

11281

29

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
ENTIDAD: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**



Estudio de la participación de la vía PI 3-K, Rac y
Rho en la vía de transducción de señales por
integrinas beta1 en monocitos.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOMEDICAS)**

PRESENTA:

ELSA MERIT REYES REYES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA

MEXICO. D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el departamento de inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la asesoría y dirección del Dr. Carlos Rosales Ledezma. El comité tutorial de la evaluación semestral estuvo formado por los doctores: José Pedraza Chaverri, Roberto Coria Chaverri, Alejandro Zentella Dahesa y Ricardo Rosales Ledezma.

Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de una beca completa para estudios de posgrado de CONACyT y un complemento de beca de PAEP-UNAM.

A mi esposo Marco Antonio:

Por todo el amor y el apoyo que me ha brindado.

A mi pequeño TOÑITO:

Por llenar mi vida de una gran felicidad.

A mis padres, Rosa y Carlos:

**Por apoyarme en los momentos más amargos y
difíciles de mi vida.**

A mis hermanos, Rafael, Karla y Magda

Por hacer mi vida más interesante.

Agradecimientos:

Al Dr. Carlos Rosales Ledezma especialmente, por sus enseñanzas, sus sabios consejos y por todo el apoyo que me dió durante mi formación académica.

A los Doctores: Antonio Peña Díaz, Edmundo Lamoyi Velázquez, Yvonne Rosenstein Azoulay, Wilhelm Hansberg Torres, Eduardo García Zepeda y Ma. Eugenia Torres Márquez, por la revisión crítica de este trabajo y por sus observaciones que contribuyeron al mejoramiento del trabajo escrito.

A la MIBB. Nancy Mora Pérez por su excelente asesoría técnica

INDICE

Resumen	viii
Abstract	ix
Abreviaturas	x
Introducción	1
Inflamación	1
Integrinas.....	4
Transducción de señales por integrinas	7
Cinasas de tirosinas	7
Cinasas activadas mitogénicamente.....	9
GTPasas de la familia Rho.....	12
Expresión de genes inducida por integrinas.....	16
Planteamiento del problema	18
Hipótesis	20
Objetivo general	21
Métodos	22
Reactivos.....	22
Células.....	23
Transfecciones.....	24

Actividad de luciferasa.....	24
Estimulación.....	25
Ensayos de movilidad retardada.....	25
Lisados celulares.....	26
Western blot.....	26
Ensayo para medir la actividad de PI 3-K.....	27
Ensayo para medir la actividad de MEK.....	28
Inmunoprecipitación HA-MAPK ^{erk1/2}	29
Resultados	30
Las integrinas $\beta 1$ activan el NF- κ B.....	30
El citoesqueleto regula la activación de NF- κ B por integrinas $\beta 1$	32
Las GTPasas Rho y Rac regulan la activación de NF- κ B por integrinas $\beta 1$	33
PI 3-K participa en la activación de NF- κ B por integrinas $\beta 1$	35
Syk participa en la activación de PI 3-K y de NF- κ B por integrinas $\beta 1$	38
PI 3-K participa en la activación de MAPK ^{erk1/2} por integrinas $\beta 1$	40
Syk participa en la activación de MAPK ^{erk1/2} por integrinas $\beta 1$	43
PI 3-K participa en la activación de la cinasa MEK por integrinas $\beta 1$	44
La activación de NF- κ B por integrinas $\beta 1$ es independiente de MAPK ^{erk1/2}	46
La activación de MAPK ^{erk1/2} y de NF- κ B por integrinas $\beta 1$ son conducidas por vías de transducción de señales diferentes.....	47
Discusión	51

Conclusión..... 60

Bibliografía..... 61

Anexo.....69

Abstract

Integrin-mediated signals play an important but poorly understood role in regulating many leukocyte functions. In monocytes and monocytic leukemia cells, $\beta 1$ integrin-mediated adhesion results in a strong induction of immediate early genes that are important in inflammation. To investigate the integrins signaling pathways in monocytic cells, THP-1 cells were stimulated via $\beta 1$ integrins by binding to fibronectin and by crosslinking the integrins with specific monoclonal antibodies. The involvement of Syk, PI 3-K and MAPK^{erk1/2} on NF- κ B activation was then analyzed. We found that integrins activated both NF- κ B and MAPK^{erk1/2} in a Syk and PI 3-K-dependent manner, since a Syk inhibitor (picieethanol) and PI 3-K inhibitors (wortmannin and LY294002) blocked these responses. However, the specific MEK inhibitor PD98059 did not prevent integrin-mediated NF- κ B activation. In contrast, a dominant negative mutant of Rac completely prevented NF- κ B activation. These results indicated that integrin signaling to NF- κ B was not mediated by the MAPK^{erk1/2} pathway, but rather by the small GTPase Rac. In addition, NF- κ B activation was prevented by cytochalasin B, indicating that the actin cytoskeleton is important in this pathway. These data suggest that integrins activate different signaling pathways in monocytic cells. One pathway uses Syk, PI 3-K and Rac to activate NF- κ B, while the other uses Syk, PI 3-K, MEK, and MAPK^{erk1/2} to activate other nuclear factors, such as Elk-1.

Resumen

Las vías de transducción de señales inducidas por las integrinas juegan un papel importante en la regulación de muchas funciones de los leucocitos. En los monocitos, la adhesión regulada por las integrinas $\beta 1$ induce la expresión de genes de citocinas que son importantes en la inflamación. Para estudiar las vías de transducción de señales de las integrinas $\beta 1$ en los monocitos, las células monocíticas THP-1 fueron estimuladas adheriéndolas a fibronectina o entrecruzando sus integrinas $\beta 1$ con anticuerpos monoclonales. Se analizó la participación de Syk, MAPK^{erk1/2} y de PI 3-K en la activación del factor de transcripción NF- κ B mediada por las integrinas $\beta 1$. Se encontró que tanto la activación de MAPK^{erk1/2} como la activación de NF- κ B dependen de Syk y de PI 3-K, ya que tanto el inhibidor de Syk, picetanol; como los dos inhibidores de PI 3-K, wortmanina y LY294002 bloquearon estas respuestas. Sin embargo, el inhibidor específico de MEK, PD98059, no bloqueó la activación de NF- κ B inducida por integrinas $\beta 1$. En cambio, una mutante negativa dominante de Rac bloqueó completamente la activación de NF- κ B, pero no afectó la activación de MAPK^{erk1/2}. Estos resultados indican que la vía de transducción de señales a NF- κ B no es regulada por MAPK^{erk1/2}, sino por la GTPasa Rac. Además, la activación de NF- κ B fue bloqueada por citocalasina B, indicando que el citoesqueleto de actina es importante en esta vía de transducción de señales. Nuestros datos sugieren que las integrinas $\beta 1$ activan diferentes vías de transducción de señales en las célula monocíticas. Una de las vías utiliza Syk, PI 3-K y Rac para activar NF- κ B, mientras que la otra utiliza Syk, PI 3-K, MEK y MAPK^{erk1/2} para activar otros factores de transcripción como por ejemplo Elk-1.

Abreviaturas

ACK	Cinasa de tirosinas acoplada ala GTPasa Cdc42
CHO	Ovario de hamster chino
ECM	Matriz extracelular
ERK	Cinasa activada por estímulos extraceulares
FAK	Cinasa de focos de adhesión
Fn	Fibronectina
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1
ILK	Cinasa unida a integrinas
IL	Interleucina
JNK	Cinasa de la región amino terminal de c-Jun
MAPK	Proteína cinasa activada mitogénicamente
MEK	Cinasa de MAPK
NF-κB	Factor nuclear κ-B
PKC	Proteina cinasa C
PI 3-K	Fosfoinositol 3-Cinasa
PDL	Fosfolipasa D
Pyk	Cinasa homóloga a FAK
Raf	Cinasa de MEK
Syk	Cinasa de tirosina de bazo
TNF	Factor de necrosis tumoral

Introducción

La importancia de la adhesión celular a las proteínas de la matriz extracelular (ECM) se empezó a elucidar cuando se descubrió que los receptores de las proteínas de ECM, las integrinas, no sólo actúan como simples receptores de adhesión sino que también son capaces de transducir señales al interior de la célula (Damsky y Werb, 1992). Actualmente se sabe que las integrinas juegan un papel importante en la regulación de varios procesos, como el rearrreglo del citoesqueleto, la movilidad celular, la transcripción génica, la proliferación y la supervivencia (Rosales y Juliano, 1995). En las células fagocíticas (neutrófilos y monocitos/macrófagos) la adhesión celular inducida por integrinas regula diferentes respuestas celulares como, por ejemplo, la migración de estas células hacia el sitio inflamado, la secreción de citocinas, la producción de intermediarios de oxígeno reactivo, la degranulación y la fagocitosis (Rosales y Juliano, 1995). Sin embargo, aún no se conocen las vías de transducción de señales mediadas por integrinas específicas a cada una de estas respuestas. En esta introducción se dará un resumen del papel de las integrinas en la regulación del proceso inflamatorio y de las vías de transducción de señales de las integrinas en las células fagocíticas.

Inflamación

La inflamación es un mecanismo de defensa del organismo que consiste en el reclutamiento y la activación de los leucocitos cuando ocurre un daño físico o un proceso infeccioso, y contribuye a eliminar el agente dañino (Abbas, 2000; Roitt, 1998).

Los neutrófilos y macrófagos/monocitos juegan un papel central en la defensa del organismo contra los microorganismos patógenos. Cuando perciben un estímulo dañino para el

hospedero estos leucocitos, inician la secreción de algunas moléculas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF α), interleucina 1, 6, 8 (IL-1, IL-6, IL-8), prostanglandinas y tromboxanos. Estas moléculas pro-inflamatorias provocan la vasodilatación y un aumento del flujo sanguíneo en el sistema microvascular (arteriolas, red capilar y venulas poscapilares) de las zonas dañadas, así como un incremento en la permeabilidad vascular y la extravasación de fluido que contiene principalmente proteínas plásmicas y leucocitos. La manifestación física de estas respuestas son un aumento de la temperatura (calor), un enrojecimiento (rubor), una hinchazón (tumor) y dolor en la zona afectada.

La inflamación puede ser dividida en aguda o crónica, dependiendo de los diferentes tipos de leucocitos (neutrófilos, monocitos ó linfocitos) que se acumulen en la zona afectada. En la inflamación aguda, los únicos leucocitos atraídos al sitio dañado son los neutrófilos. Si el daño es persistente o muy grave, la inflamación se convierte en crónica y los leucocitos atraídos, además de los neutrófilos son los monocitos y linfocitos (Anderson, 1996). Por lo tanto, un aspecto importante en el proceso inflamatorio es la migración de los leucocitos al sitio dañado. Aunque hay diferencias en el tiempo de reclutamiento de los diferentes tipos de leucocitos, varios estudios han demostrado que estas células siguen una secuencia similar a nivel molecular para migrar al sitio inflamado (Springer, 1994). Esta similitud molecular ha permitido proponer un modelo general para la migración de estas células (Figura 1).

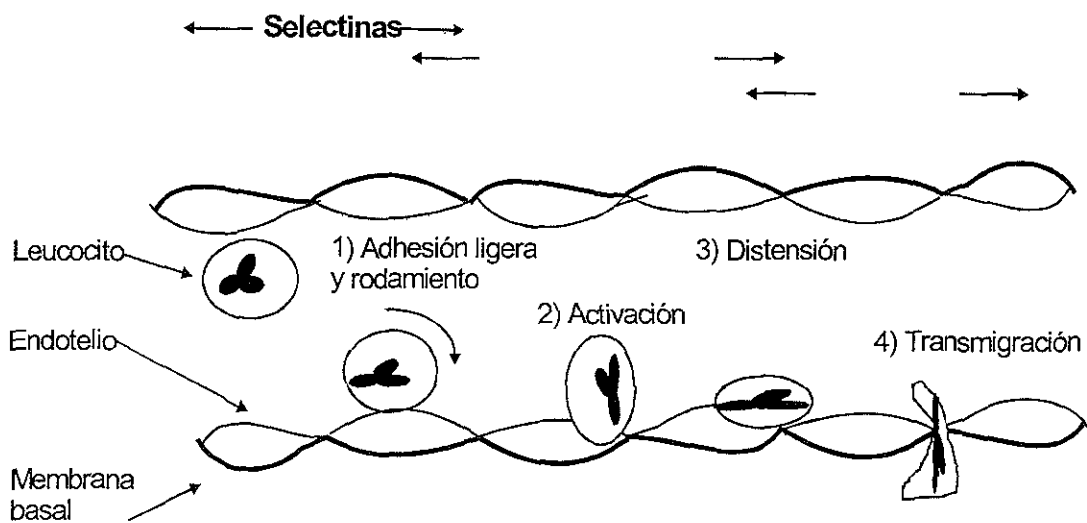


Figura 1. Interacciones moleculares durante la migración de los leucocitos a los sitios inflamados. El proceso de migración de los leucocitos hacia el sitio inflamado puede ser visto como un modelo secuencial dependiendo de las moléculas de adhesión involucradas. Las selectinas regulan la adhesión inicial de los leucocitos al endotelio del sistema microvascular sin activación de los leucocitos. Los quimioatrayentes activan a los leucocitos para inducir una adhesión más estable a través de las integrinas.

Los leucocitos no tienen la capacidad de adherirse al endotelio de las vénulas. Sin embargo, cuando los leucocitos son estimulados con un agente inflamatorio se induce la expresión de moléculas de adhesión que permiten que los leucocitos se adhieran ligeramente al endotelio y rueden sobre éste (Springer, 1994). Las moléculas de adhesión involucradas en este paso son la E-selectina y la P-selectinas de las células endoteliales y la L-selectina de los leucocitos. Las selectinas reconocen principalmente a los grupos de ácido cíalicos sobre los neutrófilos o sobre las células del endotelio (Rosales y Juliano, 1995; Wahl, 1996).

Mientras los leucocitos van rodando sobre el endotelio de las vénulas, éstos son estimulados por quimioatrayentes. En respuesta a este estímulo, los leucocitos se adhieren de manera estable y se extienden sobre el endotelio (Springer, 1994). La adhesión estable se produce por un aumento en la afinidad de los receptores integrinas de los leucocitos, y por un aumento en la expresión de los ligandos de las integrinas (moléculas de adhesión intracelular, ICAMs) sobre

la células del endotelio (Rosales y Juliano, 1995; Springer, 1994).

El aumento en la adhesividad conlleva a que los leucocitos se desplacen lentamente sobre el endotelio hasta encontrar una unión interendotelial. En estos sitios los leucocitos reciben señales adicionales que hacen que éstos salgan completamente de las vénulas y migren al sitio dañado, arrastrándose a través de la matriz extracelular (Anderson, 1996; Wahl, 1996). Una vez que llegan al sitio dañado, los leucocitos se encargan de eliminar el agente dañino.

Integrinas

Las integrinas son proteínas transmembranales heterodiméricas, que actúan como receptores de proteínas de la matriz extracelular (ECM) o de moléculas localizadas en otra célula (co-receptores). Estas moléculas participan en una gran variedad de procesos, como: el desarrollo embrionario, el crecimiento, la inflamación, la activación de los leucocitos, la metástasis de las células tumorales y la apoptosis (Hogan, 1999; Hynes, 1999). Las integrinas están formadas por dos subunidades diferentes nombradas α y β . Cada subunidad tiene un dominio extracelular grande, un dominio transmembranal y en muchos de los casos un dominio citoplásmico pequeño (Hynes, 1992; Rosales y Juliano, 1995) (Figura 2). La región extracelular de ambas subunidades de las integrinas, contribuye a la formación del sitio de unión al ligando. La familia de las integrinas en los vertebrados está formada, hasta este momento, por 17 subunidades α diferentes y 9 subunidades β diferentes. La mayoría de las subunidades β pueden asociarse con varias subunidades α , formando por lo menos 22 receptores diferentes (Hynes, 1992; Plow, 2000; Rosales y Juliano, 1995).

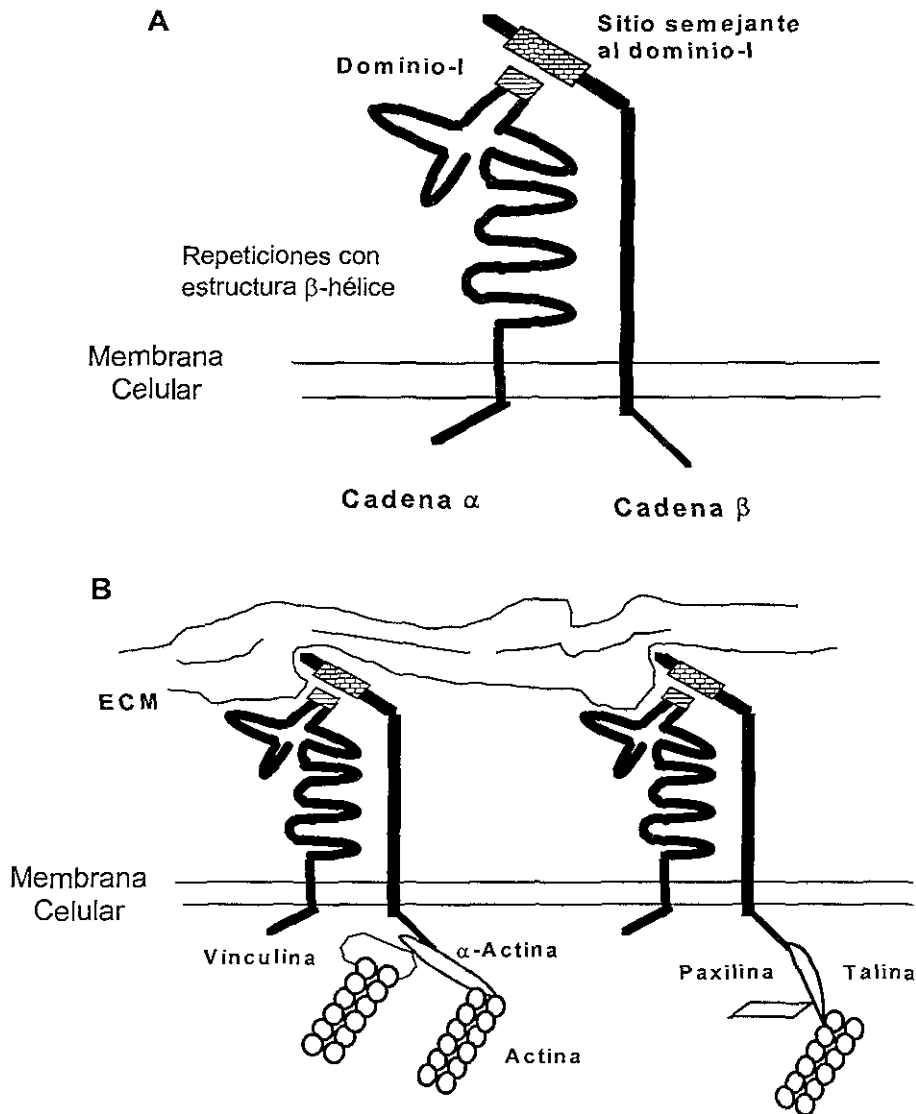


Figura 2. Características de las integrinas. A) Las integrinas están formadas por dos cadenas polipeptídicas: la cadena α y la cadena β . Ambas cadenas tienen una región extracelular grande, una región transmembranal y en la mayoría de los casos una región intracelular pequeña. Las cadenas α tienen una región nombrada dominio-I que contiene un sitio de unión para un nucleótido y un sitio de unión para un catión divalente. Algunas cadenas β tienen una región semejante al dominio-I. B) La región amino terminal de ambas cadenas de las integrinas forman el sitio de unión para su ligando principalmente proteínas de la matriz extracelular (ECM). La región intracelular de las integrinas se une al citoesqueleto de actina a través de algunas proteínas adaptadoras.

La familia de las integrinas puede ser dividida en subfamilias según la subunidad β que la forme. La presencia de una integrina en particular depende del tipo celular. Las células fagocíticas por ejemplo, expresan principalmente las integrinas de la subfamilia $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ (Lowell, 1999;

Plow, 2000) (Tabla 1).

Tabla 1. Integrinas expresadas por las células fagocíticas.

Integrinas	Ligandos
$\beta 1$	
$\alpha 4/\beta 1$ (CD49d/CD29;VLA-4)	Fibronectina, VCAM-1 (CD106)
$\alpha 5/\beta 1$ (CD49e/CD29;VLA-4)	Fibronectina
$\alpha 6/\beta 1$ (CD49f/CD29;VLA-4)	Laminina
$\beta 2$	
$\alpha L/\beta 2$ (CD11a/CD18; LFA-1)	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
$\alpha M/\beta 2$ (CD11b/CD18, Mac-1)	ICAM-1, ICAM-2, C3bi, fibrinógeno, factor X, quinógeno de alto peso molecular, hemaglutinina filamentosa de <i>Bordetella pertussi</i> , lipofosfoglicano y gp63 de <i>Leishmania mexicana</i> , lipopolisacáridos, β -glucano, heparina, factor inhibidor de los neutrófilos, oligodesoxinucleotidos, elastasa
$\alpha X/\beta 2$ (CD11c/CD18, gp150/95)	Fibrinógeno, lipolisacárido
$\alpha D/\beta 2$ (CD11d/CD18)	ICAM-3
$\beta 3$	
$\alpha v/\beta 3$ (CD51/CD61)	Vitronectina, entactina

Después de unirse a su ligando, las integrinas se agrupan, siendo este un paso importante para su activación. En la región citoplásmica de las integrinas agrupadas se forma un complejo proteico que las conecta con el citoesqueleto de actina. Algunas de las proteínas que se concentran en este complejo proteico son: talina, vinculina, paxilina, tensina y α -actina (Burrige y Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Burrige, 1988) (Figura 2). Algunas subfamilias de las integrinas, tales como la $\beta 1$ y la $\beta 5$, al agregarse pueden formar estructuras más especializadas en la superficie celular denominadas focos de adhesión. En estas estructuras, la región citoplásmica de las integrinas también está conectada con filamentos de actina largos (Burrige y Chrzanowska-Wodnicka, 1996).

Transducción de señales mediada por integrinas

El concepto de que las integrinas transducen información extracelular al interior de la célula y que no son sólo simples receptores de adhesión surgió de varios estudios experimentales con diferentes tipos celulares. En esos estudios se observó que cuando las integrinas se unían a su ligando, se inducían muchos cambios bioquímicos intracelulares, tales como: un aumento en la concentración de Ca^{+2} , la producción de metabolitos de fosfolípidos, un aumento del pH, algunos cambios en la expresión de genes y la regulación del proceso de muerte celular programada (apoptosis). Estos cambios observados no son generales; dependen del tipo de integrina que se active y del tipo celular. La información publicada hasta este momento sobre las vías de transducción de señales iniciadas por integrinas es muy extensa. En esta sección se citarán sólo los avances obtenidos en las vías de transducción señales mediadas por integrinas en los neutrófilos y los monocitos/macrófagos.

Cinasas de Tirosina

Las integrinas no poseen ninguna actividad catalítica. Por lo tanto para transducir señales extracelulares se deben apoyar en otras enzimas. La fosforilación de las proteínas en sus tirosinas es uno de los primeros cambios bioquímicos observados en respuesta a la activación de las integrinas. Las tres clases de cinasas de tirosina que se han implicado como transductores de las señales de las integrinas en los neutrófilos y los monocitos/macrófagos son: la familia de cinasas de FAK ($\text{p}125^{\text{FAK}}$ (FAK) y Pyk2), la familia de cinasas de Src y la familia de cinasas $\text{p}72^{\text{syk}}$ (Syk).

La participación de la cinasa de focos de adhesión (FAK) en la transducción de señales iniciada por integrinas en los neutrófilos, monocitos y macrófagos es controvertida todavía. Mientras algunos investigadores han reportado la expresión y la activación de esta cinasa

dependiente de las integrinas en estos tipos celulares (Fernandez, 1997; Gotoh, 1995), otros investigadores han fracasado en detectar tanto la expresión como la activación de la misma (Lin, 1997; Lin, 1994; Roach, 1997). Se ha sugerido que posiblemente la cinasa Pyk (cinasa homóloga a FAK) participe en la transducción de señales mediada por integrinas, ya que esta cinasa se expresa en las células mieloides y se ha observado su activación inducida con las integrinas en las células hematopoyéticas (Astier, 1997; Kondo, 2000).

Las principales cinasas de la familia Src que se expresan en los neutrófilos y los monocitos/macrófagos son: p59/61^{hck} (Hck), p58^{c-fgr} (Fgr), p53/56^{lyn} (Lyn) y p60^{c-src} (Src). Se ha observado que estas cinasas juegan un papel importante en la transducción de señales mediada por integrinas en las células mieloides. Las cinasas Frg y Lyn se activan cuando los neutrófilos se adhieren al fibrinógeno, o cuando los macrófagos se adhieren a fibronectina (Roach, 1997; Yan, 1996). Las evidencias experimentales más relevantes que apoyan la participación de las cinasas de la familia Src en el papel funcional de las integrinas se han obtenido con animales manipulados genéticamente (Meng y Lowell, 1997; Pereira, 2001). Por ejemplo, los macrófagos deficientes genéticamente de Hck (*hck*^{-/-}) o Fgr (*fgr*^{-/-}) disminuyen su extensión sobre las superficies cubiertas con fibronectina y disminuyen la fosforilación en las tirosinas de varias proteínas, a diferencia de los macrófagos normales (Meng y Lowell, 1998). Por otro lado, se ha observado que en las líneas celulares de macrófagos murinos, la adhesión regulada por integrinas activa la cinasa Src y la cinasa de lípidos fosfoinositol 3-cinasa (PI 3-K), a través del proto-oncogen p120^{c-cbl} (c-Cbl). El c-Cbl a su vez se ha identificado como un sustrato de Src en los osteoclastos (Ojaniemi, 1997).

La cinasa de tirosinas Syk, la cual predomina en las células hematopoyéticas, fue implicada originalmente en la respuesta a las integrinas $\beta 3$ en las plaquetas (Gao, 1997).

Posteriormente se observó que en una línea celular de monocitos, el entrecruzamiento de sus integrinas $\beta 1$ inducía la activación de Syk, y se observó una relación entre la activación de esta cinasa y la inducción de la transcripción de citocinas (Lin, 1994). En los neutrófilos, Syk también se activa por integrinas, e induce la formación de complejos proteicos que contienen Syk, Fgr, Lyn, proteínas fosforiladas en tirosina e integrinas $\beta 2$ (Yan, 1997). Estas observaciones refuerza la posibilidad de que la cinasa Syk, junto con las cinasas de la familia Src, sean las responsables de iniciar la transducción de señales mediada por integrinas en los neutrófilos y los monocitos/macrófagos.

Cinasas activadas por mitógenos

Los eventos bioquímicos posteriores a la fosforilación de proteínas se conocen sólo en forma fragmentada. Sin embargo, se ha establecido que, en diferentes tipos celulares las integrinas pueden activar la cascada de la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), principalmente a dos miembros de esta familia, las cinasas activadas extracelularmente, ERK1 y ERK2 (MAPK^{erk1/2}) (Clark y Hynes, 1996; Chen, 1996; Ishida, 1996; Lin, 1997; Mainiero, 1997; Renshaw, 1996). Se ha sugerido que la activación de esta cascada por integrinas se lleva a cabo a través de varios elementos de la vía de Ras (Figura 3). La vía de Ras es utilizada por los receptores cinasa de tirosina para inducir la activación de la cascada de MAPK^{erk1/2}. En esta vía, la autofosforilación del receptor resulta en la activación de la GTPasa de bajo peso molecular Ras (al intercambiar su GDP unido por GTP) a través de proteínas adaptadoras como Grb2 o Shc y proteínas activadoras como mSos (factor intercambiador de GDP por GTP). Ras activada inicia una cascada de fosforilación que comienzan con Raf-1 y continúa con la cinasa de la cinasa de MAP (MEK) y luego ERK, terminando con la activación de factores

de transcripción que activan diferentes genes (Ahn, 1992; Davis, 1995; Gardner, 1994; Garrinton y Johnson, 1999; Kyriakis, 1992).

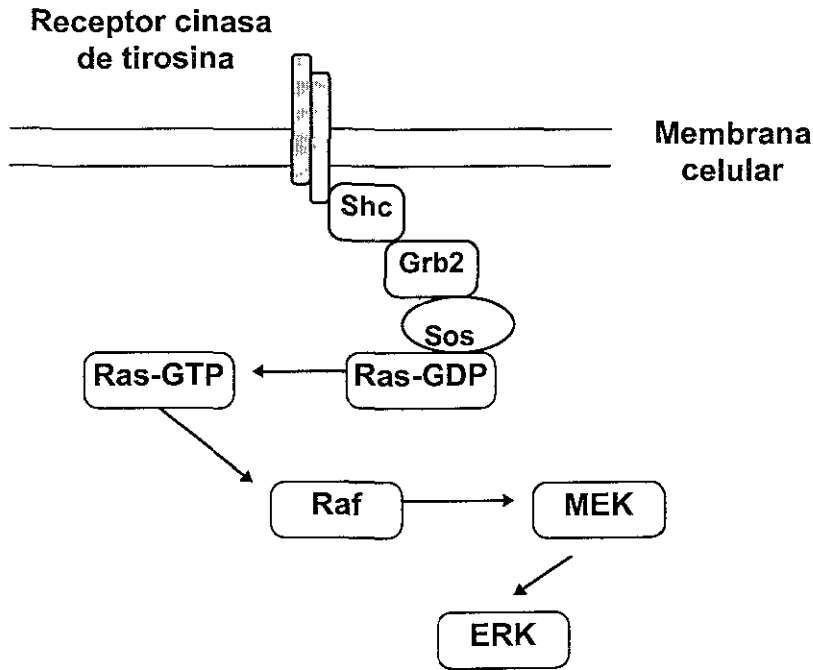


Figura 3. Vía de Ras. Esta vía es utilizada por los receptores cinasa de tirosina para inducir la activación de la cascada de MAPK^{erk1/2}. La autofosforilación del receptor resulta en la activación de Ras por el intercambio de su GDP por GTP a través de las proteínas adaptadoras como Grb2 y Shc y las proteínas activadoras como mSos. Ras activada inicia una cascada de fosforilación que comienzan con Raf-1 y continúa con la cinasa cinasa de MAP (MEK) y luego ERK.

