

Tesis de Posgrado

Vías de señalización en la respuesta mitogénica a PGF 2 alfa, lif y citoquinas relacionadas, en células Swiss 3T3 que involucran la expresión de ciclinas D y CDKs

Sauane, Moira

2000

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sauane, Moira. (2000). Vías de señalización en la respuesta mitogénica a PGF 2 alfa, lif y citoquinas relacionadas, en células Swiss 3T3 que involucran la expresión de ciclinas D y CDKs. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3289_Sauane.pdf

Cita tipo Chicago:

Sauane, Moira. "Vías de señalización en la respuesta mitogénica a PGF 2 alfa, lif y citoquinas relacionadas, en células Swiss 3T3 que involucran la expresión de ciclinas D y CDKs". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3289_Sauane.pdf

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

TITULO

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA RESPUESTA MITOGÉNICA A $PGF_{2\alpha}$,
LIF Y CITOQUINAS RELACIONADAS, EN CÉLULAS SWISS 3T3 QUE
INVOLUCRAN LA EXPRESIÓN DE CICLINAS D Y CDKs.

Moira Sauane

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires

Director: Dr. Luis Jiménez de Asúa

Consejero de estudios: Dr. Ricardo Wolosiuk

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar.

2000

Nº 3289

University of Buenos Aires
School of Natural and exact Sciences

Title

Signal transduction pathways in the mitogenic response to $\text{PGF}_{2\alpha}$, LIF and related cytokines in Swiss 3T3 cells, including cyclins Ds and CDKs expression by diverse signalling pathways.

Maira Sauane
Director: Dr. Luis Jimenez de Asua

Thesis presented to opt for the Doctor's degree issued by the University of Buenos Aires

Institute of Investigation Bioquímica, Campomar Foundation

2000.

a Miguel
a Marta, Nadia y Juan.

Agradecimientos:

Indice:

	página
1- Introducción:	16-
Proliferación celular, conceptos generales	
Mediadores intercelulares:	18-
Citoquinas	19
Factor inhibitorio de Leucemia (LIF)	22
Prostaglandina F _{2α} (PGF _{2α})	23
Factor de Transformación y crecimiento beta 1 (TGFβ1)	24
Introducción a receptores y mecanismos de señalización:	25-
Tipo de Receptores	26
Señalización mediada por receptores en la superficie celular asociados a proteína G	26
Señalización mediada por receptores con actividad tirosina quinasa	29
Señalización mediada por receptores no asociados a proteínas quinasas de tirosinas	31
Señalización mediada por receptores unidos a otras actividades enzimática.	32
Segundos mensajeros intracelulares:	33-
AMP cíclico	33
Fosfolípidos y calcio	34
Proteínas quinasas dependientes de calcio y fosfolípidos (PKC)	35
MAPK	38
Ras	40
JAK/STAT	41
Resumen de los mecanismos de señalización y la regulación de la fase G₁ en células de ratón Swiss 3T3	43-
Regulación del ciclo celular	47
Fase G ₀ /G ₁ del ciclo celular en células Swiss 3T3	50
Cáncer y ciclo celular	53
2- Objetivos	56-
3- Resultados:	57-
Primera parte	57-
Expresión de la ciclina D1 inducida por la PGF _{2α}	57

Expresión de la proteína de ciclina D1 inducida por mecanismos dependientes de PKC	59
El TGFβ1 potencia la síntesis de ADN estimulada por PGF _{2α} .	61
Efecto de la PGF _{2α} y el TGFβ ₁ sobre el compromiso celular	62
Efecto del TGFβ ₁ sobre la estabilización del ARNm de ciclina D1	64
Secuencias estabilizantes en el ARNm de ciclina D1	65
Efecto de la retro modulación de la PKC en la expresión de ciclina D1	67
Efecto del GF en la expresión de la ciclina D1	68
Expresión de la proteína ciclina D1 inducida por mecanismos dependientes de PTK	69
Segunda parte:	69-
La acción mitogénica del LIF, es independiente de la activación de la PKC	69
El LIF estimula la síntesis de ADN a través de un mecanismo independiente de la farnesilación de proteínas	71
El LIF estimula la síntesis de ADN a través de un mecanismo independiente de MAPKK y p38 ^{MAPK}	73
El LIF estimula la síntesis de ADN a través un mecanismo independiente de la activación de PKA	75
El aumento de la concentración intracelular de AMPc potencia la síntesis de ADN inducida por LIF	76
La iniciación del ciclo celular en células Swiss 3T3 en cultivo inducida por LIF podría involucrar un mecanismo regulatorio no descrito anteriormente	76
Acción diferencial de distintas citoquinas en la inducción de síntesis de ADN	78
Potenciación del efecto mitogénico del LIF y la OSM por PGE1 e insulina	78
Acción de la IL-6 sobre la inducción de síntesis de ADN	80
Relación entre las vías de señalización del LIF y de la OSM	81
Translocación nuclear de la STAT1 dependiente de la estimulación con LIF	82
Translocación nuclear de la STAT3 y STAT5 luego de distintos estímulos	83
4- Materiales y métodos	84-86
5- Discusión	87-
Primera parte:	87
Mecanismos de señalización dependientes de PGF _{2α} , capaces de inducir expresión de Ciclina D1	87

Analizar el efecto del TGF β 1 sobre la expresión de ciclina D1. Determinar la relación entre los niveles del ARNm de ciclina D1 y el punto de compromiso celular	87
Segunda parte:	89-
Efecto mitogénico del LIF	89
Mecanismos de señalización involucrados en la inducción de la síntesis de ADN. Sinergia observadas entre los diferentes mecanismos de señalización y el LIF:	89
<i>Mecanismos de señalización dependientes de AMPc</i>	89
<i>Mecanismos de señalización dependientes de PTK</i>	90
<i>Mecanismos de señalización dependientes de MAPK y MEK</i>	90
<i>Translocación de STAT1 a núcleo</i>	91
Diferencias entre mecanismos de señalización inducidos por el LIF y por la PGF _{2α} :	92
<i>Mecanismos de señalización dependientes de PKC</i>	92
<i>Mecanismos de señalización dependientes de PTK</i>	92
<i>Isoprenilación de proteínas:</i>	93
<i>Mecanismos de señalización dependientes de MAPK</i>	93
Síntesis de ADN inducida por LIF independiente de la expresión de ciclinas D:	94
Similitudes entre las distintas citoquinas de tipo IL-6:	96
<i>Translocación de STAT1, STAT3 y STAT5, a núcleo</i>	97
6- Bibliografía	98-

La proliferación celular en mamíferos, es un proceso de alta complejidad, regulado y coordinado por mecanismos conservados entre especies. El control fisiológico del inicio de la proliferación de células eucariotas, está ejercido por factores humorales, producidos por las mismas células, u otras, bajo ciertos requerimientos del organismo. La progresión entre las distintas fases del ciclo celular, está controlada por un aparato regulatorio conservado entre las distintas especies, que no solo coordina los diferentes eventos del ciclo celular, sino que también vincula al ciclo celular con señales extracelulares, que controlan la proliferación de las células. A partir de un determinado estímulo mitogénico, a través de un receptor específico de una célula blanco, se generan cascadas de mecanismos de señalización en la membrana y en el citoplasma de esa célula. Estos eventos tempranos, actúan sobre la maquinaria del ciclo celular, que conducen finalmente a la división celular. La expresión de proteínas que regulan el ciclo celular, es en parte inducida por mecanismos de señalización estimulados por mitógenos.

La progresión desde la fase G_0 hasta la fase S, depende de la actividad de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Estas quinasas son las Cdk4 y Cdk6, y son activadas al formar complejos con las ciclinas D (ciclina D1, D2, y D3), inducidas en la fase G_1 . Se considera a las ciclinas D como "sensores" del medio extracelular, ya que a partir de un estímulo mitogénico, se induce su expresión. Los complejos activados ciclina D-Cdk4 y ciclina D-cdk6, catalizan la fosforilación de la proteína Rb.

La $PGF_{2\alpha}$, es capaz de inducir síntesis de ADN, mediante múltiples mecanismos de señalización en células Swiss 3T3, en ausencia de otros factores. La $PGF_{2\alpha}$ induce la expresión de ciclina D1 mediante mecanismos de señalización dependientes de PKC. Dado que el GF109203X, un inhibidor específico de PKC, disminuye parcialmente la expresión de dicha proteína estimulada por $PGF_{2\alpha}$. Bajo las mismas condiciones, el OAG es incapaz de inducir la expresión de ciclina D1. La $PGF_{2\alpha}$ es capaz de mediar la expresión de ciclina D1, además, aparentemente por mecanismos de señalización dependientes de PTK, mientras que mecanismos de señalización dependientes de calcio, regulan otros eventos aún no determinados. El $TGF\beta_1$, que no es mitogénico en estas células, potencia el efecto mitogénico de la $PGF_{2\alpha}$. Este factor no es capaz de inducir expresión de ciclina D1, sin embargo, el $TGF\beta_1$ es capaz de aumentar los niveles de ciclina D1 inducidos por el OAG o la $PGF_{2\alpha}$ aparentemente, mediante la estabilización del ARNm de ciclina D1.

El factor inhibitorio de leucemia (LIF), pertenece a una familia de citoquinas con un gran número de funciones, entre ellas promover la multiplicación de una gran cantidad de células (células pluripotenciales embrionarias, proliferación de mioblastos, macrófagos etc.), así como estar involucrado en eventos de diferenciación (monocitos, neuronas, etc.).

En células Swiss 3T3, el LIF estimula la síntesis de ADN en forma independiente del incremento de AMPc. Sin embargo, la Prostaglandina E1, la isobutil metilxantina (IBMX), la forskolina (FK), o el 8-bromo AMPc (8 br-cAMP), que en éstas células incrementan los niveles de AMPc, potencian la respuesta proliferativa del LIF. Inhibidores de proteína quinasa A (PKA) como el H-89 o el PKI, que difieren en sus mecanismos de acción, no alteran la respuesta del LIF.

La lovastatina (LOV), un inhibidor de la hidroximetil CoA reductasa, previene la síntesis de ácido mevalónico, inhibiendo la isoprenilación de proteínas, entre ellas la proteína $p21^{ras}$. El agregado de LOV, no bloquea la inducción mitogénica del LIF, pero es capaz de inhibir la síntesis de ADN estimulado por la $PGF_{2\alpha}$. Además, la LOV inhibe la sinergia entre la $PGF_{2\alpha}$ y el LIF.

Inhibidores de la cascada de MAPK (PD 098059 y SB 203580) no bloquean la inducción de la mitogénesis estimulada por el LIF. Sin embargo, ambos inhibidores son capaces de bloquear la síntesis de ADN estimulada por $PGF_{2\alpha}$.

El LIF es capaz de inducir síntesis de ADN mediante mecanismos de señalización independientes de PKC, utilizando como inhibidor específico al GF 109203X. Sin embargo, la

PGF_{2α} requiere de mecanismos de señalización dependientes de PKC para su efecto mitogénico. Además, el GF 109203X, no inhibe la sinergia entre la PGF_{2α} y el LIF.

La STAT1 (transductor de señal y activador de la transcripción 1) es translocada a núcleo mediante la estimulación de células por el LIF.

Podemos concluir que el efecto mitogénico del LIF utiliza mecanismos de señalización alternativos a la PKC, PKA, MEK, p38^{MAPK} y proteínas isopreniladas. Además, mecanismos de señalización dependientes de PKC, PKA, y probablemente PTK, son capaces de complementarse de forma sinérgica, con mecanismos de señalización estimulados por el LIF.

La PGF_{2α} estimula la expresión de ciclina D1, mediante mecanismos de señalización dependientes de PKC y PTK, además dicho mitógeno, estimula la expresión de la proteína ciclina D2. Sorprendentemente, el LIF no es capaz de estimular la expresión de ciclina D1, ni de ciclina D2. Los niveles de ciclina D3, Cdk4 y Cdk6 permanecen constantes en células tratadas por LIF, PGF_{2α} o no tratadas. Estos resultados indican que el LIF induce síntesis de ADN, de forma independiente a la expresión de ciclina D1, D2 y D3. A diferencia de la mayoría de los mitógenos, como la PGF_{2α}, que son capaces de inducir la expresión de una o varias ciclinas D.

Por último, el LIF y la OSM (otra citoquina perteneciente a la misma familia), inducen síntesis de ADN, posiblemente a través de mecanismos de señalización semejantes, dado que: ambas citoquinas son capaces de translocar STAT1 hacia el núcleo; la PGE1 y la insulina son capaces de potenciar el efecto mitogénico de ambas citoquinas de forma semejante; la sinergia de cada una de éstas citoquinas, con la PGF_{2α} sobre la iniciación de la síntesis de ADN, se observó tanto a concentraciones subsaturantes como saturantes. Además, el LIF y la OSM adicionados conjuntamente a concentraciones subsaturantes, tuvieron un efecto aditivo sobre la inducción de la entrada en la fase S, mientras que, el agregado del LIF en combinación con la OSM, ambos a concentraciones que resultan saturantes cuando se agregan individualmente, no indujeron un mayor aumento en el porcentaje de células en la fase S, que aquel estimulado por cada citoquina.

Los resultados obtenidos sugieren que la mitogénesis estimulada por la PGF_{2α} ocurriría a través de la expresión de ciclina D1, mediada por mecanismos dependientes de DAG/PKC y quinasas de tirosinas, mientras que mecanismos dependientes de calcio, estarían involucrados en otro/s proceso/s, aún no determinados. Por último, el LIF induce síntesis de ADN de forma independiente de mecanismos de señalización tales como la PKC, PKA, MEK, p38^{MAPK} y proteínas isopreniladas, e independiente de un aumento en la expresión de ciclinas Ds, CDK4 y CDK6.

Palabras claves:

Células de ratón Swiss 3T3

Factores de crecimiento

Mecanismos de transducción de señales

Moléculas regulatorias del ciclo celular

Factor inhibidor de leucemia (LIF)

Oncostatina M (OSM)

Citoquinas de tipo IL-6

TGF β 1

PGF $_{2\alpha}$

Fase G $_1$

Proteínas quinasas de tirosinas (PTK)

Proteína quinasa C (PKC)

Calcio

AMPc

Proteínas quinasas dependientes de AMPc (PKA)

Ciclina D

Quinasas dependientes de ciclina (CDK)

Trasductores de señales y factores de transcripción (STATs)

Mammalian cell division, is a highly complex process, regulated and coordinated by mechanisms that are conserved through most species. The physiological control of eucariotic cell proliferation initiation is external, and it is exerted by humoral factors, made by the same or other cells, under certain requirements of the organism. Progression through the different phases of the cell cycle, is governed by a regulatory machinery conserved through most species, that not only coordinates the various events that made up the cell cycle, but also connects the cell cycle with extracellular signals, that regulates cell proliferation. Beginning with a given mitogenic stimulus acting through a specific receptor in a target cell, signalling mechanisms cascades are generated in the membrane and in the cytosol of that cell. These early events, act on the cell cycle machinery, finally leading to cell division. The expression of proteins that regulate the cell cycle is in part induced by mitogen-stimulated signalling mechanisms.

The passage from G₀ to S phase, depends on the activity of cyclin-dependent kinases (CDKs). These kinases are CDK4 and CDK6, and they are activated when they form complexes with cyclins D (D1, D2 and D3), induced in the G₁ phase. Cyclins D are considered as "sensors" of the extracellular medium, since their induction is triggered by mitogenic stimuli. The activated complexes cyclin D-CDK4 and cyclin D-CDK6 catalyse the phosphorylation of the Rb protein.

In Swiss 3T3 cells, PGF_{2 α} is capable of inducing DNA synthesis, by means of multiple signalling mechanisms, in the absence of other factors. However its mitogenic effect is potentiated by TGF β 1 addition. We have shown that PGF_{2 α} triggers cyclin D1 mRNA/protein expression prior to cellular entry into the S phase, but fails to raise CDK4 or cyclin D3 levels, while 1-oleoyl-2-acetylgllycerol (OAG), a protein kinase C (PKC) and tyrosine kinase (TK) activator, induces only cyclin D1 expression with no mitogenic response. In contrast, in PKC-depleted or -inhibited cells, PGF_{2 α} , but not OAG, increases cyclin D1 expression with no mitogenic response. Finally, OAG, in the presence of orthovanadate (Na₃VO₄) or TGF β 1, induces DNA synthesis. Thus, it appears that PGF_{2 α} triggers cyclin D1 expression via two independent signalling events that complement with TGF β 1-triggered events to induce DNA synthesis. TGF β 1 cannot trigger cyclin D1 expression, but, stabilise cyclin D1 mRNA, after PGF_{2 α} -triggered its expression.

Leukaemia inhibitory factor (LIF) was originally described on the basis of its ability to stimulate the differentiation of murine M1 leukemic cells into granulocytes and macrophages. In Swiss 3T3 cells, both LIF and prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) trigger initiation of DNA synthesis and cell proliferation. LIF appears to exert its action through signals and processes markedly different from those elicited by PGF_{2 α} . While pre-treatment the cell culture with either GF 109203 (bysoindolmaleimide), a specific PKC inhibitor, or 12-tetradecanoyl-13-phorbolacetate, which causes PKC down modulation, or lovastatin, known to block mevalonic acid synthesis and protein isoprenylation, totally impairs PGF_{2 α} mitogenic action. None of these treatments inhibited LIF-induced DNA replication. Agents capable of rising intracellular cAMP, enhanced both LIF and PGF_{2 α} ability to cause cellular entry into the S phase. However, H89 and PKI, both PKA inhibitors, prevented cAMP-mediated potentiation, but did not affect LIF induction of cellular entry into S phase. PD98059, a MEK (MAPKK) inhibitor, prevents PGF_{2 α} -mitogenic response but does not block LIF-induced initiation of DNA synthesis. Immunofluorescence studies revealed that LIF and PGF_{2 α} responses exhibit marked differences in STAT cytoplasmic-nuclear translocation. After 15 to 30 min, LIF causes STAT1 but not STAT3 or STAT5 translocation. In contrast, PGF_{2 α} failed to induce translocation of any of those transcriptional factors.

Thus, it appears that LIF triggers mitogenic action through independent signalling events such as those involving PKC, PKA, MEK, p38^{MAPK}, and protein isoprenylation. In addition, its mitogenic effect is markedly potentiated by PKC, PKA, and probably PTK mediated signalling mechanisms.

Western blot analyses of cyclin D1, D2 and D3 expression (implicated in most mitogen actions), revealed that $\text{PGF}_{2\alpha}$, after 7-9 h, caused an increase in cyclin D1 protein levels, and a later increase in cyclin D2 levels. In contrast, LIF failed to increase either cyclin D1, D2, D3, CDK4 or CDK6 protein levels.

Finally, oncostatin M (OSM), a cytokine closely related to LIF, exerts its action through signals and processes markedly similar to those elicited by LIF. This conclusion is based in the following facts: both cytokines causes STAT1 translocation; the effect of Prostaglandin E1 and insulin, when added separately or in combination, enhances the effect of either LIF or OSM; $\text{PGF}_{2\alpha}$ enhances the effect of LIF or OSM on DNA synthesis, both at subsaturant or saturant concentration. Moreover, LIF and OSM added together at subsaturating concentrations had an additive effect on DNA synthesis. LIF and OSM added together at saturating concentration had an similar effect to that of these same cytokines when added separately.

Interleukin -6 and CNTF, fail to cause either cyclin D expression or mitogenic response.

The results obtained suggest that the $\text{PGF}_{2\alpha}$ -stimulated mitogenesis would occur through cyclin D1 expression, mediated by DAG/PKC and TK dependent mechanisms, while calcium dependent mechanisms would be involved in other processes. Finally, the LIF stimulated mitogenesis is not depend on signalling mechanisms such as those that act through PKC, PKA, MEK, p38^{MAPK} and isoprenilated proteins, and also independently of the expression of cyclins D, CDK4 and CDK6.

Keywords:

Swiss 3T3 cells

Growth factors

Signalling mechanisms

Cell cycle

Leukaemia inhibitory factor (LIF)

Oncostatin M (OSM)

Ciliary neurotrophic factor (CNTF)

Interleukin-6 (IL-6)

Transforming growth factor β 1 (TGF β 1)

Prostaglandin 2 α (PGF_{2 α})

G₁ phase

Protein tyrosine kinase (PTK)

Protein kinase C (PKC)

Calcium

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

AMPc

Protein kinase A (PKA)

Cyclin D

Cyclin-dependent kinase (CDK)

Signal transducers and activators of transcription (STATs)

INTRODUCCION

La proliferación celular en mamíferos es un proceso de alta complejidad, regulado y coordinado por mecanismos conservados entre especies. Identificar los eventos básicos subyacentes y su regulación no solo es de vital importancia para comprender los mecanismos de reproducción de los organismos, sino también para poder ahondar en el conocimiento de procesos fisiológicos tales como la regeneración de órganos, la cicatrización de tejidos y la inmunidad celular, entre otros. Comprender los mecanismos que controlan la división celular es de gran importancia para estudiar procesos patológicos como el cáncer.

En términos generales el ciclo celular puede describirse como una sucesión de fases denominadas G_1 , S, G_2 y M (Sher, et al. 1996). La fase G_1 se caracteriza por una intensa actividad bioquímica, en la que el tamaño de la célula se duplica, al igual que sus estructuras citoplasmáticas; es decir, es una etapa de crecimiento (Heichman et. al. 1994; Hunter, T 1994; Hall., 1996). Posteriormente, en la fase S, se lleva a cabo la duplicación del material genético nuclear y la síntesis de proteínas involucradas en dicho proceso (Donachei, 1968). Culminada esta etapa, la célula entra en la fase G_2 , en la cual se ensamblan las estructuras necesarias para producir la separación de los cromosomas que ocurre durante la fase M (Sachsenmaier, 1972; Kauffman 1975). En este último período los cromosomas, que ya se han duplicado, se condensan, y posteriormente se separan, esto permite la formación de dos núcleos celulares. Finalmente, la célula comienza a estrecharse por el centro hasta dividirse en dos en un proceso que se conoce como citoquinesis, dando origen a dos células hijas con igual contenido genético. (figura 1)

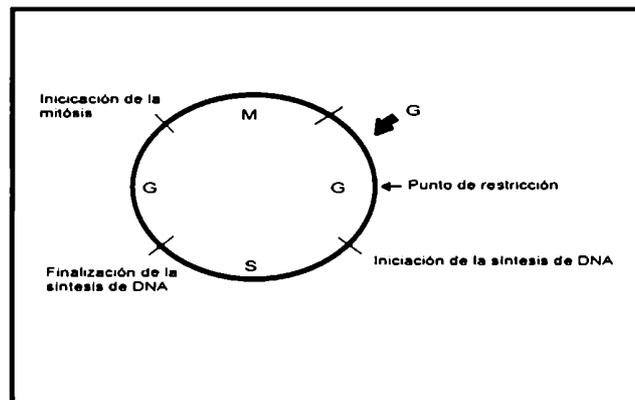


Figura 1: Esquema del ciclo celular. Abreviaturas: G : fase gap 1; S : fase de síntesis de DNA; G : fase gap 2; M: mitosis, G , fase de quiescencia

La fase M ocupa sólo una pequeña parte del ciclo celular. En cambio, la interfase, que comprende las fases G₁, S y G₂, abarca normalmente el 90% o más del tiempo total del ciclo celular.

El control fisiológico del inicio de la proliferación de células eucariotas, es externo y está ejercido por factores humorales producidos por células, cercanas o distantes, bajo ciertos requerimientos del organismo. La mayoría de las células de un organismo multicelular se encuentra en un estadio no proliferativo o de quiescencia, llamado G₀ (Pardee, 1989; Sherr, 1994). Sin embargo, los factores externos (usualmente llamados mitógenos, factores de crecimiento o citoquinas) inducen cambios en la maquinaria intracelular para pasar de la quiescencia (estadio G₀) a la fase G₁. Por lo tanto, a partir de estímulos extracelulares, una célula que se encuentra en un estadio de G₀, es capaz de inducir múltiples mecanismos de transducción de señales, que convierten las señales extracelulares en mensajes intracelulares, que resultan en la transcripción de genes críticos, conocidos como genes del ciclo celular (cdc) (Planas-silva, et al. 1997). En cambio, las células tumorales son relativamente independientes de los factores extracelulares y su ciclo es más corto debido fundamentalmente a la reducción de la fase G₁.

La decisión de iniciar una nueva fase del ciclo celular se encuentra regulada por distintos puntos específicos de control (Hartwell, et al. 1994). Dichos puntos de control son los siguientes: la determinación de iniciar la Replicación del ADN, una vez que ha recibido estímulos extracelulares, la iniciación de la síntesis de ADN y la iniciación de la mitosis (Planas-Silva, et al. 1997). Además de los puntos de control, existen los llamados puntos de chequeos (Nasmyth, et al. 1993), donde la célula es capaz de responder a las condiciones adversas, deteniendo el ciclo celular en determinados estadios. El arresto del ciclo celular esta mediado por señales específicas. Por ejemplo, daño del ADN, falta de oxígeno (hipoxia), activación de ciertos oncogenes, o infección por ciertos virus. Las células detienen su ciclo celular, de tal forma que, o bien el daño es reparado y continúa el ciclo, o la célula sufre apoptosis. Esto previene fundamentalmente que alteraciones en el ADN sean replicadas, y los daños en el ADN sean propagados a las células hijas.

Para estudiar a los mecanismos que controlan la división celular en un organismo superior, se utilizan actualmente cultivos de distintos tipos celulares que crecen en un entorno definido. Esta metodología ha permitido dilucidar nuevos procesos regulatorios que los mencionados anteriormente. Desde luego, estos sistemas son una aproximación a lo que ocurre *in vivo*

debido a la interrupción de la arquitectura del tejido y a la ausencia de otros factores presentes en el organismo intacto.

MEDIADORES INTERCELULARES

Las células en un tejido normal emprenden programas de proliferación de acuerdo a las señales que reciben de otras células (Dulbecco, et al 1973; Holly, et al. 1975; Prescott, et al. 1987). En esta red de señales intercelulares se basa el establecimiento y mantenimiento de la arquitectura normal de los tejidos. Para ello, los organismos multicelulares han desarrollado mecanismos de comunicación celular altamente eficientes para integrar y coordinar tanto funciones específicas celulares como la proliferación de cada tipo celular en particular. Esta comunicación se da a través de mediadores intercelulares, también llamados factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, neuropeptidos, etc.. Las distintas clases de mediadores intercelulares incluyen proteínas, péptidos pequeños, aminoácidos, nucleótidos, esteroides, derivados de ácidos grasos, e inclusive gases disueltos tales como óxido nítrico y monóxido de carbono. La mayoría de estos mediadores intercelulares pueden ser secretados a partir de una célula mediante la exocitosis o la difusión a través de la membrana plasmática, o bien son retenidas en la superficie de la célula, influenciando únicamente a células adyacentes. Por lo tanto, los mediadores intercelulares que son secretados por las células, pueden actuar a distancia (señal endocrina) o como mediadores locales, afectando únicamente células próximas a la célula que lo produjo (señal parácrina, señales yuxtácrinas) o bien actúan sobre la propia célula que le dio origen (señal autócrina).

Los mediadores intercelulares son liberados por ciertas células y se unen a receptores específicos ubicados en la célula blanco. Existe una unión específica entre el mediador intercelular y el receptor. Posteriormente se inicia la respuesta en la célula blanco. En la mayoría de los casos los receptores son proteínas transmembrana que se encuentran en la superficie de la célula blanco, cuando se une un mediador intercelular, el receptor es activado y genera una cascada de señales intracelulares que altera el comportamiento de la célula blanco. En algunos casos, sin embargo, el receptor se encuentra dentro de la célula blanco y el mediador intercelular debe entrar a la célula para activarlo. Para ello, estas moléculas señalizantes deben ser suficientemente pequeñas e hidrofóbicas para difundir a través de la membrana plasmática.

Cualquier célula de un organismo multicelular está expuesta a un gran número de mediadores intercelulares. La célula debe responder a los distintos mediadores intercelulares selectivamente, de acuerdo a sus características específicas, en particular, de acuerdo a los

receptores que dicha célula contenga y a los mecanismos de señalización activados posteriormente. Entonces, una célula puede ser programada a responder a un grupo de señales extracelulares que posibilita que dicha célula prolifere, se diferencie o cumpla otras funciones específicas (Blagosklonny, 1999).

Citoquinas:

Como hemos mencionado, dentro de los mediadores intercelulares se encuentran las citoquinas. Estas cumplen una función importante en la comunicación entre células. Como mediadores intercelulares actúan en concentraciones de nano o picomolar. Las citoquinas se definen como proteínas reguladoras que controlan la supervivencia, el crecimiento, la diferenciación y ciertas funciones efectoras de las células de un tejido (Heinrich, P.C. et al. 1998).

Las citoquinas tienen un papel fundamental en la respuesta inmune, particularmente durante las infecciones, inflamaciones, enfermedades en riñón, vaso, e intestino, o en enfermedades autoinmunes neurológicas y endocrinas.

A diferencia de las hormonas, las citoquinas no son almacenadas como precursores en glándulas, sino que rápidamente se sintetizan y se secretan por diferentes células, luego de ser estimuladas.

La mayoría de las citoquinas son difíciles de detectar en suero ya que sus células productoras se localizan frecuentemente adyacentes a la célula blanco y en general se liberan pequeñas cantidades de citoquinas. Las citoquinas actúan sobre muchos tipos de células blancas (pleiotropismo) y frecuentemente afectan la acción de otras citoquinas en forma aditiva, sinérgica o antagónica. Además de tener un efecto pleiotrópico, las citoquinas tienen acciones frecuentemente redundantes (una respuesta biológica similar puede estar dada por grupos diferentes de citoquinas). Las citoquinas ejercen su acción a través de un receptor específico en la célula blanco (Heinrich. et al., 1998).

Las citoquinas son polipéptidos de masa molecular baja, cuya estructura es frecuentemente estabilizada por N- y/o O-glicosilaciones y por puentes disulfuros intramoleculares. Han sido clasificadas en base a su respuesta biológica, de acuerdo al tipo de receptor utilizado o en base a su estructura tridimensional. Dentro de las clasificaciones por estructura, Bazan (Bazan, 1991) propuso clasificar a una familia de citoquinas en base a su estructura de cuatro α -hélices en haz. Posteriormente se subclasificó en cadena corta y cadena larga de citoquinas con cuatro α -hélices en haz. Esta última subfamilia comprende a la interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 11 (IL-11), factor inhibitorio de leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), factor neutrófilo ciliar (CNTF), cardiotropina (CT-1), eritropoyetina (Epo), factor estimulante de colonias granulocíticas (G-

CSF), interleuquina 12 (IL-12), hormona de crecimiento, prolactina, interleuquina 10 (IL-10), Interferon (IFN) α/β , y leptina.

Dentro de ésta subfamilia, las IL-6, LIF, IL11, OSM, CNTF y CT-1 utilizan una proteína asociada al receptor llamada gp130. Debido a que todos los receptores pertenecientes a ésta subfamilia se asocian a gp130, y esta proteína es la responsable de la transducción de la señal, una vez que la citoquina se une a su receptor específico, estas citoquinas desencadenan respuestas fisiológicas similares y superpuestas. A este grupo de citoquinas se las llama citoquinas de tipo IL-6 (Hibi, et al., 1992).

El mecanismo de señalización conocido de la familia de citoquinas de tipo IL-6, se inicia a partir de la unión de cada citoquina a su receptor específico, provocando una heterodimerización u homodimerización con la glicoproteína 130 (gp130) en la superficie de la célula. En el caso de la IL-6, esta se une con su receptor específico (IL-6R) permitiendo la homodimerización de dos proteínas gp130 (Murakami, et al. 1993). En cambio, los receptores del LIF (LIFR) (Gearing, et al. 1992), el CNTF (CNTFR) (Davis, et al. 1993), y la CT-1, forman heterodímeros entre la gp130 y el LIFR, necesarios para la señalización posterior. En el caso de OSM, existe una heterodimerización de gp130-LIFR (Gearing, et al. 1992). Sin embargo, en algunos experimentos realizados en ratones, se observó que la respuesta fisiológica se genera a partir de un heterodímero formado por una gp130 y OSMR. No está claro si la IL-11 induce la formación de un homodímero de gp130 (Yin, et al., 1993), o recluta un receptor específico aún no identificado (Neddermann et al., 1996). (figura 2)

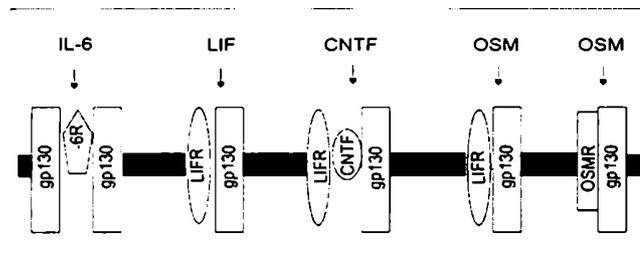


Figura 2: Complejo de receptores de citoquinas de tipo IL-6.

La vía de traducción de señales, una vez activado el receptor de estas citoquinas, está constituido por quinasas de tirosinas, llamadas Janus quinasas (JAKs) y por proteínas llamadas transductores de señales y activadores de transcripción (STATs) (Lütticken, et al., 1994, Stahl, et al. 1994, Damell, et al 1994). Uno o más miembros de JAKs se asocia con un receptor transmembranal. Esto lleva a la activación de JAK y posterior fosforilación en tirosina de uno o más miembros de STATs (Pellegrini, et al. 1997)

Las citoquinas de tipo IL-6 regulan una variedad de procesos celulares complejos, muchas de las respuestas biológicas están enumeradas en la tabla 1. Se observa que la mayoría de la información proviene de experimentos *in vitro*. Es difícil determinar si los efectos observados *in vitro* se correlacionan con aquellos *in vivo*. Los posibles roles de las citoquinas de tipo IL-6 *in vivo* se observaron a partir de estudios con animales transgénicos y knockout. Si bien estos estudios han confirmado algunas de las observaciones *in vitro*, han permitido demostrar por otro lado funciones nuevas e inesperadas (Heinrich, et al. 1998) (tabla 2).

Tabla 1: Propiedades fisiológicas de las citoquinas humanas pertenecientes a la familia IL-6

	IL-6	LIF	CNTF	OSM
Sitio de síntesis.	Diversos tejidos incluyendo hueso, cartilago, sangre, piel, pulmón, y SNC.	Diversos incluyendo corazón, hígado, endometrio SNC, pituitaria, riñon, pulmon, timo, e intestino.	Sistema nervioso.	Testículo y sangre.
Respuesta	Diferenciación y proliferación de células T y B. Proliferación de células mesangiales y queratinocitos. Desarrollo de osteoclastos Estimula la producción de ACTH. Fiebre	Hematopoyesis Implantación de blastocitos Factor de diferenciación de células pituitarias corticotróficas Inhibición de la diferenciación de células ES. Proliferación de mioblastos Cambio de función de neuronas simpáticas a colinérgicas. Factor de supervivencia neuronal	Efecto anti-apoptótico de neuronas injuriadas. Promueve el fenotipo colinérgico de neuronas simpáticas. Down-regulación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-8)	Inhibición de la diferenciación de ES Supervivencia de células de serotol y gonocitos Inducción de citoquinas (IL-6, LIF, etc.) Up-regulación de moléculas de adhesión de células endoteliales.

Abreviaturas: ACTH: hormona adrenocorticotrófica; SNC: sistema nervioso central; ES: células troncales embrionarias.
Fuente: Heinrich, 1998.

Tabla 2: Fenotipos de ratones transgénicos (tg) y ratones knock-out (ko).

Citoquinas	t.g/k.o	Efectos
IL-6	k.o	Embriogénesis y desarrollo normal. Disrupción en el metabolismo de hueso. Defecto en regeneración de hígado luego de una hepatectomía parcial.
CNTF	t.g	Prevención de degeneración de motoneuronas. Pérdida del peso corporal. Protección de apoptosis neuronal durante el desarrollo embrionario.
LIF	k.o k.o	Pérdida de motoneuronas en ratones adultos y subsecuente atrofia muscular. Infertilidad de hembras, debido a defectos en la implantación del embrión. Tamaño corporal reducido. Pérdida parcial de stem-cell. Respuesta reducida de células T linicas. Habilidad reducida de neuronas simpáticas injuriadas a la supervivencia Sobreexpresión en células ES, lleva a la no diferenciación de quiméras embrionarias.
OSM		La sobreexpresión en neuronas y queratinocitos, es letal. Anormalidades en el crecimiento de hueso y espermatogénesis. La sobreexpresión en células de páncreas, lleva a fibrosis. La sobreexpresión en linocitos, resulta en anomalías en el desarrollo de tejido linfoideo.

Abreviaturas: IL-6: interleuquina 6; CNTF: factor trófico ciliar; LIF: factor inhibitorio de leucemia; OSM: Oncostatina M.
t.g: ratones transgénicos; k.o: ratones knock-out ES: células troncales embrionarias.
Fuente: Heinrich, 1998

Factor inhibitorio de leucemia (LIF):

El LIF es una proteína de 180 aminoácidos, monomérica, y altamente glicosilada (Gearing, et al. 1987). Es conocido por la variedad de nombres alternativos que recibe (tabla 3), debido a que ejerce diversos efectos sobre células hematopoyéticas, células troncales embrionarias, células germinales primitivas, hepatocitos, neuronas, adipocitos, mioblastos y osteoblastos (Hilton, 1992). El LIF controla varias funciones celulares vitales como mantener en estado indiferenciado y pluripotente a células troncales embrionarias ("stem cells") y prevenir la entrada de estas células en apoptosis (Pease et al. 1990; Metcalf, 1992). Por otro lado, este factor cumple un papel crucial en regular el desarrollo del embrión ya que, permite una adecuada implantación en el útero (Stewart, et al. 1992). El LIF y sus receptores son producidos a partir de una gran variedad de células, incluyendo células inmunocompetentes (monocitos, macrófagos), fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales tímica y células tumorales humanas y de roedores (Gascan et al. 1990, Kurzrock et al 1991, Metcalf, 1991).

Tabla 3: Nombres alternativos del LIF

NOMBRES ALTERNATIVOS DE LIF	ABREVIACIÓN
FACTOR INDUCTOR DE DIFERENCIACIÓN	DIF
ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA DIFERENCIACIÓN	D-FACTOR
FACTOR RETARDADOR DE LA DIFERENCIACIÓN	DRF
FACTOR DIFERENCIANTE DE NEURONAS COLINERGICAS	CNDF
CÉLULAS D ₈ PARA INTERLEUQUINA HUMANA	HILDA
FACTOR III ESTIMULANTE DE HEPATOCITOS	HSF-III
INHIBIDOR DERIVADO DE LIPOPROTEINA LIPASA DE MELANOCITOS	MLPLI

El efecto biológico del LIF es pleiotropico y redundante, esto puede ser bien ilustrado comparando ratones en los cuales los niveles de LIF han sido artificialmente elevados, tanto por inyección de LIF purificado recombinante o transplantando a los ratones, células hematopoyéticas productoras de LIF. En ambos casos los efectos son similares. Se produce una completa pérdida de grasa subcutánea y abdominal (resultando en un 30% de pérdida de peso a los 3 días); se observan elevados niveles de calcio en suero, y algunos de estos ratones presentan calcificaciones en músculo, corazón e hígado. Se detectan síntomas de una respuesta de fase aguda, con una disminución en la concentración de albúmina sérica y un aumento en la tasa de sedimentación de eritrocitos. En ratones, y también en primates, con niveles aumentados de LIF circulante, existe un incremento en el número de plaquetas y en los megacariocitos; las células progenitoras de megacariocitos se ven considerablemente

aumentadas en el baso (Metcalf et al. 1989).

Los ratones carentes del gen funcional LIF, se desarrollan de la misma manera que los ratones controles y tienen una expectativa de vida normal, aparentan ser histológicamente normales (Escary, et al. 1993). El efecto más profundo, sin embargo, que ocasiona la delección del gen funcional LIF, es la implantación de los embriones en el útero. Los embriones, independientemente de su capacidad para producir el LIF, no pueden implantarse en el útero de ratones hembras que no produzcan esta citoquina. Se puede corregir este efecto, inyectando en el útero LIF purificado en el momento de la implantación (Stewart, et al. 1992).

Prostaglandinas:

Las prostaglandinas (PGs) son compuestos cíclicos, derivados de ciertos ácidos grasos no saturados de 20 átomos de carbono. La biosíntesis de las prostaglandinas, se produce a partir de los ácidos grasos esenciales. En una de las rutas típicas, el ácido graso esencial linoleico se convierte primeramente en ácido araquidónico, de 20 átomos de carbonos. La ciclación de este ácido graso insaturado lleva a la formación de distintas prostaglandinas (Hokin et al. 1985; Berridge et al. 1990; Parker, et al. 1987). Las prostaglandinas se designan de acuerdo con los substituyentes presentes en el número de dobles enlaces adicionales en la cadena lateral, que poseen la configuración *cis*. Las prostaglandinas mejor conocidas son las E1, F_{1α}, F_{2α}, que se designan abreviadamente como PGE1, PGF_{1α} y PGF_{2α} respectivamente. Las prostaglandinas difieren entre si respecto a su actividad biológica, aunque todas muestran por lo menos alguna actividad depresora de la presión sanguínea, e inductora de la contracción de los músculos lisos.

Las prostaglandinas se las considera hormonas locales ya que ejercen sus efecto y se inactivan en los tejidos y órganos donde son sintetizadas.

En el sistema reproductor femenino se encuentran prostaglandinas en ovario, miometrio y en el líquido menstrual en concentraciones que varían con el ciclo ovulatorio. Las prostanglandinas producen contracciones en el útero. El aumento de la síntesis de PGF_{2α} es un requisito previo para la iniciación del parto, ya que inicia y mantiene las contracciones uterinas, mientras que la oxitocina es una hormona importante sólo en el segundo estadio, cuando el feto distiende el cuello y la vagina. Las prostaglandinas son indispensables para la ovulación porque estimulan el tono muscular a nivel de la pared folicular, facilitando la expulsión del óvulo.

Las prostaglandinas estarían involucradas en el control de la respuesta inmunológica, asignándose para alguna de ellas un papel inmunosupresor. Intervienen también en la génesis del proceso inflamatorio. La administración local de PGE2 produce vasodilatación (síntomas como calor, dolor y edema). Sin embargo, en la fase crónica, actuarían inhibiendo la inflamación

mediante supresión de la liberación de linfoquinas por los linfocitos T.

