

03062
7
201

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y Posgrado del C. C. H.

EXPRESION DE PROTO-ONCOGENES CELULARES EN RESPUESTA
A HORMONAS EN HEPATOCITOS DE RATA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
LIBB. CLAUDIA GONZALEZ ESPINOSA

MEXICO, D.F.

1992



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 está 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.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
-Mecanismos de acción hormonal	2
-Regulación de la transcripción génica mediada por esteroides	12
-Regulación de la transcripción génica por factores de crecimiento	15
-Regulación de la transcripción génica por sistemas que involucran la acción de segundos mensajeros	21
ANTECEDENTES	26
-Regulación hormonal de la transcripción en hígado ...	27
OBJETIVO	29
RESUMEN DE RESULTADOS	30
ARTICULO PUBLICADO	33
DISCUSION	39
CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS	48

INTRODUCCION

Cada animal multicelular con reproducción sexual es una clona que desciende de una sola célula original: el huevo fertilizado. De esta forma, se puede afirmar que todas las células del organismo son, de manera general, idénticas. Sin embargo, es obvio que fenotípicamente son distintas: algunas están especializadas como células musculares, otras como neuronas, otras como células hepáticas, otras como células plasmáticas, o células del hueso, etc. (1).

Los diferentes tipos celulares están arreglados con base en un patrón de organización preciso y la estructura final posee una forma bien definida. La apariencia y el metabolismo de cada tipo están determinados por la secuencia de DNA en su genoma. Cada célula actúa según las mismas instrucciones, pero las interpreta con cambios en el tiempo y según las circunstancias, de tal suerte que manifiesta y comparte sus características especiales con el resto de la sociedad multicelular (2).

Los organismos multicelulares son muy complejos, pero están contruidos a partir de un limitado repertorio de actividades celulares. Las células crecen y se dividen. Mueren. Apagan o encienden la producción de ciertas moléculas codificadas por sus genomas, presentan algún tipo de movimiento u orientación y secretan o muestran en su superficie, mensajeros químicos que modifican las actividades metabólicas o la división de sus vecinas (3).

En el estudio de la regulación genética en los eucariontes durante su desarrollo embrionario, se ha llegado a la conclusión de que la expresión secuencial y ordenada de los genes está pre-programada; de tal suerte que por lo general, los genes no pueden encenderse de un modo distinto a la manera establecida. Usualmente, ésta cascada de expresión génica conduce a la diferenciación irreversible de la célula.

Sin embargo, una vez que las células se han diferenciado en tejidos y órganos complejos, se inicia la regulación de la expresión de proteínas de mantenimiento además de la síntesis de productos que son indispensables y característicos de cada tejido. Gracias a la síntesis e intercambio adecuado de éstos productos, un organismo mantiene su integridad, su metabolismo y su capacidad para defenderse del medio externo y utilizarlo para su nutrición y sobrevivencia (4).

Para estudiar a este nuevo grupo de genes (inducibles reversiblemente en la mayoría de los casos), se utilizan modelos de células ya diferenciadas, tejidos obtenidos a partir de órganos de animales maduros, y hasta los organismos completos. Algunas estrategias experimentales para estudiar cómo responde una célula a los estímulos externos o al paso del tiempo, sin que

ésto involucre una diferenciación irreversible, son la perfusión del órgano completo con soluciones de composición conocida, la disociación del órgano con colagenasa o tripsina para estudios de células aisladas y el cultivo celular en medios controlados.

Los factores externos que son capaces de modular tanto el metabolismo como la expresión diferencial de genes, desencadenando procesos coordinados de varias células, involucrando modificaciones a corto plazo (como la activación de la glucogenólisis o la despolarización de la membrana), y a largo plazo (como la duplicación celular, el desarrollo embrionario y posiblemente la memoria), son las **hormonas** (5).