Aunque se ha querido generalizar la participación de la GTPasa Ras en la activación de MAPK^{erk1/2} inducida por integrinas, todavía hay controversia en la participación de esta GTPasa. Algunos grupos encontraron que la activación de MAPK^{erk1/2} no requiere la participación de Ras (Chen, 1994; Chen, 1996) mientras otros encontraron que Ras sí participa (Clark y Hynes, 1996; Kapron-Bras, 1993). Algunos trabajos sugieren que ambas partes tienen razón, ya que las diferencias observadas posiblemente son debidas a la capacidad de las integrinas para utilizar distintos mecanismos para activar MAPK^{erk1/2} (Figura 4). Las integrinas pueden conectarse a la vía

Ras a través de FAK (Schlaepfer, 1994; Schlaepfer, 1996; Schaller, 1992), o a través de la proteína transmembranal caveolina (Cav) (Wei, 1999). Las integrinas, al unirse con su ligando inducirían la autofosforilación de FAK o inducirían un cambio conformacional en Cav. La fosforilación de FAK crea sitios de unión para Grb2 y PI 3-K (BurrIDGE, 1992; Critchley, 2000; Kumar, 1998) y el cambio de conformación en Cav crea un sitio de unión para Shc (Wary, 1996) (Figura 4A). Se ha observado que la activación de MAPK^{erk1/2} independiente de Ras tiene lugar a través de Raf (Arai y Escobedo, 1996; Cacace, 1996). Desafortunadamente todavía no se sabe cuales son las moléculas que podrían estar participando en la conexión entre las integrinas y Raf. Se ha propuesto que las moléculas involucradas podrían ser la fosfolipasa D (PLD) (Serrander, 1996), la proteína cinasa C (PKC) (Vuori y Ruoslahti, 1993), la cinasa unida a las integrinas (ILK) (Dedhar, 1997), o las cinasas de la familia Src (Cobb, 1994) (Figura 4B). Por otro lado, se ha sugerido que el mecanismo utilizado por las integrinas para conducir la activación de MAPK^{erk1/2} también dependa del tipo celular. Por ejemplo, se ha observado que en los neutrófilos y los monocitos/macrófagos, el entrecruzamiento de las integrinas incrementa la activación de MAPK^{erk1/2} (Chen, 1996; Schlaepfer y Hunter, 1997); sin embargo, la participación de Ras sólo se corroborado en los neutrófilos. Este hecho no indica que participe Ras en los monocitos/macrófagos.

En células de mamífero se han identificado 14 GTPasas de la familia Rho (Rac1-3, Cdc42, TC10, RhoA-E, G, H y Rnd1 y 2). Las mejor caracterizadas son Cdc42, Rac1 y RhoA (Aspenström, 1999). El efecto de estas GTPasas sobre la organización del citoesqueleto de actina se ha observado en diferentes sistemas celulares, tales como fibroblastos, leucocitos y neuronas (Aspenström, 1999). Cdc42 participa en la formación de filipodia (protuberancias en forma de dedo formadas por una haz apretado de filamentos de actina en dirección de la protuberancia). Rac1 regula la formación de lamelipodia (protuberancias en forma de malla). RhoA participa en la formación de fibras de estrés (haces de filamentos de actina que atraviesan a la célula) y el ensamble de contactos focales (sitios donde las fibras de estrés se conectan con proteínas ECM a través de los receptores integrinas) (Hall, 1998) (Figura 5). También se ha visto que estas GTPasas pueden estar interconectadas jerárquicamente en una cascada, en la cual Cdc42 activa a Rac1 y esta a su vez activa a RhoA (Aspenström, 1999).

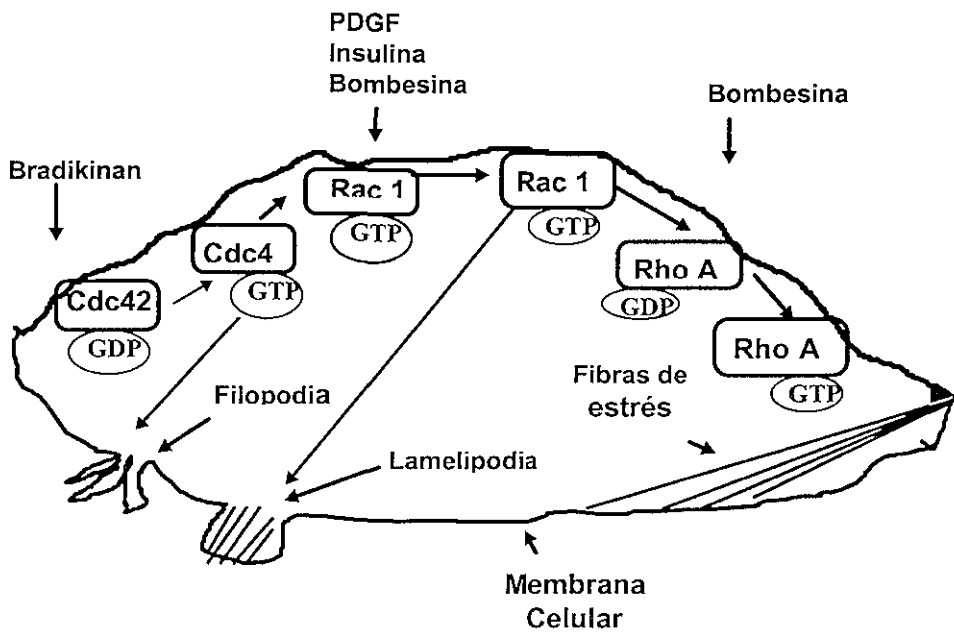


Figura 5. Las GTPasas de la familia Rho regulan la organización del citoesqueleto. Diversos estímulos extracelulares inducen la activación de Cdc42, Rac 1 y Rho A. Estas GTPasas responden rápidamente a los estímulos para la formación de filopodia, lamelipodia y fibras de estrés respectivamente. Los miembros de esta familia pueden interconectarse: Cdc42 puede activar Rac 1, ésta a su vez puede activar a Rho A.

La familia de las GTPasas Rho se ha implicado en la regulación de la agregación de las integrinas en los fibroblastos, así como en la regulación de la adhesión dependiente de integrinas en los leucocitos (Aplin, 1998). Sin embargo, hasta el momento se conoce poco sobre el papel que tiene la familia de las GTPasas Rho en las vías de transducción de señales inducidas con integrinas en las células fagocíticas. Se ha demostrado que en los macrófagos la extensión y la reorganización del citoesqueleto de actina inducido por integrinas son procesos regulados por Cdc42, Rac 1 y Rho A (Allen, 1997).

Basándose en las observaciones experimentales obtenidas en otros sistemas celulares (fibroblastos y células endoteliales), se podrían proponer algunos mecanismos sobre cómo las GTPasas de la familia Rho podrían estar participando en las vías de transducción de señales inducidas por integrinas en las células fagocíticas (Figura 6). Varias moléculas, que son activadas por integrinas pueden conducir a la activación de las GTPasas de la familia Rho. Se ha descrito la activación del proto-oncogen Vav después del entrecruzamiento de las integrinas en varios tipos celulares, incluyendo las células mieloides (Gotoh, 1997; Moores, 2000). La activación de Rac puede ser regulada por Vav por catalizar el intercambio de GDP por GTP de esta GTPasa (Moores, 2000). La activación de Vav a su vez podría estar regulada por Syk (Han, 1998; Mainiero, 2000; Miranti, 1998; Moores, 2000). El entrecruzamiento de las integrinas de las células de ovario de hamster chino (CHO) transfectadas con un vector de expresión de Vav, induce la fosforilación en las tirosinas de Vav y ello depende de la co-expresión de Syk. En este sistema Vav y Syk cooperan también para inducir la formación de lamellipodia, sugiriendo la activación de Rac (Miranti, 1998). Por otro lado en las células hematopoyéticas, se ha observado que la activación de Syk por integrinas es regulada por las cinasas de la familia Src (Erpel y Court, 1995; Parsons y Parsons, 1997; Pereira, 2001; Yan, 1997). Las GTPasas de la familia Rho

también podrían ser activadas por PI 3-K (Akasaki, 1999). Se ha observado que esta cinasa de lípidos participa en la reorganización del citoesqueleto de actina y en la activación de Rac (Akasaki, 1999; Han, 1998; Hawkins, 1995; Leever, 1999). Estas evidencias experimentales aumentan la posibilidad de que PI 3-K, Syk y Vav participen en la activación de las GTPasas de la familia de Rho en la transducción de señales por integrinas en las células fagocíticas.

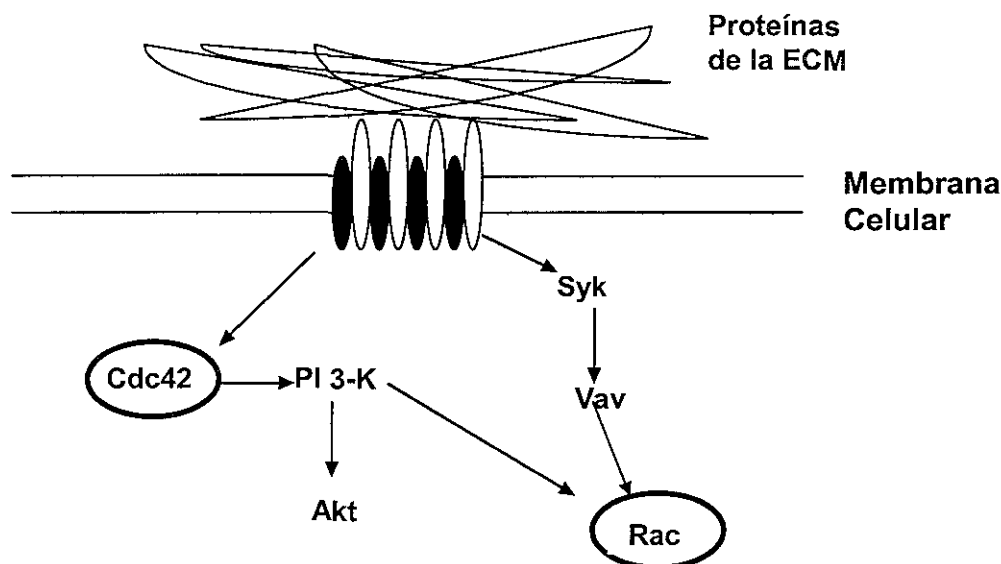


Figura 6. Posibles mecanismos de la activación de las GTPasa de la familia Rho por integrinas. La activación de Rac por integrinas podría ocurrir a través de proteínas tales como Cdc42 y la fosfomositol 3-cinasa (PI 3-K) o posiblemente a través de Syk y Vav.

Las GTPasas de la familia Rho también podrían participar en la transducción de señales por integrinas activando muchas otras moléculas. Cdc42 se ha implicado en la activación PI 3-K, Akt, la cinasa de tirosinas asociada a Cdc42 (ACK) y MAPK^{crk1/2} (Clark, 1998; Yang, 1999). Rac se ha implicado en la activación de MAPK^{p38} y de JNK (Brenner, 1997; Mainiero, 2000) y así mismo Rho se ha implicado en la activación de MAPK^{crk1/2} y de FAK (Critchley, 2000; Renshaw, 1996). Sin embargo, hasta este momento no se conoce cuáles de estas proteínas podrían estar participando en las vías de transducción de señales iniciadas por integrinas en las células fagocíticas.

Expresión de genes inducida por integrinas.

Las integrinas pueden inducir la expresión de genes en varios tipos celulares. En los fibroblastos, por ejemplo, las integrinas $\alpha 5/\beta 1$ inducen la expresión de varios genes específicos de metalproteinasas, mientras que las integrinas $\alpha 4/\beta 1$ inhiben esta respuesta. Tal vez el ejemplo más claro de activación de genes por integrinas se encuentre en los monocitos. La adhesión dependiente de integrinas en los monocitos induce la expresión rápida de un gran número de genes de respuesta inmediata temprana (IE). Algunos de estos genes codifican para citocinas inflamatorias IL-1, IL-8 y TNF- α (Aplin, 1998; Giancotti y Ruoslahti, 1999; Rosales y Juliano, 1995). El entrecruzamiento de las integrinas $\beta 1$ resulta en una rápida acumulación los mRNA de los genes IE activados por adhesión (Haskill, 1988; Hiscott, 1993), mientras que el entrecruzamiento de las integrinas $\beta 2$ no causa la misma respuesta. Estos datos ejemplifican el hecho de que las vías de transducción de señales aún dentro de la familia de las integrinas son diferentes. Elucidar la vía usada por cada tipo de integrina es muy importante para comprender cómo éstos receptores regulan las diversas funciones celulares de los monocitos.

La expresión *in vivo* e *in vitro* de muchos de los genes IE inducidos en los monocitos requiere la activación de factores de transcripción específicos. Los promotores y las regiones reguladoras de varios genes IE contienen secuencias que reconocen el factor de transcripción NF- κ B (Cogswell, 1994; Hiscott, 1993). Este factor se encuentra unido a su inhibidor I κ B en el citosol. NF- κ B se separa de su inhibidor al ser activado y es transportado al núcleo. Hay evidencia experimental que demuestra que el entrecruzamiento de las integrinas induce la activación del factor NF- κ B (Lin, 1994) y que la activación de este factor es esencial para la inducción de genes IE (Cogswell, 1994; Hiscott, 1993; Lin, 1994). Sin embargo aún no se conocen las moléculas

intermediarias que participan en la activación de NF- κ B inducida por integrinas y que conduce a la expresión de los genes IE en estas células (Figura 7). En este sistema se ha observado una conexión entre la activación de NF- κ B y la fosforilación de las proteínas en tirosinas. La cinasa Syk es la enzima que se ha demostrado que se activa en respuesta a las integrinas en monocitos. También se ha observado una relación entre la activación de esta cinasa y la activación del factor NF- κ B (Lin, 1994). Por lo tanto es muy probable que Syk participe en la activación de NF- κ B por integrinas en monocitos. Hay evidencia experimental que demuestra en este sistema que no se requiere la GTPasa Ras en la activación del factor NF- κ B por integrinas (Rosales y Juliano, 1996).

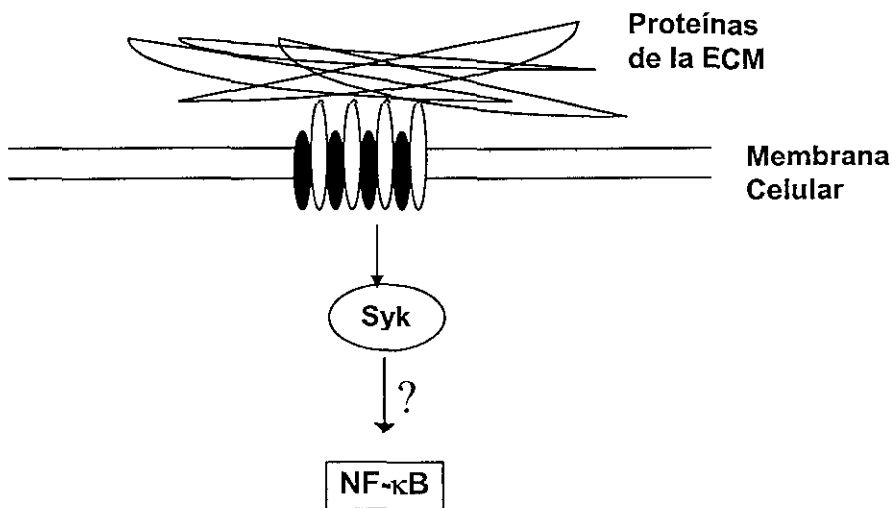


Figura 7. Activación de NF- κ B por integrinas. Las moléculas que participan en la activación de NF- κ B inducida por integrinas en células monocíticas aun no se han elucidado. Sin embargo, Syk es el candidato perfecto debido a que se ha observado que existe una correlación estrecha en la activación de Syk y la activación de NF- κ B.

Como se puede observar, las vías de señalización activadas por integrinas en los monocitos no se han estudiado tan extensamente como en otros sistemas celulares. El conocimiento de estas vías permitirían comprender como estos receptores pueden regular diferentes respuestas celulares de los monocitos.

Plantamiento del Problema

Una de las funciones celulares más importantes que es activada por integrinas $\beta 1$ en las células mielomonocítica es la producción de las citocinas IL-1, IL-8 y TNF- α [Haskill *et al*, 1988]. Esto significa que el entrecruzamiento de las integrinas induce la transcripción de los genes que codifican para la producción de estas proteínas. La transcripción génica de estas citocinas se regula por factores de transcripción. Hasta el momento se conoce poco sobre los factores de transcripción que se activan por las integrinas $\beta 1$ y sobre las vías de transducción de señales que utilizan estos receptores para activar los factores de transcripción que conduciría a la expresión de estas citocinas inflamatorias. Sin embargo, se ha observado que uno de los factores de transcripción que tiene un papel importante en la inducción génica de estas citocinas es el factor de transcripción NF- κ B. Las regiones reguladoras 5' de los genes de las citocinas IL-1, IL-8 y TNF- α , contienen sitios de unión para el factor de transcripción NF- κ B (Cogswell, 1994; Hiscott, 1993). Además, también se ha observado que el entrecruzamiento de las integrinas $\beta 1$ conduce a la activación del factor NF- κ B (Lin, 1994). Debido a estos datos experimentales pensamos que monitorear la activación de NF- κ B sería una manera ideal para estudiar las vías de transducción de señales por integrinas $\beta 1$ que conducen a la inducción génica de dichas citocinas. Pensamos que los candidatos que podrían participar en esta vía de transducción de señales son las proteínas que regulan el ensamble del citoesqueleto de actina tales como PI 3-K y las GTPasas de la familia de Rho. Esta idea se basa principalmente en dos evidencias experimentales: 1) cuando las integrinas se unen a su ligando, inducen la reorganización del citoesqueleto de actina (Dogic, 1999), y 2) la activación de NF- κ B por las integrinas $\beta 1$ parece ser independiente de Ras (Rosales y Juliano, 1996). Algunas observaciones iniciales sugieren que el entrecruzamiento de las

integrinas enciende la vía de Ras (Grb-2→ Sos→ Ras→ Raf→MEK→MAPK^{erk1/2}) (Ahn, 1992; Chen, 1994), y por lo tanto se ha tratado de involucrar esta vía en las funciones inducidas por integrinas. Sin embargo, Ras no parece participar al menos en la activación de NF-κB, (Rosales y Juliano, 1996). Es importante la elucidación de las moléculas que intervienen en la vía de transducción de señales que conducen a la activación de NF-κB y por consecuencia a la expresión de las citocinas inflamatorias, ya que ello nos daría un mejor conocimiento sobre como se regula el proceso inflamatorio por células monocítica.

Hipótesis

Las integrinas $\beta 1$ en los monocitos activan al factor nuclear de transcripción NF- κ B a través de las proteínas PI 3-K, Rac 1 y Rho A.

Objetivo General.

El objetivo general de este trabajo era encontrar algunas de las moléculas que participan en la vía de transducción de señales mediada por las integrinas $\beta 1$, que conducen a la activación del factor de transcripción NF- κ B en los monocitos.

Objetivos Particulares.

Una manera fácil de encontrar algunas de las moléculas que intervienen en esta vía de transducción de señales consiste en medir la activación de NF- κ B por integrinas $\beta 1$ en células monocíticas THP-1 tratadas o sin tratar con inhibidores específicos de proteínas. Esta estrategia experimental nos sirvió para plantear objetivos particulares que en su conjunto nos llevarían a lograr el objetivo general. Los objetivos particulares eran:

- Inducir la activación de NF- κ B por el entrecruzamiento de integrinas $\beta 1$ en la línea celular monocítica de leucemia THP-1.
- Investigar el papel del citoesqueleto de actina en la activación de NF- κ B por integrinas $\beta 1$.
- Investigar la participación de las GTPasas Rac y Rho en la transducción de señales por integrinas $\beta 1$.
- Investigar la participación de fosfoinositol 3-cinasa en la transducción de señales por integrinas $\beta 1$.

Métodos

Reactivos.

a) Anticuerpos. El anticuerpo monoclonal anti-integrina $\beta 1$ (TS2/16) fue donado por el Dr. Martín Hemler del Instituto de Investigación de Cancer Dana Farber (Boston, MA). El anticuerpo monoclonal anti-MHC clase I (W6/32) es de ATCC (Manassas, VA). El anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosinas (AFT8) fue producido por el Dr. Carlos Rosales, ya se ha descrito (Sánchez-Mejorada y Rosales, 1998). El anticuerpo monoclonal anti-HA (12CA5) es de Roche Molecular Biochem (Indianapolis, IN). El anticuerpo monoclonal anti-pan ERK (MAPK^{erk1/2}, No. de catálogo E171120) es de Transduction Laboratories (Lexington, KY). El anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfoinositol 3-Cinasa p110 β (PI 3-K p110 β , No. de catálogo sc-7189) es de Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA). Los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra anticuerpos IgG de ratón (F(ab')₂ de cabra anti-IgG) y F(ab')₂ de cabra anti-IgG conjugados con peroxidasa de raíz fuerte son de Cappel (Aurora, OH).

b) Inhibidores. Los inhibidores de fosfoinositol 3-Cinasa (wortmanina y LY294002), el inhibidor de cinasas de tirosina (herbamicina A) y el inhibidor de Syk (picietanol) son de Calbiochem (San Diego, CA). El inhibidor específico de MEK (PD98059) es de New England Biolabs (Beverly, MA).

c) Plásmidos. El plásmido reportero 3XMHC-luc conduce a la síntesis de luciferasa como respuesta a la activación del factor de transcripción NF- κ B, y contiene tres sitios de unión para el factor de transcripción NF- κ B. Este plásmido fue donado por los Doctores. John Westwick y

David A. Brenner de la Universidad de Carolina del Norte (Chapel Hill, NC). Los plásmidos que dirigen la síntesis de la forma normal o mutada de las proteínas de Rho ó Rac fueron donados por el Dr. Channing Der de la Universidad de Carolina del Norte (Chapel Hill, NC). Los cDNAs de las formas de Rho y Rac fueron clonados en el vector retroviral pZIP. El Rho N19 (asparagina 19) y el Rac N17 (asparagina 17) son las formas dominantes negativas de estos genes, mientras Rho L63(leucina 63) y Rac I115 (isoleucina 115) son las formas activadas (oncogénicas). El plásmido que dirige la síntesis de MAPK^{erk1/2} deficiente en su actividad cinasa (K⁻MAPK^{erk1/2}) fue donado por el Dr. Rudy Juliano de la Universidad de Carolina del Norte (Chapel Hill, NC). El plásmido que dirige la síntesis de MAPK^{erk1/2} marcada con epítoto (HA-MAPK^{erk1/2}) fue donado por el Dr. Mike Weber de la Universidad de Virginia (Charlottesville, VA). El sistema de plásmidos Gal-Elk/5XGal-luc fue donado. El plásmido Gal-Elk conduce la expresión de una proteína híbrida que contiene la región de activación de Elk y el sitio de unión a DNA de Gal, el cual es expuesto cuando la región de Elk de esta proteína es fosforilada. El plásmido 5XGal-luc, conduce la síntesis de luciferasa como respuesta a la activación de la proteína híbrida Elk/Gal.

Células.

Los monocitos humanos de la línea celular THP-1 se mantienen en medio RPMI-1640, suplementado con suero fetal de bovino 10% inactivado, L-glutamina 20 μ M, penicilina 50 unidades/ml y estroptomicina 50 μ g/ml. Todos los reactivos utilizados en el mantenimiento de las células THP-1 son de Gibco BRL (Grand Island, NY)

Tranfecciones.

Las células THP-1 se transfectan mediante el método del DEAE-dextrán (Ausubel, 1994). Se añaden 3×10^6 células en 0.5 ml de medio RPMI 1640 a 4 ml de medio RPMI 1640 que contenga 5 µg del plásmido en cuestión. A esta mezcla se le agrega 500 µl de DEAE-dextrán a una concentración de 2 µg/ml y se incuba durante una hora a 37°C. Después las células se centrifugan y resuspen en RPMI 1640 que contenga cloroquina 0.1 mM. Las células se incuban durante otra hora a 37°C. Posteriormente las células se lavan con PBS e incuban en medio RPMI suplementado y se mantienen a 37°C y 5% CO₂ por 24 horas antes de usarlas.

PBS: KH₂PO₄ 1 mM, Na₂HPO₄ 6 mM, NaCl 155 mM, pH 7.2

Actividad de la luciferasa

La actividad de la luciferasa se determina en los lisados celulares con un luminómetro (Luminómetro Monolight 2010, Winooski, VT) durante 20 segundos. 50 µl de los lisados celulares se mezclan con 100 µl de buffer de luciferasa y 100 µl de sustrato (250 µM D-luciferin, pH 6.5; Sigma-aldrich, St Louis, MO). Para evaluar la eficiencia de las transfecciones, las células se transfectan con el plásmido control pGL3 (Promega, Madison, WI) el cual expresa constitutivamente la luciferasa por tener el promotor SV40. La actividad de la luciferasa se normaliza basándose en la concentración proteica de los lisados celulares y se reporta como número de incremento sobre los controles no estimulados, los cuales arbitrariamente son tomados como uno. La concentración proteica de los lisados se determina usando el método de ácido bicinoninico. Los análisis estadísticos realizados en este trabajo fueron con la prueba t- Student.

Buffer de luciferasa: triglicina 30 mM, ATP 3 mM, MgSO₄ 15 mM, ditioneitol 10 mM, pH 7.8

Estimulación

a) Fibronectina. Se cubren cajas de cultivo de 33 mm de diametro con fibronectina humana 20 µg/ml en PBS toda la noche a 4°C y son bloqueadas con BSA 1% (albumina de bovino). Las células THP-1 se lavan con PBS y resuspenden en 1.5 ml de medio RPMI 1640. Las células se colocan sobre las cajas cubiertas de fibronectina o dejan en suspensión e incuban a 37°C por los tiempos que se indican en la sección de resultados.

b) Anticuerpos. Las células THP-1 se incuban en medio RPMI 1640 solo, o en medio RPMI 1640 que contenga el anticuerpo deseado a una concentración de 5 µg/ml por una hora a 4°C. Las células se lavan y resuspenden en medio RPMI 1640 conteniendo F(ab')₂ de cabra anti-ratón IgG a una concentración de 5 µg/ml. Las células se incuban a 37°C por 3 minutos o por los tiempos indicados en la sección de resultados.

Ensayos de movilidad retardada.

Se congelan 3×10^6 de células THP-1 en un baño de hielo seco y metanol por 10 minutos, posteriormente se derriten en 100 µl de buffer A (hipotónico). Esto provoca que se rompa la membrana celular al 100% sin afectar los núcleos. Los núcleos celulares se recuperan por centrifugación a 800 x g (3000 rpm en una microcentrifuga) por 10 min y posteriormente se lisan con 20 µl de buffer C (hipertónico). Los extractos nucleares se mezclan con el mismo volumen de buffer D y guardan a -80°C.

Las reacciones de unión al oligo de DNA se hacen en un volumen final de 20 µl. Esta reacción debe contener 10 µg de proteína de nuclear, el oligonucleotido radiomarcado con ³²P, 1 µg de poli[d(I.C)] y 10 µg de BSA. El oligonucleotido que se utiliza tiene una secuencia consenso

general de unión para NF- κ B. La secuencia es: 5'-GGGGACTTTCCC-3'. La mezcla de reacción se incuba por 20 minutos a temperatura ambiente y se para con 6 μ l buffer de carga. Los complejos DNA-proteína son separados en geles de poliacrilamida al 5% no desnaturalizantes los cuales se corren a 150 V. Los geles son secados y analizados con un aparato Molecular Dynamics Phosphoimager modelo Storm 850 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England).

Buffer A hipotónico: Hepes 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, ditioneitol 1mM.

Buffer C hipertónico: Hepes 20 mM, NaCl 0.4 M, MgCl₂ 1.5 mM, glicerol 25% v/v, EDTA 0.2 mM, ditioneitol 1 mM, PMSF 0.5 mM, pH 7.9

Buffer D: Hepes 20 mM pH 7.9, KCl 50 mM, glicerol 20% v/v, EDTA 0.2 mM, ditioneitol 1 mM, PMSF 0.5 mM.

Buffer de carga: Bromofenol 0.25%, xileno de cianol 0.25%, glicerol 30%, MgCl₂ 4mM, KCl 30 mM, Tris-HCl 20mM pH 7.9.

Lisados celulares.

Las células THP-1 se lisan en buffer RIPA conteniendo vanadato de sodio 1 mM, p-nitrofenil fosfato 1 mM, PMSF 2 mM, aprotinina 50 μ g/ml, leupeptina 25 μ g/ml y pepstatina 25 μ g/ml. Esta mezcla se incuba por 15 minutos a 4°C y posteriormente se centrifuga a 2000 x g por 5 minutos. Los sobrenadantes se guardan a -80°C hasta que se utilizan.

Buffer RIPA: NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, HEPES 50 mM, desoxicolato de sodio 0.5%,

Nonidet P-40 1%, pH 7.5

Western Blot

Las proteínas de los lisados celulares totales de un número equivalente de células ó de

inmunoprecipitados de MAPK^{erk1/2} ó inmunoprecipitados de PI 3-K se separan en geles SDS-acrilamida al 10 %, al 12 % o al 8% repectivamente. Los geles se corren a una corriente de 20 mAmp utilizando buffer para electrodo. Las proteínas se electrotrasfieren a membranas de fluoruro de polivinilidino (PVDF) a 500 mAmp por dos horas en presencia de buffer de transferencia. Las membranas se incuban en buffer de bloqueo toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas se incuban con el correspondiente anticuerpo en buffer de bloqueo por una hora a temperatura ambiente, anti-fosfotirosina (AFT8) 1 µg/ml, anti-ERK 75 ng/ml y anti-PI 3-K 100 ng/ml. La membranas se lavan 6 veces con PBS; cada lavado es de 5 minutos. Posteriormente las membranas se incuban por otra hora con F(ab')₂ de cabra anti-ratón IgG o F(ab')₂ de cabra anti-conejo IgG acoplados a peroxidasa (HRP) a una dilución de 1/3333 en buffer de bloqueo. Después de seis lavados más con PBS, las proteínas que reaccionan con el anticuerpo se detectan usando un sustrato quimiolumincente (Super Signal, Pierce, Rockford, IL) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las membranas se desnudan de los anticuerpos unidos mediante una incubación por 30 minutos a 50°C en un buffer que contenga Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.7, 2-mercaetanol 100 mM, SDS 2 %. Las membranas se prueban con otros anticuerpos.

Buffer de bloqueo: BSA 1%, leche en polvo descremada 5%, Tween 20 0.1% en PBS.