En particular, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ media varios procesos fisiológicos incluyendo inflamación, contracción y relajación de músculo liso y agregación plaquetaria. La prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) está implicada en las funciones reproductivas: ovulación, luteólisis, y el parto. La acción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ está mediada por el receptor $\text{PGF}_{2\alpha}$ (FP) de tipo rodopsina, acoplado a una proteína G (Sugimoto et al. 1994). Ratones knockout de FP se desarrollan normalmente pero fueron incapaces de gestar fetos a término. Éstos junto con otros resultados, indican que el parto se inicia cuando la $\text{PGF}_{2\alpha}$ interactúa con el receptor FP en células luteales ováricas de ratones preñados para inducir la luteólisis.

Factor de transformación y crecimiento beta 1 ($\text{TGF}\beta 1$)

El factor de transformación y crecimiento beta 1 ($\text{TGF-}\beta 1$) y los polipéptidos relacionados con él (la activina, la inhibina, las proteínas relacionadas al péptido decapentaplégico Vg, la sustancia inhibidora Mülleriana, la proteína morfogénica de hueso, los factores de crecimiento y diferenciación y el factor neurotrófico derivado de glía), integran una familia de factores con gran influencia sobre el crecimiento, la diferenciación, la motilidad, la organización y la muerte celular. Algunos de ellos participan en el armado de la estructura básica del cuerpo durante la etapa temprana de la embriogénesis en mamíferos, ranas y moscas. Otros controlan la formación de cartílagos, huesos y órganos sexuales; suprimen el crecimiento de las células epiteliales; promueven la reparación de heridas; o regulan importantes funciones inmunológicas o endocrinas (Letterio, et al. 1998). El $\text{TGF-}\beta$, fue denominado así, por su capacidad de inducir un fenotipo transformado de células en cultivo (Roberts et al., 1980), posteriormente se encontró asociado a la supresión del crecimiento de células tumorales (Massague, 1990). En muchas células, el $\text{TGF-}\beta$ induce la estimulación de la proliferación celular, mientras que en otras, es un potente inhibidor del crecimiento, ya que detiene el ciclo celular en la fase G_1 . En algunas líneas celulares, despliega ambas respuestas biológicas alternativamente. Las circunstancias que permiten una u otra respuesta dependen de las condiciones de cultivo, de las condiciones de crecimiento de las células (si están o no confluentes), de la presencia de otras moléculas reguladoras de la proliferación celular, dependiendo además de la secuencia en la que son adicionadas

El $\text{TGF-}\beta$ induce sus respuestas a través de la interacción con un grupo de receptores específicos situados en la superficie celular. Hasta ahora han sido identificados cuatro tipos,

denominados I, II, III y endoglina, de los cuales solo dos (I y II) median la señalización del TGF- β 1 (Attisano, et al. 1993, Franzén, et al. 1993). Las diferencias entre los distintos tipos de receptores está dada por el dominio de unión al TGF- β 1 y en la afinidad por el mismo. Los receptores I y II, estarían involucrados en la traducción de las señales, mientras que el receptor III y la endoglina, funcionarían como aceptores de membrana y matriz extracelular que preservarían al péptido de la degradación y regularía el acceso del TGF- β 1 a los otros dos receptores (Ruoslahti, 1989; Lopez-Casillas et al., 1993). Los receptores I y II presentan en su región citoplasmática dominios de quinasas en treonina o serina responsables de desencadenar los efectos intracelulares. El receptor II es una quinasa constitutiva que, luego de la unión del TGF β , se asocia con el receptor I, el cual es fosforilado y activado (Massague, 1992; Wrana et al., 1992; Wrana, et al. 1994; Cárcamo et al., 1994).

El único mecanismo de señalización conocido del TGF- β ha sido identificado recientemente. Está formado por una familia de proteínas denominadas Smad. Se han clonado siete genes de Smad (Derynck et al., 1996). De ellos, Smad2 y Smad3 median la acción del TGF- β , la Smad4 sería un componente general en la translocación de las Smad hacia el núcleo, donde potencialmente pueden regular la transcripción de genes blanco (Derynck et al., 1998). Las Smad6 y Smad7 actúan como reguladores negativos de la transducción de la señal y podrían estar involucrados en la terminación de los efectos intracelulares desencadenados por la unión del TGF- β a su receptor (Imamura, et al. 1997).

El mecanismo propuesto para la traducción de señal a partir del TGF- β unido a su receptor es el siguiente: el receptor de tipo I fosforila a las Smad2 o Smad3. Al ser estas fosforiladas, forman un homotrímero que es capaz de unirse a Smad4, evento que permite la entrada del complejo al núcleo donde puede modular la transcripción de genes específicos (Pick, et al. 1999).

RECEPTORES Y MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN

Los organismos multicelulares han desarrollado mecanismos altamente eficientes de comunicación entre células, necesarios para integrar y coordinar la proliferación de cada célula individual. Para que exista una comunicación entre células, se requiere tanto mediadores intercelulares, como un grupo complementario de proteínas receptoras en cada célula, que permita la unión de éstos mediadores intercelulares, así como una respuesta de forma característica y programada. Algunos mediadores intercelulares son hidrofóbicos (esteroides, hormonas tiroideas y retinoides), esto permite que atraviesen la membrana plasmática por

difusión, activando proteínas receptoras intracelulares, que a su vez regulan directamente la transcripción de genes específicos (Arai et al., 1990). También, algunos gases disueltos (como por ejemplo el óxido nítrico, el monóxido de carbono) actúan como mediadores locales, difundiendo a través de la membrana plasmática de la célula blanco y activando a una enzima intracelular (Schmidt et al., 1994; Bredt et al., 1994). Pero la mayoría de los mediadores intercelulares son hidrofílicos, por lo tanto, son capaces de activar proteínas receptoras únicamente en la superficie de la célula blanco. A partir de la unión de estos receptores con mediadores intercelulares hidrofílicos, se genera una cascada de transducción de señales, convirtiendo esta unión extracelular, en un conjunto de señales intracelulares que altera el comportamiento de la célula blanco.

El sistema de transducción de señales dentro de las células eucariotas consiste en una red de proteínas que transforman estímulos extracelulares, en respuestas celulares apropiadas. Las moléculas que forman esta red están en un camino de señalización bioquímico ordenado, en el cual, la propagación de la señal ocurre a través de interacciones secuenciales de proteínas entre sí e interacciones entre pequeñas moléculas y proteínas. Las moléculas señalizantes de esta red se ensamblan para ejecutar un programa de señalización en forma ordenada, tanto en el tiempo como en el espacio (Zuker et al., 1999).

Tipos de receptores:

Existen dos familias (excluyendo la familia perteneciente a receptores unidos a canales iónicos) de receptores en la superficie de la célula, cada uno de los cuales, transduce la señal extracelular de diferente manera. El primer grupo lo constituyen receptores unidos a una proteína G (proteína trimérica que une GTP), estos receptores indirectamente, activan o inactivan enzimas unidas a la membrana plasmática. El segundo grupo, son receptores unidos a una enzima, el receptor puede tener una actividad enzimática *per se* o bien el receptor se asocia a una enzima. Dependiendo del tipo de actividad enzimática del receptor o el tipo de enzima que es capaz de activar dicho receptor, se puede a su vez clasificar en: Receptores con actividad de proteína quinasa de tirosina (TK) (Van der Geer et al., 1994), Receptores que activan TK intracelular, Receptores con actividad tirosina fosfatasas, Receptores que activan proteína quinasa de serina/treonina, y Receptores con actividad guanilil ciclasa.

1 Señalización mediada por receptores en la superficie celular asociados a proteína G

Los receptores unidos a una proteína G (llamada así porque es capaz de unir GTP) pertenecen a una "super familia" de receptores que se encuentran en la superficie celular y se

asocian a dicha proteína, en la cara interna de la membrana plasmática.

A pesar que los receptores acoplados a una proteína G, responden a una amplia variedad de estímulos extracelulares (factores de crecimiento, polipeptidos vasoactivos, neurotransmisores, hormonas, fosfolípidos, fotones, odorantes, etc...), todos tienen dos características en común: una característica estructural que consiste en que el receptor tiene siete segmentos transmembranales hidrofóbicos y una característica funcional que es la habilidad de estimular el intercambio de GDP por GTP en la proteína G en respuesta a la unión de la hormona al receptor (figura 3).

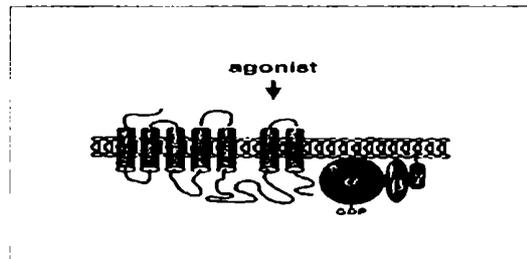


FIGURA 3: RECEPTOR ACOPLADO A PROTEINA G (representado como las subunidades alpha, beta y gama)..

La proteína G está formada por tres cadenas polipeptídicas: una subunidad α , una subunidad β y una subunidad γ . La subunidad α , es capaz de unir e hidrolizar GTP. Las subunidades β y γ forman un dímero. Cuando el receptor acoplado a la proteína G es activado, cambia su conformación, e induce un cambio en la conformación de la subunidad α (Altenbach et al, 1996; Bourne 1997). Esto causa una liberación del GDP. Ya que la concentración de GTP en el citosol es mayor que el GDP, la subunidad α se une a GTP. La unión del GTP induce una disociación entre la subunidad α y el complejo $\beta\gamma$. El tiempo en el cual la proteína G se encuentra activada, está controlado por la subunidad α . Todas las subunidades α tienen actividad GTPasa, una vez que el GTP es hidrolizado a GDP, la subunidad α se reasocia con el dímero $\beta\gamma$, y vuelve a un estado trimérico inactivo, acoplado al receptor. En la figura se muestra la activación de la proteína G, luego de la unión del ligando al receptor y la desactivación de la misma una vez transmitida la señal (Necr, 1995) (figura 4).

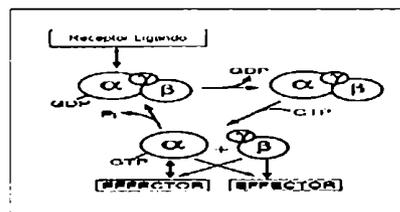


Figura 4 Ciclo regulatorio de la proteína G.

Las distintas clases de proteína G son sumariadas en la tabla 4. La activación puntual de una proteína G puede causar, tanto una inducción como una inhibición de un efector particular, o puede actuar sobre múltiples efectores (provocando la activación de varias vías de señalización: adenilato ciclasa, fosfodiesterasas, fosfolipasas o regulando la actividad de canales iónicos, transportadores de iones, y un creciente número de quinasas). Por lo tanto, una subunidad α unida a GTP y/o un complejo $\beta\gamma$, inician una respuesta de señalización intracelular actuando sobre moléculas efectoras como adenilato ciclasa, fosfodiesterasas, fosfolipasas, o bien regulando la activación de canales iónicos, transportadores iónicos y un número creciente de proteínas quinasas. Por ejemplo, algunas proteínas G activan o inactivan a la proteína adenilato ciclasa, alterando así la concentración intracelular de AMPc. Otras proteínas G activan a una fosfolipasa C específica (PLC β) que hidroliza fosfatidil inositol bisfosfato (PIP2), para generar dos segundos mensajeros, inositol trifosfato (IP3), que libera Ca²⁺ a partir del retículo endoplásmico e incrementa la concentración de Ca²⁺ en el citosol, y diacilglicerol, que permanece en la membrana plasmática activando a proteínas quinasas C. El AMPc o el Ca²⁺ estimulan a PKA y CaM-quinasa respectivamente. Las PKC, PKA, y las quinasas CaM fosforila a proteínas en serina o treonina y alteran así la actividad de otras proteínas.

Tabla 4: Características de los distintos tipos de subunidades de la proteína G

FAMILIA	SUBTIPO	SISTEMAS EFECTORES	RECEPTORES Y LIGANDOS ASOCIADOS
G _q		↑ Adenilato ciclasa ↑ Canales de Ca ²⁺ ↓ Canales de Na ⁺	β adrenergico, glucagón, etc.
	αf	↑ Adenilato ciclasa	Odontico
G ₁₂	11	↓ Adenilato ciclasa	G12 adrenergico, m2-muscarinico
	12	↓ Adenilato ciclasa	Adrenocortico,
	13	↑ Canales de K ⁺	antipeptido Y,
	14	↑ Canales de K ⁺ y de Na ⁺	galantina, etc.
	15	Extracelulares	Glucocorticoides
	16	↑ cGMP fosfodiesterasa	Rodopsina
	17	↑ cGMP fosfodiesterasa	Pigmentos colorados
G ₁₃	18	↑ Fosfolipasa C	α1-muscarinico,
	19	↑ Fosfolipasa C	α1-adrenergico
	20	↑ Fosfolipasa C	Glucocorticoides
	21	↑ Fosfolipasa C	Desconocidos
G ₁₄	22	↑ Hbot	Trumbina, Bombano A2, α1-muscarinico
	23	↑ Hbot	Bradiquinina

Luego de haber descrito las características y las clasificaciones de las proteínas G, volvemos a ocuparnos de la interacción entre el receptor y la proteína G. Cuando una proteína G se disocia del receptor activado, éste es capaz de unirse a otra proteína G inactiva, comenzando nuevamente el ciclo. Entonces un complejo receptor ligando puede activar a muchas proteínas G, en un período corto de tiempo, amplificando la señal original. Posteriormente, una subunidad α interactúa con el efector. Existen 16 variedades de subunidades α conocidos en mamíferos, 5 variedades β y 11 subunidades γ . Las 16 subunidades α se las agrupa en cuatro familias en base a su similitud de secuencia: α_s , α_i , α_q y α_{12} . Las subunidades α_s , que se caracterizan por estimular la adenilato ciclasa; las subunidades α_i descritas inicialmente por su capacidad de inhibir la misma enzima y actuar sobre canales iónicos y la fosfodiesterasa; las subunidades α_q , que activan la fosfodipasa C y finalmente las subunidades α_{12} , más recientemente identificadas, cuyas funciones parecen estar principalmente relacionadas con la regulación del citoesqueleto, movimiento celular, transformación celular, proliferación y tumorigénesis. Una característica en común de todas las proteínas G, es actuar como una enzima efectora que cambia la concentración de pequeñas moléculas de la célula.

Tanto la forma intacta como la forma disociada de la proteína G, se encuentra asociada a la cara interna de la membrana plasmática. Sin embargo, cada subunidad individual es hidrofílica, y no tiene dominio transmembranal. El dímero $\beta\gamma$ tiene una afinidad intrínseca por la membrana ya que la subunidad γ se prenila. Los tipos de subunidades α_i y α_o son miristoilados, esto explica su habilidad por permanecer asociados con la membrana luego de disociarse del dímero $\beta\gamma$. La subunidad α_s es palmitoilada (Neer, 1995).

2- Señalización mediada por receptores con actividad de quinasa de tirosina:

Los receptores pertenecientes a esta familia, a diferencia de los receptores acoplados a una proteína G, contienen una enzima con capacidad de fosforilar a otras proteínas en residuos de tirosina. La primera proteína con actividad de tirosina quinasa (TQ) fue descubierta en 1980 por Tony Hunter y Bartholomew Sefton, a partir del estudio y caracterización de una proteína oncogénica pertenecientes al virus de sarcoma Rous. Posteriormente Stanley Cohen descubrió que el receptor del EGF tenía una función de TQ, estableciendo que la fosforilación de proteínas en tirosina es parte de los mecanismos de señalización en respuesta a estímulos externos. Actualmente se conocen más de 50 receptores con actividad de TQ, incluyendo el receptor de insulina, PDGF, NGF, EGF, y muchos otros (Van der Geer, et al. 1994).

Todos los receptores pertenecientes a esta familia, contienen un dominio N-terminal

extracelular, con capacidad de unión a ligando, un α -helice transmembranal única, y un dominio C-terminal con actividad de TQ. La mayoría de los receptores están formados por una única cadena polipeptídica. La unión del ligando al receptor, activa su dominio quinasa citosólico, esto lleva a la fosforilación tanto del receptor como de ciertas proteínas celulares, propagando la señal inicial a partir de la unión del factor de crecimiento al receptor específico (Cadena, 1992) (figura 5).

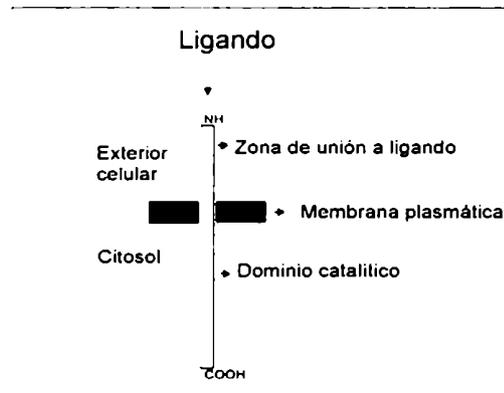


Figura 5: Estructura de un receptor tirosina quinasa.

El primer paso de señalización de la mayoría de estos receptores, requiere de la dimerización y autofosforilación de los mismos, inducida por ligando (Lemmon, et al. 1994). La unión del ligando al receptor, lleva a la activación del dominio de tirosina quinasa y subsecuentemente existe una interacción con el dominio intracelular del receptor adyacente (Schlessinger, 1993). La dimerización de los dominios extracelulares acarrea el cambio de conformación de los dominios citosólicos, que se colocan yuxtapuestos, cuya estabilización causa una relajación en la conformación, que origina la activación de la actividad quinasa. Se produce una autofosforilación del receptor, mediante la fosforilación de residuos de tirosina de una subunidad por parte de la otra subunidad.

Una vez que se ha producido la activación de la quinasa, se producen dos fenómenos importantes: por un lado la fosforilación de los propios receptores (autofosforilación) y por otro lado la fosforilación de numerosos sustratos.

El proceso de autofosforilación por lo general afecta a dos zonas: por un lado a un residuo de tirosina dentro del propio dominio catalítico, que provoca un aumento de la actividad quinasa, desencadenando la fosforilación de otros residuos de tirosina en el receptor y en sustratos. Por otro lado afecta a tirosinas fuera del dominio catalítico, lo que permite crear sitios de reconocimiento para moléculas señalizadoras que posean dominios de reconocimiento SH2 (zona de homología 2 con la tirosina quinasa Src) (Van der Geer, et al. 1994).

Se han descrito numerosas moléculas que contienen diferentes dominios SH2, los cuales muestran distinta afinidad por distintas agrupaciones de aminoácidos con fosfotirosina, lo que nos da una idea de la especificidad existente en esta interacción entre proteínas. Una cascada de señalización mejor conocida comienza tras la activación de los receptores, produciéndose el acercamiento a éstos de moléculas adaptadoras (mediado por sus dominios SH2), como la proteína Grb2, la cual se une a Sos. La proteína Sos es un intercambiador de GDP por GTP para la GTPasa denominada Ras.

Algunos factores de crecimiento, como PDGF y NGF, son dímeros formados por dos cadenas polipeptídicas idénticas, éstos factores de crecimiento inducen la dimerización al unir simultáneamente a dos receptores (Hammacher, et al. 1989). Otros factores de crecimientos, como el EGF, son monómeros pero tienen dos receptores distintos a los cuales se unen, induciendo la heterodimerización de los mismos (Earp, 1995).

El dominio SH2, de aproximadamente 100 aminoácidos, se pliega de tal modo que crean un bolsillo para 6-8 aminoácidos donde se encuentra la tirosina fosforilada a la que se unen, es decir son proteína que reconocen tanto al residuo de fosfotirosina del receptor, como a regiones cercanas en la cadena polipeptídica. Es por ello que la autofosforilación del receptor, crea sitios de unión para proteínas con dominio SH2 y las secuencias flanqueantes de la fosfotirosina son las que determinan la especificidad de la unión entre el receptor y las proteínas específicas (Kuriyane et al. 1999) (tabla 5).

Tabla 5: sustratos de la activación de los receptores tirosina quinasa.

Enzimas	Proteínas estructurales
Fosfolipasas (C,A,D)	Anexinas I y II
Quinasas de la familia Src	Claetrina
Quinasas de la familia Jak	Vinculina
Fosfatidil inositol 3' quinasa	Paxilina
Fosfatasa	Receptores de fibronectina
GTPasas (RasGAP)	Cadherinas
Adaptadores	Otras proteínas
Nck	STATs
Crk	
Grb2	
Shc	

3- Señalización mediada por receptores no asociados a proteínas quinasas de tirosinas:

Esta familia de receptores no contienen *per se* una quinasa de tirosina (TQ), sin embargo son capaces de activar una proteína TQ intracelular. La mayoría de las citoquinas, así como algunas hormonas polipeptídicas, tienen receptores pertenecientes a esta familia.

Dichos receptores contienen un dominio N-terminal extracelular que une al ligando, un dominio

C-terminal citosólico y una α -helice transmembranal. El dominio citosólico de los receptores no tienen actividad catalítica.

La dimerización del receptor inducida por ligando, lleva a la fosforilación cruzada de quinasas de proteínas asociadas al receptor. Posteriormente estas enzimas activadas, fosforilan al receptor, generando sitios de unión a proteínas que contienen dominios SH2. Por lo tanto, la combinación del receptor asociado a una quinasa de tirosina funciona de forma análoga al receptor con actividad de quinasa de tirosina, mencionado en la sección anterior.

Las quinasas asociadas a estos receptores pertenecen a dos familias. Una de ellas, esta formada por Src, y la otra pertenece a las quinasa Janus o JAK. Src fue originalmente identificada como una proteína oncogénica del virus de sarcoma Rous. La familia de las JAK, juega un rol crítico en la transmisión de señal, a partir de receptores de citoquinas, mientras que los miembros de la familia Src, juegan un rol en la señalización de receptores de antígenos de linfocitos T y B, pero no son requeridos para la señalización de la mayoría de las citoquinas.

Las quinasas de la familia Src son el prototipo de enzimas citosólicas, todas contienen un dominio catalítico en el extremo carboxilo-terminal, con dominios SH2 y SH3 (homología con Src). Los dominios SH3 son regiones de unos 50-60 aminoácidos que interaccionan con zonas ricas en prolina de otras proteínas, formando complejos supramoleculares.

4- Señalización mediada por receptores unidos a otras actividades enzimáticas:

Estos receptores incluyen fosfatasas de tirosinas, quinasas de serina/treonina y guanilil ciclasas. Las funciones de la mayoría de éstos receptores se conocen menos que las funciones de los receptores asociados a proteína G o los asociados a proteínas quinasa de tirosinas.

Los receptores con actividad de fosfatasas de tirosinas, remueven el grupo fosfato de residuos tirosinas. En muchos casos, estas proteínas juegan un rol negativo en la vía de señalización celular iniciada por fosforilaciones en tirosinas. Sin embargo, estos receptores tienen actividad fosfatasas de tirosina y pueden estar involucrados en el control positivo de la señalización celular, como por ejemplo, el receptor llamado CD45, que se expresa en la superficie de los linfocitos T y B. Luego de una estimulación antigénica, el CD45 se cree que desfosforila una fosfotirosina, que inhibe la actividad enzimática de miembros de la familia de Src. El CD45 actúa a través de la estimulación de quinasas de tirosina.

Los receptores del factor de crecimiento y transformación β (TGF β) son proteínas quinasas que fosforilan residuos de serina o treonina en proteínas sustratos.

Algunos ligandos unen receptores cuyo dominio citosólico tiene actividad de guanilil ciclasa, catalizando la formación de GMPc.

SEGUNDOS MENSAJEROS INTRACELULARES:

A partir de la unión de un mediador intercelular (ligando) a su receptor, se desencadena una cascada de mecanismos de señalización intracelular, que lleva a modificaciones en el patrón de la expresión génica y como consecuencia, modifica el comportamiento de la célula.

De acuerdo a lo ya señalado, la mayoría de los receptores asociados a ligandos son capaces, directa o indirectamente, de estimular a una enzima específica. Esta enzima funciona intracelularmente como propagadora y amplificadora de una señal inicial, desde la superficie de la célula hasta una variedad de blancos intracelulares. A este proceso se lo llama transducción de señales. Los blancos de estas vías de señalización, frecuentemente incluyen factores de transcripción que regulan la expresión de genes. Por lo tanto, las vías de señalización intracelular, conectan la superficie de la célula con el núcleo, produciendo cambios en la expresión génica en respuesta a un estímulo extracelular (Zuker et al., 1999).

La unión de la mayoría de los mediadores intercelulares a sus receptores, inicia una serie de reacciones intracelulares que regulan virtualmente todos los aspectos del comportamiento celular, incluyendo metabolismo, movimiento, proliferación y diferenciación. Comprender los mecanismos moleculares responsables de estas vías de señalización es un área importante de investigación (Dhanasekaran, 1998).

A continuación, se resume las distintas vías de señalización conocidas y relevantes para el entendimiento del trabajo.

AMP cíclico (AMPc):

Una de las vías de traducción de señales mejor comprendida, involucra al AMPc. Los componentes de la cascada de señalización, esto es, receptores, proteína G heterotrimérica, adenilato ciclasa y subunidades de quinasas, han sido clonados y caracterizados.

En las células de mamífero, el AMP cíclico (AMPc) se forma a partir del ATP, por acción de la acción de la adenilato ciclasa, y es degradado a AMP, por AMPc fosfodiesterasa. Una vez producido el AMPc, éste es capaz de unir y activar a una proteína llamada quinasa dependientes de AMPc (PKA).

La PKA, descubierta por Donal Walsh y Ed Krebs en 1968, es tetramérica y está compuesta por dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C). En su forma inactiva, la PKA se encuentra en forma de tetrámero. El AMPc es capaz de unirse a la subunidad regulatoria, causando la liberación de las subunidades catalíticas activadas, las cuales difunden del citoplasma hacia el núcleo, fosforilando proteínas específicas en residuos serina.

Existen tres isoformas de la subunidad C ($C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$) con propiedades tanto cinéticas como fisiológicas semejantes (Taylor, et al. 1990). Las diferentes subunidades R (RI; RII), tienen distinta afinidad de unión a AMPc y se localizan diferencialmente dentro de la célula.

En muchas células animales, los aumentos en los niveles de AMPc, activan la transcripción de genes que contienen una secuencia regulatoria llamada elementos de respuesta a AMPc (CRE). En particular, la señal se transmite del citoplasma hacia el núcleo, por la subunidad catalítica activada de la PKA. Dicha subunidad, dentro del núcleo, fosforila al factor de transcripción CREB (proteína que une CRE), llevando a la activación de genes inducibles por AMPc (Frank, et al. 1994).

La regulación de la expresión génica mediada por AMPc juega un rol importante en la proliferación y diferenciación de muchos tipos de células animales. Recientemente CREB ha sido involucrado además, en procesos de aprendizaje y memoria.

Fosfolípidos y calcio:

El fosfatidil inositol (PI) es el único fosfolípido de la membrana que puede ser fosforilado aún más. Una PI quinasa transfiere un grupo fosfato del ATP a la posición 4 del inositol dando PI 4-fosfato (PI4P). Posteriormente una PI4P quinasa agrega otro fosfato en la posición 5 para dar PI 4,5-bifosfato (PIP_2) (Fain, et al 1979).

El fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP_2) es un componente de la membrana plasmática, localizado en la cara interna de la bicapa lipídica (Divecha, et al. 1995). Una amplia variedad de hormonas y factores de crecimiento estimulan la hidrólisis de PIP_2 mediada por fosfolipasa C (PLC). Esta reacción genera dos tipos de segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5,-trifosfato (IP_3). El DAG y el IP_3 , estimulan a la PKC y posibilitan la movilización de calcio, respectivamente (Clapham, 1995.).

La hidrólisis de PIP_2 es activada por receptores acoplados a proteína G y por receptores con actividad de tirosina quinasa. Esto se debe a que una forma de fosfolipasa C ($PLC-\beta$) es estimulada por proteína G, mientras que una segunda forma $PLC-\gamma$, contiene dominios SH2 que median su asociación con un receptor de tirosina quinasa activado. Esta última interacción, lleva a la fosforilación en tirosina de $PLC-\gamma$ e incrementa su actividad catalítica.

El IP_3 , es una molécula polar, que estimula la liberación de calcio, a partir de los reservorios intracelulares. La concentración de calcio citosólica es extremadamente baja (aproximadamente 0,1-0,01 μ M). El IP_3 actúa liberando calcio desde el retículo endoplásmico, a través de la unión a receptores que están ligados a canales de calcio. Como resultado, los niveles de calcio citosólicos llegan aproximadamente a 1 μ M, afectando así la actividad de una variedad de

proteínas incluyendo quinasas y fosfatasa (Berridge, 1987; Mignery et al. 1990, Miyawaky et al. 1991).

El calcio es capaz de unir, y activar a una proteína llamada calmodulina. La calmodulina activada, une a una variedad de proteínas blanco incluyendo a miembros de la familia de CaM quinasa (Rasmussen, et al. 1989). Ésta fosforila a una gran variedad de proteínas diferentes, entre ellas, enzimas metabólicas, canales iónicos, y factores de transcripción. Uno de los factores transcripcionales que es fosforilado por CaM quinasa IV, es el CREB. Tanto la PKA como la CaM quinasa IV fosforilan a CREB en el mismo sitio.

Una vía alternativa involucra la entrada de calcio a partir de el medio extracelular, a través de los canales situados en la membrana plasmática. En un gran número de células, el aumento transiente de calcio intracelular resulta a partir de la producción de IP₃ seguido por un aumento sostenido de calcio a partir del medio extracelular. La entrada de calcio extracelular es importante en células eléctricamente excitables como las neuronas y las células musculares. En el caso de neuronas, los canales de calcio activados por voltaje en la membrana plasmática son abiertos por depolarización de la membrana.

Proteína quinasa dependiente de calcio y fosfolípidos (PKC)

La PKC fue descubierta en 1977 por Nishizuka. Es una enzima activada por receptores acoplados a fosfolipasa C, mediante el aumento transitorio de DAG.

En base a experimentos de purificación y clonado de PKC, se sabe que esta enzima pertenece a una multifamilia de quinasas en serina y treonina, regulada por lípidos, capaz de fosforilar a un gran número de proteínas celulares.

Los ésteres de forbol, se generan a partir de plantas, son promotores de tumores en varios tipos celulares. Son capaces de activar a la PKC, actuando como análogos del DAG. Estos resultados permitieron involucrar a la PKC en carcinogénesis y dieron herramientas para la manipulación de dicha proteína, tanto *in vitro* como en sistemas animales (Blumberg, 1988).

La PKC comprende al menos diez proteínas quinasas dependiente de fosfolípidos (Mellor, et al. 1998; Newton, 1995; Newton, 1997). Las distintas isozimas han sido agrupadas en tres subfamilias basándose en homología de secuencia y en sus propiedades bioquímicas. Las "clásicas" o "convencionales" (cPKCs) incluyen a la PKC α , β I, β II e γ . Estas isoformas pueden ser activadas por calcio y fosfolípidos. También unen DAG, que incrementa la afinidad de la enzima por los fosfolípidos y el Ca²⁺. Las cPKCs son también receptores de los ésteres de forbol. Las "nuevas" (nPKCs), incluyen a la PKC δ , ϵ , η y θ , pueden ser activadas por DAG o ésteres de forbol en presencia de fosfolípidos, sin embargo son independientes de calcio. Finalmente, las PKCs "atípicas", que incluye a la PKC ζ e ι (su homólogo en ratón ha sido llamada PKC λ), son

insensibles a calcio, a DAG y a ésteres de forbol.

Cada isozima de PKC, está formada por una única cadena polipeptídica, que contiene dos dominios estructuralmente bien definidos: un dominio regulatorio en el amino terminal de la cadena y un dominio catalítico en el carboxilo terminal de la proteína. La región regulatoria posee capacidad de unir a cofactores fosfolipídicos y a calcio. Además, participa en la interacción proteína-proteína, capaz de regular la actividad de la PKC, así como su localización. La región carboxilo terminal contiene un dominio involucrado en la unión a ATP y otro capaz de unir al sustrato. Los dominios regulatorio y catalítico, se encuentran conectados por una región bisagra, altamente sensible al clivaje proteolítico por proteasas celulares.

Las enzimas poseen regiones que son altamente conservadas entre las diferentes isozimas de PKC (región C1 a C4) y regiones que son variables (regiones V1 a V5). La región C1 está presente en todas las isozimas de PKC. Contiene un dominio autoinhibitorio o pseudosustrato, que se une al sitio de unión a sustrato, en el dominio catalítico y mantiene a la enzima en un estado inactivo, en ausencia de cofactores y activadores (Orr, et al. 1992). Además, la región C1 tiene un dominio rico en cisteína, capaz de unir al DAG y a ésteres de forbol, en las PKC de tipo cPKCs y nPKCs (Kazanietz, et al. 1995, Kazanietz, et al. 1995).

La regulación de la actividad de la PKC por cofactores lipídicos, ha sido estudiada utilizando micelas o bicapas lipídicas. Los fosfolípidos ácidos son eficientes cofactores de la activación de la PKC, con una selectividad por fosfatidilserina. Los fosfolípidos no solo son útiles como moléculas de anclaje mediante la unión a la PKC, por su dominio rico en cisteína, sino que el DAG causa un incremento dramático en la afinidad de la cPKCs y nPKCs por la fosfatidilserina (Newton, 1995; Newton, 1997). La activación de la PKC mediada por el DAG (o ésteres de forbol) en presencia del cofactor fosfolipídico, produce un cambio conformacional de la PKC, da como resultado, la remoción del pseudosustrato del sitio de unión, provocando la activación de la enzima. El dominio de pseudosustrato, una vez que se remueve del sitio de unión, puede contribuir a la unión de la PKC a la membrana plasmática a través de sus residuos básicos (Orr, et al. 1992; Orr, et al. 1992; Newton, 1993). Por lo tanto, la PKC una vez activada, se transloca desde el citosol hacia la membrana plasmática. Este proceso está controlado además, por interacciones entre proteínas.

El calcio incrementa la afinidad de la cPKC por los fosfolípidos aniónicos (Bazzi, et al. 1990). Se sabe que la concentración de calcio requerida para la unión de la PKC a la membrana plasmática es sustancialmente menor que aquella requerida para la activación de la enzima. El modelo alostérico propuesto indica que a bajas concentraciones de calcio, existe una interacción débil a la membrana plasmática, acompañada por cambios conformacionales que

no son suficientes para inducir la activación de la enzima. Altas concentraciones de calcio son necesarias para producir cambios conformacionales en la PKC, que resultan en la liberación del pseudosustrado al sitio de unión en el dominio catalítico, llevando a la activación de la enzima.

La PKC se autofosforila en residuos de serina/treonina y es transfosforilada en residuos de tirosina y/o serina/treonina por quinasas. La fosforilación de la PKC es un evento que regula la maduración de la enzima además de la activación o inactivación de la misma (Ron, et al 1999).

La PKC, además de la unión a lípidos, es capaz de interactuar con un gran número de proteínas. Un gran número de sustratos pueden ser fosforilados por las distintas isoenzimas de la PKC. Entre los numerosos sustratos se pueden mencionar receptores (EGF, muscarínicos, β -adrenérgico), proteínas del citoesqueleto (MARCKS o "Myristoylated Alanine-Rich C kinase Substrate", vinculina, tau), canales iónicos, portoncogenes (Raf), proteínas nucleares (lamina B, factores de transcripción), etc.

La PKC puede ser clivada por una proteasa dependiente de calcio llamada calpaina y por tripsina, originando dos fragmentos. El fragmento mayor, de aproximadamente 50KDa (dominio catalítico), retiene la capacidad de quinasa activada y el fragmento menor de 35-38 KDa (dominio regulatorio), conserva la capacidad de unión de ésteres de forbol (Lee, et al. 1986; Huang, et al. 1986). No está claro el papel fisiológico de la proteólisis de la PKC. Una posible explicación indica que la proteólisis sería un proceso para iniciar la degradación de la PKC. En numerosos trabajos se ha demostrado que en distintos tejidos y tipos celulares el forbol dibutirato (PDBu), que induce la activación persistente de la PKC, provoca la translocación de la enzima del citoplasma a la membrana plasmática y la subsiguiente eliminación de la misma. Este último fenómeno ha sido denominado retro modulación de la PKC (Blackshear, et al. 1985, 1986, Ballester, et al.1985).

Numerosos trabajos han demostrado la acción sinérgica de la activación de la PKC y el aumento de calcio citoplasmático para lograr una respuesta fisiológica. En la mayoría de ellos se utilizó el ionóforo de calcio llamado A23187 junto con DAG sintético o ésteres de forbol. Algunos ejemplos son: liberación de serotonina y enzimas lisosomales por plaquetas (Kaibuchi, et al. 1983), de histamina y enzimas lisosomales por mastocitos y neutrófilos respectivamente (Nishizuka, 1983), proliferación de linfocitos T (Kaibuchi, et al. 1983), activación de linfocitos bovinos con concanavalina A (Mastro, et al. 1983), etc.

El mecanismo de activación de la PKC por ésteres de forbol es similar al del DAG. De hecho, los ésteres de forbol interactúan con las isoenzimas de la PKC en el mismo sitio, ya que ambos activadores se unen a las regiones ricas en cisteína. Sin embargo, los ésteres de forbol son más potentes y metabólicamente más estables que el DAG, lo cual resulta en una

activación prolongada de la PKC en la célula. El éster de forbol más utilizado en el laboratorio es el PMA ("Phorbol 12 Myristate 13-Acetate"), también conocido como TPA ("Tetradecanoyl Phorbol Acetate"). El agregado de ésteres de forbol a células en cultivo produce la translocación de la PKC desde el citosol hacia la membrana y citoesqueleto. La estimulación de receptores que aumentan los niveles de DAG en la membrana también producen este fenómeno, pero dado que la vida media del DAG es muy corta, en este último caso el fenómeno de translocación es rápido y se revierte en segundos o fracciones de segundo. La PKC asociada a la membrana, al sufrir un cambio conformacional que la hace activa, también expone regiones que son altamente sensibles a la acción de proteasas intracelulares. Es por ello que cuando se exponen las células durante varias horas a los ésteres de forbol se produce la degradación de la PKC, con la consecuente caída en la actividad enzimática de PKC en la célula. Esto se conoce con el nombre de regulación negativa ("down regulation", en inglés). Este fenómeno puede ser aprovechado experimentalmente, ya que es posible eliminar prácticamente toda la actividad de PKC en la célula por la incubación prolongada con ésteres de forbol y así poder determinar si la PKC está implicada o no en una determinada función celular.

Recientemente se han aislado otras proteínas capaces de unir ésteres de forbol. Entre ellas está la familia de las quimerinas. Estas proteínas, pese a unir DAG y ésteres del forbol con afinidad similar a las isoenzimas de la PKC, no presentan actividad de quinasas sino actividad Rac-GAP, es decir, tienen la capacidad de acelerar la hidrólisis de GTP de proteínas G de bajo peso molecular de la familia Rac. También se ha aislado una proteína con actividad activadora del protooncógeno Ras que tiene la capacidad de unir ésteres de forbol (ras-GRP). En todos estos casos, estas proteínas poseen una región rica en cisteína que presenta alta homología con aquellas de las isoenzimas de la PKC y que es la responsable de la unión de los ésteres de forbol y el DAG.

MAPK

La cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) participa en diversos programas celulares, incluyendo diferenciación, movimiento celular, división celular y muerte celular programada. Esta cascada está conservada evolutivamente en eucariotas y tiene un rol clave en la regulación de la expresión génica, así como en diversas actividades citoplasmáticas (Robinson, et al. 1997).

Generalmente se las clasifica en: MAPK, MAPKK (son activadores de MAPK, también llamados MEK, MKK) y MAPKKK (son activadores de MAPKK, también llamados MEKK). Durante la evolución, muchos de estos componentes de quinasas han sido conservados desde las

levaduras hasta el hombre. Hasta la fecha, 12 miembros de proteínas quinasas MAPK han sido identificadas en células de mamífero, y pueden ser agrupadas en 5 subfamilias, en base a su homología de secuencia y su función. Siete de las MAPKK y 14 MAPKKK han sido identificadas funcionalmente en células de mamífero. Proteínas de bajo peso molecular que unen GTP (por ejemplo: Ras, Rac, Cdc42) y proteínas quinasas específicas, pueden ser consideradas como MAPKKKK, es decir, regulan la actividad de MAPKKK (Su, et al. 1996; Gutkind, 1998; Widmann, et al. 1999). La transmisión de la señal está dada por fosforilaciones secuenciales y subsiguientes activaciones de componentes específicos de una cascada (figura 6).

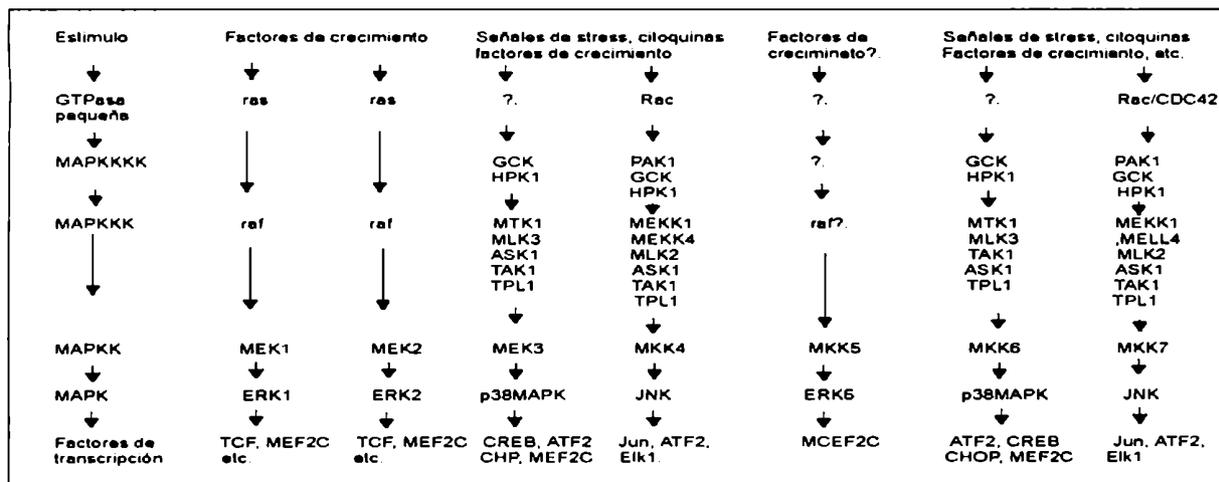


Figura 6: Vías de señalización de MAPK.
Fuente: *Dhanasekaran et al. 1998*

Esta cascada de quinasas puede ser activada tanto por receptores unidos a tirosinas quinasas, como por receptores unidos a proteína G (Howe, et al. 1993; Winitz, et al 1993).

