



* 5 3 0 9 5 7 9 3 2 4 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

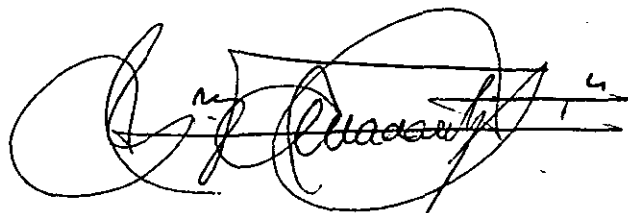
**RESPUESTAS CELULARES MEDIADAS POR LA
ACCION DE LOS ONCOGENES ras Y abl**



ARCHIVO

Memoria presentada por Dña. Mónica
López Barahona para optar al Grado
de Doctora en Ciencias Químicas.

EL DIRECTOR

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ysidro Valladares Sánchez', written over a horizontal line. The signature is highly stylized and cursive.

Fdo.: Ysidro Valladares Sánchez
Profesor de Investigación del C.S.I.C.

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA ONCOLOGICA
(Centro coordinado del Consejo Superior de Investigaciones Científicas)

A MIS PADRES Y HERMANO

Este trabajo se realizó en:

- Los laboratorios de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Gregorio Marañón de Madrid.
- El departamento de Laboratory Medicine del M.D. Anderson Cancer Center de Houston (Texas).

Quiero expresar mi agradecimiento:

Al Dr. Ysidro Valladares Sánchez, director de este trabajo, que junto con el Dr. Ysmael Alvarez han orientado y supervisado la realización del mismo.

A D. Angel Martín-Municio que con su continuo seguimiento, apoyo e interés, ha hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

A la Dra. Nieves Olmo por su constante labor de tutoría.

A todas las personas del laboratorio de Medicina y Cirugía Experimental (Hospital Gregorio Marañón de Madrid) y del departamento de Laboratory Medicine (M.D. Anderson Cancer Center de Houston) que colaboraron en el desarrollo de este trabajo.

"EL ESTUDIO DE LOS ONCOGENES PUEDE NO SER LA MEJOR
ESPERANZA PARA DESTERRAR EL CANCER. PUEDE SER LA UNICA
ESPERANZA"

Dr. Sharp, director del Centro de Investigaciones Oncológicas del
MIT.

INDICE

| | |
|---|----|
| INDICE..... | 1 |
| ABREVIATURAS..... | 3 |
| INTRODUCCION..... | 5 |
| Oncogenes y proto-oncogenes..... | 5 |
| Funciones biológicas codificadas por oncogenes y proto-oncogenes..... | 10 |
| Relaciones entre la quimera bcr-abl y el oncogén ras..... | 28 |
| Transducción de señales a través de membrana..... | 30 |
| OBJETIVOS..... | 41 |
| MATERIALES Y METODOS..... | 42 |
| Líneas celulares..... | 42 |
| Marcaje isotópico de cultivos celulares..... | 45 |
| Análisis de los productos del metabolismo de fosfolípidos..... | 47 |
| Purificación de inmunoglobulinas de suero y fluido ascítico..... | 50 |
| Marcaje isotópico de anticuerpos con ^{125}I | 51 |
| Recubrimiento de partículas de poliestireno con moléculas de anticuerpo..... | 53 |
| Obtención de lisado de células K562, HL-60 y NB4..... | 54 |
| Radioinmunoensayo en fase sólida tipo "sandwich"..... | 55 |
| RESULTADOS..... | 57 |
| Activación del metabolismo de fosfolípidos en células transformadas por un mutante de K1-ras sensible a temperatura | 57 |

| | |
|--|-----|
| Síntesis de DNA inducida a 32°C en un mutante de Ki-ras sensible a temperatura de..... | 66 |
| Efectos del suero en liberación de Pcho y síntesis de DNA en fibroblastos normales..... | 68 |
| Puesta a punto de condiciones para el recubrimiento de partículas de poliestireno con el anticuerpo correspondiente..... | 70 |
| Reconocimiento de p210 por la combinación de diferentes anticuerpos en ensayo tipo "sandwich"..... | 73 |
| Curvas de dosis-respuesta en reconocimiento de p210 por anti-bcr frente a exon I (72 y 92) y anti-abl-1..... | 83 |
| Reconocimiento de p210 tras modificación introducida en el ensayo tipo "sandwich"..... | 86 |
| Reconocimiento de distintas IgG por anti-abl-1 en ensayo tipo "sandwich"..... | 89 |
| DISCUSION..... | 91 |
| CONCLUSIONES..... | 108 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 109 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| AA | Acido araquidónico |
| ACTH | Hormona adrenocorticotropa |
| ADP | Adenosín difosfato |
| Ala | Alanina |
| AML | Leucemia mieloblástica aguda |
| AMPc | Adenosín monofosfato cíclico |
| APMSF | Fluoruro de 4-aminodifenilmetanosulfonilo |
| Arg | Arginina |
| Asp | Acido aspártico |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| CML | Leucemia mieloblástica crónica |
| CSF | Factor estimulante de formación de colonias |
| Cys | Cisteína |
| Cho | Colina |
| DAG | Diacilgliceroles |
| DNA | Acido desoxirribonucleico |
| DNAC | Acido desoxirribonucleico complementario |
| EGF | Factor de crecimiento epitelial |
| EGFR | Receptor para el factor de crecimiento epitelial |
| FGF | Factor de crecimiento fibroblástico |
| GAP | Proteína activadora de la enzima hidrolítica de GTP |
| GDP | Guanosín difosfato |
| GF | Factor de crecimiento |
| GFR | Receptor para factor de crecimiento |
| Gln | Glutamina |
| G3P | Glicerol-3-fosfato |
| GPC | Glicerofosfocolina |
| GTP | Guanosín trifosfato |
| GTPasa | Enzima hidrolítica de GTP |
| Gly | Glicina |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta presión |
| Ile | Isoleucina |
| IP | Inositol monofosfato |
| IP ₂ | Inositol-1,4-bifosfato |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-trifosfato |
| IP ₄ | Inositol-1,3,4,5-tetraquisfosfato |
| IPs | Inositoles fosfato |
| KDa | Kilodaltons |

| | |
|------------------|---|
| MAG | Monoacilgliceroles |
| NGF | Factor de crecimiento nervioso |
| PA | Acido fosfatidico |
| PAF | Factor activador de plaquetas |
| PAP | Fosfatidico fosfatasa |
| PBS | Solución de fosfatos reguladora |
| PBSG | Solución de fosfatos reguladora con gelatina |
| PC | Fosfatidilcolina |
| Pcho | Fosforilcolina |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PE | Fosfatidiletanolamina |
| PEt | Fosfatidiletanol |
| Ph | Cromosoma de Filadelfia |
| pl | Punto isoelectrico |
| PI | Fosfatidilinositol |
| PIP | Fosfatidilinositol-4-fosfato |
| PIP ₂ | Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato |
| PIPs | Fosfolinosítidos |
| PKC | Proteína quinasa C |
| PL | Fosfolípidos |
| PLA | Fosfolipasa A |
| PLC | Fosfolipasa C |
| PLD | Fosfolipasa D |
| Pro | Prolina |
| REP | Proteína promotora de intercambio de nucleótidos en ras |
| RNA | Acido ribonucleico |
| SBF | Suero bovino fetal |
| Ser | Serina |
| TCA | Acido tricloroacético |
| TGF | Factor de crecimiento transformante |
| Thr | Treonina |
| Tyr | Tirosina |
| Val | Valina |

INTRODUCCION

Desde hace tan sólo algo más de diez años la aparición y/o el desarrollo de enfermedades neoplásicas se ha asociado con la alteración de ciertos agentes relacionados con el crecimiento y la diferenciación celular normal.

Entre estos reguladores se incluyen varias hormonas, factores de crecimiento, proteínas producto de proto-oncogenes y de oncogenes, segundos mensajeros celulares, etc. (1,2).

A continuación se detallan algunos de los aspectos más relevantes en el campo de la bioquímica sobre la investigación en oncogenes y proto-oncogenes, factores de crecimiento y mecanismo de transducción de señales.

Oncogenes y proto-oncogenes

Los oncogenes se han definido como genes víricos o celulares que pueden inducir una o más características de la transformación tumoral cuando se introducen solos o en combinación con otro gen en el tipo de célula apropiado (3).

La mayoría de los genes se han aislado de retrovirus transformantes (tabla 1), que actúan como transductores de oncogenes. Los genomas de estos virus poseen sólo una millonésima parte del DNA contenido en la célula, con lo que parece evidente que esta pequeña cantidad de información genética es suficiente para generar una transformación maligna.

Tabla 1.-Retrovirus transformantes y sus respectivos oncogenes

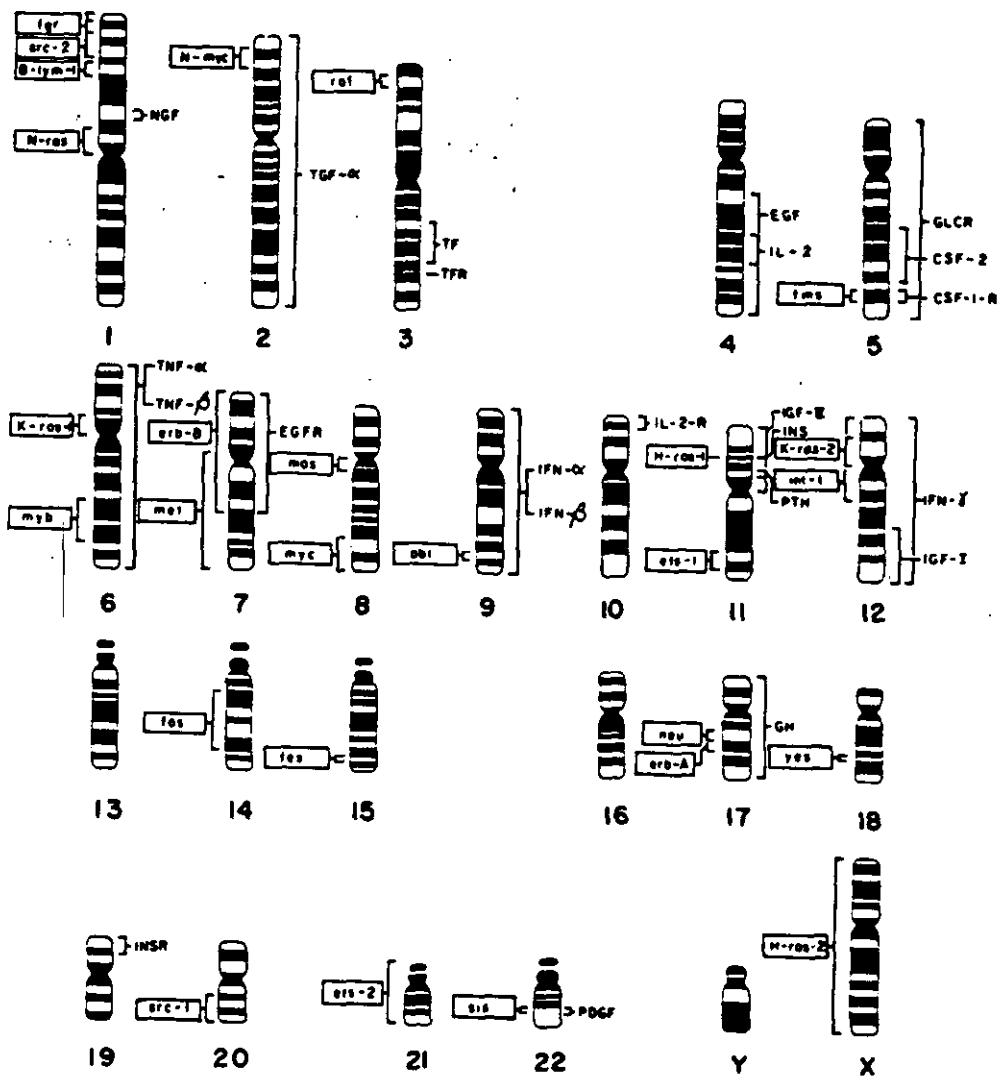
| Oncogén | Origen | Virus |
|---------|---------|------------|
| abl | Roedor | A-MuLV |
| erb-A | Ave | AEV |
| erb-B | Ave | AEV |
| fes | Felino | ST-FeSV |
| fms | Felino | MD-FeSV |
| fos | Roedor | FBJ-MOV |
| mht | Ave | MH2-ACV |
| mos | Roedor | M-MuSV |
| myb | Ave | AMV |
| myc | Ave | MC29-AMCV |
| raf | Roedor | 3611-MuSV |
| Ha-ras | Roedor | Ha-MuSV |
| Ki-ras | Roedor | Ki-MuSV |
| ros | Ave | UR11-ASV |
| sis | Primate | SSV |
| sk1 | Ave | SKV 770 AV |
| src | Ave | RSV |
| yes | Ave | Y-ASV |

Los oncogenes víricos derivan de secuencias de origen celular denominadas proto-oncogenes o c-onc (4).

Por tanto, pueden definirse los proto-oncogenes como aquel conjunto de genes celulares normales que como consecuencia de cambios genéticos pueden transformarse en oncogenes.

Se han detectado proto-oncogenes en todas las especies de vertebrados estudiados, así como en ciertos hongos (5) y en arqueobacterias (6).

El número de proto-oncogenes se limita probablemente a unas dos docenas, y la mayoría de los conocidos hasta ahora ya se han asignado a cromosomas particulares, tal y como se muestra en el esquema:



MODOS DE ACTIVACION DE PROTO-ONCOGENES

Hasta la fecha se conocen varios modos según los cuales un proto-oncogén se transforma en oncogén:

1.- MUTACIONES

1.1.- Inducidas por inserción de DNA retroviroico.

Cuando un retrovirus infecta una célula el RNA de su genoma se copia a DNA por la transcriptasa inversa, y este DNA se integra en el propio genoma celular.

La integración es potencialmente mutagénica y por tanto potencialmente carcinogénica, ya que pueden alterarse genes celulares vitales o bien quedar bajo el control de señales reguladoras víricas (7).

1.2.- Inducidas por un agente cancerígeno.

Distintos agentes físicos y químicos se han identificado como mutágenos que eventualmente pueden conducir a la transformación tumoral (tabla II).

La frecuencia de genes mutados en cáncer humano es esporádica, pero existen hoy en día varios ejemplos en los que la carcinogénesis elemental reproduce el mismo neoplasma y porta el mismo gen mutado.

Tabla II.- Oncogenes inducidos por mutaciones

| Fuente del oncogén | Carcinógeno | Oncogén |
|--------------------------|----------------------|----------|
| papiloma/carcinoma ratón | Dimetilbenzantraceno | c-Ha-ras |
| carcinoma mama ratón | Nitrosometilurea | c-Ha-ras |
| neuro-glioblastoma rata | Etilnitrosourea | c-neu |
| linfoma timo ratón | Nitrosometilurea | N-ras |
| linfoma timo ratón | Radiación gamma | c-Ki-ras |

2.- TRANSLOCACION CROMOSOMICA

Supone un intercambio entre segmentos de ciertos cromosomas que se redistribuyen situándose contiguo uno al otro. La translocación puede afectar bien a la expresión o bien a los productos proteicos de los proto-oncogenes, y suele ser un fenómeno característico de ciertos linfomas y leucemias.

En el linfoma de Burkitt la translocación yuxtapone el proto-oncogén c-myc (normalmente localizado en el cromosoma 8) con un gen para inmunoglobulina situado en el cromosoma 14 (8). Esta translocación perturba el control de c-myc y potencia el crecimiento tumoral de células B (9).

Otra translocación cromosómica de gran interés en biología molecular actualmente es la que genera el denominado cromosoma de Filadelfia (Ph). Este cromosoma fué el primer marcador cariotípico que se encontró para caracterizar una enfermedad neoplásica humana particular denominada leucemia mieloblástica crónica (CML) (10).

La CML es un desorden mieloproliferativo clonal que se origina por una transformación neoplásica de células pluripotenciales a partir de las cuales se generan los granulocitos, eritrocitos, plaquetas, monocitos, macrófagos y linfocitos B (11). Una característica de esta enfermedad son sus fases clínicas. La fase crónica relativamente benigna, que se distingue por hiperplasia de granulocitos maduros funcionales, progresa inevitablemente hacia una crisis blástica en la que predominan los blastos inmaduros. Las células leucémicas positivas para Ph tienen una gran ventaja en crecimiento frente a las células normales de la médula espinal, y normalmente todas las células nucleadas de la médula son Ph-positivas en el momento que se diagnostica la enfermedad. Las células Ph-negativas persisten, pero su crecimiento está aparentemente suprimido por las células leucémicas. (12-14). La enfermedad se transforma en una leucemia agresiva cuatro años después de haberse diagnosticado. Las células Ph-positivas pierden la capacidad de diferenciación, y la acumulación de blastos indiferenciados es responsable directa o indirectamente de un desenlace fatal. Las causas de CML y el mecanismo que determina su progresión son todavía hoy desconocidos. Se trata de una enfermedad normalmente letal y adquirida, de cuya etiología no hay más indicios que el aumento de riesgo en individuos expuestos a radiación ionizante.

Los esfuerzos de la biología molecular en este campo se dirigen a una mejora en el diagnóstico y en la comprensión de los procesos moleculares que hacen posible que se desarrolle la enfermedad.

Se viene realizando durante los últimos años en varios laboratorios un estudio detallado de la estructura y expresión de los oncogenes implicados directamente en la génesis del cromosoma de Filadelfia; así como de otros que hoy también se creen relacionados con el proceso, como es el caso del oncogén ras. Este último aspecto se matizará más adelante, ya que ciertas rutas activadas por ras han sido objeto de estudio en este trabajo.

La aberración de Filadelfia es el producto de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 en la que el oncogén c-abl se desplaza desde su posición habitual sobre el extremo distal del brazo q del cromosoma 9 a una región restringida (5-6 Kb) del cromosoma 22 denominada bcr (15,16). La región del cromosoma 22 en la que se produce la rotura se encuadra dentro de una zona de codificación para un gen relativamente largo (>50 Kb) denominado bcr (17). (Se profundizará más adelante en las características de los dos genes implicados en este proceso).

Por tanto, el oncogén bcr-abl es un producto del cromosoma de Filadelfia que codifica para una proteína quimérica de 210 KDa -p210- con actividad tirosina quinasa (tyr-quinasa), cuya presencia se ha constatado en CML (18). De hecho, más de un 92% de los pacientes a los que se les diagnostica una CML son Ph-positivos.

Hasta la fecha no se ha puesto a punto un ensayo de tipo inmunológico para p210 en lisados celulares. Este ensayo podría conducir a la identificación de la proteína en suero, lo que supondría un indiscutible avance en el campo de los marcadores tumorales. Concretamente estas determinaciones han supuesto gran parte del trabajo desarrollado en esta tesis doctoral.

3.- AMPLIFICACION

Supone la aparición de 10, 15 o 100 copias del gen en lugar de las 2 copias normales. Esto provoca un aumento de la concentración de la proteína expresada y normalmente conduce a un crecimiento desordenado.

Se ha observado amplificación del proto-oncogén c-myc en neuroblastomas humanos y carcinomas de pulmón, así como en retinoblastomas (19-21).

4.- TRUNCACION

Un claro ejemplo de este fenómeno es el que aparece en la línea A431 (células tumorales epiteliales). En ellas se aprecia una pérdida de información en el oncogén erb-B, lo cual pone de manifiesto que la síntesis de una oncoproteína truncada estimula permanentemente el crecimiento celular (22). Procesos de delección en el gen del retinoblastoma tienen también como consecuencia una proliferación irrestringida (23).

Funciones biológicas codificadas por oncogenes y proto-oncogenes

Haciendo uso de aproximaciones experimentales se han intentado revelar las propiedades bioquímicas de las proteínas codificadas por oncogenes y proto-oncogenes. La posibilidad de discernir la secuencia de nucleótidos de genes clonados se ha utilizado para deducir la estructura primaria de oncoproteínas; el empleo de anticuerpos junto con la bioquímica de proteínas y los procedimientos de fraccionamiento celular han sido útiles para determinar el tamaño, la localización celular y las modificaciones químicas de las proteínas codificadas por estos genes y ensayos de tipo enzimático y otros han aclarado en parte las consecuencias biológicas de la expresión oncogénica.

En base a estos criterios, la mayoría de los oncogenes conocidos se han agrupado en familias funcionales a saber:

- 1.-Oncogenes y factores de crecimiento.
- 2.-Oncogenes funcionando como factores de transcripción.
- 3.-Familia de oncogenes que codifican para proteínas quinasas.
- 4.-Oncogenes como transductores de señales.- Familia ras.

1.-ONCOGENES Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Agentes claramente implicados en el crecimiento celular son los nutrientes y las hormonas, en cuanto a factores químicos se refiere, y el contacto célula -célula, así como la capacidad de adhesión en lo que concierne a factores físicos.

Recientemente se han descubierto un número de péptidos denominados factores de crecimiento (GFs) que están implicados en la proliferación celular. La unión de los GFs a receptores específicos de membrana desencadena una cascada de reacciones conocida como transducción de señales, en las que se incluyen diferentes rutas metabólicas que conducen en último término a una proliferación celular.

La regulación de la síntesis y el metabolismo de los GFs y de sus receptores (GFRs) tiene capital importancia en el control del crecimiento celular. Errores en este control tienen como consecuencia una proliferación irrestringida que no será acorde con la disponibilidad de nutrientes ni en último término con la supervivencia del organismo.

Desde hace tiempo se reconoció que las células "in vitro" requieren suero para crecer, y aunque el suero contiene la mayoría de las sustancias promotoras del crecimiento, el primer GF se aisló de tejido.

Fue un péptido denominado factor de crecimiento nervioso (NGF), específico para neuronas del sistema nervioso simpático (24). Durante la purificación del NGF Stanley Cohen detectó otro factor capaz de inducir la apertura del párpado del ojo en ratas y ratones (25), y en reconocimiento a la importancia del desarrollo epitelial en este proceso, el factor se denominó factor de crecimiento epitelial (EGF); junto con estas proteínas otros factores de crecimiento que se encuentran dentro de los mejor estudiados son: factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), factores de crecimiento transformantes (TGFs), factor estimulante de formación de colonias (CSF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Todos los polipéptidos mencionados son capaces de estimular la síntesis de ácido desoxirribonucleico (DNA) cuando se encuentran en el cultivo de las células blanco apropiadas, y en algunos tejidos los factores de crecimiento no sólo se requieren para la proliferación de las células inmaduras, sino también para la supervivencia de las ya maduras (26). Bajo la influencia del factor de crecimiento, las células que lo requieren para sobrevivir son capaces de seguir un programa de diferenciación. Además, estas proteínas pueden incrementar la eficacia fisiológica de células maduras tales como macrófagos (26) y neutrófilos (27).

Puesto que todos los factores de crecimiento afectan en uno u otro modo al ciclo de división celular, conviene detallar este último con el fin de comprender mejor los tipos de regulación que pueden ejercerse sobre él (figura 1).

Ciclo celular de una célula eucariótica

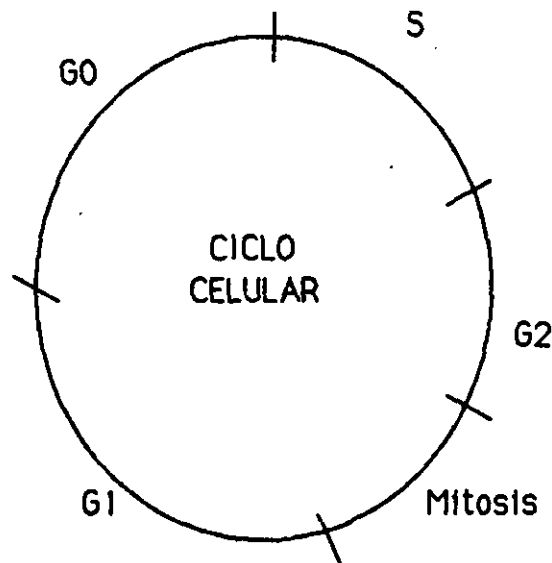


Figura 1.- Etapas del ciclo celular

Se distinguen en él cinco etapas:

1.- Etapa S : Período durante el cual se sintetiza el DNA. Su duración oscila entre 3 y 6 horas.

2.- Etapa GAP2 o G2 : Su duración es de 1 a 2 horas, es el intervalo premitótico.

3.- Etapa M : Período de 1 a 2 horas de duración durante el que se realiza la mitosis.

4.- Etapa GAP o G1 : presenta una duración variable y es el período comprendido entre la mitosis y la fase de síntesis del DNA.

5.- Etapa G₀ : fase en la que se encuentran las células que por circunstancias variables no están preparadas para la división. Se denomina también estado de quiescencia.

Hay un gran número de condiciones que pueden hacer que una célula entre en estado quiescente; tales como limitación de suero o de ciertas hormonas, de aminoácidos como isoleucina (Ile) o glutamina (Gln), de glucosa o de ciertos lípidos en el medio celular (28). Otras causas que pueden conducir a la célula al estado mencionado son altos niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), alta densidad celular, presencia de drogas como cicloheximida, etc (29).

* Punto de restricción : Lugar decisivo en la fase G1 del ciclo en que la célula se encuentra en la situación de compromiso entre proseguir hacia la fase S o permanecer en G1 hasta que surjan condiciones mejores para la replicación. Las células que opten por esto último se encontrarán en fase G₀. Si la célula avanza hacia S deberá completar el ciclo para volver a G1 pues si éste se bloquea en alguna de las fases la célula morirá.

No está aún perfectamente establecido el modo de control bioquímico sobre el punto de restricción. Rossow y col. (30) han propuesto un modelo que relaciona este control con la síntesis de una proteína lábil con vida media ≤ 2 horas y por tanto muy sensible a condiciones limitantes para síntesis de proteínas. Una vez que R alcanza los valores críticos la célula puede entrar en fase S, sintetizar DNA y progresar a lo largo de otras fases. Cabe pensar que las células tumorales presenten alterado el control de la síntesis o degradación de la proteína R o bien hayan disminuido su requerimiento de ésta (30).

Se ha propuesto que GFs del suero pueden llegar a inducir la síntesis de esta proteína R. Así, según Pledger y col. la transición de G₀ a G₁ se divide en dos fases:

-Competencia. En esta fase las células se encuentran en el límite entre la fase G₀ y G₁. Ciertos GFs estimulan a las células capacitándolas para responder a factores derivados del plasma los cuales permiten continuar el ciclo.

-Progresión. En esta fase las células pueden progresar a lo largo de G₁. Este estado se induce por otro grupo de GFs que actúan sobre células competentes permitiéndoles avanzar hacia S.

Siguiendo este modelo, puede establecerse una clasificación para los GFs en:

| | |
|-------------------------|----------------------------------|
| Factores de competencia | PDGF |
| | FGF |
| | Ca ⁺⁺ , fosfato ,etc. |
| Factores de progresión | EGF |
| | Insulina |
| | Somatomedina C,etc. |

Por otra parte, factores producidos por células transformadas o tumorales son capaces de inducir transformación transitoria en cultivos celulares. La producción incontrolada de factores de crecimiento o de factores de crecimiento mutados puede afectar a:

- La propia célula productora (estimulación autocrina).
- Células adyacentes (estimulación paracrina).
- Células distantes (estimulación endocrina).

Pero la primera evidencia que claramente unió los factores de crecimiento con los oncogenes fué el hecho de que el oncogén v-sis (oncogén del virus de sarcoma de simio) codifique para la cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) lo que quedó demostrado al comparar la secuencia parcial aminoacídica del PDGF con la de la proteína de v-sis (31, 32).

Es interesante hacer notar que el oncogén c-erb, presente en el genoma de todos los vertebrados estudiados incluyendo el hombre (33), y que posee variedades víricas en el virus de eritroblastosis de aves denominadas: v-erbA y v-erbB, presenta una gran homología estructural con el receptor humano para EGF aislado de la línea A431 o de placenta (34).

En efecto, el producto del oncogén v-erbB corresponde a una forma truncada del receptor para EGF; las proteínas codificadas por v-erb B contienen exclusivamente las regiones transmembrana y tyr-quinasa del EGFR, perdiéndose en gran extensión la región extracelular para unión de EGF (34). En consecuencia, las proteínas de v-erbB corresponden a un receptor de GF que ha perdido la región reguladora de unión, pero retiene la localización de membrana y los dominios con actividad bioquímica. Se trata por tanto de un receptor desregulado que podrá expresarse constitutivamente en estado activado.

Por otra parte anticuerpos generados frente a la proteína sintética pp60 v-src interaccionan específicamente con el EGFR (35). Lo cual indica que la región tyr-quinasa y la proteína pp60 v-src están antigénicamente relacionadas. Una analogía antigénica similar existe con oncogenes de la familia src tales como yes, y con otros que codifican para quinasas independientes de receptor como fes, mos, fps y abl (36).

2.- ONCOGENES FUNCIONANDO COMO FACTORES DE TRANSCRIPCION

En los primeros años del desarrollo de la oncología molecular se pensó que las proteínas transformantes podrían funcionar en el núcleo, donde se da la replicación del DNA y la síntesis del ácido ribonucleico (RNA). Y el primer estudio de una oncoproteína, el antígeno SV40 T, apoyó esta idea.

Con el paso de los años, las proteínas producto de los oncogenes se han localizado en citoplasma, núcleo, e incluso en el espacio extracelular. Sin embargo actualmente se ha enfatizado el estudio de lo que se ha dado en llamar: "oncogenes nucleares", de los cuales algunos de los más importantes se detallan en la tabla III.

Tabla III.- Oncoproteínas nucleares

| Oncoproteína | Cromosoma humano | Función |
|--------------|------------------|-----------------------------|
| c-Myc | 8q24 | ? |
| c-Myb | 6q22-24 | Transcripción |
| c-Fos | 14q21-31 | Regulación de transcripción |
| c-ErbA | 17 | Receptor hormonas tiroideas |
| c-Jun | 1p31-32 | Regulación de transcripción |
| p53 | 17p13 | Supresor transformación |
| c-Ski | 1q22-24 | ? |
| c-Ets-2 | 21q22.3 | ? |
| c-Rel | 1p12-13 | ? |

Se han producido rápidos avances tras el descubrimiento de un retrovirus oncogénico de aves denominado v-jun (37) que parece estar relacionado con procesos de transcripción según muestran los siguientes hechos.

La traducción de la secuencia nucleotídica de v-jun presenta gran homología aminoacídica con el factor de transcripción de levaduras codificado por el gen GCN4 (38).

-La proteína de GCN4 y el factor de transcripción de mamíferos AP-1 unen la misma secuencia corta de DNA (39).

-C-jun codifica la parte mas importante de AP-1 (40).

-Una proteína de 39000 daltons que está asociada con proteínas nucleares esta incluida en la secuencia de los oncogenes c-fos y v-fos (41).

Existe también otra colección de resultados que apunta hacia un papel importante de los oncogenes nucleares en el control de la transcripción:

1.- El potencial transformante del gen E1A de adenovirus está genéticamente unido con regulación de transcripción, predominantemente con represión (42).

2.- Una secuencia de la proteína de c-myc es similar a la de algunos de los factores de transcripción de mamíferos (43).

3.- La proteína de v-erbA está relacionada con los receptores de glucocorticoides y de otras hormonas esteroídicas, que son activadores de transcripción dependientes de ligando (44) y recientemente se ha identificado a los productos de c-erbA con receptores de hormonas tiroideas (45).

Quizás un mayor conocimiento de las oncoproteínas nucleares nos pueda aportar información acerca no sólo de los fenómenos de transcripción, sino de transducción de señales desde el citoplasma y la membrana hasta el núcleo, actuando ellas mismas como transductoras (como puede ser el caso de c-myc y c-fos); y en último término pueda aclarar el papel de la estructura nuclear integrando estos acontecimientos con otros procesos celulares.

3.-FAMILIA DE ONCOGENES QUE CODIFICAN PARA PROTEINAS QUINASAS

Al menos la mitad de los más de 20 proto-oncogenes hoy conocidos codifican para proteínas con capacidad de fosforilar ciertos polipéptidos (46, 47).

Esto sugiere que la fosforilación de proteínas desempeña un papel central en la regulación de la multiplicación celular, y que un gran número de proteínas quinasas ejercen control sobre este proceso en células normales, control que se puede perturbar en células tumorales.

Si bien el dominio catalítico de las proteínas quinasas está muy conservado (48), cada enzima posee un único dominio o dominios que le permite la regulación de su actividad.

Las proteínas quinasas oncogénicas inducen transformación a través de una inapropiada o excesiva fosforilación de polipéptidos.

En la tabla IV se expone una clasificación de estas enzimas en base al sustrato que fosforilan y a su localización celular.

Tabla IV.- Proteínas quinasas oncogénicas

Proteínas tyr-quinasas

-Asociadas a membrana

*Relacionadas con receptores de factores de crecimiento

v-erbB (deriva de receptor de EGF)
proteína neu (erbB2)
proteína v-fms (deriva del receptor de CSF)
proteína v-kit
proteína met
proteína trk
proteína ret
proteína v-ros
proteína v-sea

*Familia src

proteína v-src (pp60 v-src)
proteína v-yes
proteína v-fgr
proteína lck

-Citoplásmicas

proteína v-fps (v-fes)
proteína v-abl

Proteínas Ser-quinasas

proteína v-mos
proteína v-raf (v-mil)
proteína pim-1

Efectivamente, la fosforilación de proteínas debe tener un papel importante en la regulación de la división celular, ya que receptores para al menos cuatro factores de crecimiento (EGF, PDGF, CSF y factores de crecimiento semejantes a insulina) son proteínas quinasas (46, 47, 49). Lo anterior sugiere que la división celular puede estar iniciada por una fosforilación de proteínas inducida por la unión del GF a su receptor, y que las proteínas quinasas oncogénicas inducen un crecimiento incontrolado a través de la fosforilación crónica de los sustratos normales para factores de crecimiento.

Las formas activas de todos los oncogenes conocidos que codifican para quinasas funcionan como elementos genéticos transformantes dominantes, pero ¿cuál es el mecanismo de activación? En casi todos los casos estudiados se ha encontrado que el oncogén vírico bien está truncado o bien presenta una mutación puntual, lo que sugiere que los productos de los oncogenes activados han adquirido actividad dominante transformante gracias a una alteración estructural.

La primera proteína oncogénica con actividad quinasa que se identificó fué pp60 v-src (codificada por el virus del sarcoma de Rous) que se encuentra localizada en la membrana plasmática (50). Su actividad quinasa es concretamente tyr-quinasa (51, 52), lo cual no dejó de ser sorprendente, ya que la creencia extendida con anterioridad a este hallazgo era que cualquier fosforilación de una proteína celular se llevaba a cabo en residuos de serina (Ser) o treonina (Thr), dado que en la mayoría de las células sólo un 0.1%-1% es fosfotirosina (48).