Buffer de electrodo: Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%.

Buffer de transferencia: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% pH8.3

Ensayo para medir la actividad de PI 3-K.

PI 3-K es inmunoprecipitada de los lisados celulares (equivalente a 1.5×10^7 células THP-1) con 1 µg del anticuerpo anti-PI 3-K. Primero el anticuerpo se incuba con 50 µl de proteína G-sefarosa 50 % (Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden) por dos horas a 4°C y posteriormente se agregan los

lisados celulares. Esta mezcla se incuba por tres horas a 4°C. Las perlas de sefarosa se lavan: 1) dos veces con PBS frío que contenga NP-40 1% y vanadato de sodio 1 mM, 2) dos veces con Tris 100 mM pH 7.4 frío que contenga vanadato de sodio 1mM y 3) dos veces con buffer TNE frío. Los inmunoprecipitados se resuspenden en: 10 µl de TNE y 10 µl de MgCl₂ 100 mM. Para iniciar la reacción de cinasa se agrega: 40 µg de L-α-fosfatidilinositol (resuspendidos en 10 µl de una disolución de EGTA 1 mM, Tris 10 mM pH 7.4) y 10 µl de buffer de cinasa. La mezcla se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos y la reacción se para con 20 µl de HCl 6N. Los lípidos se extraen agregando a la mezcla anterior 160 µl de CHCl₃:CH₃OH (1:1 v/v) y agitando vigorosamente. Posteriormente esta mezcla se centrifuga a velocidad máxima por 10 minutos en una microcentrifuga. Cincuenta µl de la fase orgánica se aplican en una placa de sílica gel oxilata (Sigma-aldrich, St Louis, MO). Los lípidos se separan por cromatografía en capa delgada utilizando una mezcla de disolventes de CHCl₃:CH₃OH:H₂O:NH₄OH (60:47:11.3:2 v/v). El fosfatidilinositol-3-fosfato se detecta por autoradiografía. Para evaluar la cantidad de proteína inmunoprecipitada un alícuota de cada muestra se separa y se analiza por Western blot con anticuerpos anti-PI 3-K.

Buffer TNE : Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, y Na₃VO₄ 1 mM.

Buffer de cinasa : ATP 0.88 mM, 8 µCi de [γ -³²P]ATP (0.11 TBq/mmol; 2 mMCi/ml).

Ensayo para medir la actividad de MEK.

MEK se inmunoprecipita de los lisados celulares (equivalente a 1.5 X 10⁶ células THP-1) con 0.5 µg de anticuerpo anti-MEK. Primero el anticuerpo se incuba con 50 µl de proteína A sefarosa al 50% por dos horas a 4°C. Posteriormente se mezcla con el lisado celular y se incuba por otras dos

horas a 4°C. Las perlas de sefarosa se lavan una vez con buffer de RIPA y cuatro veces más con buffer de lavado frío. Los inmunoprecipitados se resuspenden en 40 µl de buffer de cinasa conteniendo 3µg de MAPK^{erk1/2} deficiente en su actividad de cinasa (K⁻MAPK^{erk1/2}) como sustrato para MEK. Las mezclas se incuban a temperatura ambiente por 30 minutos. La reacción se para con 20 µl de buffer de carga 2X y calentando a 100°C por 5 minutos. Las proteínas se separan en geles de SDS-acrilamida al 12%. Las proteínas se analizan por autorradiografía. Para evaluar la cantidad de proteína inmunoprecipitada se separa una alícuota de cada muestra y se analiza por Western blot con anticuerpos anti-MEK.

Buffer de lavado: Tris-HCl 0.25 M, pH 7.5, NaCl 0.1 M.

Buffer de cinasa: Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, MgCl₂ 10mM, ditioneitol 1 mM, ATP 25 µM, 5 µCi de [γ -³²P]ATP (0.11 TBq/mmol; 2 mMCi/ml).

Buffer de carga: SDS 5%, glicerol 20%, Azul de bromofenol 0.25%, Tris 125 mM pH 6.7

Inmunoprecipitación de HA-MAPK^{erk1/2}.

Se inmunoprecipita MAPK^{erk1/2} marcada con un epítoto de hemaglutinina de influenza (HA) de lisados celulares (equivalente a 1.5 X 10⁷ células THP-1) con el anticuerpo anti-HA, 12CA5. Primero el anticuerpo se incuba con los lisados celulares por 2 horas a 4°C y posteriormente se agrega 50 µl de sefarosa-proteína G al 50%. Se incuba la mezcla por 4 horas a 4°C. Las perlas de sefarosa se lavan tres veces con buffer de RIPA frío y cuatro veces más con PBS frío. Los inmunoprecipitados se separan en geles SDS-acrilamida 9% y analizan por western blot con anticuerpos anti-fosfotirosina.

RESULTADOS

Las integrinas $\beta 1$ activan a NF- κ B

En varios trabajos se ha reportado que el entrecruzamiento de las integrinas $\beta 1$ en los monocitos induce la transcripción de los genes de IL-1, IL-8 y TNF- y que ello requiere la activación del factor de transcripción NF- κ B (Cogswell, 1994; Eierman, 1989; Haskill, 1991; Haskill, 1988). Por lo tanto un buen modelo para elucidar que vías de transducción de señales son activadas por integrinas $\beta 1$ es evaluar la activación del factor de transcripción NF- κ B en la línea celular monocítica THP-1. La adhesión a fibronectina o el entrecruzamiento de las integrinas $\beta 1$ de células THP-1 con el anticuerpo monoclonal anti-integrina $\beta 1$ (TS2/16) induce a la activación de NF- κ B. Esta activación se reflejó en un incremento de la actividad de luciferasa de alrededor de tres veces en comparación con las células que no fueron estimuladas o fueron estimuladas con el anticuerpo monoclonal anti-MHC clase I (Figura 8). La activación de NF- κ B también se midió por su translocación al núcleo de la célula. Esto se realizó a través de ensayos de movilidad retardada que determina la formación de los complejos DNA-NF- κ B. En estos ensayos la mayor activación de NF- κ B fue 20 minutos después del entrecruzamiento de las integrinas $\beta 1$. A este tiempo se observó un incremento de 5 veces en la formación del complejo NF- κ B-DNA (Figura 9).

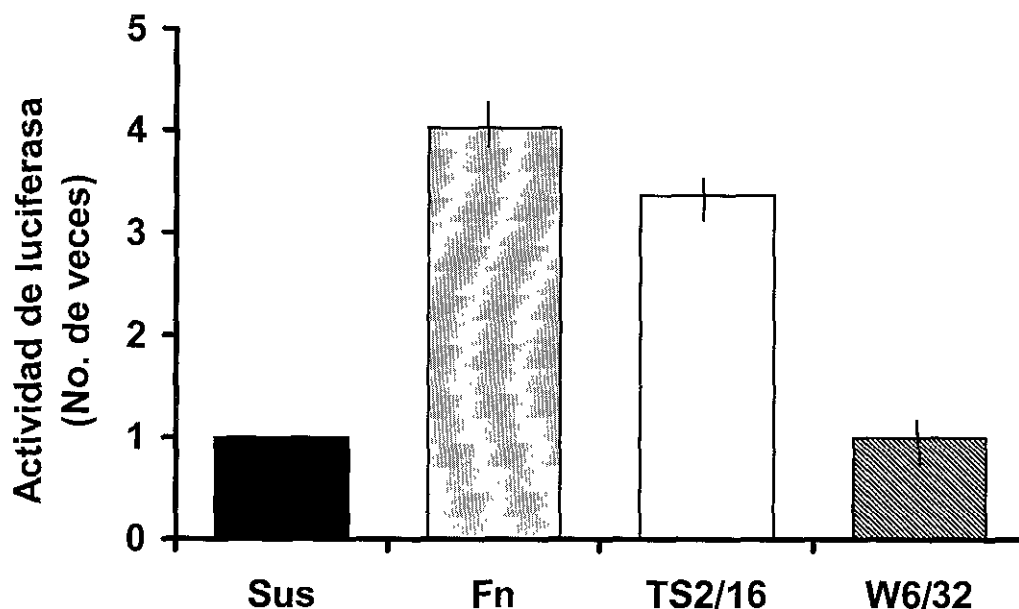


Figura 8. El entrecruzamiento de las integrinas $\beta 1$ induce la activación $NF-\kappa B$. Se tranfectaron 3×10^6 células THP-1 con el plásmido reportero específico de $NF-\kappa B$ (3XMHC-luc). Veinticuatro horas después de la transfección se pusieron las células en medio RPMI-1640 sin suplementar y se dejaron en suspensión o adherieron a fibronectina (Fn). Algunas células se trataron con el anticuerpo monoclonal anti-integrinas $\beta 1$ (TS2/16) o con el anticuerpo monoclonal anti-MHC clase I (W6/32). Después de cuatro horas de incubación a $37^\circ C$ las células fueron lisadas y la actividad de luciferasa que representa la actividad de $NF-\kappa B$ fue determinada en un luminómetro. Los datos son promedio (+/-) error estandar de 3 determinaciones por separado.

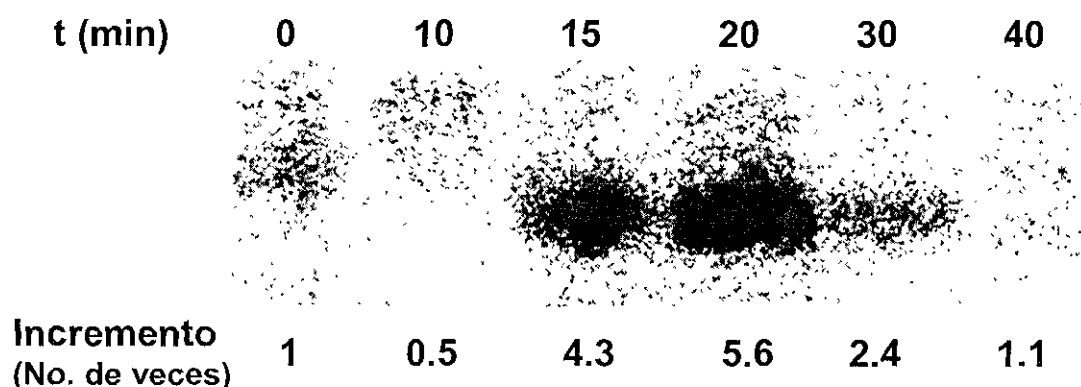


Figura 9. Cinética de activación de $NF-\kappa B$ por integrinas $\beta 1$. Se incubaron 3×10^6 células THP-1 con el anticuerpo monoclonal anti-integrina $\beta 1$ (TS2/16) y se estimularon por los tiempos indicados. Se prepararon los extractos nucleares para los ensayos de unión de proteína al DNA como se indica en la sección de métodos. Las bandas son los complejos específicos DNA/ $NF-\kappa B$. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

El citoesqueleto regula la activación de NF-κB por integrinas β1

Las integrinas, al entrecruzarse, inducen reorganización del citoesqueleto de actina (Burridge y Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Harris, 2000; Rosales y Juliano, 1995). Por tal motivo decidimos estudiar el papel del citoesqueleto de actina sobre la activación de NF-κB. Las células THP-1 que se trataron con citocalasina B (compuesto que destruye los filamentos de actina), a 10 µg/ml por 15 minutos a 37°C antes de la estimulación con integrinas no mostraron activación de NF-κB. Esto se pudo observar tanto en los ensayos de transfección (Figura 10), como en los ensayos de movilidad retardada (Figura 14). Estos resultados nos sugieren que el citoesqueleto de actina es requerido para la activación de NF-κB a través de las integrinas β1.

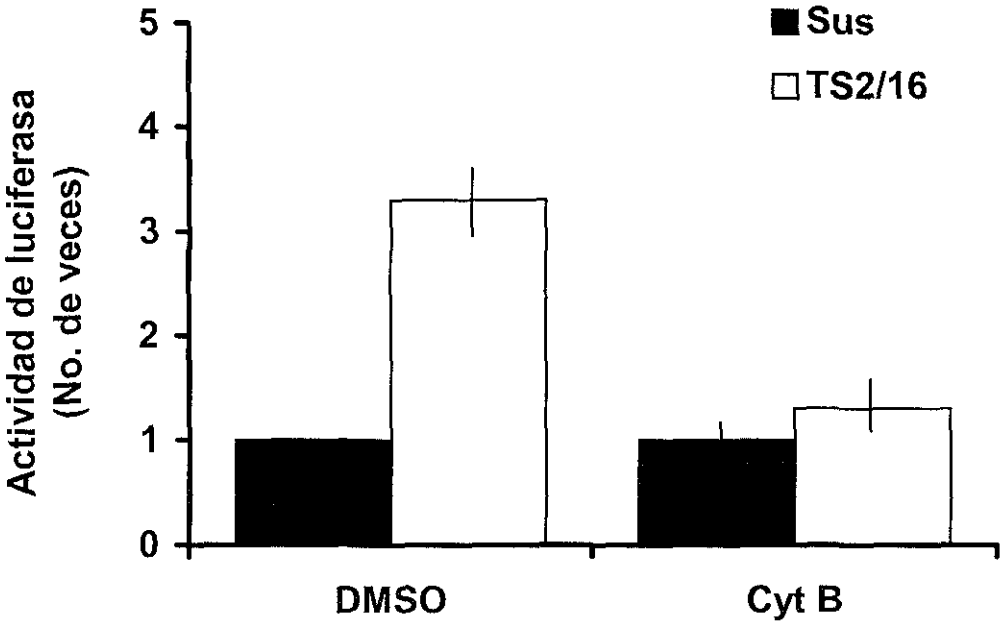


Figura 10. La activación de NF-κB por integrinas β1 es dependiente del citoesqueleto. Se transfectaron 3X 10⁶ células THP-1 con el plásmido reportero específico de NF-κB (3XMHC-luc). Veinticuatro horas después de la transfección las células se pusieron en 4 ml RPMI sin suplementar y se dejaron en suspensión (Sus) o trataron con el anticuerpo monoclonal anti-integrinas β1 (TS2/16). Antes de la estimulación, las células se trataron con 10 µg/ml de citocalasina B (Cyt B) o sólo con el disolvente (DMSO) por 15 minutos a 37°C. Después de cuatro horas de incubación a 37°C, las células se lisaron y la actividad de luciferasa se determinó en luminómetro. Los datos son promedio (+/-) error estandar de 3 determinaciones por separado.

Las GTPasas Rho y Rac regulan la activación de NF- κ B por integrinas β 1

La inhibición de la activación de NF- κ B por citocalasina B y el hecho de que Ras no parece estar involucrada en la activación de este factor nuclear por integrinas β 1 en este tipo celular (Rosales y Juliano, 1996) sugería que posiblemente otras GTPasas podrían estar participando en la activación de NF- κ B por integrinas β 1. Las GTPasas de la familia Rho juegan un papel importante en la reorganización del citoesqueleto de actina inducido por las integrinas (Hall, 1998). Por tal motivo nos pareció que estas GTPasas podrían participar en la activación de NF- κ B por integrinas β 1. Para analizar la participación de las GTPasas Rho y Rac en la activación de NF- κ B por integrinas, las células THP-1 fueron co-transfectadas con el plásmido reportero de NF- κ B y otro plásmido que dirige la expresión de una forma mutada de Rho o de Rac y posteriormente se estimularon por adhesión a fibronectina. Las células estimuladas que expresaban la forma silvestre de Rho activaban a NF- κ B de igual manera que las células que contenían el vector vacío. Reflejándose en ambos casos un incremento de la actividad de luciferasa alrededor de tres veces comparado con las células que no fueron estimuladas (Figura 11). Las células estimuladas que expresaban la dominante negativa (Rho N19, inhibe Rho endógeno) provocó un incremento en la actividad de NF- κ B de casi 8 veces (Figura 11). En contraste, la forma oncogénica Rho L63 bloqueó la activación de NF- κ B por integrinas β 1 a un nivel basal (Figura 11). La expresión de la forma silvestre de Rac tampoco cambio el nivel de activación de NF- κ B después de la adhesión celular a fibronectina (Figura 12). Sin embargo, al contrario de los efectos de Rho, la dominante negativa Rac N17 bloqueó la activación de NF- κ B (Figura 12), mientras que la mutante oncogénica Rac I115 causó un incremento en la actividad de luciferasa de casi 11 veces después de la adhesión celular a fibronectina (Figura 12). Estos

resultados sugieren que tanto Rho y como Rac participan en la regulación de la activación de NF- κ B inducida por integrinas β 1, pero que estas GTPasas tienen efectos contrarios sobre el factor NF- κ B, ya que Rho parece actuar como un regulador negativo.

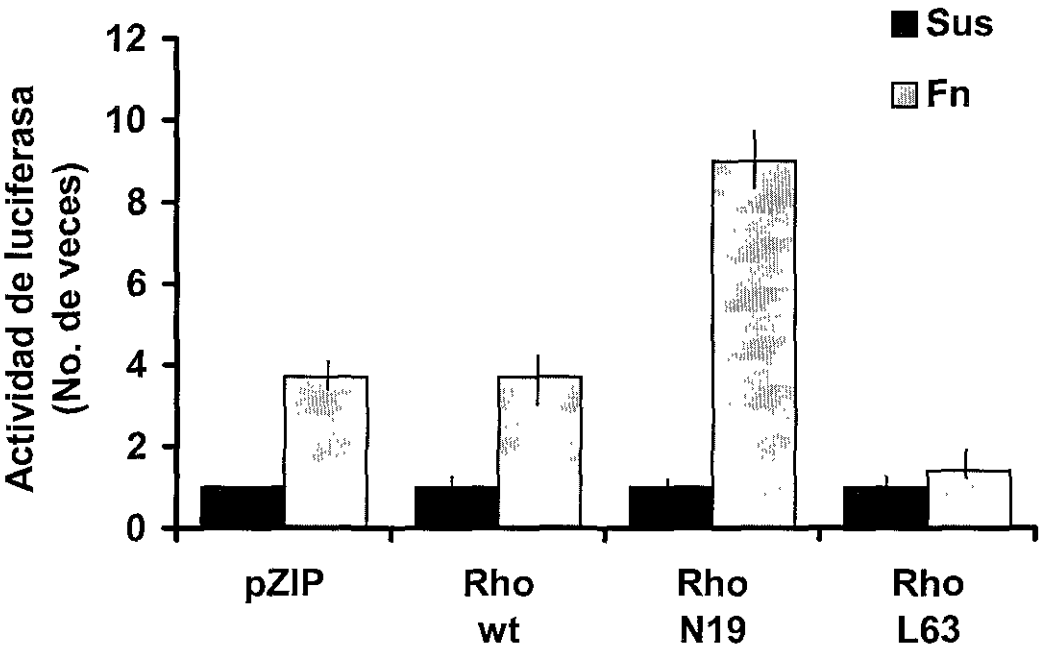


Figura 11. Rho activado inhibe la activación de NF- κ B por integrinas β 1. Se co-transfectaron 3×10^6 células THP-1 con el plásmido reportero específico de NF- κ B (3XMHC-luc) y un plásmido que dirige la expresión de la forma silvestre de Rho, la forma dominante negativa de Rho (Rho N19) o la forma oncogénica activada de Rho (Rho L63). Veinticuatro horas después de la co-transfección las células fueron puestas en 4 ml de medio RPMI-1640 sin suplementar y se dejaron en suspensión (Sus) o adherieron a fibronectina (Fn). Después de cuatro horas de incubación a 37°C las células se lisaron y se determinó la actividad de luciferasa. pZIP es el vector vacío en el cual se clonaron los diferentes cDNA de Rho. Los datos son promedio (+/-) error estándar de 8 determinaciones por separado.

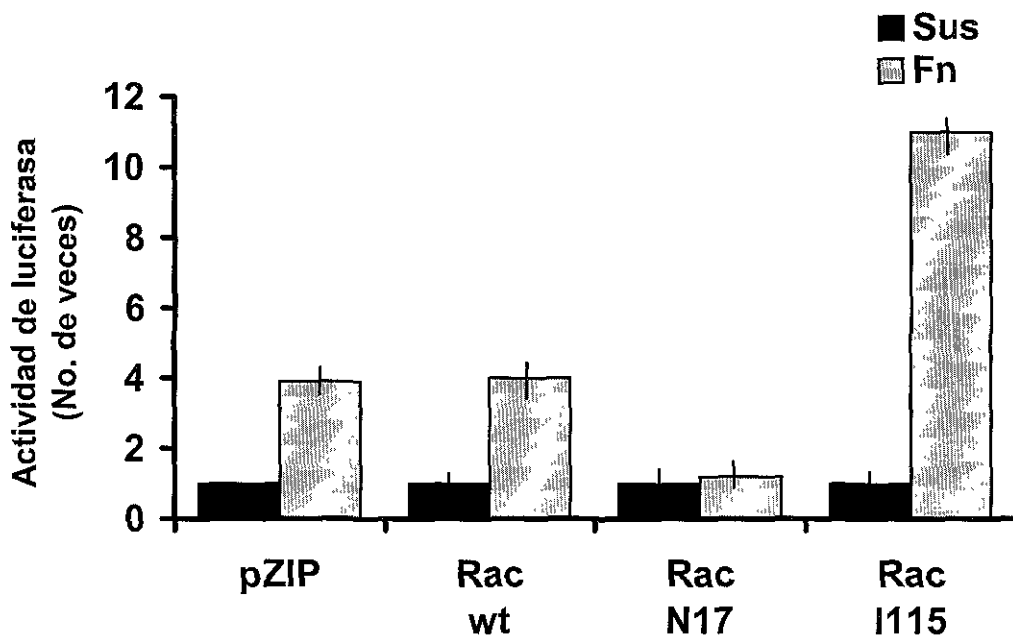


Figura 12. La dominante negativa de Rac inhibe la activación de NF- κ B por integrinas β 1. Se co-transfectaron 3×10^6 células THP-1 con el plásmido reportero específico de NF- κ B (3XMHC-luc) y un plásmido que dirige la expresión de la forma silvestre de Rac, la forma dominante negativa de Rac (Rac N17) o la forma oncogénica activada de Rac (Rac I115). Veinticuatro horas después de la contranfección las células se pusieron en 4 ml de medio RPMI sin suplementar y se dejaron en suspensión (Sus) o adherieron a fibronectina (Fn). Después de cuatro horas de incubación las células se lisaron y se determinó la actividad de luciferasa. pZIP es el vector vacío en el cual se clonaron los diferentes cDNA de Rac. Los datos son promedio (+/-) error estándar de 8 determinaciones por separado.

PI 3-K participa en la activación de NF- κ B por integrinas β 1

Fosfatidilinositol 3-Cinasa (PI 3-K) se ha descrito como una proteína que participa en varias repuestas intracelulares inducidas por integrinas β 1 (Chen y Guan, 1994; Howe, 1998; King, 1997). Además esta cinasa también participa en la reorganización del citoesqueleto de actina y en la activación de Rac (Akasaki, 1999; Aspenström, 1999; Han, 1998). Debido a esto decidimos analizar si PI 3-K participaba también en la activación de NF- κ B por integrinas β 1. Las células THP-1 transfectadas con el plásmido reportero de NF- κ B se trataron con wortmanina 50 nM y LY294002 50 μ M (inhibidores específicos de PI 3-K) antes de ser estimuladas por

adherirlas a fibronectina o por entrecruzamiento de sus integrinas $\beta 1$ con anticuerpo. Ambos inhibidores bloquearon la activación del factor NF- κ B, sugiriendo con esto que PI 3-K participa en la activación de este factor de transcripción (Figura 13). Además, por ensayos de movilidad retardada, se observó que wortmanina y LY294002 bloqueaban por completo la unión de NF- κ B a su secuencia consenso en el DNA (Figura 14). Esto confirmó la participación de PI 3-K en la activación de este factor. La hipótesis de que PI 3-K participa en esta vía es reforzada por la observación de que el entrecruzamiento de las integrinas $\beta 1$ con el anticuerpo activó a PI 3-K. Esta respuesta se bloqueó en presencia de los dos inhibidores de PI 3-K (Figura 15).

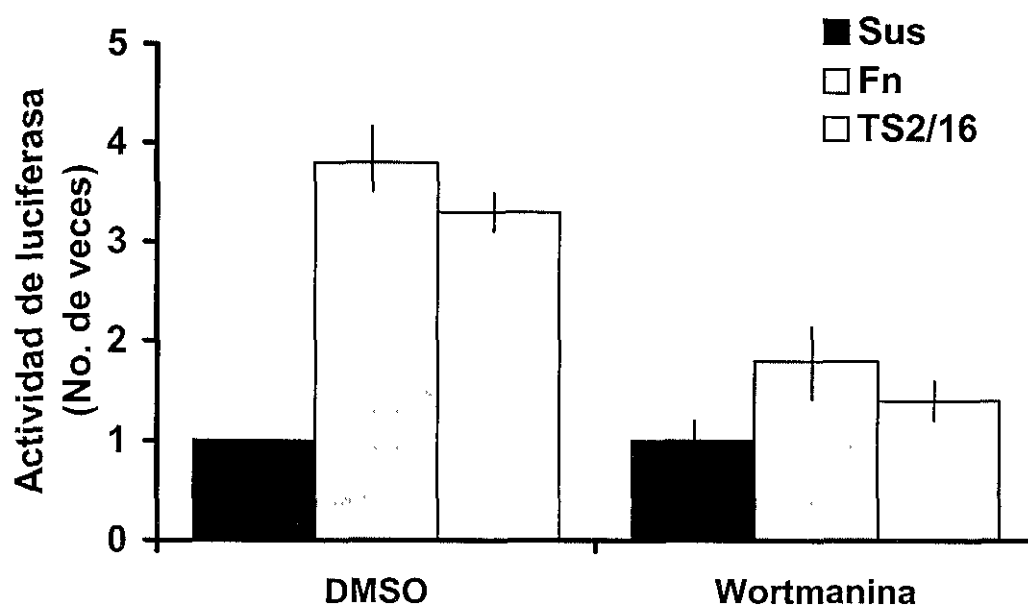


Figura 13. La activación de NF- κ B es dependiente de PI 3-K. Se transfectaron 3×10^6 células THP-1 con el plásmido reportero específico de NF- κ B. Veinticuatro horas después de la transfección las células se transfirieron a 4 ml de medio RPMI-1640 sin suplementar y se dejaron en suspensión (Sus) o se adherieron a fibronectina (Fn), o se trataron con anticuerpo monoclonal anti-integrinas $\beta 1$ (TS2/16). Antes de la estimulación las células se trataron con wortmanina 50 nM o sólo el solvente (DMSO) por 30 minutos a 4°C. Después de cuatro horas de incubación a 37°C las células fueron lisadas y la actividad de luciferasa determinada. Los datos son promedio (+/-) error estándar de 6 determinaciones por separado.

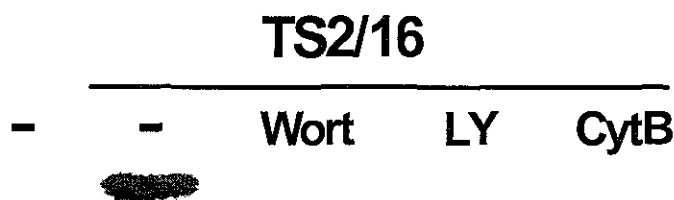


Figura 14. La activación de NF-κB por integrinas β1 necesita PI 3-K y el citoesqueleto. Se incubaron 3×10^6 células monocíticas THP-1 con el anticuerpo monoclonal anti-integrina β1 (TS2/16) por una hora, se lavaron y resuspendieron en medio RPMI-1640 que contenía los fragmentos F(ab')₂ de anti-IgG de ratón a 37°C durante 20 minutos. Después de la incubación se preparan los extratos nucleares para los ensayos de unión de proteína al DNA. Algunas células se pretrataron con wortmanina 50 nM (Wort), LY294002 50 μM (LY), o citocalasina B 10 μg/ml (Cyt B) o sólo con el solvente DMSO (-). Las bandas son los complejos específicos de DNA/NF-κB. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

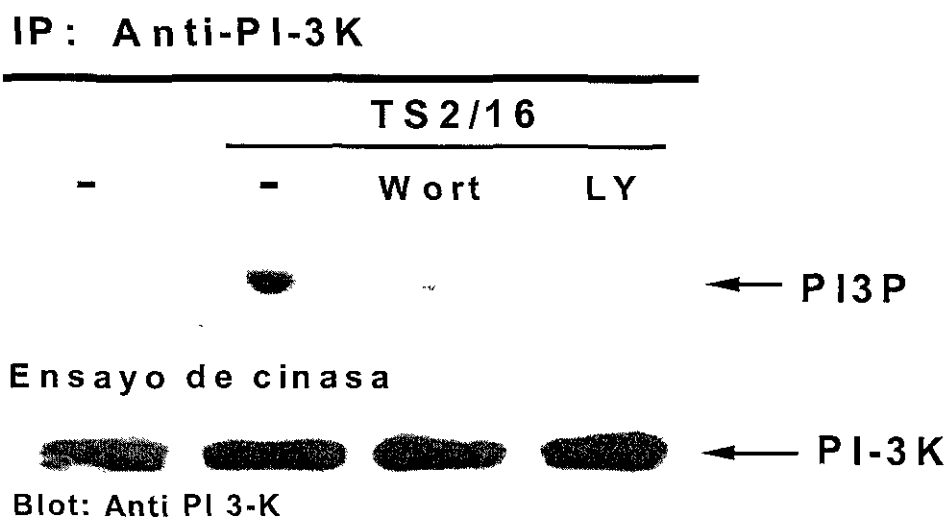


Figura 15. El entrecruzamiento de las integrinas β1 induce la activación de PI 3-K. Se estimularon 1.5×10^7 células THP-1 con anticuerpo anti-integrina β1 (TS2/16). PI 3-K fue inmunoprecipitada (IP) y su actividad se midió con un ensayo de cinasa *in vitro*. Algunas células se incubaron con wortmanina 50 nM (Wort) por 30 minutos o con LY29002 50 mM (LY) por 60 minutos o sólo con el solvente DMSO (-). Los paneles inferiores en cada figura son Western blot anti-PI 3-K donde se muestra la misma cantidad de proteína inmunoprecipitada de cada muestra. PI3P, fosfatidilinositol 3-fosfato. Los datos son representativos de tres experimentos por separado.