Una característica de las MAPK es que para su activación total requieren de la fosforilación tanto de una treonina como de una tirosina (separadas en la proteína por un único aminoácido). Estas quinasas de proteínas que catalizan ambos tipos de fosforilaciones son las MAPKK. Estas últimas, son activadas por fosforilación en serina/treonina catalizado por la MAP-quinasa-quinasa (MAPKKK).

Al ser activada MAPK, fosforila a varias proteínas intercelulares, incluyendo otras quinasas y proteínas que regulan la expresión de genes.

Existen en mamíferos cinco tipos de cascadas de MAPK. Estas incluyen la cascada de quinasas reguladas por señales extracelulares de tipo 1 y 2 (ERK1/2), que preferencialmente regulan el crecimiento y la diferenciación celular, así como la cascada de p38^{MAPK} y quinasas del N-terminal de c-jun (JNK), que tienen un papel fundamental tanto en respuestas a estrés, como en procesos de inflamación o apoptosis (Robinson, et al. 1997; Ip, et al. 1998; Lewis, et al. 1998).

Una de las vías de señalización de MAPK mejor comprendidas es la que lleva a la activación de ERK1/ERK2^{MAPKs}, mediada por MEK (Seeger et al. 1995). La cascada se inicia a partir de un receptor con actividad de tirosina quinasa (RPTK) o bien un receptor acoplado a la proteína G. El mecanismo de activación mediado por un RPTK se inicia luego de la translocación del complejo SOS-Grb2 a la membrana plasmática, uniéndose a un sitio fosforilado en el RPTK o a un sustrato fosforilado por dicho receptor (Van der Geer et al. 1994). Esto lleva a la activación de Ras, ya que SOS-Grb2 induce un intercambio de GDP por GTP en la proteína Ras. Por lo tanto, Ras unido a GTP une al N-terminal de un miembro de la familia Raf, que es una MAPKKKs. Esto lleva a la fosforilación y subsecuente activación de Raf. Posteriormente Raf activa a unas quinasas llamadas MEK1/MEK2 (conocida como quinasa de quinasa de MAP). Finalmente, estas últimas MAPKK fosforilan y activan a ERK1/ERK2 (Seeger et al., 1995). Una fracción activada de ERK1/ERK2 es capaz de translocarse al núcleo y fosforilar factores de transcripción como el TCF/Elk1, o bien fosforilar a sustratos citoplasmáticos, como fosfolipasa A2, entre otros.

Ras:

Existen tres genes Ras que codifican para cuatro proteínas relacionadas de 21 kDa (H-ras, N-ras, K-ras4a y K-ras4b) (Barbacid, 1987). Las proteínas Ras se encuentran en un estado inactivo, unido a un GDP. Luego de ser estimuladas las células por una variedad de ligandos extracelulares, los factores de intercambio de nucleótidos de guanina de Ras (SOS/2 y RasGRF/CDC25) son activados para estimular el intercambio del GDP unido a Ras por GTP, llevando a la activación de la proteína Ras (Boguski, et al. 1993). El Ras activado es capaz, entre otros mecanismos, de activar la cascada de MAPK (Davis, 1993; Egan, et al. 1993; Marshall, 1995). Después de esto el GTP unido es hidrolizado a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de Ras y vuelve de esta forma a su estado inactivo. La reacción de hidrólisis del GTP, catalizada por Ras, es potenciada por las proteínas activadoras de la actividad GTPasa o GAP (Ras-GAP).

Mutaciones de las tres versiones de genes Ras, han sido encontrados en aproximadamente 30% de todos los cánceres humanos (Barbacid, 1987; Bos, 1989). Por lo tanto, Ras ha sido implicado en carcinogenesis.

Existe un gran número de factores de crecimiento (ej. EGF), hormonas (ej. insulina) citoquinas (ej. interleuquinas) y neurotransmisores (ej. carbacol), capaces de activar la proteína Ras (Satoh, et al. 1992). Se sabe que receptores serpentina acoplados a proteína G, receptores quinasas de tirosina y receptores que causan estimulación de una quinasa de tirosina no asociada a receptor, son capaces de activar a la proteína Ras.

Se sabe que el Ras requiere de modificaciones lipídicas y de una asociación con la membrana

plasmática para su completa actividad biológica. Las propiedades bioquímicas de las proteínas Ras, como se observó, incluyen unión, intercambio e hidrólisis de nucleótidos de guanina; para ello precisa que , después de sus síntesis en el citosol y de modificaciones posteriores a la traducción, se unan al lado interno de la membrana citoplásmica. La unión a la cara interna de la membrana plasmática se realiza por el aminoácido cisteína (posición 186) mediante un lípido isoprenoide, el radical farnesilo. Tras esta unión, que es catalizada por la enzima farnesil-transferasa, los tres aminoácidos carboxi terminales siguientes a este residuo son eliminados y la cisteína 186 carboximetilada. Estas modificaciones son absolutamente necesarias para la asociación a la membrana y funcionalidad de Ras (Maltese, 1990)

Debido a que la oncogenicidad de Ras está motivada por un aumento de los niveles de Ras-GTP, una posibilidad deseable sería disponer de fármacos capaces de disminuir dichos niveles, por ejemplo, los inhibidores de la formación de farnesilo, como la lovastatina, inhibe la acción de Ras en células y animales.

JAK/STAT

Las proteínas JAKs representan una familia de quinasa de tirosina solubles. Existen cuatro miembros de estas familias llamadas Tyk2, Jak1, Jak2 y Jak3, tienen un peso molecular entre 125-135KDa, contienen siete dominios conservados y una secuencia idéntica en un 35-45% (Ihle, 1994; Pellegrini, et al. 1997; Duhé, et al., 1998). Presentan dos dominios quinasa de tirosina en tandem (Johnson, et al. 1996). En general estas quinasas son catalíticamente inactivas en células quiescentes, pero se las encuentran asociadas al dominio citoplasmático del receptor (Pellegrini, et al 1997; Murakami, et al. 1991). La dimerización de dos receptores, luego de la activación por ligando, lleva a una fosforilación inter- o intra-molecular de dos moléculas de JAK, esta fosforilación, y subsecuente activación se da en residuos de tirosinas dentro del dominio de quinasa de JAK (Pellegrini, et al 1997; Duhé, et al 1998; Ihle, 1995). Se necesitan dos quinasas para la activación mutua, ya que existe una transfosforilación recíproca. Posteriormente, JAK quinasa fosforila a un residuo de tirosina en el receptor. Este receptor activado es ahora capaz de reclutar un miembro específico de la familia de STAT al complejo formado por receptor y JAK, a través de la interacción con el dominio SH2 de la STAT (Stahl, et al. 1995; Gerhartz, et al. 1996). Las proteínas STAT son subsecuentemente activadas (por fosforilación en tirosina) (Greenlund, et al, 1994; Heim et al. 1995), probablemente por las JAK quinasas, luego de lo cual son dimerizadas (heterodimerizadas u homodimerizadas), posibilitando así su translocación al núcleo y posterior unión al ADN (Shuai, et al. 1994; Zhang et al. 1995; Chen, et al. 1998; Becker et al. 1998). Cabe señalar que una característica única de ésta señalización mediada por STAT, es que la vía de traducción de

señales desde la superficie de la membrana hacia el núcleo está mediado por una única molécula, a diferencia de las cascadas de quinasas y adaptadores (figura 7).

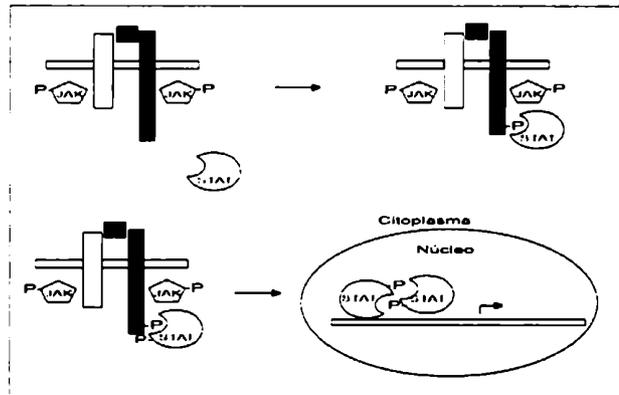


Figura 7: Transducción de señal mediada por JAK/STAT.

Como se observa en la tabla 6, existe una gran variedad de citoquinas y factores de crecimiento capaces de activar mecanismos de señalización dependientes de JAK/STAT.

Tabla 6: receptores capaces de activar JAK/STAT.

Proteína	Receptores activados	Proteína	Receptores activados
Tyk2	INF- α/β , IL-10 IL-6 IL-12	Stat1	INF- α/β , INF- γ , IL-10 IL-6, IL-11, OSM, LIF, CNTF G-CSF IL-2, IL-7, GH, PRL, G-CSF EGF, PDGF, CSF-1
Jak1	INF- α/β , INF- γ IL-6, IL-11, OSM, LIF, CNTF G-CSF IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 EGF, PDGF, CSF-1	Stat2	INF- α
Jak2	INF- γ IL-6, OSM, LIF, CNTF, leptin IL-12 IL-3, IL-5, GM-CSF EPO, GH, PRL, G-CSF EGF, PDGF, CSF-1	Stat3	INF- α , IL-10 IL-6, IL-11, OSM, LIF, CNTF, leptin IL-12 IL-2, IL-7, IL-9 GH, G-CSF EGF, PDGF
Jak3	IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15	Stat4	IL-12
		Stat5A/B	INF- α , IL-10 IL-2, IL-7, IL-9, IL-15 IL-3, IL-5, GM-CSF EPO, GH, PRL, G-CSF leptin
		Stat6	IL-4, IL-13 leptin

Abreviaturas: CNTF: factor neurotrófico ciliar, CSF-1: factor 1 estimulante de colonias, EGF, factor de crecimiento endodermal, EPO: eritropoyetina, G-CSF: factor estimulante de colonia granulocítica, GH: hormona de crecimiento, PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas, PRL, prolactina, GM-CSF, factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos, LIF, factor inhibitorio de leucemia, OSM, oncostatina M.

Fuente: Liu, 1998

RESUMEN DE LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN Y LA REGULACIÓN DE LA FASE G₁ A PARTIR DEL ESTUDIO DE CÉLULAS DE RATÓN SWISS 3T3:

Numerosos estudios destinados a la identificación de vías de transducción de señales inducidas por factores mitogénicos, han utilizado cultivos murinos Swiss 3T3 (Rozenfurt, 1986, 1991). Estas células cesan de progresar a lo largo del ciclo celular deteniéndose en la fase G₀/G₁, cuando el medio es depletado de factores que promueven el crecimiento. Sin embargo, pueden ser inducidas a reiniciar la síntesis de ADN y la división celular por la adición exógena de factores de crecimiento. Es por ello que se utilizan estos cultivos celulares como modelo para el estudio, tanto de mecanismos de señalización como de moléculas regulatorias del ciclo celular.

Análisis recientes en fibroblastos de ratón Swiss 3T3 y en fibroblastos diploides humanos, realizados con cámaras de vídeo en lapsos de tiempo, permitieron demostrar, a partir de células individuales arrestadas en G₀, que éstas transitan primeramente por una fase llamada G₁ post-mitosis (G₁-pm), luego de la cual, las células se tornan independientes tanto de los estímulos mitogénicos, como de los inhibidores de proteínas en bajas dosis. A esta última fase se la llama G₁ pre-fase S (G₁-ps). La transición entre G₁-pm, que es dependiente de factores mitogénicos, y la fase G₁-ps, que es independiente de estímulos externos, es lo que se denomina el punto de "commitment" (Zetterberg et al. 1995) (figura 8).

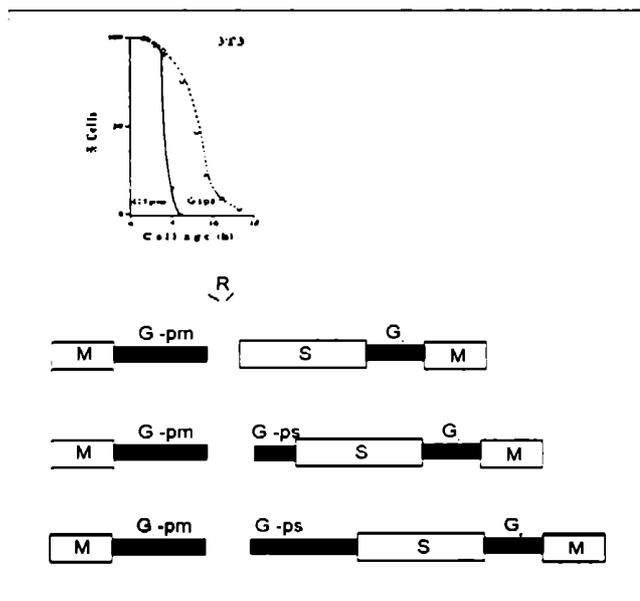


Figura 8. Panel superior: Distribución de G₁-pm y G₁-ps en células Swiss 3T3. Panel inferior: Modelo que muestra las longitudes variables de G₁-ps. Fuente: Zetterberg et al. 1995.

El tiempo desde que una célula transita de G_0 hasta el final de G_1 -pm, es de 8 horas. Este tiempo es constante para todas las células analizadas y es por ello que se considera que las mismas progresan a través de esta fase en forma sincrónica. Esto sugiere que otros procesos iniciados durante o inmediatamente luego de la mitosis anterior deberían estar involucrados para que se mantenga dicha sincronía (por ejemplo: reorganización del citoesqueleto o descondensación de cromatina). La longitud de G_1 -ps, en cambio, varía considerablemente. La asincronía observada en esta fase da cuenta de todas las variables que se tienen que dar para que cada célula inicie la fase S (ej.: acumulación de proteínas para incrementar el tamaño de la célula, activación e inhibición de moléculas regulatorias del ciclo celular que dictaminan el inicio de una nueva fase, etc.) (Zetterberg et al. 1995).

Jimenez de Asúa et al. (1975) demostraron que la $PGF_{2\alpha}$ posee actividad mitogénica en las células Swiss 3T3. Este efecto es específico para la $PGF_{2\alpha}$ ya que otras prostaglandinas con estructura semejante no lo inducen (Jimenez de Asua et al. 1983). La $PGF_{2\alpha}$, agregada a partir de 5 ng/ml, estimula la iniciación de la síntesis de ADN, produciendo un aumento en el índice de núcleos marcados, que llega a un plateau a 300 ng/ml. Estos resultados se correlacionan con el aumento en el número de células.

La estimulación de la síntesis de ADN, en células Swiss 3T3, inducida por la $PGF_{2\alpha}$ y otros mitógenos, presenta dos características: un período pre-replicativo o fase G_1 de 14-15 horas de duración, independiente de la concentración del mitógeno (Jimenez de Asua et al. 1977,1979; Otto, et al. 1981; Richmond et al. 1980) y posteriormente las células entran en la fase S, se observa en dicho período, un aumento en la tasa de reclutamiento, es decir, un aumento en la velocidad con que se incrementa el porcentaje de células que han comenzado a sintetizar ADN (velocidad de entrada en fase S) que depende de la concentración del mitógeno, dado que a mayor concentración del mitógeno, la pendiente de la velocidad de entrada es mayor (Jimenez de Asua et al. 1977,1979; Richmond et al. 1980; Otto, et al. 1981). La velocidad de entrada en la fase S sigue siempre una cinética de, aparentemente, primer orden que puede ser cuantificada por una constante K (Jimenez de Asua, 1977,1979). Por lo tanto, existe una fase que es independiente de la concentración de mitógeno, con una duración constante, y una fase, que es dependiente de la concentración de mitógeno y es variable en la velocidad de entrada.

Dependiendo en que momento se adicionen factores no mitogénicos e incluso factores que inhiban tanto la síntesis de DNA, como la síntesis de proteínas, pueden o no tener un efecto sobre el factor mitogénico en la progresión a través de G_1 y en la inducción de síntesis de ADN. Particularmente, la insulina, en concentraciones cercanas a las fisiológica (10^{-8} - 10^{-9} M), carece de actividad mitogénica *per se* pero potencia marcadamente el efecto mitogénico de la $PGF_{2\alpha}$

(Jimenez de Asua et al. 1983). Este fenómeno de sinergia se refleja en un aumento en la velocidad de entrada en fase S, sin alterar la duración de G_1 y ocurre cuando la hormona es agregada en cualquier momento de la fase G_1 (Jimenez de Asua, et al. 1977). De forma similar, la PGE1 que no posee actividad mitogénica, aumenta el efecto de la $PGF_{2\alpha}$ en cualquier momento de la fase G_1 (Otto, et al. 1982). Sin embargo, la hidrocortisona y la dexametasona inhiben la síntesis de ADN estimulada por $PGF_{2\alpha}$ en células Swiss 3T3. Este efecto se refleja en una disminución de la velocidad de entrada en la fase S y sólo se manifiesta cuando el glucocorticoide es agregado dentro de las primeras 8 hs de la fase G_1 (Jimenez de Asua, 1977).

Estos resultados llevaron a la conclusión que la $PGF_{2\alpha}$, así como otros factores de crecimiento, estimulan la mitogénesis activando al menos dos sistemas señalizantes independientes. La señal 1 induce una cascada de eventos que determina la progresión a través de la fase G_1 . La señal 2 controla la velocidad final de iniciación de la replicación del ADN. Por otro lado la señal 2 no necesariamente debe ser disparada al inicio del período pre-replicativo junto con la señal 1, ya que adiciones tardías de $PGF_{2\alpha}$ pueden aumentar la velocidad final de entrada en fase S (Jimenez de Asua et al. 1983; Otto, et al. 1985; Rozengurt, 1986).

Por lo tanto, debido a la diferencia en el patrón temporal de interacción entre $PGF_{2\alpha}$ y factores no mitogénicos como insulina o PGE1, así como también efectos inhibitorios como la hidrocortisona, se postuló que cada tipo de interacción afecta eventos regulatorios distintos en el camino que lleva a la síntesis de ADN. El hecho que existan tiempos determinados en G_1 para la interacción entre estos factores llevó a la conclusión que el período pre-replicativo está constituido por una secuencia de procesos que resultan en la síntesis de ADN y la mitosis.

La $PGF_{2\alpha}$, en las células Swiss 3T3, estimula el metabolismo de fosfatidilinositol, aumentando el contenido intracelular de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato, éste último induce la movilización de Ca^{2+} del retículo endoplásmico. Actuando en forma concertada el DAG y el Ca^{2+} activan la proteína quinasa C (PKC) (Corps, et al. 1989; Goin, et al. 1993). La activación de esta enzima es necesaria para que ocurran distintos eventos celulares. Se determinó que la PKC es capaz de inducir la fosforilación de una proteína de 80 kDa, denominada MARCKS, así como también la disminución en la afinidad del receptor de EGF, la inducción del transporte de glucosa y la mitogénesis (Jimenez de Asua, et al. 1997; Watanabe, et al. 1994). Estudios dirigidos a establecer el papel del AMPc en la mitogénesis estimulada por la $PGF_{2\alpha}$ revelaron la ausencia de variaciones en la concentración intracelular de este nucleósido cíclico tanto por el agregado de la $PGF_{2\alpha}$ como de insulina o ambos (Otto, et al. 1982).

El factor de crecimiento y transformación $\beta 1$ ($TGF\beta 1$) no es mitogénico en sí mismo, pero sí

amplifica la señal de inducción de síntesis de ADN, ejercida por prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF_{2\alpha}$) (Gomez de alzada, et al. 1994). Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la acción potenciadora del $TGF\beta1$ sobre la estimulación de la $PGF_{2\alpha}$, se ve a su vez aumentada mediante el agregado de insulina. Dicha estimulación ocurre preferencialmente a bajas concentraciones de $TGF\beta1$. Estos resultados llevaron a postular las diferencias existentes entre la acción del $TGF\beta1$ y la insulina, lo cual es contradictorio a lo propuesto por Brown y Holley (Brown et al. 1987; Corps, et al. 1989). El agregado de la prostaglandina E1 ($PGE1$) no potencia la estimulación de síntesis de ADN inducida por $PGF_{2\alpha}$ más $TGF\beta1$, en cambio la insulina sí es capaz de hacerlo. Esto sugiere que el $TGF\beta1$ y la $PGE1$ podrían estar disparando algunos eventos en común. La acción del $TGF\beta1$ no involucra síntesis de $PGE1$, ya que la indometacina, que bloquea la formación de $PGE1$, no disminuye la acción potenciadora del $TGF\beta1$. (Tashjian, et al. 1985; Diaz, et al. 1989). Estos resultados sugieren que la insulina, el $TGF\beta1$ y la $PGE1$, amplifican la acción de la $PGF_{2\alpha}$ disparando diferentes eventos.

En células Swiss 3T3, la $PGF_{2\alpha}$, es capaz de estimular la actividad de las tirosinas quinasas (TK), durante la inducción de la síntesis de ADN. Los procesos de señalización del $TGF\beta1$ difieren de los disparados por la $PGF_{2\alpha}$, ya que éste no estimula el metabolismo de los fosfatidil inositoles; tampoco aumenta el flujo del Calcio (Brown et al. 1987). Sin embargo el $TGF\beta1$ despliega una acción concertada con algunos eventos dependientes de la $PGF_{2\alpha}$. Por ejemplo, el 1-oleil-2-acetil-glicerol (OAG, un análogo del DAG) puede causar la activación de la PKC y TK, sin que estimule la síntesis de ADN, pero agregado junto con el $TGF\beta1$, sí puede estimular ésta última. Esta inducción se ve potenciada por la insulina y no por la $PGE1$, a pesar que las dos últimas juntas tienen efecto mitogénico en presencia de OAG.

El Factor inhibitorio de leucemia (LIF) es capaz de inducir síntesis de ADN en células confluentes y arrestadas Swiss 3T3, en un rango de concentración que va de 5-50ng/ml. El efecto mitogénico del LIF se ve potenciado por acción tanto de la insulina como de la prostaglandina E1 ($PGE1$). Además, el LIF no activa a la proteína quinasa C (PKC), debido a que células pretratadas con ésteres de forbol por tiempos prolongados para inhibir a la PKC, son inducidas a iniciar la síntesis de ADN estimuladas con el LIF. Por otro lado, el $TGF\beta1$ no es capaz de potenciar la respuesta proliferativa del LIF. Tanto el LIF como la $PGF_{2\alpha}$ inducen síntesis de ADN, sin embargo actúan aparentemente, mediante mecanismos de señalización diferentes, ya que, a diferencia del LIF, la $PGF_{2\alpha}$ es capaz de iniciar la síntesis de ADN

únicamente en células que contengan PKC, además el TGF β 1 sinergiza la acción mitogénica de la PGF $_{2\alpha}$, no así la del LIF. Por último, el LIF y la PGF $_{2\alpha}$ tienen efectos sinérgicos en la inducción de la síntesis de ADN.

REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

El ciclo celular en células somáticas, consta de cuatro procesos altamente coordinados: el crecimiento celular, la replicación del ADN, la distribución de los cromosomas duplicados hacia las células hijas y la división celular. La progresión entre las distintas fases del ciclo celular está controlada por un aparato regulatorio conservado entre las distintas especies, que no solo coordina los diferentes eventos del ciclo celular sino que también une al ciclo celular con señales extracelulares que controlan la proliferación de las células. Durante la primera fase del ciclo celular, llamada fase G $_1$, la célula se prepara para la síntesis de ADN, para ello se transcriben y sintetizan componentes necesarios para la replicación del ADN. Se observa en dicho estadio un continuo crecimiento celular. Luego de completar la fase G $_1$, la célula inicia la fase S (síntesis), durante la cual tiene lugar la replicación del ADN. Una vez finalizada dicha fase, se inicia la fase G $_2$ (gap), en la cual, la célula continúa creciendo y se comienzan a sintetizar proteínas requeridas para la mitosis. Por último, la fase M del ciclo celular corresponde a la mitosis, en la cual tiene lugar la separación de los cromosomas hijos y posterior división nuclear. Finalmente, la célula se divide (a éste paso se lo llama citoquinesis) dando origen a dos células hijas con igual contenido genético.

Los mecanismos moleculares que controlan el ciclo celular están formados esencialmente por dos familias de proteínas conservadas en todos los eucariotas. Los reguladores positivos del ciclo celular están constituidos por un grupo de proteínas llamadas ciclinas (Sherr, 1993; Yang, et al. 1999; Sherr, 1995; Roberts, 1999). Estas proteínas son subunidades reguladoras positivas de una clase de quinasas de proteínas en serina y treonina, llamadas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Nurse, 1990; Pines, et al. 1991; Lew, et al. 1996; Sherr, 1993). El genoma de mamífero codifica al menos diez ciclinas diferentes (3 ciclinas D, 2 ciclinas E, ciclina A, ciclina B, ciclina C, ciclina F, ciclina H) y siete CDKs (cdc2, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7), que pueden asociarse entre sí en al menos quince formas diferentes, formando complejos ciclina-CDK. Diferentes complejos ciclina-CDK controlan a la célula a través de las distintas fases del ciclo celular fosforilando proteínas específicas en residuos serina/treonina, y prolina. Las CDKs deben unirse a las ciclinas para ser activas. En general las CDKs están presentes constantemente, en cambio, los genes de ciclinas, se transcriben de forma dependiente del ciclo celular y algunas

ciclinas son degradadas en un determinado punto del ciclo celular. Por último existe una tercera molécula reguladora positiva que se denomina quinasa activadora de CDK (CAK) formada por una ciclina llamada H y una CDK específica llamada CDK7. Este complejo fosforila en un residuo de treonina a algunos complejos de ciclina-CDK, regulando de forma positiva su actividad. Además CAK forma parte de la maquinaria transcripcional y de reparación del ADN (Sclafani, 1996; Draetta, 1997). La amplia variedad de caminos para los cuales la actividad de las distintas CDKs pueden ser reguladas, posibilita que el ciclo celular responda tanto a una gran variedad de factores externos de división (positivos o negativos) como a señales internas generadas por eventos previos en el ciclo celular.

Casi todas las CDKs se encuentran presentes de forma constante, y en exceso comparado con las ciclinas a lo largo del ciclo celular. Esto significa que la actividad de CDK puede ser regulada en función de la cantidad de ciclina presente. Para que cada una de las ciclinas con su correspondiente CDK se encuentren activadas en un determinado momento del ciclo celular, se requiere de múltiples mecanismos involucrados en la regulación de la actividad de los complejos ciclina-CDK. Estos mecanismos incluyen: síntesis y destrucción de ciclinas, fosforilación y desfosforilación de CDK, asociación de estos complejos con CDKI, controles en la localización subcelular.

Los reguladores negativos del ciclo celular están constituido por una familia de proteínas llamadas inhibidores de quinasa dependiente de ciclina (CDKIs) que son reguladores negativos de la actividad del complejo formado por ciclina-CDK o bien inhibidores de CDKs. Los CDKIs pueden ser subdivididos en dos categorías. El primer grupo (llamado Cip/Kip) actúa uniéndose a una gran cantidad de complejos que están formados por ciclina y CDK. Mientras que el segundo grupo de CDKIs (llamado Ink4) inhibe la actividad de CDK4 y CDK6 específicamente. El grupo de CDKI Cip/Kip está formado por p21 (también llamado waf1, sdi1, o CAP20), p27 y p57 mientras que el grupo de CDKI Ink4 comprende a p16, p15, p18 y p19. En particular los inhibidores de los complejos formados por ciclina/CDK de la fase G₁ están involucrados en el arresto en esta fase de células en respuesta a señales anti-proliferativas. Este arresto de células, posibilita la entrada a procesos como quiescencia, diferenciación terminal, senescencia celular o la reparación de daños del ADN (Funk et al. 1998; Sherr, et al. 1999).

Por último, existe una segunda familia de inhibidores negativos del ciclo celular, constituido por proteínas de la familia de retinoblastoma, que incluye el producto del gen susceptible a retinoblastoma (Rb) y proteínas relacionadas funcionalmente y estructuralmente, llamadas p130 y p107 (Graña, et al. 1998). Estas proteínas unen e inhiben factores transcripcionales

(pertenecientes a la familia E2F), estos últimos son requeridos para la inducción de genes que codifican proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular y para la replicación del ADN, así como también enzimas involucradas en la síntesis de deoxiribonucleosidos trifosfatos. Los complejos formados por ciclina-CDK son capaces de fosforilar a la proteína Rb produciendo su inactivación, es decir permitiendo que los factores de transcripción asociados al Rb sean liberados y puedan de esta manera, ser activos.

En resumen, la regulación molecular del ciclo celular, que mantiene el balance homeostático entre el crecimiento, diferenciación, sobrevivencia y muerte celular, está determinado por dos grandes grupos de moléculas estimuladoras del ciclo celular (ciclina, CDKs, CAK) y moléculas inhibitorias del ciclo celular (RB, CDKIs) (Blagosklonny 1999).

La proliferación de células normales está controlada por múltiples mecanismos que actúan conjuntamente en la regulación del ciclo celular. Las células responden a una variedad de señales extracelulares, incluyendo factores de crecimiento, antagonistas mitogénicos, y factores que inducen la diferenciación celular. Estos factores dictan distintos comportamientos celulares, incluyendo la decisión de crecer, diferenciarse o predeterminarse a morir. Cuando las células emergen de un estado de quiescencia (fase G_0) y entran en la primera fase del ciclo (fase G_1), se induce la expresión de ciclina D y posteriormente la de ciclina E. Al comienzo de la síntesis del ADN (fase S) se observa expresión de ciclina A. Posteriormente se induce la expresión de ciclina B durante el intervalo entre la fase S y la mitosis, llamada fase G_2 , seguida de una rápida degradación al finalizar la mitosis (fase M) (Booher, et al. 1989; Draetta, et al. 1989; Moreno, et al. 1989). Las quinasas activadas por ciclina (CDK), en células de mamífero, tienen un rol definido en cada fase del ciclo. Las CDK4 y CDK6 están involucradas en la progresión de la fase G_1 . La CDK2 se requiere tanto para la transición G_1/S como para la fase S. La cdc2 está implicada en la fase M. La CDK7 aparentemente tiene un rol dual, actúa como quinasa activadora de CDK (CAK) y es un integrante del factor de transcripción TFIIH (el TFIIH forma parte de la maquinaria de transcripción basal y también se requiere para la reparación del ADN). Por lo tanto, las primeras ciclina que se inducen a partir de células quiescentes, luego de un estímulo mitogénico, son las ciclina D. Estas se asocian con CDK4 y CDK6. Posteriormente, se sintetiza la ciclina E al final de la fase G_1 y forma un complejo con CDK2. Se cree que actúa como un factor limitante en la transición G_1/S y durante la iniciación de la fase S. La expresión de ciclina A es inducida inmediatamente posterior a la ciclina E. La ciclina A se asocia tanto con CDK2 como con CDC2, éstos complejos aparentan tener un rol en las fases S y G_2 del ciclo celular. La síntesis y

destrucción de ciclina B oscila posterior a la ciclina A. El complejo formado por ciclina B-CDC2 se cree que es importante para promover la entrada a la fase M.

Han sido identificadas otras ciclinas, sin embargo el rol que cumplen en el control del ciclo celular, no se conoce aun. La ciclina F fue aislada en virtud de su habilidad para suprimir mutantes de *cdc4* en *Saccharomyces cerevisiae*. Su abundancia se encuentra alterada durante el ciclo celular y tiene un pico de expresión durante la fase G₂ (Kraus, et al. 1994; Cenciarelli, et al. 1999). La ciclina G se sugiere que es un blanco transcripcional de p53, y que tal vez esté involucrado en la reparación o replicación del ADN (Greener, et al. 2000). Ciclina I ha sido recientemente clonada, sin embargo no se conoce su función. La ciclina C se expresa durante la fase G₁ del ciclo celular (Liu, et al 1998).

Fase G₀/G₁ del ciclo celular:

La fase G₁ del ciclo celular es un período durante el cual la célula se prepara para la fase S, caracterizada por la síntesis de ADN, histonas y algunas enzimas. La mayoría de las células pos-embionarias requieren muchas horas para atravesar una serie de subfases de G₁, comenzando a partir de G₀ o de un ciclo previo. Las células pos-embriónicas normalmente cesan su proliferación en la fase G₁ o entran en un estado de quiescencia llamado fase G₀ luego de ser depletadas de suero, factores de crecimiento, nutrientes o por contacto con otras células. La habilidad de arrestarse en la fase G₀, en respuesta a cambios ambientales, refleja un mecanismo de regulación, que opera estrictamente en células no transformadas, pero es defectivo en células transformadas (Ver cáncer y ciclo celular). En las células embriónicas y en algunas células en cultivo, particularmente las transformadas, el período G₁ tiene una duración muy corta (Prescott, 1987). Existen dos hipótesis que explican este fenómeno, por un lado se sugiere que la fase G₁ no existía en estos sistemas. Por otro lado, se sugiere que las fases funcionales del ciclo celular se superponen (Cross et al. 1989). Los procesos de la fase G₁ requeridos para el inicio de la fase S pueden comenzar durante el ciclo anterior, al mismo tiempo que otros, como la síntesis de ADN o la preparación para la mitosis (Pardee, 1989). Por lo tanto, el intervalo G₁ observado entre M y S depende de cuanto progreso se ha efectuado en el ciclo anterior.

Las células en el estadio G₀ difieren de las que están en la fase G₁ en muchas propiedades (Cross et al. 1989). Las células en G₀ disminuyen su tamaño porque sus proteínas y ARNs son degradados y no se resintetizan rápidamente. En la fase G₀ las actividades enzimáticas y de transporte a través de la membrana están disminuidas y los ribosomas están en su mayoría

como monosomas (Cross et al. 1989). Cuando las células de mamífero se tornan quiescentes aparecen algunos ARNs y proteínas nuevos (Schneider. 1988; Verma et al.. 1988). La diferencia entre G_0 y G_1 es fundamental en la proliferación celular debido a que la velocidad de aumento de una población celular es dependiente de la fracción de células que entran en ciclo comparadas con aquella que están en G_0 (Pardee, 1989).

La progresión desde G_0 a la fase S difiere sustancialmente de la transición G_1/S que se lleva a cabo en células que inician un nuevo ciclo, luego de la mitosis, sin entrar previamente en G_0 . Esta conclusión se basa no sólo en el hecho que las células que están en G_0 requieren más tiempo para llegar a S, sino también en las diferencias dramáticas que existen en la expresión genética en las células que pasan a través de G_1 comparadas con las células estimuladas en G_0 (Almendral et al. 1988; Pardee, 1989; Bravo 1990). Se ha establecido que muchos genes que son inducidos en células estimuladas por mitógenos o reprimidos en las quiescentes, tales como c-myc y c-fos no son regulados durante la progresión en el ciclo celular en células que proliferan asincrónicamente (Hann, et al. 1985; Bravo et al. 1986). Por lo tanto es muy importante distinguir entre la progresión G_0/S y la transición G_1/S .

Una de las características fundamentales que poseen las células de mamífero estimuladas por mitógenos, es la de adquirir la propiedad de estar determinadas a dividirse luego de un cierto tiempo de exposición al mitógeno. Pardee demostró que el crecimiento de las células, dependía de la presencia de mitógenos, en el medio de cultivo. Sin embargo, observó que esta dependencia únicamente operaba durante un tiempo discreto al comienzo de la fase G_1 y finalizaba algunas horas antes del comienzo de la transición G_1/S . Esta propiedad fue denominada por Pardee como punto de restricción R o punto de compromiso (en inglés "commitment"). La misma, confiere a las células, la habilidad de memorizar un programa de órdenes impartidas por el mitógeno que permite iniciar la síntesis de ADN, y consecuentemente la división de la célula. Por lo tanto, la regulación de estos procesos, provee un complejo y eficiente mecanismo para la coordinación de los distintos eventos del ciclo celular.

Además, probablemente, el punto de "commitment", es el momento a partir del cual la célula es capaz de iniciar procesos de diferenciación o procesos de senescencia.

Pardee observó además, que el agregado de concentraciones bajas de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, era capaz de bloquear la progresión a lo largo de G_1 , si se agregaba dicho inhibidor antes del punto de "commitment", pero la cicloheximida no tenía efecto si se adicionaba en tiempos posteriores. Estos experimentos sugirieron que para alcanzar el

punto de "commitment" se requería la acumulación de moléculas lábiles, cuyos niveles eran especialmente sensibles a los inhibidores de la biosíntesis de proteínas. En la actualidad, se postula que la mayoría de esas proteínas, están representadas por las ciclinas D.

La ciclinas D se expresan durante la fase G₁ y se localizan en el núcleo de la célula. La síntesis de dichas proteínas está controlada por señales extracelulares. Los distintos tipos de ciclinas D (D1, D2, D3) difieren en la distribución de los tejidos y en la periodicidad de expresión, sin embargo, no se conocen diferencias funcionales entre las ciclinas D (Ando et al., 1993; Kato et al., 1993). Las ciclinas D son capaces de asociarse con las quinasas dependientes de ciclinas de tipo 4 y 6 (CDK4 y CDK6). Se conocen dos funciones de estos complejos de ciclinaD-CDK4/6 durante la fase G₁ del ciclo celular, por un lado son capaces de fosforilar e inactivar a la proteína Rb, y por otro lado son capaces de unir y secuestrar a los CDKI pertenecientes a la familia Kip/Cip (particularmente p27) (Sherr, 1996), necesario para la activación de ciclina E.

La ciclina D1 es producto de un proto-oncogen llamado Bcl-1/PRAD1, cuya sobre-expresión causada por amplificación o estabilización del ARNm ha sido correlacionada con varios tipos de cáncer humanos (Motokura, et al. 1991; Rosenberg, et al. 1991; Lammie, et al. 1991; Jiang, et al. 1992; Erikson et al. 1984; Tsujimoto, et al. 1985; Koduru, et al. 1989). La expresión de ciclinas D (particularmente ciclina D1 y D2) es rápidamente inducida luego del agregado de mitógeno, sus niveles declinan cuando el mitógeno es removido o cuando se adicionan factores inhibitorios del crecimiento. Es por este motivo que se considera que las ciclinas D funcionan como nexo entre el ambiente extracelular y la maquinaria que controla el ciclo celular. La microinyección de anticuerpos anti-ciclina D1, o la utilización de un vector anti-sentido de ciclina D1 en la fase G₁, inhibe la entrada en fase S en fibroblastos, mientras que la microinyección en la transición G₁/S, o en tiempos posteriores, no produce ningún efecto. Por lo tanto, la expresión de ciclina D1 durante la fase G₁ es crucial para la progresión a través del ciclo celular.

Alteración de la biogénesis normal de proteínas y la resultante acumulación de proteínas incompletamente plegadas en el retículo endoplásmico dispara una respuesta al estrés que regula positivamente la expresión de chaperonas ER, mientras se reprime coordinadamente la síntesis general de proteínas y se produce el arresto celular. La activación de esta respuesta con tunicamicina, según la observación de Brewer y colaboradores (Brewer et al. 1999), condujo a la disminución en la actividad de quinasas dependientes de ciclina D y ciclina E, y el arresto en la fase G₁, en fibroblastos de ratón NIH3T3. La síntesis de proteína ciclina D1 se inhibió rápidamente por el tratamiento con tunicamicina. Los niveles de ARNm de ciclina D1 no fueron afectados significativamente sino hasta mucho después del tratamiento. Pero ya antes Jiménez

de Asúa y colaboradores observaron que la tunicamicina (Estevez et al. 1997), un inhibidor de la N-glicosilación de proteínas unidas a asparagina, bloquearon la iniciación de la síntesis de ADN en células Swiss 3T3 estimuladas con Prostaglandina F2 α sola o con insulina. Dicho efecto fue observado únicamente cuando se adiciona tunicamicina de 0 a 8hs. luego de la estimulación mitogénica. Estos resultados sugieren que la síntesis de N-glicoproteínas durante la fase temprana de G1 es un evento importante en el control de la mitogénesis estimulada pro la Prostaglandina F2 α .

Fase G₀/G₁ del ciclo celular en células Swiss 3T3:

Las células de ratón suizo 3T3 (Swiss 3T3) son un modelo ideal para identificar las señales y los mecanismos que controlan la proliferación celular (Todaro et al. 1963). Estas células se arrestan en la fase G₀/G₁ del ciclo celular cuando están confluentes o cuando el medio de cultivo está privado de mitógenos presentes en el suero (Otto et al. 1985; Rozengurt, 1986). Pero pueden ser inducidos a reiniciar la síntesis de ADN y la división de las células, mediante la adición exógena de factores de crecimiento o citoquinas. Dichos mediadores intercelulares pueden ser: la prostaglandina F2 α (PGF_{2 α}) (Jimenez de Asua et al. 1975; O'Farrel et al. 1979), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Carpenter, et al. 1979; Otto et al. 1981), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (Holly, et al. 1974; Richmond et al. 1980), la vasopresina (Rozengurt et al. 1979), la bombesina (Rozengurt, et. al. 1983), el factor inhibitorio de leucemia (LIF) (shere levi et al.) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Lopez-Rivas et al. 1984).

En términos generales, los mitógenos estimulan dos fenómenos básicos:

a) La progresión a través de la fase G₁, que está constituida por una serie de eventos organizados y relacionados temporalmente. Dicha fase en células Swiss 3T3 dura aproximadamente 14 horas (Jimenez de Asua et al. 1979, 1977; Otto et al. 1981; Richmond et al. 1980).

b) La síntesis de ADN, que comienza, para cada mitógeno, con una velocidad característica y se desarrolla en forma asincrónica en la población celular (Jimenez de Asua et al. 1977, 1979; Richmond et al. 1980; Otto et al. 1981). Las otras fases, G₂ y M que ocurren en forma subsecuente, son relativamente independientes del control mitogénico (Neufeld, et al. 1998).

Cáncer y ciclo celular:

La proliferación de células normales está controlada por múltiples vías regulatorias, que acabamos de desarrollar, actúan conjuntamente durante el ciclo celular. Para evadir este control, las células tumorales adquieren una gran cantidad de cambios, antes de disparar un

fenotipo transformante.

Las células normalmente responden a una variedad de señales extracelulares, incluyendo factores de crecimiento, antagonistas mitogénicos, y factores de inducción de diferenciación. Estos dictan distintos comportamientos celulares, incluyendo la decisión de crecer, diferenciarse o predeterminarse a morir por apoptosis. Las células cancerígenas ignoran muchas de estas señales regulatorias debido a mutaciones en genes que controlan vías que tienen que ver con la progresión del ciclo celular (proto-oncogenes), o genes que controlan vías inhibitorias (genes supresores de tumor) (Hartwell, et al. 1994; Hunter, 1993).