Las células reciben información de su entorno gracias a moléculas hidrofóbicas o hidrofílicas presentes en el medio que las rodea. Tales sustancias pueden ser hormonas, neurotransmisores, moléculas de matriz extracelular o de la superficie de células vecinas. Por convención, éstas moléculas extracelulares se llaman "primeros mensajeros". Por su naturaleza química pueden dividirse en **esteroides** (como la testosterona y el estradiol), **prostaglandinas** (como la PGE1 y la PGE2), **hormonas peptídicas** (como la vasopresina, la angiotensina y el factor de crecimiento epidérmico), y **aminas**, que incluyen a los aminoácidos y a los derivados del metabolismo de los aminoácidos (como la glicina, el ácido glutámico, la epinefrina, la histamina y las hormonas tiroideas), ver la figura 1.

MECANISMOS DE ACCION HORMONAL

Los elementos y eventos moleculares involucrados en el paso de la señal hormonal desde el exterior hasta el interior de la célula, que garantizan el paso fidedigno del mensaje, su amplificación y su efecto en el metabolismo y o división de la célula blanco se conoce como el **sistema de transducción** de esa hormona (6).

Los sistemas de transducción más estudiados hasta el momento son:

I. El sistema que acopla la unión del agonista con su receptor, a la apertura directa de un canal iónico que forma parte estructural de la molécula receptora (7). Este sistema es el que media la transmisión de muchos mensajes a través de neurotransmisores. A este tipo de canales se les llama "canales regulados por ligando" y algunos ejemplos son el receptor nicotínico de la acetilcolina, el receptor GABA del ácido gama-aminobutírico, canales de calcio activados por potasio y canales modulados por nucleótidos. Después que el agonista se une al receptor, en fracciones de segundo se inicia el flujo iónico que provoca cambios en la polaridad de la membrana celular, ocasionando modificaciones en la liberación de neurotransmisor en la terminal pre-sináptica. La respuesta celular es extremadamente rápida.

Hormones	Site of Origin	Structure	Major Effects
<i>Proteins and Glycoproteins</i> Insulin	beta cells of pancreas	protein α-chain = 21 amino acids β-chain = 30 amino acids	utilization of carbohydrate (including uptake of glucose into cells); stimulation of protein synthesis; stimulation of lipid synthesis in fat cells
Somatotropin (growth hormone)	anterior pituitary	protein 191 amino acids	stimulation of liver to produce somatomedins, which in turn cause growth of muscle and bone
Somatomedins	liver	proteins	growth of bone and muscle; influences metabolism of Ca^{2+} , phosphate, carbohydrate, and lipid
Adrenocorticotrophic hormone (ACTH)	anterior pituitary	protein 39 amino acids	stimulation of adrenal cortex to produce cortisol; fatty acid release from fat cells
Parathormone	parathyroid	protein 84 amino acids	increase in bone resorption, thereby increasing blood Ca^{2+} and phosphate; increase in resorption of Ca^{2+} and Mg^{2+} and decrease in resorption of phosphate in kidney tubules
Follicle-stimulating hormone (FSH)	anterior pituitary	glycoprotein α-chain = 92 amino acids β-chain = 118 amino acids	stimulation of ovarian follicles to grow and secrete estradiol; stimulation of spermatogenesis in testis
Luteinizing hormone (LH)	anterior pituitary	glycoprotein α-chain = 92 amino acids β-chain = 115 amino acids	stimulation of oocyte maturation and ovulation and progesterone secretion from ovary; stimulation of testis to produce testosterone
Epidermal growth factor	unknown	53 amino acids	stimulation of epidermal and other cells to divide
Thyroid-stimulating hormone (TSH)	anterior pituitary	glycoprotein α-chain = 92 amino acids β-chain = 112 amino acids	stimulation of thyroid to produce thyroxine; fatty acid release from fat cells
<i>Small Peptides</i> TSH-releasing factor	hypothalamus	3 amino acids	stimulation of anterior pituitary to secrete thyroid-stimulating hormone (TSH)

FIGURA 1. DESCRIPCION DE LOS PRINCIPALES TIPOS DE HORMONAS.
En esta figura, se presenta un resumen de la estructura, sitio de síntesis y efectos más importantes de algunos mensajeros químicos. Este esquema fue obtenido de la referencia 1.