La fosforilación en Ser y Thr es importante en la transducción de señales. Por ejemplo la proteína quinasa C (PKC), que es una serina quinasa se activa por diglicéridos (DAG) que a su vez derivan de la activación de fosoflipasa C (PLC). Sobre estas dos actividades enzimáticas se profundizará más adelante.

Posteriormente se puso de manifiesto que no solo v-src, sino también c-src presenta actividad tyr-quinasa, y ésto es extensivo a todos los homólogos celulares de los oncogenes víricos que presentan esta actividad enzimática (53).

La discrepancia entre el número de enzimas y el nivel de fosfotirosina indica que las tyr-quinasas celulares se encuentran normalmente bajo un estricto control negativo, control que suele abolirse cuando una tyr-quinasa oncogénica se pone de manifiesto.

Es difícil identificar cuáles son las moléculas blanco de la acción de las quinasas, sin embargo estudios recientes apuntan la posibilidad de que en la mayoría de las ocasiones se trate de otras quinasas (54). Lo cual conduciría a una cascada de fosforilaciones con importante significado biológico.

El oncogén *abl* pertenece a esta familia de *tyr*-quinasas, y dado que forma parte de los estudios realizados en esta tesis se detallan a continuación los modos de activación que de él se conocen en la actualidad.

La activación de *c-abl* puede darse por incorporación a genoma retrovívico y por una translocación cromosómica que ya se ha mencionado (55) (figura II).

En ambos casos el oncogén *abl* se expresa como una proteína quimérica con secuencias ajenas situadas en la zona N-terminal.

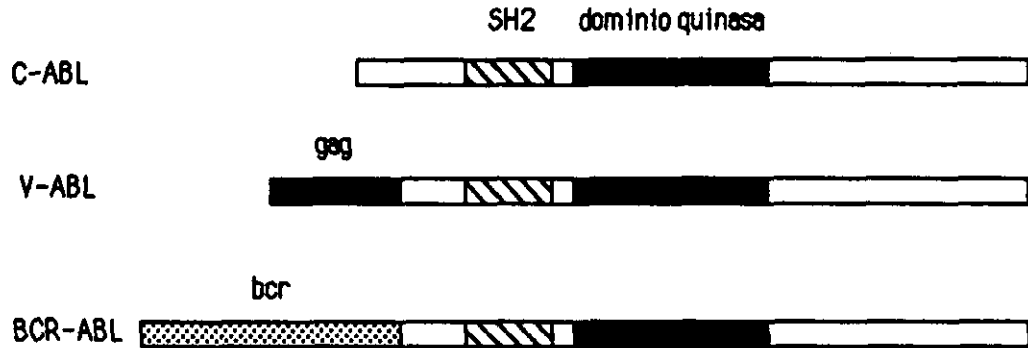


Figura II.- Modos de activación de *abl*

En el oncogén vírico, *v-abl*, la secuencia amino terminal *gag* provee una señal de miristilación, con lo que *gag-abl* será una proteína asociada a membrana.

En la translocación cromosómica, que como se ha indicado se produce entre los cromosomas 9 y 22, se origina la quimera *bcr-abl* en la cual un segmento de la zona amino terminal de la proteína *bcr* se une al primer exón común de *c-abl*, reemplazándose de este modo el primer exón variable.

De lo anteriormente expuesto se deduce que la pérdida de la zona amino terminal del oncogén *abl* debe ser esencial para la activación oncogénica y probablemente, esta región N-terminal actúa como un regulador negativo de la actividad *tyr*-quinasa. Pero la simple eliminación del exón variable no es suficiente para la activación oncogénica de *c-abl*. Por tanto, la unión de la zona N-terminal de *bcr* podría aportar una función crítica a la proteína *bcr-abl*.

Los datos que se tienen hasta la fecha acerca de la actividad quinasa de ciertos oncogenes parecen no ser más que el comienzo de las investigaciones de lo que podrá ser un amplio campo de la biología molecular, ya que se ha especulado que puede haber cerca de 1000 genes para proteínas quinasas en el genoma humano; y si esto es verdad, se puede anticipar que existen muchos más oncogenes con actividad *tyr*-quinasa a la espera de ser descubiertos.

4.- ONCOGENES COMO TRANSDUCTORES DE SEÑALES .- FAMILIA RAS

Los oncogenes ras se detectaron en primera instancia como los genes transformantes del los virus de sarcoma murino Harvey y Kirsten (Ha-MSV y Ki-MSV) (56, 57). Análisis moleculares pusieron de manifiesto que los virus mencionados contenían secuencias en sus genomas que no estaban presentes en los de los virus parentales. Estas nuevas secuencias se habían adquirido como resultado de una transducción viral de genes celulares y por tanto fueron candidatas a ser responsables de la transformación oncogénica.

Lo anterior quedó demostrado completamente cuando se observó que fragmentos subgenómicos de Ha-MSV que contenían exclusivamente secuencias derivadas de células eran capaces de transformar (58).

Mediante el empleo de anticuerpos se identificaron las proteínas codificadas por estos virus . Los anticuerpos reaccionaron con una fosfoproteína de 21000 daltons denominada p-21 . El gen de p-21 se mapeó de la región de DNA viral que se sabe de origen celular, y además en células normales se han aislado proteínas p-21 (59). Por tanto, se pudo concluir que el gen para p-21 es un oncogén de los virus Ha-MSV, Ki-MSV, y otros estrechamente relacionados y que este oncogén deriva de una forma proto-oncogénica presente en células normales.

Las proteínas ras p-21 unen nucleótidos de guanina con gran afinidad (60) y están localizadas en la cara interna de la membrana plasmática (61). Las cuatro especies de proteínas ras producidas por mamíferos (Ha-ras, Ki-ras2A, Ki-ras2B, y N-ras) muestran muchas propiedades comunes. Los primeros 85 aminoácidos son idénticos, y los siguientes 80 tienen una homología de un 85%. Estos 165 aminoácidos constituyen la zona de unión de los nucleótidos de guanina (62), así como otras regiones esenciales para la acción de ras. El alto grado de conservación observado sugiere una función común para estas proteínas, pero por otra parte, se detectan fuertes divergencias entre las secuencias comprendidas entre el aminoácido 165 y el 185, lo que indica que cada especie proteica posee también una única función. Tres aminoácidos de la zona C-terminal de cada proteína son residuos de cisteína (Cys), modificación que es esencial para la actividad oncogénica (63). Ésto ha conducido a la idea de que el sitio de acción de las formas normales y oncogénicas de p-21 es la cara interna de la membrana plasmática (figura III).

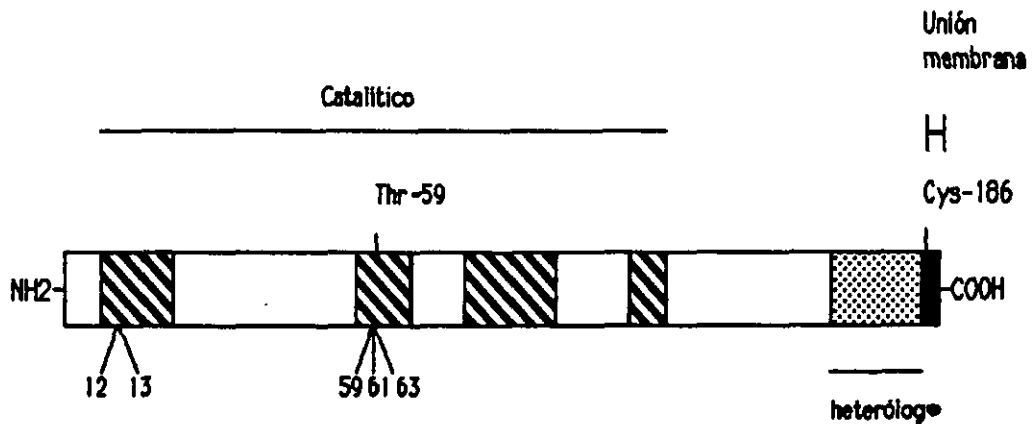


Figura III.- Regiones más destacadas de p21

Las células de mamíferos contienen además de los genes ras mencionados una familia de genes relacionados con ras.

Los más similares son raf y R-ras con homologías de 50% y 35% respectivamente, y otros miembros de la familia son: rho, rab-1, rab-2, rab-3, rab-4 y rap. Todos ellos codifican para proteínas capaces de unir nucleótidos de guanina con estructuras similares a las descritas en la región C-terminal (64-69).

Gran parte del interés que se ha desarrollado en torno a los genes ras de mamíferos se debe a su posible implicación entre las causas del cáncer humano. Las series de experimentos que condujeron a esta suposición comenzaron en 1979, cuando se demostró que DNA genómico de alto peso molecular de células transformadas inducía transformaciones morfológicas en células NIH-3T3 (62). Este experimento sugiere la existencia de genes con dominante acción transformante en estas células y provee un ensayo para su identificación. Se analizaron gran número de líneas celulares y de tipos de tumores y en la mayoría de los casos los mismos genes resultaron ser los responsables de la transformación (70, 71).

Uno de estos genes, derivado de la línea celular EJ/T24 de carcinoma de vejiga se identificó rápidamente con el homólogo humano del gen Ha-MSV ras (72, 73). Esto llevó a cuestionarse el mecanismo por el cual este gen difería de su proto-oncogén homólogo normal, que era aparentemente incapaz de transformar las NIH-3T3. La respuesta se obtuvo rápidamente, un simple cambio de base da cuenta de la activación del oncogén Ha-ras1 de carcinoma de vejiga (74, 75). Esta alteración supone un cambio de glicina (Gly) por valina (Val) en el codon número 12. La incidencia de estas mutaciones varía entre los diferentes tipos de tumores y cuestiona el papel exacto del oncogén ras activado en estas enfermedades.

Mecanismo de activación de ras

Las proteínas ras unen guanósín difosfato (GDP) y guanósín trifosfato (GTP) del mismo modo que lo hacen las proteínas G implicadas en la transducción de señales desde receptores de superficie de membrana hasta sistemas de segundos mensajeros internos. En 1979 Scolnick y colaboradores (60) sugirieron en base a esta analogía que las proteínas ras y las G deberían tener funciones similares. Las proteínas G tienen actividad GTPasa intrínseca, que no se observó en las ras, pero sin embargo estas últimas emplean GTP para su autofosforilación. Al expresar en *E. Coli* la proteína ras recombinante humana Ha-ras-1 p-21 y su homóloga oncogénica, se aclararon las razones de estas discrepancias, y la analogía con las proteínas G se puso de manifiesto.

Se encontró que ras normal posee actividad GTPasa, si bien esta es baja comparada con la de las clásicas proteínas G, y esta actividad puede estimularse bajo la acción de glicerol y de Mn^{++} (76).

La proteína ras mutada (12-valina) también presenta estas características, pero los niveles de activación son 10 veces menores. Esta fué la primera diferencia bioquímica que se encontró entre p-21 normal y transformante, que condujo al modelo que se muestra en la figura IV (77, 78).

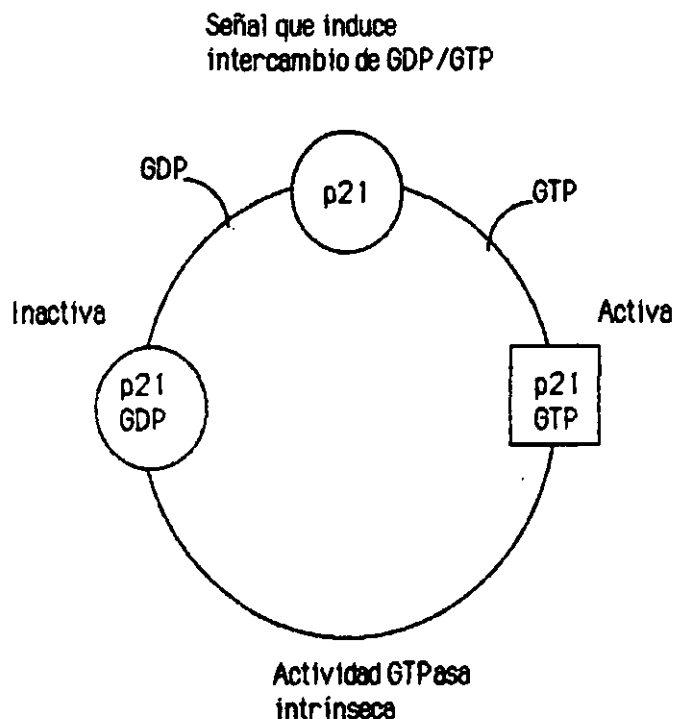


Figura IV.-Ciclo de activación/inactivación de p21

P-21 parece funcionar como intermediaria en la cascada de transducción de señales. De acuerdo con lo anterior, p-21 unida a GDP es inactiva y puede activarse por una señal, desplazándose el GDP por GTP. Esto es análogo al intercambio entre GDP y GTP que se produce en las proteínas G. P-21, ya activada, podrá actuar sobre un blanco posterior a ella en la cascada, blanco que le servirá como efector y la retornará a su estado inactivo hidrolizando el GTP a GDP.

P-21 transformante es defectiva en actividad GTPasa, por lo que continuará en estado activado durante períodos largos emitiendo señales a su efector. Esta estimulación incontrolada del efector podría conducir en último término a una proliferación celular anormal.

Tras estos resultados se analizaron muchos mutantes de ras en los que se estudió la actividad GTPasa, encontrándose que cualquier mutación en posición 12 (normalmente ocupada por Gly) excepto prolina (Pro) (72), y cualquiera en posición 61 (normalmente ocupada por Thr) (73) excepto Gly activan el potencial transformante y las proteínas mutadas invariablemente presentan reducida actividad GTPasa, de acuerdo con el modelo propuesto. También deleciones alrededor de la posición 12 (74) y mutaciones en 59 y 63 presentan el mismo efecto (75). Los oncogenes Ha-ras MSV y Ki-ras MSV presentan arginina (Arg) y Ser respectivamente en posición 12, por tanto reducida actividad GTPasa, y en posición 59 presentan la alanina (Ala) sustituida por Thr; esta mutación además de disminuir la actividad GTPasa y la afinidad por GDP, crea un nuevo sitio de autofosforilación, de modo que el gamma-fosfato del GTP se transfiere al grupo hidroxilo de la Thr en vez de al agua (77, 78). En contraposición con los resultados mencionados se ha hallado que la mutación en 12 correspondiente a aspártico (Asp) que presenta la N-ras-p-21 en la mayoría de la leucemias humanas sólo tiene un pequeño descenso en la actividad GTPasa y sin embargo es una proteína totalmente transformante (79), por lo que la reducción en esta actividad enzimática parece ser una condición necesaria pero no suficiente para que se dé la transformación tumoral.

Examinando las propiedades bioquímicas de las oncoproteínas ras en células vivas se descubrió un polipéptido en oocitos de rana capaz de estimular en gran extensión la actividad GTPasa de p-21 normal sin afectar a la de p-21 transformante. En presencia de esta proteína denominada GAP (proteína activadora de actividad GTPasa) p-21 normal presenta una actividad GTPasa 500 veces mayor que mutantes de Asp o Val en 12 (80). Tras estos resultados cabe pensar que GAP mantenga a p-21 normal en su estado inactivo (GDP.p-21) y que los mutantes escapen a este control, permaneciendo en su forma activa. Por tanto, en el modelo propuesto, la hidrólisis de GTP vendría mediada por un complejo GAP.p-21 y no exclusivamente por p-21.

Funciones bioquímicas controladas por proteínas ras

Aunque el mecanismo exacto de acción de p-21 no se conoce todavía, se han realizado algunos avances en este campo. La búsqueda de cascadas bioquímicas controladas por proteínas ras de mamíferos ha conducido a menudo a la introducción de genes ras o proteínas en ciertas líneas celulares.

El hecho de que la microinyección de p21 transformante en células NIH-3T3 indujera síntesis de DNA (81), sugirió, que por analogía con proteínas G, ras p-21 puede estar regulando la transducción de señales que activa la cascada mitogénica. Según esta hipótesis, p21 podría estar involucrada en la cascada mitogénica a nivel de metabolismo de fosfoinosítidos (PIPs) (82).

La microinyección de p21 transformante en oocitos de rana conduce al incremento de los niveles basales de DAG en estas células, sin embargo este incremento no es concomitante con la liberación de inosítoles fosfato (83). Por otra parte uno de los efectos de la mencionada proteína sobre el metabolismo de fosfolípidos (PL) en fibroblastos, es el incremento en la producción de ácido araquidónico (AA) (84).

Sin embargo, ras no parece afectar exclusivamente a procesos de proliferación, sino también a procesos de diferenciación. Así, ras transformante microinyectada en células de feocromocitoma de rata (PC12) induce diferenciación morfológica (85). Diferenciación que normalmente se produce en esta línea gracias a la acción del NGF. Por tanto, ras es capaz de abolir la necesidad de este factor.

En contraste, un bloqueo irreversible de la diferenciación se induce por ras transformante en cultivo de células de tiroides de rata (86). Además ras transformante puede bloquear la diferenciación terminal que el calcio induce en queratinocitos epidérmicos de ratón BALB/MK y abolir el requerimiento absoluto de EGF que éstos presentan normalmente (87).

Al haberse encontrado proteínas c-ras en cerebro de rata, se piensa que ras podría hallarse implicada en otras funciones distintas de la de controlar la proliferación celular (88).

La introducción de anticuerpos frente a ras en células con el ánimo de bloquear la función de esta proteína, ha demostrado que ras activa se requiere para la síntesis de DNA estimulada por suero y para la división celular, así como para la transformación de células por oncogenes con actividad tyr-quinasa (89, 90). Por otra parte la maduración que la insulina induce en oocitos se ve bloqueada por los anticuerpos mencionados (91). Puede afirmarse que la unión de GTP es esencial para la transformación ya que un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo de p-21 que incluye el residuo 12, bloquea la unión de GTP a p-21, y a la inversa, es decir, la presencia de GTP impide la unión del anticuerpo (92) y la microinyección de anticuerpos específicos para el aminoácido 12 de p-21 produce una reversión transitoria de las células transformadas a fenotipo normal (93).

Para inducir la colección de fenómenos asociados a un proceso neoplásico, se requiere además de ras activo otra serie de cambios genéticos tales como aneuploidía (94). Por último, la transformación celular por oncogenes con actividad citosólica quinasa en Ser y Thr, tales como raf y mos, no requiere actividad ras. Lo que indica que sus homólogos normales deben localizarse después de ras o paralelos a él siguiendo una ruta independiente en la cascada de transducción de señales.

La proteína candidata a actuar como efector de ras es GAP. GAP interacciona con GTP.p21 en un lugar denominado "sitio de unión del efector" (95). A continuación se muestra un esquema (figura V) en el que se detalla la acción de GAP como efectora y como reguladora de la acción de ras.

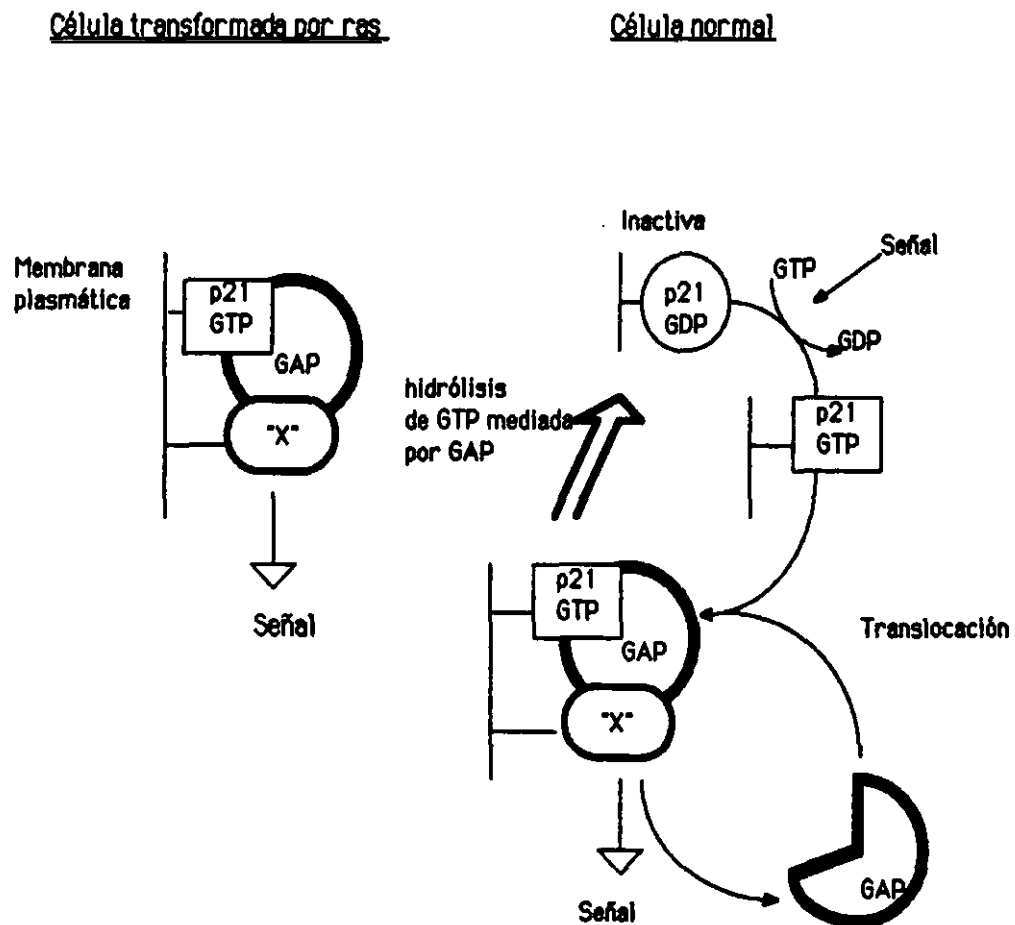


Figura V.- Acción de GAP sobre p21

GDP.p21 localizada en la membrana plasmática se transforma en GTP.p21 por un mecanismo desconocido y así puede interaccionar con GAP. GAP es una proteína citosólica que puede asociarse transitoriamente con p-21 de membrana. Durante la asociación, GTP.p21.GAP envía una señal mitogénica a la célula. La vida del complejo formado y la duración de la emisión de la señal viene limitada por la capacidad de GAP para convertir GTP.p21 en GDP.p21. Una vez que la hidrólisis se ha producido el complejo se disocia, GAP vuelve a formar parte del citosol y la señal cesa.

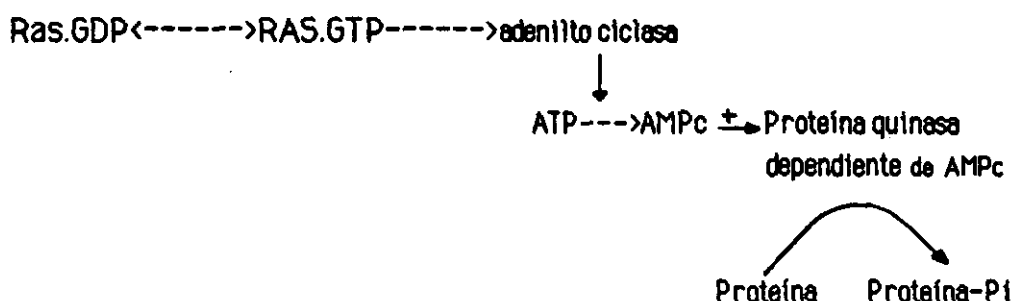
En células transformadas, la p-21 mutada no es inducida por GAP para hidrolizar GTP a GDP, por lo que el complejo no se disociará y la señal puede continuar indefinidamente.

La validez de este modelo sigue estando bajo investigación, pero si GAP es verdaderamente el efector de la acción de ras, el conocimiento de las propiedades bioquímicas de esta proteína nos ayudarían a comprender la acción de ras. GAP es una estructura proteica de 125000 daltons, cuya región amino terminal presenta cierta homología con la región reguladora de adenilato ciclasa en *S.cerevisiae* (79). Esta homología puede ser de interés como se verá más adelante. Pero quizás es de más ayuda el hecho de que GAP presente homologías importantes con tyr-quinasas que no son receptores, con fosfolipasa C, y con el oncogén crk.

En *S. cerevisiae* se mostró que la función principal de ras era regular la actividad adenilato ciclasa. El descubrimiento fué el resultado de análisis genético de cadenas de *S. cerevisiae* que contenían genes ras mutantes o defectivos (96, 97).

S.cerevisiae contiene dos genes ras (RAS1 y RAS2) que codifican para proteínas de mamíferos, y que presentan gran homología en la región de unión de GTP. Sus zonas efectoras son idénticas, mientras que la mayoría de las divergencias se dan en las regiones variables. Una mutación en Val-19 en las proteínas RAS equivale a la de Val-12 en ras de mamíferos (97).

Análisis genéticos posteriores mostraron que los productos de RAS activan adenilato ciclasa y que los mutantes en Val-19 causan producción incontrolada de altos niveles de AMPc. Como consecuencia, la quinasa dependiente de AMPc estará activada tal y como ocurre en los mutantes bcy1 caracterizados por Matsumoto (98). Por tanto, las proteínas RAS en su estado activado (GTP.RAS) son capaces de estimular adenilato ciclasa en membranas de *S. Cerevisiae* (97) según se indica a continuación.



A pesar de las analogías detectadas entre las RAS y las ras de mamíferos, las proteínas ras no parecen controlar la actividad adenilato ciclasa . En efecto, los niveles de adenilato ciclasa son menores en células transformadas por ras que en células normales y p21 purificada no activa el sistema adenilato ciclasa de membranas de células de mamíferos. El parecido entre RAS de levadura y p-21 de mamíferos puede restringirse a aspectos mecánicos de señales proteína-proteína; y probablemente la proteína con la que p21 interaccione en modo dependiente de GTP presente homologías estructurales, pero no funcionales con la adenilato ciclasa de levadura.

Ras en el contexto de biología celular y cáncer

Tras el descubrimiento de un gen ras activado en carcinoma de vejiga, se han realizado diferentes estudios con el fin de esclarecer cual es la incidencia de las mutaciones de este oncogén en cáncer humano.

Tabla V.- Incidencia de las mutaciones de ras en cáncer humano

| Tipo de tumor | Incidencia(%) | Gen ras activado |
|-------------------------|---------------|------------------|
| Pulmón (adenocarcinoma) | 30 | Ki-ras |
| Colon (adenocarcinoma) | 50 | Ki-ras |
| Carcinoma de páncreas | 90 | Ki-ras |
| Seminoma | 40 | Ki-ras, N-ras |
| Melanoma | 20 | N-ras |
| Carcinoma de vejiga | 6 | Ha-ras |
| Tiroide | 50 | Todos |
| AML | 30 | N-ras |
| CML | 10 | N-ras |

A la vista de la tabla V pueden hacerse las siguientes generalizaciones:

1.- La incidencia de las mutaciones de ras varía sustancialmente según el tipo de cáncer. Por ejemplo, la mayoría, sino todos los cánceres exocrinos de páncreas contienen genes ras activados y por el contrario estas mutaciones son muy extrañas en carcinomas de mama. De modo similar, aproximadamente el 30% de las leucemias mieloblásticas agudas (AML) y el 10% de las leucemias mieloblásticas crónicas (CML) contienen mutaciones en ras (99), pero el análisis de más de 100 casos de leucemias linfoblásticas crónicas y de linfomas no Hodgkin no revela prácticamente ninguna mutación (100)

2.- Parece existir cierto predominio en la expresión de una determinada forma de ras mutado según el tipo de cáncer, aunque, aún no se ha esclarecido la razón por la que esto puede ocurrir.

3.- En general, la presencia de genes ras activados no se correlaciona con el estadio de desarrollo de un determinado tumor.

De todo lo anterior se deduce que la detección de mutaciones en ras no tiene todavía una aplicación clara en diagnóstico que pudiera ser aprovechable en clínica.

Relaciones entre la quimera bcr-abl y el oncogén ras

Datos preliminares de Steven Collings y colaboradores sugieren que los proto-oncogenes c-abl y N-ras presentan una ruta de transducción de señales similar al menos cuando su activación tiene como consecuencia la proliferación de células pluripotenciales hematopoyéticas.

Un oncogén celular que podría estar implicado en la progresión de CML hacia la crisis blástica es el proto-oncogén N-ras. Como se ha descrito anteriormente, se han hallado mutaciones puntuales de miembros de la familia de oncogenes ras en un 10-20% aproximadamente de la amplia variedad de neoplasias humanas. Las células de leucemia mieloide aguda (AML), tal y como se ha indicado, muestran una incidencia relativamente alta de las mencionadas mutaciones puntuales, concretamente en los codones 12, 13 ó 61 del proto-oncogén N-ras (101-104, 99). Si bien se desconoce la razón por la que se producen las mutaciones puntuales en N-ras y no en otros proto-oncogenes de la familia, el hecho sugiere que se activan preferentemente ciertos oncogenes en malignidades particulares.

Dado que algunos casos de AML, como CML, conllevan la transformación de un sistema hematopoyético pluripotencial, y que la crisis blástica de CML recuerda en cuanto a fenotipo y comportamiento clínico a AML, cabe cuestionarse:

a) Si la incidencia de las mutaciones puntuales de N-ras en la crisis blástica de CML, se aproxima a la incidencia relativamente alta de este tipo de mutación que se ha observado en AML.

b) Si la adquisición de esta mutación puntual está asociada con la evolución de CML de fase crónica a crisis blástica.

La revisión de 41 muestras de pacientes de CML en fase crónica y de 3 en crisis blástica, puso de manifiesto que ninguna de ellas contenía mutaciones puntuales en los codones 12, 13, 59-63 de N-ras.

¿ Por qué las mutaciones puntuales en N-ras son relativamente frecuentes en células de AML y tan infrecuentes en células Ph-positivas de CML?

Probablemente, las mutaciones de oncogenes celulares se mantienen en células malignas porque comunican una ventaja proliferativa sobre las células que no contienen dichas mutaciones. Se sabe que los productos del gen c-abl y del N-ras están asociados con la membrana celular, y ambos pueden estar involucrados en regulación de la transducción de señales que conduce a proliferación celular.

La generación de bcr-abl o la adquisición de mutaciones puntuales en N-ras altera de algún modo la proliferación de células hematopoyéticas pluripotenciales. Si ambos oncogenes (c-abl y N-ras) están involucrados en la misma o en similar ruta de transducción de señales, y si una mutación en cualquiera de estos proto-oncogenes puede alterar significativamente su ruta regulatoria favoreciendo la proliferación, entonces una mutación puntual en N-ras puede no suponer una ventaja dramática en cuanto a proliferación en una célula que ya presenta el gen bcr-abl activado. Esto podría explicar la escasez de mutaciones puntuales demostrables en células Ph-positivas de CML.

Sin embargo una conexión definitiva entre la transducción de señales generada por abl y la que origina ras se establece en base a la existencia de una proteína de unos 60 KDa identificada por Weinberg y col. en 1990 y denominada REP (promotora de intercambio de nucleótidos en ras) (105).

Tal y como ya hemos mencionado la proteína GAP puede representar un efector tardío en la acción de p21, sin embargo los elementos regulatorios tempranos hasta la aparición de los resultados obtenidos por Weinberg y col. eran desconocidos. En base a la analogía de p21 con proteínas G puede esperarse que la estimulación de la actividad de p21 requiera un aumento en la velocidad con la que dicha proteína intercambia los nucleótidos de guanina con las reservas solubles. Y de hecho la actividad REP (identificada por el grupo mencionado en extracto de tejido humano) promueve el intercambio de nucleótidos de guanina en p21.

Las actividades REP y GAP son diferentes ya que:

- REP y GAP no coeluyen en cromatografía de intercambio iónico (105).

- REP tiene un peso molecular relativo de 60 KDa (105), mientras que el de GAP es 120 KDa.

- Los mutantes de p21 que no interaccionan con REP son diferentes de los que no lo hacen con GAP (105).

- GAP purificada no presenta actividad de intercambio de nucleótidos (106).

La actividad REP descrita por Weinberg y col. parece venir asociada con una proteína citosólica. REP actúa *in vitro* estimulando la velocidad a la que p21 intercambia GTP por GDP o GDP por GTP. Una indicación del posible significado fisiológico de este hecho, deriva del examen de los niveles de nucleótidos libres y asociados a p21 en las células.

En células normales, más del 95% de p21 está asociada a GDP (107) y la concentración de GTP citosólico es unas 20 veces la de GDP. En consecuencia, una estimulación indirecta del intercambio nucleotídico sobre p21 supondría la casi eliminación de GDP en función de una sustitución de estas moléculas por las de GTP. P21 podría, por tanto, activarse en base a su interacción con REP, y en este sentido REP sería un regulador positivo de p21.

De modo que podría tratarse del análogo en mamíferos de CDC25 en *Saccharomyces cerevisiae*, proteína que promueve el intercambio de nucleótidos de p29 RAS y es la responsable de su activación en el sistema de levaduras (108, 109). Por otra parte REP puede recordar también al receptor que controla el intercambio nucleotídico en proteínas G triméricas (110).

De lo anterior se deduce que si se asume que REP es verdaderamente el activador fisiológico de p21, la misma REP debe estar regulada de algún modo, y es en este punto donde aparece la relación entre los oncogenes *abl* y *ras*.

La expresión de formas activadas de ABL en fibroblastos Rat 1 supone la fosforilación de un sustrato para fosfotirosina que migra como un doblete hacia los 62-65 KDa (111, 112). Deleciones dentro de secuencias de BCR que generan BCR-ABL en Rat 1 suponen una pérdida en fosforilación en tyr del sustrato de 62 KDa. Este sustrato de 62 KDa también resulta fosforilado por otros oncogenes con actividad tyr-quinasa además de *v-abl*, tales como *v-src* o *v-fps*, y coimmunoprecipita en un complejo con GAP (111). Por otra parte, se ha constatado que la transformación que llevan a cabo oncogenes con actividad tyr-quinasa localizada en proteínas diferentes de receptores (*src*, *fps*, *abl*), requieren *ras* funcional (90).

A la vista de estos datos, es bastante probable que la proteína de 62 KDa que se une a GAP sea REP, la cual estimula la transformación manteniendo a *ras* en el estado activado de p21.GTP y se fosforila bajo la acción de *abl* y en mucho menor grado bajo la acción de *bcr-abl*.

Transducción de señales a través de membrana

La mayoría de las proteínas codificadas por proto-oncogenes y oncogenes, especialmente las que se encuentran en el citoplasma y en la membrana plasmática actúan como detectoras o generadoras de señales químicas. Estas señales se denominan hormonas o segundos mensajeros según se encuentren en el fluido extracelular o intracelular.

A continuación estudiaremos la organización y los principios que rigen la regulación celular por señales químicas, así como las cascadas afectadas por oncoproteínas.