Las células cancerosas proliferan en forma descontrolada. Las diferencias más significativas entre las células cancerosas y las células normales son: incremento en la invasividad, disminución en la sensibilidad ante drogas, pérdida de diferenciación, menor requerimiento por factores de crecimiento externos y carencia de inhibición por contacto. En algunos casos, las células cancerosas producen factores de crecimiento que estimulan su propia proliferación. En otros casos, el menor requerimiento de factores de crecimiento se debe a que existen anomalías en el sistema de señalización intracelular, por ejemplo ciertos receptores u otras proteínas se encuentran activados independiente de los estímulos externos.

Las células cancerosas tienen menos adherencia que las células normales, frecuentemente como resultado de la expresión reducida de moléculas de adhesión en la superficie celular. Esto produce una mayor capacidad para abandonar el tejido de origen y como consecuencia, invadir otros tejidos (metástasis). Generalmente, estas células son capaces de secretar proteasas que digieren los componentes de la matriz extracelular y permiten la invasión a tejidos normales adyacentes. Además, secretan factores de crecimiento que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis).

Otra característica de la mayoría de las células cancerosas es que están alteradas sus mecanismos de diferenciación. Este defecto está relacionado con la proliferación anormal, ya que células totalmente diferenciadas cesan de dividirse o se dividen únicamente ante estímulos externos.

La acumulación de numerosas mutaciones en genes claves del control de la división producen perturbaciones que desregulan en forma definitiva la proliferación celular. En algunos casos, las mutaciones promueven un mayor crecimiento selectivo de las células afectadas, llevando a una excesiva e inapropiada división. Cuando esto ocurre en un organismo multicelular, la división descontrolada puede dar origen a un gran número de enfermedades, siendo la enfermedad más devastadora el cáncer. En los últimos diez años han existido numerosos ejemplos que directamente conectan el control del ciclo celular con mutaciones que producen distintas formas

de cáncer.

Recientemente se han asociado alteraciones genéticas capaces de promover la proliferación celular descontrolada, con moléculas que controlan el ciclo celular, incluyendo tanto componentes de la maquinaria que regula el ciclo, como mecanismos de traducción de señales (esto incluye receptores, factores de crecimiento, segundos mensajeros, y factores de transcripción) (Sherr, 1996).

En células de mamífero, las mayores decisiones que afectan la progresión del ciclo celular son tomadas durante la fase G₁. Tanto el desarrollo, la diferenciación, como la apoptosis, dependen primariamente de señales que se dictan durante la fase G₁. Es durante este período en que la mayoría de las mutaciones en genes claves se asocian a tumorigenesis (Hunter, et al. 1996, Hall, et al. 1996).

La ciclina D1 humana (originalmente llamada PRAD-1) fue aislada en tumores paratiroides, a partir de rearrreglos de genes con la hormona paratiroide (Motokura, et al. 1991; Rosenberg, et al. 1991). En adenomas paratiroides, obtenidos de distintas fuentes, se observaron inversiones cromosomales. La región regulatoria 5' del gen de la hormona paratiroide, está translocada a la región codificante de la ciclina D1, esta translocación se asocia con una sobreexpresión aberrante de ciclina D1, implicando a este fenómeno como un importante paso en la formación de estas lesiones. La sobreexpresión de ciclina D1 también se encuentra en neoplasias no paratiroides como cáncer de mama, carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (Lammie, et al. 1991). Estudios de 20 tumores escamosos esofágicos humanos, mostraron que el 25% de ellos muestran amplificación de ciclina D1 (Jiang, et al. 1992). En linfomas de células B existe una sobreexpresión de ciclina D1, en linfomas centrocíticos, el extremo 3' no codificante del ARNm de ciclina D1 está deletado. La región 3' no codificante se supone que es importante para la estabilidad del ARNm. Se observa un aumento en los niveles de la ciclina D1, tanto de ARNm como de su proteína (Rosenberg, et al. 1991)

La expresión de dicha ciclina en forma inapropiada, aberrante o excesiva, conduce a la patogenicidad de células epiteliales, linfoides y hematopoyéticas entre otras. Particularmente, en un 15% de cánceres de mamas, un tercio de los cánceres esofágicos, así como en los cánceres de pulmón y vejiga, se encuentra una amplificación en el locus de ciclina D₁.

OBJETIVOS

Cuando un mitógeno interactúa con su receptor específico en una célula, se generan señales que conforman mecanismos de señalización intracelulares. Estos eventos tempranos son seguidos por alteraciones en moléculas regulatorias del ciclo celular, temporalmente organizadas, que conducen finalmente a la división celular.

La inducción y expresión de proteínas que regulan el ciclo celular, está dada por mecanismos de señalización estimulados por mitógenos. En términos generales, la regulación de estas proteínas está sujeta a mecanismos precisos y de alta complejidad.

Resultados previos de este laboratorio han dilucidado algunos de los mecanismos de señalización involucrados en la respuesta mitogénica de la $PGF_{2\alpha}$ en fibroblastos de ratón Swiss 3T3 (Jimenez de Asua, et al. 1997; Goin et al. 1992, 1993). Estas células pueden ser cultivadas en condiciones experimentales bien definidas y aquietadas en la fase G_0 del ciclo celular. Por lo tanto, constituyen un modelo excelente para el estudio de los mecanismos de control de la proliferación celular.

El objetivo general de esta tesis es estudiar el papel que cumplen factores mitogénicos, así como citoquinas en la regulación del ciclo celular.

Este trabajo está centrado en: dilucidar los mecanismos de señalización que modulan la expresión de las ciclinas D, estimulados por la $PGF_{2\alpha}$, $TGF\beta_1$, LIF y otras citoquinas relacionadas. Analizar la relevancia que posee la inducción de ciclina D1, en el punto de compromiso celular ("*commitment*") para iniciar la fase S y dividirse. Estudiar los mecanismos de señalización inducidos por el LIF necesarios para la mitogénesis.

El trabajo se centra fundamentalmente en los siguientes puntos:

- 1- Determinar las vías de señalización estimuladas por la $PGF_{2\alpha}$ involucradas en la expresión de la ciclina D1. Estudiar el rol de la proteína quinasa C, del calcio, y de la proteína quinasa de tirosina, responsables de aumentar los niveles de ciclina D1 y de estimular la síntesis de ADN.
- 2- Analizar el efecto del $TGF\beta_1$ sobre la expresión de ciclina D1. Determinar la relación entre los niveles y la vida media del ARNm de ciclina D1 y el punto de compromiso celular ("*commitment*").
- 3- Estudiar los mecanismos de señalización del LIF involucrados en el efecto mitogénico en células Swiss 3T3. Analizar la participación de la PGE1 e insulina en dicho efecto.
- 4- Estudiar las sinergías observadas entre LIF y los mecanismos de señalización dependientes de AMPc.
- 5- Determinar si los mecanismos mitogénicos del LIF son independientes de PKA, PKC y MAPK.
- 6- Comparar los mecanismos de señalización ejercidos por el LIF con aquellos promovidos por

la $\text{PGF}_{2\alpha}$, necesarios para iniciar la síntesis de ADN y posterior división celular.

- 7- Estudiar los factores de transcripción involucrados en los mecanismos de señalización del LIF y otras citoquinas relacionadas.
- 8- Analizar la expresión de moléculas regulatorias del ciclo celular (ciclina D1, D2, D3, CDK4, y CDK6) estimulados por el LIF y la $\text{PGF}_{2\alpha}$.
- 9- Comparar los mecanismos de señalización ejercidos por el LIF con aquellos promovidos por citoquinas pertenecientes a la misma familia (OSM, CNTF, IL-6) necesarios para iniciar la síntesis de ADN y posterior división celular.

RESULTADOS

PRIMERA PARTE

Expresión de la ciclina D1 inducida por la $PGF_{2\alpha}$

Para el estudio del control de la proliferación celular, se utilizaron cultivos de células Swiss 3T3. Éstas células constituyen un modelo muy apropiado para identificar las señales y los mecanismos que controlan la división celular. Pueden ser cultivadas en condiciones experimentales bien definidas y se arrestan en la fase G_0 del ciclo celular al llegar a confluencia o cuando son cultivadas en un medio privado de los agentes mitogénicos presentes en el suero (Rozenfurt, 1986, 1991; Jimenez de Asúa, 1976; 1977; 1997).

Durante la fase G_1 del ciclo celular, ocurren en la célula eventos que deciden el destino de la misma: o bien la célula continúa a través del ciclo y se divide, o ingresa a un estado de quiescencia (G_0). Esta determinación del destino de la célula se designa globalmente como "compromiso celular" (La expresión utilizada en lengua inglesa es *cell commitment*) y está mediada en parte por factores de crecimiento y factores no mitogénicos que se encuentran en el medio extracelular.

El mecanismo molecular involucrado en la regulación de la fase G_1 es complejo. Las ciclinas D y las CDKs han sido postuladas como proteínas reguladoras de la fase G_1 . Las ciclinas D cumplen un rol fundamental en la transducción de señales en la fase G_1 del ciclo. La presencia de suero en el medio de cultivo induce su síntesis. Debido a su corta vida media, en ausencia de suero, tanto el ARNm como la proteína de ciclina D1 son degradados, esto se correlaciona con la falta de síntesis de ADN. Se considera a las ciclinas D como "sensores" que integran señales extracelulares con la maquinaria del ciclo celular, en respuesta a factores de crecimiento (Matsushime et al. 1991).

Resultados previos de este laboratorio han demostrado que la $PGF_{2\alpha}$ es capaz de inducir síntesis de ADN en células Swiss 3T3 (Jimenez de Asua, et al. 1979; 1977; Otto et al. 1981). Con el objeto de determinar el efecto de $PGF_{2\alpha}$ sobre la expresión de ciclina D1, cultivos celulares quietados y confluentes fueron estimulados por distintos lapsos (4,6,8,10,12,14,16 horas) con $PGF_{2\alpha}$ (300ng/ml). Utilizando la técnica de Northern Blot, se observó que la estimulación con $PGF_{2\alpha}$ (300ng/ml) induce la expresión del ARNm de ciclina D1 en células Swiss 3T3 en cultivo (Fig: 1A). Dicha expresión muestra una variación característica según la duración del estímulo. La $PGF_{2\alpha}$ induce la expresión de ARNm de ciclina D1 luego de 6 horas de estimulación; alcanza un máximo luego de 9-12 horas y posteriormente comienza a declinar llegando a un mínimo a las 14 horas (Fig: 1A, 1D). Mediante la técnica de Western blot se observó que la expresión de la proteína ciclina D1 comienza a observarse a las 8 horas (Fig: 1B). El pico máximo en la expresión de proteína ciclina D1 ocurre a partir de las 10-12 horas (Fig: 1B). En contraste con lo observado para la expresión del ARNm, la proteína se mantiene en un nivel elevado de expresión más allá de las 16 horas posteriores al inicio de la estimulación con $PGF_{2\alpha}$.

Para determinar el tiempo mínimo de estimulación de $PGF_{2\alpha}$ necesario para inducir síntesis de ADN, se determinó por autoradiografía, el porcentaje de células en fase S, luego de la aplicación de $PGF_{2\alpha}$ y el agregado de timidina tritiada a los cultivos. Se observó que cuando las células Swiss 3T3 se exponen a la $PGF_{2\alpha}$ durante un lapso mayor a 8-10 horas, quedan comprometidas hacia la división celular, ya que, aún luego de remover el estímulo, se observa síntesis de ADN (medida a las 28 hs, contadas a partir del inicio de la estimulación), llegando a un máximo en la síntesis de ADN a las 14-15 horas del estímulo (Fig: 1C). Si la $PGF_{2\alpha}$ es retirada antes de las 8-10 hs no se verifica este efecto (Fig: 1C). Es decir que se requiere un tiempo mínimo de exposición al factor mitogénico, para que se establezca el compromiso celular hacia la síntesis de ADN. Si el lapso de estimulación con $PGF_{2\alpha}$ es menor, las células

son incapaces de iniciar el ciclo celular.

Estos resultados indican que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ es capaz de inducir la expresión de ciclina D1 y que existe una coincidencia entre el tiempo necesario para alcanzar el máximo en la cantidad de expresión de mensajero de ciclina D1 (Fig: 1D), y aquél requerido para alcanzar el compromiso celular hacia la síntesis de ADN (Fig: 1C).

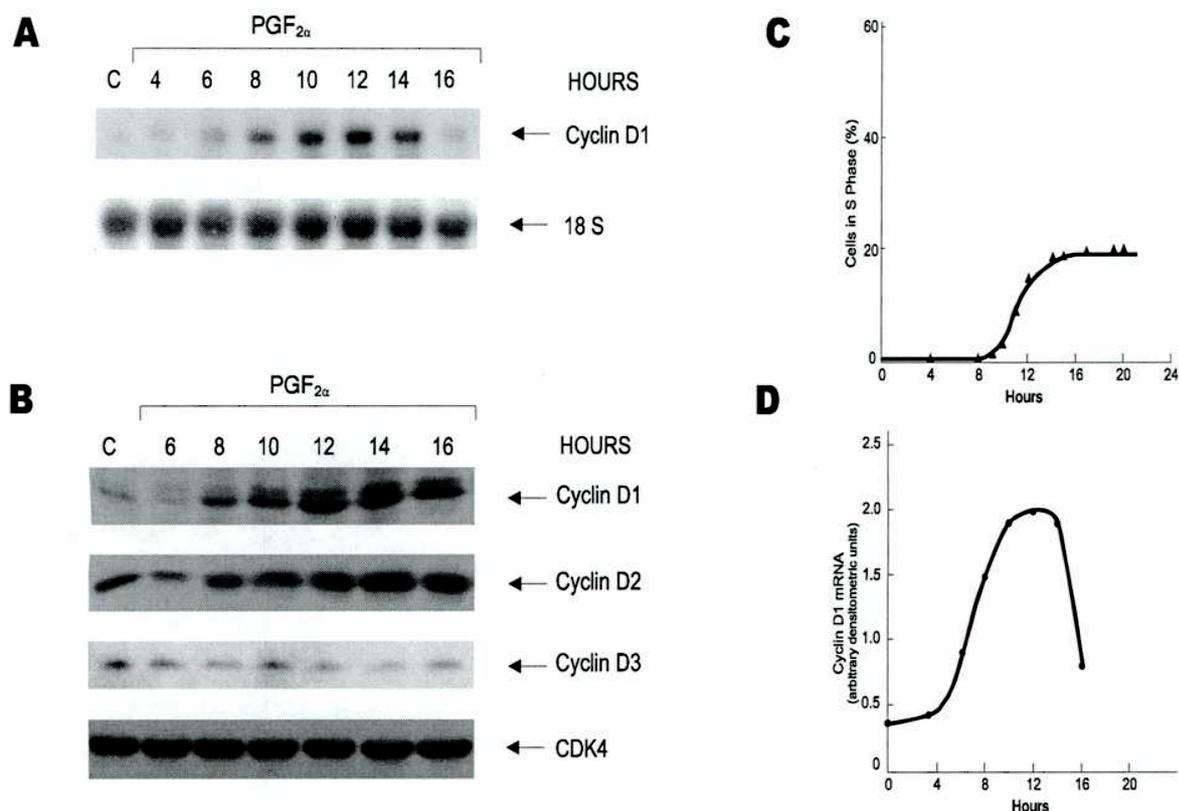


Figura 1: Regulación de la expresión de ciclina D1 estimulado por $\text{PGF}_{2\alpha}$.

A. Las células Swiss 3T3 quiescentes, fueron cultivadas en condiciones control (C) o con $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante los tiempos indicados y se determinaron los niveles de ARNm correspondiente a la ciclina D1, por Northern blot. El panel inferior muestra la hibridización con una sonda de 18S como referencia de normalización.

B. Las células Swiss 3T3 quiescentes fueron cultivadas en condiciones control (C) o con $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante los tiempos indicados y se determinaron los niveles proteínicas correspondientes a la ciclina D1, D2, D3 y CDK4, por Western blot.

C. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ fue removido a distintos tiempos como se indica en el eje de las abscisas, aspirando el medio de cultivo y lavando las células, agregando luego medio condicionado. Los cultivos fueron expuestos continuamente en presencia de metil [³H] timidina de 0 a 28 hs. y procesados para autorradiografía (▲).

D. Resultados de la cuantificación del ARNm de ciclina D1 relativo a la señal del 18S mostrado en **A** (●).

Expresión de la proteína de ciclina D1 inducida por mecanismos dependientes de PKC

Se ha demostrado previamente que la $PGF_{2\alpha}$ estimula el metabolismo de fosfatidil inositol y aumenta el contenido de diacilglicerol (DAG) intracelular y de inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3), en células Swiss 3T3 en cultivo (Jimenez de Asua, et al. 1992; Goin et al. 1993). El IP_3 es capaz de movilizar Ca^{2+} a partir de reservorios intracelulares, mientras que el DAG activa a la proteína quinasa C (PKC).

Con el objeto de investigar si estos mecanismos de señalización estimulados por la $PGF_{2\alpha}$ son capaces de estimular la expresión de ciclina D1, se utilizaron el 1-oleil-2-acetil-glicerol (OAG) (100ug/ml), análogo del DAG y activador de la PKC, y el A23187, ionóforo de calcio capaz de aumentar los niveles de calcio citosólicos.

Las células fueron estimuladas con OAG, con A23187, o con ambos en combinación. Se determinó la expresión de la proteína ciclina D1 luego de 10 horas de estímulo, utilizando la técnica de Western blot (Fig: 2A). Se comprobó que el OAG es capaz de inducir la expresión de ciclina D1 pero que sin embargo no induce la síntesis de ADN (Fig: 2A y B). Por otra parte se observó que el A23187 no es capaz de inducir la expresión de ciclina D1 ni la síntesis de ADN en estas células (Fig: 2A y B). Con el agregado conjunto de A23187 y OAG se verificó una inducción de ciclina D1 a niveles similares a los observados con la adición de OAG solo (Fig:2A y B). Tampoco en este caso se indujo la síntesis de ADN (Fig: 2A y B).

Estos resultados demuestran que la expresión de ciclina D1 no es suficiente para inducir la síntesis de ADN, ya que el OAG es capaz de inducir la expresión de ciclina D1, pero no la síntesis de ADN. Se puede inferir, además que la inducción de la síntesis de ADN por $PGF_{2\alpha}$ involucra mecanismos de señalización adicionales.

El factor de crecimiento transformante $\beta 1$ ($TGF\beta 1$), sin ser mitogénico por si mismo en células Swiss 3T3, potencia si embargo, el efecto mitogénico del la $PGF_{2\alpha}$. Se investigó la posibilidad de que los mecanismos de señalización estimulados por el $TGF\beta 1$ fuesen capaces de complementarse con la acción del OAG o del Ca^{2+} , sobre la expresión de ciclina D1 (Fig:2A y B).

Se observó que el $TGF\beta 1$ no es capaz de inducir la expresión de ciclina D1, sin embargo, potencia la inducción de ciclina D1 por OAG. En estas condiciones, $TGF\beta 1$ y OAG en combinación, inducen la síntesis de ADN. En contraste, la combinación de $TGF\beta 1$ y A23187, no logra inducir la expresión de ciclina D1 ni la síntesis de ADN.

Estos resultados sugieren que podría existir una convergencia de señales intracelulares entre el OAG y el $TGF\beta 1$ necesarias para la inducción de ciclina D1, o bien el $TGF\beta 1$ sería capaz de estabilizar el ARNm y/o la proteína ciclina D1.

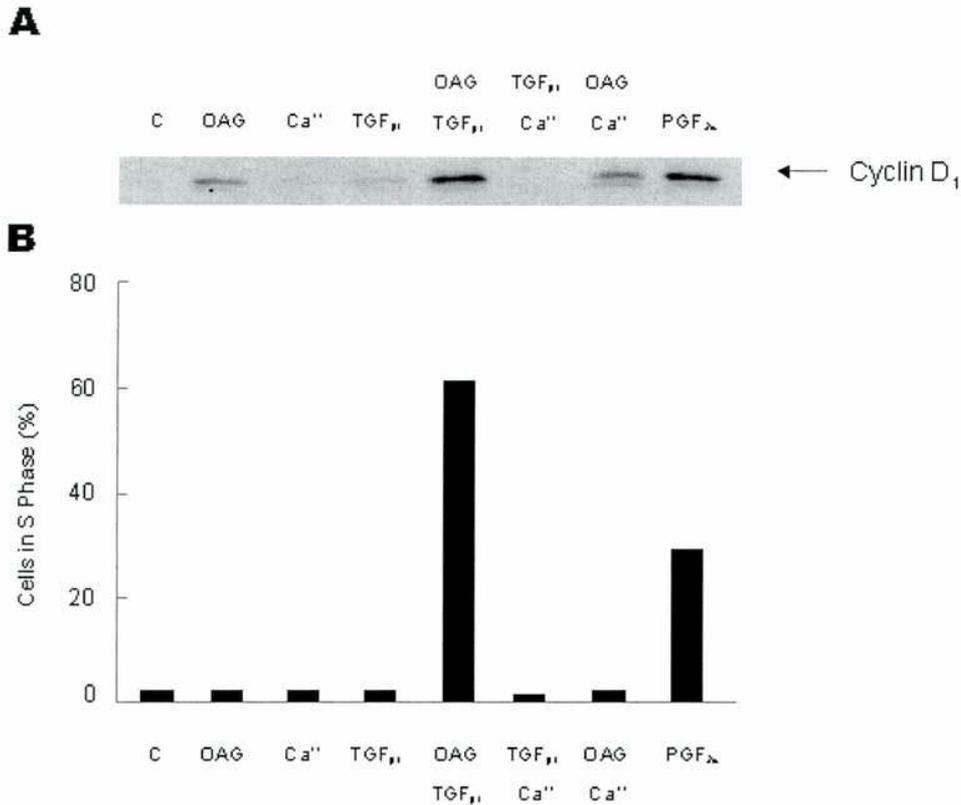


Figura 2: Diferentes mecanismos de señalización que regulan la expresión de ciclina D1 y la síntesis de ADN.

A Las células Swiss 3T3 fueron cultivadas en condiciones control (C), con ionóforo de calcio (Ca⁺⁺), con OAG, con TGFβ1 o con PGF_{2α} durante 10 horas y se determinaron los niveles de proteínas correspondiente a ciclina D1 por Western blot.

B Efecto de ionóforo de calcio, OAG, TGFβ1 y PGF_{2α} sobre la síntesis de ADN. Las células se cultivaron con los mismos estímulos que en A durante 28 horas en presencia de metil [³H] timidina y procesadas para autorradiografía.

El TGFβ1 potencia la síntesis de ADN estimulada por PGF_{2α}. Cinética de entrada en fase S

Resultados previos de este laboratorio demostraron que el TGFβ1, que por si solo no estimula la replicación del ADN, potencia, sin embargo, el efecto de la PGF_{2α}. La PGF_{2α} (300ng/ml) induce la síntesis de ADN en un 18% de las células luego de 28hs de estimulación. Mientras que el agregado conjunto del TGFβ1 con la PGF_{2α}, potencia el efecto mitogénico de ésta última, ya que, en este caso el porcentaje de células que inician la síntesis de ADN, luego de 28h de estimulación, es del 80%. Para dichos experimentos, se utilizaron cultivos confluentes de células Swiss 3T3 aquietadas en la fase G₀. Luego de la aplicación de los diferentes estímulos y el agregado de timidina tritiada a los cultivos (Gomez de Alzaga., et al FEBS, 1994, 21-24).

La pregunta que nos planteamos fue si el efecto del TGFβ1 se debe a un aumento en la tasa de reclutamiento de células que entran en fase S, es decir a un aumento en la velocidad con

que se incrementa el porcentaje de células que han comenzado a sintetizar ADN; o se debe a una disminución en la duración de la fase G₁ del ciclo celular; o a una combinación de ambas situaciones. Mediante la determinación del porcentaje de células que incorporaron timidina tritiada, a distintos intervalos de tiempos luego del comienzo de la estimulación conjunta de PGF_{2α} y TGFβ₁ pudimos establecer que la potenciación del TGFβ₁ en la síntesis de ADN estimulada por la PGF_{2α} ocurre a través del aumento de la tasa de reclutamiento de células para la síntesis de ADN, sin alterar la duración de la fase G₁ (fig 3).

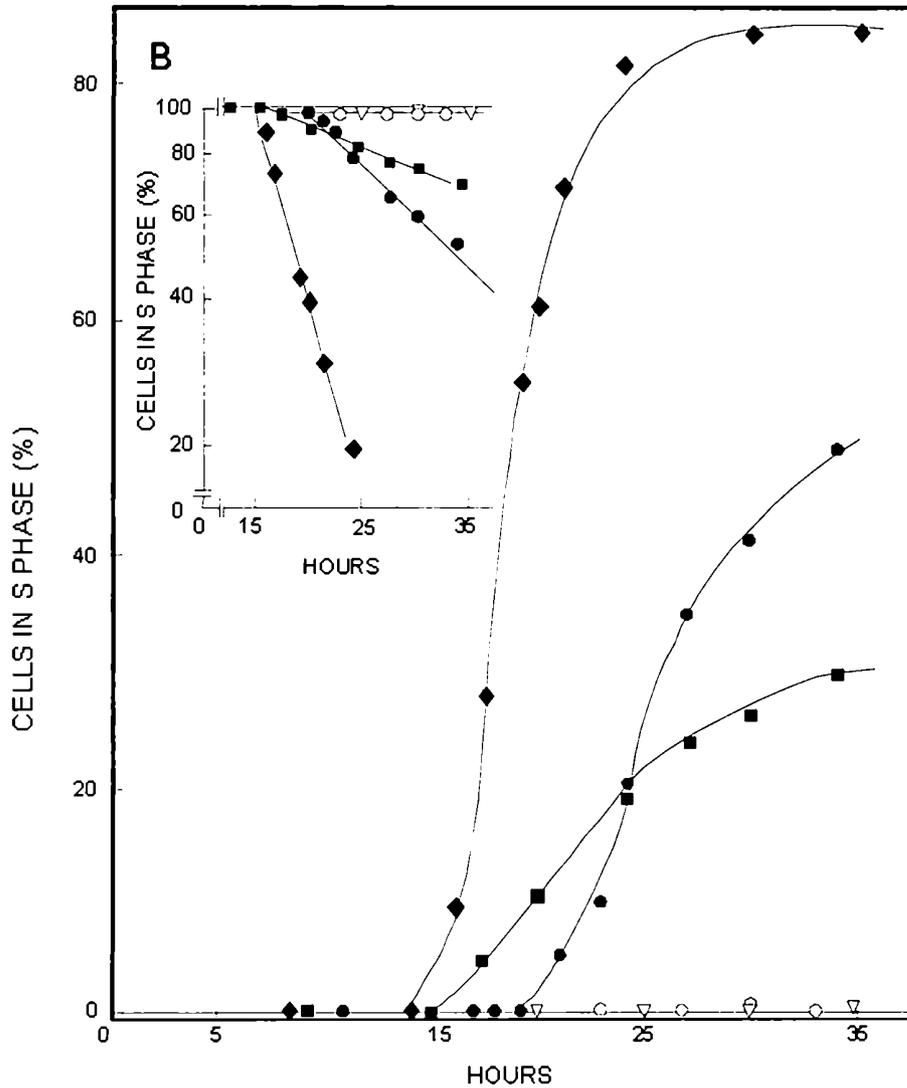


Figura 3: Cinética de entrada en fase S estimulado por PGF_{2α} solo, o con el agregado de TGF-β₁
 Las células fueron estimuladas de la siguiente manera: (■) PGF_{2α} presente continuamente, (◆) PGF_{2α} y TGF-β₁ presente continuamente; (○) PGF_{2α} presente 6 horas; (●) PGF_{2α} presente 6 horas luego de lo cual, se remueve y se adiciona TGF-β₁; (▽) control. Los cultivos fueron expuestos en presencia de metil [³H] timidina. Posteriormente, a los tiempos indicados en el eje X, las células fueron procesadas por autorradiografía. Inserto: los mismos resultados representados en escala logarítmica.

Efecto de la $PGF_{2\alpha}$ y el $TGF\beta_1$ sobre el compromiso celular

Continuando con la misma metodología, determinamos que, como se observó previamente, cuando las células Swiss 3T3 se exponen a la $PGF_{2\alpha}$ durante un lapso mínimo de 8-10 horas, quedan comprometidas hacia la división celular, ya que, aún luego de remover el estímulo, se observa síntesis de ADN medido a las 28 hs contadas a partir del inicio de la estimulación. Si la $PGF_{2\alpha}$ se retira antes de las 8-10 hs, no se verifica este efecto (fig. 4, triángulos llenos). Es decir que se requiere un tiempo mínimo de exposición al factor mitogénico para que se produzca el compromiso celular hacia la síntesis de ADN; si el lapso de estimulación con $PGF_{2\alpha}$ es menor, las células serán incapaces de iniciar el ciclo celular. Sin embargo, si luego de la remoción del mitógeno, se agrega $TGF\beta_1$ en el medio de cultivo, se reduce el tiempo de exposición al mitógeno necesario para que las células adquieran la capacidad de iniciar la síntesis de ADN (Fig 4 círculos). Observamos que este efecto es aún más marcado si el $TGF\beta_1$ se agrega conjuntamente con la $PGF_{2\alpha}$ al comenzar la estimulación, y sólo se remueve, en los tiempos indicados, la $PGF_{2\alpha}$ (Fig 4, triángulos abiertos).

Podemos concluir que el efecto del $TGF\beta_1$ sobre la síntesis de ADN en células Swiss 3T3 en cultivo no es tan solo potenciar la inducción mediada por $PGF_{2\alpha}$ sino también provocar una disminución en el tiempo mínimo de estimulación con $PGF_{2\alpha}$ necesario para iniciar la síntesis de ADN. Entonces, en este tipo de células en cultivo, el $TGF\beta_1$ regula el compromiso celular hacia la división.

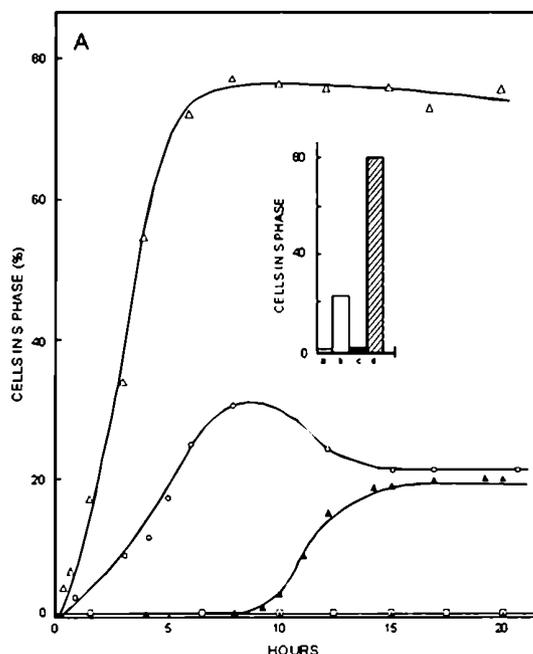


Figura 4: Efecto de la $PGF_{2\alpha}$ y $TGF\beta_1$ sobre el compromiso celular:

Cultivos de células Swiss 3T3 confluentes y arrestadas fueron sometidos en presencia continua de metil [3H] timidina a distintos tratamientos (desde $t = 0$): $TGF\beta_1$ (□), $PGF_{2\alpha}$ (▲ y ○) o $PGF_{2\alpha}+TGF\beta_1$ (△). Luego de distintos lapsos ($t = x$, en hs en el eje de abscisas) se retiró el medio de cultivo y se agregó: medio condicionado (□ y ▲) o medio condicionado + $TGF\beta_1$ (○ y △), junto con metil [3H] timidina en todos los tratamientos. Se continuó con el cultivo hasta cumplidas 28 hs en todos los casos, tiempo al cual se retiró el medio y luego de lavar las células se procesaron las distintas placas (correspondientes a los distintos lapsos y distintos tratamientos) para autorradiografía. El porcentaje de células en fase S, se indica en el eje de ordenadas. El inserto muestra el % de células en fase S (medidos también a las 28 hs) de cultivos sin estímulo (a) o tratados ($t = 0$) con $PGF_{2\alpha}$ (b), $TGF\beta_1$ (c) o suero (d).

Efecto del TGF- β ₁ sobre la estabilización del ARNm de ciclina D1

La expresión de ciclina D1 podría ser necesaria para la progresión de las células durante la fase G1. Si esto fuese así, la rápida degradación de ciclina D1 (Matsushime et al. 1991) podría no permitir a las células la entrada en fase S, al menos que la PGF_{2 α} estuviera presente durante 10 horas o más. Cuando la PGF_{2 α} es removida del medio a tiempos tempranos (4-8 horas) y se agrega TGF β ₁, las células son capaces de iniciar la síntesis de ADN, por lo tanto, una hipótesis factible podría ser que el factor no mitogénico (el TGF β ₁), estuviera estabilizando a la ciclina D1, una vez removida la PGF_{2 α} . Por lo tanto, teniendo en cuenta que el TGF β ₁ mantiene el compromiso celular hacia la síntesis de ADN, aún después de ser removido el mitógeno, estudiamos la expresión del ARNm de la ciclina D1 luego de la remoción de la PGF_{2 α} , con el agregado inmediato posterior de TGF β ₁. Para ello estimulamos las células con PGF_{2 α} y luego de 7 horas removimos el medio de cultivo con mitógeno y lo reemplazamos por medio condicionado (obtenido de otras células arrestadas, en las mismas condiciones, pero no expuestas a mitógeno) sólo o con el agregado de TGF β ₁. Realizamos la medición de los niveles de ARN mensajero de ciclina D1 luego de distintos lapsos a continuación del cambio de medio. Pudimos observar que cuando, luego de la remoción del mitógeno se agregó únicamente medio condicionado, el mensajero de ciclina D1 fue degradado rápidamente. Este resultado es coincidente con la observación de que las células en estas condiciones no son capaces de iniciar el ciclo celular (como se mostró en la figura 4). Sin embargo, si luego de la remoción del mitógeno se agrega TGF β ₁, que no es capaz de inducir la expresión de ciclina D1 (fig: 2), al medio condicionado, se observa que los niveles de ciclina D1 se mantienen elevados durante aproximadamente 2hs (fig 5) y en estas condiciones las células si son capaces de iniciar la síntesis de ADN (Fig.4).

Podemos concluir que el TGF β ₁ es capaz de mantener los niveles de ARNm de ciclina D1 elevados una vez que fue removida la PGF_{2 α} , y consecuentemente de mantener el compromiso celular hacia la síntesis de ADN.

Si bien es un resultado preliminar (dado que el número de experimentos fue igual a dos), se observó que si en el momento de la remoción del mitógeno del experimento recién mencionado, se agrega un inhibidor de la transcripción, el 5,6 dicloro benzimidazol (DRB) previamente al agregado del TGF β ₁, observamos que el patrón temporal de los niveles de mensajero de ciclina D1 no se ven alterados por la presencia del inhibidor de la transcripción, indicando que, aparentemente, el efecto del TGF β ₁ es a través de la estabilización del mensajero y no de una mayor síntesis de ciclina D1. Esta estabilización estaría mediando el mantenimiento de la capacidad de las células para dividirse, luego de la remoción del mitógeno.

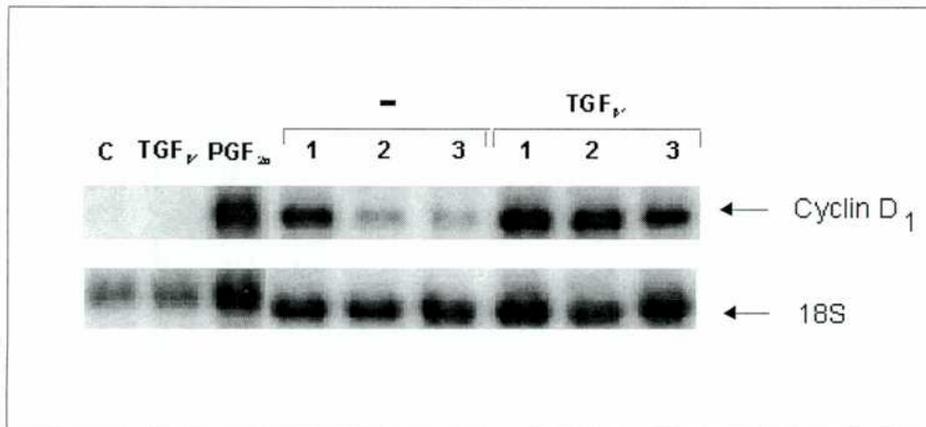


Figura 5: Efecto del TGFβ1 en estabilización del ARNm de ciclina D1:

Las células Swiss 3T3 fueron cultivadas en ausencia (C) o en presencia de PGF_{2α}, TGFβ1, durante 7 horas, luego de lo cual se extrae el ARN total. Luego de 7 horas de estimulación con PGF_{2α} se remueve el medio de cultivo y se agrega medio condicionado (-), o bien medio condicionado en presencia de TGFβ1 (+TGFβ1), durante distintos tiempos (1, 2, 3 horas), posteriormente se extrae el ARN total. Se determinaron los niveles de ciclina D1 mediante la técnica de Northern blot. El panel inferior muestra la hibridización con una sonda de 18S como referencia de normalización.

Secuencias estabilizantes en el ARNm de ciclina D1

Por análisis de secuencia a partir de un banco de datos, se observó que el ARNm de ciclina D1 contiene dentro del extremo 3' no codificante secuencias desestabilizantes de mensajeros ya conocidos, estas son: GAGUUUNNN/NNNUUUGAG, las mismas están presentes en el ARNm de la ribonucleotido reductasa, en la cual el TGFβ1 causa una estabilización de dicho mensajero vía la inducción/activación de una proteína de 75Kd. Esta secuencia consenso se encuentra en cuatro sitios de la región 3' no codificante del ARNm de ciclina D1 (Fig:6), la secuencia AUUUA, la misma está presente en una gran cantidad de ARNm altamente inestables, como por ejemplo en el mensajero de transportador de glucosa tipo 1 (Glut1), en la cual el factor de necrosis tumoral alfa, mediante la acción de AMPc, causa la estabilización del ARNm de Glut1 vía la inducción de un factor proteico que se une a ésta secuencia consenso e impide la degradación. En el ARNm de ciclina D1, la secuencia consenso se encuentra en cinco sitios de la región 3' no codificante, esta secuencia ya había sido descrita dentro de dicho mensajero (Matsushime, et al 1991). Por último la secuencia GCUUGC, presente en el receptor de motilidad mediada por hyaluronan (HMMR), también existe en la región 3' no codificante del ARNm de ciclina D1 (fig. 6).

Efecto de la retro modulación de la PKC en la expresión de ciclina D1

En base a las evidencias encontradas que vinculan la inducción de ciclina D1 por $\text{PGF}_{2\alpha}$ con la activación de PKC se decidió examinar si la $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimula la expresión de ciclina D1 sólo a través de la activación de la PKC o si existen otros mecanismos de señalización involucrados. La estrategia utilizada consistió en estudiar el efecto de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en células Swiss 3T3 privadas de PKC. Para ello se recurrió a la retromodulación (*downmodulation* en inglés) mediante tratamiento prolongado de la monocapa celular con el éster de forbol 12-tetradecanoil 13-forbol acetato (TPA, 800nM), durante 72 horas (Fig: 7A y B) (resultados presentados en la tesis de Belén Cadenas, demuestran que en células pre-tratadas con TPA durante 72 horas, se inhibe la expresión de la PKC). Se comprobó que en estas condiciones la $\text{PGF}_{2\alpha}$ es capaz de estimular la expresión de ciclina D1 pero en menor proporción que en células con la actividad de PKC intacta. Por otra parte el OAG es incapaz de inducir la expresión de ciclina D1 en células tratadas con TPA (Fig: 7A y B). Esto sugiere que la estimulación de la expresión de ciclina D1 por $\text{PGF}_{2\alpha}$ involucra al menos dos vías de señalización independientes: una a través de la PKC y otra no relacionada con dicha enzima.

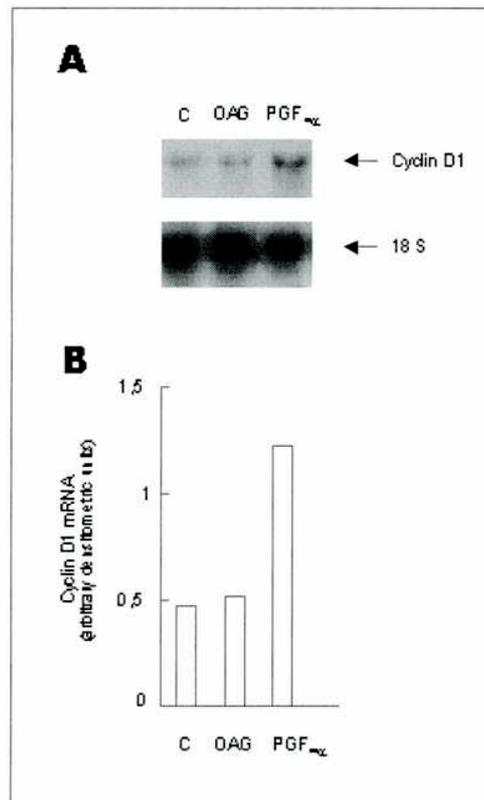


Figura 7: Efecto de la retromodulación de la PKC sobre la expresión del ARNm de ciclina D1 estimulada por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ o el OAG:

A. Las células Swiss 3T3 fueron pretratadas durante 72 horas en presencia de TPA, en medio control (C) o con el agregado de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (300ng/ml) u OAG (100ug/ml), durante 8 horas. Posteriormente se determinaron los niveles del ARNm correspondiente a ciclina D1 por Northern blot. El panel inferior muestra la hibridización con una sonda de 18S como referencia de normalización.

B. Cuantificación del ARNm de ciclina D1 relativo a la señal del 18S mostrado en A.

Efecto del GF en la expresión del ARNm de la ciclina D1

Se utilizó un inhibidor específico de la PKC, el GF 109203X (GF), para corroborar los resultados anteriores. Para ello, células confluentes y aquietadas fueron preincubadas durante 1 hora con GF, posteriormente, fueron estimuladas con $\text{PGF}_{2\alpha}$ u OAG (Fig: 8A y B). En estas condiciones se observó estimulación de la expresión de ciclina D1 por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ pero no por OAG (Fig: 8A y B). En la figura 8C se observa la inhibición del GF, en la síntesis de ADN estimulada por $\text{PGF}_{2\alpha}$. Estos resultados refuerzan y confirman las observaciones hechas en el punto anterior, utilizando otra estrategia experimental.