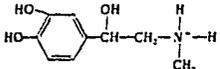
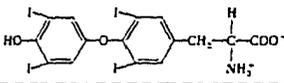
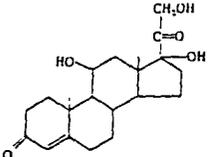
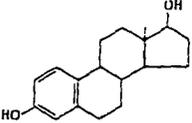
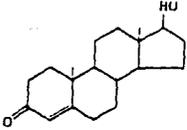
Hormones	Site of Origin	Structure	Major Effects
LH-releasing factor	hypothalamus	10 amino acids	stimulation of anterior pituitary to secrete luteinizing hormone (LH)
Vasopressin	posterior pituitary	9 amino acids	elevation of blood pressure by constriction of small blood vessels; increase in water resorption in kidney tubules
Somatostatin	hypothalamus	14 amino acids	inhibition of somatotropin release from anterior pituitary
<i>Amino Acid Derivatives</i> Epinephrine	adrenal medulla		increase in blood pressure and heart rate; increase in glycogenolysis in liver and muscle; fatty acid release from fat cells
Thyroxine	thyroid		increase in metabolic activity in most cells
<i>Steroids</i> Cortisol	adrenal cortex		affect on metabolism of proteins, carbohydrates and lipids; suppression of inflammatory reactions
Estradiol	ovary, placenta		development and maintenance of secondary female sex characteristics; maturation and cyclic function of accessory sex organs; development of duct system in mammary glands
Testosterone	testis		development and maintenance of secondary male sex characteristics; maturation and normal function of accessory sex organs

FIGURA 1. CONTINUACION

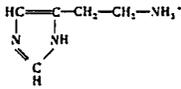
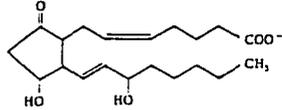
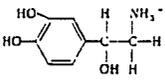
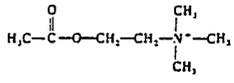
Local Chemical Mediators	Site of Origin	Structure	Major Effects
Proteins			
Nerve growth factor	all tissues innervated by sympathetic nerves	2 identical chains of 118 amino acids	survival and growth of sensory and sympathetic neurons
Small Peptides			
Eosinophil chemotactic factor	mast cells	4 amino acids	chemotactic signal for a special type of white blood cell (eosinophilic leukocytes)
Amino Acid Derivatives			
Histamine	mast cells		causes blood vessels to dilate and become leaky
Fatty Acid Derivatives			
Prostaglandin E ₂	many different cell types		contraction of smooth muscle
Neurotransmitters*			
Amino Acids and Related Compounds			
Glycine	nerve terminals	${}^-\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	Inhibitory transmitter in central nervous system
Norepinephrine	nerve terminals		excitatory and inhibitory transmitter in central and peripheral nervous system
γ-Aminobutyric acid (GABA)	nerve terminals	${}^-\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	Inhibitory transmitter in central nervous system
Acetylcholine	nerve terminals		excitatory transmitter at neuromuscular junction; excitatory and inhibitory transmitter in central and peripheral nervous system
Small Peptides			
Enkephalin	nerve terminals	5 amino acids	morphine-like action Inhibits pain pathways in central nervous system

FIGURA 1. CONTINUACION

II. El sistema en el cual se activa directamente una proteína amplificadora, que produce un "segundo mensajero" intracelular. Es el caso de factor natriurético auricular, que se acopla con un receptor con actividad enzimática de guanilato ciclasa (8). Esta enzima cataliza la producción de GMP cíclico a partir de GTP. La actividad catalítica del receptor permite amplificar la señal inmediatamente después de interactuar con el agonista y no necesita ninguna proteína mediadora.

III. El sistema que involucra la unión del agonista con su receptor, la activación de una proteína transdutora (proteína G), y la apertura de un canal iónico que es una entidad, distinta al receptor y que se abre al interactuar con la subunidad alfa de la proteína G activada (9) (figura 2). Algunos ejemplos de éste sistema son los canales de potasio activados por la subunidad alfa de G_{i3}. Esta proteína G se disocia gracias a la interacción del receptor muscarínico de acetilcolina cuando éste tiene unido un ligando. G_{i3} también puede acoplar la estimulación del receptor para ATP en células de músculo de conejo, con la apertura de canales de potasio. La respuesta en el flujo iónico no es tan rápida como en I, pero aún así, la liberación del neurotransmisor adecuado se lleva a cabo en unos cuantos milisegundos.