Los organismos han desarrollado un gran número de estrategias moleculares para la transducción de señales extracelulares a través de la membrana plasmática. Estas estrategias se esquematizan en la figura VI:

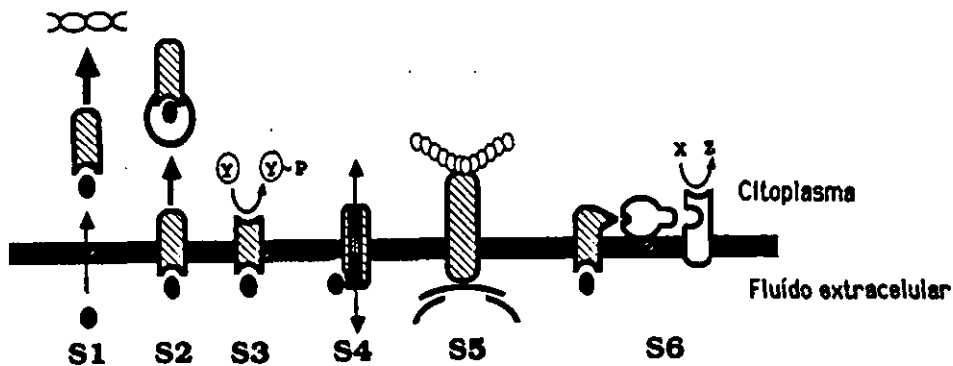


Figura VI.- Transducción de señales a través de membrana

El modo más sencillo es S1. Se trata de una señal hormonal que es lo suficientemente liposoluble como para atravesar la membrana y actuar sobre un receptor intracelular (por ejemplo: cortisol u hormonas tiroideas).

El modo S2 muestra como un receptor puede orientarse hacia el exterior de la membrana y transportar un ligando extracelular al interior de la célula por endocitosis de vesículas de membrana (por ejemplo colesterol transportado por receptor de lipoproteínas de baja densidad).

En el modo S3 se observa la forma de actuar de un receptor de transmembrana. El ligando se une al receptor en una región extracelular del mismo y esta unión desencadena una actividad enzimática localizada en un dominio intracelular del propio receptor (por ejemplo receptores con actividad tyrosina-quinasa como el de EGF o el de PDGF).

En los procesos de sinapsis y de uniones neuromusculares los neurotransmisores actúan según se indica en S4. Moléculas tales como acetilcolina o ácido gamma-aminobutírico se unen a un canal de iones de transmembrana, abriéndose rápidamente éste y permitiendo el paso de sustancias cargadas a través de la membrana, lo que implica una despolarización de la misma.

El modo S5 explica la capacidad de ciertos receptores denominados Integrinas para unir proteínas de la matriz extracelular contribuyendo, por tanto, a regular la morfología celular, el anclaje en la matriz extracelular, la movilidad, etc.

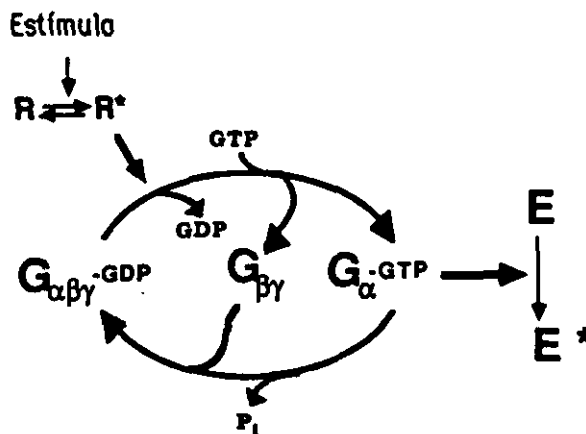
El último modelo (S6) esquematiza de qué manera se detectan un gran número de señales extracelulares por receptores que actúan a través de proteínas G para regular la producción de segundos mensajeros intracelulares que controlan en último término la actividad de proteínas citoplasmáticas.

Modo de acción de las proteínas G

Uno de los blancos más comunes de la acción de las proteínas G es el sistema adenilato ciclasa ya que más de 20 hormonas y neurotransmisores diferentes estimulan el mencionado sistema mediante la interacción con proteínas Gs, y sólo un pequeño número lo inhibe acoplándose con una proteína Gi, o activa otra cascada de segundos mensajeros.

Investigaciones recientes de gran número de laboratorios han conducido a clonar los cDNAs que codifican para receptores acoplados a proteínas G. Entre estos se encuentran los receptores para catecolaminas adrenérgicas y agentes muscarínicos colinérgicos. Se han clonado tres adreno-receptores y cuatro receptores muscarínicos (113).

Las proteínas G actúan según el siguiente esquema:



1.- La interacción con un receptor que se ha activado por la unión de un ligando permite a la proteína G liberar el GDP, entrando GTP al lugar de unión de nucleótidos de guanina.

2.- En la conformación que adopta la proteína unida al GTP regulará a la molécula efectora.

3.- La hidrólisis del GTP a GDP que se produce gracias a una actividad GTPasa intrínseca facilita que termine la interacción de la proteína G con su efector y la devuelve al estado inicial.

La mayor parte del conocimiento que se tiene sobre proteínas G deriva del hecho de que sirven como primer blanco a las toxinas bacterianas producidas por *Vibrio Cholerae* y *Bordetella pertussis*. Ambas toxinas actúan catalizando la transferencia de ADP-ribosa desde NAD⁺ hasta diferentes residuos de las cadenas alfa de las proteínas G. (114, 110). La modificación de la cadena alfa por toxina colérica estabiliza su conformación activa y potencia la activación del sistema adenilato ciclasa; este efecto es el responsable de los elevados niveles de AMPc en células de mucosa intestinal que causa la diarrea, eventualmente mortal consecuencia del cólera. Sin embargo, las proteínas G modificadas por toxina pertussis no pueden interaccionar con sus receptores.

Por tanto, esta toxina bloquea los efectos de las hormonas mediadas por proteínas G_i, incluyendo la inhibición de la adenilato ciclasa, abriendo los canales de K⁺ y estimulando el metabolismo de fosfoinosítidos.

Otras moléculas blanco de la acción de proteínas G son las fosfolipasas C (actividad enzimática de la que se hablará más adelante). Por último, los transductores de señales capaces de unir GTP están implicados en la regulación hormonal de la génesis de otros mensajeros lipídicos que incluyen ácido araquidónico (115) y metabolitos de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) (116). El descubrimiento de que los fibroblastos transformados por ras presentan los niveles basales de los dos últimos compuestos incrementados, sugiere que p-21 puede desempeñar un papel regulatorio en su metabolismo (117).

Segundos mensajeros

Uno de los sistemas de segundos mensajeros mejor estudiado es el que da cuenta de la estimulación de la degradación de los fosfolípidos, concretamente de los fosfoinosítidos que son los componentes minoritarios de la membrana plasmática (118).

Hoy es aún objeto de estudio el hecho de que la hidrólisis fosfodiesterásica del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) sea una consecuencia temprana de ciertas interacciones ligando-receptor, como las que se exponen en la tabla VI (119).

Tabla VI.- Receptores acoplados a metabolismo de PIPs en tejidos blanco

| Tejido | Receptor |
|------------------------|---|
| Músculo liso del iris | Colinérgicos muscarínicos y adrenérgicos |
| Hepatocitos | Vasopresina y Angiotensina |
| Gl. Paratiroides | Colinérgicos muscarínicos, -adrenérgicos Sustancia P |
| Plaquetas | Trombina, ADP y PAF |
| Cerebro | Colinérgicos muscarínicos, ACTH |
| Gl. de la sal en aves | Colinérgicos muscarínicos |
| Gl. Salivares de mosca | 5-HT ₁ |
| Gl. Adrenal | ACTH |
| Páncreas | Colinérgicos muscarínicos |

En efecto, los receptores para hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento que actúan a través de un mecanismo de estimulación de la degradación de PL, lo hacen en la gran mayoría de las ocasiones a través de una proteína G, pero no siempre.

Normalmente se estimula una PLC que hidroliza específicamente PIP_2 liberando inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Pero la actividad PLasa C puede catalizar también la hidrólisis de fosfatidilinositol (PI) o fosfatidilinositol-4-fosfato (PIP) (120); los productos de la hidrólisis en este caso serían inositol monofosfato (IP) e inositol-1,4-bifosfato (IP_2) respectivamente, junto con DAG.

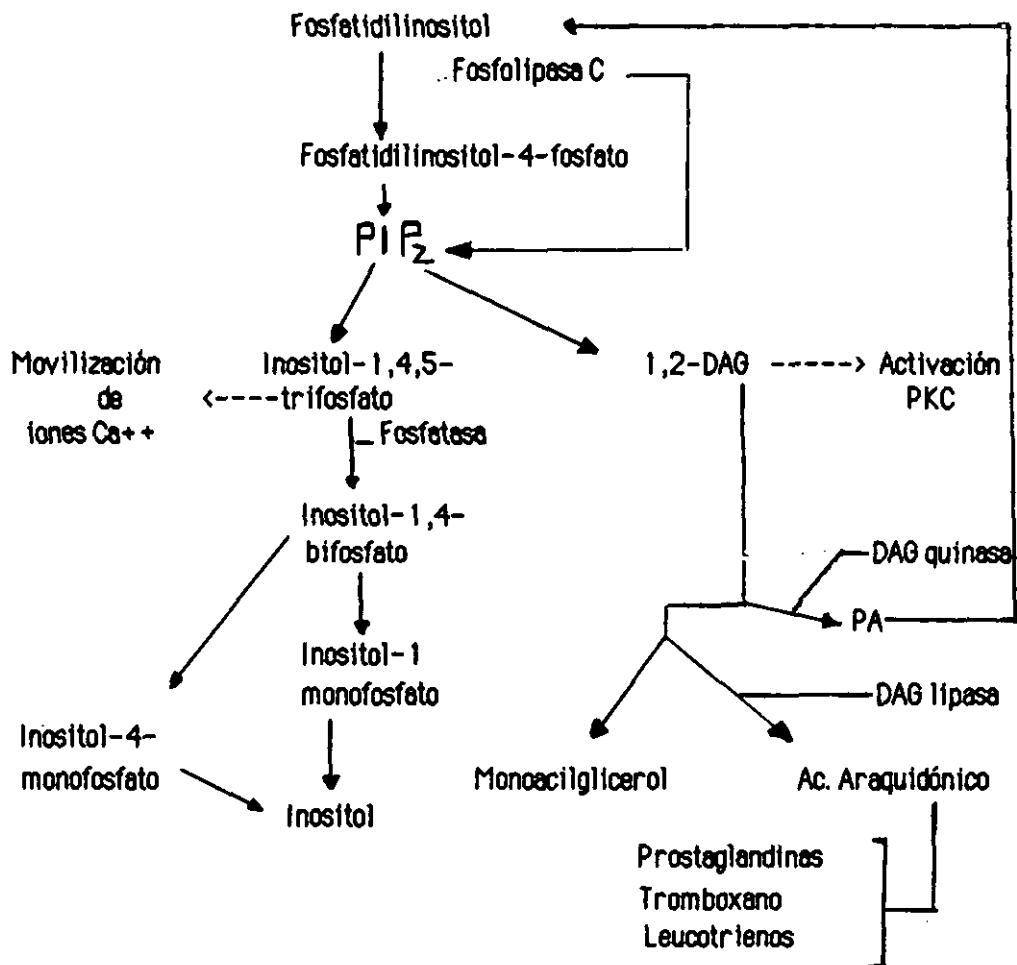
Aunque la hidrólisis fosfodiesterásica sea la mayoritaria, los PL también pueden hidrolizarse por la acción de las fosfolipasas A y D (PLA y PLD).

Se ha avanzado considerablemente en la comprensión de los papeles que desempeñan los dos metabolitos resultantes de la hidrólisis del PIP_2 en la función celular. Nos referimos al inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y a los diacilglicerol (DAG) (121).

La adición de IP_3 a células permeabilizadas por la acción de un detergente (células pancreáticas de acinar (122), hepatocitos (123) y fibroblastos 3T3 (124)) supone un incremento en los niveles de calcio intracelular. Sin embargo, los inositol monofosfato y bifosfato no son efectivos en cuanto a liberación de calcio.

En algunos tejidos se encuentra mayoritariamente un isómero del inositol-1,4,5-trifosfato, concretamente el 1,3,4-trifosfato (125). El origen de este isómero no se ha establecido todavía, pero una posibilidad es que resulte de la defosforilación del inositol-1,3,4,5-tetraquisfosfato (IP_4), el cual se forma junto con IP_3 en muchos tejidos estimulados (126). El IP_4 puede también formarse, a partir del 1,4,5- IP_3 , bajo la acción de una quinasa dependiente de adenosín trifosfato (ATP) y otra posibilidad es que se formara a partir de la hidrólisis del fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, pero no se tienen evidencias de la existencia de este lípido. Sea cual fuere su origen, su función tampoco se conoce con certeza, si bien se cree implicado en la entrada a la célula de calcio extracelular.

El IP_3 puede también degradarse a inositol-1,4-bifosfato (127). El modo de degradación del IP_2 no se conoce con exactitud, aunque puede sugerirse el que se indica en el siguiente esquema:



Los DAG son los otros productos de la hidrólisis del PIP_2 , y están implicados en la activación de la PKC (128). Se ha podido observar en plaquetas estimuladas por trombina (128), o en hepatocitos estimulados por vasopresina (129) que una rápida acumulación de DAG precede a la fosforilación de ciertas proteínas celulares. Los efectos de los DAG sobre la fosforilación proteica se pueden imitar por la adición de ciertos ésteres de forbol, aprovechando el hecho de que estos compuestos poseen una estructura similar a los DAG, y que como ellos activan PKC (130).

La PKC es una enzima multifuncional dependiente de calcio y de calmodulina, ya que niveles elevados de calcio intracelulares pueden tener un efecto sinérgico sobre la actividad de PKC, actuando sobre la propia enzima (131,132).

La actividad de PKC se asocia con la transducción de señales a través de membrana y con procesos de autofosforilación (133,134). La activación de PKC tiene importancia en el control de la síntesis del DNA, la proliferación celular y la regeneración de órganos y tejidos (135).

Queda aún por demostrar si alguno de los múltiples genes que codifican para las isoenzimas de PKC pueden alterarse para generar oncogenes.

Se conocen cuatro PKCs estructuralmente distintas (136, 137), que se diferencian también en su localización celular, del mismo modo que podrían hacerlo en las propiedades catalíticas o reguladoras o en la especificidad por el sustrato.

El modo general por el que la PKC se activa supone la pérdida de una de sus subunidades. Una vez activada, la enzima fosforila en Ser y Thr múltiples proteínas como S6 (138), vinculina (139), proteínas del citoesqueleto (140), proteínas no histonas (141), ciertas hormonas, receptores para factores de crecimiento, y transportadores de glucosa (142,143)

La activación de PKC podría servir como un posible mecanismo regulatorio del metabolismo de los PIPs, ya que la adición de ésteres de forbol inhibe tanto la movilización de calcio, como la hidrólisis de PIPs mediada por interacciones ligando-receptor (144,145).

Los DAG pueden degradarse bajo la acción de DAG-lipasas generando monoacilgliceroles (MAG) y ácido araquidónico (AA). La oxigenación del AA supone la aparición de una familia de compuestos en la que se incluyen prostaglandinas, tromboxano y leucotrienos; todos ellos con importante actividad biológica. En plaquetas, los niveles iniciales incrementados de AA se deben a la hidrólisis de PIPs tras la adición de ciertos estímulos, pero los incrementos tardíos de este metabolito tienen su origen en la hidrólisis de fosfatidilcolina (PC) (146).

Por otra parte, los PIPs se han implicado también en la respuesta proliferativa que algunos GFs y agentes mitógenos inducen sobre cultivos celulares. Así la adición de PDGF (producto del oncogén c-sis) a fibroblastos 3T3, supone una elevación de los niveles de calcio intracelulares, y una alcalinización del citoplasma. El efecto tardío de la adición del mitógeno es la estimulación de la bomba Na^+/K^+ , que se hará totalmente funcional tras la activación de PKC. Tanto el incremento de Ca^{++} , como el de pH, parecen ser requeridos para la iniciación de la síntesis del DNA y de la proliferación celular.

A pesar de todo lo expuesto, se ha observado recientemente que la activación del metabolismo de PIPs parece ser condición necesaria pero no suficiente para la respuesta mitogénica.

Escobedo y Williams (147) han obtenido un receptor mutado para PDGF capaz de inducir la aparición de niveles incrementados de IPs tras la unión de su ligando de modo similar al que se desarrolla con el receptor normal; pero la adición de PDGF a las células que expresan este receptor mutado no conlleva ninguna síntesis de DNA cuando se estimula con este factor de crecimiento.

De lo anterior cabe deducir que ciertas cascadas metabólicas diferentes al metabolismo de PIPs deben activarse para la síntesis de DNA en respuesta a la adición de GFs. Entre estas señales se le ha asignado un papel a una fosfatidilinositol-3-quinasa novel recientemente identificada (148,149).

También la hidrólisis fosfodiesterásica de lípidos diferentes de PIPs puede ser importante en el mantenimiento de la activación de PKC, una vez que han tenido lugar las alteraciones metabólicas a nivel de PIPs (150). Actualmente, el estudio del efecto de la transformación oncogénica sobre el metabolismo de fosfolípidos ha revelado la posible importancia en el crecimiento y la transformación de estas nuevas cascadas (83,117). Y concretamente una de estas dos rutas metabólicas constituye gran parte del estudio desarrollado en esta tesis.

Se trata de una de las vías por las que se activa la hidrólisis de fosfolípidos diferentes de PIPs, concretamente de fosfatidilcolina, a DAG y fosforilcolina (Pcho), que pueden participar eventualmente como segundos mensajeros en la transducción de señales celulares.

Transducción de señales a través de ciclos de fosfatidilcolina

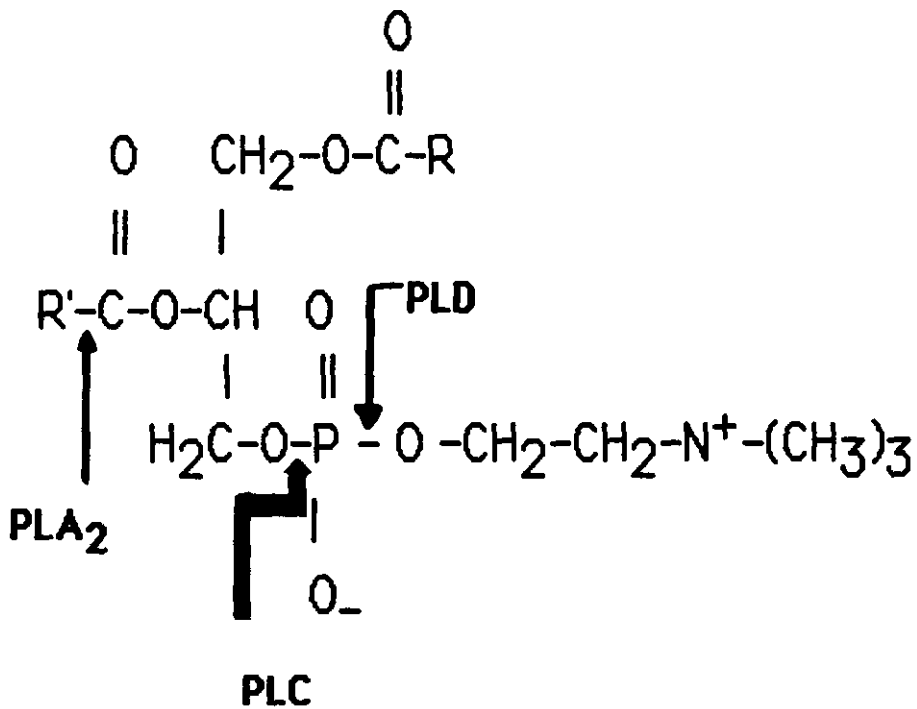
Tal y como hemos indicado, la transducción de señales a través del metabolismo de fosfoinosítidos está hoy en día relativamente bien establecida, mientras que la importancia de rutas alternativas al metabolismo de PIPs sólo está comenzando a valorarse.

Existen ciertas evidencias de que algunos agonistas inducen la activación de ciclos de PC en los que el catabolismo de este compuesto proporciona entre otras cosas una importante fuente de DAG. Este segundo mensajero puede aparecer como resultado de la acción de una PLC sobre PC, o bien como consecuencia de la actuación de dos actividades enzimáticas consecutivamente PLD y fosfatídico fosfatasa (PAP) y además por la acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) sobre PC generando liso-PC y ácido araquidónico (AA), que como se ha mencionado es un precursor inmediato de prostaglandinas, tromboxano y leucotrienos.

Por tanto, podemos encontrar tres acciones enzimáticas hidrolíticas sobre la fosfatidilcolina: PLC, PLD y PLA₂. Que liberan los siguientes metabolitos:

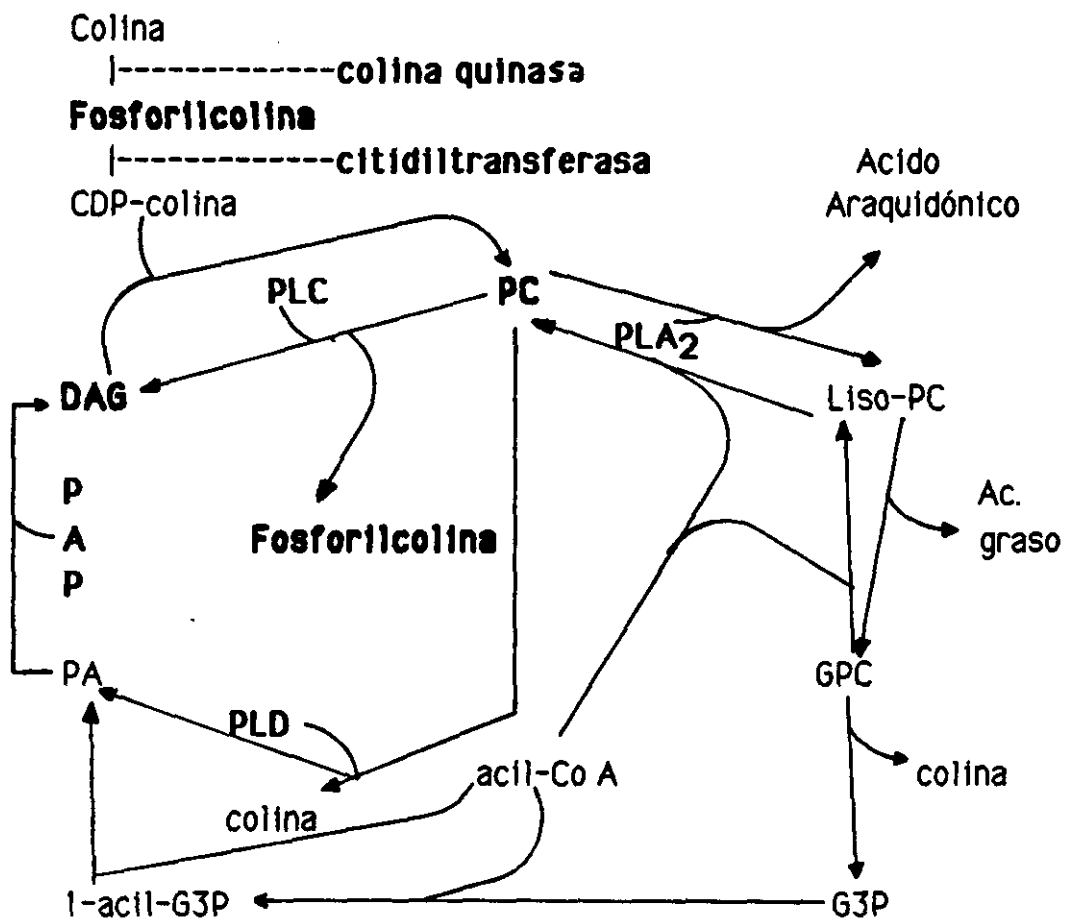
- La PLC genera DAG y Pcho.
- La PLA₂ libera ácido araquidónico y la forma liso de PC.
- La PLD hidroliza PC produciendo colina y ácido fosfatídico.

El lugar de acción de cada una de estas actividades sobre PC se indica en el siguiente esquema:



La liso-PC puede reesterificarse generando PC, o bien catabolizarse a glicerofosfocolina (GPC), la cual puede degradarse posteriormente a glicerol-3-fosfato (G3P) y colina. El G3P puede transformarse nuevamente en DAG a través de la síntesis de PA.

Por otra parte, los DAG pueden reaccionar con CDP-colina para regenerar PC completándose así el siguiente ciclo:



De la misma manera que los inosítoles fosfato la PC se encuentra fundamentalmente en la membrana de células eucarióticas. Estudios recientes han implicado la activación de una PLC específica para PC en respuesta a ciertas hormonas. De hecho, incrementos en la liberación de DAG y fosforilcolina (Pcho) se han hallado en células tratadas con agentes purinérgicos P_2 (116), vasopresina (116), PDGF (151), bombesina (152), interleuquina-1 (153) e interleuquina-3. Si bien la mayoría de estos agentes también estimulan la hidrólisis del PIP_2 , las interleuquinas 1 y 3 no lo hacen (153, 154).

Por otra parte fibroblastos transformados por Ha-ras muestran niveles incrementados de DAG y liberación de Pcho sin que se produzca un incremento de los niveles de inosítoles fosfato (117). Son coherentes con estos datos las observaciones de Lacal y col. al microinyectar en oocitos de *Xenopus laevis* el producto del oncogén Ha-ras (p21) que le llevaron a constatar una dramática alteración de los niveles de DAG que no se acompañaba de prácticamente ningún cambio en los niveles de inosítoles fosfato.

La mayoría de los estudios realizados sobre esta ruta metabólica concluyen que los DAG se generan directamente a partir de la PC gracias al efecto catalítico de PLC, puesto que Pcho es el otro producto de la hidrólisis. Sin embargo, en varias cromatografías de capa fina se observa que GPC migra junto con Pcho. De lo que se deduce que la acción de PLA_2 y de una lisofosfolipasa podrían generar la mencionada GPC. Esta afirmación se basa en la observación de que el tratamiento con norepinefrina y con el ionóforo de calcio A23187 en glándula pineal de rata induce la formación de AA y liso-PC a partir de PC por activación de una PLA_2 (155).

Por último, los DAG puede también aparecer como resultado de las acciones consecutivas de una PLD y PAP, o como resultado de la síntesis *de novo* a partir de productos de degradación de PC. De hecho estudios recientes en células embrionarias de rata (REF52) (156) y en hepatocitos de rata (157) implican a la PLD en el catabolismo de PC. Las células REF presentan un acelerado catabolismo de PC a PA en respuesta a vasopresina (156), y de modo similar medidas másicas manifiestan que se produce un acúmulo de PA anterior a la aparición de DAG en hepatocitos tratados con vasopresina y que una proteína G se halla involucrada en el proceso (157). Sin embargo la vasopresina no afecta a la incorporación de 3H -glicerol en PA y se observa presencia de DAG, por lo que se excluye la posibilidad de síntesis *de novo* de DAG.

Por último parece que una proteína G media la activación de PLC por agonistas purinérgicos P_2 (116).

Efectivamente GTP y moléculas análogas que contienen guanina en su composición, mostraron efectos estimuladores sobre el catabolismo de PC , mientras que otros nucleótidos trifosfato tienen poco o ningún efecto (116).

Los descubrimientos que han llevado a comenzar a establecer los múltiples caminos por los que los oncogenes pueden desarrollar un proceso neoplásico han revolucionado el estudio del cáncer, han unido a investigadores de campos inicialmente inconexos y han impulsado un interés clínico sobre las aplicaciones de los ensayos para determinación de mutaciones comunes de proto-oncogenes en el diagnóstico y el pronóstico de procesos tumorales. Aunque hoy existe ya un amplio número de oncogenes clasificado, aún no se conoce con certeza el conjunto de acontecimientos bioquímicos que tienen lugar para que una célula normal se convierta en tumoral. ¿Cuáles son los blancos específicos de acción de las proteínas oncogénicas?; ¿qué rutas metabólicas se ven alteradas en la transformación tumoral?; ¿cuál es la localización y función de las proteínas transformantes en la transducción de señales?, son cuestiones que siguen despertando hoy gran interés y algunas de ellas han sido objeto de estudio en el trabajo que se expone a continuación.

OBJETIVOS

Las investigaciones que han hecho posible el desarrollo de esta tesis doctoral se han dirigido :

- A la identificación de segundos mensajeros que aparecen como consecuencia de la activación del oncogen ras. La cinética de la acción de ras en la transducción de señales se ha estudiado en una línea celular mutante, sensible a temperatura y transformada por este oncogén.

-Al desarrollo de un posible modo de detección de p210 que posibilite un mayor conocimiento de las proteínas que codifican bcr y abl e integran la quimera.

Con todo ello se ha pretendido imprimir un cierto avance en el estudio de las enfermedades neoplásicas hematopoyéticas en las que se ven implicados los oncogenes mencionados.

MATERIALES Y METODOS

Líneas celulares

Ts-6-315

Es una línea celular de fibroblastos infectada con un mutante de K1-ras que es sensible a temperatura. De modo que las células muestran fenotipo transformante a 32°C y morfología plana a 40.5°C (174). Y fué cedida generosamente por Paul L. Kaplan (Dana-Faber Institute, Boston, Massachusetts).

El gen mutante ts-K1-ras difiere del salvaje en una mutación puntual en el residuo 43 de la proteína p21 que codifica (158). Esta mutación es aparentemente la responsable de la inestabilidad térmica de ts-p21 a 40.5°C lo que explica la morfología normal de la línea celular a altas temperaturas (159).

Cultivo:

Se empleó medio de Eagle modificado por Dulbecco al que se añade un 10% (v/v) de suero bovino fetal (SBF), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y L-glutamina 2mM. (Reactivos de Flow Laboratories)

Las células se crecen en condiciones permisivas (32°C) en frascos de cultivo (Costar) cuya superficie se recubre previamente con fibronectina (Calbiochem) a una concentración final de 1mg/ml, en una estufa con humedad relativa del aire del 95% y un 5% de CO₂. De este modo las células muestran un fenotipo transformante, que revierte cuando se cambian a una estufa de las mismas características, pero con temperatura restrictiva (40.5°C).

Swiss 3T3

Son fibroblastos normales de rata.

Cultivo:

Se empleó medio Eagle con la modificación de Dubelcco, suplementado con suero bovino fetal 10% (v/v), 100 unidades/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina y L-glutamina 2mM. (Reactivos de Flow Laboratories).

Las células se crecen a 37°C en frascos de cultivo convencionales (Costar) previamente recubiertos con fibronectina (Calbiochem) a una concentración final de 1 mg/ml y en una estufa con un 95% de humedad y un 5% de CO₂.

Quiescencia:

En las dos líneas celulares descritas el estado quiescente se consigue de la siguiente manera:

Cuando las células han alcanzado la confluencia, se les retira el medio de crecimiento y se lavan dos veces con PBS a la temperatura adecuada.

Después del lavado se mantienen durante 24 h en el medio de cultivo mencionado, pero sin suero, y suplementado con el resto de los componentes anteriormente indicados, así como con sal sódica del ácido selénico (Collaborative Research Incorporated) en concentración 1 µM y con transferrina (Collaborative Research Incorporated) en concentración final de 5 µg/ml.

Una vez realizado este proceso, todas las células estarán sincronizadas, encontrándose en la fase G0 del ciclo celular.

K562

Se trata de una línea celular hematopoyética establecida por Lozzio (160) a partir de un paciente con CML positivo para el cromosoma de Filadelfia.

Cultivo:

Las células crecen en suspensión a 37°C en una estufa con 95% de humedad y 5% de CO₂, en frascos de cultivo convencionales y con medio RPMI1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100 unidades / ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. (Reactivos de Flow Laboratories).

HL-60

Se trata de una línea celular hematopoyética establecida por Collins (161) a partir de un paciente de leucemia humana negativo para el cromosoma de Filadelfia.

Cultivo:

Se cultivan del mismo modo que K562.

NB4

Se trata de una línea celular hematopoyética generosamente cedida por el Dr. Ralph Arlinghaus (M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas). La línea se obtuvo de un paciente de leucemia negativo para el cromosoma de Filadelfia.

Cultivo:

Se cultivan del mismo modo que las K562 y las HL-60.

Marcaje isotópico de cultivos celulares

Marcaje con (metil- ^{14}C) colina, (U- ^{14}C) glicerol, ^{32}P -ortofosfato o mio-2- ^3H -inositol de células ts-6-315

Una vez sembradas para realizar los correspondientes experimentos, las células se incuban a 40.5°C (temperatura restrictiva) durante tres días en presencia de suero. En las últimas 24 h, las células se marcan con uno de los cuatro isótopos mencionados a continuación, según el experimento que se desee realizar:

- $2\ \mu\text{Ci/ml}$ de (metil- ^{14}C) colina (Amersham International) de actividad específica 50-60 mCi/mmol.
- $2\ \mu\text{Ci/ml}$ de (U- ^{14}C) glicerol (Amersham International) de actividad específica 50-60 mCi/mmol.
- $1\ \mu\text{Ci/ml}$ de ^{32}P (Amersham International) de concentración 37 MBq/mmol.
- $15\ \mu\text{Ci/ml}$ de mio-2- ^3H -inositol (Amersham International) de actividad específica 20 Ci/mmol.

Posteriormente las células se lavan dos veces con PBS a 40.5°C , y se incuban en un medio de quiescencia con la misma cantidad de marcaje durante 24 h, tras lo cual el medio se retira y las células se vuelven a lavar dos veces con PBS a 40.5°C , y se les añade medio nuevo de quiescencia. Tras un período de equilibrado con este medio de 30 minutos, las células se estimulan trasladándolas a temperatura permisiva (32°C) y los fosfolípidos se extraen y se analizan a los tiempos requeridos según se indica más adelante.

Marcaje con (metil- ^{14}C) colina en Swiss 3T3

Una vez sembrados para los experimentos los fibroblastos Swiss 3T3 crecen a 37°C durante dos días, al tercer día se marcan con $2\ \mu\text{Ci/ml}$ de (metil- ^{14}C) colina (Amersham International) de actividad específica 50-60 mCi/mmol, y con este marcaje se incuban durante 24 h. Transcurrido este tiempo las células se lavan dos veces con PBS a 37°C , y se incuban con medio de quiescencia y la misma cantidad de marcaje durante otras 24 h.

Posteriormente se retira el medio de quiescencia marcado y se lava el cultivo dos veces con PBS a 37°C, una vez lavadas se les añade medio nuevo de quiescencia en el que se equilibran durante 30 minutos. Después de este período de equilibrado, se estimulan con SBF al 10% (v/v) durante los tiempos requeridos; transcurrido el tiempo de estimulación la reacción se detiene y los lípidos se extraen y analizan como se indica más adelante.

Ensayos de incorporación de ^3H -timidina en ts-6-315

Una vez que se tienen las células crecidas a 32°C, se siembran en placas y se crecen durante tres días a 40.5°C.

Alcanzada la confluencia, se lavan dos veces con PBS a 40.5°C y se incuban en medio de quiescencia durante 24 h a la misma temperatura.