Se sabe que uno los primeros pasos en la transducción de señales por integrinas es la activación de algunas cinasas de tirosina. Además uno de los mecanismos de activación de PI 3-K es la unión de la subunidad regulatoria p85 a través de su region SH2 a las tirosinas fosforiladas (Krasilnikov, 1999). Para analizar si la activación de PI 3-K por integrinas β1 requiere de la

activación de las cinasas de tirosina, se trataron a las células THP-1 con herbamicina A (un potente inhibidor de las cinasas de tirosina) antes de entruzar sus integrinas $\beta 1$. La herbímicina A bloqueó completamente la activación de PI 3-K (Figura 16). Estos resultados indican que la vía de transducción de señales por integrinas $\beta 1$ se inicia con la activación de las cinasas de tirosina y posteriormente éstas activan a PI 3-K, la cual a su vez conduce la activación del factor NF- κ B.

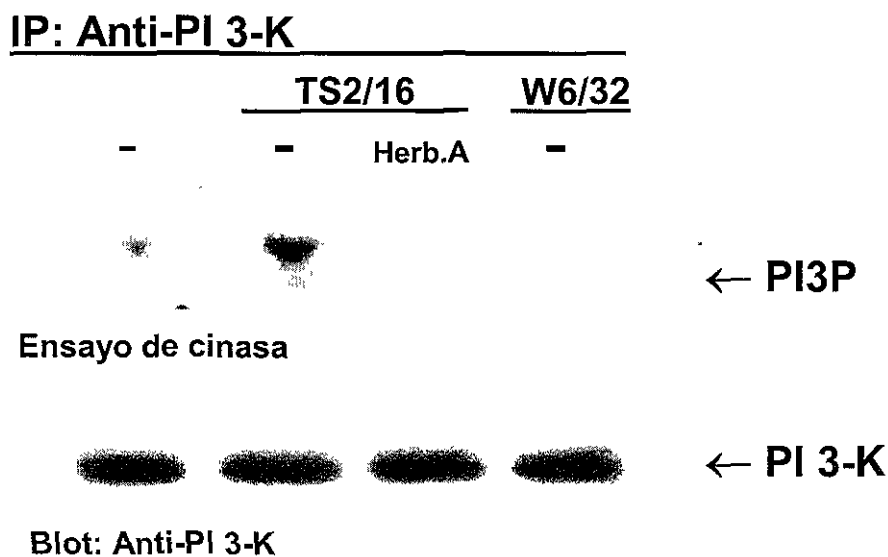


Figura 16. La activación de PI 3-K por integrinas $\beta 1$ es regulada por las cinasas de tirosina. Se estimulan 1.5×10^7 células THP-1 con anticuerpo anti-integrina $\beta 1$ (TS2/16) o con el anticuerpo anti-MHC clase I (W6/32). PI 3-K se inmunoprecipita (IP) y su actividad se midió con un ensayo de cinasa *in vitro*. Algunas células se trataron con herbamicina A $10 \mu\text{M}$ (Herb A) por 60 minutos o con el solvente sólo DMSO (-) antes de la estimulación. Los paneles inferiores en cada figura son western blot de PI 3-K que muestra la misma cantidad de proteína inmunoprecipitada de cada muestra. PI3P, fosfatidilinositol 3-fosfato. Los datos son representativos de tres experimentos por independientes.

Syk participa en la activación de PI 3-K y de NF- κ B por integrinas $\beta 1$

En las células hematopoyéticas la cinasa Syk juega un papel importante en la transducción de señales a través de los receptores del sistema inmune. Incluso se ha reportado que en los monocitos el entrecruzamiento de las integrinas $\beta 1$ conduce a la activación de Syk (Lin, 1994). Debido a estos hallazgos decidimos investigar si Syk participaba en la activación de PI 3-K. Para

ello células THP-1 se trataron con picietanol (inhibidor de Syk) antes de ser estimuladas con anticuerpo anti-integrina $\beta 1$. La actividad de PI 3-K se bloqueó por el inhibidor de Syk (Figura 17). Estos resultados sugieren que Syk participa en la la activación de PI 3-K.

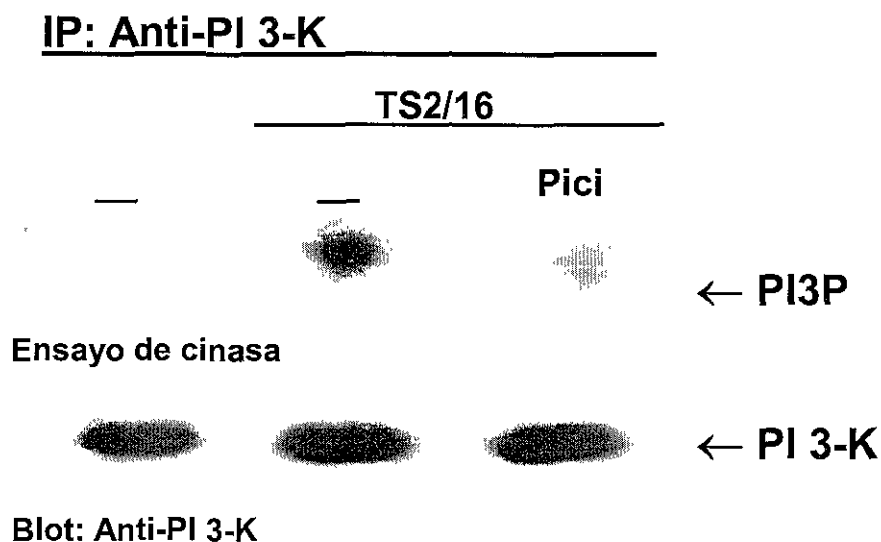


Figura 17. La activación de PI 3-K por integrinas $\beta 1$ depende de Syk. Se estimularon 1.5×10^7 células THP-1 con el anticuerpo anti-integrina $\beta 1$ (TS2/16). PI 3-K se inmunoprecipita (IP) y su actividad se midió con un ensayo de cinasa *in vitro*. Algunas células se trataron con picietanol 30 $\mu\text{g/ml}$ (Pici) por 60 minutos. Los panele inferiores en cada figura son western blot de PI 3-K que muestra la misma cantidad de proteína inmunoprecipitada de cada muestra. PI3P, fosfatidilinositol 3-fosfato. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Hasta el momento nuestros resultados indicaban que Syk participa en la activación PI 3-K y que PI 3-K participa en la activación de NF- κ B. Por lo tanto estos resultados sugerían que Syk también podía participar en la activación de NF- κ B. Para probar esta hipótesis las células THP-1 transfectadas con el plásmido reportero de NF- κ B se trataron con picietanol antes de ser estimuladas por adhesión a fibronectina o por el entrecruzamiento de sus integrinas $\beta 1$ con el anticuerpo anti-integrina $\beta 1$. La activación de NF- κ B bloqueó con el inhibidor de Syk (Figura 18). Por lo tanto nuestros resultados sugieren que en la vía de transducción de señales inducida

por integrinas $\beta 1$, participa Syk en la activación de PI 3-K y está a su vez en la activación de NF- κ B.

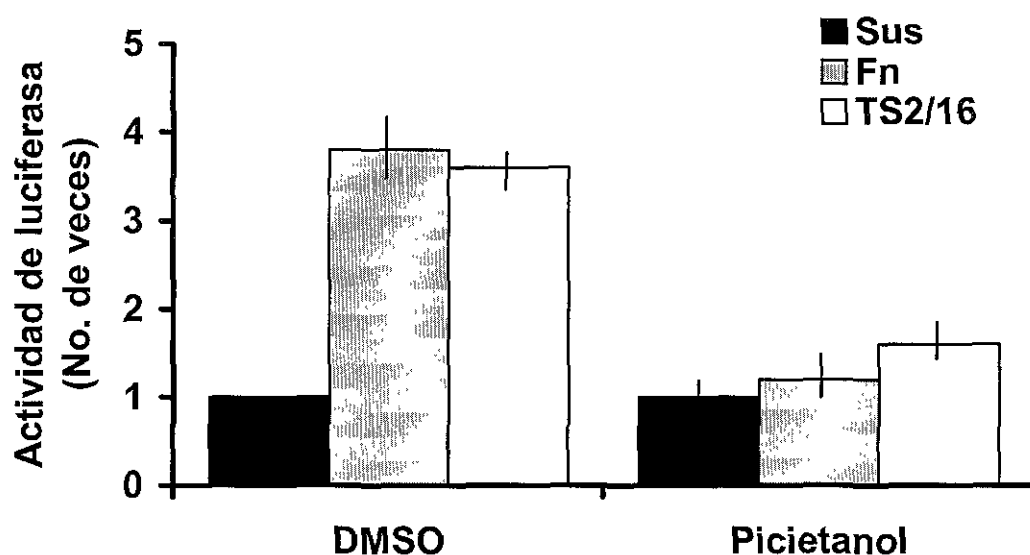


Figura 18. La activación de NF- κ B por integrinas es dependiente de Syk. Se transfectaron 3×10^6 células THP-1 con el plásmido reportero específico de NF- κ B. Veinticuatro horas después de la transfección las células se pusieron en 4 ml de medio RPMI-1640 sin suplementar y se dejaron en suspensión (Sus) o se trataron con el anticuerpo monoclonal anti-integrinas $\beta 1$ (TS2/16). Antes de la estimulación las células se trataron con picietanol 30 μ g/ml o sólo con solvente (DMSO) por 60 minutos a 4°C. Después de cuatro horas de incubación a 37°C las células se lisaron y la actividad de luciferasa se determinó. Los datos son promedio (+/-) error estandar de 3 determinaciones independientes.

PI 3-K participa en la activación de MAPK^{erk1/2} por integrinas $\beta 1$

Para identificar las posibles moléculas que se activan de una manera dependiente a PI 3-K en la vía de transducción por integrinas $\beta 1$, analizamos el efecto de wormanina y LY294002 sobre el patrón de fosforilación de proteínas en los residuos de tirosinas al estimular a las células THP-1 con el anticuerpo anti-integrina $\beta 1$. Se fosforilaron varias proteínas, particularmente las proteínas con una masa molecular aproximada de 40, 120, 150 y 170 kDa. Ambos inhibidores de PI 3-K, wortmanina (Figura 19) y LY294002 (Figura 20) redujeron el nivel de fosforilación en las tirosinas de las proteínas de alrededor de 40 y 120 kDa.

Blot: Anti-PY

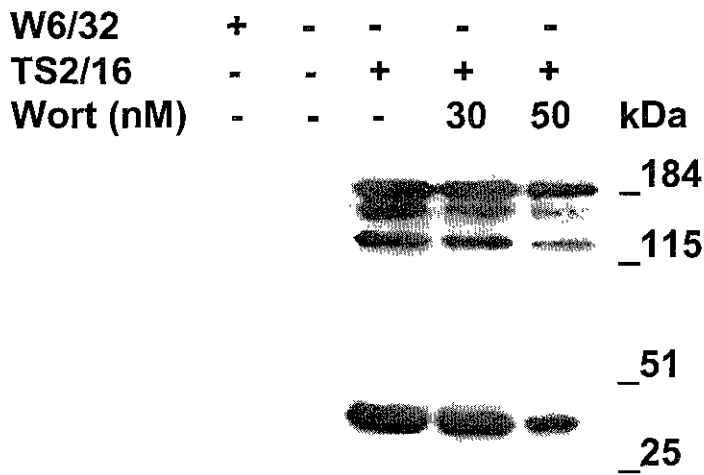


Figura 19. Wortmanina inhibe la fosforilación de las tirosinas de algunas proteínas. Se estimulan 5×10^6 células THP-1 con el anticuerpo anti-MHC I (W6/32) o el anticuerpo anti-integrina $\beta 1$ (TS2/16). Algunas de las células se trataron con wortmanina 50 nM (Wort) o sólo con solvente DMSO (-) por 30 minutos. Después de la estimulación, los extractos celulares se corrieron en geles SDS-acrilamida y se analizaron por Western blot anti-fosfotirosina. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Blot: Anti-PY

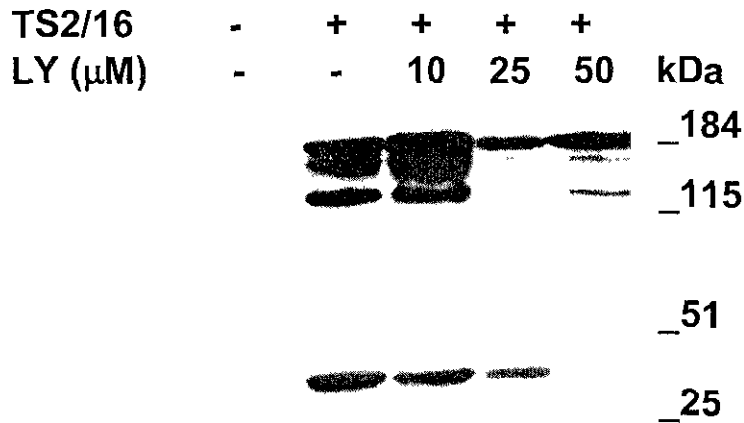


Figura 20. LY294002, Inhibidor de PI 3-K, inhibe la fosforilación de tirosinas de algunas proteínas. Se estimulan 5×10^6 células THP-1 con el anticuerpo anti-integrina $\beta 1$ (TS2/16). Algunas de las células se trataron con LY294002 50 μ M (LY) o sólo con solvente DMSO (-) por 60 minutos. Después de la estimulación, los extractos celulares se corrieron en geles SDS-acrilamida y se analizaron por Western blot anti-fosfotirosina. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

La banda de aproximadamente de 40 kDa pensamos que podría ser MAPK^{erk1/2}. Por tal motivo decidimos analizar directamente el efecto de los inhibidores de PI 3-K sobre la fosforilación de los residuos de tirosina de MAPK^{erk1/2}, en respuesta al entrecruzamiento de las integrinas $\beta 1$. Las células THP-1 estimuladas con anticuerpos activaron a MAPK^{erk1/2}. Esta activación se bloqueó cuando las células se trataron con wortmanina y LY294002 (Figura 21). Para probar que la inhibición de wortmanina y LY2940002 era específica, examinamos el efecto de estos inhibidores sobre la activación MAPK^{erk1/2} inducida por otro receptor que se sabe que conduce la activación de MAPK^{erk1/2} independientemente de PI 3-K. La estimulación de las células THP-1 con insulina indujo la activación de MAPK^{erk1/2}, la cual no se vió afectada por ninguno de los dos inhibidores de PI 3-K (Figura 22).

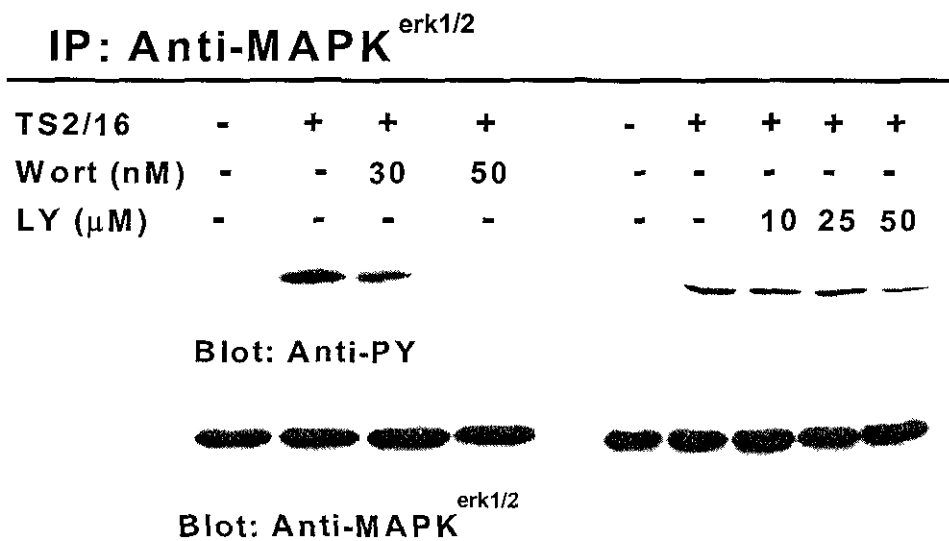


Figura 21. PI 3-K participa en la activación de MAPK^{erk1/2} por integrinas $\beta 1$. Se estimularon 1.5×10^7 células THP-1 con el anticuerpo monoclonal anti-integrina $\beta 1$ (TS2/16). Algunas células se trataron con wortmanina 50 nM (Wort) por 30 ó con LY294002 50 μ M (LY) por una hora previamente a la estimulación. Después de la estimulación, las células se lisaron y MAPK^{erk1/2} se inmunoprecipito (IP). Las proteínas de los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-acrilamida y se analizaron por Western Blot anti-fosfotirosinas. Las membranas se desnudaron del anticuerpo unido se les hizo un Western blot anti-MAPK^{erk1/2} (paneles inferiores). Los datos representativos de tres experimentos independientes.

IP: Anti-PY

Insulina	-	+	+	+	+	+	+	+
Wort (nM)	-	-	30	50	90	-	-	-
LY (μ M)	-	-	-	-	-	10	25	50

Blot: Anti-PY

Blot: Anti-MAPK^{erk1/2}

Figura 22. PI 3-K no se necesita en la activación de MAPK^{erk1/2} inducida por insulina en células THP-1. Se estimularon 1.5×10^7 células con insulina $1 \mu\text{M}$ a 37°C por 10 min. Algunas células se trataron con wortmanina 50 nM (Wort) por 30 ó con LY294002 $50 \mu\text{M}$ (LY) por una hora previamente a la estimulación. Después de la estimulación, las células se lisaron y MAPK^{erk1/2} se inmunoprecipito (IP). Las proteínas de los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-acrilamida y se analizaron por Western Blot anti-fosfotirosinas. Las membranas se desnudaron del anticuerpo unido y se les hizo un Western blot anti-MAPK^{erk1/2} (paneles inferiores). Los datos representativos de tres experimentos independientes.

Syk participa en la activación de MAPK^{erk1/2} por integrinas $\beta 1$.

Los resultados anteriores muestran que la activación de MAPK^{erk1/2} fue dependiente a la activación de PI 3-K y a su vez que la activación de PI 3-K era dependiente a Syk en esta vía de transducción de señales inducida por integrinas $\beta 1$. Por lo tanto, estos resultados sugirieron que Syk podría participar en la activación MAPK^{erk1/2} inducida por entrecruzamiento de las integrinas $\beta 1$ en monocitos. Para confirmar está idea, se trataron a las células THP-1 con el inhibidor de Syk antes de estimularlas con anticuerpos anti-integrinas $\beta 1$ y se analizó la activación de MAPK^{erk1/2} por Western blot anti-fosfotirosinas. La activación de MAPK^{erk1/2} inducida a través de las integrinas $\beta 1$ se bloqueó con el inhibidor de Syk (Figura 23). Estos resultados indican que la activación MAPK^{erk1/2} depende de Syk en la vía de transducción de señales por integrinas $\beta 1$.

IP: Anti-PY

Fn	-	-	-	-	+	+
TS2/16	-	+	+	-	-	-
Pici	-	-	+	-	-	+

Blot: Anti-PY



Blot: Anti-MAPK^{erk1/2}

Figura 23. La activación de MAPK^{erk1/2} por integrinas $\beta 1$ es dependiente de Syk. Se estimularon 1.5×10^7 células THP-1 con el anticuerpo monoclonal anti-integrina $\beta 1$ (TS2/16) o por adhesión a fibronectina (Fn). Algunas células se pre-trataron con picietanol 30 $\mu\text{g/ml}$ (Pici) por una hora. Después de la estimulación, las células se lisaron y MAPK^{erk1/2} se inmunoprecipito (IP). Las proteínas de los inmunoprecipitados se separaron en geles SDS-acrilamida y se analizaron por Western Blot anti-fosfotirosinas. Las membranas se desnudaron del anticuerpo unido y se les hizo un Western blot anti-MAPK^{erk1/2} (paneles inferiores). Los datos representativos de tres experimentos independientes.

PI 3-K participa en la activación de la cinasa MEK por integrinas $\beta 1$

Actualmente la única cinasa que se conoce que es indispensable para la activación de MAPK^{erk1/2} es MEK (Davis, 1995; Gardner, 1994; Robinson y Cobb, 1997; Schwartz y Baron, 1999). Para evaluar si PI 3-K participaba en la activación de MEK en la vía de transducción de señales por integrinas $\beta 1$ en monocitos, analizamos el efecto de wortmanina y LY294002 sobre la activación de MEK después de estimular las células THP-1. El entrecruzamiento de las integrinas $\beta 1$ por anticuerpos incrementó la actividad de MEK. Esta activación fue inhibida por los dos inhibidores de PI 3-K (Figura 24). Además el inhibidor específico de MEK (PD98059) bloqueó completamente la activación de MAPK^{erk1/2} por integrinas $\beta 1$ (Figura 25). Nuestros resultados hasta este momento mostraban que Syk activa a PI 3-K y esta última, a su vez es requerida para la activación de MEK y MAPK^{erk1/2}.

IP: Anti-MEK

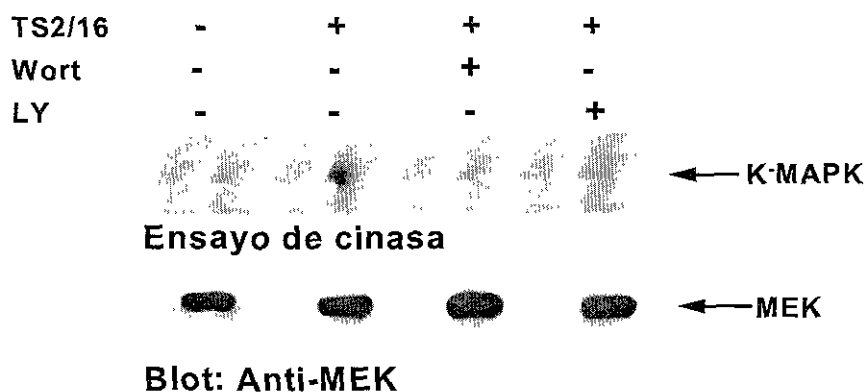


Figura 24. El entrecruzamiento de las integrinas $\beta 1$ induce la activación de MEK de una manera dependiente de PI 3-K. Se estimularon 1.5×10^7 células THP-1 con el anticuerpo monoclonal anti-integrina $\beta 1$ (TS2/16). Algunas células se trataron con wortmanina 50 nM (Wort) por 30 minutos o con LY294002 50 μ M (LY) por una hora previamente a la estimulación. Después de la estimulación las células se lisaron y MEK se inmunoprecipito. La actividad de MEK inmunoprecipitada se determino por un ensayo de cinasa *in vitro*, se utilizó como sustrato a una MAPK^{erk1/2} deficiente en su actividad de cinasa (K-MAPK). Las proteínas se separaron en geles de SDS-acrilamida y detectaron por autoradiografía. Los paneles inferiores son Western blot anti-MEK que muestran la misma cantidad de proteína inmunoprecipada de cada muestra. Los datos representativos de tres experimentos por separado.

IP: Anti-MAPK^{erk1/2}

TS2/16	-	+	+	+
PD (mM)	-	-	20	30

Blot: Anti-PY

Blot: Anti-MAPK^{erk1/2}

Figura 25. MEK es requerida para regular la activación de MAPK^{erk1/2} por integrinas. Se estimularon 1.5×10^7 células con el anticuerpo monoclonal anti-integrina $\beta 1$ (TS2/16). Algunas células fueron tratadas con PD98050 30 μ M (PD) o solo con solvente DMSO (-) por una hora previamente a la estimulación. Después de la estimulación las células se lisaron y MAPK^{erk1/2} se inmunoprecipito (IP). Los inmunoprecipitados se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por Western Blot anti-fosfotirosinas. Las membranas se desnudaron del anticuerpo y se les hizo un Western blot anti-MAPK^{erk1/2} (paneles inferiores). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

La activación de NF- κ B inducida por integrinas β 1 es independiente de MAPK^{erk1/2}

Los resultados mostrados hasta el momento sugerían que PI 3-K esta participando en la activación de NF- κ B y MAPK^{erk1/2} en la vía de transducción de integrinas β 1. Para explorar si había conexión entre la activación de NF- κ B y MAPK^{erk1/2}, las células THP-1 transfectadas con el plásmido reportero de NF- κ B se trataron con el inhibidor específico de MEK (PD98059) antes de entrecruzar sus integrinas β 1. Para nuestra sorpresa el inhibidor de MEK bloqueó la activación de NF- κ B .(Figura 26). Estos resultados sugieren que aunque PI 3-K participa en la activación de NF- κ B y en la activación de MAPK^{erk1/2}, estas respuestas no estan sobre la misma vía de transducción de señales río abajo de PI 3-K.

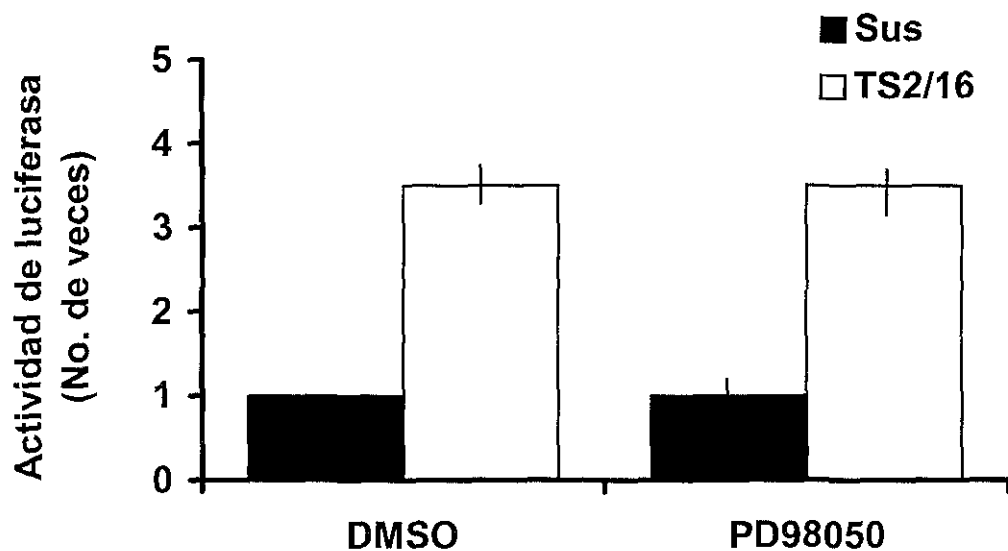


Figura 26. La activación de NF- κ B por integrinas β 1 es independiente de MEK. Se transfectaron 3×10^6 células THP-1 con el plásmido reportero específico de NF- κ B. Veinticuatro horas después de la transfección las células se pusieron en 4 ml de medio RPMI-1640 sin suplementar y se dejaron en suspensión o se estimularon con anticuerpo monoclonal anti-integrinas β 1 (TS2/16). Antes de la estimulación las células se trataron con PD98059 $30 \mu\text{M}$ o sólo con solvente (DMSO) por 60 minutos a 4°C . Después de cuatro horas de incubación las células se lisaron y la actividad de luciferasa que representa la actividad de NF- κ B se determinó en un luminómetro. Los datos son promedio (+/-) error estandar de 6 determinaciones independientes.

La activación de MAPK^{erk1/2} y de NF-κB son conducidas por vías de transducción de señales diferentes

Si la activación de NF-κB y la activación de MAPK^{erk1/2} realmente se conducen por vías separadas, entonces la inhibición de Rac, la cual habíamos visto que era requerida para la activación de NF-κB, no debía tener efecto sobre la activación de MAPK^{erk1/2} por integrinas β1. Para confirmar esta hipótesis, las células THP-1 se co-transfectaron con los plásmidos que dirigían la síntesis de MAPK^{erk1/2} marcada con el epítopo HA (HA-MAPK^{erk1/2}) y la forma dominante negativa de Rac (Rac N17). Después de la transfección, las células se estimularon con anticuerpos anti-integrina β1 y la activación de HA-MAPK^{erk1/2} se analizó por Western blot anti-fosfotirosinas. Como habíamos visto anteriormente el entrecruzamiento de las integrinas β1 indujo la activación de HA-MAPK^{erk1/2} y como se esperaba esta activación no se afectó por la dominante negativa de Rac (Figura 27). Estos resultados reforzaban la hipótesis de que la activación de NF-κB por integrinas β1 es independiente a la activación de MAPK^{erk1/2}.

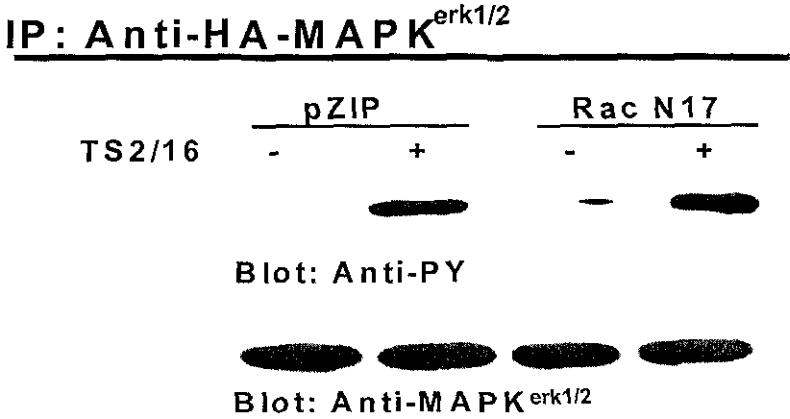


Figura 27. El entrecruzamiento de las integrinas β1 induce la activación de MAPK^{erk1/2} de una manera independiente de Rac. Las células THP-1 (1.5 X 10⁷) co-transfectaron con los plásmidos de expresión para MAPK^{erk1/2} marcada con el epítopo HA (HA-MAPK^{erk1/2}) y para la forma dominante negativa de Rac (Rac N17) o el vector de expresión vacío pZIP, se estimularon con el anticuerpo anti-integrina β1. Después de la estimulación las células se lisaron y HA-MAPK^{erk1/2} se inmunoprecipito. Las proteínas de los inmunoprecipitados se analizaron por un Western Blot anti-fosfotirosinas. Las membranas se desnudaron del anticuerpo unido y se les hizo un Western blot anti-MAPK^{erk1/2} (paneles inferiores). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Uno de los principales sustratos de MAPK^{erk1/2} es el factor de transcripción Elk-1, por lo tanto nosotros decidimos analizar si este factor era activado en la vía de transducción de señales inducida por las integrinas $\beta 1$ en monocitos. Para estudiar la activación de Elk-1, las células THP-1 fueron transfectadas con el sistema de plásmidos reporteros Gal-Elk/5XGal-luc. Este sistema lleva a la expresión de luciferasa como respuesta a la activación del factor nuclear Elk-1. Cuando las células THP-1 transfectadas se estimularon con el anticuerpo anti-integrina $\beta 1$, se observó un incremento en la actividad de Elk-1 alrededor de tres veces (Figura 28). El pretratamiento de las células con el inhibidor de PI 3-K (wortmanina) bloqueó la activación de Elk-1 inducida por integrinas, pero no afectó la activación de Elk-1 inducida por insulina (Figura 28). El pretratamiento con inhibidor específico de MEK PD98059 bloqueó la activación de Elk-1 inducida tanto por las integrinas $\beta 1$ como por insulina (Figura 28). Por otro lado cuando la células THP-1 se transfectaron también con el plásmido que dirige la síntesis de Rac N17, la activación de Elk-1 por integrinas $\beta 1$ no se vió afectada (Figura 29). Estos resultados confirman que PI 3-K y MAPK^{erk1/2} son requeridos para la activación de Elk-1 y que Rac no está involucrada en la activación de este factor nuclear. Todos los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la vía de transducción de señales encendida por integrinas $\beta 1$ en las células monocíticas THP-1 se divide en dos vías río abajo de PI 3-K. En una de las vías Rac conduce a la activación de NF-kB mientras en la otra vía, MEK y MAPK^{erk1/2} conducen la activación de Elk-1 (Figura 30).