IV. El sistema donde el receptor posee una actividad enzimática de cinasa de tirosinas en un dominio situado en la porción intracelular (10). Este receptor, al ser activado por el primer mensajero (generalmente factores de crecimiento), inicia la propagación de la señal al activar una cascada de fosforilaciones y desfosforilaciones en proteínas intracelulares. Los factores de crecimiento, como veremos más adelante, tienen acciones a corto y a largo plazo.

V. El sistema de transducción donde el receptor contiene una actividad intrínseca también, pero de fosfatasa de tirosinas. Este sistema es el menos estudiado hasta la fecha, pero se tiene evidencia directa de que juega un papel fundamental en la transducción de señales y procesamiento de antígenos en el sistema inmune. La proteína CD45, marcadora de linfocitos, posee una actividad de fosfatasa de tirosinas al ser estimulada por la unión de anticuerpos (figura 3). Se desconoce el significado de la defosforilación promovida por CD45, pero tal vez también se tengan efectos a corto y a largo plazo (11).

VI. El sistema de la **adenilato ciclasa**, llamado así porque la molécula amplificadora de la señal es una enzima transmembranal que genera como un segundo mensajero (12) al AMP cíclico. En este sistema, el ligando se une a un receptor transmembranal induciendo un cambio conformacional de tal manera, que ahora el receptor puede interactuar con una proteína fijadora de nucleótidos de guanina (proteína G). Esta interacción produce la disociación de la proteína G (13) y la subunidad alfa de ésta provoca la activación de la adenilato ciclasa, que forma AMP cíclico a partir de ATP.

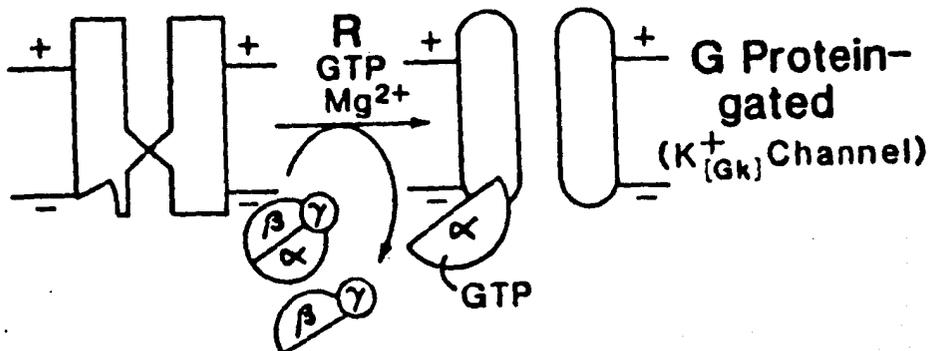


FIGURA 2. ACTIVACION DE CANALES IONICOS POR PROTEINAS G. Se muestra que las proteínas G son heterotriméricas (están formadas por una subunidad alfa, una beta y una gama). Al activarse un receptor por la unión con el neurotransmisor, se provoca un cambio conformacional que es transmitido a la G; ésta recambia GDP por GTP, se disocia el complejo beta-gama de la subunidad alfa, y ésta última se acopla al canal iónico correspondiente, permitiendo su apertura. El esquema fue tomado de Brown, A.M., y Birbaumer, L. (1988). *Am. J. Physiol.* 254:H401-410.