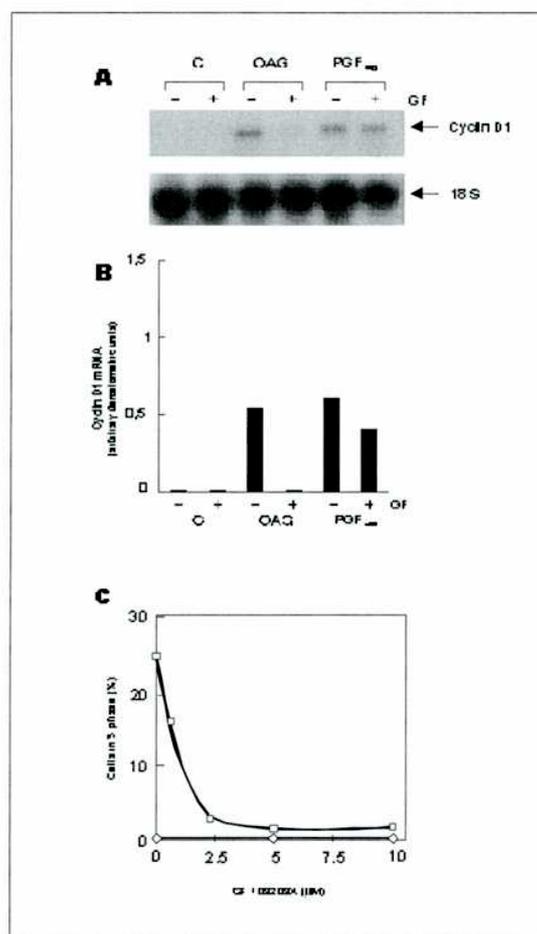


Figura 8: Efecto del GF109203X sobre la expresión de ciclina D1 estimulada por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ o el OAG.

A. Las células Swiss 3T3 fueron cultivadas en condiciones control (GF-) o pretratadas durante 1 hora en presencia de GF109203X (GF+) en medio control (C) o con el agregado de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (300ng/ml) u OAG (100ug/ml) durante 8 horas. Posteriormente se determinaron los niveles del ARNm correspondientes a la ciclina D1 por Northern blot. El panel inferior muestra la hibridización con una sonda de 18S como referencia de normalización.

B. Cuantificación del ARNm de ciclina D1 relativo a la señal del 18S mostrado en A.

C. Las células fueron pretratadas durante 1 hora con concentraciones crecientes de GF109203X como se indica en el eje de las abscisas. Posteriormente las células fueron estimuladas con $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante 28 horas en presencia de metil [^3H] timidina y procesadas por autorradiografía.

Expresión de la proteína ciclina D1 inducida por mecanismos dependientes de PTK:

Dada la capacidad de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ de inducir la fosforilación de tirosina en proteínas intracelulares (Jimenez de Asua 1997), resulta plausible que la expresión de ciclina D1 inducida por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ estuviese mediada por mecanismos de señalización dependientes de proteínas quinasas de tirosina (PTK). Para investigar esta hipótesis, se trataron células Swiss 3T3 con vanadato de sodio (Na_3VO_4), un inhibidor de la fosfatasa de tirosinas (Fig: 9A). Se observó que el Na_3VO_4 es capaz de inducir la expresión de ciclina D1 (Fig: 9A). Sin embargo, la presencia de esta sal no basta para inducir la síntesis de ADN (Fig: 9B). Para iniciar el ciclo celular es necesaria la presencia conjunta de Na_3VO_4 y OAG (Fig: 9B). A23187, un agente capaz de movilizar calcio intracelular, potencian este efecto, pero no aumenta los niveles de ciclina D1 estimulados por el Na_3VO_4 y OAG.

Estos resultados indican la participación tanto de mecanismos de señalización dependientes de PKC como de PTK en la estimulación de la expresión de ciclina D1. Sin embargo, se requiere la acción de ambos tipos de mecanismos, para posibilitar la inducción de síntesis de ADN y en consecuencia, el inicio del ciclo celular.

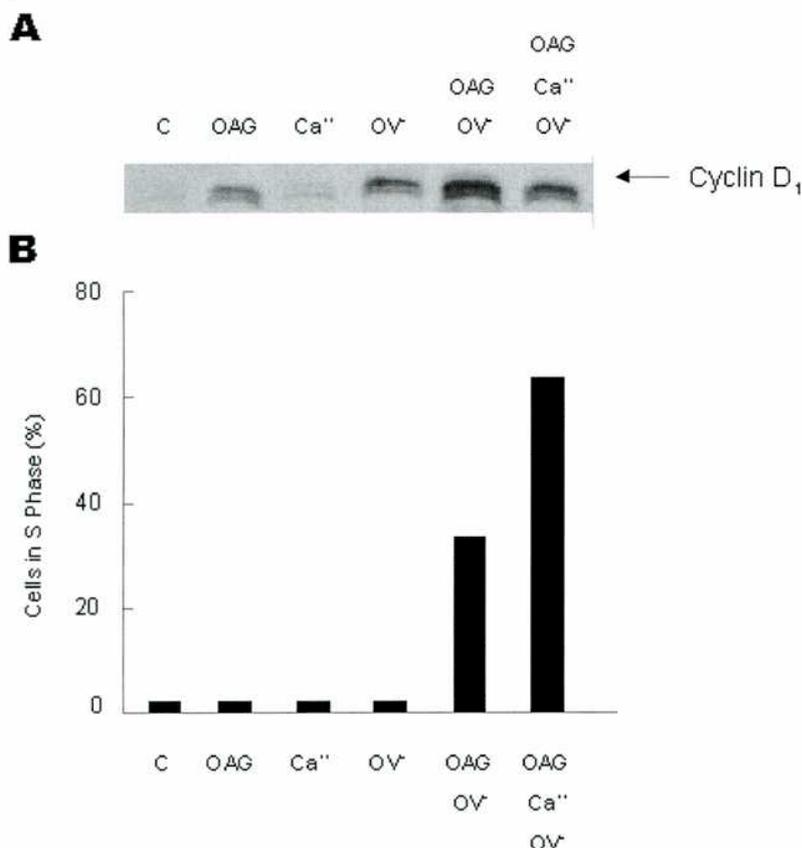


Figura 9: Diferentes mecanismos de señalización que regulan la expresión de ciclina D1 y la síntesis de ADN.

A Las células Swiss 3T3 fueron cultivadas en condiciones control (C), con vanadato de sodio (OV⁻), con OAG o con A23187 (Ca⁺⁺) durante 10 horas y se determinaron los niveles de proteínas correspondientes a ciclina D1 por Western blot. **B** Efecto del vanadato de sodio, OAG y A23187 sobre la síntesis de ADN. Las células fueron cultivadas con los mismos estímulos que en A durante 28 horas, en presencia de metil [³H] timidina y fueron procesadas para autorradiografía.

SEGUNDA PARTE:

La acción mitogénica del factor inhibidor de leucemia (LIF) es independiente de la activación de la PKC.

Una serie de experimentos realizados previamente en nuestro laboratorio demostraron que el LIF estimula la síntesis de ADN en cultivos confluentes de células Swiss 3T3 arrestadas (Shere Levy et al. 1997). Además, se encontró evidencia de que el efecto mitogénico del LIF no requeriría de mecanismos de señalización dependientes de PKC y que, por el contrario, la PKC sería necesaria para la estimulación de la síntesis de ADN por $PGF_{2\alpha}$. Entonces, el LIF y la $PGF_{2\alpha}$, actuarían aparentemente a través de mecanismos de señalización intracelular diferentes (Shere Levy et al). Los tratamientos prolongados con TPA utilizados en los citados experimentos, además de retromodular la PKC, ejercen una gran variedad de efectos, incluyendo la transcripción de genes (Huang et al. 1995; Hunter et al. 1992). Por ello se decidió utilizar un inhibidor específico de la PKC para confirmar los resultados antes mencionados. Numerosos inhibidores de PKC han sido descritos. Sin embargo, el GF109203X es uno de los más específicos (Toullec, et al. 1991). Su acción inhibitoria está dada a través de la unión al sitio catalítico de la PKC.

El efecto mitogénico del LIF en células con actividad de PKC normal o en aquellas pre-tratadas con GF 109203X, se muestra en la Tabla 1. En ambas condiciones el LIF (100 ng/ml), estimula la entrada de las células en fase S, en porcentajes que no difieren significativamente. En ausencia de actividad de PKC, la $PGF_{2\alpha}$ no es capaz de ejercer su acción mitogénica, sin embargo, la combinación del LIF y la $PGF_{2\alpha}$ promueve en forma sinérgica la entrada en fase S, tanto en células que poseen actividad normal de PKC como en células pre-tratadas con GF 109203X. En células con actividad de PKC intacta, la presencia de OAG, que activa a la PKC, potencia el efecto mitogénico del LIF, no así en células pre tratadas con GF 109203X (Tabla 1). Es interesante notar que cuando las células son tratadas con TPA, produciendo la retromodulación de la PKC, la $PGF_{2\alpha}$ no puede inducir la síntesis de ADN pero sí la fosforilación de proteínas en tirosina (tesis de la Dra. Mercedes Goin, pag 100).

Podemos concluir que mientras el efecto mitogénico de la $PGF_{2\alpha}$ involucra la activación de PKC, el LIF actúa por un mecanismo de señalización independiente de PKC. El agregado de LIF y la $PGF_{2\alpha}$ inducen mitogénesis en forma sinérgica. Sin embargo, este efecto sinérgico es independiente de PKC ya que la síntesis de ADN inducida por ambos mitógenos es semejante en ausencia y en presencia de PKC. Resta determinar si el efecto de sinergia entre el LIF y la $PGF_{2\alpha}$ está mediado por la activación de la PTK o por una vía alternativa. Además, el hecho de que un análogo de DAG, capaz de activar a la PKC, potencie el efecto mitogénico del LIF, estaría indicando que existirían mecanismos de señalización dependientes de PKC capaces de potenciar el efecto mitogénico del LIF.

Additions	Cells in S Phase (%)	
	-	GF
Control	0.8	0.9
OAG	0.9	0.5
LIF	29.5	28.5
PGF _{2α}	20.1	1.1
LIF + OAG	47.1	28.2
LIF + PGF _{2α}	65.1	64.7

Tabla 1: Síntesis de ADN estimulada por el LIF o la PGF_{2α} en células control o células sin actividad de PKC.

Las células fueron cultivadas en condiciones control o pretratadas durante 1 hora con GF109203X (10uM). Los agregados posteriores fueron los siguientes: PGF_{2α} (300ng/ml), LIF (100ng/ml), OAG (100ug/ml). El porcentaje de células con núcleos marcados se determinó a las 28 horas de cultivo. Cada uno de los resultados son medias de cuantuplicados de campos conteniendo 600 células aproximadamente cada uno.

El LIF estimula la síntesis de ADN a través de un mecanismo independiente de la farnesilación proteínas

La presencia de inhibidores competitivos de la hidroximetilglutaril CoA (HMG-CoA) reductasa, como la lovastatina (LOV), bloquea la producción de ácido mevalónico. Este último es un precursor esencial para la biosíntesis de compuestos isoprenoides. Evidencias recientes han mostrado que el mevalonato actúa como precursor de moléculas preniladas involucradas en la proliferación celular. Específicamente, la LOV bloquea la farnesilación del producto del oncogén p21^{ras}, por lo tanto, inhibe la inserción de la proteína ras en la superficie de la membrana e inhibe la actividad de la misma (Alberts et al., 1980; Fairbanks et al., 1984; Hancock, JF. 1993). Este efecto inhibitorio de LOV es revertido por el agregado exógeno de mevalonato.

Para determinar la importancia de la isoprenilación de proteínas, en los efectos mitogénicos de la PGF_{2α} y el LIF, las células fueron pretratadas con LOV, para luego medir la síntesis de ADN (Fig: 10A). Se observó que el agregado de bajas concentraciones de LOV no inhibe la síntesis de ADN inducida por LIF. Sin embargo, luego del agregado de LOV (10uM) la inducción de síntesis de ADN por PGF_{2α} fue inhibida en más del 50% (fig: 10B). La insulina, que no es mitogénica en estas células, potencia el efecto mitogénico tanto de la PGF_{2α} como del LIF. Se determinó si la sinergia producida por la insulina, en el efecto mitogénico del LIF y de la PGF_{2α}, ocurre o no a nivel de la farnesilación de proteínas. La LOV adicionada a distintas concentraciones, tanto sola como en combinación con la insulina, no tiene efecto sobre la síntesis de ADN (Fig: 10A). En cuanto a la potenciación de la acción de los mitógenos por la insulina, la LOV inhibe este efecto en el caso de la PGF_{2α} pero no en el del LIF (Fig: 10A).

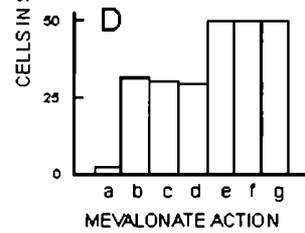
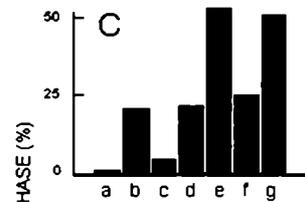
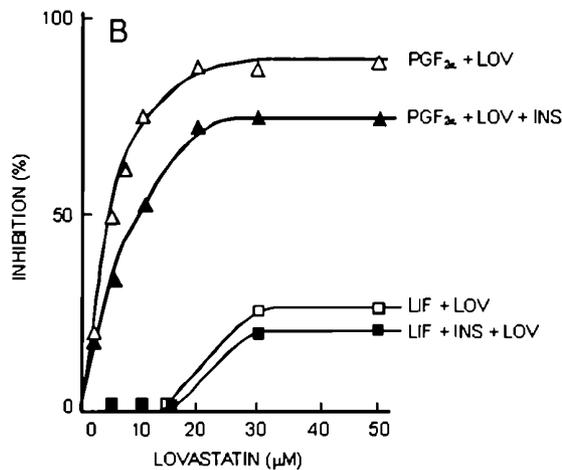
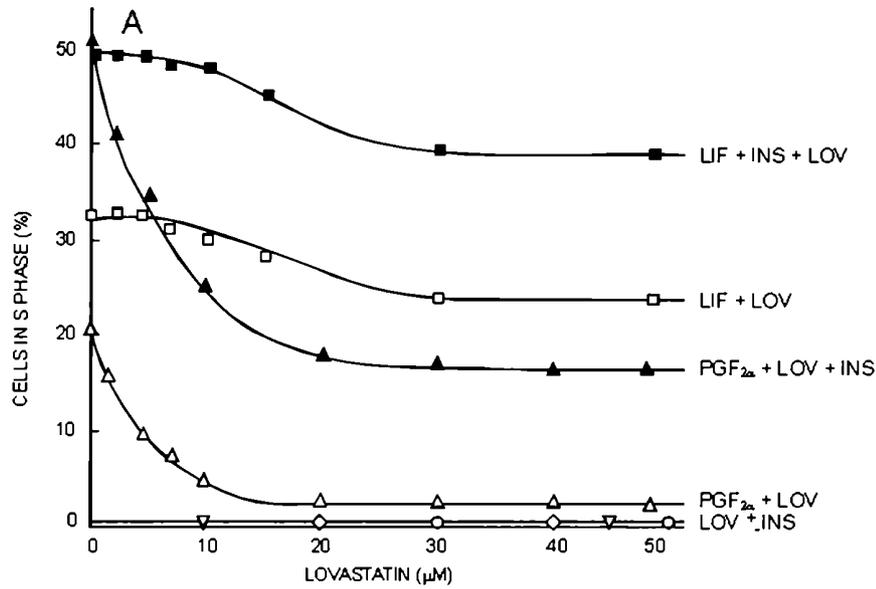


Figura 10: Acción diferencial de lovastatina en la síntesis de ADN inducida por LIF o PGF_{2α}

A: Las células Swiss 3T3 fueron pretratadas con concentraciones crecientes de lovastatina (LOV) por 1 hora como se indica en el eje de abscisas. Las adiciones fueron las siguientes: (O) LOV, (◊) Insulina, (▽) LOV+Insulina; () LIF+LOV, (■) LIF+Insulin+LOV; (Δ) PGF_{2α}+LOV, (▲) PGF_{2α}+Insulin+LOV.

B: Porcentaje de inhibición de la síntesis de ADN mediado por LOV, en células estimuladas con LIF o PGF_{2α}: Las adiciones fueron las siguientes: () LIF+LOV, (■) insulina+LIF+LOV, (Δ) PGF_{2α}+LOV, (▲) PGF_{2α}+insulina+LOV.

C y D Reversión de la acción de LOV por mevalonato: En **C** las adiciones fueron las siguientes: a) control, b) PGF_{2α}, c) PGF_{2α}+LOV, d) PGF_{2α}+LOV+Mevalonato, e) PGF_{2α}+Insulina, f) PGF_{2α}+Insulina+LOV, g) PGF_{2α}+Insulina+LOV+mevalonato. En **D** las adiciones fueron las siguientes: a) control, b) LIF, c) LIF+LOV, d) LIF+LOV+Mevalonato, e) LIF+Insulina, f) LIF+Insulina+LOV, g) LIF+Insulina+LOV+mevalonato. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: LOV (10uM), LIF (100ng/ml); PGF_{2α} (300ng/ml); insulina (50ng/ml) y mevalonato (100uM). El porcentaje de células con núcleos marcados se determinó a las 28 horas de cultivo. Los resultados son medias de cuantuplicados de campos conteniendo 600 células aproximadamente cada uno. Se realizaron tres experimentos.

Para determinar si el efecto de la LOV es específico, se agregó mevalonactona, un análogo de mevalonato. Como se observa en la figura 10C y 10D, la mevalonactona revirtió el efecto inhibitorio de la LOV en la síntesis de ADN estimulada por $PGF_{2\alpha}$ así como también la inducida por $PGF_{2\alpha}$ en presencia de insulina. Además, la mevalonactona no modifica el porcentaje de células que entran en fase S inducidas por el LIF en presencia o no de insulina (Fig. 10D). Por último, la sinergia observada entre el LIF y la $PGF_{2\alpha}$ es inhibida en presencia de LOV, y el agregado de mevalonactona revierte dicha inhibición (dato no mostrado).

Estos resultados permiten concluir que el LIF, a diferencia de la $PGF_{2\alpha}$, ejerce su efecto mitogénico independientemente del efecto inhibitorio de la LOV y que la sinergia observada entre LIF y la $PGF_{2\alpha}$ es dependiente de la farnesilación de proteínas.

El LIF estimula la síntesis de ADN a través de un mecanismo independiente de MAPKK y $p38^{MAPK}$

El SB 203580 es un inhibidor de $p38^{MAPK}$, mientras que PD 098059 es un inhibidor selectivo de MEK1/2 (MAPKK), estos compuestos bloquean la fosforilación y por lo tanto la activación de dichas enzimas (Ridley, et al 1998; Seufferlein, et al. 1996). Para determinar la importancia de la activación de MAPK y MAPKK en la mitogénesis de la $PGF_{2\alpha}$ y del LIF, se procedió a pretratar las células con dichos inhibidores para luego medir la síntesis de ADN (Fig: 11A y B). Ambos inhibidores interfieren con la síntesis de ADN estimulados por la $PGF_{2\alpha}$ (Fig: 11A y B cuadrados). Sin embargo, el agregado tanto de PD 098059 como de SB 203580, no inhiben la síntesis de ADN inducida por el LIF (Fig: 11A y B triángulos) a bajas concentraciones (Seufferlein, T. et al, 1996; Simon, H, et al, 1998).

Estos resultados indican que la $PGF_{2\alpha}$ induce síntesis de ADN mediante mecanismos de señalización dependientes de $p38^{MAPK}$ y MEK. Mientras que la síntesis de ADN estimulada por LIF no requiere de dichos mecanismos de señalización.

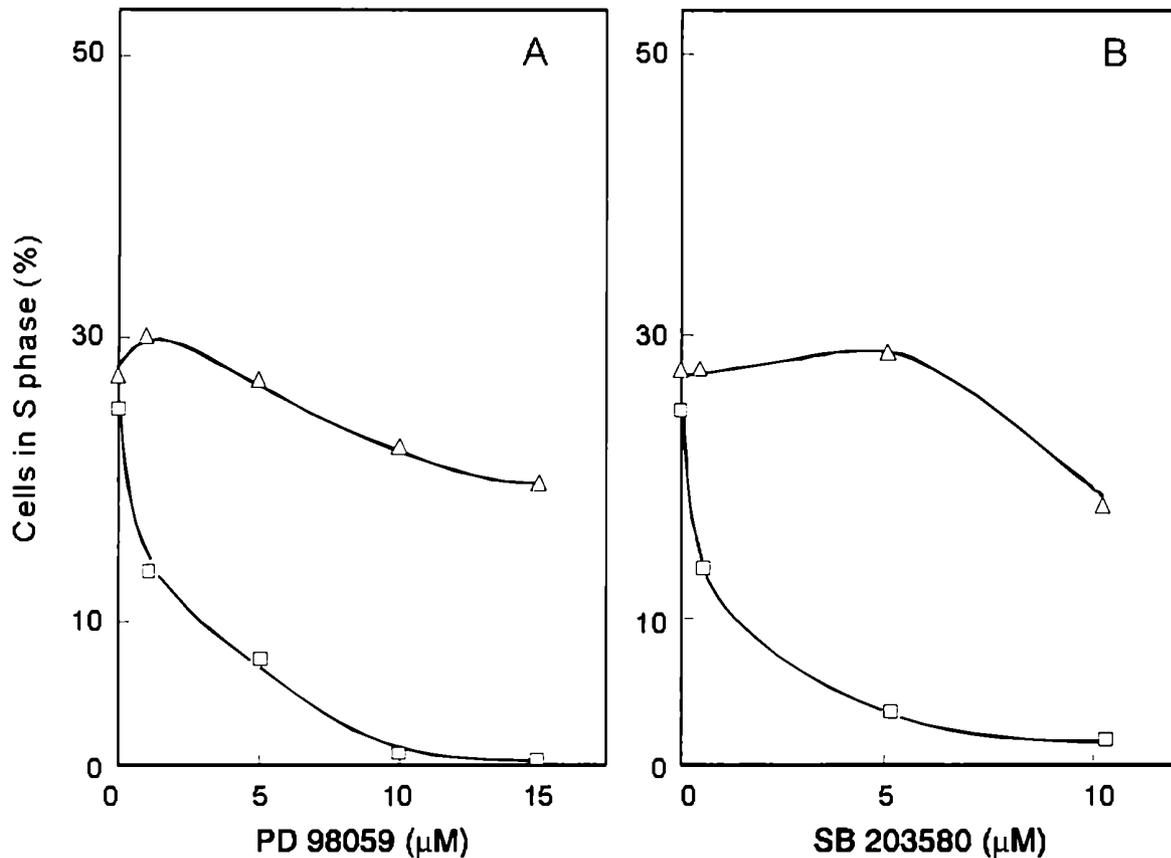


Figura 11: Síntesis de ADN inducido por LIF o PGF_{2α} en presencia de inhibidores de p38^{MAPK} (SB 203580) o MEK (PD 98059).

Las células Swiss 3T3 fueron pretratadas con concentraciones crecientes de PD 98059 (panel **A**) o SB 203580 (panel **B**) durante 1 hora, como se muestra en el eje de abscisas. Posteriormente las células fueron estimuladas con: LIF (Δ), PGF_{2α} (!), en presencia de metil [³H] timidina. El porcentaje de núcleos marcados se determinó a las 28 horas posteriores, por autorradiografía. Los resultados son medias de triplicados de campos conteniendo 600 células aproximadamente cada uno.

El LIF estimula la síntesis de ADN a través un mecanismo independiente de la activación de PKA:

Se realizaron una serie de experimentos con el objetivo de determinar si el LIF es capaz de inducir mecanismos de señalización dependientes de AMPc, o bien, si estos mecanismos inhiben o potencian la síntesis de ADN estimulada por LIF.

El H-89, es un inhibidor selectivo de la proteína quinasa A (PKA) (Geilen, et al. 1992). El PKI es un péptido de 20 aminoácidos que se une a la subunidad catalítica de la PKA, inhibiendo su función (Knighton, et al. 1991). El agregado de una u otra de dichas drogas, a concentraciones de 2, 5 y 10 μM en el caso de H-89, y 2, 4 y 5 μM en el caso de PKI, no produjo el bloqueo del efecto del LIF (Fig: 12A y B triángulos). Sin embargo a concentraciones mas altas, se pudo constatar un efecto inhibitorio. Utilizando H-89 o PKI a bajas concentraciones (2-4 μM) sobre células estimuladas con LIF y PGE1, o LIF y FK, se observó inhibición de la potenciación descrita en el punto anterior. (2-4 μM) (Fig: 12A y B círculos y cuadrados)

Se concluye que el LIF ejerce su efecto mitogénico independiente del aumento de AMPc y la activación de la PKA. Sin embargo, la potenciación del efecto del LIF por agentes que elevan los niveles de AMPc podría deberse en parte, o totalmente, a mecanismos dependientes de PKA.

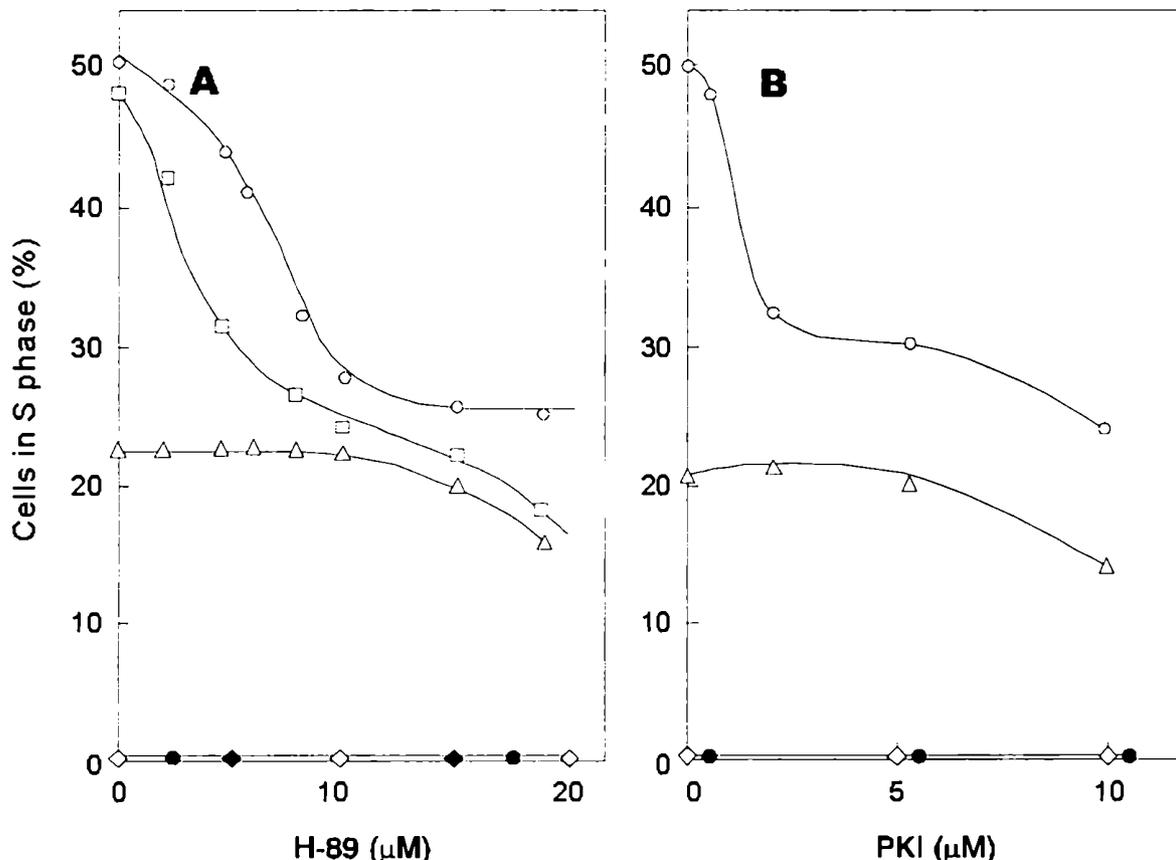


Figura 12: Síntesis de ADN inducido por LIF o $\text{PGF}_{2\alpha}$ en presencia de inhibidores de PKA. Las células Swiss 3T3 fueron pretratadas con concentraciones crecientes de H-89 (panel A) o PKI (panel B) durante 1 hora, como se muestra en el eje de abscisas. Posteriormente las células fueron estimuladas con LIF(Δ), LIF+PGE1(O), LIF+Forskolina (-), en presencia de metil [^3H] timidina. El porcentaje de núcleos marcados se determinó a las 28 horas posteriores, por autorradiografía.

El aumento de la concentración intracelular de AMPc potencia la síntesis de ADN inducida por LIF

Tanto el 8-bromo cAMP (0.5 mM), un análogo de AMPc, como la forskolina (FK) (30uM), un activador de la adenilato ciclasa, producen un aumento de los niveles de AMPc, sin embargo, por si solos no son capaces de inducir síntesis de ADN en estas células. Ambos, son capaces de amplificar marcadamente la respuesta mitogénica del LIF (de 25 a 50% en el caso del 8Br-cAMP y de 25 a 54% en el de la FK). El IBMX (50uM), que previene la degradación de AMPc mediante la inhibición de la actividad de fosfodiesterasa de AMPc, sólo ejerció una acción marginal en la potenciación del LIF. El agregado de FK (300uM) junto con IBMX (50uM) causó una mayor amplificación en la respuesta mitogénica del LIF que aquella observada con el LIF junto con la FK. La PGE1 (50ng/ml) no posee efecto mitogénico en estas células, sin embargo potencia la acción del LIF (Tabla 2). La PGE1 incrementa la concentración de AMPc, siendo capaz de activar a la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) .

Estos resultados demuestran que la acción mitogénica del LIF es potenciada por factores que aumentan los niveles de AMPc. El LIF no es capaz de aumentar los niveles de AMPc, ni modificar los niveles de AMPc inducidos por la FK, PGE1 o IBMX (estos experimentos fueron realizados en colaboración con el Dr. Piñataro).

Additions	Cells in in S Phase - (%)	AMPc (pmol/mg of protein)
Control	0.8	22.1
LIF	27.9	23.9
IBMX (50uM)	0.8	74.8
PGE1	0.9	150.7
FK (30uM)	0.7	99.8
PGE1 + IBMX	0.8	167.6
LIF + PGE1	52.8	140.7
LIF + FK	50.2	89.2
LIF + IBMX	42.1	77.9
LIF + IBMX + PGE1	55.8	154.4
LIF + IBMX + FK	58.2	Nd

Tabla 2: Efecto del LIF solo o con agentes que modifican los niveles intracelulares de AMPc.

Las adiciones fueron las siguientes: FK (30uM), LIF (100ng/ml), IBMX (50uM), PGE1 (100ng/ml). El porcentaje de células con núcleos marcados se determinó a las 28 horas, por autorradiografía. Los resultados son medias de cuantuplicados de campos conteniendo 600 células aproximadamente cada uno. Las determinaciones de AMPc fueron hechas luego de 20 min de agregado los estímulos.

La iniciación del ciclo celular en células Swiss 3T3 en cultivo inducida por LIF podría involucrar un mecanismo regulatorio no descrito anteriormente

Numerosos estudios en cultivos celulares han demostrado que la progresión desde la fase G₀

hasta la fase S, depende de la actividad de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Estas quinasas son las Cdk4 y Cdk6, y son activadas al formar complejos con las ciclinas D (ciclina D1, D2, y D3), inducidas en la fase G₁. Se considera a las ciclinas D como "sensores" del medio extracelular, ya que a partir de un estímulo mitogénico, se induce su expresión. Los complejos activados ciclina D-Cdk4 y ciclina D-cdk6, catalizan la fosforilación de la proteína Rb. Teniendo en cuenta que el LIF es capaz de inducir síntesis de ADN en células Swiss 3T3 en cultivo mediante mecanismos de señalización independientes de PKC, isoprenilación de proteínas, MEK1/2 y p38^{MAPK}; y que muchos de estos mecanismos de señalización son activadores de la expresión de ciclina D1, se decidió estudiar los reguladores positivos del ciclo celular (ciclinas y CDKs) durante el ingreso a la fase G₁ estimulado por LIF. Se decidió además, comparar los mecanismos regulatorios del ciclo celular inducidos por LIF con aquellos inducidos por la PGF_{2α}.

Se estimularon células Swiss 3T3 arrestadas y confluentes durante distintos lapsos con PGF_{2α} o LIF (Fig: 13) y a continuación se determinaron los niveles de ciclinas mediante la técnica de Western blot. La PGF_{2α} es capaz de estimular la expresión de las proteínas ciclinas D1 y D2, como se indicó anteriormente. Sorprendentemente, el LIF no fue capaz de estimular la expresión de ciclina D1 ni de ciclina D2 (Fig: 13). Los niveles de ciclina D3 fueron semejantes en células tratadas por LIF, PGF_{2α} o no tratadas. Además, los niveles de Cdk4 y Cdk6 permanecieron constantes tanto en células no tratadas como en aquellas tratadas con LIF o PGF_{2α} (Fig: 13)

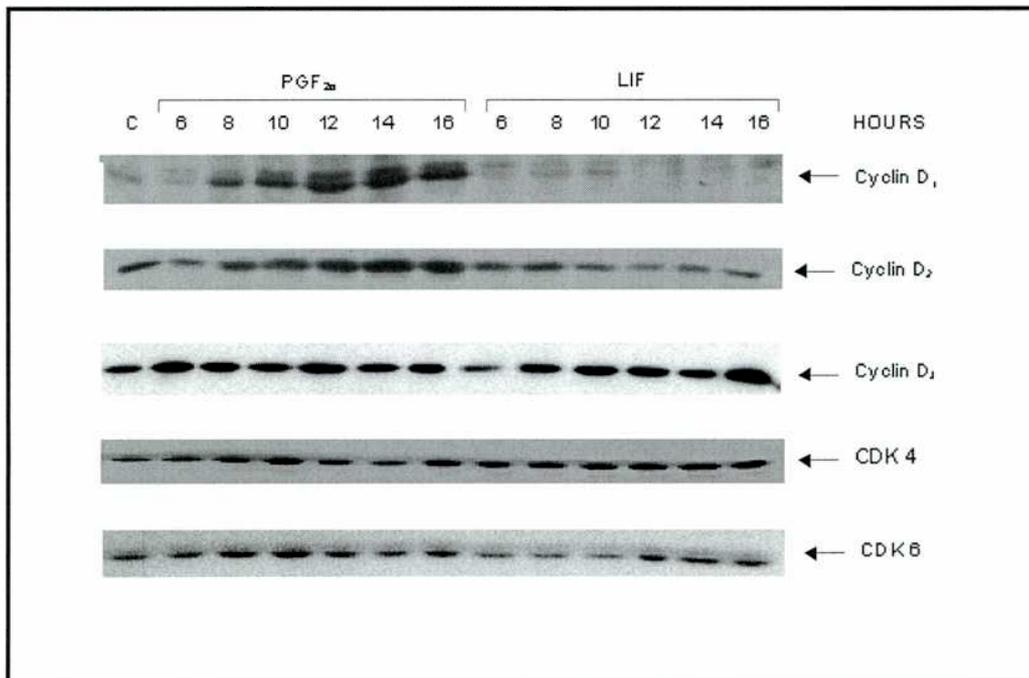


Figura 13: Regulación de la expresión de ciclina D1, ciclina D2, ciclina D3, CDK4 y CDK6 inducidos por PGF_{2α} o LIF

Las células Swiss 3T3 confluentes y quiescentes fueron cultivadas en condiciones control (C); con LIF (100ng/ml) o PGF_{2α} (300ng/ml) durante los tiempos indicados en la figura y se determinaron los niveles de proteínas correspondientes a ciclina D1, D2, D3, CDK4 y CDK6 utilizando anticuerpos específicos, por Western blot. Los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes

Estos resultados indican que el LIF induce síntesis de ADN, de forma independiente a la expresión de ciclina D1, D2 y D3. A diferencia de la mayoría de los mitógenos, como la $PGF_{2\alpha}$, que son capaces de inducir la expresión de una o varias ciclinas D. Además, los niveles de quinasas dependientes de ciclinas D permanecieron constantes.

Acción diferencial de distintas citoquinas en la inducción de síntesis de ADN

El objetivo de la serie de experimentos que se describen a continuación, fue determinar si otras citoquinas pertenecientes a la misma familia ejercen su efecto mitogénico mediante mecanismos de señalización semejantes al del LIF.

En la figura 14 se muestran los efectos del LIF, la Oncostatina M (OSM), el Factor neurotrófico ciliar (CNTF) y la Interleuquina 6 (IL-6) sobre la iniciación de la síntesis de ADN en células quiescentes Swiss 3T3. Tanto el LIF (100ug/ml) como la OSM (100ug/ml) causaron un incremento similar del porcentaje de células que ingresan a fase S, mientras que el CNTF(100ng/ml) y la IL-6 (100ng/ml), no tuvieron efecto sobre este parámetro (Fig: 14).

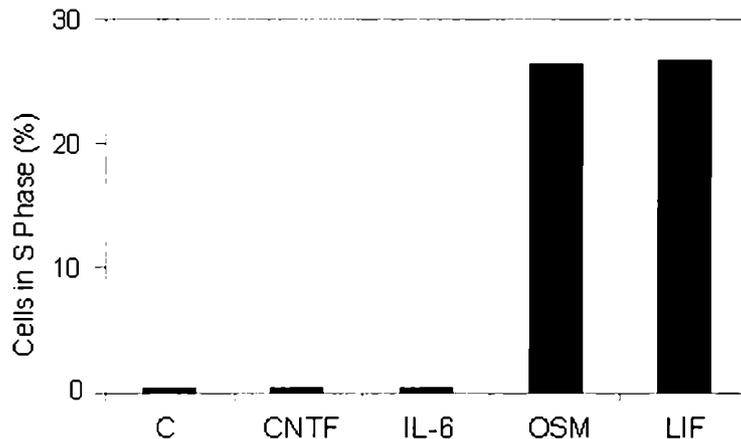


Figura 14: Síntesis de ADN inducido por distintas citoquinas pertenecientes a la familia de IL-6:

Las células Swiss 3T3 fueron estimuladas con LIF, IL-6, CNTF o OSM, como se indica en la figura, en presencia de metil [3H] timidina. La determinación del porcentaje de células en fase S fue determinado como se describe en materiales y métodos.

Potenciación del efecto mitogénico del LIF y la OSM por PGE1 e insulina.

Se estudio el efecto mitogénico del LIF y la OSM a distintas concentraciones, en presencia de prostaglandina E1 (PGE1) y/o insulina en células quiescentes Swiss 3T3 (Fig: 15).

El LIF y la OSM adicionados a varias concentraciones entre 10 y 100ng/ml causaron un progresivo incremento del porcentaje de células que entran en fase S, llegando a un máximo de 30% de células en fase S, a una concentración de 60ng/ml. La Insulina y la PGE1, amplificaron marcadamente tanto la acción mitogénica del LIF como de la OSM. Además, tanto la insulina como la PGE1, como la combinación de ambas, modificaron notablemente la concentración de LIF o de OSM requeridas para alcanzar un máximo de células en fase S de 100ng/ml (células no tratadas ni con PGE1 ni con insulina) a 20ng/ml (células tratadas con PGE1 o insulina) (Fig: 15).

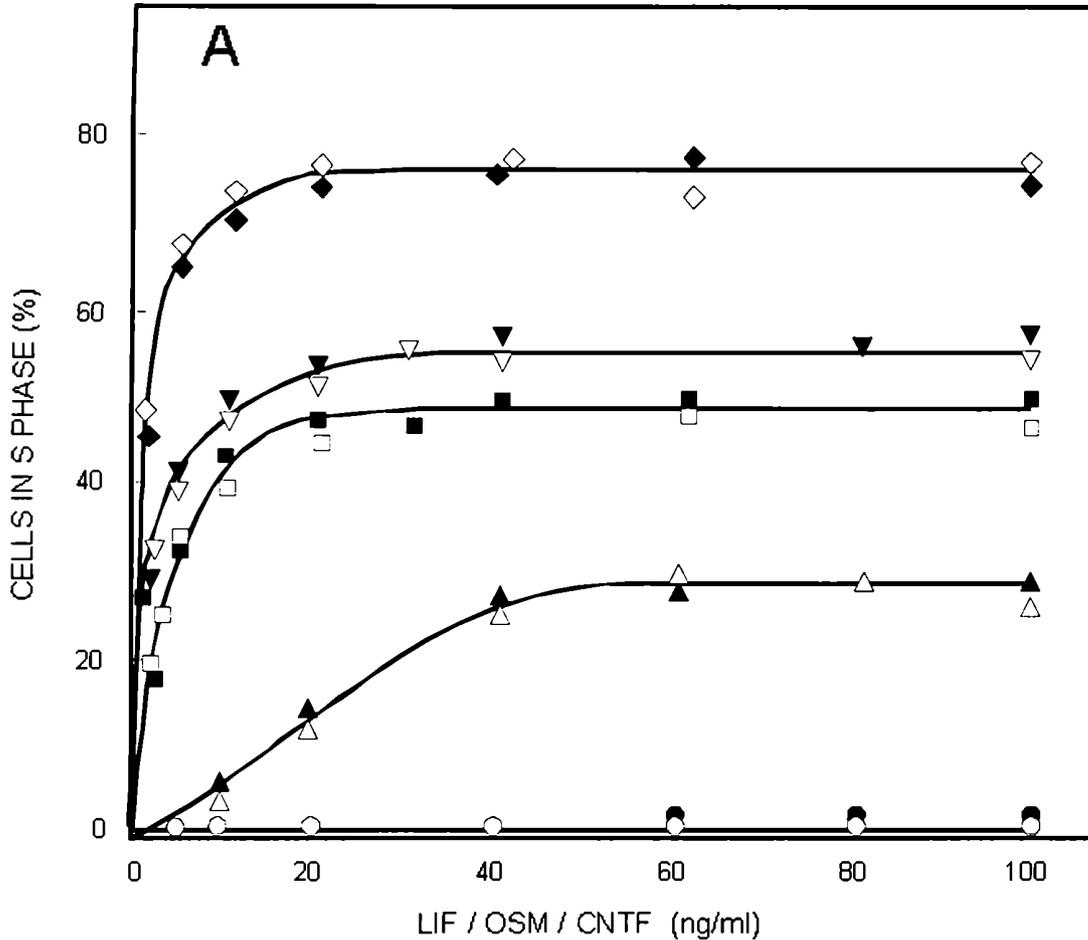


Figura 15: Síntesis de ADN inducido por el LIF, la OSM y el CNTF en presencia o ausencia de la insulina y la PGE1.