Una vez cumplido este proceso, las células se transfieren a temperatura permisiva y se determina la síntesis *de novo* de DNA a diferentes tiempos. Añadiendo pulsos de 6- ^3H -timidina de actividad específica 21 Ci/mmol (Amersham International) a razón de 2 $\mu\text{Ci/ml}$ 2 h antes de concluir el tiempo de cada estimulación, tal y como se ha descrito por Aaronson y col. (162).

Para finalizar la reacción se les retira el medio a las células, y se lavan dos veces con PBS a 32°C. La reacción se detiene añadiendo sobre las placas 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 15-20% (v/v) a 4°C.

Las células se mantienen durante 10' a 4°C con el TCA, después de lo cual se raspan y se llevan a un tubo de ensayo.

Sobre cada tubo se añaden 100 μl de una disolución de albúmina de suero bovino (BSA) preparada al 5% (p/v). Se agitan energicamente los tubos durante 1' y se incuban 10' a 4°C con el fin de que precipiten las proteínas.

Tras la incubación se centrifugan 10' a 2000 rpm y se recoge el sedimento que se resuspende en 250 μl de KOH 0.5 M. Para conseguir una buena resuspensión es conveniente agitar durante toda la noche a temperatura ambiente.

Posteriormente se neutraliza con 125 μl de HCl 1N, y la incorporación de ^3H -timidina se determina mediante contaje de centelleo líquido.

El líquido de centelleo empleado en este y otros ensayos fué el "Cocktail" de Reactivos Scharlau.

Ensayos de incorporación de ^3H -timidina en Swiss 3T3

Los fibroblastos Swiss 3T3 se crecen en placas a 37°C durante tres días, una vez confluentes se lavan dos veces con PBS a 37°C y se incuban en medio de quiescencia durante 24 h. Posteriormente se estimulan con un 10% de suero bovino fetal a diferentes tiempos y se determina la síntesis *de novo* de DNA (162) añadiendo pulsos de $2\mu\text{Ci/ml}$ de $6\text{-}^3\text{H}$ -timidina de actividad específica 21 Ci/mmol (Amersham International) 2 h antes de finalizar cada reacción.

El protocolo que se sigue para esta determinación es el mismo que se ha descrito para las células ts-6-315.

Análisis de los productos del metabolismo de fosfolípidos

Cuantificación de DAG y PA

Una vez seguido el protocolo descrito de marcaje con ($\text{U-}^{14}\text{C}$) glicerol, y tras haberse estimulado las células a diferentes temperaturas, se lavan dos veces con PBS y se detienen las reacciones añadiendo metanol, que previamente se haya enfriado a 4°C .

Las células se raspan y se llevan a tubos de ensayo previamente deslipidificados con una mezcla de CHCl_3 :metanol (2:1, v/v). Ya en los tubos se les añade CHCl_3 y agua en las proporciones sugeridas por Bligh y Dyer (163).

Los tubos se agitan fuertemente durante 1' y se centrifugan 10' a 2000 rpm.

La fase clorofórmica se separa en dos partes, en una se determinan DAG y en otra PA.

La separación de DAG del resto de los componentes lipídicos se realiza empleando cromatografía de capa fina con soportes de sílica-gel de Whattman, y con el siguiente sistema móvil: hexano: dietil éter: ácido acético (60:40:1, v/v/v).

Una vez desarrollada la cromatografía, se realiza una autorradiografía de la placa que permita la identificación de DAG. Para la autorradiografía se emplea película de Curix y se incuban placa y película a -70°C durante 24 ó 48 h. Tras revelar la película, las manchas que correspondan al compuesto buscado se extraen de la placa raspándolas, y se cuantifican en un contador de centelleo líquido. La identificación se simplifica cromatografiando también los patrones correspondientes marcados.

La identificación y aislamiento de PA se realiza siguiendo el mismo protocolo que con los DAG, pero en este caso el sistema móvil de la cromatografía será la fase superior de acetato de etilo saturado con agua: trimetil pentano: ácido acético: agua (90:50:20:100, v/v/v/v).

En los ensayos en los que las células se marcan con ^{32}P -ortofosfato en vez de con (U- ^{14}C) glicerol el aislamiento de PA se realiza del mismo modo.

Este sistema cromatográfico es también válido para identificar fosfatidiletanol (PEt).

En ciertos experimentos se quiso estudiar el efecto del propanolol o del etanol, tras la adición de fosfolipasa D (PLD) exógena, sobre los niveles de PA, DAG y PEt.

Las modificaciones al protocolo propuesto consisten en añadir PLD de cacahuete tipo III (Sigma) 1' ó 10' antes de detener las reacciones. Y en incubar las células, a la temperatura idónea, con el agente cuyo efecto se quiera estudiar, durante los tiempos de estimulación escogidos.

La concentración de propanolol empleada fué 200 μM y la de etanol 0.5% v/v.

Cuantificación de inosítoles fosfato

La modificación en el protocolo de marcaje mencionado anteriormente consiste en la adición al medio de incubación de las células marcadas con mio-2- ^3H -inositol, en algunas de las determinaciones, LiCl (Merck) 10 mM durante los últimos 15 minutos.

Cuando el período de incubación se ha completado se aspira el medio de cultivo y se añade sobre la placa 1 ml de TCA a 4°C al 15-20%. Se incuban las placas con el ácido a 4°C durante 10 minutos con el fin de extraer los inosítoles fosfato solubles en agua (165).

Las células se raspan y se transfieren a tubos de ensayo (previamente deslipidificados) donde se les añaden 100 μl de BSA (Sigma) al 5% (p/v) agitándolos y dejando que precipiten las proteínas a 4°C durante 10'.

Después de la precipitación se centrifugan los tubos 10' a 2000 rpm y se conserva el sobrenadante.

Por último el TCA se extrae del conjunto de inosítoles libres de proteínas mediante cuatro lavados con éter dietílico.

Los IPs totales se separan del mio-2-³H-inositol y glicerofosfoinositol empleando columnas Dowex 1x8 (Bio-Rad) de intercambio iónico (166), y se determina su contenido en radioactividad en un contador de centelleo líquido. Si esta aproximación apuntara la presencia de alteraciones significativas en inositoles fosfato es conveniente realizar una separación más fina de las distintas especies de IPs por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (165).

Cuantificación de Pcho, Cho y PC

Una vez transcurrido el proceso de marcaje, que se ha descrito, con (metil-¹⁴C) colina las reacciones se detienen a los tiempos requeridos.

En primer lugar las células se lavan con PBS a 32°C si son ts-6-315 y a 37°C si se trata de Swiss 3T3.

Ya lavadas, el protocolo para la determinación y la extracción de Pcho, Cho y PC es común para los dos tipos de células.

Las reacciones se detienen añadiendo metanol a 4°C, posteriormente las células se raspan y se llevan a tubos de ensayo deslipidificados. En el tubo se añade CHCl₃ y agua siguiendo las proporciones sugeridas por Bligh y Dyer (163).

Los tubos se agitan energicamente durante 1' y tras una centrifugación de 10' a 2000 rpm se separa la fase acuosa de la clorofórmica. En la fase acuosa se encuentran la Pcho y la Cho, y en la clorofórmica la PC.

El fraccionamiento de los lípidos se lleva a cabo en soportes cromatográficos de capa fina (Whatman), siguiendo el método propuesto por Yavin (164). La fase móvil de la cromatografía consiste en metanol: NaCl (0.5% p/v): NH₄OH (100:100:2, v/v/v).

Junto con las muestras se cromatografían también patrones marcados. Concluido el proceso de separación cromatográfico se procede a autorradiografiar la placa, para lo cual se incuba ésta con película Curix a -70°C durante uno o dos días.

Tras revelar la autorradiografía, se identifican los lípidos tomando como referencia los patrones cromatografiados.

Cada mancha identificada se extrae de la placa raspándola y se determinan los niveles de radioactividad que contiene por contaje de centelleo líquido.

Purificación de inmunoglobulinas de suero y de fluido ascítico

Los antisueros para bcr que se emplearon en los ensayos que se describirán más adelante fueron obtenidos en colaboración con el laboratorio del Dr. Ralph Arlinghaus (M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas), donde también se obtuvo el antisuero para abl y el anticuerpo monoclonal de fluido ascítico frente a abl. Por tanto, tan sólo uno de los anticuerpos utilizados es comercial, concretamente el denominado Ab-1 por la casa Oncogene Science, se trata de un anticuerpo policlonal purificado por afinidad, cuya secuencia es: YISDEVEKELGK.

Fué necesaria la purificación de los antisueros correspondientes a los anticuerpos:

| <u>Región</u> | <u>Secuencia</u> | <u>Forma</u> |
|---------------|--------------------|--------------|
| bcr 103-114 | (C)DGADPPPAEEPE | suero |
| bcr 417-426 | DGEGAFHGDA(C) | suero |
| bcr 898-911 | TINKEDDESPGLYG(C) | suero |
| abl 389-403 | DEVEKELGKRGTRGG(C) | suero |
| abl 51-64 | KENLLAGPSENDPN(C) | fluido asc. |

La purificación se llevó a cabo introduciendo pequeñas modificaciones al método propuesto por Mc. Kinney y Parkinson (167). Concretamente, el protocolo que se siguió fué el siguiente:

-Se añaden 5 ml del antisuero o del fluido ascítico sobre 20ml de disolución tampón de acetato sódico de concentración 60 mM y pH=4.4, sobre la disolución resultante se añaden gota a gota 625 µl de ácido caprílico (Sigma) y se agita la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifuga a 10000 g y a una temperatura de 4°C durante 30 minutos para eliminar la albúmina y otras proteínas insolubles que no sean IgG.

- A partir de aquí el proceso de purificación debe continuarse a 4°C. Al sobrenadante obtenido se le añaden 2.2 ml de 11x PBS frío de pH=7.5 y gota a gota 24.4 ml de (NH₄)₂SO₄ saturado. La disolución así obtenida se agita durante 30 minutos a 4°C de modo que se permita la precipitación total de las IgG. Transcurrido este tiempo, se centrifuga de nuevo a 3000g y a 4°C durante 30 minutos.

- El precipitado obtenido se resuspende en 1 ml de disolución tampón de fosfato sódico de concentración 20 mM y pH=7.0; y este mililitro se dializa frente a 4000 ml de PBS durante una noche. Una vez dializada la muestra se determina su concentración por medidas de absorbancia y se comprueba su pureza con un isoelectroenfoco.

Marcaje isotópico de anticuerpos con ^{125}I

El ^{125}I reemplaza el grupo OH^- de los residuos de tyr de las proteínas bajo condiciones oxidantes. Mediante el método de yodación que se describe a continuación, el anticuerpo marcado se separa del yodo libre haciendo pasar la mezcla por una columna de intercambio iónico. Alícuotas de las fracciones colectadas se cuantifican en un contador gamma, de modo que la actividad específica y la concentración del anticuerpo marcado puede calcularse.

Procedimiento:

1º. - Preparación de la columna:

- Se corta la boca de una pipeta de plástico de 10 ml.
- Se corta un trozo de tubo de plástico de pequeño diámetro y aproximadamente 2.5 cm de longitud, y se sitúa en el extremo afilado de la pipeta.
- En el tubo mencionado se coloca un dosificador que permita controlar la caída de cada gota.
- Una pequeña porción de fibra de vidrio, previamente humedecida en PBS se sitúa en el extremo terminal de la columna con el fin de mejorar el empaquetamiento de la resina.
- Se equilibran 50 g de resina (resina Dowex de intercambio iónico, AG1-x8, 20-50 mesh de forma hidroxil, Bio-Rad) en 100 ml de PBS durante una hora. Se vierte el PBS transcurrido el tiempo indicado y se añade 150 ml de PBS fresco.
- Se carga la resina en la columna y se elimina el exceso de disolución tampón, teniendo extremo cuidado en que no quede ninguna burbuja de aire en la columna.
- Una vez empaquetada la columna se procede a lavar el relleno con la siguiente secuencia: 100 ml de PBS, 50 ml de PBSG (PBS con 1 g/l de gelatina) y 100 ml de PBS.

- Se marcan 14 tubos de ensayo de plástico haciendo una señal en el exterior de cada tubo que indique el nivel que corresponde a 1.2 ml.

- Se añaden 0.2 ml de PBSG en cada tubo.

- Se preparan 6 mg de cloramina T (Sigma) en 10 ml de PBS y 5 mg de metabisulfito sódico (Sigma) en 10 ml de PBS. Estos reactivos deben prepararse justo antes de que la reacción de yodación se lleve a cabo, y no deben utilizarse después de tres horas de haberse preparado.

2º reacción entre el ^{125}I y el anticuerpo

- Se colocan de 10 a 100 μl de anticuerpo en un tubo cónico de centrifuga (Eppendorf).

- Se calcula el volumen de ^{125}I (DuPont/NEN products) de concentración 432 mCi/ml requerido para que la cantidad añadida sea de 200 a 400 μCi . Dado que el volumen será muy pequeño se pueden añadir sobre el isótopo 25-30 μl de PBS antes de calcular la cantidad de isótopo requerida.

- Se añade el volumen de ^{125}I necesario al anticuerpo y se agita.

- Se añaden 100 μl de la cloramina T anteriormente preparada, agitándose fuertemente durante un minuto y dejándola reaccionar durante otros 60 s.

- Se añaden 100 μl del metabisulfito sódico anteriormente preparado agitándolo y dejándolo reaccionar durante 30 s.

3º Separación del anticuerpo marcado del yodo libre

- Se deja correr la columna hasta que la disolución tampón se encuentre en el tope de la resina.

- Se coloca la mezcla de reacción sobre la resina con una pipeta Pasteur.

- Se deja que la mezcla penetre en la resina.

- Se eluyen alícuotas de 1 ml con PBS en los 14 tubos preparados anteriormente a razón de una gota por segundo.

- Se mezclan los eluidos en un agitador, y se determina el contenido radioactivo de 5 μl de cada eluido en un contador gamma calibrado para ^{125}I .

- Se calcula la concentración y la actividad específica del anticuerpo marcado en el tubo que posea mayor número de cuentas, asumiendo que todo el material marcado eluye de la columna y el yodo libre queda unido a ella.

Recubrimiento de partículas de poliestireno con moléculas de anticuerpo

La adsorción de proteínas sobre partículas de poliestireno se debe a fuerzas de unión inespecíficas de tipo Van der Waals, pero no por ello el fenómeno es independiente del pH. De hecho cambios en este parámetro pueden afectar a la conformación de la proteína y ser determinantes para la cantidad de proteína unida. La formación de una monocapa compacta de proteínas es normalmente máxima cuando el proceso de recubrimiento se realiza al pH que corresponde con el punto isoeléctrico (pI) de la proteína en cuestión. Concretamente en el caso de IgG el pH idóneo suele ser pH=8.0, que es el valor medio para el pI de este tipo de proteínas.

El mejor resultado en el recubrimiento de soportes de poliestireno de 6.7 mm de diámetro (Bangs Laboratories, Carmel, Indianápolis) con los anticuerpos, que se han indicado anteriormente, se obtuvo siguiendo el protocolo que se detalla a continuación. El método que se expone es el resultado de un detallado estudio de condiciones de pH, fuerza iónica, temperaturas y tiempos de incubación que han llevado a optimizar la adsorción de los anticuerpos empleados en este trabajo sobre el soporte de poliestireno escogido.

- El soporte redondeado de poliestireno de 6.7 mm de diámetro se lava durante 30 minutos con agua destilada con una agitación de 140 rpm y a temperatura ambiente.

- Tras este primer lavado se realizan dos lavados consecutivos de una hora de duración cada uno, a la misma temperatura y velocidad de agitación, pero esta vez con la disolución tampón en la que posteriormente se llevará a cabo la reacción de adsorción.

Se trata de una solución reguladora de pH=8.0 y de baja fuerza iónica, pero tal que pueda neutralizar posibles cargas localizadas en la IgG lo que favorecerá las interacciones hidrofóbicas. Una disolución de estas características se consigue con una concentración de NaH_2PO_4 de 0.01 M y un 0.9% de NaCl en un volumen final de 1 litro. El pH se ajusta con NaOH 1 M.

- La reacción de recubrimiento con el anticuerpo correspondiente se realiza incubando la IgG a una concentración final de 2.5 μg por cada 300 μl de la disolución reguladora mencionada.

La incubación se mantiene durante 16-18 horas a 4°C o bien durante 3 horas a temperatura ambiente, con agitación de 140 rpm, obteniéndose en ambos casos el mismo resultado. Dado el pequeño tamaño del soporte 300 μl de disolución son suficientes para cubrirlo completamente.

- Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo conviene constatar que éste ya está adsorbido en el soporte. Esta comprobación se lleva a cabo empleando el método desarrollado por Smith y col. (1968) y comercializado por Pierce Chemical Co. que permite detectar cantidades proteicas de hasta 0.5 µg.

- Tras la adsorción del anticuerpo el soporte se lava a 4°C y 140 rpm durante 45 minutos con la disolución reguladora.

- Posteriormente se procede al bloqueo de los sitios de unión inespecífica. En primer lugar se realiza una incubación de 3 h a 4°C o de 1 h a temperatura ambiente, y a 140 rpm, con Tween 20 en concentración de 0.1% en la disolución tampón mencionada anteriormente. Se eligió este detergente como agente bloqueante por ser uno de los que presenta un valor bajo para su concentración crítica de micela. Al unirse el detergente al poliestireno, aumenta la carga en la superficie de las partículas, lo que dificulta la unión de proteínas, evitándose de este modo uniones inespecíficas.

- En segundo lugar, tras un lavado de 45 minutos con la disolución tampón a 4°C y 140 rpm, y después de haber constatado que el agente que menor unión inespecífica produce es la leche desnatada en polvo, se lleva a cabo una incubación del mismo tiempo y en las mismas condiciones descritas para el Tween 20 con leche desnatada de concentración 1 g por litro de solución tampón.

- Los soportes con el anticuerpo adsorbido y los sitios de unión inespecífica bloqueados se conservan a 4°C en disolución reguladora con azida hasta su posterior utilización.

Nota:

En caso de querer realizar una unión de otro anticuerpo sobre el que previamente se ha adsorbido al soporte, la reacción se realizará tras la unión del primer anticuerpo, lavando el soporte durante 45 minutos con la disolución reguladora, y posteriormente se procederá al bloqueo de los lugares de unión no específica continuando el protocolo hasta el final tal y como se ha descrito.

Obtención de lisados de células K562, HL-60 y NB4

Las células una vez crecidas se lavan tres veces con PBS de pH=7.5, centrifugando durante 5 minutos a 2500 rpm y a 4°C en cada lavado.

Después de este proceso se congelan rápidamente a -90°C hasta que se deban resuspender para obtener el correspondiente lisado.

La resuspensión se realiza añadiendo a cada 25×10^6 células 1.5-2 ml de PBS (pH=7.5) al que se le han añadido los siguientes inhibidores de proteasas de Boehringer Mannheim:

- APMSF (10 $\mu\text{g/ml}$) y aprotinina (2 $\mu\text{g/ml}$), que son ambos inhibidores de serin-proteasas.

- Leupeptina (0.5 $\mu\text{g/ml}$) quien además de inhibir actividad serin-proteasa también actúa sobre cistein-proteasas (plasmina, tripsina, papaína, catepsina B, etc).

- Pepstatina (0.7 mg/ml) que inhibe aspartato-proteasas.

Una vez resuspendidas las células en esta disolución se homogeneizan durante 15 segundos a 4°C , y posteriormente se centrifugan en la ultracentrífuga durante una hora a 4°C y 50000 rpm.

En el sobrenadante se encuentra el lisado citosólico que se empleará para los ensayos correspondientes.

Radioinmunoensayo en fase sólida de tipo "sandwich"

El radioinmunoensayo en fase sólida de tipo "sandwich" consiste en hacer reaccionar la proteína que se desea cuantificar con un anticuerpo previamente unido a un soporte orgánico y en una posterior incubación con un anticuerpo secundario marcado radioactivamente. Este ensayo puede ponerse en práctica siempre que la proteína en cuestión pueda ser reconocida por al menos dos anticuerpos. La cantidad de radioactividad medida tras las incubaciones mencionadas será directamente proporcional a la cantidad de proteína presente.

Dado que la proteína p210 es una quimera que resulta de la expresión del gen bcr-abl, ésta puede ser eventualmente reconocida por anticuerpos frente a bcr y frente a abl. Para estudiar este reconocimiento se han seguido los pasos que se detallan a continuación en el ensayo tipo "sandwich":

1.- Se lava durante una hora, a temperatura ambiente, a 140 rpm y con PBS de pH=7.5 el soporte de poliestireno en el que está unido el anti-bcr a estudiar y en el que se han bloqueado los lugares de uniones inespecíficas.

2.- Se sitúan cada soporte con su anticuerpo correspondiente en las placas que Abott tiene especialmente diseñadas para este tipo de ensayos.

3.- Se incuba dicho soporte con 300 μ l del lisado de la línea celular correspondiente durante 3 horas a temperatura ambiente y a 140 rpm. La concentración proteica del lisado será la misma para cada línea celular.

4.- Se efectúan tres lavados con 5 ml de agua cada vez, empleando el sistema semiautomático que para este tipo de ensayos provee la casa Abott. Estos lavados tienen la finalidad de eliminar el exceso de proteína que no se ha unido al anticuerpo adsorbido en el soporte.

5.- Se añaden 300 μ l de cada anticuerpo secundario marcado sobre los pocillos según convenga de modo que la cantidad de radioactividad por pocillo sea de unas 300000 cpm.

6.- Se incuba con este anticuerpo marcado durante 16-18 horas, a temperatura ambiente y a 140 rpm.

7.- Se efectúan otros tres lavados tal y como se ha descrito en el apartado 4, con el fin de eliminar el anticuerpo marcado que no se haya unido.

8.- Se transfieren cada una de las bolas de poliestireno desde las placas de reacción a tubos de ensayo que permitan cuantificar la radioactividad que posean.

9.- Se determina la cantidad de radioactividad de cada tubo en un contador gamma para ^{125}I .

Nota:

Todos los resultados que se exponen a continuación se obtuvieron calculando el valor medio de los datos de tres experimentos independientes realizados por duplicado para cada ensayo.

RESULTADOS

Activación del metabolismo de fosfolípidos en células transformadas por un mutante de Ki-ras sensible a temperatura.

Las células empleadas en los ensayos que se describen a continuación son fibroblastos de rata transformados por el oncogén Ki-ras mutado y se denominan ts-6-315.

Se trata de una mutación puntual en el residuo 43 de la proteína p21 que la hace sensible a cambios de temperatura (158). Gracias a esta alteración, las células muestran fenotipo transformante a 32°C y morfología plana a 40.5°C. Lo cual permite estudiar la cinética de la aparición de ciertos metabolitos que potencialmente podrían relacionarse con esta transformación tumoral.

Liberación de DAG

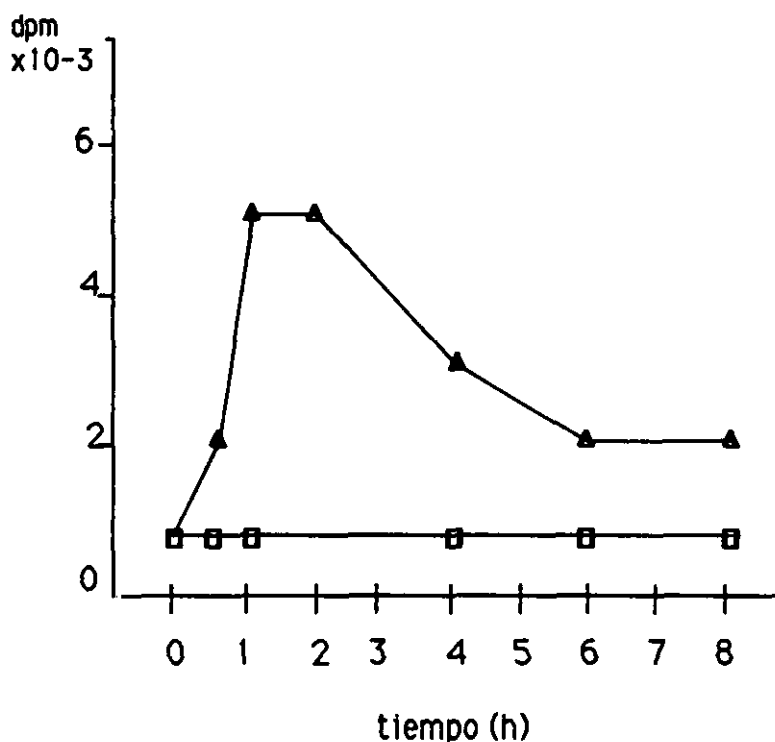


Figura 1.- Liberación en función del tiempo de DAG en ts-6-315. Células transferidas a 32°C (Δ), células mantenidas a 40.5°C (□).

Las células transformadas por el mutante mencionado se crecieron rutinariamente a 32°C y se trasladaron a temperatura restrictiva (40.5°C) durante tres días. Transcurrido este periodo de tiempo los fibroblastos presentan una morfología completamente plana.

Tras el protocolo de marcaje con (U-¹⁴C) glicerol ya descrito, se extrajeron los lípidos y se determinaron los niveles de DAG a diferentes tiempos (30', 1 h, 2 h, 4 h, 6 h y 8 h) tal y como se ha indicado en el apartado de materiales y métodos. El ensayo se realizó tanto en células que se habían cambiado a temperatura permisiva como células mantenidas a 40.5°C, sirviendo estas últimas como control.

Los resultados obtenidos, que se muestran en la figura 1, indican que tan sólo transcurridos 30' tras el cambio de temperatura ya se produce un incremento en los DAG, alcanzándose los máximos niveles de estos metabolitos entre la primera y la segunda hora posteriores al cambio de temperatura. Incluso 4 horas después de la estimulación se pueden observar niveles incrementados de DAG. Transcurrido este tiempo, se observa una meseta que da cuenta de los altos niveles basales de este segundo mensajero.

Los niveles de DAG en las células mantenidas a 40.5°C se mantienen constantes para todos los tiempos.

Liberación de IPs

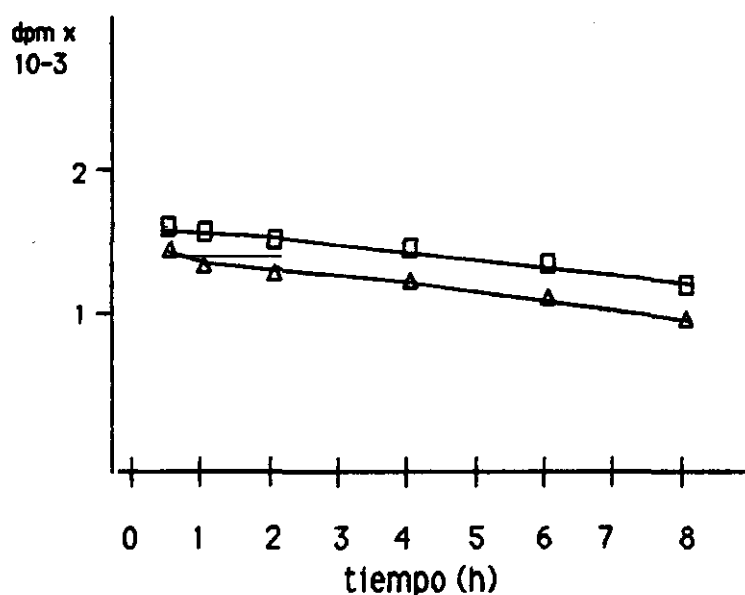


Figura 2.- Liberación de IPs en ts-6-315

Células a 32°C ó 40.5°C con LiCl (▲)

Células a 32°C ó 40.5°C sin LiCl (□)

Células ts-6-315, crecidas a 32°C y trasladadas a 40.5°C durante tres días, se marcaron con mio-2-³H-inositol siguiendo el protocolo descrito. Se determinaron los niveles de IPs tanto en presencia como en ausencia de LiCl a los mismos tiempos que se estudió la liberación de DAG, y empleando como control células mantenidas a 40.5°C.

Los resultados obtenidos, que fueron independientes de las variaciones de temperatura a las que se sometieron a las células, se muestran en la figura 2.

Como puede observarse, no se aprecia estimulación alguna del metabolismo de PIPs en este sistema celular, y la presencia del LiCl tampoco parece tener efecto sobre los niveles basales de IPs totales detectados.

Liberación de colina y fosforilcolina

Las células ts-6-315 se marcaron con (meti-¹⁴C) colina bajo condiciones restrictivas y se estimularon a 32°C siguiendo el protocolo ya conocido.

Tras detener la reacción se estimó el contenido en colina y fosforilcolina, tal y como se ha descrito en materiales y métodos, a distintos tiempos: 30', 1 h, 2 h, 4 h, 6 h y 8 h.

Los niveles de estos metabolitos también se determinaron en ts-6-315, siguiendo el mismo protocolo, pero manteniéndolas a 40.5°C, de modo que estos últimos ensayos sirvieran como control.

Los resultados, que se muestran en las figuras 3 y 4, indican que el cambio de temperatura induce una liberación rápida de Cho y Pcho.

En la figura 3 se puede observar que la liberación de Pcho con respecto al tiempo es concomitante con el patrón de aparición que sigue el DAG (figura 1).

Por otra parte, en la figura 4 se constata que los niveles de colina intracelulares, lejos de disminuir incrementan tras la estimulación a 32°C.

Por último, destacar que los niveles de Pcho, así como los de Cho, permanecen prácticamente inalterados a temperatura restrictiva.

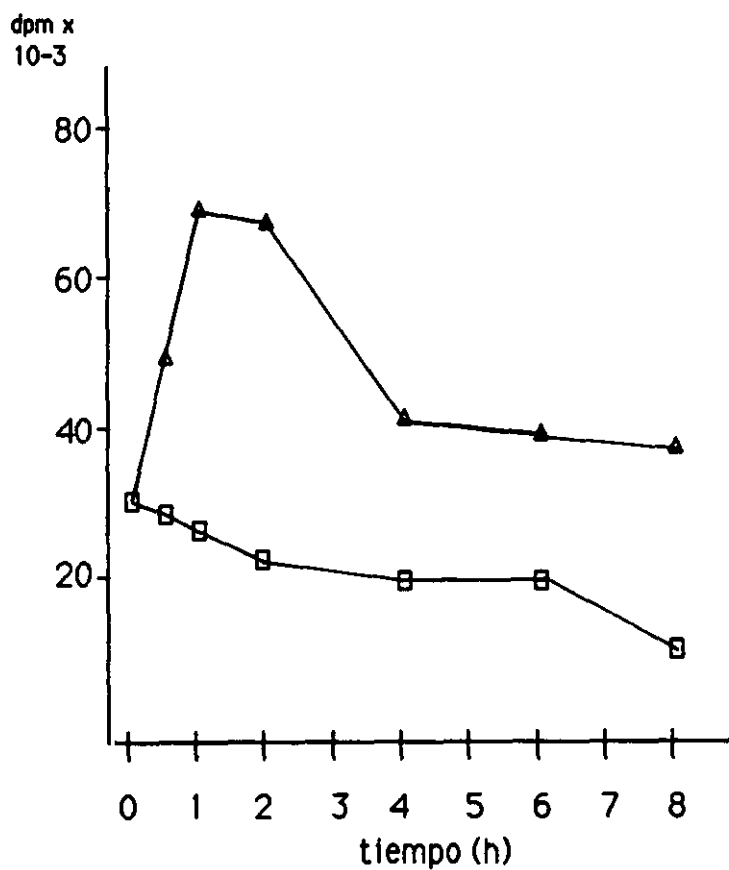


Figura 3.- Libreación de Pcho en ts-6-315
 Células mantenidas a 40.5 °C (□)
 Células estimuladas a 32°C (Δ)

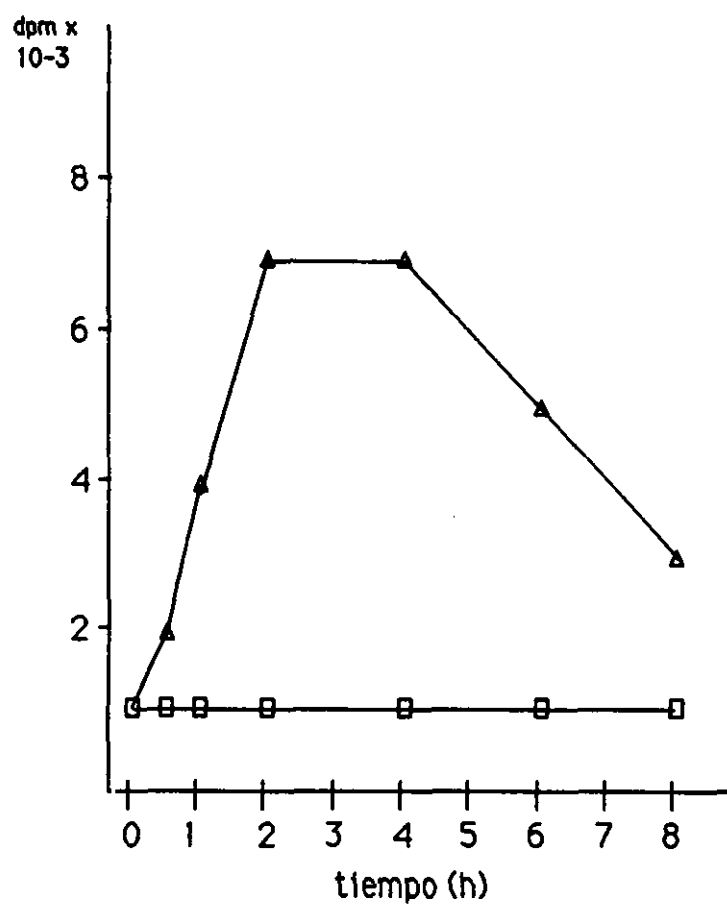


Figura 4.- Liberación de Cho en ts-6-315
Células mantenidas a 40.5°C (□)
Células estimuladas a 32°C (Δ)

Variación de los niveles de PC

Las células ts-6-315 se crecieron, se estimularon y se marcaron con (meti-¹⁴C) colina tal y como se ha descrito en los ensayos de liberación de Pcho y Cho. Las reacciones se detuvieron a 30', 1 h, 2 h, 4 h, 6 h y 8 h y se determinaron los niveles de PC.

Los resultados obtenidos, que se plasman en la figura 5, dan cuenta de un descenso rápido y transitorio en los niveles de PC tras estimularse las células a 32°C.

De la igual manera que en los ensayos anteriores, se hicieron las mismas determinaciones en células mantenidas a 40.5°C; y a esta temperatura no se observaron cambios apreciables en los niveles de PC.