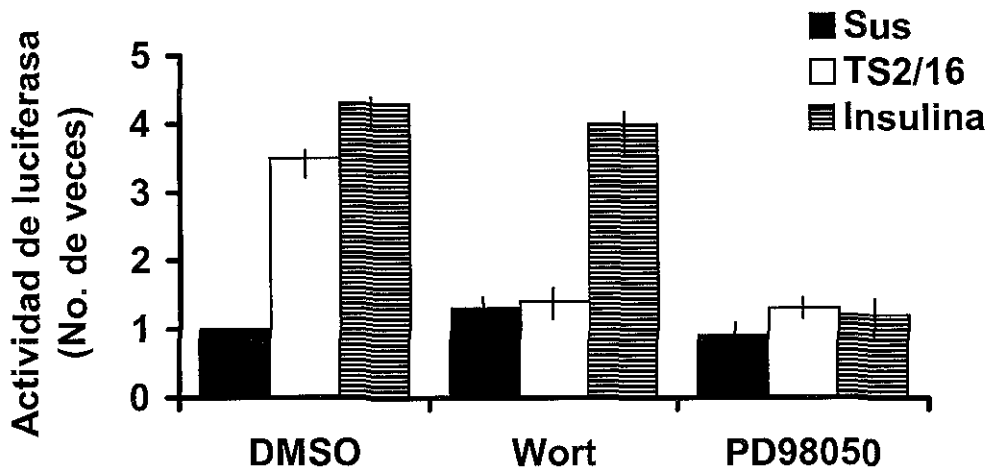


Figura 28. La activación de Elk-1 por integrinas $\beta 1$ depende de PI 3-K. Se transfectan 3×10^6 células THP-1 con el sistema de dos plásmidos Gal-Elk-1/5XGal-luc específico para Elk-1. Veinticuatro horas después de la transfección las células se transfieren a 4 ml de medio RPMI-1640 sin suplementar y se dejan en suspensión (Sus) o se tratan con el anticuerpo monoclonal anti-integrinas $\beta 1$ TS2/16 ó con insulina. Algunas células se pretrataron antes de la estimulación con wortmanina 50nM (Wort), con PD98050 30 μ M o sólo con solvente (DMSO). Después de cuatro horas de incubación a 37°C las células fueron lisadas y la actividad de luciferasa que representa la actividad de Elk-1 se determinó. Los datos son promedio (+/-) error estandar de 3 determinaciones independientes.

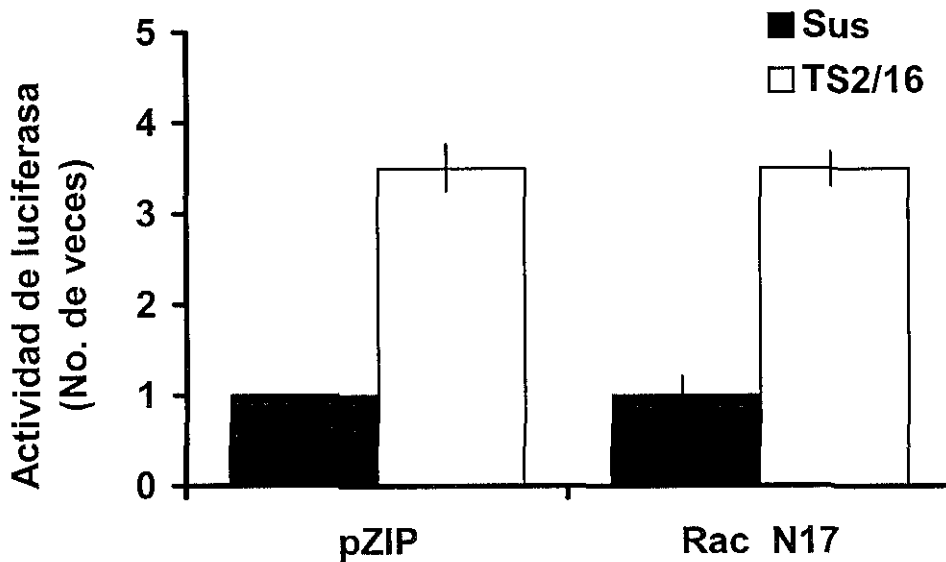


Figura 29. La activación de Elk-1 por integrinas $\beta 1$ es independiente de Rac. Se transfectaron 3×10^6 células THP-1 con el sistema de dos plásmidos Gal-Elk-1/5XGal-luc específico para Elk-1 y el plásmido que expresaba la forma mutante negativa de Rac (Rac N17) o el vector vacío pZIP. Veinticuatro horas después de la transfección las células se transfirieron en 4 ml de medio RPMI-1640 sin suplementar y se dejaron en suspensión (Sus) o se trataron con el anticuerpo monoclonal anti-integrinas $\beta 1$ (TS2/16). Después de cuatro horas de incubación a 37°C las células fueron lisadas y la actividad de luciferasa que representa la actividad de Elk-1 se determinó. Los datos son promedio (+/-) error estandar de 3 determinaciones independientes.

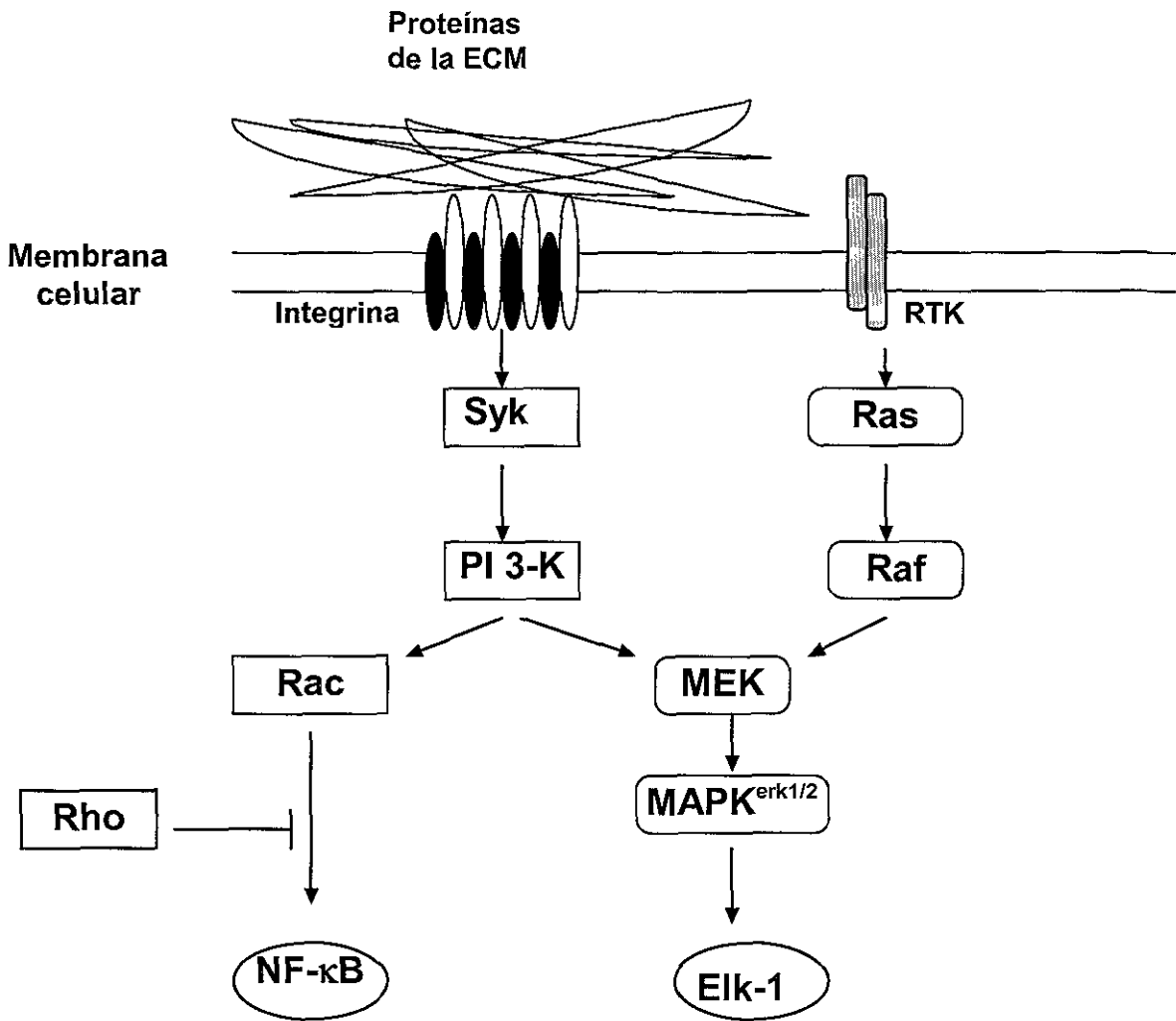


Figura 30. Modelo de la vía de transducción de señales inducido por integrinas $\beta 1$ en monocitos. Una vez que las integrinas $\beta 1$ se han entrecruzado se activan las cinasas de tirosina. En los monocitos, Syk parece ser la cinasa de tirosina involucrada. Syk conduciría a la activación de PI 3-K. Posterior a la activación de PI 3-K, la vía de transducción se separa para enviar las señales al núcleo. Las GTPasa Rac guía a la activación del factor NF- κ B, mientras que MEK y MAPK^{erk1/2} guían a la activación del factor nuclear Elk-1. La GTPasa Rho parece regular negativamente la activación de NF- κ B de una manera que todavía no se conoce. Los receptores cinasas de tirosina (RTK) utilizan la vía clásica de Ras para activar a MAPK^{erk1/2}. En las células THP-1, la GTPasa Ras parece no estar involucrada en la activación de NF- κ B inducida por integrinas $\beta 1$.

DISCUSIÓN.

Los monocitos juegan un papel importante en la regulación del proceso inflamatorio. En estas células el entrecruzamiento de sus integrinas $\beta 1$ conduce a la producción de citocinas inflamatorias tales como IL-1, IL-8 y TNF. Los promotores de estos genes de citocinas contienen sitios de unión para el factor de transcripción NF- κ B (Cogswell, 1994; Haskill, 1991; Haskill, 1988; Hiscott, 1993). Sin embargo, actualmente se conoce muy poco sobre las vías de transducción de señales activadas por las integrinas $\beta 1$ que inducen la producción de estas citocinas inflamatorias. Por tal motivo pensamos que el monitoreo de la activación del factor de transcripción NF- κ B por integrinas $\beta 1$ en presencia de varios inhibidores era una manera fácil de elucidar las moléculas involucradas en esta la vía de transducción de señales. Primero analizamos que la adhesión de las células monocíticas THP-1 a fibronectina activaran al factor de transcripción NF- κ B como se había reportado (Lin, 1994). La producción de luciferasa a partir de un plásmido reportero específico para NF- κ B y la capacidad de unión de NF- κ B a DNA, confirmó la activación de este factor nuclear por integrinas $\beta 1$.

Varios reportes han sugerido que las integrinas pueden encender la vía de Ras. Las integrinas, cuando son entrecruzadas, conducen a la formación del complejo Grb2-Sos, el cual funciona como un activador de la cascada de Ras (Ras \rightarrow Raf \rightarrow MEK \rightarrow MAPK^{erk1/2}) (Schlaepfer, 1994). Además, el entrecruzamiento de las integrinas también conduce a la activación de MAPK^{erk1/2} que es otro elemento de la vía de Ras (Chen, 1994). Con esta evidencia experimental, se ha querido involucrar a la vía de Ras en todas las funciones inducidas por integrinas. Sin embargo, la activación de NF- κ B inducido por las integrinas $\beta 1$ en células monocíticas parece ser independiente a Ras. En un trabajo previo de nuestro grupo se encontró la inhibición de Ras

endógena, utilizando mutantes negativas de ésta, no afectaba la activación de NF- κ B inducida por integrinas β 1 (Rosales y Juliano, 1996).

La participación de Ras en las vías de transducción de señales inducidas por integrinas todavía es controvertida, debido a que los resultados obtenidos hasta este momento son contradictorios. Por ejemplo, utilizando mutantes negativas de Ras, algunos grupos han encontrado que la activación de MAPK^{erk1/2} es dependiente de esta GTPasa (Clark y Hynes, 1996; Schlaepfer y Hunter, 1997; Wary, 1996), mientras otros han encontrado que Ras no está involucrada (Chen, 1996; King, 1997). Sin embargo, algunos trabajos recientes sugieren que ambas partes tienen razón y que las diferencias encontradas se pueden deber a los distintos mecanismos de señalamiento utilizados por las integrinas. Por ejemplo, la activación de Raf por integrinas se puede dar de dos maneras. En una de ellas, la activación de Raf es conducida por la interacción Ras-Raf. Esta activación no se afecta por el inhibidor de PKC (Howe y Juliano, 1998). Mientras que la otra manera de activación de Raf es independiente de la interacción de Ras-Raf y es afectada por el inhibidor de PKC (Howe y Juliano, 1998). Estos resultados sugieren que la cascada prendida por integrinas que conduce a la activación de MAPK^{erk1/2}, algunas veces requiere de la participación de Ras mientras otras veces no. En otro caso, se encontró que los inhibidores específicos de PI 3-K bloquean la activación de Raf, MEK y MAPK^{erk1/2} inducida por integrinas, pero estos inhibidores no afectan la activación de Ras (King, 1997). Estos datos muestran que en algunos casos la vía de transducción de señales que conduce a la activación de MAPK^{erk1/2} inducida por integrinas puede ser separada de Ras y regulada por otras moléculas tales como PKC y PI 3-K. Probablemente el mecanismo de señalamiento utilizado por las integrinas dependería entonces del tipo de receptor integrina involucrado, así como del tipo celular en que se haga el estudio.

La mayoría de los estudios sobre las vías de transducción de señales inducidas por integrinas han sido hechos en fibroblastos o células endoteliales. Hay muy poca información sobre estas vías en otro tipo celular. En las células monocíticas la activación del factor de transcripción de NF- κ B a través de las integrinas β 1 parece ser independiente a Ras (Rosales y Juliano, 1996). Por tal motivo decidimos investigar la participación de otras GTPasas en la activación de NF- κ B. Se sabe que la familia de las GTPasas Rho participa en varios aspectos funcionales del citoesqueleto y que las integrinas son receptores que se conectan al citoesqueleto (Boudreau y Jones, 1999; Critchley, 2000). La destrucción del citoesqueleto con citocalasina B bloqueó la activación del factor NF- κ B por integrinas β 1. También se ha sugerido una relación funcional entre NF- κ B y el citoesqueleto en un artículo reciente, indicando que las subunidades p65/Rel A de NF- κ B interactúan con estructuras de actina en fibroblastos de rata (Are, 2000). Por lo tanto, el citoesqueleto y las moléculas relacionadas con éste, tales como las GTPasas de la familia Rho eran excelentes candidatos para participar en la transducción de señales al núcleo por integrinas β 1. La participación de las GTPasas Rho y Rac se exploró utilizando las formas mutadas de estas moléculas. La mutante negativa dominante de Rac bloqueó la activación de NF- κ B, mientras la mutante activada aumentó esta respuesta, indicando que Rac está involucrada en esta vía de transducción de señales por integrinas. En contraste, la mutante negativa dominante de Rho incrementó la activación del factor NF- κ B, mientras la mutante activada inhibió esta respuesta. Esto sugiere que ambas GTPasas participan en la vía de transducción de señales por integrinas β 1 que conduce a la activación de NF- κ B. Al inicio de nuestra investigación no había artículos publicados que apoyaran la hipótesis de que Rac participa en la activación de NF- κ B. Sin embargo en este último año han sido publicados algunos trabajos que apoyan esta hipótesis. Se ha encontrado que los receptores tipo TOLL, el receptor TCR/CD3 y el receptor de IL-4

activan a NF- κ B de una manera dependiente de Rac (Arbibe, 2000; Frost, 2000; Hehner, 2000). Estos resultados junto con los nuestros sugieren que la participación de Rac en la activación de NF- κ B no sólo es un evento esporádico de un receptor, si no que Rac es un punto convergente de varios receptores para conducir a la activación NF- κ B.

Mientras que Rac parece estar en la vía para activar a NF- κ B, Rho parece participar como un regulador negativo de NF- κ B en la vía de señalización por integrinas β 1. Hasta este momento no hay ningún reporte que relacione a la GTPasa Rho de esta manera con la regulación de este factor de transcripción. Estos resultados al principio nos sorprendieron porque se ha reportado que Rac participa en la activación de Rho (Nobes y Hall, 1995). Por lo tanto nosotros esperabamos que la inhibición de Rho inhibiera la activación de NF- κ B. Sin embargo ahora se sabe que la conexión entre estas GTPasas es más compleja que la cascada inicialmente descrita, donde Cdc42 activa a Rac y ésta a su vez activa a Rho. Se ha descrito recientemente que Rac y Rho pueden regularse entre sí, provocando repuestas opuestas (Hall y Kjoller, 1999). Por lo tanto la participación de Rho prodría ser un mecanismo para prevenir una excesiva activación del factor nuclear o bien para apagar la señal de activación. Si los efectos de Rho realmente fueran los responsables de terminar la señal de activación de NF- κ B, entonces Rho debería ser activada después de Rac. Esto podría ser un mecanismo de control por retroalimentación. Conocer la cinética de activación de estas GTPasas inducida por integrinas β 1 nos podría ayudar a entender un poco más cómo estas GTPasas participan en la regulación de este factor de transcripción.

Los productos de la enzima PI 3-K juegan un papel importante en la regulación del citoesqueleto de actina, incluso también puede activar a Rac (Akasaki, 1999; Han, 1998; Leever, 1999). Por tal motivo investigamos la participación de PI 3-K en la vías de transducción señales activadas por integrinas. El entrecruzamiento de las integrinas β 1 en las células monocíticas

produjo la activación de PI 3-K y los inhibidores de esta enzima bloquearon la activación del NF- κ B. Estos datos ponen a PI 3-K y Rac en la misma vía de señalización al núcleo encendida por las integrinas β 1. La manera de como exactamente PI 3-K participa en la activación de Rac todavía no se conoce. Se ha sugerido que los productos de PI 3-K participan la activación de factores intercambiadores de GDP por GTP (por ejemplo Vav) que son importantes para la activación de esta GTPasa. (Akasaki, 1999; Han, 1998).

Se ha aceptado que la activación de las cinasas de tirosina es el primer paso inducido con el entrecruzamiento de las integrinas. Las integrinas no tienen actividad enzimática por sí mismas pero se ha observado que después de reconocer a su ligando se asocian con otras proteínas. La primera cinasa que se observó que esta asociada con las integrinas y que se activaba en fibroblastos fué FAK (Hanks, 1992). Sin embargo en tipos celulares tales como plaquetas y leucocitos FAK no juega un papel importante en la vía de señalamiento por integrinas. Las cinasas de tirosina que están involucrada en las vía de señalamiento por integrinas en estos tipos celulares aún no han sido completamente elucidadas. Se ha propuesto que posiblemente sean las cinasas de la familia Src y la cinasa Syk. En monocitos Syk es el candidato más fuerte al menos a través del entrecruzamiento de integrinas β 1 (Lin, 1994). Por lo tanto cuando nosotros observamos que la activación PI 3-K por integrinas β 1 se bloqueó con el inhibidor de las cinasa de tirosina (herbamicina A), decidimos estudiar si la cinasa involucrada era Syk. El inhibidor de Syk (picetanol) bloqueó la activación de PI 3-K y la activación de NF- κ B. Nuestros resultados refuerzan la hipótesis que en la vía de transducción de señales inducida por integrinas β 1, una de las cinasas de tirosina que está participando es Syk y demuestran que Syk participa en la activación de PI 3-K y NF- κ B.

Los datos discutidos arriba sugerían que las integrinas β 1 en células monocíticas utilizan

una vía de señalamiento distinta a la vía clásica de MAPK^{erk1/2} para conducir a la activación de NF-κB. Sin embargo se ha observado que MAPK^{erk1/2} es activada por el entrecruzamiento de integrinas β1 (Chen, 1994). En nuestros resultados parecía haber una discrepancia entre la vía de transducción que conduce a la activación de MAPK^{erk1/2} (Ras→Raf→MEK→MAPK^{erk1/2}) y la vía de transducción que estábamos observando para la activación de NF-κB (Syk→PI 3-K→Rac→NF-κB). Para explorar la conexión entre estas dos posibles vías decidimos estudiar la influencia de los inhibidores de PI 3-K sobre el patrón de fosforilación en proteínas por integrinas β1. La fosforilación de varias proteínas se vió afectada por los inhibidores de PI 3-K en particular una banda alrededor de 45 kDa. Debido a que esta proteína podría ser MAPK^{erk1/2}, dirigimos nuestra atención a la activación de esta proteína. Las integrinas β1 activaban efectivamente a MAPK^{erk1/2} como se había reportado (Chen, 1994; Lin, 1997; Zhu y Assoian, 1995). Esta activación fue dependiente de PI 3-K. La participación de PI 3-K en la activación de MAPK^{erk1/2} se ha documentado muy poco. Posiblemente es debido a que siempre se ha querido comprometer a la vía de Ras en la activación de MAPK^{erk1/2} y la aceptación de que PI 3-K participa en la activación de MAPK^{erk1/2} sugería que Ras no participaba. Hasta hace un año la manera de como PI 3-K participaba en la activación de MAPK^{erk1/2} no se podía explicar. Sin embargo, recientemente se ha reportado que PI 3-K puede conducir la activación de MAPK^{erk1/2} de dos maneras, una dependiente a Ras y la otra independiente de Ras. PI 3-K puede activar a Raf-1 a través de Ras (Osada, 1999) o a través de PAK (Chaudhary, 2000).

Por otro lado nuestros resultados nos habían indicado que Syk participaba en la activación de PI 3-K, por lo tanto Syk debería también estar participando en la activación de MAPK^{erk1/2} por integrinas β1. El inhibidor de Syk bloqueó completamente la activación de MAPK^{erk1/2} por el entrecruzamiento de la integrinas β1. Entoces tanto Syk como PI 3-K parecen ser moléculas clave

en la activación de MAPK^{erk1/2} y de NF-κB.

Nuestros resultados sugerían Syk y PI 3-K eran necesarias para la activación de MAPK^{erk1/2} y de NF-κB. Por lo tanto, pensamos que la vía posiblemente se dividía río abajo de PI 3-K para conducir por un lado a la activación de MAPK^{erk1/2} y por el otro lado a la activación de NF-κB. Para confirmar esta hipótesis buscamos la activación por integrinas β1 de otro factor nuclear. El factor nuclear Elk-1 es uno de los principales sustratos de MAPK^{erk1/2}. Como esperabamos, este factor también se activó cuando las integrinas β1 eran entrecruzadas. Claramente observamos que la activación de Elk-1 es dependiente de MEK y MAPK^{erk1/2}, ya que el inhibidor específico de MEK, PD98059, bloqueó tanto la activación de MAPK^{erk1/2} como la de Elk-1. Sin embargo PD98059 no afectó la activación de NF-κB por integrinas β1. Estos datos apoyaban nuestra hipótesis de que la vía de transducción de señales por integrinas β1 se dividía para llevar a la activación de NF-κB y de MAPK^{erk1/2}. Aunque la idea de que un receptor puede activar más de una vía de señalamiento se ha aceptado muy bien, en muy pocos sistemas esta idea se ha comprobado. Por ejemplo el receptor de insulina puede inducir dos vías de transducción de señales para dos respuesta celulares diferentes pero complementarias. Una de las vías de transducción de señales encendida es la vía de PI 3-K/PKB para inhibir a la sintetasa de glucogeno. La otra vía de transducción es la de Ras para inducir crecimiento celular (Avruch, 2001; Kido, 2001).

Si nuestra hipótesis era correcta los elementos río abajo de PI 3-K en la activación de NF-κB no deberían afectar a la otra vía. Para explorar esta posibilidad nosotros utilizamos la dominante negativa de Rac (Rac N17). Como se predijó, Rac N17 no fue capaz de inhibir la activación de MAPK^{erk1/2}, ni la activación de Elk-1. Observamos claramente que la inhibición de Rac bloqueaba la vía de activación de NF-κB, pero no afecta la activación de Elk-1.

Inversamente, la inhibición de MEK y de MAPK^{erk1/2} no afectó la vía de activación de NF- κ B, pero bloqueó eficientemente a Elk-1. Estos resultados apoyan la hipótesis que las integrinas β 1 en monocitos THP-1 utiliza dos vías distintas de transducción de señales para conducir señales al núcleo.

Sin embargo cabe mencionar que nuestros resultados también se pueden interpretar de otra manera. La célula THP-1 expresan varios receptores de integrinas β 1 (α 2 β 1, α 3 β 1, α 4 β 1, α 5 β 1), nosotros estamos entrecruzando todos ellos al mismo tiempo. Por lo tanto es posible que lo observando sea una respuesta promedio de todas las vías de transducción que se están encendiendo como consecuencia de entrecruzar a todos los receptores integrina β 1. Sin embargo, es importante recordar que en un sistema *in vivo* no sólo se encienden las vías de señalamiento de un receptor integrina, ya que diferentes receptores integrinas pueden reconocer un mismo ligando (Howe, 1998). Por ejemplo en nuestro sistema las integrinas α 3 β 1, α 4 β 1, y α 5 β 1 reconocen a fibronectina. Por otro lado en los leucocitos posiblemente es necesario que haya redundancia en la transducción de señales por integrinas que son necesarias para la migración de estas células. Por ejemplo en el proceso de inflamación, los leucocitos migran al sitio dañado arrastrándose a través de la matriz extracelular (ECM). Una de las funciones de los receptores integrinas es orientar a los leucocitos en donde se encuentran a través de las interacciones con las proteínas ECM (laminina, fibronectina colagena, elastina entre otras) (Abbas, 2000; Anderson, 1996). Aunque la composición proteica de la ECM no es homogénea, los leucocitos necesitan recibir señales extracelulares similares enviadas por los diferentes receptores integrinas, que les permita a estas células seguir migrando.

Aunque nuestros resultados pueden ser interpretados de dos maneras, una de ellas sería que la vía de transducción de señales por integrinas β 1 se separa para conducir señales al núcleo. La

promedio de todas las vías de transducción que se prenden como consecuencia de los diferentes receptores integrina $\beta 1$. Pensamos que la importancia de nuestro trabajo es que permite comprender un poco más sobre las vías de transducción de señales inducidas por integrinas que juegan un papel importante en el proceso de la inflamación en los monocitos.

AGRADECIMIENTOS

CONCLUSIÓN.

Nuestros resultados indican que el entrecruzamiento de las integrinas $\beta 1$ en los monocitos no sólo induce la activación de NF- κ B y sino también la activación del factor de transcripción Elk-1. La activación de ambos factores nucleares juega un papel importante para activar la transcripción génica de las citocinas reguladoras del proceso inflamatorio en monocitos. Estos factores son activados por diferentes vías de transducción de señales encendidas por integrinas $\beta 1$. En una de las vías se utiliza a Syk, PI 3-K y Rac para activar a NF- κ B, mientras que la otra se utiliza a Syk, PI 3-K, MEK y MAPK^{erk1/2} para activar a Elk-1.

Referencias

- Abbas, A., Lichtman, A., and Pober, J. (2000). **Cellular and Molecular Immunology**, fourth edition, S. Company, ed. (Philadelphia, Pensylvania).
- Ahn, N. G., Seger, R., and Krebs, E. G. (1992). **The mitogen activated protein kinase activation**. *Curr Opin Cell Biol* **4**, 992-999.
- Akasaki, T., Koga, H., and Sumimoto, H. (1999). **Phosphoinositide 3-kinase-dependent and independent activation of the small GTPase Rac2 in neutrophils**. *J Biol Chem* **274**, 18055-18059.
- Allen, W., Jones, G., Pollard, J., and Ridley, A. (1997). **Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages**. *J Cell Sci* **110**, 707-720.
- Anderson. (1996). **Inflamation**. In Anderson's Pathology, Mosby, ed. (St. Louis Missouri).
- Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., and Juliano, R. (1998). **Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins**. *Pharmacol Rev* **50**, 197-263.
- Arai, H., and Escobedo, J. (1996). **Angiotensin II type 1 receptor signals through Raf-1 by a protein kinase C-dependent mechanism**. *Mol Pharmacol* **50**, 522-528.
- Arbibe, L., Mira, J., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P., Ulevitch, R., and Knaus, U. (2000). **Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation requires a Rac1-dependent pathway**. *Nat Immunol* **6**, 533-540.
- Are, A., Galkin, V., Pospelova, T., and Pinaev, G. (2000). **The p65/RelA subunit of NF- κ B interacts with actin-containing structures**. *Exp Cell Res* **256**, 533-44.
- Aspenström, P. (1999). **Effectors for the Rho GTPases**. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 95-102.
- Astier, A., Avraham, H., Manie, S., Groopman, J., Canty, T., Avraham, S., and Freedman, A. (1997). **The related adhesion focal tyrosine kinase is tyrosine-phosphorylated after β 1-integrin stimulation in B cells and binds to p130cas**. *J Biol Chem* **272**, 228-232.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., and Struhl, K. (1994). **Current Protocols in Molecular Biology**. J. W. Sons, ed. (New York)
- Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D., and Zhang, X. (2001). **Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade**. *Recent Prog Horm Res* **156**, 127-155.
- Bos, J. (1997). **Ras-like GTPases**. *Biochim Biophys Acta* **1333**, M19-31.