Las células Swiss 3T3 fueron estimuladas con concentraciones crecientes de las distintas citoquinas, como se indica en el eje de abscisas. Las adiciones fueron las siguientes: (Δ) LIF; (▲) OSM; (!) LIF+PGE1 (50ng/ml); (■) OSM+PGE1 (▽) LIF+Insulina (50ng/ml); (▼) OSM+Insulina, (◇) LIF+Insulina+PGE1, (◆) OSM+Insulina+PGE1; (●) PGE1+Insulina, (○) CNTF+Insulina+PGE1. Las células fueron marcadas con metil [³H] timidina de 0 a 28 horas. El porcentaje de células en fase S, por autoradiografía, fue determinado como se describe en materiales y métodos.

El hecho de que la inducción de síntesis de ADN mediada por LIF en presencia de concentraciones saturantes de insulina se ve potenciada con el agregado de PGE1, estaría indicando que el mecanismo amplificador de la PGE1 difiere del de la insulina.

No se observó efecto mitogénico del CNTF debido a que probablemente las células Swiss 3T3, de fenotipo fibroblástico, carezcan de receptores para este factor. Sólo han sido encontrados receptores de CNTF en sistema nervioso.

Acción de la IL-6 sobre la inducción de síntesis de ADN

Se investigó si factores no mitogénicos, tales como PGE1 o insulina, capaces de sinergizar con mecanismos de señalización estimulados por el LIF o la OSM, son capaces de sinergizar con mecanismos de señalización estimulados por IL-6 (Fig: 16A).

Como se indico anteriormente, la IL-6 no es mitogénica en Swiss 3T3. Se observó que la IL-6 y PGE1, conjuntamente, son capaces de inducir la síntesis de ADN en dichas células. Por otro lado, si bien el agregado conjunto de IL-6 e insulina no estimuló la síntesis de ADN, la insulina fue capaz de amplificar el efecto de IL-6 y PGE1 juntas (Fig: 16A).

El siguiente paso fue determinar si la acción de la IL-6 se produce a través de mecanismos compartidos con la vía de señalización del LIF. Se observó que el efecto mitogénico del LIF no es modificado por el agregado de IL-6 (Fig: 16 inserto).

Por lo tanto, la IL-6 si bien no es mitogénica en células Swiss 3T3, a diferencia del CNTF, el agregado conjunto de PGE1 e insulina, posibilita la entrada en fase S. No podemos concluir en base a estos experimentos que la IL-6 comparte parte de los mecanismos de señalización estimulados por el LIF o la OSM, sin embargo, todas estas citoquinas, son capaces de complementarse con mecanismos de señalización estimulados por la Insulina y la PGE1.

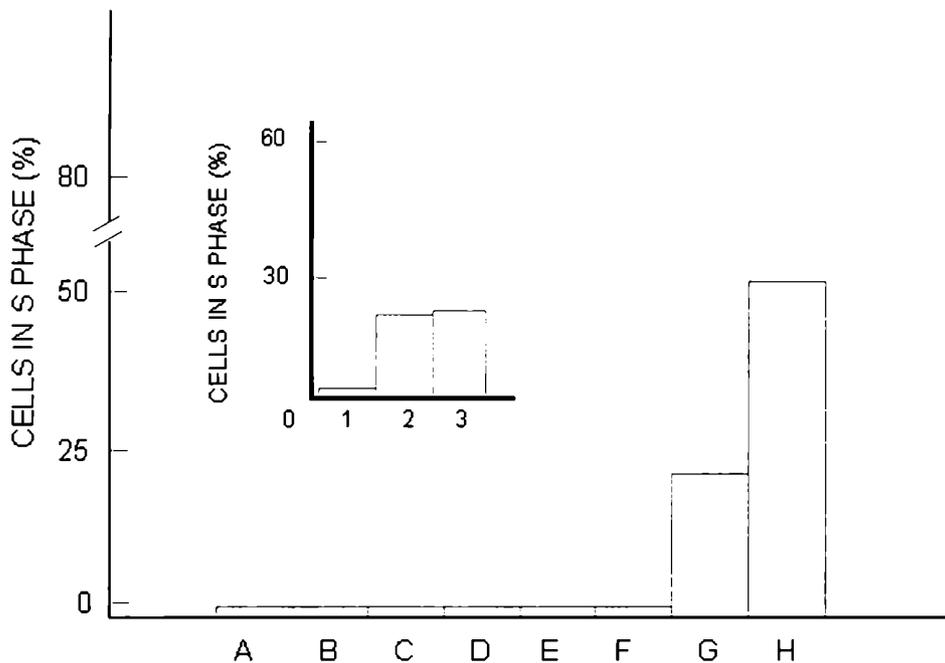


Figura 16: Síntesis de ADN inducido por la IL-6 en presencia de PGE1 e insulina: Síntesis de ADN inducida por la IL-6 (100ng/ml) en presencia o ausencia de insulina y PGE1: a) control; b) Insulina (50ng/ml), c) PGE1 (50ng/ml) d) Insulina+PGE1, e) IL-6 (100ng/ml); f) IL-6+Insulina; g) IL-6+PGE1; h) IL6+Insulina+PGE1. Inserto 1) control; 2) LIF (100ng/ml)+IL-6 y 3) LIF (100ng/ml)+iL-6. Las células fueron marcadas con metil [³H] timidina de 0 a 28 horas. El porcentaje de células en fase S, por autoradiografía, fue determinado como se describe en materiales y métodos.

Relación entre las vías de señalización del LIF y de la OSM.

Se investigó si la estimulación por LIF, es afectada por la presencia de OSM, tanto a concentraciones sub-saturantes como saturantes.

El LIF y la OSM adicionados conjuntamente a concentraciones sub-saturantes tuvieron un efecto aditivo sobre la inducción de la entrada en la fase S. Sin embargo, el agregado de LIF en combinación con OSM, ambos a concentraciones que resultan saturantes cuando se agregan individualmente, no indujo un mayor aumento en el porcentaje de células en fase S que aquel estimulado por cada citoquina (Fig: 17).

Además, la sinergia de cada una de estas dos citoquinas, con la $PGF_{2\alpha}$ sobre la iniciación de síntesis de ADN se observó tanto a concentraciones subsaturantes como saturantes (Fig: 17).

Estos resultados, junto con los resultados anteriores, sugieren que el LIF y la OSM inducen la síntesis de ADN posiblemente a través de un mecanismo común de señalización intracelular.

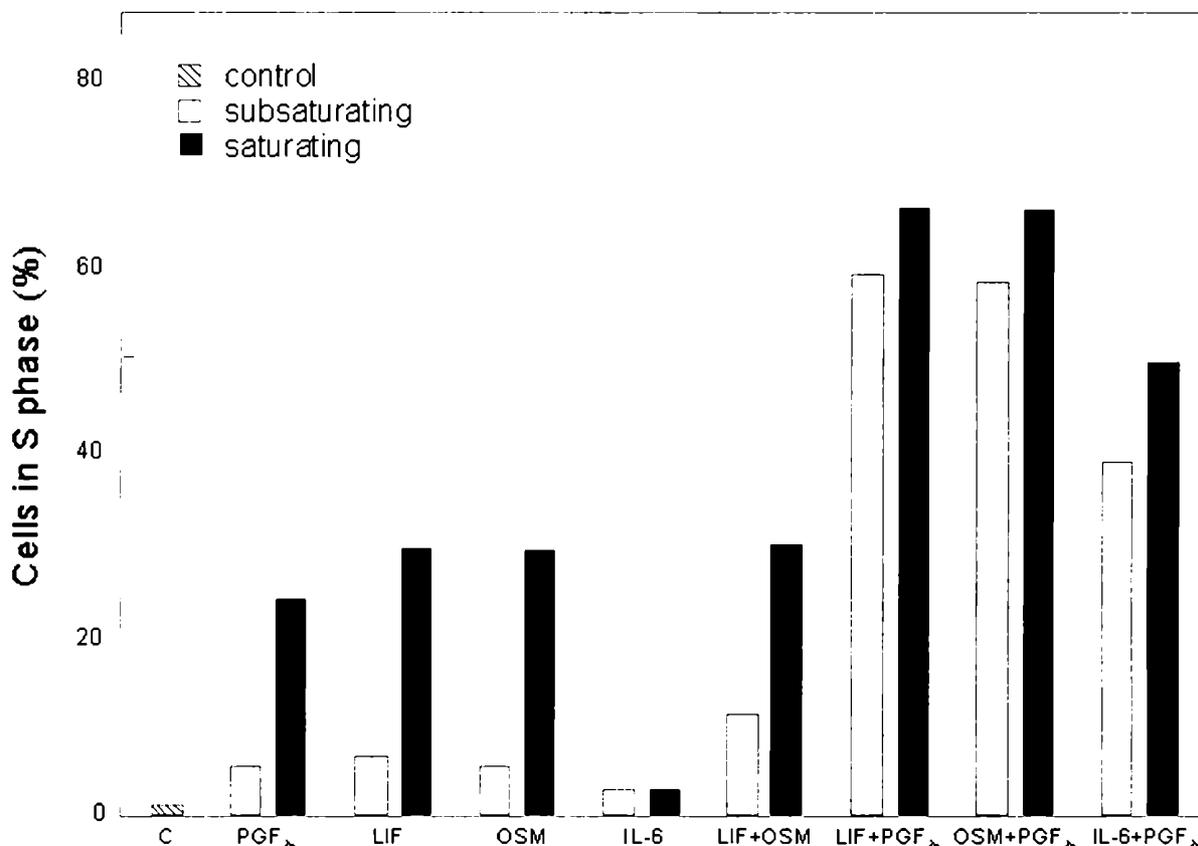


Figura 17: Síntesis de ADN inducido por LIF, OSM, IL-6, $PGF_{2\alpha}$, o sus combinaciones, a concentraciones subsaturantes o saturantes:

Las células Swiss 3T3 fueron estimuladas con las distintas citoquinas y/o $PGF_{2\alpha}$ como se muestra en el eje de abscisas, en presencia de metil [3H] timidina durante 28 horas. Las concentraciones subsaturantes fueron las siguientes: $PGF_{2\alpha}$: 30ng/ml; LIF: 10ng/ml; OSM: 10ng/ml; IL-6: 10ng/ml. Las concentraciones saturantes fueron las siguientes: $PGF_{2\alpha}$: 300ng/ml; LIF: 100ng/ml; OSM: 100ng/ml; IL-6: 100ng/ml. El porcentaje de núcleos marcados se determinó por autorradiografía. Los resultados son medias de cuatriduplicados de campos conteniendo 600 células aproximadamente cada uno.

Translocación nuclear de la STAT1 dependiente de la estimulación con LIF

Las STATs (transductores de señales y activadores de la transcripción) pertenecen a una familia de proteínas activadas por fosforilación en un residuo de tirosina, por acción de las proteínas quinasas de tirosina llamadas JAK. Esta fosforilación permite la formación de homo o heterodímeros de STAT que, posteriormente, migran hacia el núcleo, funcionando allí como factores de transcripción. Un gran número de citoquinas, interactúan con sus receptores específicos e inducen la fosforilación y subsecuente activación de STATs.

La cinética de translocación al núcleo de STAT1 estimulada por LIF, reveló que tan sólo en 3 min se produjo una translocación detectable de STAT1 hacia el núcleo, llegando a una máximo de translocación a los 15 min y declinando completamente luego de 1 hora de estímulo.

La inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-STAT1 en células Swiss 3T3 no confluentes demostraron que la proteína STAT1 fue preferencialmente localizada difusamente en el citoplasma, sin observarse una señal nuclear. Las adiciones de LIF, OSM, IL-6, CNTF o $\text{PGF}_{2\alpha}$ indujeron respuestas diferenciales de la inmunolocalización de la STAT1. El LIF y la OSM a 100ng/ml durante 15 min estimularon la aparición de un alto porcentaje de células que presentaban la STAT1 en el núcleo. (Fig: 18) mientras que la IL-6, que no es mitogénica en estas células, indujo una translocación detectable de STAT1 al núcleo, únicamente en una pequeña proporción de células. Esta proporción se mantuvo con el agregado de IL-6 junto con PGE1 e insulina (en este caso el agregado conjunto de IL-6, PGE1 e insulina, inducen mitogénesis, como se indicó en experimentos anteriores). Contrariamente, ni $\text{PGF}_{2\alpha}$ ni CNTF fueron capaces de estimular la translocación de STAT1 hacia el núcleo.

Es posible concluir que tanto el LIF como la OSM, a diferencia de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, inducen la translocación de STAT1 a núcleo.

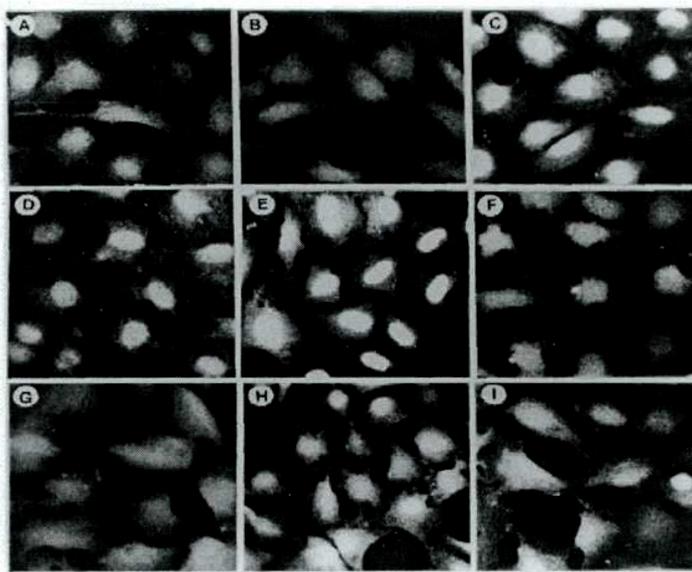


Figura 18: Translocación nuclear de STAT1

La translocación nuclear de STAT1 en células Swiss 3T3 no confluentes y quiescentes, fueron detectadas por inmunofluorescencia indirecta, con anticuerpos anti-STAT1, luego de distintos tiempos, a partir de los siguientes estímulos: a) Control 15 min., b) $\text{PGF}_{2\alpha}$ (300ng/ml) 15 min; c) OSM (100ng/ml) 15 min.; d) LIF LIF 1min. (100ng/ml); e) LIF 15 min. (100ng/ml); f) LIF 1 hora; g) Insulina (50ng/ml) más PGE1 (50ng/ml) 15 min.; h) IL-6 (100ng/ml) 15 min. y i) IL-6 más la insulina y PGE1 15min. (amplificación 400x original).

Translocación nuclear de la STAT3 y STAT5 luego de distintos estímulos.

Se estudio la acción del LIF, así como de la $PGF_{2\alpha}$, sobre la translocación desde el citoplasma hacia el núcleo de las STATs 3 y 5. Los resultados muestran que el LIF no fue capaz de translocar ni la STAT3 ni la STAT5 a núcleo. En estos experimentos, no existe un control positivo de translocación de estas STATs, por lo tanto, se requiere de futuros experimentos para determinar si los anticuerpos utilizados, son específicos para la STAT3 y STAT5 (fig: 19).

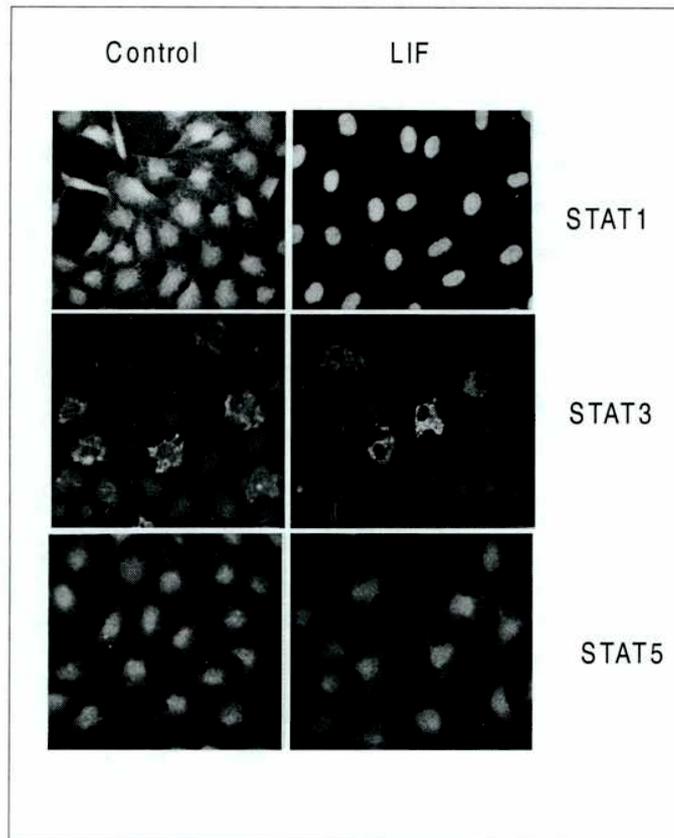


Figura 19: Translocación nuclear de STAT1, STAT3, STAT5.

La translocación nuclear de STAT1, STAT3, STAT5, en células Swiss 3T3 no confluentes y quiescentes, fueron detectadas por inmunofluorescencia indirecta, con anticuerpos anti-STATs, luego de 15 min. a partir de los siguientes estímulos: primera columna: células control, segunda columna: células estimuladas con LIF (100ng/ml)-

Los resultados presentados fueron realizados con una línea celular Swiss 3T3, por lo que se debe ejercer prudencia en la extrapolación de los mismos a otras líneas celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS:

A) MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CÉLULARES DE RATÓN SWISS 3T3:

Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en placas de Petri de 10 cm. de diámetro con 10 ml de medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) conteniendo 100 ug/ml de streptomocina, 60 ug/ml de penicilina y 10% de suero fetal bovino. Los cultivos fueron incubados en estufas con atmósfera húmeda a 37° y 10% de P_{CO_2} . Al tercer día se realizó un cambio de medio y al séptimo se repicaron para la realización de los ensayos experimentales.

B) CONDICIONES DE CULTIVO PARA LOS ENSAYOS EXPERIMENTALES:

1) Medición de la síntesis de ADN por autorradiografía

Se sembraron $1 \cdot 10^5$ células en placas de petri de 3,5 cm de diámetro con 2 ml de medio de cultivo (2/3 de DMEM + 1/3 de Waymouth) conteniendo 100 ug/ml de streptomocina, 60 ug/ml de penicilina, 6% de suero fetal bovino y 1% de suero de ternero recién nacido. Luego de tres días se cambio el medio por otro igual. Al cabo de cuatro días aproximadamente, las células se encuentran confluentes y aquietadas para comenzar con los experimentos.

2) Ensayo de Western blot

Se sembraron $3 \cdot 10^5$ células en placas de Petri de 10 cm de diámetro con 10 ml de medio de cultivo (2/3 de DMEM y 1/3 de Waymouth) conteniendo 100 ug/ml de estreptomocina, 60 ug/ml de penicilina, 6% de suero fetal bovino y 1% de suero de ternero recién nacido. Luego de 3 días se cambio el medio por otro igual. Al cabo de cuatro días las células se encuentran confluentes y aquietadas (no se observaron figuras mitóticas).

3) Ensayos de Northern blot

Igual que en el punto anterior.

4) Ensayo de retromodulación de PKC:

Se sembraron $3 \cdot 10^5$ células en placas de Petri de 10 cm de diámetro con 10 ml de medio de cultivo (2/3 de DMEM y 1/3 de Waymouth) conteniendo 100 ug/ml de estreptomocina, 60 ug/ml de penicilina, 6% de suero fetal bovino y 1% de suero de ternero recién nacido. Luego de 3 días se cambio el medio por otro igual conteniendo TPA (800 nM). Al cabo de cuatro días las células se encuentran confluentes y aquietadas (no se observaron figuras mitóticas). Antes de realizar las estimulaciones se lavaron las placas 2 veces con DMEM a $37^{\circ}C$ y se agregaron 10ml de medio condicionado.

5) Ensayos de inmunofluorescencia

Se sembraron $1 \cdot 10^5$ células en placas de Petri de 3,5 cm de diámetro conteniendo un cover slip de 20mm con 2 ml de medio de cultivo (2/3 de DMEM + 1/3 de Waymouth) conteniendo 100 ug/ml de estreptomocina, 60 ug/ml de penicilina, 6% de suero fetal bovino y 1% de suero de ternero recién nacido. Luego de tres días se cambió el medio por otro conteniendo 1% de suero fetal bovino y 0,5 % de suero de ternero recién nacido. Al cabo de dos días las células se encuentran aquietadas aunque no llegan a confluencia (no se observa figuras mitóticas)

C) ENSAYO DE SINTESIS DE ADN POR AUTORADIOGRAFIA:

Se agregó junto con el o los estímulos, metil [3H] timidina (18 Ci/mmol) obteniéndose una

concentración final de 3 uCi/ml, 1uM. La reacción se detuvo con el agregado de solución fisiológica (2 lavados), ácido tricloroacético (TCA) al 5% (2 lavados) a 4° C y luego se lavo 2 veces con etanol absoluto. A las placas secas se les agrego solución mordiente (1 lavado). Al día siguiente se colocó un film sensible al ³H y las placas permanecen en oscuridad y atmósfera seca (silicagel) durante 4 días. Después del revelado (4 min.) y fijado (4 min.) las placas fueron teñidas con colorante Giemsa. Finalmente se analizo por conteo de los núcleos marcados y no marcados, al microscopio óptico (se contaron por lo menos 3 campos por placa, cada uno de ellos con alrededor de 300 células

D) EXTRACCIÓN DEL ARNm TOTAL y NORTHERN BLOT

El RNA total de los cultivos Swiss 3T3 se extrajo como se describió previamente (Chomezynsky y Sacchi, 1987)(Current protocols in Molecular Biology Vol. 1, Eds. Frederick Ausubel, et. al. 1990). La transferencia del ARN de los geles conteniendo formaldehído a membrana de nylon y la subsecuente hibridación se realizaron en las condiciones especificadas por los fabricantes (bio-). Los resultados se encuentran normalizados usando una sonda que reconoce el ARN de 18S. Las sondas que se utilizaron para la detección de los ARNm específicos y el 18S se marcaron usando un sistema primers al azar. La cuantificación de las bandas se realizó con el programa ImageQuant (molecular Dynamics).

E) MEDICION DE LOS NIVELES DE PROTEINAS y WESTERN BLOT

Luego de las estimulaciones se colocaron las placas sobre hielo y se lavaron 2 veces con PBS conteniendo vanadato de sodio 100 uM a 4· C. Las células fueron extraídas con solución PBS. Posteriormente centrifugadas a 2000g durante 10min. El pelet fue resuspendido en 100ul de solución tampón RIPA (Tris HCl pH: 7,8, 20mM, NaCl 150mM, Na₃VO₄ 200μM, EDTA 2mM, NaF 50mM, NP40 1%, deoxi colato 1%, SDS 0,1%, PMSF 50uM). El extracto obtenido fue centrifugado a 15.000g en una microcentrifuga a 4· C por 30 min. El sobrenadante fue analizado por SDS-PAGE en mini geles al 12%. El gel obtenido fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. La electrotransferencia se realizó en solución T (glicina 14,4g, Tris Base 3g, SDS 1g, metanol 200ml, H₂O h/1litro) durante 1 hora a 100V a 4· C. La membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada 3,5%. durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Luego se incubó con el anticuerpo específico, diluido en solución de bloqueo (1/5000) a TA. Al cabo de 1 hora se realizaron 3 lavados de 10 min en solución PBS-0,15%Tween 20 . La membrana se incubó con anticuerpo anti el anticuerpo específico diluido en la solución de bloqueo por 1 hora. Se lava 3 veces. Una vez que la membrana estuvo seca se proceso para autorradiografía por ECL (Amersham).

F) ENSAYO DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA

Luego de el o los estímulos, las células fueron fijadas y permeabilizadas con 3,7% de formaldehído en PBS por 10min., a temperatura ambiente. Luego se realizaron tres lavados con PBS, posteriormente fueron tratadas durante 2min. con una solución metanol/acetona (1:1). Se realizó un lavado de 5min con PBS-0,1%Tween 20. Las células fueron bloqueadas durante 30min. con suero de cabra inactivado por calor (10%), y posteriormente se incubo durante toda la noche con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-STAT1, anti-STAT3 o anti-STAT5 (25ug/ml, transduction Laboratories) y saponina (0,1%). Al día siguiente, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y posteriormente incubadas con un anticuerpo anti-Igs de ratón hecho en cabra conjugado con isotiocianato de fluoreseina diluido 1/50 en PBS durante 60min. Finalmente, las células fueron lavadas tres veces con PBS, y luego montadas con una solución DABCO y la expresión del antígeno fue examinada con un foto-microscopio equipado con un epifluorescencia.

COMPUESTOS BIOQUÍMICOS UTILIZADOS:

La $\text{PGF}_{2\alpha}$ y la PGE_1 fueron generosamente cedidas de la Dra. Mary Torkelston, Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan. El $\text{TGF-}\beta_1$ fue obtenido de R&D Minneapolis. La metil [^3H] timidina (18 Ci/mmol) fue obtenida de New England Nuclear. Los anticuerpos anti- ciclina D1, D2, D3, CDK4 y CDK6 fueron obtenidos de Santa Cruz. Los anticuerpos secundarios para Western Blot fueron obtenidos de DACO. Los anticuerpos anti- STAT1, 3 y 5 fueron obtenidos de Transduction Signaling. El LIF fue obtenido por Sigma Chemical Company y R&D, y por Sigma Chemical Company, el A23187 fue generosamente cedido por el Dr. Santa Coloma y por ,y los otros compuestos fueron obtenidos de Sigma Chemical Company, USA.

DISCUSIÓN

PRIMERA PARTE

Mecanismos de señalización dependientes de $\text{PGF}_{2\alpha}$, capaces de inducir expresión de Ciclina D1

En los mamíferos la determinación de una célula para iniciar la replicación del ADN y dividirse, diferenciarse, iniciar un programa de muerte celular o abandonar el ciclo celular entrando a un estado de quiescencia (G_0), tiene lugar durante la fase G_1 (Pardee, 1989). Esta determinación del destino de la célula se designa globalmente como "compromiso celular" (La expresión utilizada en lengua inglesa es *cell commitment*) y esta mediada en gran parte por factores de crecimiento y factores no mitogénicos que se encuentran en el medio extracelular (Bartek, et al. 1996; Lukas 1996; Pardee, 1989; Sherr et al. 1995; Zetterber et al. 1995). El proceso de determinación se da a partir de la integración de señales intracelulares y extracelulares tanto positivas como negativas, involucrando múltiples cascadas de señalización que lleva fundamentalmente, al encendido o apagado de genes (Marshall, 1996; Marshall 1998; Sherr, 1994). Tanto las vías de transducción de señales como las moléculas que regulan el ciclo celular, son de gran interés para las ciencias biomédicas (Bartek, 1996; Lukas 1996; Harper, et al. 1996; Sherr, 1994). El estudio del fenómeno de compromiso celular durante G_1 y su regulación es relevante para la comprensión de procesos biológicos tan diversos como la proliferación celular, inhibición temporal del ciclo celular para posibilitar la reparación del ADN, estado de quiescencia en respuesta a privación de factores de crecimiento, diferenciación terminal, senescencia o muerte celular (Bartek, et al. 1996; Lukas 1996; Harper, et al., 1996; Sherr, 1994; Strauss, 1995; Winston 1993). Por otro lado, un desajuste en la función celular durante la fase G_1 puede llevar a una proliferación celular descontrolada y/o inestabilidad genética, causales del desarrollo de cáncer y otras enfermedades (Harper 1996; Hunter, et al. 1994; Strauss, et al. 1995; Tam, et al. 1994).

La proliferación celular está gobernada por una red compleja de señales extracelulares (ej: factores de crecimiento), y señales intracelulares que actúan sobre la maquinaria del ciclo celular a través de distintos mecanismos de señalización. Los reguladores positivos del ciclo celular son las ciclinas y CDKs. En particular, las ciclinas D y las Cdk4/6 han sido postuladas como proteínas reguladoras de la fase G_1 . Las ciclinas D cumplen un rol fundamental en la transducción de señales en la fase G_1 . La presencia de suero en el medio de cultivo induce su síntesis. Debido a su corta vida media, en ausencia de suero tanto el ARNm como la proteína de ciclina D1 son degradados, lo cual se correlaciona con la falta de síntesis de ADN. La sobreexpresión de ciclina D1 acorta la duración de la fase G_1 , disminuye el tamaño celular y reduce, aunque no elimina, la dependencia de mitógeno (Quelle, et al. 1993; Jiang, et al. 1992; Resnitzky, et al. 1994). La microinyección de anticuerpos anti-ciclina D1, o de un plásmido conteniendo el cDNA anti-sentido de ciclina D1 durante la fase G_1 , inhibe el ingreso a la fase S en fibroblastos, mientras que la microinyección en la transición G_1/S , o en tiempos posteriores, no produce ningún efecto (Quelle, et al. 1993; Baldin, et al. 1993). Por lo tanto, la expresión de ciclina D1 durante la fase G_1 es crucial para la progresión a través del ciclo celular. Se considera a las ciclinas D como "sensores" que integran señales extracelulares con la maquinaria del ciclo celular, en respuesta a factores de crecimiento. Existen tres tipos de ciclinas D (ciclina D1, ciclina D2, y ciclina D3) con patrones de expresión bien definidos en los distintos tejidos (Matsushime, et al. 1991). Los tres genes de ciclinas D tienen secuencias muy semejantes, sin embargo difieren en su expresión: algunas células expresan los tres genes de ciclinas (ej. células epiteliales mamarias) (Buckley, et al. 1993), pero muchos tipos celulares expresan sólo uno o dos genes de ciclinas D

(Matsushime, et al. 1991; Xiong, et al. 1991; Motokura, et al. 1991). Los genes de ciclinas D se expresan durante la fase G₁ del ciclo celular con perfiles característicos de acuerdo al tipo celular (Matsushime, et al. 1991; Motokura, et al. 1992; Shibuya, et al. 1992; Ajchenbaum, et al. 1993). Los tres genes humanos de ciclinas D codifican para proteínas pequeñas de 33-34KDa, tienen un promedio de 57% de identidad de la región codificante y un 78% de identidad de la región llamada caja de ciclina ("cyclin box") (Xiong, et al. 1992; Inaba, T. et al. 1992). La ciclina D1 humana, es el producto del proto-oncogen bcl-1/PRAD1, y la sobreproducción de ciclina D1, debido a amplificación génica o a estabilización del ARNm, ha sido correlacionada con muchos tipos de cánceres (Motokura, et al. 1991). La ciclina D1 aparenta tener una función esencial en células que expresan el producto del gen de retinoblastoma (Rb) (Lukas, et al. 1994; Lukas, et al. 1995; Lukas, et al. 1995). Se sabe que la ciclina D1 puede asociarse físicamente a la forma hipofosforilada de la proteína Rb, e inactivar su función, mediante la fosforilación de dicha proteína, por el complejo ciclinaD-CDK (Sherr, et al. 1995; Beijersbergen, et al. 1996).

En este trabajo se demostró que la PGF_{2α} es capaz de aumentar los niveles de ARNm y proteína de ciclina D1 en células Swiss 3T3 y que existe una coincidencia entre el tiempo necesario para alcanzar el máximo en la expresión de ciclina D1 y aquél requerido para alcanzar el compromiso celular hacia la síntesis de ADN estimulado por la PGF_{2α} (fig 1). Estos resultados junto con los reportados para otras líneas celulares utilizando suero u otros mitógenos (Matsushime, et al. 1991), muestran la dependencia de la expresión de ciclina D1 con el compromiso celular, necesario para iniciar la síntesis de ADN.

La PGF_{2α}, es capaz de inducir síntesis de ADN en células Swiss 3T3 mediante múltiples mecanismos de señalización (tesis de la Dra. Mercedes Goin). Es capaz de inducir una respuesta proliferativa en ausencia de otros factores, y su efecto mitogénico se encuentra potenciado por la adición de TGFβ1 (Gomez de Alzaga, et al 1994). El efecto del TGFβ1 sobre la síntesis de ADN en células Swiss 3T3 en cultivo, no es tan solo potenciar la inducción mediada por PGF_{2α} sino también provocar una disminución en el tiempo mínimo de estimulación con PGF_{2α} necesario para iniciar la síntesis (fig. 2, 4, 5). El TGFβ1 no es capaz de inducir expresión de ciclina D1 (fig: 2). Sin embargo, el TGFβ1 es capaz de aumentar los niveles de ciclina D1 estimulados por el OAG o la PGF_{2α}, probablemente, mediante la estabilización del ARNm de ciclina D1 (fig: 2, 5).

Evidencias recientes mostraron que la expresión de ciclina D1 en Swiss 3T3 es estimulada por mecanismos de señalización dependientes de bombesina, y activación de proteína quinasa C (PKC) (Mann et al. 1997). Otras evidencias en células Balb/c 3T3, muestran que el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), preferencialmente incrementa los niveles de ARNm de ciclina D1 vía la activación de PKC, mientras que en células depletadas de PKC, el PDGF puede inducir bajos niveles de ARNm de ciclina D1. Estos resultados sugieren que el PDGF estimula la expresión de ciclina D1 vía eventos independientes de PKC (Winston, et al. 1993). Se decidió indagar que mecanismos de señalización, inducidos por la PGF_{2α}, son capaces de modular la expresión de ciclina D1. Nuestros resultados muestran que la PGF_{2α} induce expresión de ciclina D1 mediante mecanismos de señalización dependientes de PKC, ya que células pretratadas con GF109203X, un inhibidor específico de PKC, inhibe parcialmente la expresión de dicha proteína estimulada por PGF_{2α}, mientras que bajo las mismas condiciones, el OAG (un activador de la PKC), es incapaz de inducir la expresión de ciclina D1 (fig: 7, 8). La PGF_{2α} probablemente es capaz de inducir dicha expresión, además, por mecanismos de señalización dependientes de PTK, mientras que mecanismos de señalización dependientes de calcio, regulan otros eventos aún no determinados. Esto se dedujo mediante la utilización de vanadato de sodio, un inhibidor de fosfatasa de tirosinas, capaz de inducir la expresión de ciclina D1 (fig. 9), mientras que el agregado de ionóforo de calcio, no fue capaz de inducir dicha

expresión (fig. 9) (Sauane, et al. 2000).

SEGUNDA PARTE

Efecto mitogénico del LIF:

1- Mecanismos de señalización involucrados en la inducción de la síntesis de ADN. Sinergia observadas entre los diferentes mecanismos de señalización y el LIF:

El LIF fue originalmente descrito por su habilidad para estimular la diferenciación de células de leucemia M1 murinas hacia granulocitos y macrófagos (Ichikawa, 1969, 1970). En la actualidad, se sabe que el LIF pertenece a una superfamilia de citoquinas multifuncionales, capaces de regular la actividad, la respuesta y el estadio de diferenciación de diversas poblaciones de células (Hilton, 1992). Por ejemplo, el LIF puede estimular la proliferación de células madres embrionarias, células mieloides DA-1a, megacariocitos y mioblastos; induce la síntesis de proteínas de la fase aguda en hepatocitos; es capaz de convertir neuronas simpáticas de fenotipo noradrenérgico a fenotipo colinérgico y aumentar los niveles de plaquetas circulantes (Hilton, 1992; Kishimoto et al. 1995; Metcalf, 1992; Taga, 1996).

El LIF, así como otras citoquinas y factores de crecimiento, es capaz de activar mecanismos de señalización dependientes de JAK/STAT, a partir de la heterodimerización de un receptor específico y una proteína gp130 (Stahl et al. 1994; Taga, et al. 1992). La proteína gp130 se asocia con proteínas quinasas en tirosina llamadas JAK. La activación de JAK mediada por el LIF, promueve la fosforilación y subsecuente activación de STAT1, STAT3 y STAT5. Éstas proteínas son factores transcripcionales, capaces de ser traslocados a núcleo y activar genes específicos (Symes et al. 1997). En trabajos previos (Matsuda et al 1995, 1999), se propuso que existen otros mecanismos de señalización a partir de la activación de gp130, incluyendo el sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1), la quinasa 3 fosfoinositido (PI-3kinase), la proteína quinasa de tirosina asociada a receptor (ejemplo: Hck y Btk), fosfatasa de tirosina SHP2, y ERK 1/2. Este sistema de señalización modular ha sido propuesto para comprender los efectos diversos y pleiotrópicos del LIF y otras citoquinas relacionadas en distintos tipos de células. Un punto importante, por lo tanto, es comprender la contribución de distintas vías de señalización en el efecto mitogénico del LIF en un tipo de células en particular.

Se sabe poco sobre los mecanismos de señalización inducidos por el LIF capaces de desencadenar una respuesta mitogénica, tampoco se sabe, como pueden ser éstos modulados por la acción de otros factores. Hemos estudiado en células Swiss 3T3, varios mecanismos de señalización para determinar si éstos están relacionados con la capacidad del LIF en inducir mitogénesis, poniendo énfasis principalmente en aquellos mecanismos asociados al control de la proliferación celular.

Mecanismos de señalización dependientes de AMPc:

Nuestros resultados revelan que el LIF actúa como mitógeno en células Swiss 3T3. Dicha acción es marcadamente potenciada vía señales ejercidas por la PGE1 (tabla 2). Se sabe que el receptor de la PGE1 es capaz de aumentar los niveles de AMPc intracelular (Rozengurt, 1983; Escribano 1988). Estos resultados sugieren la posibilidad que mecanismos dependientes de AMPc sean capaces de potenciar el efecto mitogénico del LIF. Estos resultados fueron corroborados utilizando tres estrategias experimentales. Por un lado utilizamos factores que inducen el aumento de AMPc, como forskolina e IBMX. El agregado de dichos factores, en presencia del LIF, fueron capaces de sinergizar el efecto mitogénico del mismo (tabla 2). Una segunda

estrategia fue medir los niveles de AMPc, se observó que el LIF no es capaz de modificar los niveles de AMPc *per se*, ni de alterar aumentos en los niveles de AMPc inducidos por factores tales como PGE1, forskolina o IBMX (tabla 2). Por último, el agregado de inhibidores de proteína quinasa dependiente de AMPc (PKI y H-89). El agregado de dichos inhibidores, en presencia de LIF, no fue capaz de bloquear el efecto mitogénico del LIF (fig. 12).

Por lo tanto, el LIF no es capaz de aumentar los niveles de AMPc, ni modificar los niveles de AMPc inducidos por la FK, PGE1 o IBMX. La acción mitogénica del LIF es potenciada por factores que aumentan los niveles de AMPc. La síntesis de ADN inducida por el LIF no depende de la presencia de inhibidores de PKA, pero la sinergia observada con agentes que aumentan los niveles de AMPc, se encuentra inhibida por la presencia de H-89 o PKI. Sugerimos que la sinergia observada entre el LIF y la PGE1, podría deberse a mecanismos de señalización dependientes de AMPc. Dado que el AMPc es capaz de activar a la PKA, inferimos que dichos mecanismos podrían estar mediados por esta enzima.

Mecanismos de señalización dependientes de PTK

El factor de crecimiento epidermal (EGF) (20ng/ml), que causa activación de quinasas específicas de tirosina (Koland, et al. 1988), potencia la acción mitogénica del LIF (tesis de licenciatura de Carolina Schere Levy). El vanadato de sodio, que es un inhibidor de fosfatasa de tirosinas, potencia la respuesta proliferativa del LIF (dato no mostrado). De manera similar, en células que tienen anulada la actividad de PKC, tanto la $PGF_{2\alpha}$ como la insulina, pueden disparar fosforilaciones en tirosina y potencian el efecto mitogénico del LIF (tabla 1). Por lo tanto, se infiere que el efecto mitogénico del LIF es potenciado por mecanismos de señalización dependientes de PTK.

Mecanismos de señalización dependientes de MAPK y MEK

Shiemann W.P. *et al.*, observaron que en células 3T3-L1, el LIF produce una activación rápida y transitoria de Raf-1 (MAPKKK). Estos autores además, postulan que mecanismos dependientes de PKC eran necesarios pero no suficientes para la activación de Raf-1 inducido por el LIF. Por otro lado, aumentos en los niveles de AMPc intracelulares completamente bloqueaba la activación de Raf-1, sin embargo, los aumentos en los niveles de AMPc no tenían efecto sobre la actividad de MAPKK y MAPK estimulados por LIF. Por lo tanto, el LIF es capaz de activar una isozima aún no identificada de MAPKKK que es insensible a la inhibición de AMPc y distinto a Raf-1 y MEK1. Los autores concluyen que la activación mediada por el LIF de la cascada de MAPK en células 3T3-L1 es un evento complejo mediado por vías de señalización dependientes e independientes de Raf que difieren en su sensibilidad a inhibidores de cAMP intracelulares (Shiemann, et al. 1998).

Nuestros resultados muestran, que inhibidores específicos de PKC (GF 109203X), no modifican la síntesis de ADN estimulada por LIF (tabla 1). Inhibidores de la cascada de MAPKK (MEK) (PD 98059), tampoco tienen efecto sobre la síntesis de ADN estimulado por LIF (fig. 11A). El LIF además es capaz de inducir síntesis de ADN de forma independiente de la activación de $p38^{MAPK}$, utilizando un inhibidor específico de dicha enzima (SB 203580) (fig. 11B). Por lo tanto, la activación de MEK1 y $p38^{MAPK}$ no son vías de señalización requeridas para la síntesis de ADN inducida por el LIF. Se sabe que MEK1 es activada a partir de Raf-1 (MAPKKK), y dicha proteína es, a su vez, activada por ras. Nuestros resultados indican que la lovastatina, que inhibe la síntesis de ácido mevalónico (impidiendo la isoprenilación y activación de proteína G y ras, entre otras) (Alberts, et al. 1980; Fairbanks, et al. 1984), no es capaz de bloquear la síntesis de ADN inducida por el LIF (fig. 10). Por lo tanto la isoprenilación de proteínas, la

activación de MEK1/2, y p38^{MAPK}, no son mecanismos de señalización involucrados en la respuesta mitogénica del LIF. Por último, como se dijo anteriormente y a diferencia de Shiemann W.P. *et al.*, la síntesis de ADN estimulada por LIF no solo no se modifica con el agregado de inhibidores de PKA, sino que activadores de AMPc son capaces de potenciar el efecto mitogénico del LIF (fig. 12; tabla 2).