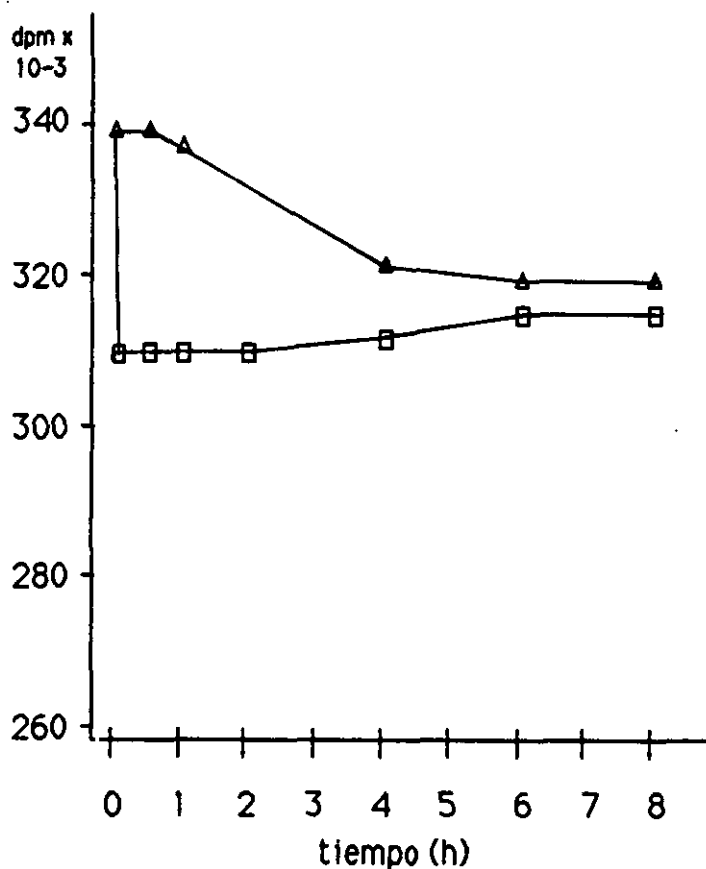


Figura 5.-Variación de niveles de PC en ts-6-315. Células estimuladas a 32°C (Δ), células mantenidas a 40.5°C (□)

Variación de los niveles de PA

Las células ts-6-315 se cultivaron tal y como se ha venido indicando y se marcaron a distintos tiempos (30', 1 h, 2 h, 4 h, 6 h y 8 h) con (U- ^{14}C) glicerol y ^{32}P -ortofosfato en experimentos paralelos. Una vez finalizada la estimulación que, como es sabido, se induce por un cambio de temperatura, se determinaron los niveles de PA en ambos ensayos.

Como controles se midieron los niveles de PA en células mantenidas a 40.5°C a los 30 minutos y a las 8 horas en ambos experimentos.

Los resultados, que se muestran en las figuras 6 y 7, indican que los niveles de PA prácticamente no se alteran tras la estimulación en ninguno de los dos casos.

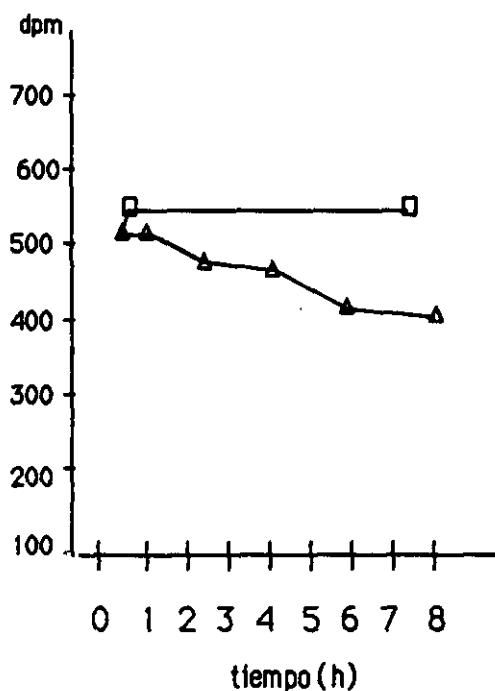


Figura 6.- Niveles de PA en ts-6-315 marcadas con (U- ^{14}C) glicerol.

Células a 32°C (▲)
Células a 40.5°C (□)

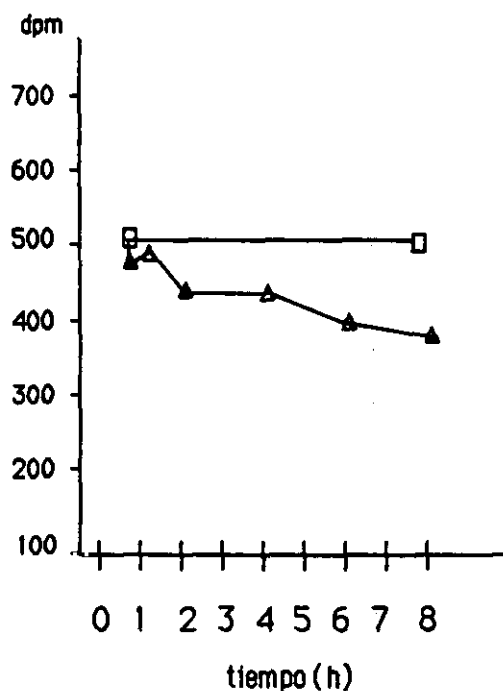


Figura 7.- Niveles de PA en ts-6-315 marcadas con ^{32}P -ortofosfato

Células a 32°C (▲)
Células a 40.5°C (□)

Efectos del propanolol sobre DAG y PA

Se aplicó a las ts-6-315 el mismo protocolo para crecimiento y marcaje con (U-¹⁴C) glicerol que se ha venido describiendo, y cuando las células se trasladaron a temperatura permisiva se les añadió propanolol a concentración 200 µM (ver materiales y métodos). El propanolol es un inhibidor establecido de la PAP (169).

Los resultados obtenidos son los que aparecen en la tabla 1.

Como puede observarse, no se producen cambios en los niveles de DAG ni de PA tras la adición de propanolol. Como control, se destaca que la adición de PLD exógena a las células marcadas con (U-¹⁴C) glicerol conduce a la liberación de PA un minuto después de haberse añadido la enzima y de DAG 10 minutos después (tabla 1).

Tabla 1.- Efectos del propanolol sobre DAG y PA

| Tratamiento | <u>30 min a 32°C</u> | | <u>2 h a 32°C</u> | |
|-------------------|----------------------|-----|-------------------|-----|
| | DAG | PA | DAG | PA |
| Blanco | 2.0 | 1.0 | 5.0 | 1.0 |
| Propanolol | 2.2 | 1.0 | 4.8 | 1.0 |
| PLD (1') | 2.1 | 3.1 | 5.2 | 3.2 |
| PLD (1') + Prop. | 2.2 | 3.2 | 4.8 | 3.4 |
| PLD (10') | 4.1 | 5.2 | 7.2 | 5.3 |
| PLD (10') + Prop. | 2.7 | 8.2 | 5.1 | 8.3 |

Nota: Los valores numéricos expresados en la tabla indican el número de veces que el metabolito está incrementado en relación con el control, control que consistió en mantener las células a 40.5°C en ausencia de propanolol y PLD. Los valores de los controles fueron: 2200 dpm/pocillo para PA y 950 dpm/pocillo para DAG.

Efectos del etanol sobre PA y PEt

Las células ts-6-315 marcadas con ^{32}P -ortofosfato se estimularon mediante un cambio de temperatura en presencia y en ausencia de etanol (0.5%) paralelamente. La adición de etanol en sistemas en los que PLD está activada conduce a la formación de PEt que es un metabolito estable (170).

Una vez concluida la reacción se extrajeron el PA y el PEt. Tanto para marcar las células como para crecerlas, estimularlas y extraer los metabolitos mencionados, se siguieron los protocolos descritos en materiales y métodos.

Los resultados que aparecen en la tabla 2, indican que el PEt no se forma en las células marcadas con ^{32}P -ortofosfato, y estimuladas a 32°C .

Como control, se puede observar que la adición de PLD exógena en presencia de etanol conduce a la aparición de PA 1 y 10 minutos después de añadirse la enzima, y a la formación de PEt (tabla II).

La presencia de etanol (0.5%) durante la estimulación con PLD promueve la aparición de PEt y disminuye la producción de PA por PLD (tabla II).

Tabla 2.- Efecto del etanol sobre PA y PEt

| Tratamiento | <u>30 min a 32°C</u> | | <u>2 h a 32°C</u> | |
|------------------|---|-----|--|-----|
| | PA | PEt | PA | PEt |
| | dpmx 10^{-3} /pocillo | | dpmx 10^{-3} /pocillo | |
| Blanco | 2.0 | 1.5 | 2.1 | 1.4 |
| EtOH | 2.0 | 1.6 | 2.0 | 1.7 |
| PLD (1') | 6.5 | 1.7 | 6.3 | 1.5 |
| PLD (1') + EtOH | 4.1 | 3.4 | 4.0 | 3.5 |
| PLD (10') | 10.2 | 1.7 | 10.9 | 1.7 |
| PLD (10') + EtOH | 6.7 | 5.7 | 6.5 | 5.9 |

Nota: Como control se determinaron los valores de PA y PEt en células mantenidas a 40.5°C en ausencia de etanol y PLD. Los valores obtenidos fueron: 2150 dpm/pocillo para PA y 1540 dpm/pocillo para PEt.

Síntesis de DNA inducida a 32°C en un mutante de Ki-ras sensible a temperatura.

Las células ts-6-315 se crecieron rutinariamente a 32°C, trasladándose durante tres días a 40.5°C con el fin de que adquirieran morfología completamente plana. Una vez cumplido este tratamiento, y tras estimularlas a 32°C, se realizaron determinaciones de incorporación de ³H-timidina a DNA a distintos tiempos (2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h y 12 h).

El protocolo seguido para este ensayo se ha descrito ya en el capítulo de materiales y métodos.

Como controles, se realizaron paralelamente las mismas determinaciones de incorporación de ³H-timidina a DNA, a los mismos tiempos, en células mantenidas a temperatura restrictiva.

De los resultados que se muestran en la figura 8 se deduce que dos horas después del cambio de temperatura ya se puede detectar incorporación de ³H-timidina, incorporación que será máxima a las 6 horas de producirse la estimulación.

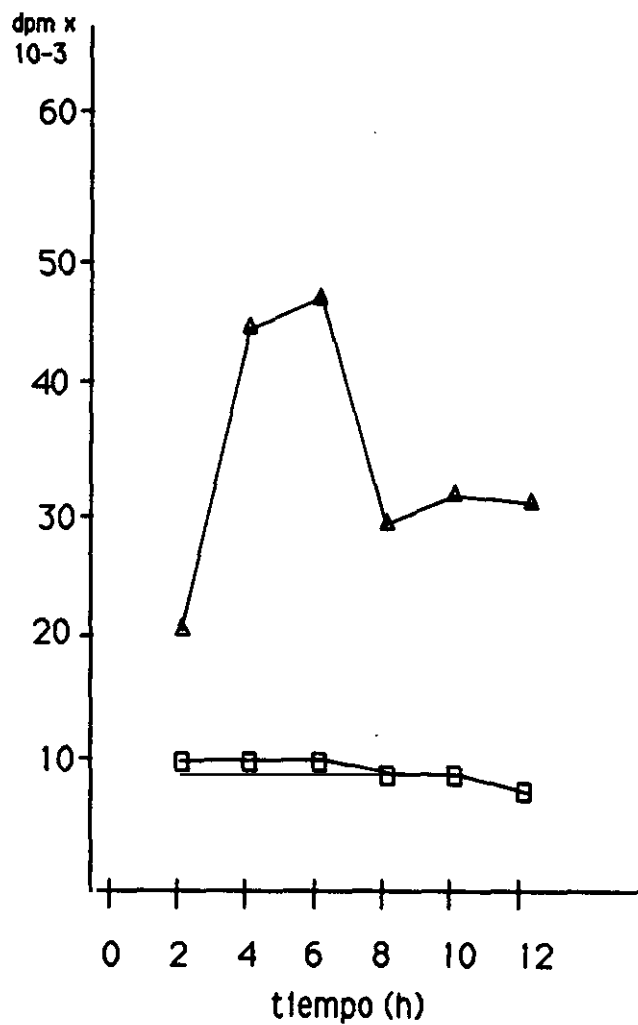


Figura 8.- Incorporación de ^3H -timidina a DNA en ts-6-315. Células a 40.5°C (□), células a 32°C (Δ).

Efectos del suero en liberación de Pcho y síntesis de DNA en fibroblastos normales

Liberación de Pcho en fibroblastos inducida por suero

Los fibroblastos normales Swiss 3T3 se crecieron y marcaron con (metil- ^{14}C) colina como ya se ha descrito. Y fueron estimulados o no con suero al 10% (v/v) a diferentes tiempos (1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h y 16 h). Una vez detenida la reacción, se determinaron los niveles de Pcho (ver materiales y métodos).

Los resultados que se muestran en la figura 9 demuestran que se producen cambios muy pequeños o nulos en los niveles de Pcho hasta que transcurren 4 horas desde el momento de la estimulación.

Los niveles máximos de Pcho tardan en alcanzarse 12 horas a partir de la adición del suero.

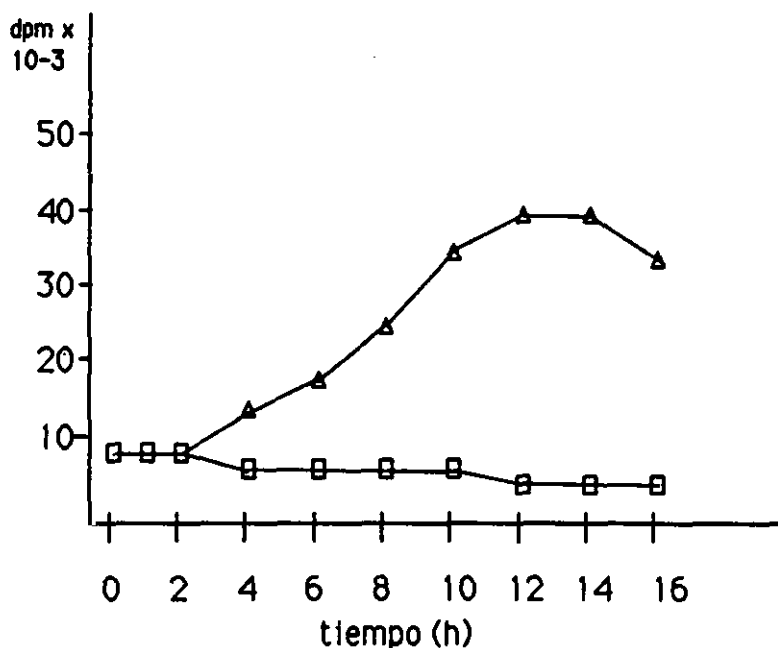


Figura 9.- Liberación de Pcho en Swiss 3T3 en respuesta a suero. Células no estimuladas con suero (□). Células estimuladas con 10% de suero (Δ).

Síntesis de DNA en fibroblastos en respuesta a suero

Las células Swiss 3T3 se crecieron como se ha indicado y siguiendo el protocolo establecido se marcaron con ^3H -timidina en presencia y en ausencia de un 10% (v/v) de SBF. Una vez detenida la reacción se estimó la cantidad de ^3H -timidina incorporada al DNA.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10 e indican que para que el suero induzca síntesis de DNA se requieren al menos 10 horas de estimulación.

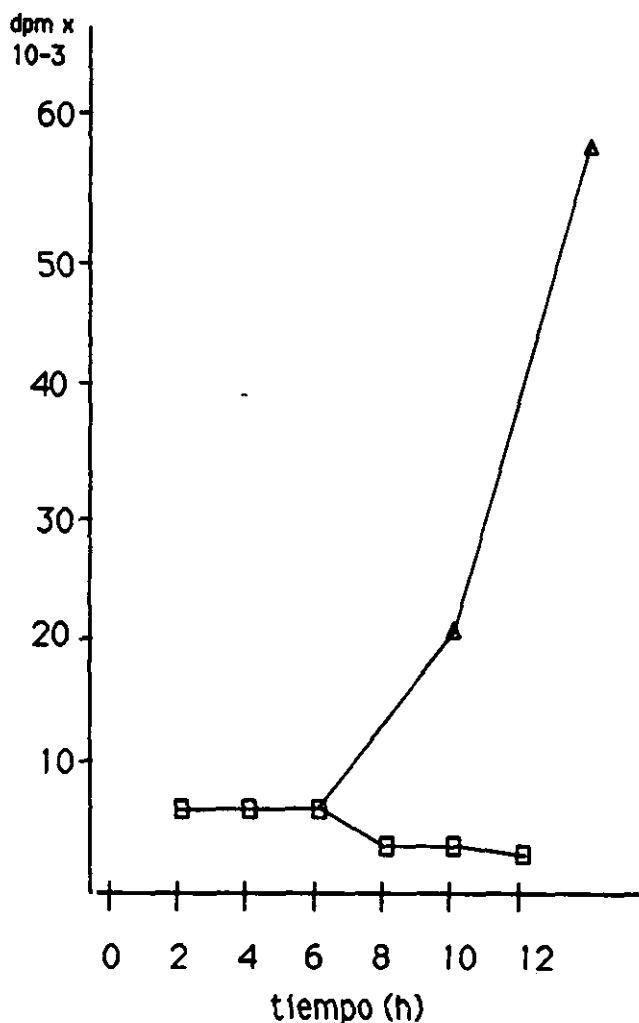


Figura 10.- Síntesis de DNA inducida por suero en Swiss 3T3. Células no estimuladas con suero (□). Células estimuladas con suero 10% (Δ).

Puesta a punto de las condiciones para el recubrimiento de partículas de poliestireno con el anticuerpo correspondiente

Como se ha indicado en el apartado de materiales y métodos, fué necesario realizar un estudio de las condiciones idóneas de pH, temperatura y tiempo de incubación para el recubrimiento de las partículas con IgG.

Una vez que el anticuerpo se adsorbió al soporte, se tuvo que elegir el mejor agente bloqueante de uniones inespecíficas.

Todos los ensayos se relizaron empleando como anticuerpo IgG inespecífica de conejo.

De los resultados que se exponen a continuación, se eligieron las mejores condiciones de ensayo.

Estudio de pH

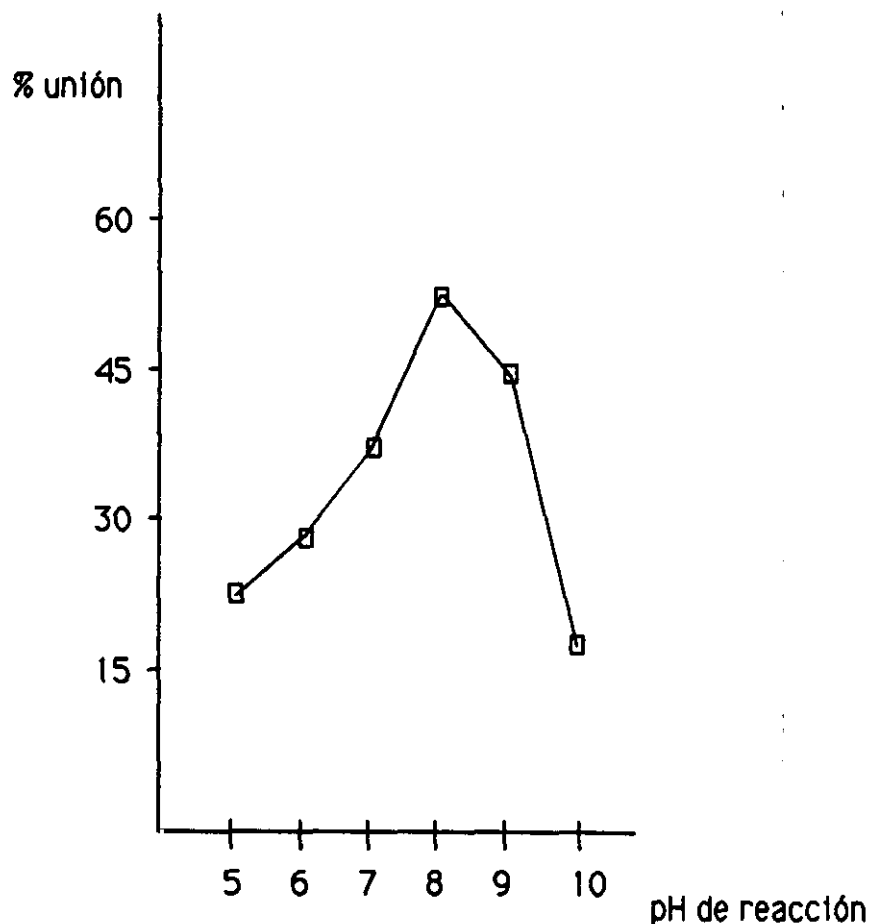


Figura 11.- Efecto del pH en la adsorción de IgG sobre partículas de poliestireno

Estudio de temperaturas y tiempos de incubación

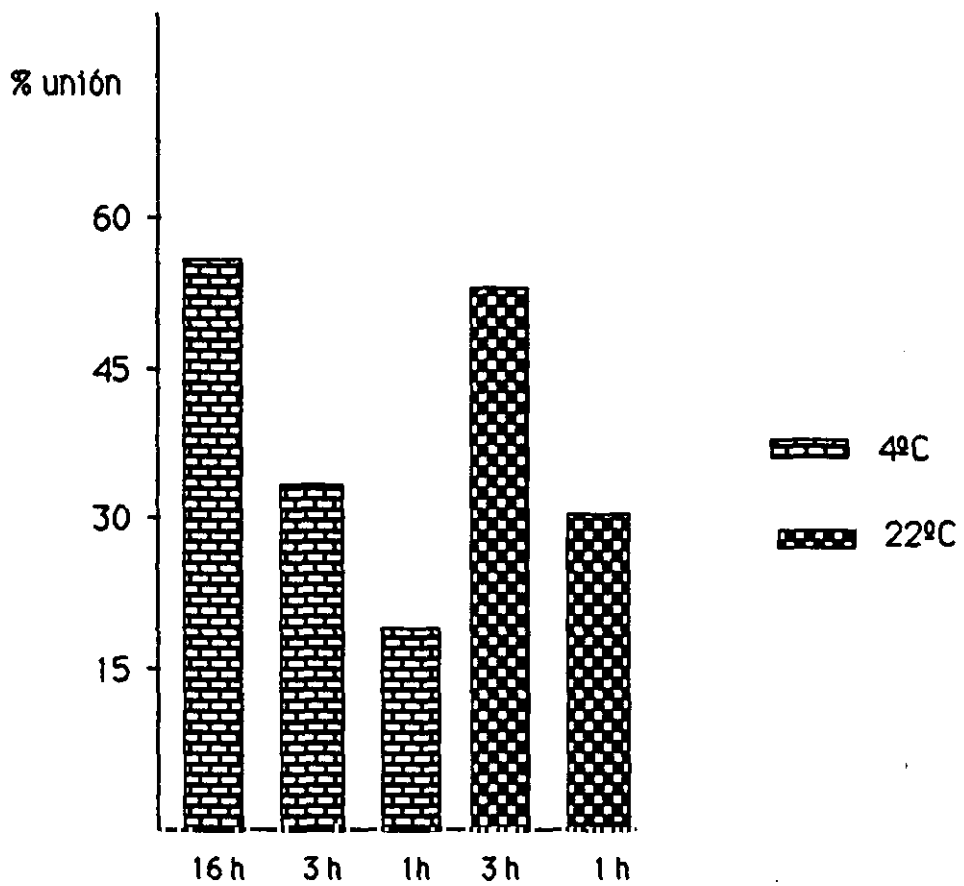


Figura 12.- Efecto de la temperatura y el tiempo de incubación en la adsorción de IgG sobre partículas de poliestireno

Estudio de agentes bloqueantes de uniones inespecíficas

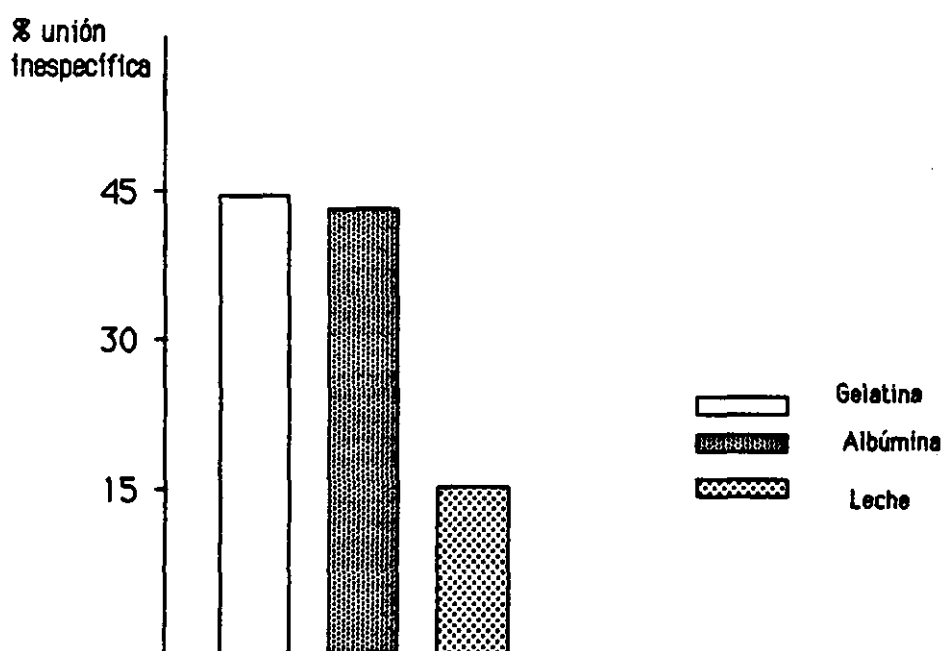


Figura 13.- % de unión inespecífica de tres agentes bloqueantes

A la vista de las gráficas 11 y 12, se eligieron las siguientes condiciones para recubrir las partículas de poliestireno: pH=8.0 y tiempo de incubación, bien 16 h a 4°C, bien 3 h a 22°C. Y a partir de los datos que se exponen en la gráfica 13, se eligió como agente bloqueante la leche desnatada en polvo.

Reconocimiento de p210 por la combinación de diferentes anticuerpos en ensayo tipo sandwich.

En los ensayos que se describen a continuación se emplearon como anticuerpos primarios los siguientes anti-bcr:

| Región | Secuencia | Nombre |
|----------------------|-------------------|-------------|
| 103-114 (Exon I) | (C)DGADPPPAEEPE | anti-bcr-92 |
| 417-426 (Exon I) | DGEGAFHGDA(C) | anti-bcr-72 |
| 898-911 (Unión 2 -3) | TINKEDDESPGLYG(C) | anti-bcr-56 |

Estos péptidos se unieron a soportes esféricos de poliestireno tal y como se ha descrito en materiales y métodos.

La línea celular empleada como portadora de p210 fué la K562.

Las líneas empleadas como controles negativos fueron: HL-60 y NB4.

Los lisados citosólicos de estas células se incubaron, siguiendo el protocolo de ensayo tipo "sandwich" previamente descrito.

Como anticuerpos secundarios marcados se utilizaron los siguientes anti-abl:

| Región | Secuencia | Nombre |
|----------------------------|--------------------|------------|
| 51-64 (ant. a SH3) | KENLLAGPSENDPN(C) | anti-abl-1 |
| 389-403 (tyr-quinasa) | DEVEKELGKRGTRGG(C) | anti-abl-2 |
| 501-512 (pos. tyr-quinasa) | YISDEVEKELGK | anti-abl-3 |

Todos los anticuerpos empleados son policlonales excepto anti-abl-1.

MARCAJE DE ANTI-ABL-1, ANTI-ABL-2 Y ANTI-ABL-3

Los anticuerpos se marcaron según el protocolo descrito en materiales y métodos.

Las curvas de elución para cada uno de ellos, que resultaron del conteo de una alícuota de 5 μ l de cada fracción colectada, se muestran a continuación.

En base a estos resultados se calculó la actividad específica para cada anticuerpo.

Marcaje de anti-abl-1

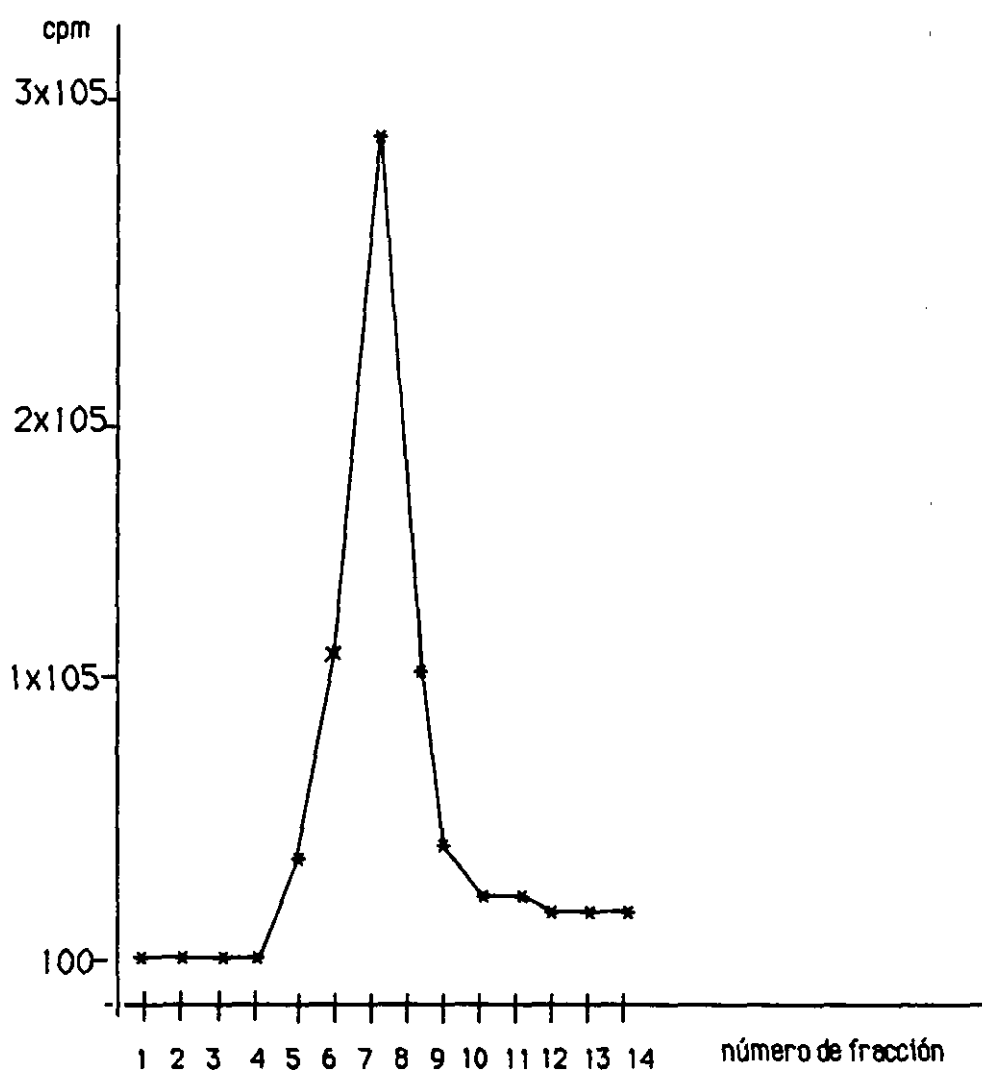


Figura 14.- Curva de elución de ¹²⁵I-anti-abl-1

Actividad específica_{anti-abl-1} = 17×10^6 cpm/ μ g

Marcaje de anti-abl-2

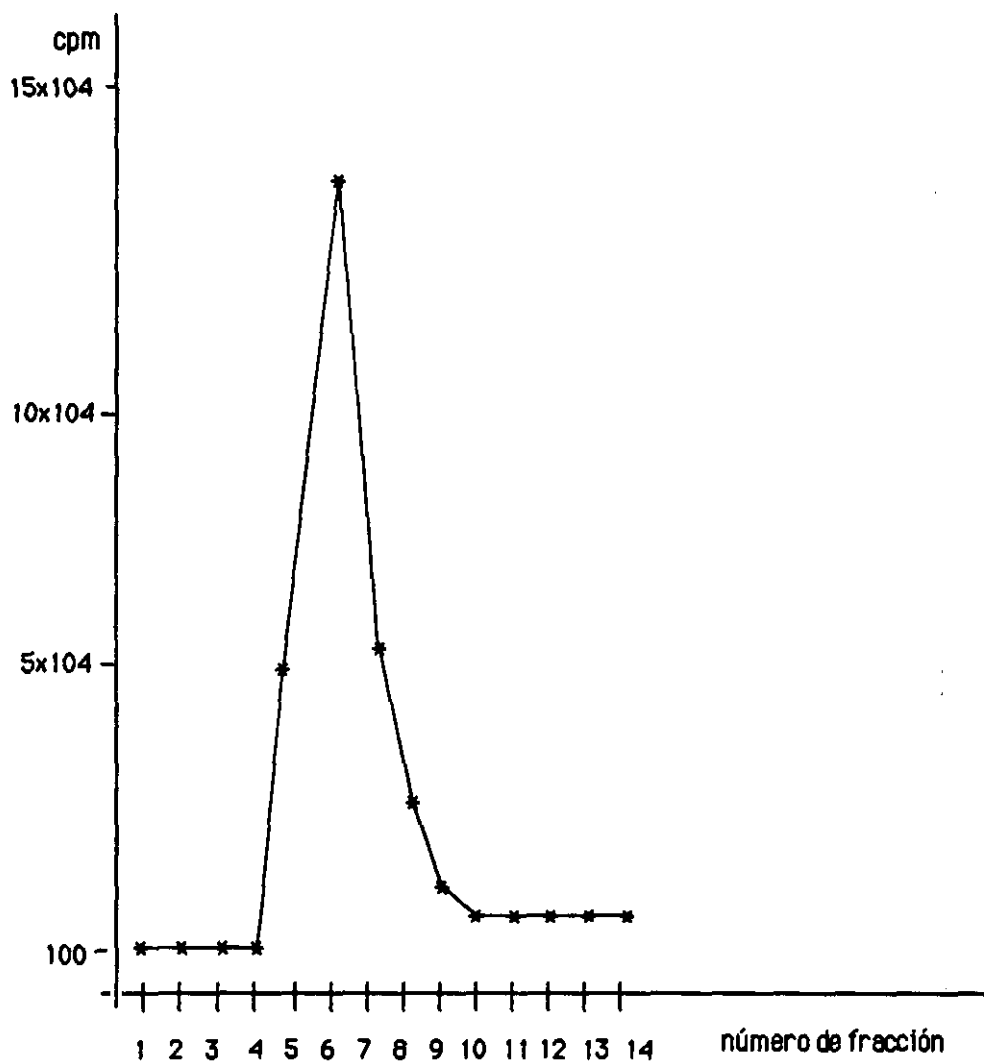


Figura 15.- Curva de elución de ¹²⁵I-anti-abl-2

Actividad específica anti-abl-2 = 6×10^6 cpm/ μ g

Marcaje de anti-abl-3

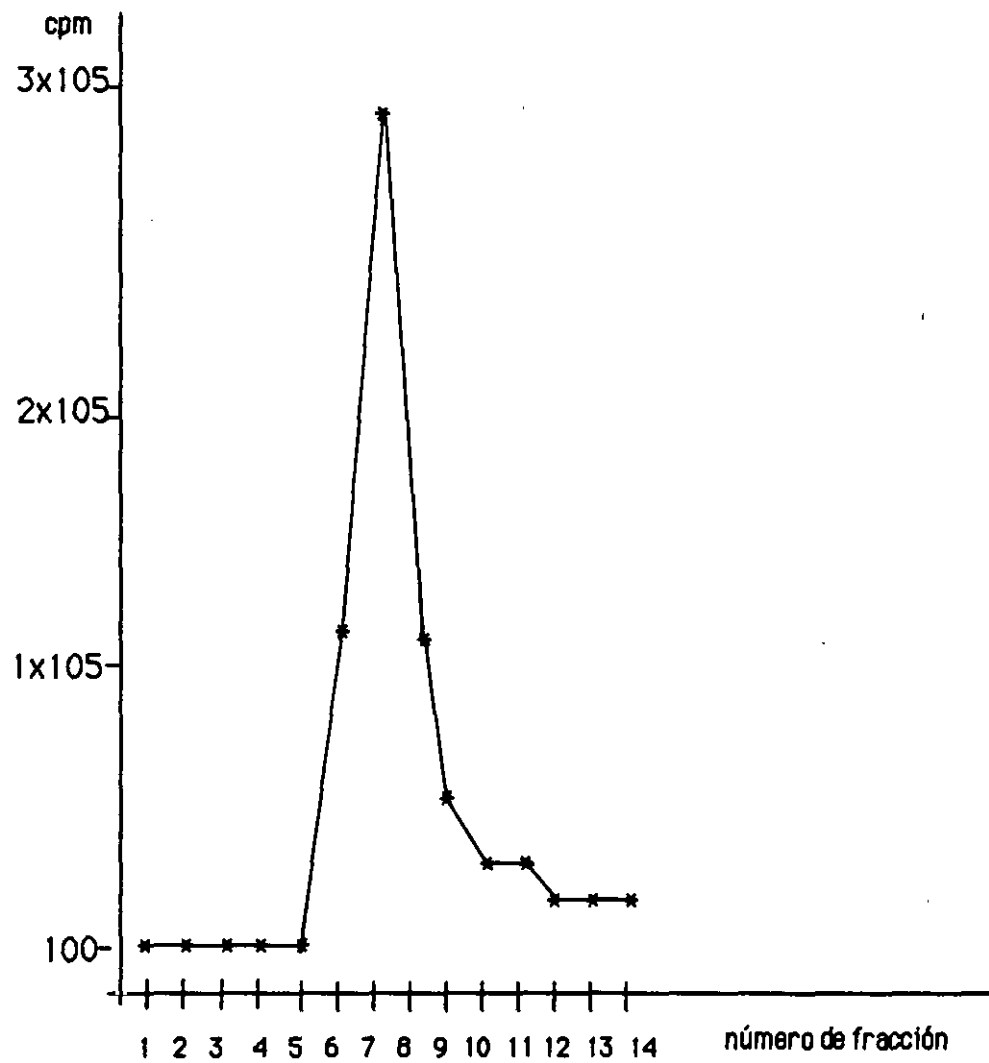


Figura 16.- Curva de elución de ^{125}I -anti-abl-3

Actividad específica anti-abl-3 = 16×10^6 cpm/ μg

En las siguientes figuras se muestran los resultados obtenidos al emplear anti-abl-1 como anticuerpo secundario, y cada uno de los anti-bcr como anticuerpos primarios:

- Combinación de anti-bcr-72 con anti-abl-1

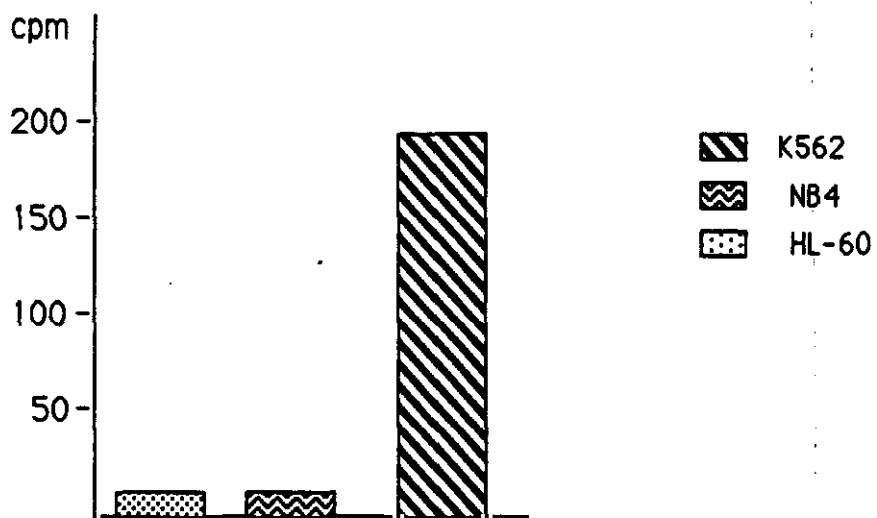
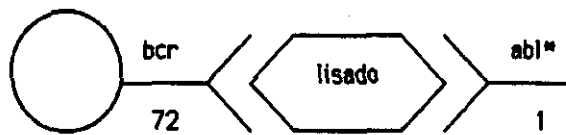


Figura 17.- Reconocimiento de proteínas por la combinación anti-bcr-72 y anti-abl-1

- Combinación de anti-bcr-92 con anti-abl-1 :

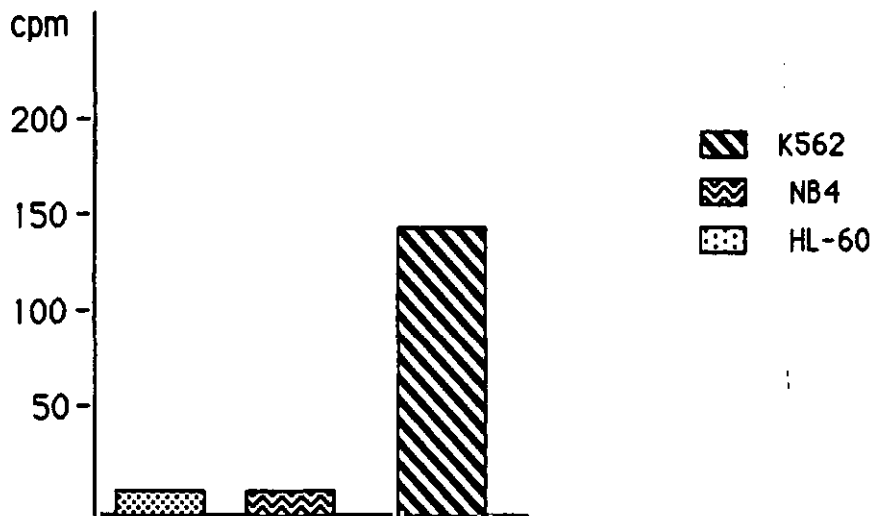
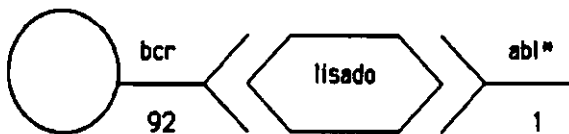


Figura 18.- Identificación de proteínas por la combinación anti-bcr-92 y anti-abl-1

- Combinación de anti-bcr-56 con anti-abl-1:

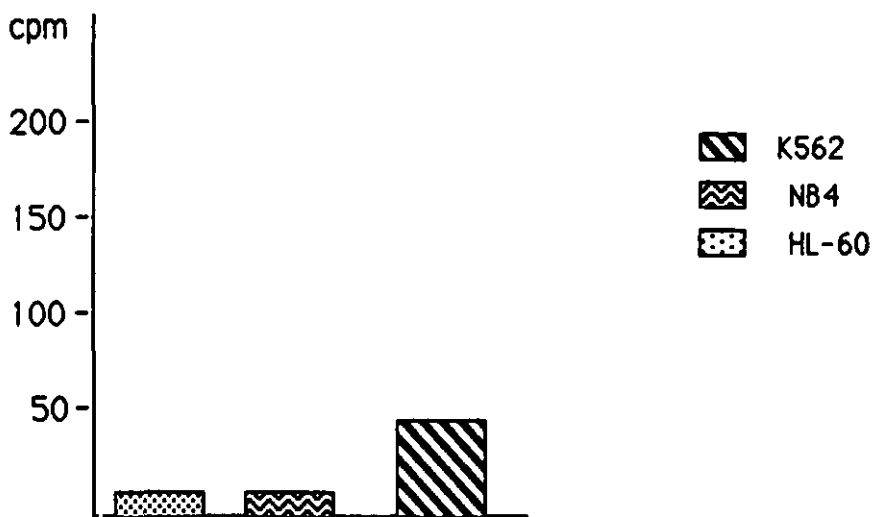
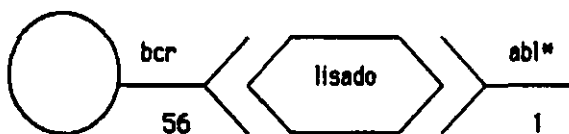


Figura 19.- Identificación de proteínas por la combinación anti-bcr-56 y anti-abl-1

En las siguientes figuras se muestran los resultados obtenidos al emplear anti-abl-2 como anticuerpo secundario y cada uno de los anti-bcr como primarios.

-Combinación de anti-bcr-72 con anti-abl-2

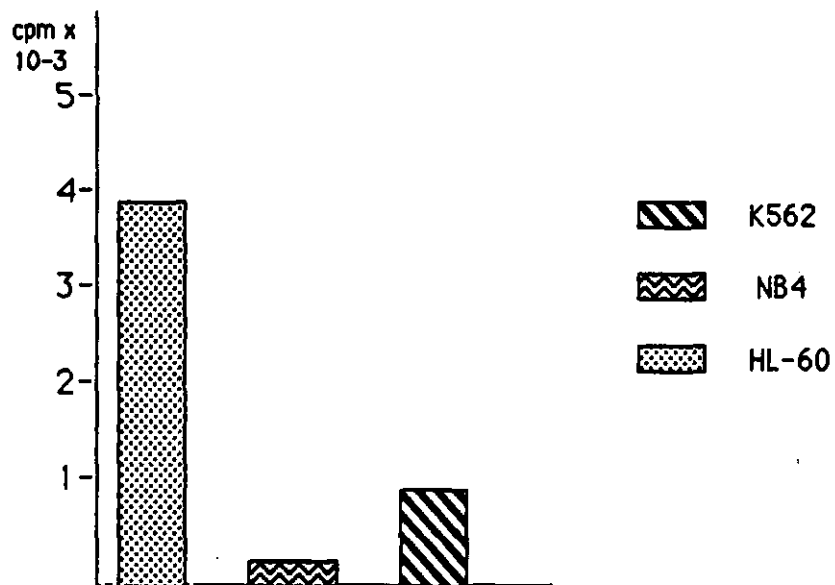
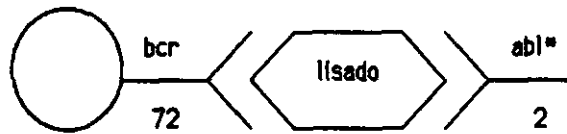


Figura 20.- Identificación de proteínas por la combinación anti-bcr-72 y anti-abl-2

-Combinación de anti-bcr-92 con anti-abl-2

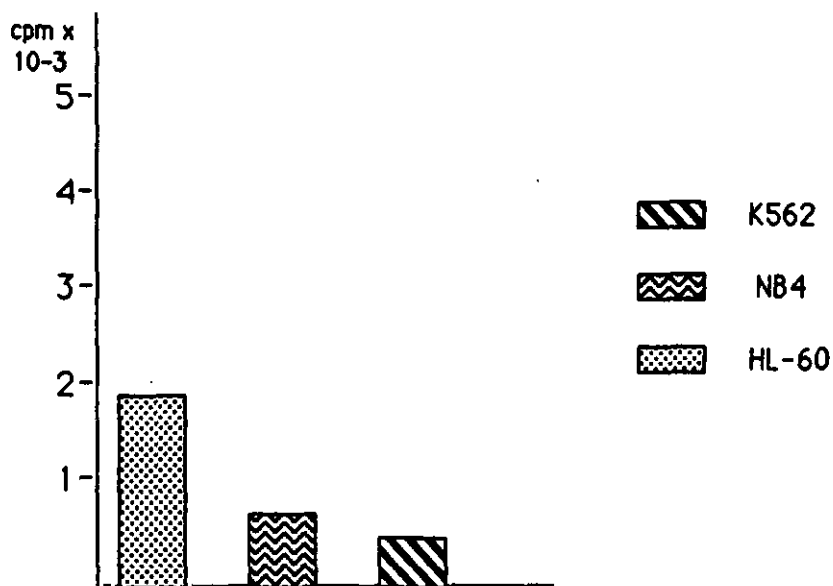
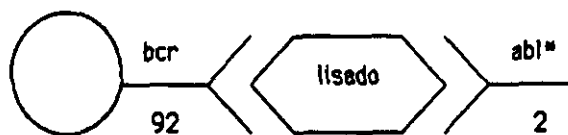


Figura 21.- Identificación de proteínas con la combinación anti-bcr-92 y anti-abl-2

-Combinación de anti-bcr-56 con anti-abl-2

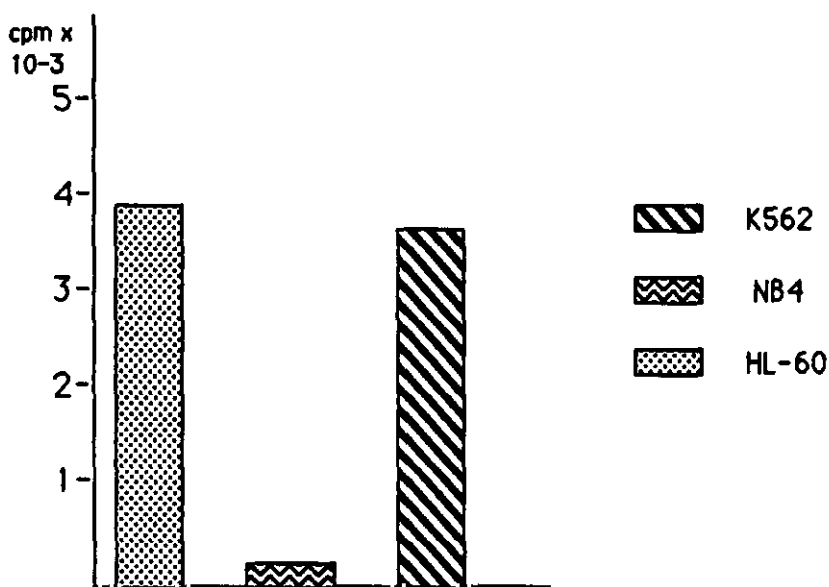


Figura 22.- Identificación de proteínas con la combinación anti-bcr-56 y anti-abl-2

En las siguientes figuras se muestran los resultados obtenidos al emplear anti-abl-3 como anticuerpo secundario y cada uno de los anti-bcr como anticuerpos primarios.

-Combinación de anti-bcr-72 con anti-abl-3

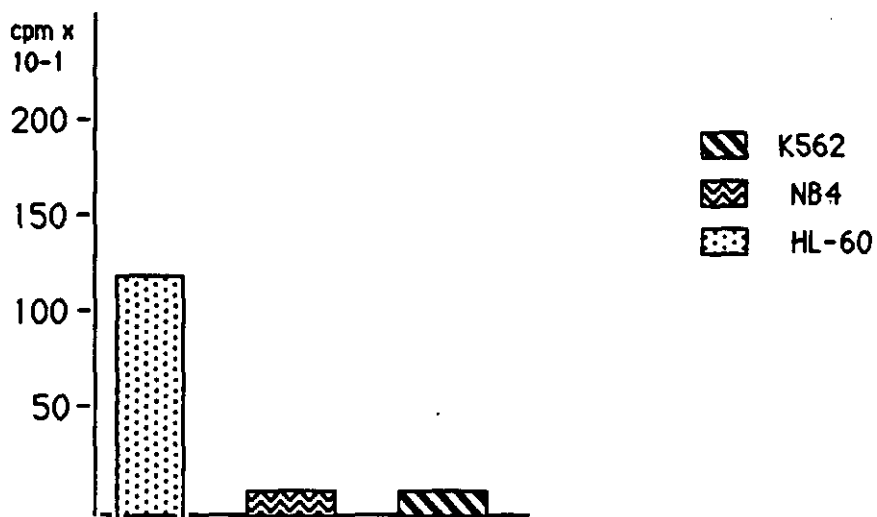
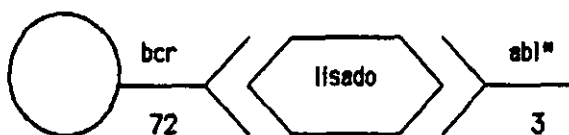


Figura 23.- Identificación de proteínas con la combinación anti-bcr-72 y anti-abl-3

-Combinación de anti-bcr-92 con anti-abl-3

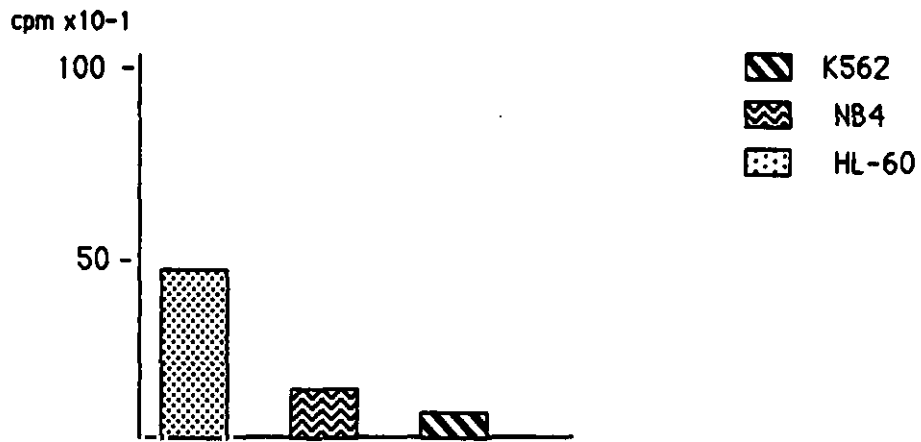
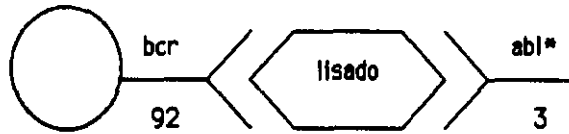


Figura 24.- Identificación de proteínas con la combinación anti-bcr-92 y anti-abl-3

-Combinación de anti-bcr-56 con anti-abl-3

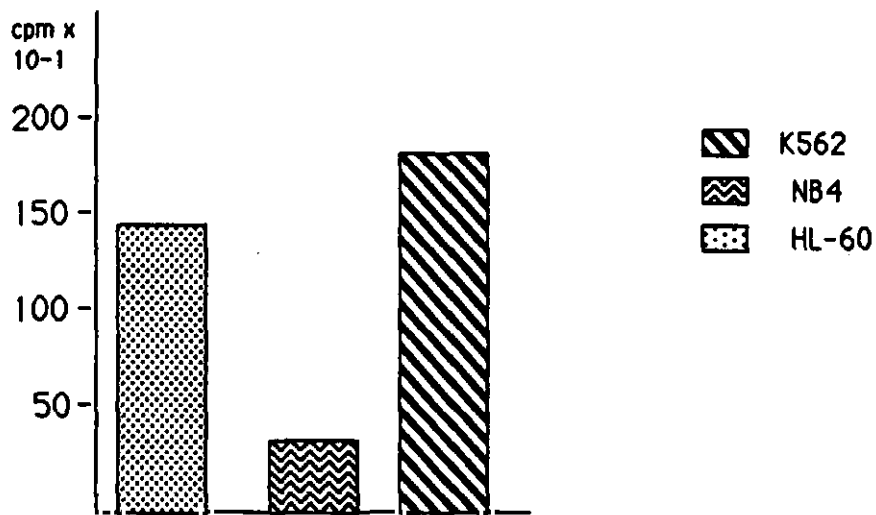
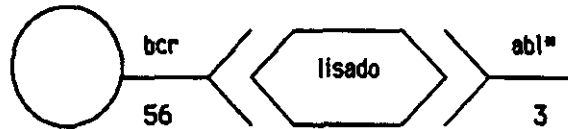


Figura 25.- Identificación de proteínas con la combinación anti-bcr-56 y anti-abl-3

Los resultados expuestos en las nueve últimas gráficas (figuras 17-25) indican que el mejor reconocimiento de p210 por parte de los anti-abl empleados es el que produce el anti-abl-1. Este anticuerpo reconoce una región de abl inmediatamente anterior a la zona SH3 de la proteína.

La mejor combinación de anticuerpos en ensayo tipo "sandwich" para la identificación del marcador tumoral mencionado, se produce cuando se emplea como anticuerpo primario uno de los anti-bcr obtenidos frente al exón I (anti-bcr-72 o anti-bcr-92) , y como anticuerpo secundario el anti-abl-1 (figuras 17 y 18). No se obtienen tan buenos resultados si se emplea como anticuerpo primario anti-bcr-56 y se mantiene el mismo anticuerpo secundario, ya que tal y como se observa en la figura 19, con esta combinación hay un reconocimiento muy bajo de p210.

Los anti-abl- 2 y 3, que reconocen parte de la actividad tyr-quinasa el primero, y la región inmediatamente posterior el segundo, dan señal de reconocimiento en los lisados de las células empleadas como controles negativos (HL-60 y NB4) en las que se sabe que p210 no está presente.

Curvas de dosis-respuesta en reconocimiento de p210 por anti-bcr frente a exón I (72 y 92) y anti-abl-1

Se prepararon diferentes diluciones del lisado de K562 (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:8, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50) y se estudió el efecto de la dilución sobre el reconocimiento de p210 por los anti-bcr frente a exón I como anticuerpos primarios y anti-abl-1 como anticuerpo secundario.

Los resultados obtenidos, que se muestran en las figuras 26 y 27, indican un incremento en los niveles de radioactividad retenida en la esfera de poliestireno según disminuye la concentración de p210 en el medio. Esto hace suponer la existencia de una reacción de reconocimiento entre anti-bcr-72 y anti-abl-1 (figura 26), así como entre anti-bcr-92 y anti-abl-1 (figura 27) que no puede producirse cuando los anti-bcr frente al exón I tienen previamente unida p210. En este caso p210 unida a los anticuerpos primarios se reconocerá también por anti-abl-1. Por tanto, a bajas concentraciones de p210 se favorece la reacción de reconocimiento entre los anticuerpos primario y secundario.

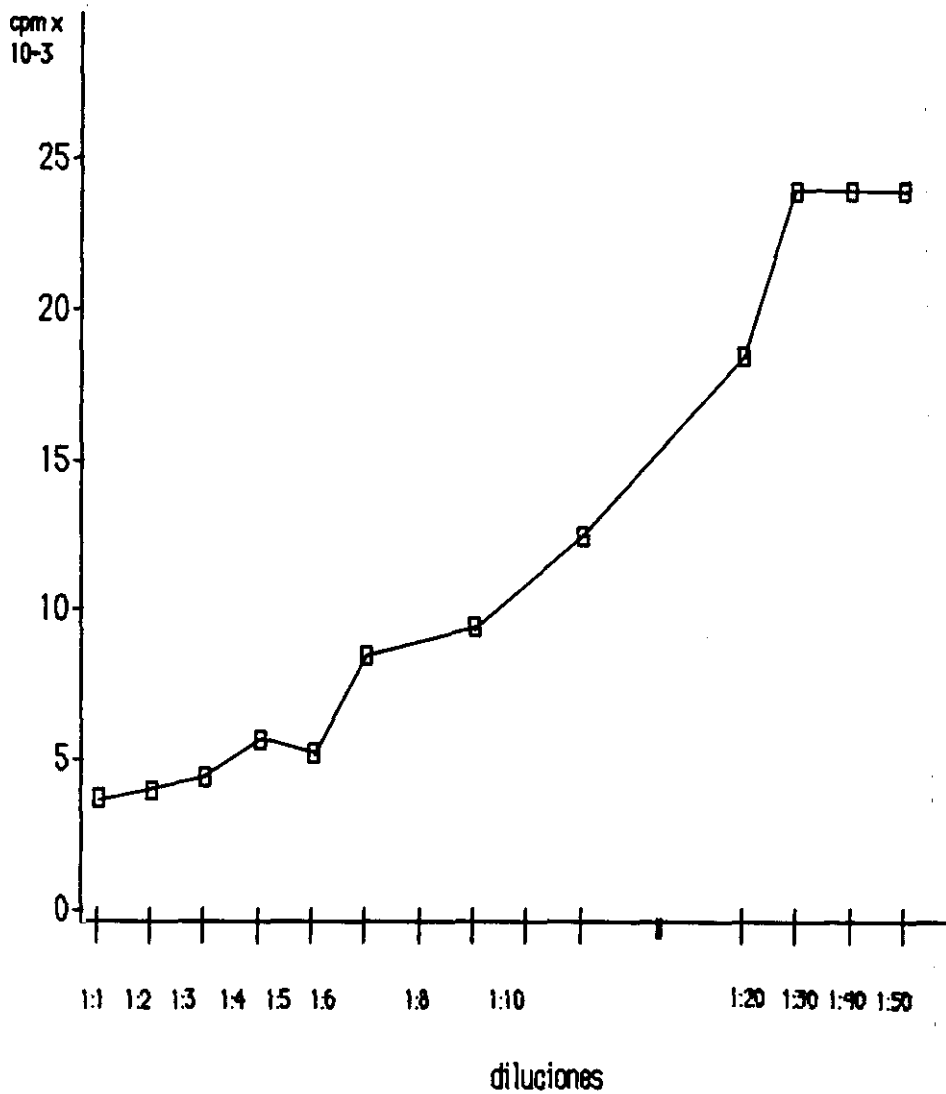


Figura 26.- Dosis-respuesta de reconocimiento de p210 por anti-bcr-72 y anti-abi-1.

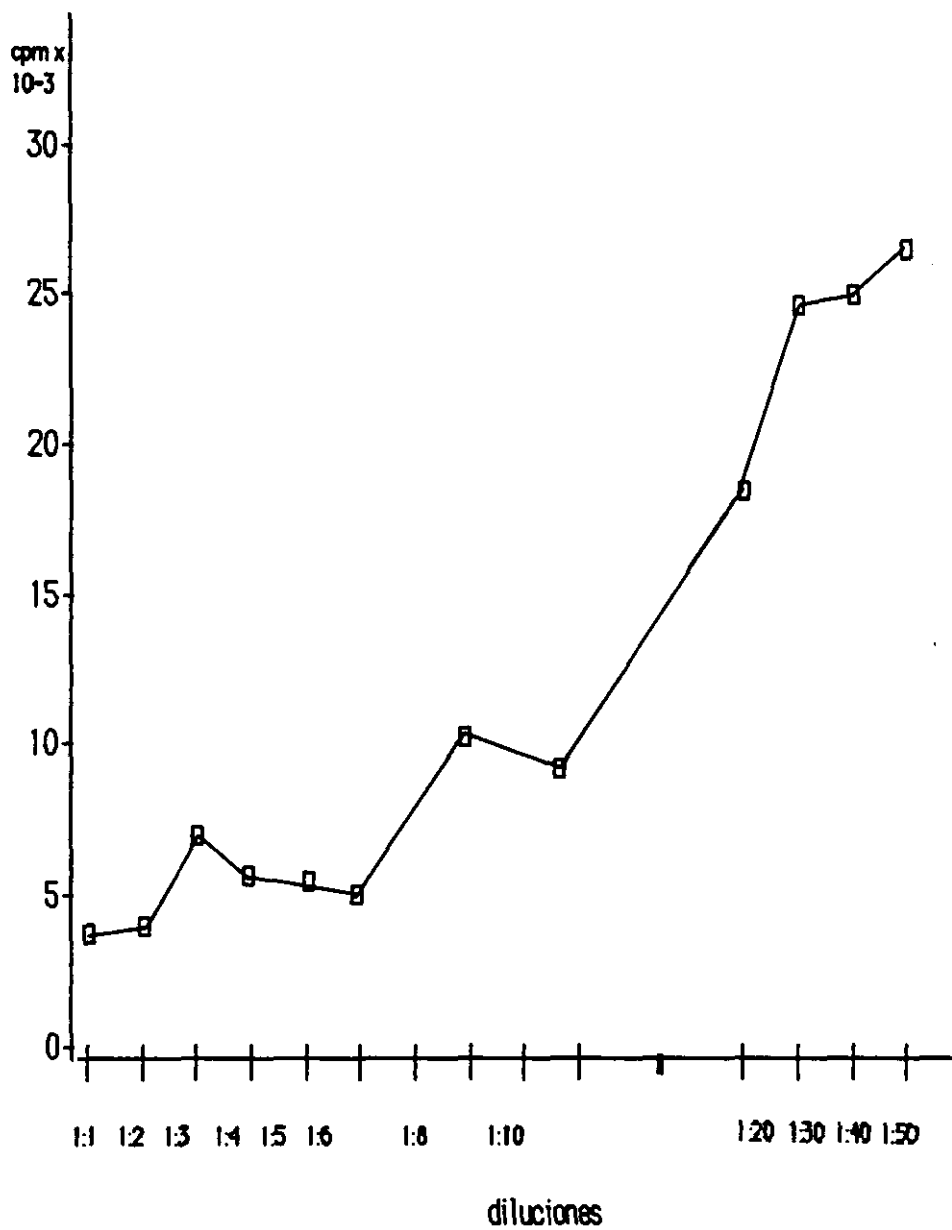


Figura 27.- Dosis respuesta de reconocimiento de p210 por anti-bcr-92 y anti-abl-1.

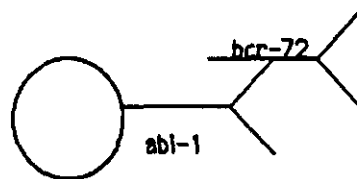
Reconocimiento de p210 tras modificación introducida en el ensayo tipo "sandwich"

Con el fin de intentar reducir el reconocimiento entre anticuerpos que se pone de manifiesto en las figuras 26 y 27, se procedió a modificar el ensayo de tipo "sandwich".

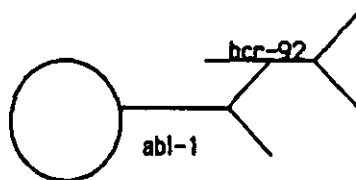
Sobre el soporte de poliestireno se adsorbió en primer lugar el anticuerpo anti-abl-1 frío. Una vez así recubiertas las esferas, y aprovechando la capacidad de anti-abl-1 para reconocer a anti-bcr-72 y 92, se incubaron en dos experimentos diferentes con cada uno de los anti-bcr frente a exón I.

Concluido el ensayo, se disponía de soportes de poliestireno recubiertos de dos modos:

a)



b)



Ambos soportes en dos experimentos paralelos se incubaron con los lisados de K562 y de NB4 y con la disolución tampón sola. Se eligió la línea NB4 como control negativo porque a la vista de los resultados de las gráficas 17-25 parece ser la que proporciona una menor respuesta.

Tras la incubación con los lisados se continuó el ensayo tipo "sandwich", empleando como anticuerpo secundario el anti-abl-1 marcado. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 28 y 29.

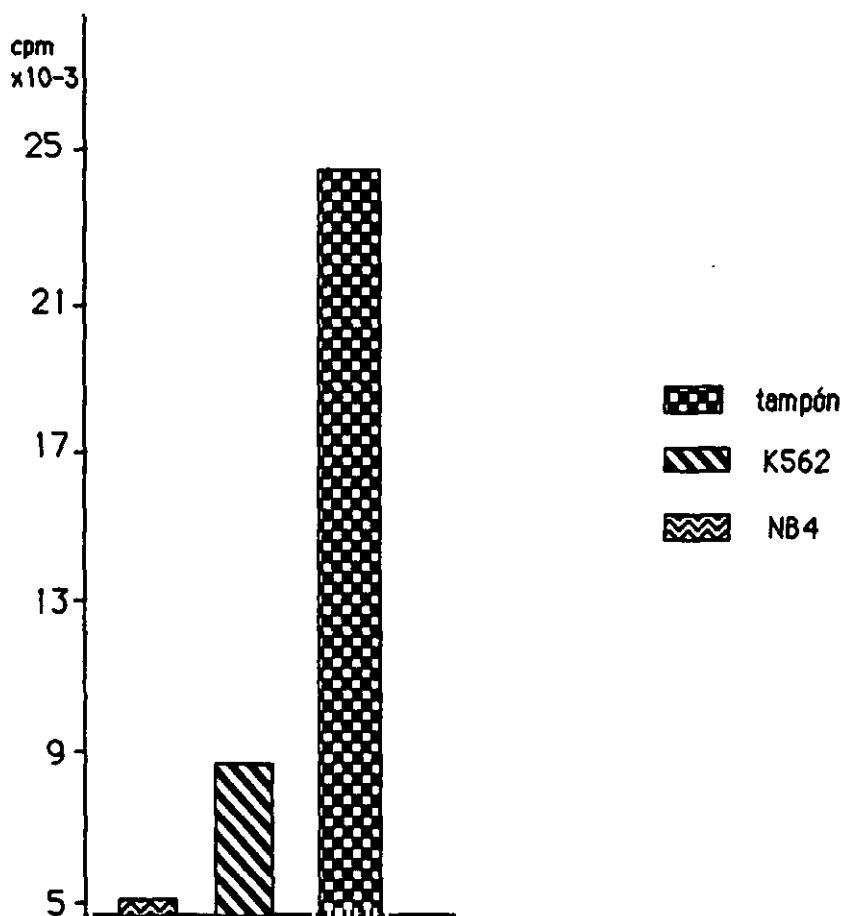
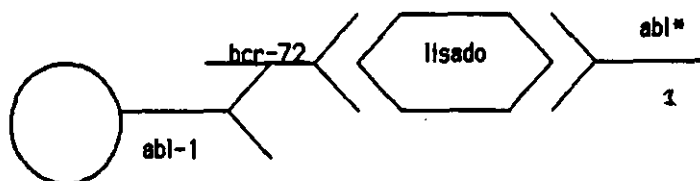


Figura 28.- Reconocimiento de proteínas por anti-bcr-72 y anti-abl-1

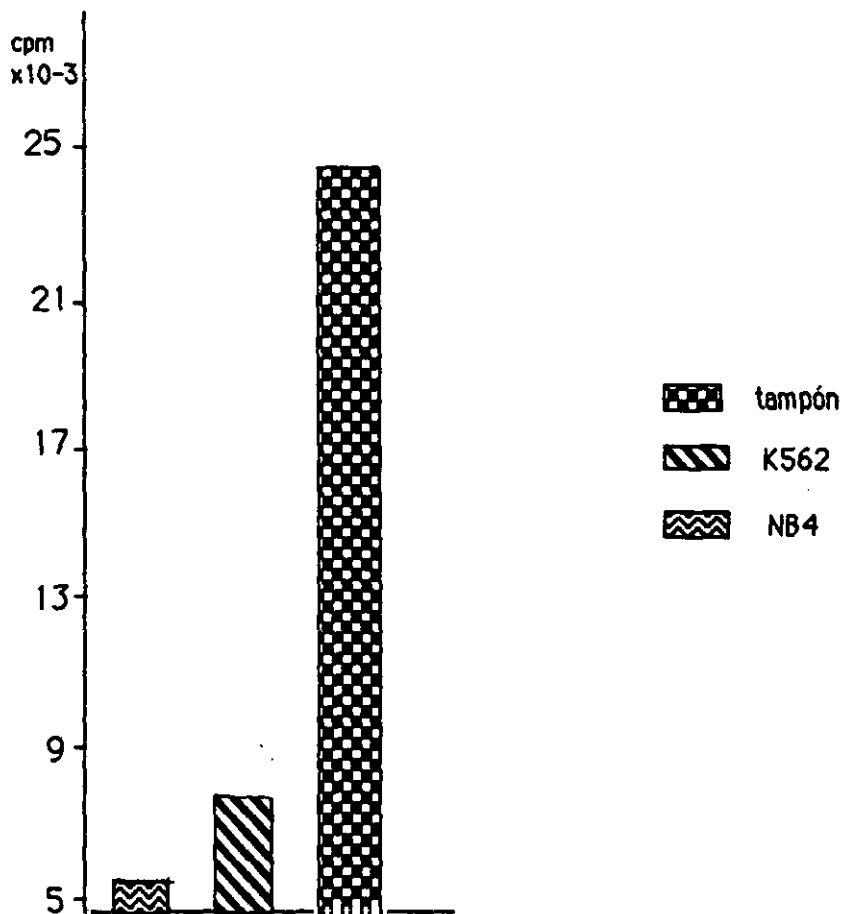
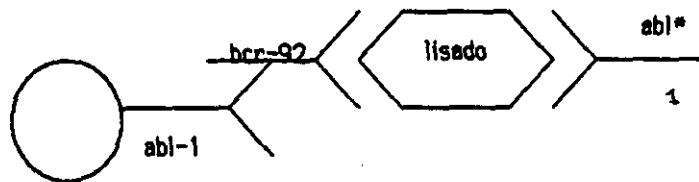


Figura 29.- Reconocimiento de proteínas por la combinación anti-bcr-92 y anti-abl-1.