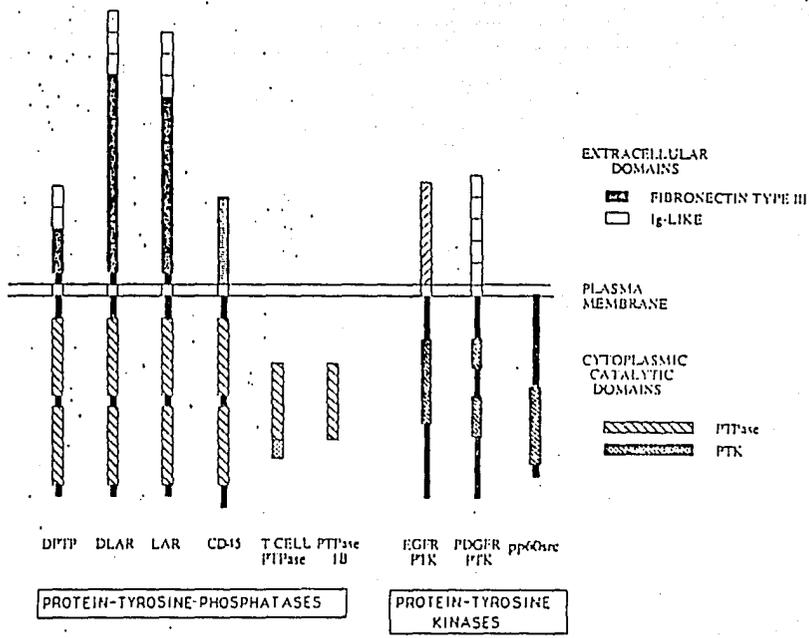


FIGURA 3. COMPARACION DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS RECEPTORES CON ACITIVIDAD DE CINASAS DE TIROSINA Y DE FOSFATASAS DE TIROSINA. Este esquema fue tomado de la referencia 11.

En este caso, el AMP cíclico ocasiona la activación de una cinasa específica: la proteína cinasa A (PKA), la cual fosforila en serinas y treoninas a un grupo numeroso de enzimas causando cambios globales y rápidos en el metabolismo celular. Este sistema puede inducirse o inhibirse según el agonista presente, ya que hay receptores acoplados de manera estimuladora (por Gs) o de manera inhibidora (por Gi) a la ciclasa (figura 4).

Experimentalmente, se pueden mimetizar los efectos de la estimulación de la ciclasa por varios agentes como la forskolina ó el dibutiliril AMP cíclico. Una vez que se estimula la PKA, se fosforilan varias proteínas dentro de las cuales está la glucógeno fosforilasa cinasa. Esta última fosforila a la glucógeno fosforilasa y se inicia el proceso de glucogenólisis en hígado. La acción de los agonistas sobre la glucógeno fosforilasa tiene un máximo después de un minuto de estimulación (14).

VII. El sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio. En éste sistema, la unión de la hormona con el receptor ocasiona también la activación de una proteína G que al disociarse, activa a la fosfolipasa C, enzima membranaral que rompe el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato y produce dos segundos mensajeros: el inositol trifosfato (IP3) y el diacilglicerol (DAG) (15).

El IP3 se une a un receptor específico en el retículo endoplásmico y produce una elevación en la concentración de calcio intracelular. El DAG, por su lado, activa a una cinasa específica llamada proteína cinasa C (PKC), que fosforila en serinas y treoninas a varios péptidos ocasionando otro paso en la amplificación del mensaje de la hormona (figura 5).

El sistema de recambio de IP3-calcio, se activa por hormonas que actúan a corto plazo como la epinefrina (vía receptores alfa 1 adrenérgicos) (16), la vasopresina (17), la angiotensina II (18), la trombina (19), la acetilcolina (vía receptores muscarínicos), etc. y puede estudiarse con cierto detalle gracias a la utilización de ionóforos de calcio (como el A23187) y activadores de la PKC, como los ésteres de forbol (19).

Una característica especial de este sistema es la existencia de múltiples isoformas de la PKC que se expresan en forma diferente en cada tipo celular y en el tiempo. Estudios de clonación génica, así como estudios bioquímicos han revelado que la PKC existe como una familia de múltiples subespecies con estructuras estrechamente relacionadas entre sí. Hasta la fecha, se han identificado 8 subespecies de PKC: alfa, beta I, beta II, gama, delta, épsilon, zeta y nu. Las subespecies beta I y beta II derivan de un solo gene, cuyo RNA se procesa diferencialmente. Todas las subespecies de PKC poseen diferencias en su modo de activación, propiedades cinéticas y especificidad por el sustrato (20).