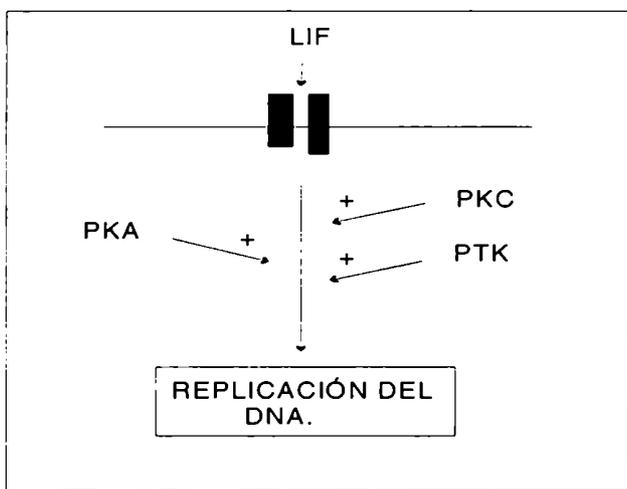
Translocación de STAT1 a núcleo

Se han identificado siete proteínas STAT (tranductor de señal y activador de la transcripción) en mamíferos. Debido a que mas de 35 factores de crecimiento y citoquinas son capaces de activar a una o mas STATs, éste grupo de proteínas ha sido implicado en una amplia variedad de respuestas biológicas. Se sabe que STAT2 es activado únicamente por IFN- α , STAT4 en linfocitos es activado por IL-12 y IFN- α (Cho *et al.* 1996) y STAT6 es activado únicamente por IL-4 y IL-13 (Schindler *et al.* 1995; Ihle, *et al.* 1995). En cambio, STAT1, 3, 5a y 5b son activados por un gran número de factores de crecimiento y citoquinas, es por ello que surge la pregunta de cómo las STATs participan en una respuesta biológica específica. Posiblemente la especificidad de una respuesta biológica está dado por la expresión de receptores en la membrana plasmática, la afinidad de unión al ligando, la presencia o ausencia de otras proteínas señalizantes, o bien la composición del dímero de STATs, en cada tipo individual de células (Darnell 1997).

Una vez que el receptor es activado por una citoquina específica, STAT es fosforilado en tirosina por JAK, se transloca al núcleo y es capaz de unir secuencias específicas de ADN (Liu, *et al.* 1998).

Mediante la utilización de ensayos de inmunofluorescencia indirecta encontramos que el LIF en células Swiss 3T3 es capaz de translocar STAT1 al núcleo de forma dependiente del tiempo (fig. 18). En base a la bibliografía, se sabe que el LIF puede activar a JAK1 y/o JAK2 (Liu, *et al.* 1998), por lo tanto es posible que el mecanismo mediante el cual el LIF es capaz de translocar STAT1 a núcleo este mediado por dichas enzimas, dado que las proteínas STATs pueden ser translocadas a núcleo, una vez que son fosforiladas.

El LIF no es capaz de translocar a núcleo la STAT3 o STAT5 (fig. 19), dado que en éstos experimentos no existe un control positivo que permita determinar la especificidad de los anticuerpos, queda por confirmar dichos resultados.



Esquema de diferentes mecanismos de señalización, capaces de potenciar la síntesis de DNA, estimulada por el LIF.

Resumiendo, el LIF es capaz de inducir síntesis de ADN mediante mecanismos de señalización independientes de PKC, PKA, MEK1/2, p38^{MAPK}, e independiente de la isoprenilación de proteínas. Sin embargo, muchos de estos mecanismos son capaces de potenciar el efecto mitogénico del LIF.

2- Diferencias entre mecanismos de señalización inducidos por el LIF y por la PGF_{2α}:

El LIF y la PGF_{2α} son capaces de inducir síntesis de ADN en forma sinérgica (fig. 17), esto podría sugerir que dichos factores actúan a través de diferentes mecanismos de señalización. Teniendo en cuenta que se conocen muchas de las vías de señalización estimuladas por la PGF_{2α} en células Swiss 3T3, se utilizó dicho mitógeno para comparar las diferencias o similitudes con los mecanismos de señalización inducidos por el LIF, aun no determinados en estas células.

Mecanismos de señalización dependientes de PKC

La activación de proteína quinasa C (PKC) es un paso obligatorio en la inducción de la mitogénesis inducida por PGF_{2α} en células Swiss 3T3 (tabla 1), así como muchos otros mitógenos (Heggt, et al. 1994; Rozengurt, 1995). La PKC es capaz de activar a un gran número de proteínas involucradas en la respuesta mitogénica incluyendo: cascadas de proteínas quinasas de serina/treonina p42^{MAPK}/p44^{MAPK}, p70^{S6K} y proteína quinasa D (PKD) (Rozengurt, 1998). En células Swiss 3T3 sin actividad de PKC, el LIF no requiere dicho mecanismo, para ejercer su efecto mitogénico, mas aún, la PGF_{2α} potencia la entrada en síntesis de ADN inducida por el LIF de forma semejante a la que lo hace en células que poseen actividad de PKC (tabla 1). Estos resultados demuestran que la actividad de PKC es requerida para la síntesis de ADN inducida por PGF_{2α} sola, pero la PGF_{2α} no requiere la activación de la PKC para potenciar el efecto mitogénico del LIF. Por lo tanto, las vías de señalización requeridos para la transición de quiescencia a la fase S, depende de la combinación de factores extracelulares utilizados.

Debido a que cada célula en un organismo multicelular está expuesta a múltiples señales tanto de diferenciación como señales que regulan el crecimiento, sugerimos que los niveles de actividad de PKC requeridos para la mitogénesis dependen, probablemente, del repertorio de señales extracelulares que interactúan con la célula a un dado tiempo. Éste concepto es relevante para el desarrollo de drogas antiproliferativas direccionadas contra las vías de PKC (Thavasu et al 1999; Gesher et al.1998;Housey et al. 1988; O'Brian et al. 1989). Ha sido propuesto que inhibidores de PKC, como GF 109203X, pueden ser blancos útiles capaces de inhibir la proliferación celular. Nosotros proponemos que inhibidores de PKC capaces de ser utilizados como bloqueantes de la proliferación, depende dramáticamente de la combinación de señales mitogénicas que interactúan con la célula blanco, para posibilitar un efecto inhibitorio en la proliferación celular.

Mecanismos de señalización dependientes de PTK

La sinergia en la síntesis de ADN observada por el agregado de LIF y la PGF_{2α}, en células pretratadas con un inhibidor de PKC, podría estar dado mediante un aumento en la actividad de quinasas de tirosinas específicas. De hecho, se sabe que el LIF causa fosforilación en tirosina en la subunidad de su receptor y también fosforila a los factores transcripcionales llamados STAT, mediante las proteínas quinasas de tirosina JAKs. Por otro lado, la PGF_{2α} causa

fosforilación en tirosina de proteínas, probablemente a través de p125^{lak} (tesis de la Dra. Mercedes Goin, pag. 97). Además sabemos, por nuestros experimentos, que la PGF_{2α} probablemente no es capaz de fosforilar a STAT1, dado que no se observa una translocación a núcleo de dicha proteína (fig. 18). La insulina, en condiciones donde la PKC esta inhibida, puede sinergizar con las señales latentes de la PGF_{2α} resultando en una muy baja actividad mitogénica (tesis de la Dra. Mercedes Goin, pag. 93), mientras que en las mismas condiciones la insulina potencia la acción del LIF (dato no mostrado). Estos datos podrían sugerir que la PGF_{2α} dispara la activación de quinasas de tirosina que actúan de manera sinérgica con las activadas por el LIF.

Isoprenilación de proteínas:

La presencia de inhibidores competitivos de la hidroximetil-glutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, como la lovastatina (LOV), bloquea la producción de ácido mevalónico. Este último es un precursor esencial para la biosíntesis de compuestos isoprenoides. Evidencias recientes han mostrado que el mevalonato, actúa como precursor de moléculas preniladas involucradas en la proliferación celular. Específicamente, la LOV bloquea la farnesilación del producto del protooncogen p21^{ras}, por lo tanto, inhibe la inserción de la proteína ras en la superficie de la membrana, e inhibe la actividad de la misma (Hancock, 1993). Este efecto inhibitorio de LOV, es revertido por el agregado exógeno de mevalonato. En base a los resultados presentados (fig. 10), se puede concluir que el LIF, a diferencia de la PGF_{2α}, ejerce su efecto mitogénico independientemente del efecto inhibitorio de la LOV y que la sinergia observada entre LIF y la PGF_{2α} podría involucrar la isoprenilación de proteínas (dato no mostrado).

Mecanismos de señalización dependientes de MAPK

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), pertenecen a una familia altamente conservada de quinasas en serina/treonina, activadas por una gran cantidad de señales extracelulares (Davis, 1993). Las dos isoformas mejor caracterizadas son p42^{MAPK} y p44^{MAPK}. Estas proteínas son activadas por fosforilación de una quinasa específica de MAPK, llamada MAPKK o MEK. Al menos dos isoformas de MEK han sido identificadas en células de mamíferos (Crews et al. 1992; Wu, et al. 1993). Numerosas vías de señalización son capaces de activar a MEK. Los receptores de tirosina quinasas, inducen la activación de MAPK, mediante p21^{ras}, la proteína p21^{ras} posteriormente activa a la cascada de quinasas comprendidas por p74^{raf-1}, MEK y MAPK (Davis, 1993; Marshall, 1995). Por otro lado el mecanismo de inducción de MAPK activado por receptores acoplados a proteína G no está bien definido (Seufferlein, et al. 1996; Howe, et al. 1993; Crespo, et al. 1998). Se conocen varios sustratos de MAPK, incluyendo factores de transcripción (Treisman, 1994) y otras proteínas quinasas como p90^{rsk}. Estudios anteriores indican que la activación sostenida de p42/p44^{MAPK} es necesaria y suficiente para inducir proliferación o diferenciación en varias líneas celulares (Pages, et al. 1993). Sin embargo, la contribución de la activación de la cascada de MAPK necesaria para la inducción de la síntesis de ADN estimulada por PGF_{2α} o LIF no ha sido determinada.

Hemos examinado la contribución de la vía de señalización de MAPK en la inducción de la síntesis de ADN estimulada por PGF_{2α} y LIF utilizando un inhibidor específico de MEK, PD 98059. Dicho inhibidor bloqueó la síntesis de ADN estimulada por PGF_{2α}, mientras que el LIF es capaz de inducir síntesis de ADN de forma independiente de MEK (fig. 11A). Por otro lado, la PGF_{2α} requiere la activación de p38^{MAPK} para inducir la síntesis de ADN, dado que un inhibidor específico (SB 203580) de dicha quinasa, bloquea la síntesis de ADN inducida por la PGF_{2α}, mientras que la estimulación de la mitogénesis mediada por el LIF no depende de la activación

de p38^{MAPK} (fig. 11B). Este dato es interesante dado que existe un solo caso reportado de síntesis de ADN inducido por un mitógeno mediante mecanismo dependiente de p38^{MAPK}.

En resumen, la PGF_{2α} utiliza mecanismos de señalización dependientes de PKC, p38^{MAPK}, MEK y ras, mientras que el LIF no utiliza dichos mecanismos de señalización, ni tampoco mecanismos de señalización dependientes de PKA para inducir síntesis de ADN. Por último, la sinergia del LIF con la PGF_{2α} sobre la iniciación de síntesis de ADN se observó tanto a concentraciones subsaturantes como saturantes. De todo éstos resultados se concluye que el LIF y la PGF_{2α} actúan mediante mecanismos de señalización distintos.

3- Síntesis de DNA inducida por LIF independiente de la expresión de ciclinas D's:

La fase G₁ del ciclo celular aparece temprano durante la embriogénesis. Las células diferenciadas, reciben señales específicas que regulan su habilidad para multiplicarse a partir de un estadio de quiescencia, y transitando primeramente a lo largo de la fase G₁. Sin embargo, las células madres embriónicas, carecen aparentemente de una fase G₁, y son capaces de dividirse transitando por la fase S y M. Las evidencias han mostrado que el LIF es una citoquina pleiotrópica, que controla varios fenómenos celulares que involucran principalmente proliferación y diferenciación. Particularmente, las células madres embriónicas murinas (ES), son capaces de proliferar indefinidamente *in vitro* en un estado no diferenciado y pluripotente en presencia de LIF (Smith, et al., 1988; Williams, et al., 1988). Estas células pueden contribuir al desarrollo completo del embrión si son reimplantadas en el blastocisto (Bradley et al. 1984; Nichols et al., 1990). La remoción de LIF, es suficiente para inducir la diferenciación de células ES a células semejantes a endodermo, sin embargo, la diferenciación *in vitro* vía la formación de cuerpos embrioides, permite la formación de un mayor espectro de tipos de tejidos diferenciados, semejante a la gastrulación y la organogénesis temprana (Robertson, 1987). A nivel molecular, la remoción de LIF, y subsecuente diferenciación de células ES, lleva a la síntesis de novo de ciclinas D, y se observa un incremento en la actividad de quinasa asociada con CDK4 (Savatier, et al. 1995). Nuestro objetivo fue determinar como actúa el LIF regulando la división de células de fibroblasto de ratón Swiss 3T3, en particular que moléculas regulatorias positivas de la fase G₁ del ciclo celular, son capaces de ser activadas.

Numerosos estudios en células en cultivo han demostrado que la progresión desde la fase G₀ hasta la fase S, depende de la actividad de quinasas dependientes de ciclinas de la fase G₁ (CDKs). Estas quinasas son las Cdk4 y Cdk6 capaces de formar complejos con las ciclinas D (ciclina D1, D2, y D3) (Sherr, 1993). Se considera a las ciclinas D como "sensores" del medio extracelular (Sherr, 1993), ya que a partir de un estímulo mitogénico, se activa su expresión. Estas ciclinas activan a Cdk4 y cdk6, llevando a la fosforilación de la proteína Rb (Resnitzky et al. 1994).

En base a nuestros resultados se sabe que el LIF es capaz de inducir síntesis de ADN en células Swiss 3T3 mediante mecanismos de señalización independientes a PKC (tabla 1), isoprenilación de proteínas (fig. 10), MEK1 (fig. 11A), p38^{MAPK} (fig. 11B), teniendo en cuenta que muchos de estos mecanismos de señalización son activadores de la expresión de ciclina D1 (Sauane et al. 2000; Lavoie, et al. 1996; Gille, et al. 1999), la pregunta que surge es si el LIF es capaz de inducir la expresión de ciclina D1 durante la fase G₁. Decidimos además, comparar la expresión de otras moléculas regulatorias positivas del ciclo celular, específicamente la expresión de ciclina D2, ciclina D3, Cdk4 y CDdk6.

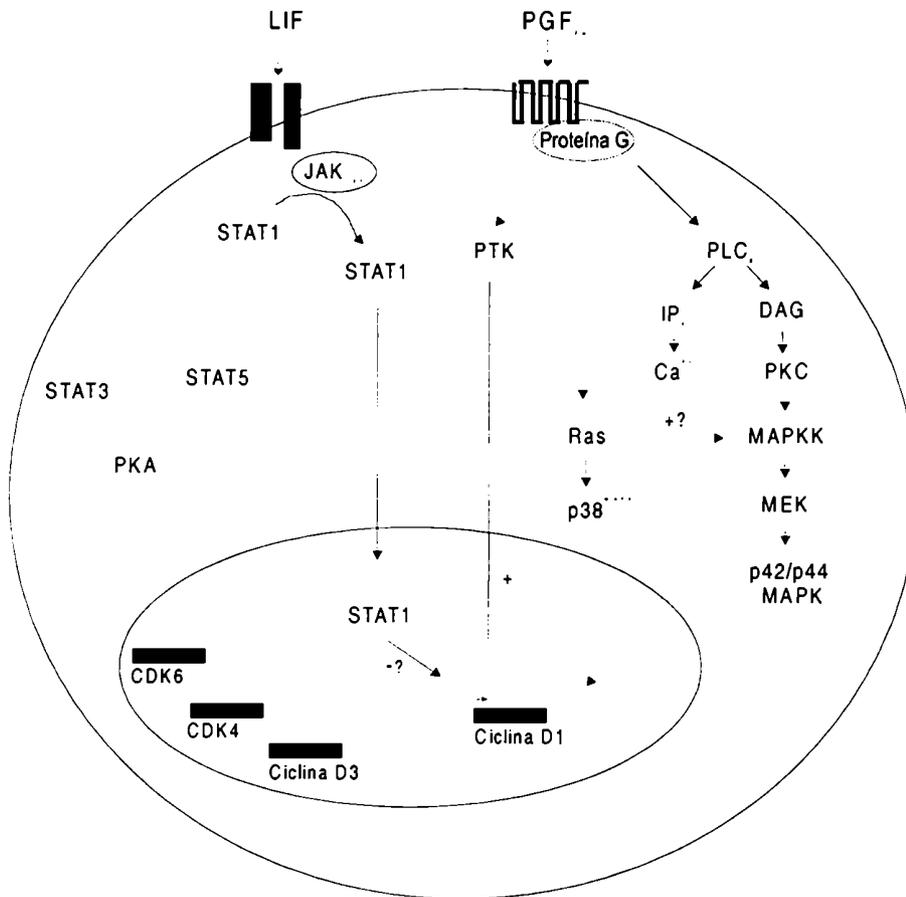
Los niveles de Cdk4 y Cdk6 permanecieron constante tanto en células control como en células estimuladas con LIF o PGF_{2α} (fig. 13). Estos resultados se correlacionan con otros

estudios en Swiss 3T3 utilizando distintos mitógenos (Mann, et al. 1997). Sin embargo, los niveles de ciclinas D en células estimuladas con $\text{PGF}_{2\alpha}$ varían de acuerdo con cada ciclina, la ciclina D1 y D2 aumentan con el agregado de $\text{PGF}_{2\alpha}$, mientras que los niveles de ciclina D3 permanecen constante tanto en células controles como estimuladas con LIF o $\text{PGF}_{2\alpha}$ (fig. 13). El hecho que la ciclina D3 no varía con el agregado de ambos mitógenos, se correlaciona con resultados que demuestran que la expresión de ciclina D3 esta mediada en Swiss 3T3 por mecanismos dependientes de PKA (Mann et al. 1998). Sorprendentemente, el LIF no es capaz de inducir la expresión de ninguna de las ciclinas D a lo largo de la fase G_1 del ciclo celular (fig. 13).

El hecho que el LIF sea mitogénico independiente de la expresión de ciclina D1, D2, D3 y que los niveles de Cdk4 y Cdk6 permanecen constantes, implica que debe existir un mecanismo alternativo de regulación del ciclo celular, una vez que las células son estimuladas por dicho mitogeno. Esto implica que la transición desde G_0/G_1 a la fase S estimulado por el LIF, está mediada por un mecanismo distinto a la expresión de ciclinas D (a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los mitógenos), ya sea porque existe una nueva ciclina D aún no descubierta; porque existe un mecanismo mediante el cual el LIF sea capaz de inhibir la expresión de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKI) que posibilita que los niveles basales de ciclina D2 o D3 sean activos; o bien el LIF sea capaz de iniciar la síntesis de ADN mediante un mecanismo nuevo y distinto a lo conocido (que no involucre a las ciclinas D ni a los CDKI).

Si bien no ha sido descrito en la bibliografía ningún mecanismo nuevo de regulación del ciclo celular, se conocen ciclinas que se expresan durante la fase G_1 del ciclo celular, cuya función no esta bien definida (ciclina F, G, I) (Richman, et al. 1994; Kraus, et al. 1994; Cenciarelli, et al. 1999; Greener, et al. 2000; Liu, et al 1998). Además en plantas se clonó recientemente una ciclina D4 (De Veylder, et al. 1999).

Un dato preliminar (dado que el número de experimentos es igual a dos) fue que cuando se agrega de forma conjunta, en células Swiss 3T3 quiescentes, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ junto con el LIF a tiempos tempranos (8 horas), se inhibe la expresión del ARNm y la proteína de ciclina D1, comparado con la inducción de ciclina D1 estimulado por $\text{PGF}_{2\alpha}$ a este tiempo. Una posible explicación podría ser que el LIF sea capaz de inhibir la transcripción de ciclina D1 inducida por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ a tiempos tempranos o bien que el LIF desestabilice el ARNm de ciclina D1. En la figura se presenta un esquema de los mecanismos de señalización estimulados por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y el LIF basado en los resultados presentados en esta tesis.



Esquema de los mecanismos de señalización estimulados por la PGF_{2α} y el LIF, basado en los resultados presentados en esta tesis.

4- Similitudes entre las distintas citoquinas de tipo IL-6:

El LIF pertenece a una familia de citoquinas de tipo IL-6. Debido a que la respuesta biológica de cada citoquina de tipo IL-6 en particular (Bazan, 1991), puede ser redundante o específica de acuerdo a: el tipo y estadio de diferenciación de cada célula; la homo u heterodimerización de receptores (Grötzinger et al. 1997; Kishimoto, et al. 1992, Stahl, et al. 1994), la activación de distintos tipos de JAK y la translocación a núcleo de distintos STATs. Decidimos estudiar si otras citoquinas pertenecientes a la misma familia, ejercen su efecto mitogénico mediante mecanismos semejantes al del LIF.

Los resultados muestran que la OSM es capaz de incrementar el porcentaje de células que entran en la fase S (fig. 14) y es capaz de ser potenciado por mecanismos dependientes de PGE1 e Insulina (fig. 15). Mientras que el CNTF y la IL-6, en Swiss 3T3, no tienen efecto mitogénico (fig. 14). Probablemente estas células no contengan receptores específicos para CNTF, ya que únicamente se han encontrado dichos receptores en neuronas (Davis, et al. 1993). Por otro lado, si bien la IL-6 no es un factor mitogénico, si se adiciona junto con PGE1, se capaz de inducir síntesis de ADN, y ésta se ve potenciada con el agregado de insulina (fig. 16).

Los resultados muestran que tanto la OSM como el LIF son capaces de inducir síntesis de ADN en Swiss 3T3 y ambos mitógenos pueden sinergizar con mecanismos de señalización estimulados por la PGE1 y la insulina de forma similar (fig 15). El LIF y la OSM adicionados conjuntamente a concentraciones sub-saturantes tuvieron un efecto aditivo sobre la inducción de la entrada en la fase S (fig. 17). Sin embargo, el agregado de LIF en combinación con OSM, ambos a concentraciones que resultan saturantes cuando se agregan individualmente, no indujo un mayor aumento en el porcentaje de células en fase S, que aquel estimulado por cada citoquina (fig. 17). Además, la sinergia de cada una de estas dos citoquinas, con la PGF_{2α} sobre la iniciación de síntesis de ADN se observó tanto a concentraciones subsaturantes como saturantes (fig. 17). Estos resultados, junto con los resultados anteriores, sugieren que el LIF y la OSM inducen la síntesis de ADN posiblemente a través de un mecanismo común de señalización intracelular.

Los receptores de la familia de citoquinas, de tipo IL-6, están compuestos por diferentes subunidades, pero todos contienen una subunidad señalizante llamada gp130 (Stahl, et al. 1995; Kishimoto, et al. 1994). Algunos miembros de esta familia de citoquinas (IL-6, IL-11) (Murakami, 1993) inducen la homodimerización de gp130, mientras que otros (LIF, OSM, CNTF) inducen la heterodimerización de gp130 y el receptor de LIF de 190KDa (Gearing et al. 1992; Davis, et al. 1993). Una posible explicación es que el LIF y la OSM comparten mecanismos de señalización en células Swiss 3T3, dado que ambos inducen una heterodimerización entre gp130 y el receptor de LIF, a diferencia de lo que ocurre con la IL-6.

Si bien son datos muy preliminares (dado que el número de experimentos es igual a uno), de forma similar al LIF, ninguna de las citoquinas pertenecientes a la familia de IL-6, es decir, la OSM, la IL-6, el CNTF, fue capaz de estimular la expresión de ciclina D1 en células Swiss 3T3.

Translocación de STAT1, STAT3 y STAT5, a núcleo:

Las proteínas STATs tienen una función dual, son transductores de señales y activadores de la transcripción. El LIF y la OSM, en células Swiss 3T3, son capaces de gatillar la activación y translocación a núcleo de STAT1 a tiempos semejantes, ésta translocación a núcleo de STAT1 no se observa en células estimuladas con la PGF_{2α} (fig. 18). La IL-6 es capaz de inducir translocación de STAT1 de forma marginal, este efecto no se ve modificado con el agregado de PGE1 e insulina, a pesar que, bajo dichas condiciones, hay una inducción de la síntesis de ADN (fig. 16; 18). Estos resultados reafirman la hipótesis que el LIF y la OSM son capaces de inducir síntesis de ADN en Swiss 3T3 mediante mecanismos de señalización semejantes.

Se estudio la acción del LIF, la OSM y la IL-6 así como de la PGF_{2α} sobre la translocación a desde el citoplasma hacia el núcleo de las STAT3 y STAT5. Los resultados muestran que ninguno de estos factores fue capaz de translocar ni la STAT3 ni la STAT5, aunque en dichos experimentos se requiere de un control positivo para determinar la especificidad de los anticuerpos empleados (fig. 19).

Es importante señalar que estos resultados, provienen de experimentos realizados con una línea celular originada de un cultivo primario de células embrionarias de ratas Swiss, la línea celular utilizada representa probablemente una variación del clon original, por lo tanto los resultados deberán ser extendidos a otras variantes celulares de dicho clon. Por esta razón las conclusiones derivadas de los mismos, no pueden ser generalizadas para otros tipos de células

de mamíferos. Sería de particular interés correlacionar estos resultados con experimentos a realizar en otros tipos celulares, como otras líneas celulares derivadas de fibroblastos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramovitz, M., Boie, Y., Nguyen, T., Rushmore, T. H., Bayne, M. A., Metters, K. M., Slipetz, D. M., and Grygorczyk, R. (1994). Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. *journal of biological chemistry* 269, 2632-6.
- Ajchenbaum, F., Ando, K., DeCaprio, J. A., and Griffin, J. D. (1993). Independent regulation of human D-type cyclin gene expression during G1 phase in primary human T lymphocytes. *journal of biological chemistry* 268, 4113-9.
- Albert, D. A., and Rozengurt, E. (1991). Transcriptional regulation of ribonucleotide reductase. *Advances In Experimental Medicine And Biology* 309B, 67-72.
- Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Hensens, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J., and Springer, J. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 77, 3957-61.
- Almendral, J. M., Sommer, D., Macdonald-Bravo, H., Burckhardt, J., Perera, J., and Bravo, R. (1988). Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Molecular And Cellular Biology* 8, 2140-8.
- Altenbach, C., Yang, K., Farrens, D. L., Farahbakhsh, Z. T., Khorana, H. G., and Hubbell, W. L. (1996). Structural features and light-dependent changes in the cytoplasmic interhelical E-F loop region of rhodopsin: a site-directed spin-labeling study. *biochemistry* 35, 12470-8.
- Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor [see comments]. *Nature* 348, 730-2.
- Asua, L. J. d., Rozengurt, E., and Dulbecco, R. (1974). Kinetics of early changes in phosphate and uridine transport and cyclic AMP levels stimulated by serum in density-inhibited 3T3 cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 71, 96-8.
- Attisano, L., Cárcamo, J., Ventura, F., Weis, F. M., Massagué, J., and Wrana, J. L. (1993). Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75, 671-80.
- Bai, C., Richman, R., and Elledge, S. J. (1994). Human cyclin F. *Embo Journal* 13, 6087-98.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M., and Draetta, G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *genes and development* 7, 812-21.
- Ballester, R., and Rosen, O. M. (1985). Fate of immunoprecipitable protein kinase C in GH3 cells treated with phorbol 12-myristate 13-acetate. *Journal Of Biological Chemistry* 260, 15194-9.
- Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annual Review Of Biochemistry* 56, 779-827.
- Barnea, G., Grumet, M., Milev, P., Silvennoinen, O., Levy, J. B., Sap, J., and Schlessinger, J. (1994). Receptor tyrosine phosphatase beta is expressed in the form of proteoglycan and binds to the extracellular matrix protein tenascin. *journal of biological chemistry* 269, 14349-52.
- Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J. (1996). The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *current opinion in cell biology* 8, 805-14.
- Bazan, J. F. (1991). Neurotrophic cytokines in the hematopoietic fold. *neuron* 7, 197-208.
- Bazzi, M. D., and Nelsestuen, G. L. (1990). Protein kinase C interaction with calcium: a phospholipid-dependent process. *Biochemistry* 29, 7624-30.
- Bazzi, M. D., and Nelsestuen, G. L. (1991). Proteins that bind calcium in a phospholipid-dependent manner. *Biochemistry* 30, 971-9.

- Becker, S., Groner, B., and Müller, C. W. (1998). Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* *394*, 145-51.
- Berridge, M. J. (1987). Inositol lipids and cell proliferation. *Biochimica Et Biophysica Acta* *907*, 33-45.
- Berridge, M. J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annual Review Of Biochemistry* *56*, 159-93.
- Berridge, M. J. (1987). Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* *494*, 39-51.
- Berridge, M. J. (1990). Calcium oscillations. *Journal Of Biological Chemistry* *265*, 9583-6.
- Biondi, R. M., Engel, M., Sauane, M., Welter, C., Issinger, O. G., Jiménez de Asúa, L., and Passeron, S. (1996). Inhibition of nucleoside diphosphate kinase activity by in vitro phosphorylation by protein kinase CK2. Differential phosphorylation of NDP kinases in HeLa cells in culture. *Febs Letters* *399*, 183-7.
- Biondi, R. M., Engel, M., Sauane, M., Welter, C., Issinger, O. G., Jimenez de Asua, L., and Passeron, S. (1996). Inhibition of nucleoside diphosphate kinase activity by in vitro phosphorylation by protein kinase CK2. Differential phosphorylation of NDP kinases in HeLa cells in culture. *febs letters* *399*, 183-7.
- Blackshear, P. J., Witters, L. A., Girard, P. R., Kuo, J. F., and Quamo, S. N. (1985). Growth factor-stimulated protein phosphorylation in 3T3-L1 cells. Evidence for protein kinase C-dependent and -independent pathways. *Journal Of Biological Chemistry* *260*, 13304-15.
- Blackshear, P. J., Wen, L., Glynn, B. P., and Witters, L. A. (1986). Protein kinase C-stimulated phosphorylation in vitro of a Mr 80,000 protein phosphorylated in response to phorbol esters and growth factors in intact fibroblasts. Distinction from protein kinase C and prominence in brain. *Journal Of Biological Chemistry* *261*, 1459-69.
- Blagosklonny, M. V., Chuman, Y., Bergan, R. C., and Fojo, T. (1999). Mitogen-activated protein kinase pathway is dispensable for microtubule-active drug-induced Raf-1/Bcl-2 phosphorylation and apoptosis in leukemia cells. *Leukemia* *13*, 1028-36.
- Blumberg, P. M. (1988). Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Research* *48*, 1-8.
- Blumberg, P. M., Acs, G., Areces, L. B., Kazanietz, M. G., Lewin, N. E., and Szallasi, Z. (1994). Protein kinase C in signal transduction and carcinogenesis. *Progress In Clinical And Biological Research* *387*, 3-19.
- Blumberg, P. M., Acs, G., Acs, P., Areces, L. B., Kazanietz, M. G., Lewin, N. E., and Szallasi, Z. (1995). Protein kinase C in cell signaling: strategies for the development of selective inhibitors. *Agents And Actions. Supplements* *47*, 87-100.
- Bodner, S. M., Naeve, C. W., Rakestraw, K. M., Jones, B. G., Valentine, V. A., Valentine, M. B., Luthardt, F. W., Willman, C. L., Raimondi, S. C., Downing, J. R., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Look, A. T. (1999). Cloning and chromosomal localization of the gene encoding human cyclin D-binding Myb-like protein (hDMP1). *Gene* *229*, 223-8.
- Boguski, M. S., and McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* *366*, 643-54.
- Booher, R. N., Alfa, C. E., Hyams, J. S., and Beach, D. H. (1989). The fission yeast *cdc2/cdc13/suc1* protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell* *58*, 485-97.
- Bos, J. L. (1989). *ras* oncogenes in human cancer: a review [published erratum appears in *Cancer Res* 1990 Feb 15;50(4):1352]. *Cancer Research* *49*, 4682-9.
- Bourne, H. R., Wrischnik, L., and Kenyon, C. (1990). Ras proteins. Some signal developments [news; comment]. *Nature* *348*, 678-9.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* *348*, 125-32.
- Bravo, R., Burckhardt, J., Curran, T., and Müller, R. (1986). Expression of *c-fos* in NIH3T3 cells is very low but

inducible throughout the cell cycle. *Embo Journal* 5, 695-700.

Bravo, R. (1990). Growth factor-responsive genes in fibroblasts. *Cell Growth And Differentiation* 1, 305-9.

Brewer, J. W., Hendershot, L. M., Sherr, C. J., and Diehl, J. A. (1999). Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 96, 8505-10.

Brooks, S. F., Herget, T., Erusalimsky, J. D., and Rozengurt, E. (1991). Protein kinase C activation potently down-regulates the expression of its major substrate, 80K, in Swiss 3T3 cells. *Embo Journal* 10, 2497-505.

Brown, K. D., and Holley, R. W. (1987). Insulin-like synergistic stimulation of DNA synthesis in Swiss 3T3 cells by the BSC-1 cell-derived growth inhibitor related to transforming growth factor type beta. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 84, 3743-7.

Buckley, M. F., Sweeney, K. J., Hamilton, J. A., Sini, R. L., Manning, D. L., Nicholson, R. I., deFazio, A., Watts, C. K., Musgrove, E. A., and Sutherland, R. L. (1993). Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *oncogene* 8, 2127-33.

Burstein, E. S., Hesterberg, D. J., Gutkind, J. S., Brann, M. R., Currier, E. A., and Messier, T. L. (1998). The ras-related GTPase rac1 regulates a proliferative pathway selectively utilized by G-protein coupled receptors. *Oncogene* 17, 1617-23.

Cadena, D. L., and Gill, G. N. (1992). Receptor tyrosine kinases. *Faseb Journal* 6, 2332-7.

Carcamo, J., Weis, F. M., Ventura, F., Wieser, R., Wrana, J. L., Attiano, L., and Massague, J. (1994). Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *molecular and cellular biology* 14, 3810-21.

Carpenter, G., King, L. J., and Cohen, S. (1979). Rapid enhancement of protein phosphorylation in A-431 cell membrane preparations by epidermal growth factor. *journal of biological chemistry* 254, 4884-91.

Cenciarelli, C., Chiaur, D. S., Guardavaccaro, D., Parks, W., Vidal, M., and Pagano, M. (1999). Identification of a family of human F-box proteins. *curr biol* 9, 1177-9.

Charlesworth, A., and Rozengurt, E. (1997). Bombesin and neuromedin B stimulate the activation of p42(mapk) and p74(raf-1) via a protein kinase C-independent pathway in Rat-1 cells. *Oncogene* 14, 2323-9.

Charlesworth, A., and Rozengurt, E. (1997). Bombesin and neuromedin B stimulate the activation of p42(mapk) and p74(raf-1) via a protein kinase C-independent pathway in Rat-1 cells. *Oncogene* 14, 2323-9.

Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J. A., Fero, M., Roussel, M. F., Roberts, J. M., and Sherr, C. J. (1999). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo Journal* 18, 1571-83.

Cho, S. S., Bacon, C. M., Sudarshan, C., Rees, R. C., Finbloom, D., Pine, R., and O'Shea, J. J. (1996). Activation of STAT4 by IL-12 and IFN-alpha: evidence for the involvement of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation. *Journal Of Immunology* 157, 4781-9.

Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell* 80, 259-68.

Colledge, M., and Scott, J. D. (1999). AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol* 9, 216-21.

Cox, A. D., and Der, C. J. (1997). Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras? *Biochimica Et Biophysica Acta* 1333, F51-71.

Crespo, P., de Mora, J. F., Aaronson, D. S., Santos, E., and Gutkind, J. S. (1998). Transforming G protein-coupled receptors block insulin and ras-induced adipocytic differentiation in 3T3-L1 cells: evidence for a PKC and MAP kinase independent pathway. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 245, 554-61.

Crews, C. M., Alessandrini, A., and Erikson, R. L. (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *science* 258, 478-80.

- Cross, F., Roberts, J., and Weintraub, H. (1989). Simple and complex cell cycles. *Annual Review Of Cell Biology* 5, 341-96.
- Darnell, J. E. J., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-21.
- Darnell, J. E. J. (1996). Reflections on STAT3, STAT5, and STAT6 as fat STATs. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 93, 6221-4.
- Darnell, J. E. J. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-5.
- Davis, R. J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268, 14553-14556.
- de Larco, J. E., and Todaro, G. J. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 75, 4001-5.
- De Veylder, L., de Almeida Engler, J., Burssens, S., Manevski, A., Lescure, B., Van Montagu, M., Engler, G., and Inze, D. (1999). A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *planta* 208, 453-62.
- Der, C. J., and Cox, A. D. (1991). Isoprenoid modification and plasma membrane association: critical factors for ras oncogenicity. *Cancer Cells* 3, 331-40.
- Derynck, R. (1994). TGF-beta-receptor-mediated signaling. *Trends In Biochemical Sciences* 19, 548-53.
- Derynck, R., and Zhang, Y. (1996). Intracellular signalling: the mad way to do it. *Current Biology* 6, 1226-9.
- Derynck, R., and Feng, X. H. (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1333, F105-50.
- Derynck, R., Zhang, Y., and Feng, X. H. (1998). Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 95, 737-40.
- Derynck, R. (1998). SMAD proteins and mammalian anatomy [news; comment]. *Nature* 393, 737-9.
- Dhanasekaran, N., and Premkumar Reddy, E. (1998). Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* 17, 1447-55.
- Dhanasekaran, N., Tsim, S. T., Dermott, J. M., and Onesime, D. (1998). Regulation of cell proliferation by G proteins. *Oncogene* 17, 1383-94.
- Dhanasekaran, N. (1998). Cell signaling: an overview. *Oncogene* 17, 1329-30.
- Divecha, N., Truong, O., Hsuan, J. J., Hinchliffe, K. A., and Irvine, R. F. (1995). The cloning and sequence of the C isoform of PtdIns4P 5-kinase. *biochemical journal* 309 (Pt 3), 715-9.
- Divecha, N., and Irvine, R. F. (1995). Phospholipid signaling. *cell* 80, 269-78.
- Donachie, W. D. (1968). Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature* 219, 1077-9.
- Draetta, G., Luca, F., Westendorf, J., Brizuela, L., Ruderman, J., and Beach, D. (1989). Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 56, 829-38.
- Draetta, G. F. (1997). Cell cycle: will the real Cdk-activating kinase please stand up. *Current Biology* 7, R50-2.
- Duhé, R. J., and Farrar, W. L. (1998). Structural and mechanistic aspects of Janus kinases: how the two-faced god wields a double-edged sword. *Journal Of Interferon And Cytokine Research* 18, 1-15.
- Dulbecco, R., and Elkington, J. (1973). Conditions limiting multiplication of fibroblastic and epithelial cells in dense cultures. *Nature* 246, 197-9.
- Egan, S. E., Giddings, B. W., Brooks, M. W., Buday, L., Sizeland, A. M., and Weinberg, R. A. (1993). Association of

Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation [see comments]. *Nature* 363, 45-51.

Erikson, J., Finan, J., Tsujimoto, Y., Nowell, P. C., and Croce, C. M. (1984). The chromosome 14 breakpoint in neoplastic B cells with the t(11;14) translocation involves the immunoglobulin heavy chain locus. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 81, 4144-8.

Escary, J. L., Perreau, J., Duménil, D., Ezine, S., and Brûlet, P. (1993). Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* 363, 361-4.

Escribano, J., and Rozengurt, E. (1988). Cyclic AMP increasing agents rapidly stimulate vimentin phosphorylation in quiescent cultures of Swiss 3T3 cells. *journal of cellular physiology* 137, 223-34.

Estevez, A. G., Calamante, G., Goin, M., and Jimenez de Asua, L. (1991). Tunicamycin inhibits the initiation of DNA synthesis stimulated by prostaglandin F2 alpha in Swiss mouse 3T3 cells. *febs letters* 290, 239-42.

Ewen, M. E., Sluss, H. K., Sherr, C. J., Matsushime, H., Kato, J., and Livingston, D. M. (1993). Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73, 487-97.

Fain, J. N., and Berridge, M. J. (1979). Relationship between phosphatidylinositol synthesis and recovery of 5-hydroxytryptamine-responsive Ca²⁺ flux in blowfly salivary glands. *Biochemical Journal* 180, 655-61.

Fairbanks, K. P., Witte, L. D., and Goodman, D. S. (1984). Relationship between mevalonate and mitogenesis in human fibroblasts stimulated with platelet-derived growth factor. *journal of biological chemistry* 259, 1546-51.

Farrens, D. L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W. L., and Khorana, H. G. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *science* 274, 768-70.

Frank, D. A., and Greenberg, M. E. (1994). CREB: a mediator of long-term memory from mollusks to mammals. *Cell* 79, 5-8.

Franzén, P., ten Dijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schulz, P., Heldin, C. H., and Miyazono, K. (1993). Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell* 75, 681-92.

Funk, J. O., and Galloway, D. A. (1998). Inhibiting CDK inhibitors: new lessons from DNA tumor viruses. *Trends In Biochemical Sciences* 23, 337-41.

Garrington, T. P., and Johnson, G. L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current Opinion In Cell Biology* 11, 211-8.

Gascan, H., Aneón, I., Praloran, V., Nautlet, J., Godard, A., Soulliou, J. P., and Jacques, Y. (1990). Constitutive production of human interleukin for DA cells/leukemia inhibitory factor by human tumor cell lines derived from various tissues. *Journal Of Immunology* 144, 2592-8.

Gearing, D. P., Gough, N. M., King, J. A., Hilton, D. J., Nicola, N. A., Simpson, R. J., Nice, E. C., Kelso, A., and Metcalf, D. (1987). Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *Embo Journal* 6, 3995-4002.