- Boudreau, N. J., and Jones, P. L. (1999). **Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come.** *Biochem J* **339**, 481-488.
- Brenner, B., Koppenhoefer, U., Weinstock, C., Linderkamp, O., Lang, F., and Gulbins, E. (1997). **Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153.** *J Biol Chem* **272**, 22173-22181.
- Burridge, K., and Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996). **Focal adhesions, contractility, and signaling.** *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 463-519.
- Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., and Turner, C. (1988). **Focal adhesions: Transmembrane junction between the extracellular matrix and cytoskeleton.** *Annu Rev Cell Dev Biol* **4**, 487-525.
- Burridge, K., Turner, C. E., and Romer, L. H. (1992). **Tyrosine phosphorylation of Paxillin and pp125 FAK accompaines cell adhesion to extracellular matrix, a role in cytoskeletal assembly.** *J Cell Biol* **119**, 893-903.
- Cacace, A., Ueffing, M., Philipp, A., Han, E., and Weinstein, I. (1996). **PKC- ϵ functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase.** *Oncogene* **13**, 2517-2526.
- Clark, E., and Hynes, R. (1996). **Ras activation is necessary for integrin-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and cytosolic A2 but not for cytoskeletal organization.** *J Biol Chem* **271**, 14814-14818.
- Clark, E., King, W., Brugge, J., Symons, M., and Hynes, R. (1998). **Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases.** *J Cell Biol* **142**, 573-586.
- Cobb, B. S., Schaller, M. D., Leu, T. H., and Parsons, J. T. (1994). **Stable association of p60 Src and pp59 Fyn with the Focal Adhesion Associated Protein Tyrosine Kinase pp125 FAK.** *Mol Cell Biol* **14**, 147-155.
- Cogswell, J., Godlevski, M., Wisely, G., Clay, W., Leesnitzer, L., Way, J., and Gray, J. (1994). **NF- κ B regulates IL-1 β transcription through a consensus NF- κ B binding site and nonconsensus CRE-like site.** *J Immunol* **153**, 712-723.
- Critchley, D. R. (2000). **Focal adhesion - the cytoskeletal connection.** *Curr Opin Cell Biol* **12**, 133-139.
- Chaudhary, A., King, W., Mattaliano, M., Frost, J., Diaz, B., Morrison, D., Cobb, M., Marshall, M., and Brugge, J. (2000). **Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338.** *Curr Biol* **10**, 551-554.
- Chen, H. C., and Guan, J. L. (1994). **Association of the focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase.** *J Biol Chem* **269**, 31229-31233.

- Chen, Q., Kinch, M., Lin, T., Burridge, K., and Juliano, R. (1994). **Integrin mediated cell adhesion activates MAP kinases.** *J Biol Chem* **269**, 26602-26605.
- Chen, Q., Lin, T., Der, C., and Juliano, R. (1996). **Integrin-mediated activation of MEK and mitogen-activated protein kinase is independent of Ras.** *J Biol Chem* **271**, 18122-18127.
- Damsky, C. H., and Werb, Z. (1992). **Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: Cooperative processing of extracellular information.** *Curr Opin Cell Biol* **4**, 772-781.
- Davis, R. J. (1995). **Transcriptional regulation by MAP kinases.** *Mol Reprod Dev* **42**, 459-467.
- Dedhar, S. (1997). **Regulating of anchorage-independent cell cycle progression and fibronectin assembly by the integrin linked kinase (ILK),** in *Signal Transduction by Cell Adhesion Receptors* ed.(Keystone, Colorado).
- Dogic, D., Eckes, B., and Aumailley, M. (1999). **Extracellular matrix, integrins and focal adhesions.** *Curr Top Pathol* **93**, 75-85.
- Eierman, D. F., Jhonson, C. E., and Haskill, J. S. (1989). **Human monocyte inflammatory mediator gene expression is selectively regulated by adherence substrates.** *J Immunol* **142**, 1970-1976.
- Erpel, T., and Court, S. (1995). **Src family protein tyrosine kinase and cellular signal transduction pathways.** *Curr Opin Cell Biol* **7**, 176-182.
- Fernandez, R., Boxer, L., and Suchard, S. (1997). **Beta 2 integrins are not required for tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils.** *J Immunol* **159**, 5568-5575.
- Frost, J., Swantek, J., Stippec, S., Yin, M., Gaynor, R., and Cobb, M. (2000). **Stimulation of NF- κ B activity by multiple signaling pathways requires PAK1.** *J Biol Chem* **275**, 19693-19699.
- Gao, J., Zoller, K., Ginsberg, M., Brugge, J., and Shattil, S. (1997). **Regulation of the pp72syk protein tyrosine kinase by platelet integrin α IIb β 3.** *EMBO J* **16**, 6414-25.
- Gardner, A., Lange-Carter, C., Vaillacourt, R., and Johnson, G. (1994). **Measuring activation of kinases in mitogen-activated protein kinase regulatory network.** *Meth Enzymol* **238**, 238-270.
- Gardner, A. M., Vaillacourt, R. R., Lange-Carter, and GL, J. (1994). **MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and Mitogen Activated Protein Kinase: Analysis of phosphopeptides and regulation of activities.** *Mol Biol Cell* **5**, 193-201.
- Garrinton, T., and Johnson, G. (1999). **Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways.** *Curr Opin Cell Biol* **11**, 211-218.

Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999). **Integrin signaling**. *Science* **285**, 1028-32.

Gotoh, A., Miyazawa, K., Ohyashiki, K., Tauchi, T., Boswell, H., Broxmeyer, H., and Toyama, K. (1995). **Tyrosine phosphorylation and activation of focal adhesion kinase (p125FAK) by BCR-ABL oncoprotein**. *Exp Hematol* **11**, 1153-1159.

Gotoh, A., Takahira, H., Geahlen, R., and Broxmeyer, H. (1997). **Cross-linking of integrins induces tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product Vav and the protein tyrosine kinase Syk in human factor-dependent myeloid cells**. *Cell Growth Differ* **8**, 721-729.

Hall, A. (1998). **Rho GTPases and the actin cytoskeleton**. *Science* **279**, 509-514.

Hall, A., and Kjoller, L. (1999). **Signaling to Rho GTPases**. *Exp Cell Res* **253**, 166-179.

Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R., Krishna, U., Falck, J., White, M., and Broek, D. (1998). **Role of substrates and products of PI 3-K in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav**. *Science* **279**, 558-560.

Hanks, S. K., Calalb, M. B., Harper, M. C., and Patel, S. K. (1992). **Focal adhesion protein tyrosine kinase phosphorylated in response to cell spreading on fibronectine**. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 8487-8491.

Harris, E., McIntyre, T., Prescott, S., and Zimmerman, G. (2000). **The leukocyte integrins**. *J Biol Chem* **275**, 23409-23412.

Haskill, S., Beg, A. A., Tompkins, S. M., Morris, J. S., Yurochko, A. D., Sampson-Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P., and Baldwin, A. S. J. (1991). **Characterization of an immediately early gene induced in adherent monocytes that encodes I κ B like activity**. *Cell* **65**, 1281-1289.

Haskill, S., Jhonson, C., Eirman, D., Becker, S., and K, W. (1988). **Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes**. *J Immunol* **140**, 1690-1694.

Hawkins, P., Eguioa, A., Qiu, R., Stokoe, D., Walter, R., Wennstrom, S., Claeson-Welsh, L., Evant, T., and Symon, M. (1995). **PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase**. *Curr Biol* **5**, 393-403.

Hehner, S., Breitkreutz, R., Shubinsky, G., Unsoeld, H., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, M., and Droge, W. (2000). **Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool**. *J Immunol* **165**, 4319-4328.

Hiscott, J., Marois, J., Garoufalidis, J., D'Addario, M., Roulston, A., Kwan, I., Pepin, N., Lacoste, J., Nguyen, H., and Bensi, G. (1993). **Characterization of a functional NF- κ B site in human interleukin 1 β promoter: Evidence for a positive autoregulatory loop**. *Mol Cell Biol* **13**, 6231-6240.

Hogan, B. (1999). **Morphogenesis**. *Cell* **96**, 225-233.

- Howe, A., Aplin, A., Alahari, S., and Juliano, R. (1998). **Integrin signaling and cell growth control.** *Curr Opin Cell Biol* **10**, 220-231.
- Howe, A., and Juliano, R. (1998). **Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of integrin-mediated activation of Raf/Mek/Mitogen-activated protein kinase cascade.** *J Biol Chem* **273**, 27268-27274.
- Hynes, R. O. (1999). **Cell adhesion: old and new questions.** *Trends Cell Biol* **9**, M33-37.
- Hynes, R. O. (1992). **Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.** *Cell* **69**, 11-25.
- Ishida, T., Peterson, T. E., Kovach, N. L., and Berk, B. C. (1996). **MAP Kinase activation by flow in endothelial cells: Role of β 1 Integrins and tyrosine kinases.** *Circ Res* **79**, 310-316.
- Kapron-Bras, C., Fitz-Gibbon, L., Jeevatatnam, P., Wilkins, J., and Dedhar, S. (1993). **Stimulation of tyrosine phosphorylation and accumulation of GTP-bound p21ras upon antibody-mediated α 2 β 1 integrin activation in T-lymphoblastic cells.** *J Biol Chem* **268**, 20701-20704.
- Kido, Y., Nakae, J., and Accili, D. (2001). **The insulin receptor and its cellular targets.** *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 972-979.
- King, W., Mattaliano, M., Cham, T., Tschlis, P., and Brugge, J. (1997). **Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation.** *Mol Cell Biol* **17**, 4406-4418.
- Kondo, A., Hashimoto, S., Yano, H., Nagayama, K., Mazaki, Y., and Sabe, H. (2000). **A new paxillin-binding protein, PAG3/Papalpa/KIAA0400, bearing an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein activity, is involved in paxillin recruitment to focal adhesions and cell migration.** *Mol Biol Cell* **11**, 1315-1327.
- Krasilnikov, M. A. (1999). **Phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathways: The role in control of cell growth, survival, and malignant transformation.** *Biochem J* **65**, 59-67.
- Kumar, C. (1998). **Signaling by integrin receptors.** *Oncogene* **17**, 1365-1373.
- Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, V. R., and Avruch, J. (1992). **Raf-1 activates MAP kinase kinase.** *Nature* **358**, 417-421.
- Levers, S., Vanhaesebroeck, B., and Waterfield, M. (1999). **Signaling through phosphoinositide 3-kinase: the lipids take centre stage.** *Curr Opin Cell Biol* **11**, 219-225.
- Lin, T. H., Aplin, A. E., Shen, Y., Chen, Q., Schaller, M., Romer, L., Aukhil, I., and Juliano, R. L. (1997). **Integrin mediated activation of MAPK is independent of FAK.** *J Cell Biol* **136**, 1385-1395.

- Lin, T. H., Yurochko, A., Kornberg, L., Morris, J., Walker, J. J., Haskill, S., and Juliano, R. L. (1994). **The Role of protein tyrosine phosphorylation in integrin-mediated gene induction in monocytes.** *J Cell Biol* **126**, 1585-1593.
- Loftus, J., and Liddington, R. (1997). **New insights into integrin-ligand interaction.** *J Clin Invest* **99**, 2302-2306.
- Lowell, C. (1999). **Integrins signal transduction in myeloid leukocytes.** *J Leukoc Biol* **65**, 313-320.
- Mainiero, F., Murguía, C., Wary, K. K., Curatola, A. M., Pepe, A., Blumemberg, M., Vestwick, J., Der, C. J., and Giancotti, F. G. (1997). **The coupling of $\alpha\beta4$ integrin to Ras-MAP Kinase pathways mediated by shc control keratinocytes proliferation.** *EMBO J* **16**, 2365-2375.
- Mainiero, F., Soriani, A., Strippoli, R., Jacobelli, J., Gismondi, A., Piccoli, M., Frati, L., and Santoni, A. (2000). **RAC1/P38 MAPK signaling pathway controls beta1 integrin-induced interleukin-8 production in human natural killer cells.** *Immunity* **12**, 7-16.
- Meng, F., and Lowell, C. (1998). **A $\beta1$ integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI 3-kinase is required for macrophage spreading and migration.** *EMBO J* **17**, 4391-4403.
- Meng, F., and Lowell, C. (1997). **Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr and Lyn.** *J Exp Med* **185**, 1661-1670.
- Miranti, C., Leng, L., Maschberger, P., Brugge, J., and Shattil, S. (1998). **Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1.** *Curr Biol* **8**, 1289-1299.
- Moores, S., Selfors, L., Fredericks, J., Breit, T., Fujikawa, K., Alt, F., Brugge, J., and Swat, W. (2000). **Vav family proteins couple to diverse cell surface receptors.** *Mol Cell Biol* **20**, 6364-6373.
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1995). **Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complex associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia.** *Cell* **81**, 53-62.
- Ojaniemi, M., Martin, S., Dolfi, F., Olefsky, J., and Vuori, K. (1997). **The proto-oncogene product p120(cbl) links c-Src and phosphatidylinositol 3-kinase to integrin signaling pathway.** *J Biol Chem* **272**, 3780-3787.
- Osada, M., Tolkacheva, T., Li, W., Chan, T., Tschlis, P., Saez, R., Kimmelman, A., and Chan, A. (1999). **Differential roles of Akt, Rac, and Ral in R-Ras-mediated cellular transformation, adhesion, and survival.** *Mol Cell Biol* **19**, 6333-6334.

- Parsons, J. T., and Parsons, C. G. (1997). **Src family proteins tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signalling pathways.** *Curr Opin Cell Biol* **9**, 187-192.
- Pereira, S., Zhou, M., Mocsai, A., and Lowell, C. (2001). **Resting Murine Neutrophils Express Functional alpha(4) Integrins that Signal Through Src Family Kinases.** *J Immunol* **166**, 4115-23.
- Plow, E., Hass, T., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J. (2000). **Ligand binding to integrins.** *J Biol Chem* **275**, 21785-21788.
- Renshaw, M., Toksoz, D., and Schwartz, M. (1996). **Involvement of the small GTPase rho in integrin-mediated activation of mitogen-activated protein kinase.** *J Biol Chem* **271**, 21691-21694.
- Roach, T., Slater, S., Koval, M., White, L., McFarland, E., Okumura, M., Thomas, M., and Brown, E. (1997). **CD45 regulates Src family members kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion.** *Curr Biol* **7**, 408-417.
- Robinson, M. J., and Cobb, M. H. (1997). **Mitogen-activated protein kinase pathways.** *Current Opin in Cell Biol* **9**, 180-186.
- Roitt, I., Brostoff, J., and Male, D. (1998). **Immunology**, Fifth edition, Mosby International, ed. (Oxford).
- Rosales, C., and Juliano, R. (1996). **Integrin signalling to NFκB in monocytic leukemia cells is blocked by activated oncogenes.** *Cancer Res* **56**, 2302-2305.
- Rosales, C., and Juliano, R. (1995). **Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocyte.** *J Leukocyte Biol* **57**, 189-198.
- Sánchez-Mejorada, G., and Rosales, C. (1998). **Fcγ receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras.** *J Biol Chem* **273**, 27610-27619.
- Schlaepfer, D., Hanks, S. K., Hunter, T., and van der Geer, P. (1994). **Integrin mediated signaling transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to Focal Adhesion Kinase.** *Nature* **372**, 786-791.
- Schlaepfer, D. a. H. T. (1996). **Evidence for in vitro phodphorylation of GRAB2 SH2-domain binding site on Focal Adhesion Kinase by Src - family protein tyrosine kinases.** *Molec Cell Biol* **16**, 5623-5633.
- Schaller, M. D., Borgman, C. A., Cobb, B. S., Vines, R. R., Reynolds, A. B., and Parsons, J. T. (1992). **pp125 FAK, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesion.** *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 5192-5196.
- Schlaepfer, D., Hanks, S., Hunter, T., and van der Geer, P. (1994). **Integrin-mediated signal**

transduction linked to Ras pathway by Grb2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372**, 786-791.

Schlaepfer, D., and Hunter, T. (1997). **Focal adhesion kinase overexpression enhances Ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src.** *J Biol Chem* **272**, 13189-13195.

Schwartz, M. A., and Baron, V. (1999). **Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections.** *Curr Opin Cell Biol* **11**, 197-202.

Serrander, L., Fallman, M., and Stendahl, O. (1996). **Activation of phospholipase D is an early event in integrin-mediated signalling leading to phagocytosis in human neutrophils.** *Inflammation* **20**, 439-450.

Springer, T. A. (1994). **Traffic signal for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.** *Cell* **76**, 301-314.

Vuori, K., and Ruoslahti, E. (1993). **Activation of protein kinase C precedes $\alpha 5 \beta 1$ integrin-mediated cell spreading on fibronectin.** *J Biol Chem* **268**, 214559-214562.

Wahl, S. M., Feldeman, G. M., and Mc Carthy, J. B. (1996). **Regulation of leucocyte adhesion and signaling in inflammation and disease.** *J Leukocyte Biol* **59**, 789-796.

Wary, K., Mainiero, F., Isakoff, S., Marcantonio, E., and Giancotti, F. (1996). **The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression.** *Cell* **87**, 733-743.

Wei, Y., Yang, X., Liu, Q., Wilkins, J. A., and Chapman, H. A. (1999). **A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling.** *J Cell Biol* **144**, 1285-1294.

Yan, S., Fumagalli, L., and Berton, G. (1996). **Activation of SRC family kinases in human neutrophils. Evidence that p58C-FGR and p53/56LYN redistributed to a Triton X-100-insoluble cytoskeletal fraction, also enriched in the caveolar protein caveolin, display an enhance kinase activities.** *FEBS Lett* **380**, 297-311.

Yan, S., Huang, M., and Berton, G. (1997). **Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72syk tyrosine kinase and formation of protein complexes containing p72syk and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen.** *J Immunol* **158**, 1902-1910.

Yang, W., Lin, Q., Guan, J., and Cerione, R. (1999). **Activation of the Cdc42-associated tyrosine kinase-2 (ACK-2) by cell adhesion via $\beta 1$ integrin.** *J Biol Chem* **274**, 8524-8530.

Zhu, X., and Assoian, R. K. (1995). **Integrin dependent activation of MAPK a link to shape dependent cell proliferation.** *Mol Biol Cell* **6**, 273-287.

CURRICULUM VITAE

DATOS PERSONALES

Nombre: Elsa Merit Reyes Reyes
Lugar y Fecha de Nacimiento: México, D.F. 29 de abril de 1970.
Estado Civil: Casada

FORMACIÓN

Doctorado Periodo: 1998-2001

Doctorado en Ciencias Biomédicas
(Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

Nombre de la tesis: *“Estudio de la participación de la vía PI 3-K, Rac, Rho en la vía de transducción por integrinas $\beta 1$ en monocitos”.*

Fecha aproximada de obtención del grado: Junio 2001.

Título a obtener: Doctor en Ciencias (Biomédicas).

Maestría Periodo: 1995-1997

Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica)

Nombre de la tesis: *“Estudio del patrón de metilación de los genes que codifican para las isoenzimas de la esteroide de la 5α -reductasa de rata”.*

Fecha de examen de grado: 14 de marzo de 1997.

Título obtenido: Maestra en Ciencias Químicas (Bioquímica).

Licenciatura**Periodo 1989-1994**

Facultad de Química UNAM

Nombre de la tesis: "Estudio cuántico estructura-actividad de herbicidas derivados de la piridina".

Fecha de examen profesional: 2 de septiembre 1994

Titulo obtenido Químico con Mención Honorífica

CURSOS

- 1995 Curso teórico-práctico de genética humana.
En el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- 1996 Curso de seguridad radiológica.
En la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- 1996 Curso de síntesis de oligonucleotidos.
En la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

PREMIOS Y DISTINCIONES.

- 1998-2000 Beca de CONACYT para realizar el Doctorado en Ciencias Biomédicas.
- 1994-1996 Beca de CONACYT para realizar la Maestría-en Ciencias Químicas.
- 1992-1993 Beca otorgada por el gobierno alemán
- 1992 "Diploma de Aprovechamiento" otorgada por la UNAM a los alumnos de mejor desempeño académico.

DIFUSIÓN

Conferencias

- 1996 "Regulación de los genes de la 5 α -reductasa tipo I y tipo II por metilación". Impartida en la Facultad de Química UNAM.
- 1993 "Evaluación de la síntesis de antroquinona en base a su interés económico ambiental empleando diseño de experimentos". En el Simposio II de educación Química. Impartido en la Facultad de Química UNAM.

Congresos.

- 1999 **E. Reyes, C. Rosales.** "Rac and PI 3-Kinase Regulate Integrin Signaling to NF- κ B in Monocytic Cells" 39th Annual Meeting "The American Society for Cell Biology". Washington, D.C. USA.
- 1998 **E.M. Reyes, C. Rosales.** "Rho Regulate Integrin Signaling to NF- κ B in Monocytic Cells" 38th Annual Meeting "The American Society for Cell Biology". San Francisco. USA.
- 1993 **Elsa M. Reyes Reyes, Sara E. Meza Galindo, Germund Höjer** "Estudio Teórico de la estructura-Actividad de Herbicidas Derivados de Piridinas".. XXXIX Congreso Mexicano de Química. Cancún, Quintana Roo. México.
- 1992 **Irma Gavilán, Elsa M. Reyes Reyes, Elvira Santos Santos, Helio Flores.** "Evaluación de la síntesis de antroquinona en base a su interés económico ambiental empleando diseño de experimentos". XII Congreso Nacional de Educación Química. Puerto Vallarta, Jalisco. México

Publicaciones

Elsa M. Reyes, Ignacio Camacho, Gabriel Nava, Marco A. Cerbón (1997). "Diferencial Methylation in Steroid 5 α -reductase Isozyme Genes in Epodydimis, Testis and Liver de Rat adult" *Journal of Andrology* 18:372-377.

Merit Reyes-Reyes, Nancy Mora, Alejandro Zentella, Carlos Rosales (2001). "Phosphatidylinositol 3-Kinase Mediates Integrin-dependent NF- κ B and MAPK Activation Through Separate Signaling Pathways" *Journal of the Cell* 114:1579-89.

Merit Reyes-Reyes, Carlos Rosales, Roberto Hernandez, Imelda López. “Mecanismos que Regulan Dinámica del Citoesqueleto de Actina” Boletín de Educación Bioquímica (en prensa)

Merit Reyes-Reyes, Gerardo Gonzalez, Nancy Mora y Carlos Rosales. “ Two Different Signaling Pathways are Activated by β 1 and β 2 Integrins Monocytes” (manuscrito en preparación)

Phosphatidylinositol 3-kinase mediates integrin-dependent NF- κ B and MAPK activation through separate signaling pathways

Merit Reyes-Reyes¹, Nancy Mora¹, Alejandro Zentella² and Carlos Rosales^{1,*}

¹Immunology Department at Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

²Cell Biology Department at Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

*Author for correspondence (e-mail: carosal@servidor.unam.mx)

Accepted 26 January 2001

Journal of Cell Science 114, 1579-1598 © The Company of Biologists Ltd

SUMMARY

Integrin-mediated signals play an important but poorly understood role in regulating many leukocyte functions. In monocytes and monocytic leukemia cells, β 1 integrin-mediated adhesion results in a strong induction of immediate-early genes that are important in inflammation. To investigate the signaling pathways from integrins in monocytic cells, THP-1 cells were stimulated via β 1 integrins by binding to fibronectin and by crosslinking the integrins with specific monoclonal antibodies. The involvement of MAPK and PI 3-K on nuclear factor κ B (NF- κ B) activation was then analyzed. We found that integrins activated both NF- κ B and MAPK in a PI 3-K-dependent manner, as wortmannin and LY294002 blocked these responses. However, the specific MEK inhibitor PD98059 did not prevent integrin-mediated NF- κ B activation. In contrast, a dominant negative mutant of Rac

completely prevented NF- κ B activation, but it did not affect MAPK activation. These results indicate that integrin signaling to NF- κ B is not mediated by the MAPK pathway, but rather by the small GTPase Rac. In addition, a dominant negative form of Rho augmented NF- κ B activation and blocked MAPK activation, implying that these two pathways are in competition with each other. These data suggest that integrins activate different signaling pathways in monocytic cells. One uses PI 3-K and Rac to activate NF- κ B, while the other uses PI 3-K, MEK, and MAPK to activate other nuclear factors, such as Elk-1.

Key words: Signal transduction, Rho GTPases, Monocytes, Inflammation, Gene activation

INTRODUCTION

Adhesion of cells to extracellular matrix (ECM) proteins has been shown to trigger important cellular functions such as cell cycle, differentiation, and gene expression (Aplin et al., 1998; Rosales et al., 1995). Integrins are the major family of transmembrane receptors that mediate attachment to the ECM. They are composed of two gene products, α - and β -chains, which are linked in a noncovalent but very stable structure (Rosales and Juliano, 1995; Ruoslahti and Reed, 1994). Most β -chains have the ability to combine with more than one α -chain, creating, in this way, a great variety of integrin receptors. Integrin-mediated adhesion has a crucial influence on the organization of the cytoskeleton through members of the Rho GTPase family. Integrins are clustered into specialized adhesive structures, named focal adhesions and focal complexes (Schoenwaelder and Burridge, 1999). The first are large integrin aggregates found at the ends of prominent bundles of actin filaments (stress fibers). Both stress fibers and focal adhesions are regulated by Rho. Focal complexes are smaller integrin clusters that occur at the tip of filopodia or lamellipodia. These structures are regulated by Rac and Cdc42, respectively (Hall, 1998; Nobes and Hall, 1995; Tapon and Hall, 1997). However, little is known about how these Rho family GTPases contribute to regulate other integrin-related

signaling events (Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). Because the great variety of cell functions activated by integrins, there is great interest in elucidating the various signaling pathways that integrins use in various cell types.

Adhesion of human monocytic cells via β 1 integrins leads to activation of immediate-early genes that are characteristic of monocyte differentiation. These genes contain consensus nuclear factor κ B (NF- κ B) elements in their 5' regulatory regions. Various of these genes code for important inflammatory mediators, such as interleukin 1 (IL-1), IL-8, and tumor necrosis factor (TNF) (Aplin et al., 1998; Juliano and Haskill, 1993). The signaling cascades used by each type of integrins to promote the various leukocyte responses are, however, poorly understood. In fibroblasts, it has been found that there is some overlap between integrin signaling pathways and the consensus pathway triggered by receptor tyrosine kinases (Chen et al., 1994; Schlaepfer et al., 1994). This pathway involves the activation of the Ras proto-oncogene protein, followed by activation of a cascade of cytoplasmic kinases including Raf, MEK and mitogen-activated protein kinase (MAPK). Integrins binding to fibronectin, induce MAPK activation but, at least in some cases, they seem to do it independently of the Ras protein (Chen et al., 1996; Howe and Juliano, 1998). Because in monocytes, integrin-mediated activation of NF- κ B also seems to be independent of the Ras

protein (Rosales and Juliano, 1996), we decided to investigate what other molecules could be involved in gene induction after integrin ligation.

Recent studies on integrin signaling indicate an important role for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) (King et al., 1997; Shimizu and Hunt, 1996). PI 3-K is a lipid kinase that phosphorylates phosphoinositides at the 3' position of the inositol ring. The principal products of these family of kinases, PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂ and PtdIns(3,4,5)P₃ (Carpenter and Cantley, 1996; Leever et al., 1999), probably act as second messenger molecules that may activate several signaling pathways – for example, the activation of Ca²⁺-independent protein kinase C isoforms *in vitro* (Toker et al., 1994) and the activation of Akt protein kinase (Franke et al., 1995; Harlan et al., 1994). PI 3-K also seems to be involved in regulating the actin cytoskeleton (Carpenter and Cantley, 1996) and in the activation of Rac (Han et al., 1998; Hawkins et al., 1995; Parker, 1995).

We have explored whether the GTPases Rac and Rho, and the kinase PI 3-K participate in the integrin signaling pathway that leads to gene transcription activation in monocytic cells. We found that a dominant negative mutant form of Rac and PI 3-K inhibitors markedly blocked integrin-mediated NF- κ B activation, while the MAPK kinase (MEK)-specific inhibitor, PD98059, did not. In contrast, integrin-dependent MAPK activation was blocked by MEK and PI 3-K inhibitors, but not by the dominant negative mutant of Rac. In addition, a dominant negative form of Rho augmented NF- κ B activation and blocked MAPK activation, indicating that these two pathways are in competition with each other. NF- κ B activation and MAPK activation were both dependent of the actin cytoskeleton, as treatment with cytochalasin B prevented them. These data suggest that integrins activate different signaling pathways in monocytic cells. One uses PI 3-K and Rac to activate NF- κ B, while the other one uses PI 3-K, MEK and MAPK to activate other nuclear factors, such as Elk-1.

MATERIALS AND METHODS

Cells and reagents

THP-1 cells, a human monocytic leukemia cell line, were maintained as described (Sánchez-Mejorada and Rosales, 1998). TS2/16, an anti- β 1 integrin monoclonal antibody was provided by Dr Martin Hemler (Dana Farber Cancer Research Institute, Boston, MA). W6/32, an anti-MHC class I monoclonal antibody was from ATCC (Manassas, VA). AFT8, an anti-phosphotyrosine monoclonal antibody was previously described (Sánchez-Mejorada and Rosales, 1998). 12CA5, an anti-HA monoclonal antibody was from Roche Molecular Biochem. (Indianapolis, IN). The anti-pan ERK (MAPK) monoclonal antibody (catalog no. E171120) was from Transduction Laboratories (Lexington, KY). The anti-phosphatidylinositol 3-kinase p110 β rabbit polyclonal IgG (Catalog no. sc-7189) was from Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, CA). The various rabbit polyclonal IgG against different NF- κ B subunits p50 (Catalog no. sc-114), p65 (Catalog no. sc-109), c-Rel (Catalog no. sc-70), and RelB (Catalog no. sc-226) were from Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA). The horseradish peroxidase-conjugated F(ab')₂ goat anti-mouse IgG was from Cappel (Aurora, OH). The specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin (U₁ et al., 1995) and LY294002, and the selective Syk tyrosine kinase inhibitor Piceatannol were from Calbiochem (San Diego, CA). The specific MEK (MAPK kinase) inhibitor, PD98059 (Alessi et al., 1995), was from New England Biolabs (Beverly, MA).