Los datos que aparecen en las figuras 28 y 29 indican que a pesar de la modificación introducida en el ensayo, el anti-abl-1 sigue reconociendo la estructura de anticuerpo.

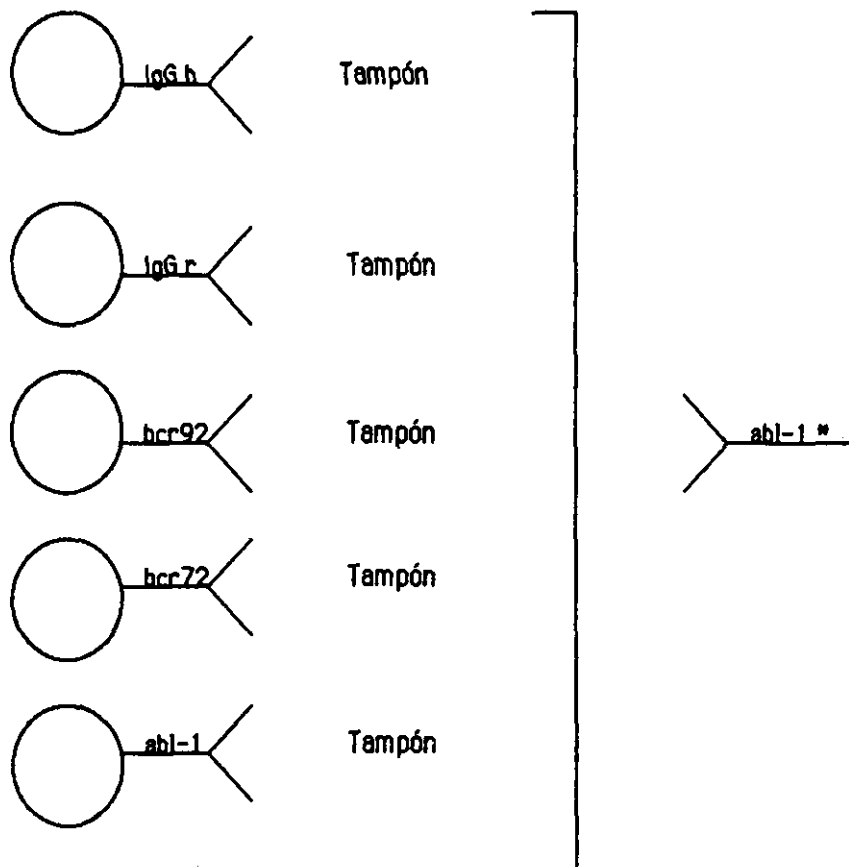
Por otra parte, se deduce que la combinación definitiva de anticuerpos que parece ser mejor, en el ensayo tipo "sandwich" para reconocer la presencia de p210 en lisados celulares es: anti-bcr-72 y anti-abl-1.

Reconocimiento de distintas IgG por anti-abl-1 en ensayo tipo "sandwich"

Sobre el soporte de poliestireno se adsorbió tal y como se ha descrito en materiales y métodos IgG humana, IgG de ratón, anti-bcr-72 , anti-bcr-92 y anti-abl-1 fríos.

Se incubaron con la disolución tampón en la que normalmente se realiza en ensayo tipo "sandwich".

Posteriormente se incubaron con anti-abl-1 marcado, como anticuerpo secundario.



Los resultados, que aparecen en la figura 30, muestran que anti-abl-1 es capaz de reconocer todas y cada una de las inmunoglobulinas con eficacia similar.

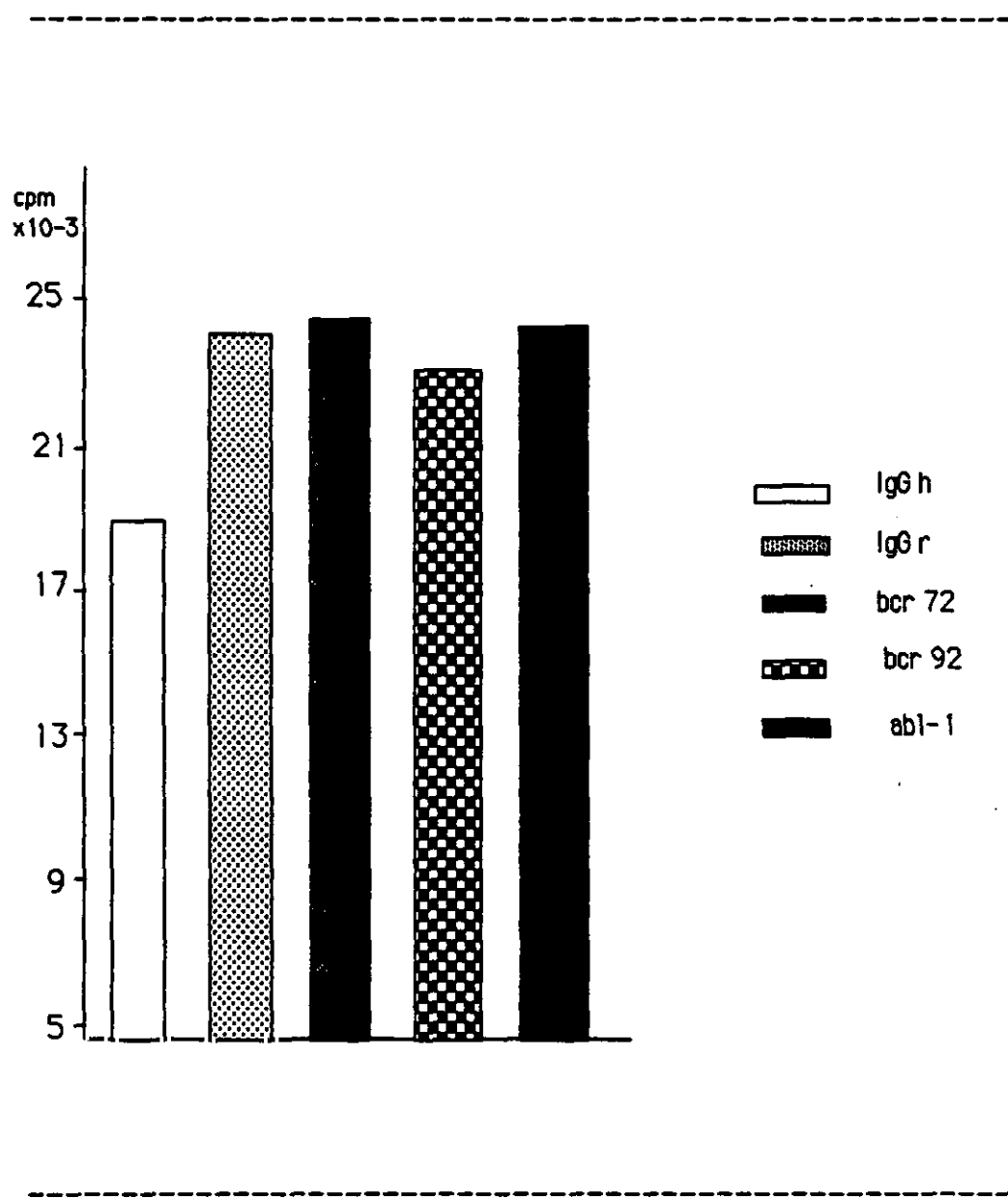


Figura 30.- Reconocimiento de IgGs por anti-abl-1

DISCUSSION

Dentro de los tipos de leucemias conocidos hasta la fecha, se encuentra la mieloblástica crónica y aguda.

La CML es una enfermedad agresiva que, como se ha indicado ya, se distingue a nivel citogenético por poseer, en un 95% de los casos, el cromosoma de Filadelfia (18).

Datos estadísticos manifiestan que, con constancia de un 30% al año, se produce la muerte en los doce primeros meses que siguen al diagnóstico. Y el tiempo medio de supervivencia viene a ser de cuatro años (171).

La causa principal de este grave desenlace es la evolución de CML a una leucemia aguda, rápida, y fatal, caracterizada por crisis blástica (172). En esta fase la enfermedad es extraordinariamente resistente a quimioterapia convencional, e incluso a tratamiento quimioterápico vigoroso seguido por trasplante de médula (173).

En su fase aguda es muy similar en cuanto a fenotipo y características clínicas a la denominada AML. Pero, la presencia del cromosoma de Filadelfia se da en menor proporción en leucemia mieloblástica aguda si se compara con la incidencia que presenta esta alteración cromosómica en CML.

Por otra parte, como ya se ha mencionado, mutaciones puntuales del oncogén ras son comunes en varios tipos de neoplasias humanas. Concretamente en AML presentan una frecuencia de un 30% lo que no ocurre en CML.

Nos encontramos, por tanto, ante dos tipos de alteraciones hematopoyéticas en las que se ven modificados bien el gen ras (en AML) o el abl (en CML). Oncogenes éstos que según se ha descrito están relacionados entre sí (105).

Por tanto, y con el fin de avanzar en el conocimiento de las bases moleculares de estas enfermedades, los ensayos de este trabajo se dirigieron a:

- Realizar un estudio cinético de rutas metabólicas afectadas por ras transformante. Lo cual fué posible utilizando como modelo la línea celular ts-6-315.

- Profundizar en las características de la quimera p210. Lo que se consiguió empleando los anticuerpos anti-bcr y anti-abl disponibles.

Los datos que derivaron de estos ensayos, y que se han expuesto en el capítulo de resultados se discuten a continuación.

El estudio cinético de las alteraciones inducidas por ras en la transducción de señales mediada por fosfolípidos se ha llevado a cabo en la mencionada línea celular mutante sensible a temperatura.

Se eligió este sistema porque las células establemente transformadas por ras no son un modelo adecuado cuando se trata de establecer una relación cinética entre la acción oncogénica, y el mecanismo de transducción de señales que induce la mitogénesis.

En primer lugar, el empleo de células transformadas crónicamente impide la investigación de cualquier relación temporal entre la función de los oncogenes y el metabolismo de PL. Además, es posible que la transformación estable lleve a las células a desarrollar modos de compensar las alteraciones iniciales en la cascada de señales que en último término conduce a la división celular; lo cual junto con los múltiples efectos de la oncogénesis, hace difícil la investigación de hechos relacionados en este sistema.

Sin embargo, en las células cedidas por P. Kaplan (ts-6-315), sí es posible realizar estos ensayos.

Ts-6-315 es una línea de fibroblastos, y las rutas activadas por oncogenes que conducen a mitogénesis se están desvelando progresivamente en este tipo de células. Y además, la transformación tumoral mediada por ras se produce rápidamente en esta línea con un simple cambio de temperatura restrictiva (40.5°C) a temperatura permisiva (32°C) (173). Transformación que se produce gracias a una mutación puntual en el aminoácido 43 de p21 (158), la cual hace a la proteína térmicamente inestable; y se manifiesta claramente por una alteración morfológica en las células al cambiarlas de temperatura. Las ts-6-315 poseen la morfología plana característica de los fibroblastos a 40.5°C y el fenotipo típico transformante a 32°C (173,174).

Los resultados obtenidos empleando el mutante sensible a temperatura muestran claramente, en lo que al metabolismo de PL se refiere, que la acción de ras y la estimulación de una fosfolipasa C específica de PC son acontecimientos cercanos en la transducción de señales.

En efecto, tal y como se observa en la figura 1, tan sólo 30 minutos después de estimularse las células a 32°C se aprecia un incremento en los niveles de DAG cuando se comparan éstos con los de los cultivos llevados en paralelo a 40.5°C. Pero los niveles máximos de este metabolito se alcanzan una o dos horas después del cambio de temperatura. Incluso cuando han transcurrido cuatro horas de estimulación, sigue habiendo niveles incrementados; y después de este tiempo, surge una meseta en la que se manifiestan altos niveles basales de DAG.

Estos resultados sugieren que la acción de p21-ras puede ser próxima a la estimulación de una PLC, y son coherentes con los resultados que se han obtenido en ensayos realizados en otros sistemas.

De hecho, se ha observado recientemente al microinyectar oocitos de *Xenopus* con p21-ras una liberación rápida de DAG (83); y además células transformadas crónicamente por este y otros oncogenes muestran los niveles basales del metabolito altos (175-177).

Por otra parte, el hecho de que las células transformadas presenten los niveles de este segundo mensajero incrementados no es algo sorprendente, puesto que, como ya se ha mencionado, los DAG son reguladores de PKC (128) y esta actividad enzimática tiene un papel clave en la respuesta proliferativa (178,179). Por tanto, es lógico pensar que la producción de DAG sea un paso importante en la cascada mitogénica.

La hidrólisis de fosfoinosítidos mediada por PLC constituye un acontecimiento fundamental en la transducción de señales estimulada por distintos agonistas, entre los que se incluyen ciertos factores de crecimiento (118, 180, 181 y 149); y esta enzima podría ser la responsable de la presencia de niveles altos de diacilgliceroles en las células transformadas por el mutante sensible a temperatura.

En base a esta hipótesis, el siguiente ensayo se dirigió a detectar alteraciones en el metabolismo de PIPs de las células ts-6-315.

Tal y como se muestra en la figura 2, no se encontró evidencia alguna de que la hidrólisis de PIPs estuviera activada.

Hay que destacar que en el sistema de *Xenopus* los dramáticos cambios en DAG se acompañan de variaciones mínimas en los productos del metabolismo de fosfoinosítidos (83); y que las células crónicamente transformadas por el oncogén ras no muestran alteraciones basales en inosítoles fosfato (177).

En base a lo expuesto anteriormente, cabe pensar que una fuente de diglicéridos diferente del metabolismo de PIPs debe estar activada por ras en ts-6-315.

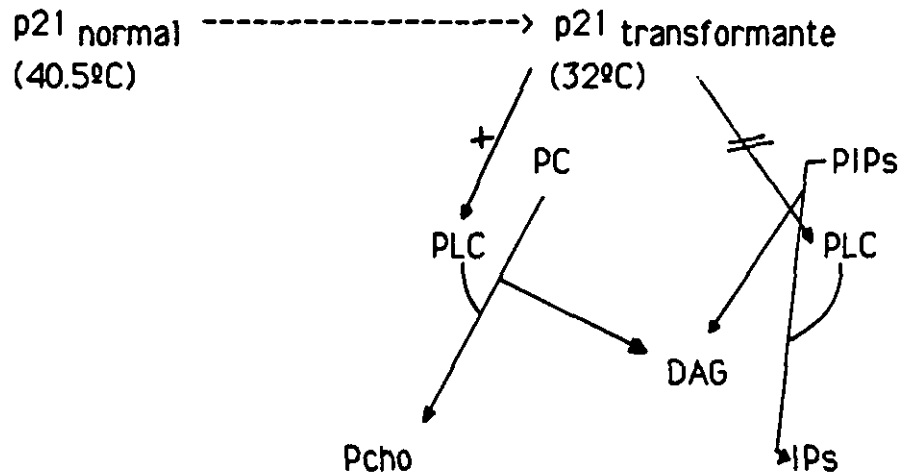
Teniendo en cuenta que en células crónicamente transformadas por este oncogén se presentan niveles incrementados de Pcho, concomitantes con los de DAG, y que estos metabolitos se liberan tras la hidrólisis fosfodiesterásica de PC (117), el siguiente ensayo se dirigió a determinar la variación de este segundo mensajero novel (Pcho) en ts-6-315.

En la figura 3 se puede observar que la Pcho se libera en este sistema, y lo hace según un patrón absolutamente compatible con el de producción de diacilgliceroles (figura 1).

Resultado este último que apunta hacia la posibilidad de que ambos metabolitos se produzcan como consecuencia de la acción catalítica de una PLC sobre PC. Ruta que según se ha demostrado está estimulada por varios agonistas (151, 153, 182 y 183).

Apoyando esta idea, hay que hacer notar la disminución rápida y transitoria de los niveles de PC que se observa en la figura 5, y que es concomitante con el incremento en Pcho (figura 3).

Los efectos que produce la acción de ras en ts-6-315, de acuerdo con los resultados comentados hasta el momento, pueden esquematizarse así:



Recientemente se ha sugerido que los niveles de Pcho incrementados en células crónicamente transformadas por el oncogén ras pueden ser la consecuencia de la activación de una colina quinasa que actúe sobre la colina basal, más que de una PLC que hidrolice PC (184).

Si este fuera el caso, debería haberse detectado un descenso en los niveles de colina, junto con el incremento de Pcho observado en ts-6-315 cuando se estimularon a 32°C.

Sin embargo, en la figura 4 puede constatar que los niveles de colina no disminuyen tras el cambio de temperatura, sino que aumentan significativamente. Lo cual indica que los cambios observados en la Pcho en ts-6-315 no se deben a la acción de una colina quinasa sobre Cho, sino a la hidrólisis de PC por PLC.

El hecho de que los niveles de Cho aumenten después de la elevación de los de Pcho en ts-6-315 estimuladas, podría significar que la colina derivase de la defosforilación de la Pcho liberada como consecuencia de la acción, mediada por ras, de PLC sobre PC. Aunque también podría deberse a la acción de una PLD específica para PC.

Si éste último fuera el caso, los niveles de PA se verían incrementados siguiendo un patrón similar al de la producción de Cho.

Los datos obtenidos, marcando las células con (U-¹⁴C) glicerol o con ³²P-ortofosfato, indican (figuras 6 y 7) que con ninguno de los dos protocolos de marcaje se detectan cambios significativos en el ácido fosfatídico.

Estos hechos pueden indicar que p21-ras no está activando una PLD, y que el incremento de Cho que se observa tras el cambio de temperatura (figura 4) puede deberse a una defosforilación de la PCho generada por hidrólisis de PC.

Pero otra posibilidad es que la activación de PLD, mediada por ras sea rápida e indetectable; y que esta actividad enzimática junto con una fosfatídico fosfatasa (PAP) dé cuenta de los niveles de DAG observados al estimular esta línea celular (figura 1).

Si los diglicéridos se hubieran producido de este modo, el tratamiento de las células con propanolol debería inhibir la producción de diacilgliceroles tras el cambio de temperatura y favorecer una acumulación de PA. Ya que el propanolol es un inhibidor establecido para la PAP (169).

En la tabla 1 puede observarse que no se producen cambios en los niveles de DAG ni de PA cuando las células, marcadas con (U-¹⁴C) glicerol, se tratan con propanolol y posteriormente se estimulan a 32°C. Los controles que aparecen en esta tabla, indican que la adición de PLD exógena a la línea ts-6-315 estimula la producción de PA tras un minuto de incubación con la enzima y la de DAG y PA cuando la incubación se realiza durante diez minutos. Si además de la adición de PLD exógena, las células se han tratado previamente con propanolol, la producción de PA no se ve alterada a tiempos cortos de incubación con PLD y sí lo hace sobre la producción de DAG a los diez minutos de incubación con la enzima. En este último caso los niveles de DAG no incrementan y se produce una acumulación de PA, debida a la inhibición que sobre la PAP produce el propanolol.

Todos estos resultados están en contra de la idea de que p21-ras estimule la degradación de PC a través de la activación de una PLD.

Sin embargo, se desarrollaron otra serie de experimentos con el objetivo de confirmar la hipótesis expuesta.

En el caso de que una PLD se encontrara activada en un sistema, la adición de etanol sobre él conduciría a la acumulación de PEt que es metabólicamente estable (170).

Aprovechando este hecho, se determinaron los niveles de PEt en células ts-6-315 marcadas con ³²P-ortofosfato, y estimuladas a 32°C. En la tabla 2 puede apreciarse que el PEt no varía en esta línea celular tras la estimulación y la adición del alcohol. Y la prueba de que el ensayo es válido en este sistema se tiene en los resultados obtenidos en los controles.

Como puede observarse, la adición de PLD exógena durante uno o diez minutos induce liberación de PA, y en caso de haber etanol en el medio los niveles del ácido decrecen en función del incremento de los del metabolito PEt.

Todos estos datos indican definitivamente que la hidrólisis de PC se encuentra asociada con la transformación inducida por ras; y que esta degradación se produce más que probablemente a través de la estimulación de una PLC.

Sin embargo, se desconoce todavía el mecanismo exacto por el que este oncogén activa esta cascada novel de degradación de PL descrita.

Existen evidencias de que la estimulación de PLC de PC, a través de un mecanismo dependiente de receptor, viene mediada por una proteína G (183,116). Y dado que p21 está relacionada con este grupo de proteínas (185), un posible modelo podría ser que p21-ras actuase como una proteína G asociada por ciertos ligandos a la PLC novel.

Sin embargo, otros estudios sugieren que la activación de PLC de PC por ras requiere la estimulación previa de PKC (186).

Por tanto, aún es necesario profundizar en el conocimiento del modo por el que ras activa el metabolismo de fosfatidilcolina.

Se sabe desde hace tiempo que p21-ras es un importante intermediario en las cascadas mitogénicas estimuladas por suero. De hecho, la microinyección de anti-ras neutralizante en fibroblastos inhibe la capacidad del mitógeno para inducir síntesis de DNA en este sistema (89). Por tanto, si la liberación de Pcho fuera un hecho importante en la señal mitogénica, el suero debería activar esta ruta. Y de hecho, se ha comprobado que el estímulo de ciertos factores de crecimiento produce pequeños incrementos en los niveles de Pcho (151).

Los resultados que se exponen en la figura 9 demuestran que hasta cuatro horas después de la estimulación de fibroblastos normales no se producen cambios en los niveles de Pcho. Y la liberación máxima de este metabolito se alcanza una vez que han transcurrido doce horas desde de la adición del estímulo.

Estos datos sugieren que la hidrólisis de Pcho es un acontecimiento tardío en la transducción de señales dirigida por suero.

Puesto que la estimulación que ras produce sobre la degradación fosofodiesterásica de PC se manifiesta rápidamente (figura 3), los resultados obtenidos en fibroblastos normales sugieren que ras puede actuar tarde en la cascada de señales mitogénicas que desencadena el agente mitogénico mencionado.

Con el fin de averiguar cómo afectan estos hechos a la capacidad de ras para inducir síntesis de DNA, se hicieron determinaciones de incorporación de ^3H -timidina al ácido desoxirribonucleico con respecto al tiempo en células Swiss 3T3 estimuladas con suero, y en células ts-6-315 estimuladas a 32°C .

Los datos obtenidos para los fibroblastos normales, que se muestran en la figura 10, indican que se requieren por lo menos diez horas para que se induzca la síntesis de DNA.

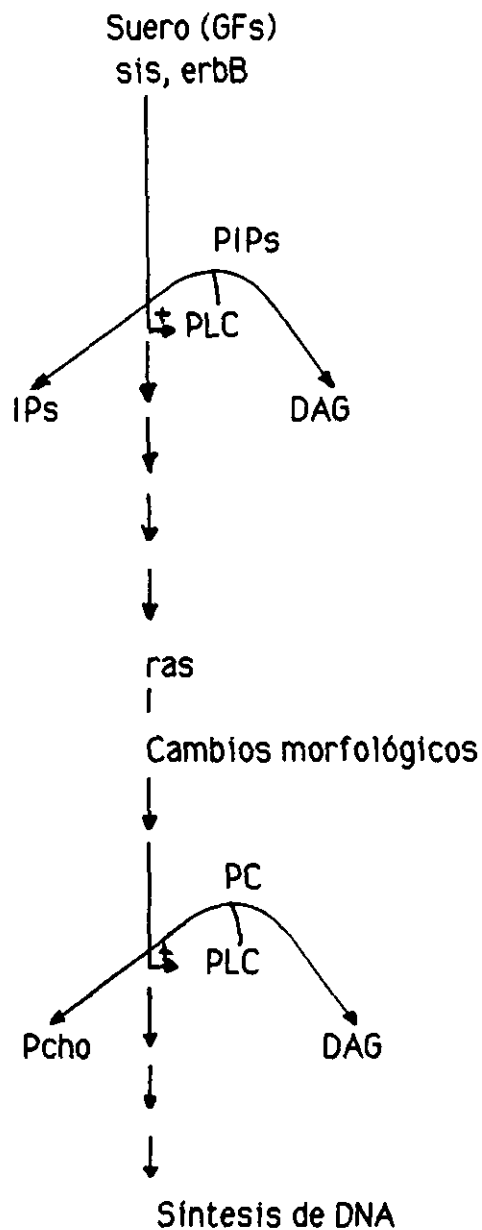
Si ras, tal y como sugieren los datos de Pcho, está actuando tarde en la ruta que estimula el suero, la síntesis de DNA que induzca p21-ras debe requerir mucho menos tiempo que la que se induce por el agente mitogénico.

Los resultados de la figura 8 indican que esto es justamente lo que ocurre en la incorporación de ^3H -timidina al DNA de las células ts-6-315 transformadas por ras. Efectivamente, tan sólo dos horas después de haberse producido el cambio de temperatura a 32°C que estimula a las ts-6-315, se detecta incorporación de ^3H -timidina; y ésta es máxima a las seis horas.

Este hecho es todavía más significativo si se tiene en cuenta que las células ts-6-315 a 32°C metabolizan más despacio que los fibroblastos a 37°C .

Tomando todos los datos comentados conjuntamente, se puede afirmar que p21-ras controla la respuesta mitogénica al suero en los últimos pasos de la cascada de transducción de señales, y que este papel parece desarrollarlo a través de la activación de una PLC de PC.

De un modo simple, la situación de ras en el metabolismo de PL activado por suero sería la siguiente:



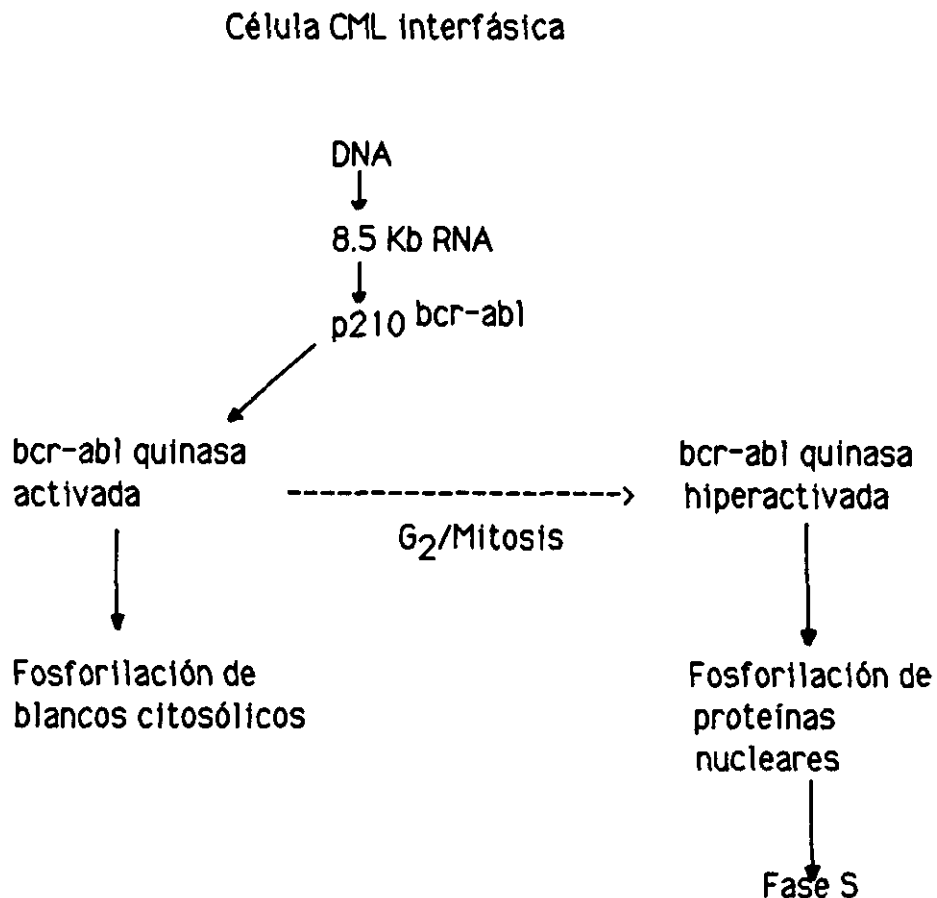
Hasta la fecha no se le había asignado a ras un lugar en las últimas etapas de la ruta que conduce a la síntesis de DNA. Pero el hecho de que las acciones tardías de este oncogén, si se comparan las figuras 1, 3 y 8, se produzcan antes de que se detecte síntesis de DNA, sugiere que ras puede actuar eliminando restricciones de entrada a la fase S del ciclo celular; y que esto lo haga a través de la activación de la hidrólisis de PC por PLC.

Sí se sabe que otros oncogenes como src, pueden estar también involucrados en señales tardías (187), así como en el punto de control del ciclo celular G₂/M, que es un acontecimiento no temprano en el proceso mitótico (188-190).

La actividad Ser/Thr quinasa de v-mos suele estimularse bien en las últimas etapas de la fase G₂, o bien en la mitosis del ciclo celular.

Por último, el oncogén abl se activa por translocación en CML, y forma la quimera bcr-abl, que como se ha indicado expresa la proteína p210 con actividad tyr-quinasa (18). Pues bien, las células de CML en estado mitótico presentan actividad bcr-abl quinasa incrementada, y en estas formas mitogénicas p210 fosforila sitios únicos de determinadas proteínas. Con la peculiaridad de que, a pesar de ser p210 una proteína citoplasmática y de que sus blancos suelen encontrarse en el citosol, al romperse la membrana nuclear, como resultado de la mitosis, p210 fosforila sustratos que normalmente son dianas nucleares. Entre ellos se incluyen proteínas capaces de unir DNA y otras asociadas a cromatina (191).

Puede establecerse el siguiente modelo para la acción de p210 en el ciclo celular:



De lo anterior se deduce que la actividad quinasa de p210 es importante en la activación del ciclo celular de CML.

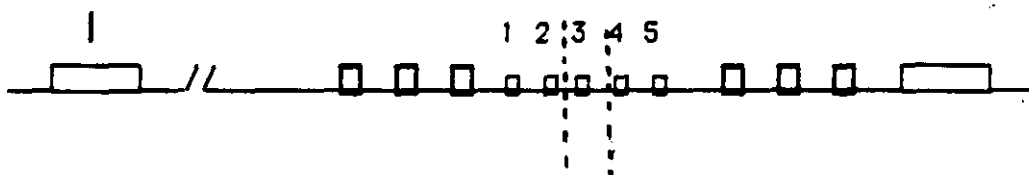
Y son concretamente los datos obtenidos en este trabajo a cerca de P210 los que se discuten a continuación.

Dado que p210 se encuentra presente en un 95% de las CML (192), los esfuerzos en biología molecular se dirigen hoy al desarrollo de una técnica que permita emplear esta proteína como marcador tumoral.

Haciendo uso de los seis anticuerpos frente a bcr y abl disponibles, y mediante el ensayo tipo "sandwich" descrito, se pudo constatar (figuras 17-25) que la mejor combinación para detectar p210 en lisados de K562 es la que resulta del empleo del anti-abl-1 como anticuerpo secundario y de anti-bcr-92 o anti-bcr-72 como primario. Siendo este último anti-bcr el que proporciona mejores resultados (figura 17).

No es extraño que anti-bcr-92 y anti-bcr-72 reconozcan bcr en p210, ya que ambos se han obtenido frente al primer exón de bcr. Y esta región génica se requiere para que bcr-abl sea transformante (193).

Los lugares de bcr que suelen romperse para que se produzca la inserción de abl se encuentran frecuentemente en posiciones centrales del gen. En concreto entre los pequeños exones 2 y 3 ó 3 y 4 (194).

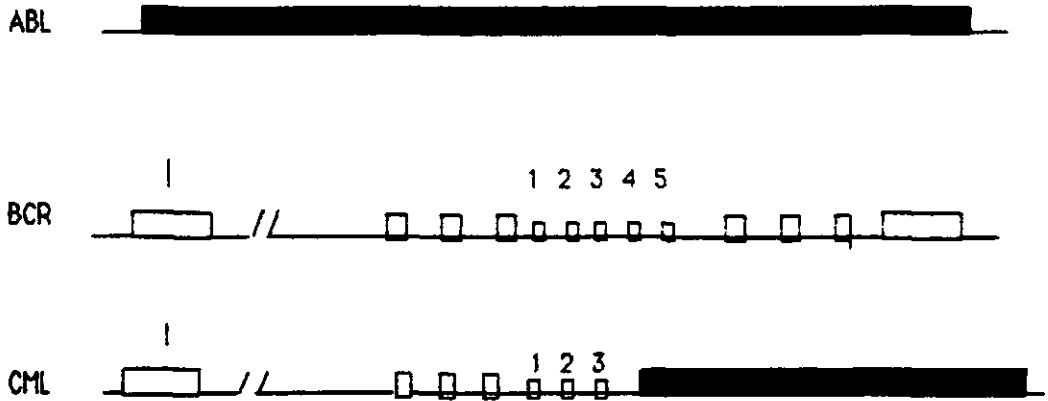


Por tanto el exón 1 siempre estará presente en la químera.