Gearing, D. P., Comeau, M. R., Friend, D. J., Gimpel, S. D., Thut, C. J., McGourty, J., Brasher, K. K., King, J. A., Gillis, S., Mosley, B., and al, e. (1992). The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255, 1434-7.

Geilen, C. C., Wieprecht, M., Wieder, T., and Reutter, W. (1992). A selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-bromocinnamyl(amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in HeLa cells. *Febs Letters* 309, 381-4.

Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (1996). Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *Journal Of Biological Chemistry* 271, 12991-8.

Gescher, A. (1998). Analogs of staurosporine: potential anticancer drugs? *general pharmacology* 31, 721-8.

Gille, H., and Downward, J. (1999). Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *Journal Of Biological Chemistry* 274, 22033-40.

Goin, M., and Jimenez de Asua, L. (1992). Stimulation of protein kinase C (PKC) activity in resting Swiss 3T3 cells by prostaglandin F2 alpha. *Febs Letters* 297, 175-8.

Goin, M., Pignataro, O., and Jimenez de Asua, L. (1993). Early cell cycle diacylglycerol (DAG) content and protein kinase C (PKC) activity enhancement potentiates prostaglandin F2 alpha (PGF2 alpha) induced mitogenesis in Swiss 3T3 cells. *Febs Letters* 316, 68-72.

Gomez de Alzaga, M., Goin, M., Ortiz, M., and Jimenez de Asua, L. (1994). Transforming growth factor beta 1, insulin and prostaglandin E1 enhance prostaglandin F2 alpha mitogenic action in Swiss 3T3 cells via separate events. *Febs Letters* 356, 21-4.

Graña, X., Garriga, J., and Mayol, X. (1998). Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* 17, 3365-83.

Greener, T., Zhao, X., Nojima, H., Eisenberg, E., and Greene, L. E. (2000). Role of cyclin G-associated kinase in uncoating clathrin-coated vesicles from non-neuronal cells. *J Biol Chem* 275, 1365-70.

Greenlund, A. C., Farrar, M. A., Viviano, B. L., and Schreiber, R. D. (1994). Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *Embo Journal* 13, 1591-600.

Grotzinger, J., Kurapkat, G., Wollmer, A., Kalai, M., and Rose-John, S. (1997). The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes. *proteins* 27, 96-109.

Gutkind, J. S. (1998). Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* 17, 1331-42.

Gutkind, J. S. (1998). The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *Journal Of Biological Chemistry* 273, 1839-42.

Hall, M., and Peters, G. (1996). Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Advances In Cancer Research* 68, 67-108.

Hammacher, A., Mellström, K., Heldin, C. H., and Westermark, B. (1989). Isoform-specific induction of actin reorganization by platelet-derived growth factor suggests that the functionally active receptor is a dimer. *Embo Journal* 8, 2489-95.

Hann, S. R., Thompson, C. B., and Eisenman, R. N. (1985). c-myc oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells. *Nature* 314, 366-9.

Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1996). Cdk inhibitors in development and cancer. *current opinion in genetics and development* 6, 56-64.

Hartwell, L. H., and Kastan, M. B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* 266, 1821-8.

Hartwell, L. (1994). Cell cycle. cAMPing out [news; comment]. *Nature* 371, 286.

Heichman, K. A., and Roberts, J. M. (1994). Rules to replicate by [see comments]. *Cell* 79, 557-62.

Heim, M. H., Kerr, I. M., Stark, G. R., and Darnell, J. E. J. (1995). Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* 267, 1347-9.

Heinrich, P. C. (1998). *Biochemical Journal*, 297-314.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemical Journal* 334 (Pt 2), 297-314.

Hemmman, U., Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Kurapkat, G., Grötzinger, J., Wollmer, A., Zhong, Z., Darnell, J. E. J., Graeve, L., Heinrich, P. C., and Horn, F. (1996). Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and

Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation. *Journal Of Biological Chemistry* 271, 12999-3007.

Herget, T., Oehrlein, S. A., Pappin, D. J., Rozengurt, E., and Parker, P. J. (1995). The myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) is sequentially phosphorylated by conventional, novel and atypical isoforms of protein kinase C. *European journal of biochemistry* 233, 448-57.

Hibi, M., M. M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., and T., K. (1990). *Cell* 63, 1149-1157.

Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., and Kishimoto, T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63, 1149-57.

Hilton, D. J., Nicola, N. A., Waring, P. M., and Metcalf, D. (1991). Clearance and fate of leukemia-inhibitory factor (LIF) after injection into mice. *Journal Of Cellular Physiology* 148, 430-9.

Hilton, D. J., Nicola, N. A., and Metcalf, D. (1991). Distribution and comparison of receptors for leukemia inhibitory factor on murine hemopoietic and hepatic cells. *Journal Of Cellular Physiology* 146, 207-15.

Hilton, D. J. (1992). LIF: lots of interesting functions. *Trends In Biochemical Sciences* 17, 72-6.

Hilton, D. J., Nicola, N. A., and Metcalf, D. (1992). Distribution and binding properties of receptors for leukaemia inhibitory factor. *Ciba Foundation Symposium* 167, 227-39; discussion 239-44.

Holley, R. W., and Kiernan, J. A. (1974). Control of the initiation of DNA synthesis in 3T3 cells: low-molecular weight nutrients. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 71, 2942-5.

Holley, R. W. (1975). Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature* 258, 487-90.

Howe, L. R., and Marshall, C. J. (1993). Lysophosphatidic acid stimulates mitogen-activated protein kinase activation via a G-protein-coupled pathway requiring p21ras and p74raf-1. *Journal Of Biological Chemistry* 268, 20717-20.

Huang, F. L., Yoshida, Y., Nakabayashi, H., Young, W. S. d., and Huang, K. P. (1988). Immunocytochemical localization of protein kinase C isozymes in rat brain. *Journal Of Neuroscience* 8, 4734-44.

Huang, T. S., Duyster, J., and Wang, J. Y. (1995). Biological response to phorbol ester determined by alternative G1 pathways. *proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 92, 4793-7.

Hunter, T., and Karin, M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *cell* 70, 375-87.

Hunter, T., and Pines, J. (1994). Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age [see comments]. *Cell* 79, 573-82.

Iglesias, T., Matthews, S., and Rozengurt, E. (1998). Dissimilar phorbol ester binding properties of the individual cysteine-rich motifs of protein kinase D. *Febs Letters* 437, 19-23.

Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., Thierfelder, W. E., Kreider, B., and Silvennoinen, O. (1994). Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends In Biochemical Sciences* 19, 222-7.

Ihle, J. N. (1995). Cytokine receptor signalling. *Nature* 377, 591-4.

Ihle, J. N. (1995). The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. *Advances In Immunology* 60, 1-35.

Ihle, J. N., and Kerr, I. M. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends In Genetics* 11, 69-74.

Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., and Silvennoinen, O. (1995). Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annual Review Of Immunology* 13, 369-98.

Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., and Miyazono, K. (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily [see comments]. *nature* 389, 622-6.

Inaba, T., Matsushime, H., Valentine, M., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Look, A. T. (1992). Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics* 13, 565-74.

Ip, Y. T., and Davis, R. J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Current Opinion In Cell Biology* 10, 205-19.

Jiang, W., Kahn, S. M., Tomita, N., Zhang, Y. J., Lu, S. H., and Weinstein, I. B. (1992). Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Research* 52, 2980-3.

Jimenez de Asua, L., and Rozengurt, E. (1974). Multiple control mechanisms underlie initiation of growth in animal cells. *Nature* 251, 624-6.

Jimenez de Asua, L., Carr, B., Clingan, D., and Rudland, P. (1977). Specific glucocorticoid inhibition of growth promoting effects of prostaglandin F2alpha on 3T3 cells. *Nature* 265, 450-2.

Jimenez de Asua, L., O'Farrell, M., Bennett, D., Clingan, D., and Rugland, P. (1977). Interaction of two hormones and their effect on observed rate of initiation of DNA synthesis in 3T3 cells. *Nature* 265, 151-3.

Jimenez de Asua, L., Richmond, K. M., and Otto, A. M. (1981). Two growth factors and two hormones regulate initiation of DNA synthesis in cultured mouse cells through different pathways of events. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 78, 1004-8.

Jimenez de Asua, L., Smith, C., and Otto, A. M. (1982). Insulin stimulates some initial events necessary for the initiation of DNA replication in Swiss 3T3 cells. *Cell Biology International Reports* 6, 791-7.

Jimenez de Asua, L., Otto, A. M., Lindgren, J. A., and Hammarström, S. (1983). The stimulation of the initiation of DNA synthesis and cell division in Swiss mouse 3T3 cells by prostaglandin F2 alpha requires specific functional groups in the molecule. *Journal Of Biological Chemistry* 258, 8774-80.

Jimenez de Asua, L., Otto, A. M., Drummond, A. H., Macphee, C. H., and Smith, C. (1985). Control of animal cell proliferation by prostaglandin F2 alpha and other hormones: multisignal hypothesis for control of cell division. *Advances In Prostaglandin, Thromboxane, And Leukotriene Research* 15, 391-3.

Jimenez de Asua, L., and Goin, M. (1992). Prostaglandin F2 alpha decreases the affinity of epidermal growth factor receptors in Swiss mouse 3T3 cells via protein kinase C activation. *Febs Letters* 299, 235-8.

Jimenez de Asua, L., and Goin, M. (1997). Prostaglandin F2 alpha (PGF2 alpha) triggers protein kinase C (PKC) and tyrosine kinase activity in cultured mammalian cells. *Advances In Experimental Medicine And Biology* 400A, 531-8.

Jimenez de Asua, L., Goin, M., Ortiz, M., and Gomez de Alzaga, M. B. (1997). A mitogenic and hormonal signalling network regulate mammalian cell division commitment time. *Advances In Experimental Medicine And Biology* 400A, 449-54.

Jimenez de Asua, L., Richmond, m. O'Farrell, A. Otto, A., kubler, and Rudland P. (1979). Growth factors and hormones interact in a series of temporal steps to regulate the rate of initiation of DN synthesis in mouse fibroblasts. In: *Hormones and Cell Culture*. G.H. Sato and R. Ross, eds. Cold Spring Harbor Conferences in Cell Proliferation Vol. 6, Cold Spring Harbor, New York, pp. 403-424.

Jiménez De Asua, L., O'Farrell, M., Clingan, D., and Rudland, P. S. (1977). Mammalian cells recognize growth factors in the G1-interval, and organize a series of signals and events necessary for deoxyribonucleic acid replication and cell division [proceedings]. *Biochemical Society Transactions* 5, 937-9.

Kaibuchi, K., Takai, Y., Sawamura, M., Hoshijima, M., Fujikura, T., and Nishizuka, Y. (1983). Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation. *Journal Of Biological Chemistry* 258, 6701-4.

Kato, J. Y., and Sherr, C. J. (1993). Inhibition of granulocyte differentiation by G1 cyclins D2 and D3 but not D1. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 90, 11513-7.

Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E., and Sherr, C. J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes And Development* 7, 331-42.

- Kauffman, S., and Wille, J. J. (1975). The mitotic oscillator in *Physarum polycephalum*. *Journal Of Theoretical Biology* 55, 47-93.
- Kazanietz, M. G., Wang, S., Milne, G. W., Lewin, N. E., Liu, H. L., and Blumberg, P. M. (1995). Residues in the second cysteine-rich region of protein kinase C delta relevant to phorbol ester binding as revealed by site-directed mutagenesis. *Journal Of Biological Chemistry* 270, 21852-9.
- Kazanietz, M. G., Barchi, J. J. J., Omichinski, J. G., and Blumberg, P. M. (1995). Low affinity binding of phorbol esters to protein kinase C and its recombinant cysteine-rich region in the absence of phospholipids. *Journal Of Biological Chemistry* 270, 14679-84.
- Khokhlatchev, A. V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., and Cobb, M. H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93, 605-15.
- Khosravi-Far, R., Cox, A. D., Kato, K., and Der, C. J. (1992). Protein prenylation: key to ras function and cancer intervention? *Cell Growth And Differentiation* 3, 461-9.
- Kiehne, K., and Rozengurt, E. (1995). Down-regulation of bradykinin receptors and bradykinin-induced Ca²⁺ mobilization, tyrosine phosphorylation, and DNA synthesis by autocrine factors, tumor necrosis factor alpha, and interferon beta in Swiss 3T3 cells. *Journal Of Cellular Physiology* 162, 367-77.
- Kiehne, K., and Rozengurt, E. (1995). Down-regulation of bradykinin receptors and bradykinin-induced Ca²⁺ mobilization, tyrosine phosphorylation, and DNA synthesis by autocrine factors, tumor necrosis factor alpha, and interferon beta in Swiss 3T3 cells. *Journal Of Cellular Physiology* 162, 367-77.
- Kishimoto, T., Akira, S., and Taga, T. (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 258, 593-7.
- Kishimoto, T., Taga, T., and Akira, S. (1994). Cytokine signal transduction. *Cell* 76, 253-62.
- Kishimoto, T., Tanaka, T., Yoshida, K., Akira, S., and Taga, T. (1995). Cytokine signal transduction through a homo- or heterodimer of gp130. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 766, 224-34.
- Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Xuong, N. H., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. (1991). Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase [see comments]. *Science* 253, 414-20.
- Koduru, P. R., Offit, K., and Filippa, D. A. (1989). Molecular analysis of breaks in BCL-1 proto-oncogene in B-cell lymphomas with abnormalities of 11q13. *Oncogene* 4, 929-34.
- Koland, J. G., and Cerione, R. A. (1988). Growth factor control of epidermal growth factor receptor kinase activity via an intramolecular mechanism. *Journal Of Biological Chemistry* 263, 2230-7.
- Korsmeyer, S. J. (1992). Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annual Review Of Immunology* 10, 785-807.
- Kramer, I. M., Koornneef, I., de Laat, S. W., and van den Eijnden-van Raaij, A. J. (1991). TGF-beta 1 induces phosphorylation of the cyclic AMP responsive element binding protein in ML-CC164 cells. *embo journal* 10, 1083-9.
- Kraus, B., Pohlschmidt, M., Leung, A. L., Germino, G. G., Snarey, A., Schneider, M. C., Reeders, S. T., and Frischauf, A. M. (1994). A novel cyclin gene (CCNF) in the region of the polycystic kidney disease gene (PKD1). *Genomics* 24, 27-33.
- Kuriyan, J., and Darnell, J. E. J. (1999). An SH2 domain in disguise [news; comment]. *Nature* 398, 22-3, 25.
- Kurzrock, R., Estrov, Z., Wetzler, M., Gutterman, J. U., and Talpaz, M. (1991). LIF: not just a leukemia inhibitory factor. *Endocrine Reviews* 12, 208-17.
- Lammie, G. A., Fantl, V., Smith, R., Schuurin, E., Brookes, S., Michalides, R., Dickson, C., Arnold, A., and Peters, G. (1991). D11S287, a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and linked to BCL-1. *Oncogene* 6, 439-44.

- Lavia, P., and Jansen-Dürr, P. (1999). E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. *Bioessays* 21, 221-30.
- Lavoie, J. N., L'Allemain, G., Brunet, A., Müller, R., and Pouyssegur, J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *Journal Of Biological Chemistry* 271, 20608-16.
- Leach, F. S., Elledge, S. J., Sherr, C. J., Willson, J. K., Markowitz, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. *Cancer Research* 53, 1986-9.
- Lee, M. H., and Bell, R. M. (1986). The lipid binding, regulatory domain of protein kinase C. A 32-kDa fragment contains the calcium- and phosphatidylserine-dependent phorbol diester binding activity. *Journal Of Biological Chemistry* 261, 14867-70.
- Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (1994). Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends In Biochemical Sciences* 19, 459-63.
- Letterio, J. J., and Roberts, A. B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review Of Immunology* 16, 137-61.
- Levy, C. S., Sauane, M., Rudland, P. S., and Jimenez de Asua, L. (1997). Leukaemia inhibitory factor induces mitogenesis in Swiss 3T3 cells and selective enhancement via a variety of signalling events. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 236, 814-8.
- Lew, D. J., and Kornbluth, S. (1996). Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Current Opinion In Cell Biology* 8, 795-804.
- Lewis, T. S., Shapiro, P. S., and Ahn, N. G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances In Cancer Research* 74, 49-139.
- Liu, K. D., Gaffen, S. L., and Goldsmith, M. A. (1998). JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Current Opinion In Immunology* 10, 271-8.
- Lopez-Rivas, A., Stroobant, P., Waterfield, M. D., and Rozengurt, E. (1984). Ionic responses rapidly elicited by porcine platelet-derived growth factor in Swiss 3T3 cells. *embo journal* 3, 939-44.
- Lopez-Rivas, A., Mendoza, S. A., Nanberg, E., Sinnott-Smith, J., and Rozengurt, E. (1987). Ca²⁺-mobilizing actions of platelet-derived growth factor differ from those of bombesin and vasopressin in Swiss 3T3 mouse cells. *proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 84, 5768-72.
- Lukas, J., Muller, H., Bartkova, J., Spitkovsky, D., Kjerulff, A. A., Jansen-Durr, P., Strauss, M., and Bartek, J. (1994). DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1. *journal of cell biology* 125, 625-38.
- Lukas, J., Bartkova, J., Rohde, M., Strauss, M., and Bartek, J. (1995). Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity. *molecular and cellular biology* 15, 2600-11.
- Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D. J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., and Bartek, J. (1995). Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *nature* 375, 503-6.
- Lukas, J., Aagaard, L., Strauss, M., and Bartek, J. (1995). Oncogenic aberrations of p16INK4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control. *cancer research* 55, 4818-23.
- Lukas, J., Bartkova, J., and Bartek, J. (1996). Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *molecular and cellular biology* 16, 6917-25.
- Lukas, R. J., and Eisenhour, C. M. (1996). Interactions between tachykinins and diverse, human nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *neurochemical research* 21, 1245-57.
- Lukas, C., Jensen, S. K., Bartkova, J., Lukas, J., and Bartek, J. (1999). Immunohistochemical analysis of the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6, using a series of monoclonal antibodies. *hybridoma* 18, 225-34.

- Lütticken, C., Wegenka, U. M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A. G., Wilks, A. F., Yasukawa, K., Taga, T., and al, e. (1994). Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 263, 89-92.
- Macphee, C. H., Drummond, A. H., Otto, A. M., and Jimenez de Asua, L. (1984). Prostaglandin F2 alpha stimulates phosphatidylinositol turnover and increases the cellular content of 1,2-diacylglycerol in confluent resting Swiss 3T3 cells. *Journal Of Cellular Physiology* 119, 35-40.
- Maltese, W. A. (1990). Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *Faseb Journal* 4, 3319-28.
- Mann, D. J., Higgins, T., Jones, N. C., and Rozengurt, E. (1997). Differential control of cyclins D1 and D3 and the cdk inhibitor p27Kip1 by diverse signalling pathways in Swiss 3T3 cells. *Oncogene* 14, 1759-66.
- Marshall, C., and Wyllie, A. (1996). Oncogenes and cell proliferation [editorial]. *current opinion in genetics and development* 6, 1-3.
- Marshall, C. J., and Nigg, E. A. (1998). Oncogenes and cell proliferation. *Cancer genes: lessons from genetics and biochemistry* [editorial]. *current opinion in genetics and development* 8, 11-3.
- Marshall, C. (1999). How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? [see comments]. *curr opin cell biol* 11, 732-6.
- Massagué, J., Cheifetz, S., Boyd, F. T., and Andres, J. L. (1990). TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 593, 59-72.
- Massagué, J., Andres, J., Attisano, L., Cheifetz, S., López-Casillas, F., Ohtsuki, M., and Wrana, J. L. (1992). TGF-beta receptors. *Molecular Reproduction And Development* 32, 99-104.
- Mastro, A. M., and Smith, M. C. (1983). Calcium-dependent activation of lymphocytes by ionophore, A23187, and a phorbol ester tumor promoter. *Journal Of Cellular Physiology* 116, 51-6.
- Matsuda, T., Fukada, T., Takahashi-Tezuka, M., Okuyama, Y., Fujitani, Y., Hanazono, Y., Hirai, H., and Hirano, T. (1995). Activation of Fes tyrosine kinase by gp130, an interleukin-6 family cytokine signal transducer, and their association. *journal of biological chemistry* 270, 11037-9.
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., and Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *embo journal* 18, 4261-9.
- Matsushime, H., Rousset, M. F., Ashmun, R. A., and Sherr, C. J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *cell* 65, 701-13.
- Mehmet, H., Taylor-Papadimitriou, J., and Rozengurt, E. (1989). Interferon inhibition of bombesin-stimulated mitogenesis in Swiss 3T3 cells occurs without blocking c-fos and c-myc expression. *Journal Of Interferon Research* 9, 205-13.
- Mehmet, H., and Rozengurt, E. (1991). Regulation of c-fos expression in Swiss 3T3 cells: an interplay of multiple signal transduction pathways. *British Medical Bulletin* 47, 76-86.
- Mehmet, H., Littlewood, T. D., Sinnett-Smith, J., Moore, J. P., Evan, G. I., and Rozengurt, E. (1997). Large induction of c-Myc is not essential for the mitogenic response of Swiss 3T3 fibroblasts. *Cell Growth And Differentiation* 8, 187-93.
- Mellor, H., and Parker, P. J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *biochemical journal* 332 (Pt 2), 281-92.
- Mendoza, S. A., Schneider, J. A., Lopez-Rivas, A., Sinnett-Smith, J. W., and Rozengurt, E. (1986). Early events elicited by bombesin and structurally related peptides in quiescent Swiss 3T3 cells. II. Changes in Na⁺ and Ca²⁺ fluxes, Na⁺/K⁺ pump activity, and intracellular pH. *Journal Of Cell Biology* 102, 2223-33.

- Mendoza, S. A., Lopez-Rivas, A., Sinnett-Smith, J. W., and Rozengurt, E. (1986). Phorbol esters and diacylglycerol inhibit vasopressin-induced increases in cytoplasmic-free Ca²⁺ and 45Ca²⁺ efflux in Swiss 3T3 cells. *Experimental Cell Research* 164, 536-45.
- Metcalf, D., and Gearing, D. P. (1989). Fatal syndrome in mice engrafted with cells producing high levels of the leukemia inhibitory factor. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 86, 5948-52.
- Metcalf, D. (1992). Leukemia inhibitory factor--a puzzling polyfunctional regulator. *Growth Factors* 7, 169-73.
- Metcalf, D., Waring, P., and Nicola, N. A. (1992). Actions of leukaemia inhibitory factor on megakaryocyte and platelet formation. *Ciba Foundation Symposium* 167, 174-82; discussion 182-7.
- Metcalf, D. (1992). Polyfunctional cytokines: IL-6 and LIF. Introduction. *Ciba Foundation Symposium* 167, 1-4.
- Metcalf, D. (1992). Role of hemopoietic growth factors in the development and suppression of myeloid leukemia. *Leukemia* 6 *Suppl* 3, 187S-188S.
- Mignery, G. A., and Südhof, T. C. (1990). The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-triphosphate receptor. *Embo Journal* 9, 3893-8.
- Miyawaki, A., Furuichi, T., Ryou, Y., Yoshikawa, S., Nakagawa, T., Saitoh, T., and Mikoshiba, K. (1991). Structure-function relationships of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 88, 4911-5.
- Moreno, S., Hayles, J., and Nurse, P. (1989). Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis. *Cell* 58, 361-72.
- Motokura, T., Bloom, T., Kim, H. G., Jüppner, H., Ruderman, J. V., Kronenberg, H. M., and Arnold, A. (1991). A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene [see comments]. *Nature* 350, 512-5.
- Muller, H., Lukas, J., Schneider, A., Warthoe, P., Bartek, J., Eilers, M., and Strauss, M. (1994). Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 91, 2945-9.
- Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993). IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260, 1808-10.
- Nasmyth, K., and Hunt, T. (1993). Cell cycle. Dams and sluices [news; comment]. *Nature* 366, 634-5.
- Neddermann, P., Graziani, R., Ciliberto, G., and Paonessa, G. (1996). Functional expression of soluble human interleukin-11 (IL-11) receptor alpha and stoichiometry of in vitro IL-11 receptor complexes with gp130. *Journal Of Biological Chemistry* 271, 30986-91.
- Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-57.
- Neufeld, T. P., and Edgar, B. A. (1998). Connections between growth and the cell cycle. *Current Opinion In Cell Biology* 10, 784-90.
- Newton, A. C. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *Journal Of Biological Chemistry* 270, 28495-8.
- Newton, A. C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Current Opinion In Cell Biology* 9, 161-7.
- Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *nature* 344, 503-8.
- O'Farrell, M. K., Clingan, D., Rudland, P. S., and Jimenez de Asua, L. (1979). Stimulation of the initiation of DNA synthesis and cell division in several cultured mouse cell types. Effect of growth-promoting hormones and nutrients. *Experimental Cell Research* 118, 311-21.
- Orr, J. W., Keranen, L. M., and Newton, A. C. (1992). Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *Journal Of Biological Chemistry* 267, 15263-6.

Orr, J. W., and Newton, A. C. (1992). Interaction of protein kinase C with phosphatidylserine. 1. Cooperativity in lipid binding. *Biochemistry* *31*, 4661-7.

Ortiz, M. B., Goin, M., Gomez de Alzaga, M. B., Hammarstrom, S., and Jimenez de Asua, L. (1995). Mevalonate dependency of the early cell cycle mitogenic response to epidermal growth factor and prostaglandin F2 alpha in Swiss mouse 3T3 cells. *Journal Of Cellular Physiology* *162*, 139-46.

Otto, A. M., Zumbé, A., Gibson, L., Kubler, A. M., and Jimenez de Asua, L. (1979). Cytoskeleton-disrupting drugs enhance effect of growth factors and hormones on initiation of DNA synthesis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* *76*, 6435-8.

Otto, A. M., Ulrich, M. O., and Jimenez de Asua, L. (1981). Epidermal growth factor initiates DNA synthesis after a time-dependent sequence of regulatory events in Swiss 3T3 cells--interactions with hormones and growth factors. *Journal Of Cellular Physiology* *108*, 145-53.

Otto, A. M., Nilsen-Hamilton, M., Boss, B. D., Ulrich, M. O., and Jimenez De Asua, L. (1982). Prostaglandins E1 and E2 interact with prostaglandin F2alpha to regulate initiation of DNA replication and cell division in swiss 3T3 cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* *79*, 4992-6.

Otto, A. M., Smith, C., and Jimenez de Asua, L. (1988). Stimulation of DNA replication by growth factor and hormones in Swiss 3T3 cells: comparison of the rate of entry into S phase with in vitro DNA synthesis and DNA polymerase alpha activity. *Journal Of Cellular Physiology* *134*, 57-66.

Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J. C., Meloche, S., and Pouyssegur, J. (1993). Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* *90*, 8319-23.

Pardee, A. B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* *246*, 603-8.

Pease, S., Braghetta, P., Gearing, D., Grail, D., and Williams, R. L. (1990). Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Developmental Biology* *141*, 344-52.

Pellegrini, S., and Dusanter-Fourt, I. (1997). The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *European Journal Of Biochemistry* *248*, 615-33.

Peters, M., Roeb, E., Pennica, D., Meyer zum Büschenfelde, K. H., and Rose-John, S. (1995). A new hepatocyte stimulating factor: cardiotrophin-1 (CT-1). *Febs Letters* *372*, 177-80.

Piek, E., Heldin, C. H., and Ten Dijke, P. (1999). Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *faseb j* *13*, 2105-24.

Pines, J., and Hunter, T. (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *Embo Journal* *13*, 3772-81.

Planas-Silva, M. D., and Weinberg, R. A. (1997). The restriction point and control of cell proliferation. *current opinion in cell biology* *9*, 768-72.

Prescott, D. M. (1987). Cell reproduction. *International Review Of Cytology* *100*, 93-128.

Quelle, D. E., Ashmun, R. A., Shurtleff, S. A., Kato, J. Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1993). Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes And Development* *7*, 1559-71.

Rasmussen, C. D., and Means, A. R. (1989). Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis. *Embo Journal* *8*, 73-82.

Rasmussen, C. D., and Means, A. R. (1989). Calmodulin, cell growth and gene expression. *Trends In Neurosciences* *12*, 433-8.

Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., and Reed, S. I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *molecular and cellular biology* *14*, 1669-79.

- Richmond, K. M., Kubler, A. M., Martin, F., and Jimenez de Asua, L. (1980). The stimulation of the initiation of DNA synthesis by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 cells: interactions with hormones during the pre-replicative phase. *Journal Of Cellular Physiology* 103, 77-85.
- Ridley, S. H., Dean, J. L., Sarsfield, S. J., Brook, M., Clark, A. R., and Saklatvala, J. (1998). A p38 MAP kinase inhibitor regulates stability of interleukin-1-induced cyclooxygenase-2 mRNA. *Febs Letters* 439, 75-80.
- Roberts, A. B., Anzano, M. A., Meyers, C. A., Wideman, J., Blacher, R., Pan, Y. C., Stein, S., Lehrman, S. R., Smith, J. M., Lamb, L. C., and al, e. (1983). Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney. *biochemistry* 22, 5692-8.
- Roberts, J. M. (1999). Evolving ideas about cyclins. *Cell* 98, 129-32.
- Robinson, M. J., and Cobb, M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion In Cell Biology* 9, 180-6.
- Rodriguez-Pena, A., and Rozengurt, E. (1986). Vasopressin rapidly stimulates protein kinase C in quiescent Swiss 3T3 cells. *Journal Of Cellular Physiology* 129, 124-30.
- Rodriguez-Pena, A., Zachary, I., and Rozengurt, E. (1986). Rapid dephosphorylation of a Mr 80,000 protein, a specific substrate of protein kinase C upon removal of phorbol esters, bombesin and vasopressin. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 140, 379-85.
- Rodriguez-Pena, A., and Rozengurt, E. (1986). Phosphorylation of an acidic mol. wt. 80 000 cellular protein in a cell-free system and intact Swiss 3T3 cells: a specific marker of protein kinase C activity. *Embo Journal* 5, 77-83.
- Rodríguez-Fernández, J. L., and Rozengurt, E. (1998). Bombesin, vasopressin, lysophosphatidic acid, and sphingosylphosphorylcholine induce focal adhesion kinase activation in intact Swiss 3T3 cells. *Journal Of Biological Chemistry* 273, 19321-8.
- Rosenberg, C. L., Wong, E., Petty, E. M., Bale, A. E., Tsujimoto, Y., Harris, N. L., and Arnold, A. (1991). PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 88, 9638-42.
- Roussel, M. F., Theodoras, A. M., Pagano, M., and Sherr, C. J. (1995). Rescue of defective mitogenic signaling by D-type cyclins. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 92, 6837-41.
- Rozengurt, E., Collins, M. K., and Keehan, M. (1983). Mitogenic effect of prostaglandin E1 in Swiss 3T3 cells: role of cyclic AMP. *journal of cellular physiology* 116, 379-84.
- Rozengurt, E. (1986). Early signals in the mitogenic response. *Science* 234, 161-6.
- Rozengurt, E., and Sinnott-Smith, J. (1988). Early signals underlying the induction of the c-fos and c-myc genes in quiescent fibroblasts: studies with bombesin and other growth factors. *Progress In Nucleic Acid Research And Molecular Biology* 35, 261-95.
- Rozengurt, E. (1991). Neuropeptides as cellular growth factors: role of multiple signalling pathways. *European Journal Of Clinical Investigation* 21, 123-34.
- Rozengurt, E. (1991). A role for arachidonic acid and its metabolites in the regulation of p21ras activity. *Cancer Cells* 3, 397-8.
- Rozengurt, E. (1995). Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes. *Cancer Surveys* 24, 81-96.
- Rozengurt, E. (1998). Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists. *Journal Of Cellular Physiology* 177, 507-17.
- Rudland, P. S., and Jimenez de Asua, L. (1979). Action of growth factors in the cell cycle. *Biochimica Et Biophysica Acta* 560, 91-133.

- Ruoslahti, E., and Giancotti, F. G. (1989). Integrins and tumor cell dissemination. *Cancer Cells* 1, 119-26.
- Ruoslahti, E. (1989). Proteoglycans in cell regulation. *Journal Of Biological Chemistry* 264, 13369-72.
- Sachsenmaier, W., Remy, U., and Plattner-Schobel, R. (1972). Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*. A model of the control of cell division in eukariots. *Experimental Cell Research* 73, 41-8.
- Satoh, T., Uehara, Y., and Kaziro, Y. (1992). Inhibition of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulated increase of active ras.GTP by herbimycin A, a specific inhibitor of tyrosine kinases. *Journal Of Biological Chemistry* 267, 2537-41.
- Satoh, T., Nakafuku, M., and Kaziro, Y. (1992). Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *Journal Of Biological Chemistry* 267, 24149-52.
- Sauane, M., Correa, L., Rogers, F., Krasnapolski, M., Barraclough, R., Rudland, P. S., and de Asua, L. J. (2000). Prostaglandin F(2alpha) (PGF(2alpha)) induces cyclin D1 expression and DNA synthesis via early signaling mechanisms in Swiss mouse 3T3 cells. *biochem biophys res commun* 270, 11-6.
- Savatier, P., Huang, S., Szekely, L., Wiman, K. G., and Samarut, J. (1994). Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts. *oncogene* 9, 809-18.
- Schiemann, W. P., and Nathanson, N. M. (1998). Raf-1 independent stimulation of mitogen-activated protein kinase by leukemia inhibitory factor in 3T3-L1 cells. *Oncogene* 16, 2671-9.
- Schindler, C., and Darnell, J. E. J. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annual Review Of Biochemistry* 64, 621-51.
- Schlessinger, J. (1993). Cellular signaling by receptor tyrosine kinases. *harvey lectures* 89, 105-23.
- Schneider, C., King, R. M., and Philipson, L. (1988). Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 54, 787-93.
- Sclafani, R. A. (1996). Cyclin dependent kinase activating kinases. *Current Opinion In Cell Biology* 8, 788-94.
- Seeger, R., and Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *Faseb Journal* 9, 726-35.
- Seufferlein, T., Withers, D. J., Mann, D., and Rozengurt, E. (1996). Dissociation of mitogen-activated protein kinase activation from p125 focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells stimulated by bombesin, lysophosphatidic acid, and platelet-derived growth factor. *Molecular Biology Of The Cell* 7, 1865-75.
- Seufferlein, T., Withers, D. J., and Rozengurt, E. (1996). Reduced requirement of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity for entry into the S phase of the cell cycle in Swiss 3T3 fibroblasts stimulated by bombesin and insulin. *Journal Of Biological Chemistry* 271, 21471-7.
- Sherr, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-65.
- Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue [see comments]. *Cell* 79, 551-5.
- Sherr, C. J. (1995). D-type cyclins. *Trends In Biochemical Sciences* 20, 187-90.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-7.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes And Development* 13, 1501-12.
- Shibuya, H., Yoneyama, M., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Taniguchi, T. (1992). IL-2 and EGF receptors stimulate the hematopoietic cell cycle via different signaling pathways: demonstration of a novel role for c-myc. *cell* 70, 57-67.
- Shuai, K., Horvath, C. M., Huang, L. H., Qureshi, S. A., Cowburn, D., and Darnell, J. E. J. (1994). Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76, 821-8.

Sinnett-Smith, J., Zachary, I., Valverde, A. M., and Rozengurt, E. (1993). Bombesin stimulation of p125 focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation. Role of protein kinase C, Ca²⁺ mobilization, and the actin cytoskeleton. *Journal Of Biological Chemistry* 268, 14261-8.

Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., and al, e. (1994). Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 263, 92-5.

Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E. J., and Yancopoulos, G. D. (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267, 1349-53.

Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Köntgen, F., and Abbondanzo, S. J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor [see comments]. *Nature* 359, 76-9.

Strauss, M., Lukas, J., and Bartek, J. (1995). Unrestricted cell cycling and cancer. *nature medicine* 1, 1245-6.

Sugimoto, Y., Hasumoto, K., Namba, T., Irie, A., Katsuyama, M., Negishi, M., Kakizuka, A., Narumiya, S., and Ichikawa, A. (1994). Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin F receptor. *journal of biological chemistry* 269, 1356-60.

Symes, A., Stahl, N., Reeves, S. A., Farruggella, T., Servidei, T., Gearan, T., Yancopoulos, G., and Fink, J. S. (1997). The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression. *current biology* 7, 697-700.

Taga, T., and Kishimoto, T. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *Faseb Journal* 6, 3387-96.

Tam, S. W., Theodoras, A. M., Shay, J. W., Draetta, G. F., and Pagano, M. (1994). Differential expression and regulation of Cyclin D1 protein in normal and tumor human cells: association with Cdk4 is required for Cyclin D1 function in G1 progression. *oncogene* 9, 2663-74.

Taylor, S. S., Buechler, J. A., and Yonemoto, W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annual Review Of Biochemistry* 59, 971-1005.

Thavasu, P., Propper, D., McDonald, A., Dobbs, N., Ganesan, T., Talbot, D., Braybrook, J., Caponigro, F., Hutchison, C., Twelves, C., Man, A., Fabbro, D., Harris, A., and Balkwill, F. (1999). The protein kinase C inhibitor CGP41251 suppresses cytokine release and extracellular signal-regulated kinase 2 expression in cancer patients. *cancer research* 59, 3980-4.

Thomas, G., Martin-Pérez, J., Siegmann, M., and Otto, A. M. (1982). The effect of serum, EGF, PGF2 alpha and insulin on S6 phosphorylation and the initiation of protein and DNA synthesis. *Cell* 30, 235-42.

Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., and al, e. (1991). The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *Journal Of Biological Chemistry* 266, 15771-81.

Treisman, R. (1994). Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *current opinion in genetics and development* 4, 96-101.

Tsujimoto, Y., Jaffe, E., Cossman, J., Gorham, J., Nowell, P. C., and Croce, C. M. (1985). Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature* 315, 340-3.

van der Geer, P., Hunter, T., and Lindberg, R. A. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annual Review Of Cell Biology* 10, 251-337.

Verma, R., Iida, H., and Pardee, A. B. (1988). Modulation of expression of the stress-inducible p118 of *Saccharomyces cerevisiae* by cAMP. II. A study of p118 expression in mutants of the cAMP cascade. *Journal Of Biological Chemistry* 263, 8576-82.

Walsh, J. H., Bouzyk, M., and Rozengurt, E. (1993). Homologous desensitization of bombesin-induced increases in intracellular Ca²⁺ in quiescent Swiss 3T3 cells involves a protein kinase C-independent mechanism. *Journal Of Cellular Physiology* 156, 333-40.

Watanabe, T., Nakao, A., Emerling, D., Hashimoto, Y., Tsukamoto, K., Horie, Y., Kinoshita, M., and Kurokawa, K. (1994). Prostaglandin F₂ alpha enhances tyrosine phosphorylation and DNA synthesis through phospholipase C-coupled receptor via Ca²⁺-dependent intracellular pathway in NIH-3T3 cells. *Journal Of Biological Chemistry* **269**, 17619-25.

Weiss, F. U., Daub, H., and Ullrich, A. (1997). Novel mechanisms of RTK signal generation. *Current Opinion In Genetics And Development* **7**, 80-6.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., and Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews* **79**, 143-80.

Winitz, S., Russell, M., Qian, N. X., Gardner, A., Dwyer, L., and Johnson, G. L. (1993). Involvement of Ras and Raf in the Gi-coupled acetylcholine muscarinic m2 receptor activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase and MAP kinase. *Journal Of Biological Chemistry* **268**, 19196-9.

Winston, J. T., and Pledger, W. J. (1993). Growth factor regulation of cyclin D1 mRNA expression through protein synthesis-dependent and -independent mechanisms. *molecular biology of the cell* **4**, 1133-44.

Withers, D. J., Bloom, S. R., and Rozengurt, E. (1995). Dissociation of cAMP-stimulated mitogenesis from activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in Swiss 3T3 cells. *Journal Of Biological Chemistry* **270**, 21411-9.

Wrana, J. L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X. F., and Massagué, J. (1992). TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* **71**, 1003-14.

Wrana, J. L., Cárcamo, J., Attisano, L., Cheifetz, S., Zentella, A., López-Casillas, F., and Massagué, J. (1992). The type II TGF-beta receptor signals diverse responses in cooperation with the type I receptor. *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology* **57**, 81-6.

Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massagué, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**, 341-7.

Wu, J., Harrison, J. K., Vincent, L. A., Haystead, C., Haystead, T. A., Michel, H., Hunt, D. F., Lynch, K. R., and Sturgill, T. W. (1993). Molecular structure of a protein-tyrosine/threonine kinase activating p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase: MAP kinase kinase. *proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* **90**, 173-7.

Yang, J., and Kornbluth, S. (1999). All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends Cell Biol* **9**, 207-10.

Yin, T., Taga, T., Tsang, M. L., Yasukawa, K., Kishimoto, T., and Yang, Y. C. (1993). Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction. *Journal Of Immunology* **151**, 2555-61.

Zachary, I., Sinnott-Smith, J. W., and Rozengurt, E. (1986). Early events elicited by bombesin and structurally related peptides in quiescent Swiss 3T3 cells. I. Activation of protein kinase C and inhibition of epidermal growth factor binding. *Journal Of Cell Biology* **102**, 2211-22.

Zachary, I., Gil, J., Lehmann, W., Sinnott-Smith, J., and Rozengurt, E. (1991). Bombesin, vasopressin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation in intact Swiss 3T3 cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **88**, 4577-81.

Zachary, I., and Rozengurt, E. (1992). Focal adhesion kinase (p125FAK): a point of convergence in the action of neuropeptides, integrins, and oncogenes. *Cell* **71**, 891-4.

Zetterberg, A., Larsson, O., and Wiman, K. G. (1995). What is the restriction point? *Current Opinion In Cell Biology* **7**, 835-42.

Zohar, M., Teramoto, H., Katz, B. Z., Yamada, K. M., and Gutkind, J. S. (1998). Effector domain mutants of Rho dissociate cytoskeletal changes from nuclear signaling and cellular transformation. *Oncogene* **17**, 991-8.

Zugaza, J. L., Waldron, R. T., Sinnott-Smith, J., and Rozengurt, E. (1997). Bombesin, vasopressin, endothelin, bradykinin, and platelet-derived growth factor rapidly activate protein kinase D through a protein kinase C-dependent

signal transduction pathway. Journal Of Biological Chemistry 272, 23952-60.

Zuker, C. S., and Ranganathan, R. (1999). The path to specificity [comment]. Science 283, 650-1.



Dr. Luis Jiménez de Asúa
Director de tesis



Lic. Moira Sauane
Tesisista