Insulin (Humulin**R*) was from Eli Lilly y Co. (Mexico City, Mexico). The NF- κ B-responsive reporter plasmid 3XMHC-luc, containing NF- κ B elements upstream of the luciferase (luc) gene was provided by Dr John Westwick and Dr David A. Brenner (University of North Carolina, Chapel Hill, NC). Plasmids that direct the synthesis of normal or mutant forms of Rho and Rac were a gift from Dr Channing Der (University of North Carolina, Chapel Hill, NC), and have been previously described (Khosravi-far et al., 1995). The plasmid coding the kinase-deficient MAPK (K⁻MAPK) was kindly provided by Dr Rudy Juliano (University of North Carolina in Chapel Hill, NC). The plasmid encoding HA-MAPK was a gift from Dr Mike Weber (University of Virginia, Charlottesville, VA). The Ras pathway-responsive reporter system Gal-Elk/5XGal-luc has been previously described (Hauser et al., 1995). The phage M13/T7, containing the gene for the T7 polymerase was kindly donated by Dr Pascal Héron (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico City, Mexico). All other chemicals were from Sigma (St Louis, MO).

Reporter gene assays

Plasmids were transfected into THP-1 cells by the DEAE-dextran method (Ausubel et al., 1994) with minor modifications as described (Sánchez-Mejorada and Rosales, 1998). Statistical analysis of data was performed with a Student's *t*-test. Values of *P* ≤ 0.01 were considered significant.

Stimulation by cell adhesion to fibronectin or by anti- β 1 antibodies

Tissue culture dishes (30 mm) were coated overnight at 4°C with 20 μ g/ml human fibronectin (Roche Molecular Biochem., Indianapolis, IN), and blocked with 1% BSA as described (Lin et al., 1995). THP-1 cells were washed and resuspended in cold serum-free RPMI 1640 medium. Cells were plated on fibronectin-coated dishes or left untreated in suspension and then incubated at 37°C for the times indicated in figure legends. For ligation by antibodies, THP-1 cells were incubated in medium alone or medium containing 5 μ g/ml of antibody for 1 hour at 4°C; cells were then washed with cold medium and incubated at 37°C in RPMI 1640 medium containing 5 μ g/ml F(ab')₂ goat anti-mouse IgG.

Electrophoretic mobility shift assays

NF- κ B translocation to the nucleus was determined as previously described (Dbaibo et al., 1993) with minor modifications. The oligonucleotide probe, (Catalog no. sc-2505) with the sequence 5'-GGGGACTTCCC-3' contains a consensus NF- κ B binding site and was purchased from Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, CA). Protein-DNA complexes were then resolved in 5% nondenaturing polyacrylamide gels run at 150 V. Gels were finally dried and analyzed with a Molecular Dynamics phosphorimager, model Storm 850 (Amersham Pharmacia Biotech., Buckinghamshire, UK). The specificity of DNA/NF- κ B complexes was demonstrated by showing no protein binding to an irrelevant oligonucleotide probe, and also by recognition of NF- κ B subunits with specific antibodies.

Cell lysates

Cells were lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Hepes, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40, 10 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.5) containing 1 mM sodium vanadate, 1 mM p-nitrophenyl phosphate, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 50 μ g/ml aprotinin A, 25 μ g/ml leupeptin, and 25 μ g/ml pepstatin, for 15 minutes at 4°C. Cell lysates were then cleared by centrifugation at 20000 *g* for 5 minutes and kept cold on ice.

PI 3-K activity assay

PI 3-K was immunoprecipitated from THP-1 cell lysates (1.5 × 10⁷ cell equivalent) with 1 μ g of anti-PI 3-kinase (p110 β subunit) antibody. The antibody was first incubated with 20 μ l of Protein G-Sepharose (Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden) for 2 hours at 4°C, and then

mixed with the cell lysate for another 2 hours at 4°C. Sepharose beads were then washed twice with cold PBS containing 1% NP-40 and 1 mM sodium vanadate, twice with 100 mM cold Tris (pH 7.4), and twice with cold TNE buffer (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and 100 mM sodium orthovanadate). Immunoprecipitates were resuspended in 70 μ l of kinase assay buffer (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 100 mM MgCl₂ and 0.88 mM ATP), containing 8 μ Ci of [γ -³²P]ATP (0.11 TBq/mmol; 2 mCi/ml) (Amersham) and 40 μ g of L- α -phosphatidylinositol (Catalog no. 640042; Avanti Polar-Lipids, Alabaster, AL). The mixture was incubated at room temperature for 30 minutes, and the reaction stopped by adding 20 μ l of 6 N HCl. Lipids were extracted by adding 100 μ l of CHCl₃:CH₃OH (1:1 v/v) mixing vigorously, and then centrifuging at maximum speed for 5 minutes in a microcentrifuge. 50 μ l of the lower organic phase was applied to an oxylated silica gel plate (Sigma). Lipids were resolved by thin-layer chromatography using a solvent mixture of CHCl₃:CH₃OH:H₂O:NH₄OH (60:47:11.3:2 v/v). Phosphatidylinositol-3-phosphate was detected by autoradiography. To evaluate the amount of protein immunoprecipitated an aliquot of the sample was separated and western blotted with anti-PI 3-K antibodies.

Purification of recombinant histidine-tagged kinase-defective MAP kinase

Histidine-tagged kinase-defective MAPK (K-MAPK) was prepared as described (Gardner et al., 1994) with modifications. Briefly, *Escherichia coli*, strain XL1Blue containing the plasmid coding for the K-MAPK protein were incubated overnight in SOB medium, containing 10 μ g/ml tetracyclin and 100 μ g/ml ampicillin, at 30°C, with agitation at 300 rpm. 5 ml of this saturated culture was diluted 100-fold in SOB medium and incubated at 37°C and 220 rpm, until the culture reached an Abs_{600nm} of 0.3. At this point, IPTG (Calbiochem, La Jolla, CA) was added to a concentration of 1 mM, and the culture continued for another hour. The phage M13/T7 was then added to the culture at 5 PFU/bacteria. Five hours later, bacteria were collected by centrifuging at 5000 g for 15 minutes at 4°C. Bacteria from a 500 ml culture were resuspended in 40 ml of a urea buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 0.5 M NaCl, 5 M urea, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM imidazole). Bacteria were then lysed by three cycles of freeze-thaw, and then incubated on ice for 30 min. Bacterial cell lysates were clarified by centrifugation at 18000 g for 15 minutes at 4°C. The clear supernatant was passed through a Ni²⁺ column (His-Bind® resin; Novagen, Chicago, IL) in the presence of 5 M urea. The column was then washed with four column-volumes of urea buffer containing 25 mM imidazole. Elution of proteins was performed with four column-volumes of urea buffer containing 100 mM imidazole. Fractions containing K-MAPK were identified by Western blotting. Protein concentration was determined using the Bicinchoninic acid method (BCA® protein assay; Pierce, Rockford, IL).

MEK activity assay

MEK was immunoprecipitated from THP-1 cell lysates (1.5 \times 10⁷ cell equivalent) with 0.5 μ g of anti-MEK antibody. Immunoprecipitates were resuspended in 40 μ l of kinase assay buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 25 μ M ATP), containing 5 μ Ci of [γ -³²P]-ATP (0.11 TBq/mmol; 2 mCi/ml) (Amersham) and 3 μ g of kinase-defective MAPK (K-MAPK) as substrate for MEK. Mixtures were incubated at room temperature for 30 minutes. Proteins were then resolved on 12% SDS-polyacrylamide gels. The phosphorylated proteins were analyzed by autoradiography. To evaluate the amount of protein immunoprecipitated an aliquot of the sample was separated and western blotted with anti-MEK antibodies

Western blot

Total cell lysates from equivalent cell numbers, or immunoprecipitates

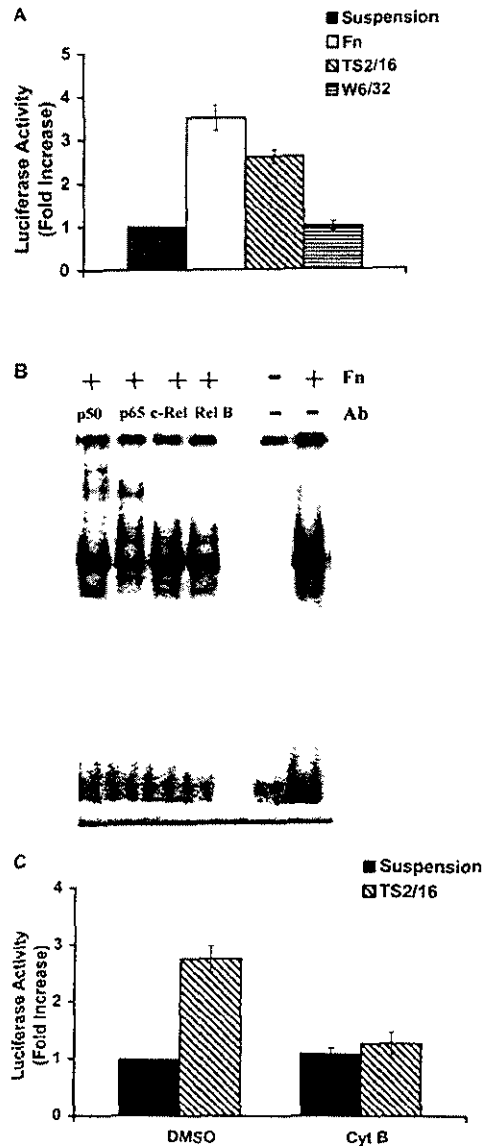


Fig. 1. Crosslinking of $\beta 1$ integrins induces NF- κ B activation.

(A) THP-1 monocytic cells were transiently transfected with the NF- κ B responsive plasmid 24 hours after transfection cells were left in suspension, or adhered to fibronectin (Fn). Cells were also treated with anti- $\beta 1$ integrin monoclonal antibody TS2/16 or with anti-MHC class I monoclonal antibody W6/32. After a 4 hour incubation, cells were lysed, and luciferase activity, which represents NF- κ B activation, was determined in a luminometer. Data are mean \pm s.e. of 10 determinations. (B) THP-1 cells were adhered to fibronectin (Fn) and nuclear extracts prepared to perform protein-DNA binding assays. Nuclear extracts were incubated with antibodies specific for the specific NF- κ B subunits p50, p65, c-Rel, and RelB before performing protein-DNA binding assays. Bands in the middle are the specific DNA/NF- κ B complex. Data are representative of three independent experiments. (C) THP-1 cells were transiently transfected with the NF- κ B responsive plasmid. cells were treated with 10 μ g/ml of cytochalasin B (Cyt B) or only the solvent (DMSO) for 15 minutes at 37°C, before stimulation with antibody TS2/16. After 4 hours, NF- κ B activation was determined in a luminometer. Data are mean \pm s.e. of three determinations

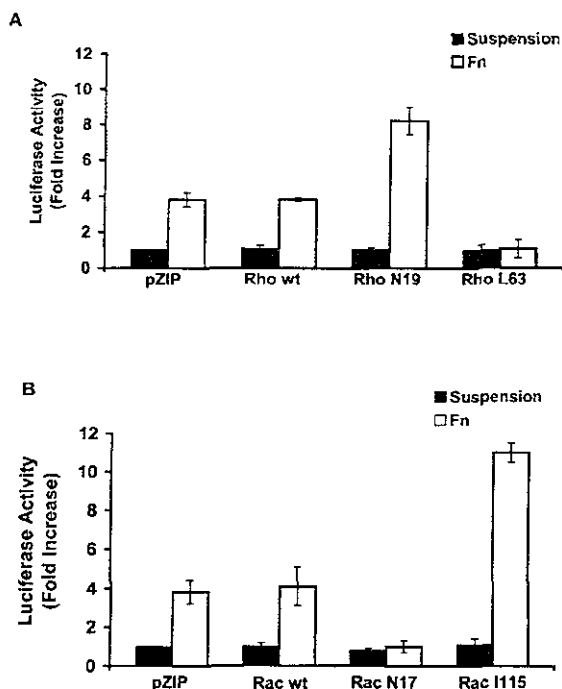


Fig. 2. Oncogenic Rho and Rac regulate integrin-mediated NF- κ B activation. THP-1 cells were transiently co-transfected with the NF- κ B reporter plasmid, 3XMHC-luc, and (A) wild-type Rho (Rho wt), dominant negative Rho (Rho N19) or oncogenic active Rho (Rho L63); and (B) wild-type Rac (Rac wt), dominant negative Rac (Rac N17) or oncogenic active Rac (Rac I115). 24 hours after transfection, cells were placed in serum-free medium and left in suspension or stimulated by adhesion to fibronectin (Fn) coated dishes. 4 hours later, cell lysates were prepared and luciferase activity, representing NF- κ B activation, was determined. pZIP is the empty vector where the Rho constructs are cloned. Data are mean \pm s.e. of eight different determinations.

of MAPK or PI 3-K were resolved on SDS 12% or 8% PAGE, respectively. Proteins were then electrotransferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA). Membranes were incubated in blocking buffer (1% BSA, 5% nonfat dry milk (Carnation; Nestle, Glendale, CA) and 0.1% Tween 20 in PBS) overnight at room temperature. Membranes were subsequently probed with the corresponding antibody in blocking buffer, for 1 hour at room temperature. Anti-phosphotyrosine (AFT8) at 1 μ g/ml, anti-ERK polyclonal IgG at 75 ng/ml, and anti-PI 3-kinase at 100 ng/ml. Membranes were washed with PBS six times, 5 minutes each time, and incubated with a 1/3000 dilution of HRP-conjugated F(ab')₂ goat anti-mouse IgG for 1 hour at room temperature. After washing six more times with PBS, antibody-reactive proteins were detected using a chemiluminescence substrate (SuperSignal; Pierce, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions. In some cases, PVDF membranes were stripped of bound antibodies by incubating them in stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.7), 100 mM 2-mercaptoethanol, 1% SDS) for 30 minutes at 50°C. Membranes were then reprobed with other antibodies.

HA-MAPK immunoprecipitation

HA epitope-tagged MAPK was immunoprecipitated from THP-1 lysates (1.5 \times 10⁷ cell equivalent) with 14 μ g/ml of anti-HA monoclonal antibody 12CA5, as previously described (Sánchez-Mejorada and Rosales, 1998). Immunoprecipitates were resolved by

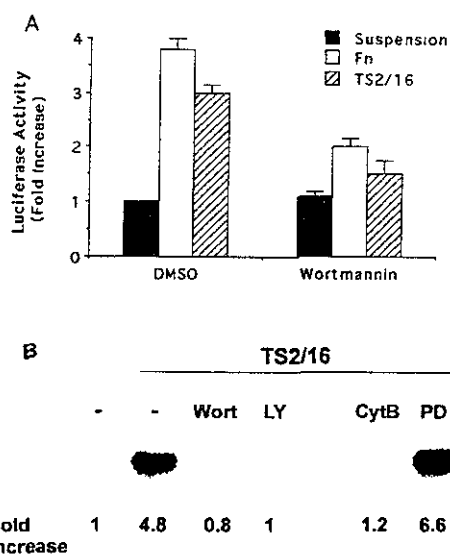


Fig. 3. β 1 integrin-mediated NF- κ B activation is dependent on PI 3-K. (A) THP-1 monocytic cells were transiently transfected with the NF- κ B responsive plasmid 3XMHC-luc. 24 hours after transfection cells were left in suspension, or plated on fibronectin (Fn), or treated with the anti- β 1 integrin monoclonal antibody TS2/16. Before stimulation cells were treated with 50 nM wortmannin or only the solvent (DMSO) for 30 minutes at 37°C. After a 4 hour incubation, cells were lysed, and luciferase activity, representing NF- κ B activation, determined in a luminometer. Data are mean \pm s.e. of six determinations. (B) THP-1 cells were incubated with 5 μ g/ml of anti- β 1 integrin monoclonal antibody TS2/16 at 4°C for 60 minutes, washed and then resuspended in medium containing 5 μ g/ml F(ab')₂ goat anti-mouse IgG at 37°C to induce integrin crosslinking. After a 20 minutes incubation, nuclear extracts were prepared to perform protein-DNA binding assays as described. Some cells were pretreated with 50 nM wortmannin (Wort), 50 μ M LY294002 (LY), 10 μ g/ml cytochalasin B (Cyt B), or 30 μ M PD98059 (PD) before stimulation. Bands shown are the specific DNA/NF- κ B complex. Data are representative of two independent experiments.

9% SDS-PAGE gels and western blotted with anti-phosphotyrosine or anti-MAPK antibodies

RESULTS

Integrin-mediated activation of the nuclear factor NF- κ B is dependent on the cytoskeleton

Because it has been reported that β 1 integrins can activate gene induction of inflammatory cytokines in monocytes and that the nuclear factor NF- κ B is required for this induction (Haskill et al., 1991; Lin et al., 1994), we evaluated the activation of this nuclear factor upon stimulation of β 1 integrins on THP-1 cells. Adhesion of cells to fibronectin or crosslinking of integrins with the anti- β 1 integrin monoclonal antibody TS2/16 induced the activation of NF- κ B, as indicated by an increase (around three fold) in luciferase activity from the NF- κ B reporter plasmid (Fig. 1A). Similar treatment with the anti-MHC class I monoclonal antibody W6/32 did not cause any activation of this nuclear factor (Fig. 1A). Activation of NF- κ B was maximum at 20 minutes after β 1 integrin crosslinking, as

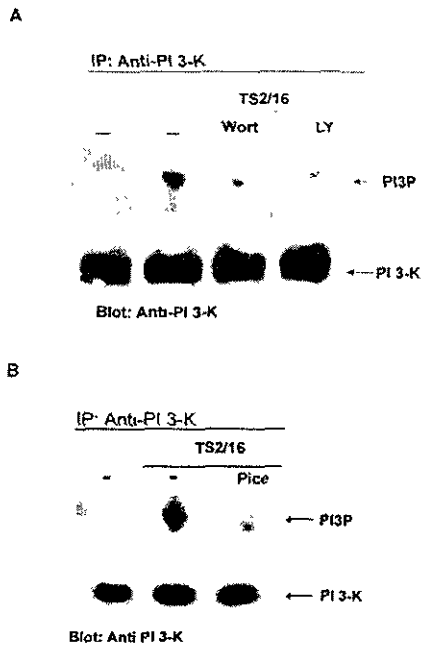


Fig. 4. Activation of PI 3-K after integrin crosslinking. 1.5×10^7 THP-1 cells in 4 ml of serum-free medium were stimulated with $5 \mu\text{g/ml}$ of anti- $\beta 1$ integrin antibody (TS2/16). PI 3-K activity was then measured by immune complex kinase assays from cell lysates. Some cells were pretreated with (A) 50 nM wortmannin (Wort) for 30 minutes, $50 \mu\text{M}$ LY294002 (LY) for 60 minutes, or (B) $30 \mu\text{g/ml}$ Piceatannol (Pice) for 60 minutes before stimulation. Lower panels in each figure are western blots of PI 3-K that show the same amount of protein immunoprecipitated in each determination. PI3P, phosphatidylinositol 3-phosphate. Data are representative of three separate experiments.

indicated by translocation of this nuclear factor to the nucleus. At this time, nuclear proteins showed around a fivefold increase in binding to the NF- κB -specific DNA probe (data not shown). The identity of these DNA/NF- κB complexes was confirmed to be the p50/p65 heterodimer (Fig. 1B), as previously published (Lin et al., 1995). Because integrins are known to participate in cytoskeleton organization, we looked at the effect of cytochalasin B (which disrupts actin filaments) on activation of NF- κB . Treatment with $10 \mu\text{g/ml}$ of cytochalasin B for 15 minutes at 37°C before stimulation of integrins resulted in complete inhibition of activation of this nuclear factor (Fig. 1C; see Fig. 3B). This indicated that the cytoskeleton is indeed required for this integrin signal to the nucleus.

The GTPases Rho and Rac participate in integrin-mediated NF- κB activation

The negative effect of cytochalasin B on NF- κB activation and the fact that Ras does not seem to be involved in activation of this nuclear factor by integrins in these cells (Rosales and Juliano, 1996) indicated that other GTPases might be participating in this integrin-mediated response. We turned our attention to the Rho family of GTPases. THP-1 cells co-transfected with the NF- κB reporter plasmid and another plasmid directing the expression of a mutant form of Rho were stimulated by adhesion to fibronectin. Cells expressing the

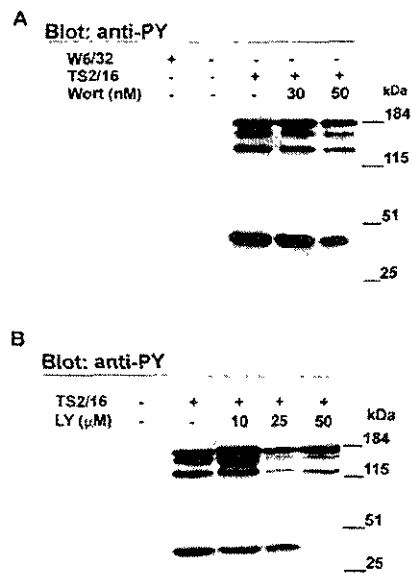


Fig. 5. PI 3-K is required for integrin-mediated tyrosine phosphorylation of some proteins. THP-1 cells were stimulated with $5 \mu\text{g/ml}$ of anti- $\beta 1$ integrin antibody (TS2/16). Some cells were also treated with (A) wortmannin (Wort) for 30 minutes or (B) LY294002 (LY) for 60 minutes prior to integrin crosslinking. After stimulation, cell lysates were prepared, resolved by SDS-PAGE, and then western blotted with anti-phosphotyrosine mAb AFT8. Data are representative of three separate experiments.

wild-type form of Rho had normal NF- κB activation around threefold after integrin engagement by fibronectin. The dominant negative mutant Rho N19 provoked an increase almost eightfold in NF- κB activity after cell adhesion to fibronectin. In contrast, the oncogenic form Rho L63 blocked integrin-mediated NF- κB activation to basal levels (Fig. 2A). Expression of the wild-type form of Rac also did not change the level of NF- κB activity after cell adhesion to fibronectin. However, opposite to the effects of Rho, the dominant negative mutant Rac N17, efficiently blocked integrin-mediated NF- κB activation, while the oncogenic form Rac I115, caused an almost 12-fold increase in NF- κB activity after cell adhesion to fibronectin (Fig. 2B). These results suggested that both Rho and Rac are important in integrin-mediated NF- κB activation, but they have opposite effects over this nuclear factor. While Rac seems to be in the pathway to activate NF- κB , Rho seems to play a regulatory negative effect.

PI 3-K is required for integrin-mediated NF- κB activation

Because, several reports have suggested a central role for PI 3-K in integrin-mediated responses (Howe et al., 1998; King et al., 1997), and because it also seems that this kinase may activate Rac (Han et al., 1998; Hawkins et al., 1995; Parker, 1995), we decided to look at the dependence on PI 3-K of integrin-mediated NF- κB activation. THP-1 cells transfected with the NF- κB reporter plasmid were treated with 50 nM wortmannin (a specific PI 3-K inhibitor) before integrin stimulation by fibronectin or by crosslinking the receptors with specific antibodies. In both cases, wortmannin blocked NF- κB

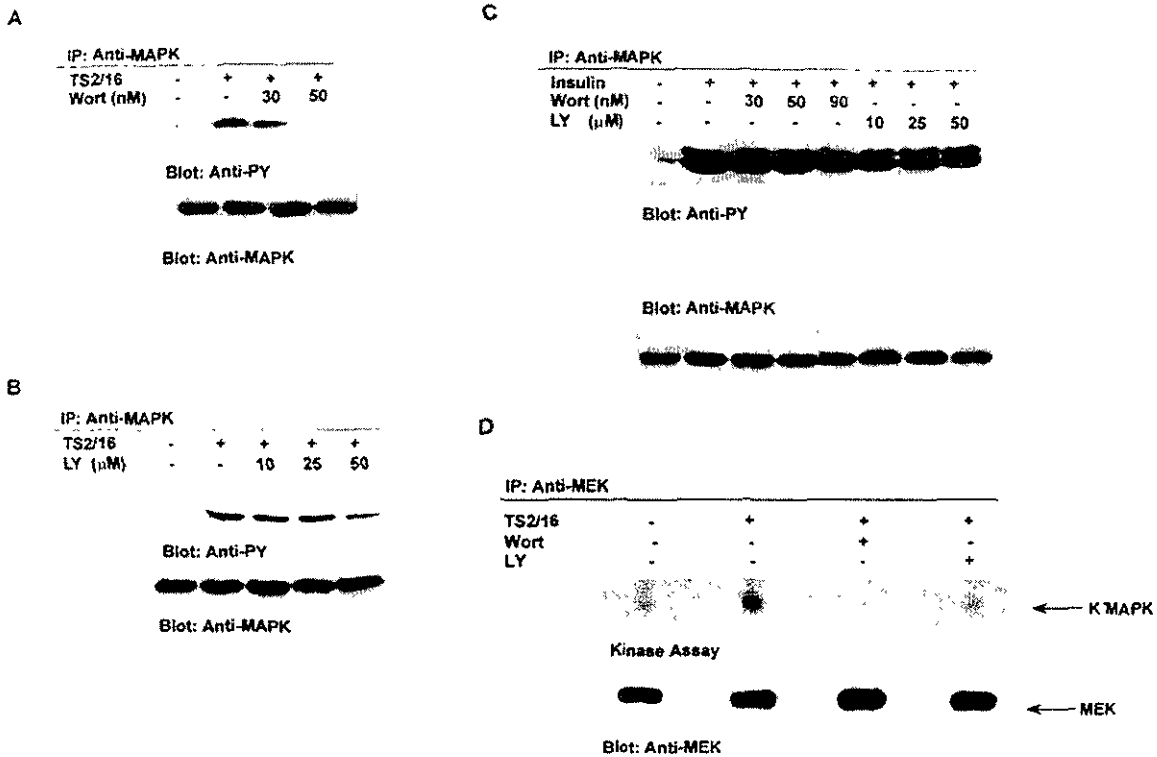


Fig. 6. PI 3-K is required for integrin-mediated MAPK activation. THP-1 cells were stimulated with 5 μ g/ml of anti- β 1 integrin antibody (TS2/16). Some cells were also treated with (A) wortmannin (Wort) for 30 minutes or (B) LY294002 (LY) for 60 minutes prior to integrin crosslinking. (C) Cells were also stimulated, in suspension, with 1 μ M insulin after treatment with wortmannin or LY294002. After stimulation, cell lysates were prepared, MAPK immunoprecipitated, resolved by SDS-PAGE and then western blotted for phosphotyrosine. After stripping off bound antibodies, the same membranes were western blotted for MAPK (lower panels). (D) 1.5×10^7 cells were stimulated with 5 μ g/ml of anti- β 1 integrin antibody (TS2/16). Cell lysates from THP-1 cells treated with wortmannin (Wort) or LY294002 (LY) prior to integrin crosslinking, were used immunoprecipitate MEK, and determined its activity by an *in vitro* kinase assay, using a kinase-defective MAPK (K-MAPK) as substrate. Lower panel is a western blot of MEK showing the same amount of protein immunoprecipitated in each determination. Data are representative of three separate experiments.

stimulation (Fig. 3A), indicating that PI 3-K is required for activation of this nuclear factor. In addition, wortmannin and also LY294002 (the other PI 3-K inhibitor) completely blocked NF- κ B translocation to the nucleus (Fig. 3B), further confirming the role of PI 3-K in integrin-mediated NF- κ B activation. Moreover, integrin crosslinking with monoclonal antibody TS2/16, clearly resulted in activation of PI 3-K (Fig. 4). Similar treatment with the anti-MHC class I antibody, W6/32, did not induce PI 3-K activation (data not shown). This response was completely blocked by the two specific PI 3-K inhibitors (Fig. 4A). It is well known that the first step in integrin signaling is the activation of tyrosine kinases (Howe et al., 1998; Rosales et al., 1995). We reasoned that PI 3-K should be downstream from tyrosine kinases in this integrin signaling pathway. In order to confirm this idea, THP-1 cells were treated with 30 μ g/ml Piceatannol, a specific inhibitor of Syk tyrosine kinase, for 1 hour at 4°C prior to integrin crosslinking. Piceatannol inhibited integrin-mediated PI 3-K activation (Fig. 4B) further supporting previous findings that point to Syk as an initial tyrosine kinase in integrin signaling in monocytes (Lin et al., 1995). These results indicated that β 1 integrin signaling in monocytic cells initiates with tyrosine

kinases and then activates PI 3-K, which in turn is required for NF- κ B activation.