El hecho de que anti-bcr-56 reconozca a p210 en combinación con los tres anticuerpos frente a abl (figuras 19, 22 y 25) confirma datos previos según los cuales, en la línea celular K562 la inserción de abl en bcr se produce entre los exones 3 y 4 (195, 17).

Por tanto, se mantiene intacta la zona comprendida entre los exones 2 y 3 en p210 ya que es ésta justamente la región frente a la que se generó el anti-bcr-56.

A la vista de estos datos se puede postular el siguiente modo de inserción de abl en bcr en el sistema K562:



Por otra parte, se ha constatado la presencia de una asociación proteica: p53-p210^{bcr-abl} en K562 (196). Complejo, que según estos autores, se reconoce en geles no reductores de poliacrilamida con SDS por anti-bcr-56, anti-abl-1 y anti-abl-2.

Los resultados de las figuras 19, 22 y 25 confirman los datos de Li y col., pero en esta ocasión en ensayo tipo "sandwich", y añaden un nuevo anticuerpo para el reconocimiento de este complejo, concretamente el anti-abl-3 (figura 25).

Se desconocía hasta la fecha si p53 en la asociación p53-p210^{bcr-abl} es un sustrato de p210^{bcr-abl} o es por sí misma una quinasa. Existe la posibilidad de que al unirse p53 a p210^{bcr-abl} establezca y/o estimule la actividad quinasa asociada esta última proteína.

De cualquier modo, trabajos preliminares de Maxwell y col. (197) concluyen que la asociación p53-p210^{bcr-abl} es un fenómeno generalizado en CML.

En cuanto a la zona de p210 integrada por abl hay que destacar lo siguiente:

Los dominios SH3 y SH2 son reguladores de la actividad quinasa y son homólogos a los que posee el oncogén c-src (198-200). La quimera abl-bcr presenta la región SH3 intacta (201, 202) y a juzgar por los resultados obtenidos también posee la zona inmediatamente anterior a SH3. Y esta región es superficial y accesible al reconocimiento por el correspondiente anti-abl-1.

Análisis por ordenador de la proteína que codifica c-abl proveen como zonas con alta probabilidad de ser superficiales las que comprenden los aminoácidos 1-300 y 525-1000, y como zonas con baja probabilidad de ser superficiales las que comprenden los aminoácidos 300-525 y 100-1130 (203).

Dentro de la región 1-300 se incluye la 51-64 (reconocida por anti-abl-1). Por tanto, cuando el oncogén abl forma parte de la quimera bcr-abl también presenta esta zona expuesta.

De los datos que aparecen en las figuras 20-25 se deduce que los anticuerpos frente a abl 2 y 3 no reconocen claramente las zonas tyr-quinasa e inmediatamente posterior a tyr-quinasa en p210, ya que también existe señal de reconocimiento en HL-60 que no posee la proteína quimérica. Como se comentará posteriormente, anti-abl-2 y anti-abl-3 pueden estar reconociendo regiones de p53 cuando esté formando complejo con p210, pero no de esta última proteína. Esto indica que ninguna de las regiones de abl mencionadas (tyr-quinasa y posterior a esta actividad enzimática) son superficiales en p210.

De hecho, anti-abl-2 reconoce los residuos 389-403 y anti-abl-3 los aminoácidos 501-512, ambas zonas incluidas en la región de abl que va del residuo 300 al 525 y que según el análisis de ordenador es una zona interna.

De todo lo anterior se puede deducir que en la p210 la región que corresponde al oncogén abl mantiene en gran medida sus características estructurales, presentándose el dominio catalítico de este oncogén en una situación interna y poco accesible a anticuerpos, y sus zonas reguladoras en la superficie, y consecuentemente accesibles a anticuerpos.

Por tanto, el incremento de actividad quinasa que se produce en abl cuando éste forma parte de p210 no parece deberse a alteraciones estructurales de la proteína.

Células negativas para el cromosoma de Filadelfia presentan productos de la expresión de bcr, y estos productos varían de una línea celular a otra. Concretamente en las células HL-60 se encuentran al menos siete proteínas expresadas por este gen y algunas de ellas están formando complejos con p53 (204).

Ciertos estudios han apuntado hacia la posibilidad de que productos de la expresión de bcr presenten actividad quinasa (205), concretamente Ser/Thr quinasa (206).

Y efectivamente, se ha identificado en bcr la presencia de un lugar de unión de ATP que responde a la composición de aminoácidos establecida para este tipo de regiones (207, 208).

Las regiones adyacentes a este dominio, revelan una zona fosfotransferasa con secuencia muy similar a la esperada para un dominio de estas características.

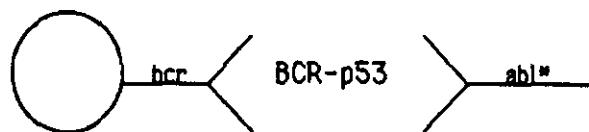
Sin embargo, y tras minuciosos estudios, no se ha encontrado homología entre la secuencia de bcr y la de proteínas quinasas, que como se sabe es una familia muy conservada (201, 209).

Por tanto, si bcr codifica una quinasa, o bien no sigue la ruta evolutiva de estas proteínas, o bien la proteína p53 que forma complejo con bcr es la que realiza las fosforilaciones.

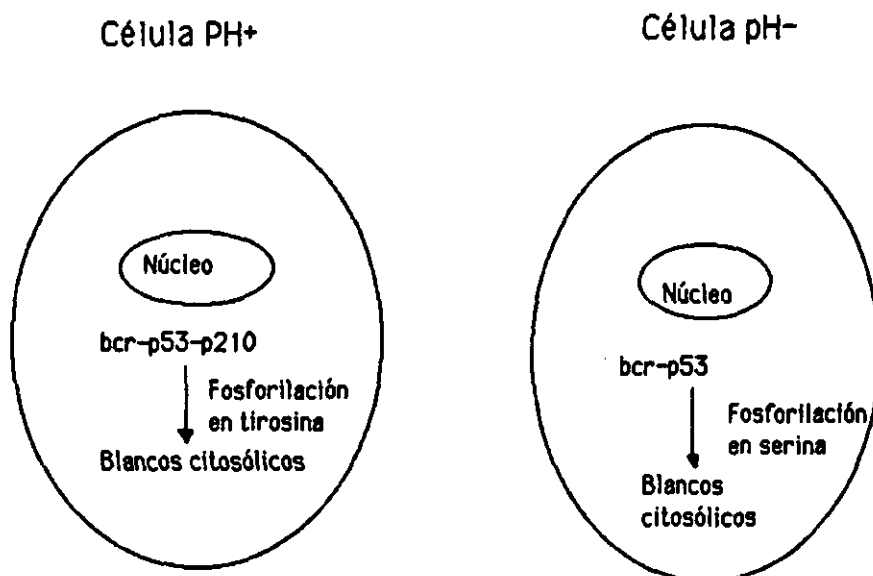
Así, la combinación de anticuerpos frente a bcr y abl que reconocen p53 en p53-p210^{bcr-abl} (196) también produce señal de reconocimiento en células negativas para el cromosoma de Filadelfia (fundamentalmente en HL-60), tal y como se muestra en las figuras 20-25.

Como ya se ha mencionado, estas células presentan productos de bcr asociados con p53. El hecho de que en las células NB4 el reconocimiento sea menor indica que en esta línea se expresan diferentes productos de bcr que en HL-60.

Por tanto, parece lógico pensar que si anti-abl-2 y 3 reconocen el complejo bcr-p53 (figuras 20-25), y son anticuerpos frente a tyr-quinasa, la actividad quinasa esté presente en esta asociación proteica. Y más aún, si bcr no presenta una secuencia genómica característica de quinasa, muy probablemente será p53 quien esté siendo reconocida por los anticuerpos secundarios. De modo que la reacción tipo "sandwich" en estos casos sería, expresada de modo general, así:



De todo lo expuesto anteriormente, cabe plantear un modo de acción de bcr-abl en CML:



Según este modelo, p210 podría insertarse como una proteína tyr-quinasa activada, en complejos bcr-p53 que poseen actividad Ser/Thr quinasa normal.

Como ya se ha indicado anteriormente, la mejor combinación para reconocer p210 en K562 es la que producen los anticuerpos frente al exón I de bcr (anti-bcr-92 y 72) y el anticuerpo frente a la zona inmediatamente anterior a SH3 de abl (anti-abl-1) (figuras 18 y 19).

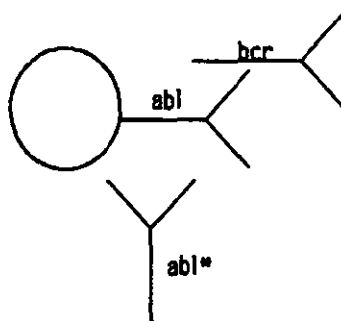
Las curvas dosis-respuesta de este reconocimiento (figuras 26 y 27) muestran, sorprendentemente, que según disminuye la concentración del lisado de K562, incrementa el reconocimiento por parte de anti-abl-1. Obteniéndose resultados similares con cualquiera de los dos anti-bcr que se empleen.

Lo que parece indicar que anti-abl-1 no sólo puede interaccionar con p210, sino también con los anticuerpos frente a bcr.

Con el fin de bloquear esta última reacción de reconocimiento, se produjo una modificación en el ensayo tipo "sandwich". Se adsorbió sobre el soporte de poliestireno anti-abl-1 frío, que posteriormente se incubó con el anti-bcr correspondiente. De este modo se bloquearon los sitios de bcr reconocidos por abl, y se procedió a determinar la señal de reconocimiento de p210 siguiendo el protocolo establecido.

Las figuras 28 y 29 muestran que con esta modificación del ensayo se sigue identificando p210. Pero cuando la quimera no está presente, anti-abl-1* continúa produciendo señal de reconocimiento.

Estos resultados condujeron a pensar que anti-abl-1 no sólo reconoce a anti-bcr, sino a la estructura de IgG; ya que al estar bloqueados los posibles sitios de interacción de abl con bcr, la señal sólo puede deberse a reacciones entre anti-abl-1 frío y marcado.



Esta hipótesis se confirmó con los datos que aparecen en la figura 30. En la gráfica se observa que anti-abl-1 reacciona con IgG humana o de conejo en extensión similar a como lo hace con anti-bcr, o con el propio anti-abl. Con lo cual queda demostrado que anti-abl-1 tiene la capacidad de reconocer IgG, probablemente en la zona C2 de este tipo de moléculas que presenta cierta homología con el péptido frente al que se obtuvo el anticuerpo.

Este hecho puede ser una de las razones que justifique la depresión inmunológica humoral que se presenta en los pacientes de CML. Depresión que se produciría como consecuencia de interacciones entre p210 e inmunoglobulinas que hagan decrecer la actividad de estas últimas.

Resumiendo toda la información que aportan los datos bibliográficos, y los obtenidos en este trabajo, se puede concluir que:

En leucemias mieloblásticas agudas, así como en otras neoplasias, ras se encuentra activado, y junto con otro oncogén, que en ciertos casos puede ser abl, induce una proliferación anormal celular.

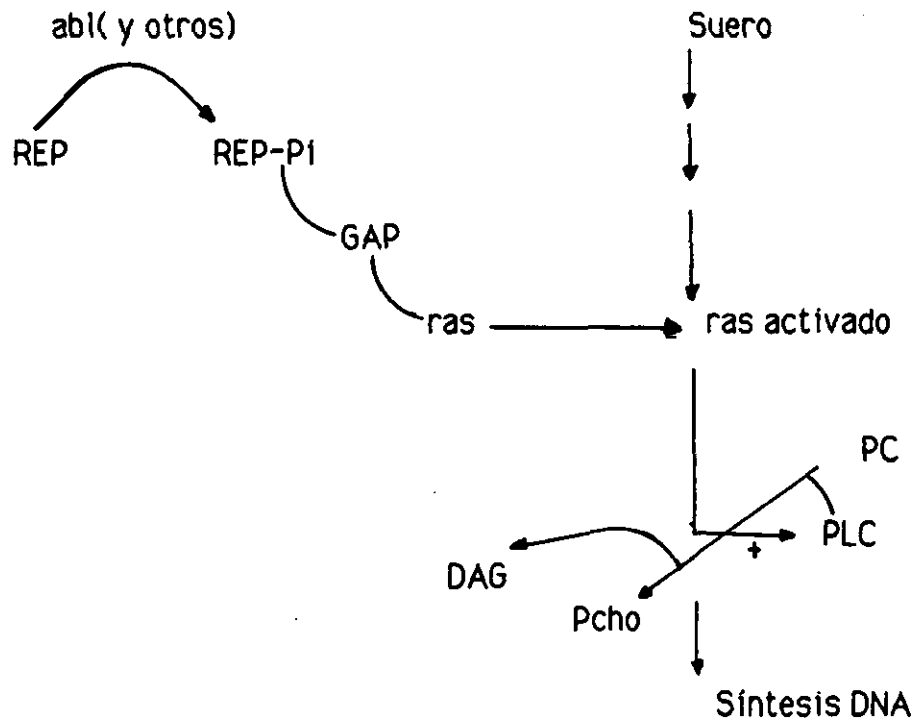
De hecho, tanto abl, como otros oncogenes con actividad tyr-quinasa no ligada a receptor, fosforilan entre otros sustratos a la proteína REP que está implicada en la activación de ras.

Ras activado actúa en las últimas etapas de la señal mitogénica que desencadena el suero, y lo hace a través de una PLC específica de PC, aumentando los niveles basales de Pcho y DAG, lo que en último término conduce a un incremento en la síntesis de DNA.

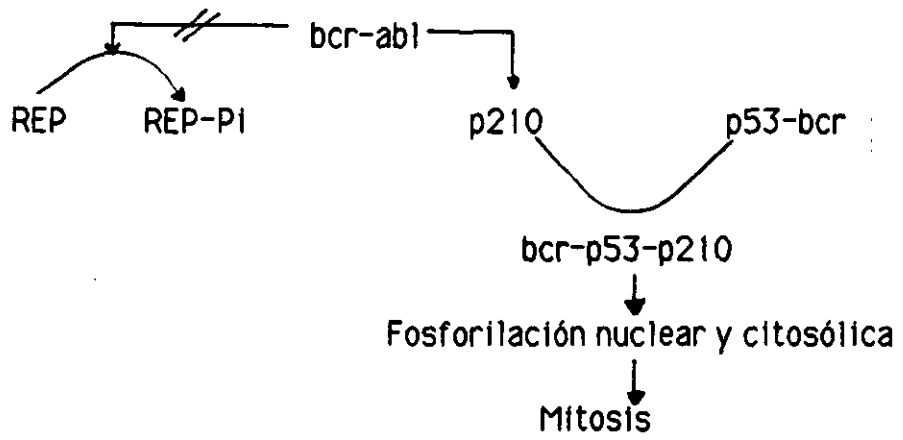
Ahora bien, si abl se ha activado por translocación, generando la quimera bcr-abl, la proteína p210 ya no fosforila REP; y de hecho ras no está activado en CML. Sino que esta quimera, asociada probablemente a p53-bcr (consiguiendo así incrementar su actividad quinasa), fosforilará sustratos citosólicos y nucleares que conducirán en último término a acelerar la mitosis celular.

Estos modos de acción propuestos para abl y ras se esquematizan en las dos últimas figuras que se muestran a continuación.

AML y otras neoplasias



CML



CONCLUSIONES

- La acción del oncogén ras y la estimulación de una fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina son acontecimientos cercanos en la transducción de señales de ts-6-315.

- La ruta metabólica novel activada por el oncogén ras en ts-6-315 no incluye la degradación de polifosfoinosítidos.

- En la hidrólisis de fosfatidilcolina, inducida por el oncogén ras en ts-6-315, no intervienen las actividades enzimáticas colina quinasa ni fosfolipasa D.

- El oncogén ras actúa en etapas tardías de la cascada de señales mitogénicas que desencadena el suero, eliminando restricciones de entrada a la fase S del ciclo celular.

- La proteína quimérica p210^{bcr-abl} en las células K562 mantiene los exones 1, 2 y 3 de bcr, así como la región anterior a SH3 de abl.

- La mejor identificación de p210^{bcr-abl} en lisado citosólico de K562, mediante ensayo tipo "sandwich", se obtiene empleando un anticuerpo frente al exón 1 de bcr y otro frente a la zona anterior a SH3 de abl.

- La proteína que codifica abl no manifiesta cambios importante en su estructura cuando forma parte de p210^{bcr-abl} de K562, por tanto las alteraciones de su actividad quinasa que se manifiestan en la quimera no se deben a modificaciones estructurales.

- En la asociación proteica bcr-p53 se reconoce, en ensayo tipo "sandwich", un dominio quinasa con anticuerpos frente a esta actividad, dominio que muy probablemente pertenece a p53.

- Las alteraciones en respuesta inmunológica humoral en pacientes de leucemia mieloblástica crónica, pueden deberse a la interacción de p210^{bcr-abl} con IgGs.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Heldin, C.H. y Westermark, B. (1984) *Cell* **37**, 9-14
- 2.- Deuel, T.F. y Huang, J.S. (1984) *Blood* **64**, 951-957
- 3.- Pimentel, E. (1986) *Oncogenes*, CRC Press, Boca Ratón, Fla.
- 4.- Todaro, G.J. y Huebner, R.J. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 1009-1015
- 5.- Prakash, K. y Selligy, V.L. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**, 293-297
- 6.- Perbal, B. y Kohiyama, M. (1985) *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **300**, 177-182
- 7.- Varmus, H. E. (1984) *Annu. Rev. Genet.* **18**, 553-612
- 8.- Nowell, P.C. y col. (1984) *Cancer Surveys* **3**, 531-542
- 9.- Leder, P. y col. (1984) *Science* **22**, 765-771
- 10.- Nowell, P. C. y Hungerford, O. A. (1960) *Science* **132**, 1497-1502
- 11.- Fialkow, P. y col. (1977) *Am. J. Med.* **63**, 125-131
- 12.- Dube, I.D. y col. (1984) *Br. J. Haematol.* **56**, 633-638
- 13.- Dube, I. D. y col. (1984) *Blood* **63**, 1172-1177
- 14.- Frassonl, F. y col. (1986) *Br. J. Haematol.* **63**, 135-140
- 15.- de Klein, A. y col. (1982) *Nature (London)* **300**, 765-767
- 16.- Groffen, J. y col. (1984) *Cell* **36**, 93-99
- 17.- Heisterkamp, N. y col. (1985) *Nature (London)* **315**, 758-761
- 18.- Konopka, J. y col. (1984) *Cell* **37**, 1035-1042
- 19.- Brodeur, G.M. y col. (1984) *Science* **224**, 1121-1124
- 20.- Nau, M.M. y col. (1984) *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 113, pp172-177, Springer-Verlag
- 21.- Lee, W.H. y col (1984) *Nature (London)* **309**, 458-460
- 22.- Akiyama, T. y col. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **123**, 797-801
- 23.- Friend, S.H. y col. (1986) *Nature (London)* **323**, 643-646
- 24.- Levi-Montalcini, R. y Angeletti, P.U. (1968) *Physiol. Rev.* **48**, 534-569
- 25.- Cohen, S. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 1555-1562
- 26.- Tushinsky, R.J. y col (1982) *Cell* **28**, 71-81
- 27.- Burgess, A.W. y Metcalf, D. (1977) *J. Cell. Physiol.* **90**, 471-484
- 28.- Paradee, A.B. y col. (1978) *Ann. Rev. Biochem.* **45**, 715-725
- 29.- Paradee, A.B. y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 1286-1289
- 30.- Rossowet y col. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4446-4450
- 31.- Doolittle, R.F. y col. (1983) *Science* **221**, 275-277

- 32.- Waterfield, M.D. y col (1983) *Nature (London)* **304**, 35-39
- 33.- Saule, S. y col. (1981) *J. Virol.* **38**, 409-412
- 34.- Donward, J. y col. (1984) *Nature (London)* **307**,
521-525
- 35.- Lax, I. y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. U.S.A.* **81**,
5911-5915
- 36.- Privalsky, M.L. y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. U.S.A.*
81, 704-708
- 37.- Maki, T. y col. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**,
2848-2852
- 38.- Vogt, P.K. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 3316-3319
- 39.- Struhl, K. (1987) *Cell* **50**, 841-846
- 40.- Bohmann, D. y col. (1987) *Science* **238**, 1386-1392
- 41.- Rausher, F.J. y col. (1988) *Science* **240**, 1010-1016
- 42.- Lillie, J.W. y col. (1986) *Cell* **46**, 1043-1051
- 43.- Landschluz, W.H. y col. (1988) *Genes. Dev.* **2**, 786-800
- 44.- Evans, R.M. (1988) *Science* **240**, 889-895
- 45.- Sap, J.A. y col. (1986) *Nature (London)* **324**, 635-640
- 46.- Sefton, B.M. y Hunter, T. (1984) *Nucleotide and Protein
Phosphorylation Res.* **18**, 195-226
- 47.- Hunter, T. y Cooper, J.A. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* **54**,
897-930
- 48.- Hanks, S.K. Y col. (1988) *Science* **241**, 42-52
- 49.- Scherr, C.J. y col. (1985) *Cell* **41**, 665-676
- 50.- Courtneidge, S.A. y col. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**,
3783-3787
- 51.- Collett, M.S. y Erikson, R.L. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
75, 2021-2024
- 52.- Levinson, A.D. y col. (1978) *Cell* **15**, 561-572
- 53.- Hunter, T. y Sefton, M.B. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**,
1311-1315
- 54.- Hunter, T. y Cooper, J.A. (1987) *Cell* **50**, 823-829
- 55.- Rosenberg, N. y Witte, O.N. (1988) *Adv. Virus Res.* **35**, 39-81
- 56.- Harvey, J.J. (1964) *Nature (London)* **204**, 1104-1105
- 57.- Kirsten, W.H. y Mayer, L.A. (1967) *J. Natl. Cancer Inst.* **39**,
311-335
- 58.- DeFeo, D. y col. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**,
3328-3332
- 59.- Langbeheim, H. y Col. (1980) *Virology* **106**, 292-300
- 60.- Scolnick, E.M. Y col. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**,
5355-5359
- 61.- Willingham, M.C. y col. (1980) *Cell* **19**, 1005-1014
- 62.- de Vos, A.M. y col. (1988) *Science* **239**, 888-893
- 63.- Willumsen, b.M. y col. (1984) *Nature (London)* **310**, 583-586

- 64.- Gallwitz, D. y col. (1983) Nature (London) **306**, 704-707
- 65.- Madaule, P. y Axel, R. (1985) Cell **41**,31-40
- 66.- Chardin, P. y Tavitian, A. (1986) EMBO J. **5**, 2203-2209
- 67.- Lowe, D.G. y col. (1987) Cell **48**, 137-146
- 68.- Touchot, N. y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**,8210-82414
- 69.- Pizón, V. y col. (1988) Oncogene **3**, 201-204
- 70.- Perucho, M. (1981) Cell **27**, 467-476
- 71.- Krontriss, T.G. y Cooper, M.G. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **78**, 1181-1184
- 72.- Parada,L.F. y col. (1982) Nature (London) **297**,474-478
- 73.- Santos, E. y col. (1982) Nature (London) **298**, 343-347
- 74.- Tabin, C.J. y col. (1982) Nature (London) **300**, 143-149
- 75.- Reddy, E.P. y col. (1982) Nature (London) **300**, 149-152
- 76.- Manne, V. y Kung, H. (1985) Biochem. Biophys. Res. Comm. **128**,1440-1445
- 77.- Gibbs, J.B. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **81** 5704-5708
- 78.- Clanton, D.J. (1987) Mol. Cell. Biol. **7**, 3092-3097
- 79.- Trahey, M. (1987) Mol. Cell. Biol. **7**,541-544
- 80.- Trahey, M. (1988) Science **242**, 1697-1700
- 81.- Stacey, D.W. y Kung, H. (1984) Nature (London) **310**,508-511
- 82.- Fleishman, L.F. y col. (1986) Science **231**, 407-410
- 83.- Lacal, J.C. y col. (1987) Science **238**, 533-536
- 84.- Bar-Sagl, D. y Feramisco, J.R. (1986) Science **233**, 1061-1068
- 85.- Bar-Sagl, D. y Feramisco, J.R. (1985) Cell **42**, 841-844
- 86.- Colletta, G. y col. (1983) Mol. Cell. Biol. **3**,2099-2101
- 87.- Weissman, B.E. y Aaronson, S.A. (1983) Cell **32**, 599-606
- 88.- Scheinberg, D.A. y Strand, M. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **78**, 55-60
- 89.- Mulcahy, L.S. y col. (1985) Nature (London) **313**, 241-243
- 90.- Smith, M.R. y col. (1986) Nature (London) **320**, 540-543
- 91.- Korn, L.J. y col. (1987) Science **236**, 840-843
- 92.- Clark,L. y co. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**, 5280-5284
- 93.- Feramisco, J.R. y col. (1985) Nature (London) **314**, 639-645
- 94.- Yuspa, S.H. y col. (1985) Nature (London) **314**, 459-464
- 95.- Vogel, U. y col. (1986) Nature (London) **335**,90-93
- 96.- Tatchell, K. y col. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**, 3785-3789
- 97.- Tida, T.I. y col. (1985) Cell **40**, 27-36
- 98.- Matsumota, K.I. y col (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**, 2555-2559
- 99.- Farr, C.J. y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **85**, 1629-1633

- 100.- Neri, A. y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **85**, 9268-9272
- 101.- Bos J. y col. (1985) Nature (London) **315**, 726-730
- 102.- Gambke, C. y col. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**, 879-883
- 103.- Bos, J. y col. (1987) Blood **69**, 1237-1242
- 104.- Needleman, S. y col. (1986) Blood **67**, 735-758
- 105.- Downward, J. y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**, 5998-6002
- 106.- Gibbs, J.B. y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **85**, 5026-5030
- 107.- Schramn, M. y Selinger, Z. (1984) Science **225**, 1350-1356
- 108.- Broek, D. y col. (1987) Cell **48**, 789-799
- 109.- Robison, L.C. y col. (1987) Science **235**, 1218-1221
- 110.- Gilman, A.G. (1987) Ann. Rev. Biochem. **56**, 615-649
- 111.- Ellis, C. y col. (1990) Nature (London) **343**, 377-381
- 112.- Lugo, T.J. y col. (1990) Science **247**, 1079-1082
- 113.- Dohlman, H.G. y col. (1987) Biochemistry **26**, 2657-2664
- 114.- Stryer, L. y Bourne, H.R. (1986) Ann. Rev. Cell Biol. **2**, 391-419
- 115.- Murayama, T. y Ui, M. (1985) J. Biol. Chem. **260**, 7226-7233
- 116.- Irving, H.R. y Exton, J.H. (1987) J. Biol. Chem. **262**, 3440-3443
- 117.- Lacal, J.C. y col. (1987) Nature (London) **330**, 269-272
- 118.- Berridge, M.J. (1987) Ann. Rev. Biochem. **56**, 159-193
- 119.- Berridge, M.J. e Irving, H.R. (1984) Nature (London) **312**, 315-321
- 120.- Imai, A. y Gershegorn, M.C. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **83**, 8540-8544
- 121.- Berridge, M.J. (1983) Biochem. J. **212**, 849-858
- 122.- Streb, H. y col. (1983) Nature (London) **306**, 67-69
- 123.- Burgess, G.M. y col. (1984) Nature (London) **309**, 63-66
- 124.- Berridge, M.J. y col. (1984) Biochem. J. **222**, 195-201
- 125.- Burgess, G.M. y col. (1985) Biochem. J. **232**, 237-243
- 126.- Batty, I.R. y col. (1985) Biochem. J. **232**, 211-215
- 127.- Connolly, T.M. y col. (1985) J. Biol. Chem. **260**, 7868-7874
- 128.- Nishizuka, Y. (1984) Science **225**, 1365-1370
- 129.- Garrison, J.C. y col. (1984) J. Biol. Chem. **259**, 3283-3292
- 130.- Gschwendt, M. y col. (1984) Biochem. Biophys. Res. Comm. **124**, 63-67
- 131.- Wolf, M. y col. (1985) Nature (London) **317**, 546-548

- 132.- May, W.S. y col. (1985) *Nature (London)* **317**, 549-552
- 133.- Kuret, J. y Schulman, H. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 6427-6430
- 134.- Takai, Y. y col. (1985) *J. Cell. Biochem.* **29**, 156-159
- 135.- Rozengurt, E. y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 5748-5151
- 136.- Edelman, A.M. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 567-613
- 137.- Ono, Y. y Kikkawa, U. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **12**, 421-423
- 138.- Parker, P.J. y col. (1985) *Eur. J. Biochem.* **148**, 579-581
- 139.- Werth, D.K. y col. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 11423-11426
- 140.- Werth, D.K. y Pastan, I. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 5264-5267
- 141.- Kimura, K. y col. (1985) *Biochem.* **227**, 271-274
- 142.- Cochet, C. y col. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 2553-2557
- 143.- Witters, L.A. y col. (1985) *Nature (London)* **315**, 777-780
- 144.- Labarca, R. y col. (1984) *Biochem. Biophys. Commun.* **123**, 703-709
- 145.- Orellana, S.A. y col. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 5236-5239
- 146.- Rittenhouse-Simmons y Deykin, D. (1981) *Platelets in Biology and Pathology II*, pp349-372, Gordon, J.L. ed.
- 147.- Escobedo, J.A. y Williams, L.T. (1988) *Nature (London)* **335**, 85-87
- 148.- Auger, K.R. y col. (1989) *Cell* **57**, 167-175
- 149.- Williams, L.T. (1989) *Science* **243**, 1564-1570
- 150.- Wright, T. M. y col. (1988) *J. Biol. Chem.* **262**, 9374-9380
- 151.- Besterman, J. y col. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 6785-6789
- 152.- Muir, J.G. y Murray, A.W. (1987) *J. Cell. Physiol.* **130**, 382-391
- 153.- Rossoff, P.M. y col. (1988) *Cell* **54**, 73-81
- 154.- Whetton, A.D. y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 3284-3288
- 155.- Ho, A.K. y Klein, D.C. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 11764-11770
- 156.- Cabot, M.C. y col. (1988) *FEBS Lett.* **233**, 153-157
- 157.- Bocckino, S.B. y col. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 15309-15315
- 158.- Stein, R.B. y col. (1986) *J. Virol.* **60**, 782-786
- 159.- Kaplan, P.L. y col. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 465-489
- 160.- Lozzio, C. y Lozzio, B. (1975) *Blood* **45**, 321-33
- 161.- Collins, S.J. y col. (1977) *Nature (London)* **270**, 347-349
- 162.- Leal, F. y col. (1985) *Science* **230**, 327-330

- 163.- Bligh, E. Dyer, W. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917
- 164.- Yavin, E. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 1392-1397
- 165.- Heslop, J.P. y col. (1986) *Cell* **47**, 703-709
- 166.- Berridge, M.J. y col. (1983) *Biochem. J.* **212**, 473-482
- 167.- Mc. Kinney, M.M. y col. (1987) *J. Immunol. Meth.* (1987) **96**, 271-278
- 168.- Smith, P.K. y col. (1985) *Anal. Biochem.* (1985) *Anal. Biochem.* **150**, 76-85
- 169.- Billah, M.M. y col. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17069-17077
- 170.- Billah, M.M. y col. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9069-9076
- 171.- Sokal, J.E. (1976) *J. Hematol.* **1**, 493-500
- 172.- Galton, D. (1969) *Sem. Hematol.* **6**, 323-327
- 173.- Coney, K. y col. (1978) *Exp. Hematol.* **6**, 738-747
- 174.- Ozanne, B. y col. (1980) *J. Cell Physiol.* **105**, 163-180
- 175.- Preiss, J. y col. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 8597-8600
- 176.- Fleischman, L. y col. (1986) *Science* **231**, 407-410
- 177.- Wolfman, A. y Macara, I.G. (1987) *Nature (London)* **325**, 359-361
- 178.- Housey, G.M. y col. (1988) *Cell* **52**, 434-354
- 179.- Persons, D.A. y col. (1988) *Cell* **52**, 447-458
- 180.- Matuoka, K. y col. (1989) *Science* **239**, 640-643
- 181.- Williams, L.T. (1989) *Science* **243**, 1564-1570
- 182.- Slivka, S.R. y col. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 12242-12246
- 183.- Díaz-Meco, M.T. y col. (1989) *Biochem. J.* **263**, 115-120
- 184.- Macara, I.G. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 325-328
- 185.- Barbacid, M. (1986) *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 779-827
- 186.- Price, B.D. y col. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 16638-16643
- 187.- Ralston, R. y Bishop, J.M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **264**, 7845-7849
- 188.- Chackalaparampil, I. y Shalloway, D. (1988) *Cell* **52**, 801-810
- 189.- Shenoy, S. y col. (1989) *Cell* **57**, 763-774
- 190.- Morgan, D.O. y col. (1989) *Cell* **57**, 775-786
- 191.- Arlinghaus, R.B. y Li, W. (1988) *The Cancer Bull.* **40**, 292-296
- 192.- Rowley, J. (1982) *Science* **216**, 749-751
- 193.- Emini, E.A. y col. (1985) *J. Virol.* **55**, 836-839
- 194.- Gale, R.P. Bailliers. (1987) *Clin. Haematol.* **1**, 1-17
- 195.- Van Derderen, J. y col. (1989) **169**, 87-98
- 196.- Li, W.J. y col. (1988) *Oncogene* **2**, 559-563
- 197.- Maxwell, S.A. y col. (1987) *Cancer Res.* **47**, 1731-1735
- 198.- Mayer, B.J. y col. (1988) *Nature (London)* **332**, 272-275
- 199.- Sadowski, I. y col. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 4396-4408

- 200.- Stahl, M.L. y col. (1988) Nature (London) **332**, 269-272
- 201.- Mes-Masson, A.M. Y col. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **83**, 9768-9772
- 202.- Shtivelman, E. y col. (1986) Cell **47**, 277-284
- 203.- Fainstein, E. y col. (1989) Oncogene **4**, 1477-1481
- 204.- Li, W. J. y col. (1989) Oncogene **4**, 127-131
- 205.- Timmons, M.S. y Witte, O.N. (1989) Oncogene **4**, 559-567
- 206.- Stam, K. y col. (1987) Mol. Cel. Biol. **7**, 1955-1960
- 207.- Kamps, M.P. y col. (1984) Nature (London) **310**, 589-592
- 208.- Wierenga, R.K. y Hol, W.G.J. (1983) Nature (London) **302**, 842-844
- 209.- Hariharan, I.K. y Adams, J.M. (1987) EMBO J. **6**, 115-119