PI 3-K is required for integrin-mediated MAPK activation

In order to identify some molecules downstream from PI 3-K in this integrin signaling pathway, we looked at the effect of wortmannin and LY294002 on the pattern of tyrosine phosphorylated proteins after integrin crosslinking. Several proteins were phosphorylated in tyrosine residues after integrin engagement in THP-1 cells. Predominantly proteins with molecular weights of approximately 40, 120, 150 and 170 kDa were detected. Both wortmannin (Fig. 5A) and LY294002 (Fig. 5B) reduced the level of tyrosine phosphorylation of some proteins. Mainly, the ones around 40 and 120 kDa. Because, the band of approximately 40 kDa could be MAPK, we decided to directly look at the activation of this kinase in response to integrin engagement. THP-1 cells showed activation of MAPK after β 1 integrins were crosslinked with specific antibodies. This activation was clearly inhibited by both PI 3-K inhibitors (Fig. 6). To confirm that inhibition by the PI 3-K inhibitors was specific, we examined the effects of wortmannin and

LY294002 on MAPK activation induced by another receptor, which signals through a pathway known to be independent of

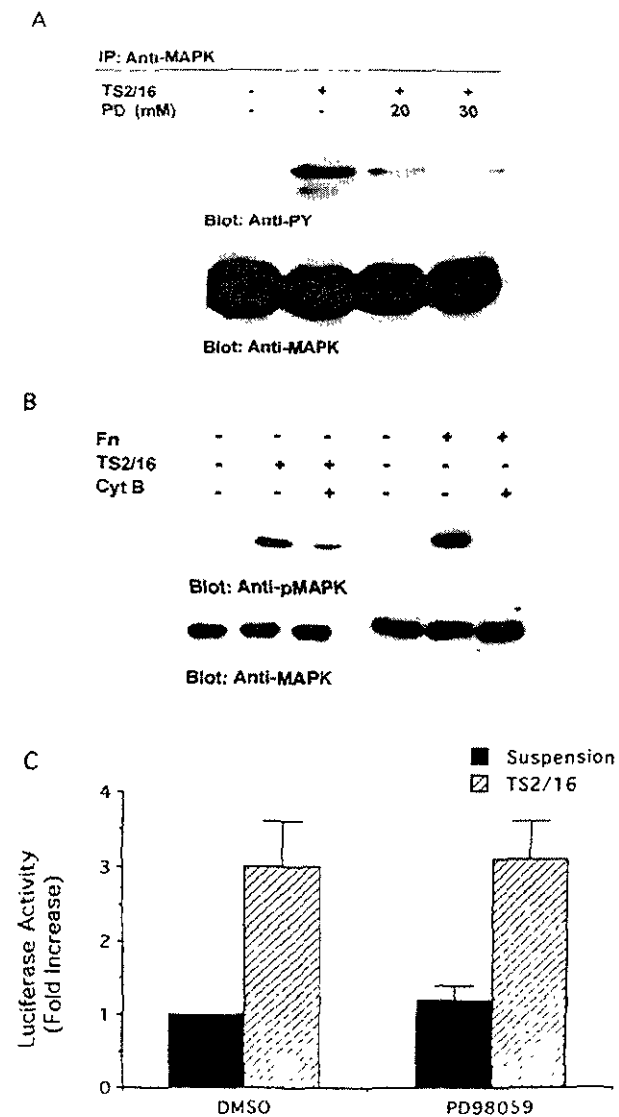


Fig. 7. MEK is required for integrin-mediated MAPK activation, but not for NF- κ B activation. THP-1 cells were left in suspension, plated on fibronectin (Fn), or stimulated with the anti- $\beta 1$ integrin monoclonal antibody TS2/16. Some cells were also treated with (A) 30 μ M PD98050 (PD) for 60 minutes, or (B) 10 μ g/ml cytochalasin B (Cyt B), prior to integrin crosslinking. After stimulation, cell lysates were prepared, MAPK immunoprecipitated, resolved by SDS-PAGE, and then western blotted for phosphotyrosine or phospho-MAPK. After stripped of bound antibodies, the same membranes were western blotted for MAPK (lower panel). Data are representative of three separate experiments. (C) THP-1 monocytic cells were transiently transfected with the NF- κ B responsive plasmid 3XMHC-luc. 24 hours after transfection cells were and left in suspension, or treated with the anti- $\beta 1$ integrin monoclonal antibody TS2/16. Before stimulation cells were treated with 30 μ M PD98059 or only the solvent (DMSO). After a 4 hour incubation, cells were lysed, and luciferase activity, representing NF- κ B activation, determined in a luminometer. Data are mean \pm s.e. of four determinations.

PI 3-K. Stimulation of THP-1 cells, in suspension with 1 μ M insulin for 10 minutes also resulted in activation of MAPK (Fig. 6C). As expected, this activation was not affected by either of the PI 3-K inhibitors. MEK (MAPK kinase) has been known for some years to be the enzyme required for MAPK activation. To test whether PI 3-K was required for MEK activation in integrin signaling in monocytes, we evaluated the

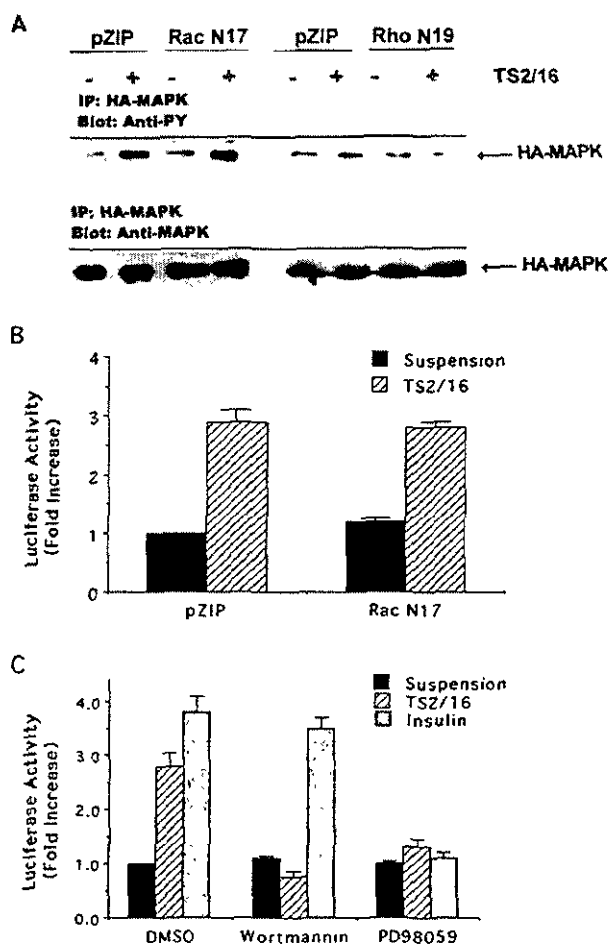


Fig. 8. Integrin-mediated MAPK activation is independent of Rac. (A) THP-1 monocytic cells, co-transfected with HA-tagged MAPK (HA-MAPK), and the dominant negative mutant Rac N17, the dominant negative mutant Rho N19, or the empty vector pZIP, were stimulated with 5 μ g/ml of anti- $\beta 1$ integrin antibody (TS2/16). After stimulation, cell lysates were prepared, HA-MAPK immunoprecipitated, resolved by SDS-PAGE, and then western blotted for phosphotyrosine. After stripped of bound antibodies, the same membranes were western blotted for MAPK (lower panel). Data are representative of three separate experiments. (B) THP-1 cells were transiently co-transfected with the Elk-1 responsive two-plasmid system Gal-Elk/5XGal-luc and the dominant negative form of Rac (Rac N17) or with the empty vector (pZIP). Cells were then left in suspension, treated with the anti- $\beta 1$ integrin monoclonal antibody TS2/16, or treated with 1 μ M insulin. (C) Cells were also pre-treated with 50 nM wortmannin, 30 μ M PD98059, or only the solvent (DMSO). After a 4 hour incubation, cells were lysed, and luciferase activity, representing Elk-1 activation, determined in a luminometer. Data are mean \pm s.e. of three determinations.

effect of the specific PI 3-K inhibitors on the activity of MEK after integrin stimulation. Crosslinking of $\beta 1$ integrins promoted an increment in MEK activity. This activation was also inhibited by wortmannin and LY294002 treatments (Fig. 6D). In addition, the specific MEK inhibitor PD98059 completely blocked integrin-mediated MAPK activation (Fig. 7). Together these results showed that PI 3-K is stimulated by integrin engagement in monocytic cells, and that PI 3-K is then required for activation of the MEK, MAPK signaling pathway.

Integrin-mediated NF- κ B activation is independent of MAPK

The results presented here, until now, indicated that the integrin signaling pathway involves PI 3-K for both NF- κ B and MAPK activation. To explore the connection between these responses, the dependence of integrin-mediated MAPK activation on the cytoskeleton was explored. MAPK activation, like NF- κ B activation, was dependent on the cytoskeleton as indicated by complete inhibition of this response by cytochalasin B (Fig. 7B). However, in THP-1 cells transfected with the NF- κ B-responsive plasmid, the MEK inhibitor PD98059 did not have any effect on integrin-mediated NF- κ B activation (Fig. 7C). Furthermore, PD98059 was also not able to block translocation of NF- κ B to the nucleus (Fig. 3B). These results showed that although the cytoskeleton and PI 3-K were needed for both NF- κ B and MAPK activation, these two responses were not connected on the same pathway downstream from PI 3-K.

Integrin-mediated activation of NF- κ B and MAPK follows distinct signaling pathways

If, NF- κ B activation and MAPK activation were really steps of separate signaling pathways, then inhibition of Rac, which is required for integrin-mediated NF- κ B activation (Fig. 2), should not have any effect on the MAPK activation induced by integrin stimulation. To confirm this idea, THP-1 cells were co-transfected with plasmids directing the expression of a HA-tagged MAPK and the dominant negative mutant form of Rac (Rac N17). After transfection, $\beta 1$ integrins were crosslinked on these cells and the activity of HA-MAPK analyzed by western blotting. As seen before, integrin engagement resulted in tyrosine phosphorylation of MAPK, and as expected, this activation was not affected by the dominant negative Rac N17 (Fig. 8A). In addition, expression of the active Rac115 in these cells did not affect integrin-mediated MAPK activation (data not shown). These results further supported the idea that integrin-mediated activation of NF- κ B is independent of MAPK and that integrin signaling is separated downstream from PI 3-K. Moreover, the GTPases Rho and Rac seemed to have opposite effects on NF- κ B activation after integrin engagement (Fig. 2). Thus, it was possible that these two signaling pathways from integrin ligation were not only separated but also in competition with each other. Expression of the dominant negative RhoN19 indeed blocked MAPK activation after integrin ligation (Fig. 8A), further supporting the idea these two pathways are working in opposite directions.

In addition, we looked at activation of the nuclear transcription factor Elk-1, which is known to be the main target of MAPK. THP-1 cells were transfected with the Ras pathway-responsive reporter system Gal-Elk/SXGal-luc, which produces luciferase upon activation of the nuclear factor

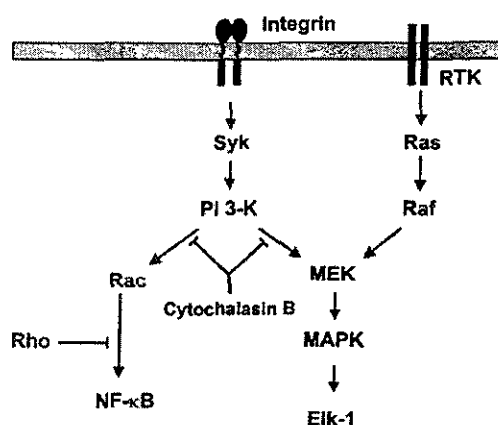


Fig. 9. Model for $\beta 1$ integrin signal transduction in monocytes. Upon stimulation $\beta 1$ integrins activate tyrosine kinases. In monocytic cells, Syk is the tyrosine kinase involved. PI 3-K is activated and then two separate signaling pathways go to the nucleus. Both pathways require a functional cytoskeleton since cytochalasin B treatment blocks them. The GTPase Rac leads to activation of the nuclear factor NF- κ B; while the MEK/MAPK pathway leads to activation of the nuclear factor Elk-1. The GTPase Rho seems to negatively regulate NF- κ B activation in a still unknown way. Receptor tyrosine kinases (RTK), such as the insulin receptor use the classical Ras pathway to activate MAPK. In THP-1 cells, the molecules Ras and Raf do not seem to be involved in integrin signaling to the nucleus (Rosales and Juliano, 1996).

Elk-1. When these cells were stimulated with anti $\beta 1$ -integrin antibodies an increase, of around threefold, in luciferase activity was observed (Fig. 8B). Co-transfection of the dominant negative mutant Rac N17 did not have any effect on this integrin-mediated response (Fig. 8B). In addition, wortmannin (PI 3-K inhibitor) treatment resulted in complete inhibition of the Elk-1 activation induced by integrin crosslinking; while the same treatment did not affect the insulin-mediated Elk-1 activation (Fig. 8C). Similarly, treatment with PD98059 (MEK inhibitor) blocked Elk-1 activation induced both by integrin crosslinking and by insulin (Fig. 8C). These results confirmed that PI 3-K and MAPK are required for integrin-mediated Elk-1 activation and that Rac is not involved in activation of this nuclear factor. Taken together, our data show that $\beta 1$ integrins, in monocytic cells, use different signaling pathways to the nucleus. Downstream from PI 3-K, Rac leads to activation of NF- κ B, while MEK and MAPK lead to activation of Elk-1 (Fig. 9).

DISCUSSION

One of the most important functions activated by integrin-mediated adhesion of myelomonocytic cells is the production of inflammatory cytokines such as IL-1, IL-8 and TNF. This means that integrin crosslinking induces transcription of the genes encoding these responses (Haskill et al., 1988; Yurochko et al., 1992). To have initiation of transcription of these genes, activation of diverse nuclear factors has to take place. Very little is known about the signal transduction pathway from integrins to transcription factors in the cell nucleus. It has been

observed that the 5' regulatory sequences of the cytokine genes induced by integrin crosslinking (IL-1, IL-8, TNF), all contain sites for the nuclear factor NF- κ B (Cogswell et al., 1994; Haskill et al., 1988; Hiscott et al., 1993). Moreover, adhesion of monocytic cells to fibronectin indeed caused NF- κ B activation, as reported earlier (Lin et al., 1995; Rosales and Juliano, 1996). We therefore reasoned that NF- κ B activation would be an ideal way for monitoring the integrin signaling pathway leading to gene induction. Initial observations have suggested that integrin signaling may use the Ras signal transduction cascade. Integrin-mediated activation, thus leads to the assembly of Grb-2-Sos complexes that then serve to activate the Ras cascade (Schlaepfer et al., 1994). In addition, in THP-1 monocytic cells, both peptide mitogens and integrin crosslinking are capable of activating MAPK, which is a known element of the Ras pathway. Despite these findings, the $\beta 1$ integrin-dependent activation of NF- κ B in monocytic cells, seems to be independent of the signaling protein Ras because, in a previous report, we found that negative mutants of this GTPase did not affect the response (Rosales and Juliano, 1996).

The involvement of Ras in integrin signaling is still controversial. Among the studies that looked directly at Ras participation in integrin signaling, the results are divided. With the aid of dominant negative mutants of Ras, some groups have found that MAPK activation by integrins requires Ras (Clark and Hynes, 1996; Schlaepfer and Hunter, 1997; Wary et al., 1996), while others have found that Ras is not involved (Chen et al., 1996; Rosales and Juliano, 1996). Recent reports, however, suggests that both parts of this issue may be correct and that the differences could be due to distinct mechanisms of integrins signaling. Raf activation by integrins occurred in two phases. Early activation of Raf required Raf-Ras interaction and was not affected by PKC inhibitors, while a lower, sustained level of activity was independent of Raf-Ras interaction and was reduced by PKC inhibitors (Howe and Juliano, 1998). So it seems that integrin signaling towards the MAPK cascade may in some instances require Ras but not in others.

Because in monocytic cells Ras does not seem to participate in integrin-mediated NF- κ B activation and because the Rho family of GTPases are well known to participate in several functional aspects of the cytoskeleton (Hall, 1998; Tapon and Hall, 1997), while integrins are receptors connected to the cytoskeleton (Howe et al., 1998), we turned our attention to other GTPases to investigate whether they might be participating in the signaling pathway to nucleus. Upon disruption of the actin cytoskeleton with cytochalasin B, NF- κ B and MAPK were no longer activated after integrin engagement. A functional relationship between NF- κ B and the cytoskeleton has also been suggested by a recent report indicating that the p65/RelA subunit of NF- κ B interacts with actin structures in rat fibroblasts (Are et al., 2000). The cytoskeleton and molecules related to it, such as the Rho family GTPases were then very likely to be involved in integrin signaling to the nucleus via MAPK and NF- κ B. We explored the participation of the GTPases Rho and Rac with the aid of dominant negative mutants of these molecules (Khosravi-far et al., 1995). The Rac negative mutant was able to block NF- κ B activation, while the oncogenic active mutant enhanced this response, indicating that Rac is involved in this signaling

pathway. In contrast, Rho negative mutant increased NF- κ B activation, while the oncogenic active mutant inhibited this response. This means that both GTPases participate in integrin signaling to NF- κ B, but they seem to do it in opposite directions. Our data show that Rac is necessary for integrin-mediated activation but they do not demonstrate that it is sufficient, as the constitutively active Rac 63L does not activate NF- κ B without integrin ligation. This suggests that although Rac is important for integrin signaling to this nuclear factor, other unidentified signals may also be required for this pathway. Although Rac is in the pathway to activate NF- κ B, Rho seems to provide a regulatory negative signal to NF- κ B. This could be a mechanism to prevent excessive activation of the nuclear factor or to turn the signal off. These results were a little surprising at first, because Rac had been reported to activate Rho (Bos, 1997); however, the connection between these GTPases is more complex than the initial cascade of activation described for them, where Cdc42 activates Rac and this one, then activates Rho (Bos, 1997). Clearly, Rac and Rho can regulate each other giving opposite responses (Schoenwaelder and Burridge, 1999). If the effects of Rho were really responsible for terminating the signal to activate NF- κ B, then Rho should be turned on after Rac, and this could be seen as a feedback control mechanism. We do not have information on the time these GTPases are activated after integrin stimulation. Determining the kinetics of activation of these GTPases may help us to understand their exact role in NF- κ B activation.

Because products of the enzyme PI 3-K have been shown to bind several GTPases (Tolias et al., 1995; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997) and also to activate Rac (Akasaki et al., 1999; Han et al., 1998; Hawkins et al., 1995; Parker, 1995), we looked whether PI 3-K participated in this integrin pathway. Integrin crosslinking on monocytic cells also resulted in activation of PI 3-K. This response and NF- κ B activation were both efficiently blocked by the specific inhibitors of PI 3-K. In addition, it is well accepted that the initial step in signaling from all integrins is the activation of tyrosine kinases. Integrins do not have any enzymatic activity by themselves, but have been found associated with many other proteins upon activation. Piceatannol, a specific Syk inhibitor also inhibited integrin-mediated PI 3-K activation further, supporting previous findings that point to Syk as an initial tyrosine kinase in integrin signaling in monocytes (Lin et al., 1995; Miller et al., 1999). Thus Syk, PI 3-K and Rac are clearly in the integrin signaling pathway to the nucleus.

Data discussed above clearly show that $\beta 1$ integrins, in monocytic cells, activate a signal transduction pathway that is distinct from the classical MAPK cascade. However, it is well established that MAPK is activated upon integrin crosslinking. So, there seemed to be a discrepancy between the general consensus about integrin signaling, via the MAPK cascade, and our results on integrin-mediated NF- κ B activation, via Syk, PI 3-K and Rac. MAPK activation was indeed dependent on PI 3-K, as both wortmannin and LY294002 completely blocked it. These inhibitors did not have any effect on MAPK activation induced by the insulin receptor, which uses the classical Ras, Raf, MEK, MAPK pathway (Lee-Kwon et al., 1998; Waters et al., 1996). Clearly, PI 3-K is an important molecule in integrin signaling in monocytic cells and it seems to be required for both NF- κ B and MAPK activation. However, our results also

suggest that although PI 3-K is needed for these two responses they did not follow the same pathway downstream of PI 3-K. Because PI 3-K has been reported to be able to activate Rac (Akasaki et al., 1999; Han et al., 1998; Hawkins et al., 1995; Parker, 1995) and also the MAPK cascade (King et al., 1997; Perkinson et al., 1999), it is thus very likely that separate signaling pathways were turned on after integrin-mediated PI 3-K activation in monocytic cells.

In order to confirm that distinct signaling pathways were in use downstream from PI 3-K, we looked at activation of a different nuclear transcription factor. Elk-1 is the main target of MAPK (Hill et al., 1993; Marshall, 1994), and as expected, integrin crosslinking also induced activation of this nuclear factor. This activation was clearly dependent on the well established MEK, MAPK pathway, as the specific MEK inhibitor PD98059 (Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995) completely blocked both MAPK activation and Elk-1 activation. In contrast, PD98059 did not affect integrin-dependent NF- κ B activation. In addition, the dominant negative mutant of Rac (Rac N17), which inhibited NF- κ B activation, was neither able to inhibit integrin-mediated MAPK activation nor Elk-1 activation. Clearly, inhibition of the Rac pathway blocked NF- κ B activation, but it did not affect Elk-1 activation. Conversely, inhibition of the MEK, MAPK, pathway did not affect NF- κ B activation, but efficiently blocked Elk-1 activation. These results demonstrate that two distinct pathways are used by β 1 integrins in monocytic cells to deliver signals into the nucleus. It remains to be determined whether this is only the case for β 1 integrins and monocytic cells. However, we have preliminary data indicating that β 2 integrins also cause activation of MAPK and NF- κ B via different pathways.

Moreover, these two pathways seem to be competing with each other. Inhibition of Rho by the dominant negative mutant Rho N19 enhanced NF- κ B activation and at the same time reduced MAPK activation. Thus, it seems that while Rac is used on the pathway leading to NF- κ B activation, Rho is used to regulate both pathways by blocking the NF- κ B pathway and enhancing the MAPK pathway. The mechanism by which this GTPase is able to regulate β 1 integrin signaling in monocytic cells remains unknown. Rho may control these pathways via the cytoskeleton, which is needed for both pathways. One possibility is that Rho regulates the actin fibers to form the proper scaffolding where either Rac or MAPK may be activated after PI 3-K.

Together these data strongly suggest that integrin engagement on monocytic cells leads to activation of the transcription factors NF- κ B and Elk-1. However, these nuclear factors are activated through distinct signaling pathways. One pathway uses PI 3-K and leads through the GTPase Rac to NF- κ B; while another pathway uses PI 3-K to activate the MEK, MAPK, Elk-1 pathway (Fig. 9).

We thank Dr John Westwick and Dr David A. Brenner (University of North Carolina at Chapel Hill, NC) for generously donating the 3XMHC-luc, Gal-Elk and 5XGal-luc plasmids, and Dr Martin Hemler (Dana Farber Cancer Research Institute, Boston, MA) for the TS2/16 antibody. We also thank Dr Channing Der (University of North Carolina at Chapel Hill, NC) for the Rho and Rac constructs, Dr Mike Weber (University of Virginia, Charlottesville, VA) for the HA-MAPK, Dr Rudy Juliano (University of North Carolina at Chapel Hill, NC, USA) for the K-MAPK and Dr Pascal Héron (IIB-UNAM,

Mexico City, Mexico) for the phage M13/T7. We are also grateful to Yuriria Vazquez for purifying the K-MAPK protein, and to Griselda Mendoza-Milla and Lucia N. López-Bojorquez for helping with the electrophoretic mobility shift assays. This work was supported by grant IN201797 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and by grant 31088-M from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico.

REFERENCES

- Akasaki, T., Koga, H. and Sumimoto, H. (1999). Phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent activation of the small GTPase Rac2 in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **274**, 18055-18059.
- Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T. and Saltiel, A. R. (1995). PD 98059 is a specific inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **270**, 27489-27494.
- Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K. and Juliano, R. L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* **50**, 197-263.
- Are, A. F., Galkin, V. E., Pospelova, T. V. and Pinaev, G. P. (2000). The p65/RelA subunit of NF- κ B interacts with actin-containing structures. *Exp. Cell Res.* **256**, 533-544.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. P., Seidman, J. C., Smith, J. A. and Struhl, K. (1994). In *Current Protocols in Molecular Biology* (ed F. M. Ausubel), Chapter 9.1. New York: John Wiley & Sons.
- Bos, J. L. (1997). Ras-like GTPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1333**, 19-31.
- Carpenter, C. L. and Cantley, L. C. (1996). Phosphoinositide kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 153-158.
- Chen, Q., Kinch, M. S., Lin, T. H., Burrridge, K. and Juliano, R. L. (1994). Integrin mediated cell adhesion activates MAP kinases. *J. Biol. Chem.* **269**, 26602-26605.
- Chen, Q., Lin, T. H., Der, C. J. and Juliano, R. L. (1996). Integrin-mediated activation of MEK and mitogen-activated protein kinase is independent of Ras. *J. Biol. Chem.* **271**, 18122-18127.
- Clark, E. A. and Hynes, R. O. (1996). Ras activation is necessary for integrin-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and cytosolic phospholipase A2 but not for cytoskeletal organization. *J. Biol. Chem.* **271**, 14814-14818.
- Cogswell, J. P., Godlevski, M. M., Wisely, G. B., Clay, W. C., Leesnitzer, L. M., Ways, J. P. and Gray, J. G. (1994). NF- κ B regulates IL-1 β transcription through a consensus NF- κ B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J. Immunol.* **153**, 712-723.
- Dbaibo, G. S., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. (1993). Tumor necrosis factor- α (TNF- α) signal transduction through ceramide. Dissociation of growth inhibitory effects of the TNF- α from activation of nuclear factor- κ B. *J. Biol. Chem.* **268**, 17762-17766.
- Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J. and Saltiel, A. R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7686-7689.
- Franke, T. F., Yang, S.-I., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., Kaplan, D. R. and Tsichlis, P. N. (1995). The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **81**, 1-20.
- Gardner, A. M., Lange-Carter, C. A., Vaillancourt, R. R. and Johnson, G. L. (1994). Measuring activation of kinases in mitogen-activated protein kinase regulatory network. *Methods Enzymol.* **238**, 258-270.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514.
- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R. D., Krishna, U. M., Falck, J. R., White, M. A. and Broek, D. (1998). Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* **279**, 558-560.
- Harian, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S. and Fesik, S. W. (1994). Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **371**, 168-170.
- Haskill, S., Beg, A. A., Tompkins, S. M., Morris, J. S., Yurochko, A. D., Sampson-Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P. and Baldwin, A. S. J. (1991). Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I κ B-like activity. *Cell* **65**, 1281-1289.

- Haskill, S., Johnson, C., Eierman, D., Becker, S. and Warren, K. (1988) Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes. *J. Immunol.* **140**, 1690-1694.
- Hauser, C. A., Westwick, J. K. and Quilliam, L. A. (1995). Ras-mediated transcription activation: analysis by transient transfection assays. *Methods Enzymol.* **255**, 412-426.
- Hawkins, P. T., Eguinoa, A., Qiu, R.-G., Stokoe, D., Cooke, F. T., Walters, R., Wennstrom, S., Claesson-Welsh, L., Evans, T., Symons, M. et al. (1995). PDGF stimulates an increase in GTP-rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr. Biol.* **5**, 393-403.
- Hill, C. S., Marais, R., John, S., Wynne, J., Dalton, S. and Treisman, R. (1993) Functional analysis of a growth factor-responsive transcription factor complex. *Cell* **73**, 395-406.
- Hiscott, J., Marois, J., Garoufalidis, J., D'Addario, M., Roulston, A., Kwan, I., Pepin, N., Lacoste, J., Nguyen, H., Bensi, G. et al. (1993). Characterization of a functional NF- κ B site in the human interleukin β promoter: Evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6231-6240.
- Howe, A., Aplin, A. E., Alahari, S. K. and Juliano, R. L. (1998). Integrin signaling and cell growth control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 220-231.
- Howe, A. K. and Juliano, R. L. (1998). Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of integrin-mediated activation of the Raf/MEK/Mitogen-activated protein kinase cascade. *J. Biol. Chem.* **273**, 27268-27274.
- Juliano, R. L. and Haskill, S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell. Biol.* **120**, 577-585.
- Khosravi-far, R., Solski, P. A., Clark, G. J., Kinch, M. S. and Channing, D. J. (1995). Activation of Rac-1, RhoA, and Mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6443-6453.
- King, W. G., Mattaliano, M. D., Chan, T. O., Tschlis, P. N. and Brugge, J. S. (1997). Phosphatidyl 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4406-4418.
- Lee-Kwon, W., Park, D. and Bernier, M. (1998). Involvement of the Ras/extracellular signal-regulated kinase signalling pathway in the regulation of ERCC-1 mRNA levels by insulin. *Biochem. J.* **331**, 591-597.
- Leevers, S. J., Vanhaesebroeck, B. and Waterfield, M. D. (1999). Signaling through phosphoinositide 3-kinase: the lipids take centre stage. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 219-225.
- Lin, T. H., Yurochko, A., Kornberg, L., Morris, J., Walker, J. J., Haskill, S. and Juliano, R. L. (1994) The role of protein tyrosine phosphorylation in integrin-mediated gene induction in monocytes. *J. Cell Biol.* **126**, 1585-1593.
- Lin, T. H., Rosales, C., Mondal, K., Bolen, J. B., Haskill, S. and Juliano, R. L. (1995). Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in a monocytic cell line. A possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 16189-16197.
- Marshall, C. J. (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase, and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 82-89.
- Miller, L. A., Hong, J. J., Kinch, M. S., Harrison, M. L. and Geahlen, R. L. (1999). The engagement of $\beta 1$ integrins on promonocytic cells promotes phosphorylation of Syk and formation of a protein complex containing Lyn and $\beta 1$ integrin. *Eur. J. Immunol.* **29**, 1426-1434.
- Nobes, C. D. and Hall, A. (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.
- Parker, P. J. (1995). PI 3-kinase puts GTP on the Rac. *Curr. Biol.* **5**, 577-579.
- Perkinton, M. S., Sihra, T. S. and Williams, R. J. (1999). Ca^{2+} -permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. *J. Neurosci.* **19**, 5861-5874.
- Rosales, C. and Juliano, R. L. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J. Leukocyte Biol.* **57**, 189-198.
- Rosales, C. and Juliano, R. (1996). Integrin signaling to NF- κ B in monocytic leukemia cells is blocked by activated oncogenes. *Cancer Res.* **56**, 2302-2305.
- Rosales, C., O'Brien, V., Kornberg, L. and Juliano, R. L. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1242**, 77-98.
- Ruoslahti, E. and Reed, J. C. (1994) Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* **77**, 477-478.
- Sánchez-Mejorada, G. and Rosales, C. (1998). Fc γ receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras. *J. Biol. Chem.* **273**, 27610-27619.
- Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T. and van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by Grb2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372**, 786-791.
- Schlaepfer, D. D. and Hunter, T. (1997). Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J. Biol. Chem.* **272**, 13189-13195.
- Schoenwaelder, S. M. and Burridge, K. (1999). Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 274-286.
- Shimizu, Y. and Hunt III, S. W. (1996). Regulating integrin-mediated adhesion: one more function for PI 3-kinase? *Immunol. Today* **17**, 565-573.
- Tapon, N. and Hall, A. (1997). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 86-92.
- Toker, A., Meyer, M., Reddy, K. K., Falck, J. R., Aneja, R., Aneja, S., Parra, A., Burns, D. J., Ballas, L. M. and Cantley, L. C. (1994). Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PI-3,4-P₂ and PI-3,4,5-P₃. *J. Biol. Chem.* **269**, 32358-32367.
- Tolias, K. F., Cantley, L. C. and Carpenter, C. L. (1995). Rho-family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 17656-17659.
- Ui, M., Okada, T., Hazeki, K. and Hazeki, O. (1995). Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 303-307.
- Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, D. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**, 2295-2322.
- Wary, K. K., Mainiero, F., Isakoff, S. J., Marcantonio, E. E. and Giancotti, F. G. (1996). The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* **87**, 733-743.
- Waters, S. B., Chen, D., Kao, A. W., Okada, S., Holt, K. H. and Pessin, J. E. (1996). Insulin and epidermal growth factor receptors regulate distinct pools of Grb-2-SOS in the control of Ras activation. *J. Biol. Chem.* **271**, 18224-18230.
- Yurochko, A. D., Liu, D. W., Eierman, D. and Haskill, S. (1992). Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9034-9038.