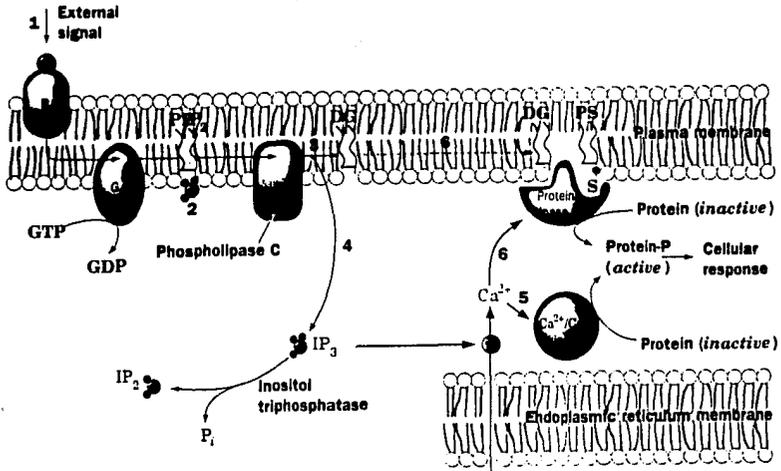


FIGURA 5. SISTEMA DE RECAMBIO DE FOSFOINOSITIDOS-CALCIO.

En este caso, el receptor para la hormona activa a la proteína G y ésta a la Fosfolipasa C, la cual hidroliza a un fosfolípido de membrana (el fosfatidil inositol 4, 5 bifosfato) para dar dos segundos mensajeros: el Inositol trifosfato (IP₃) y el Diacilglicerol (DAG). El IP₃ provoca la liberación de calcio de depósitos intracelulares y el DAG activa a una familia de proteínas conocidas con el nombre genérico de Proteína Cinasa C. Para estudiar este sistema, se poseen ionóforos de calcio, como el A23187, (para simular el incremento de calcio en citosol) y activadores de la proteína cinasa C, como los ésteres de forbol, (para estimular solamente la cascada de fosforilaciones por PKC). Esta figura fue obtenida de Voet, J. y Voet A., (1990) "Biochemistry" John Wiley and Sons. USA.

VIII. El sistema de transducción de los esteroides, donde el primer mensajero, que es hidrofóbico, penetra libremente a las células, uniéndose con su receptor que es citoplásmico. Al llevarse a cabo esta unión, el complejo hormona-receptor viaja al núcleo donde se une a elementos reguladores de la expresión genética: elementos cis que se encuentran hacia el 5' de los promotores de varios genes (figura 6) (21).

Las hormonas en general, pueden actuar induciendo cambios químicos importantes a nivel de la membrana plasmática y el citosol de las células blanco, sin embargo, algunas pueden acoplar los cambios en membrana y citosol a la diferenciación celular, la duplicación y la expresión dirigida de proteínas específicas.

Sabemos que cualquier o todas las etapas en la vía desde el DNA hasta la proteína puede estar sujeta a regulación. En principio, la expresión génica puede estar controlada en 1) el inicio de la transcripción del gene (control transcripcional), 2) el procesamiento del RNA inmaduro (control de procesamiento), 3) selección de cuáles RNAs maduros son exportados hasta el citoplasma (control de transporte), 4) selección de cuáles RNAs son traducidos en el citosol (control traduccional) ó, 5) la estabilización diferencial de los RNAs que se encuentran fuera del núcleo (control por degradación), ver figura 7.

Hasta hace muy poco, sólo algunos sistemas de transducción estaban relacionados directamente con la transcripción genética: el de los esteroides y el de los factores de crecimiento.

REGULACION DE LA TRANSCRIPCION GENETICA INDUCIDA POR HORMONAS ESTEROIDES

Los glucocorticoides son el ejemplo mas documentado de la expresión genética mediada por hormonas (22). Los efectos de los glucocorticoides han sido analizados por el uso de una hormona sintética llamada dexametasona. El hecho de tener esta hormona marcada ha permitido la localización de receptores y estudios de enlazamiento, además de estudios in vitro de transcripción de genes blanco. Los glucocorticoides actúan uniéndose primero a una proteína receptora de localización citoplásmica. Una vez que se unen el receptor y la hormona, el complejo se transporta hasta el núcleo y se une a secuencias específicas de DNA que se llaman elementos de respuesta a glucocorticoides (GRES) (23).

En ausencia de la hormona, la proteína receptora se asocia con otra proteína citoplásmica, HSP90, y tiene baja afinidad por el DNA. La evidencia actual parece indicar que la proteína citoplásmica asociada al receptor previene la formación de un

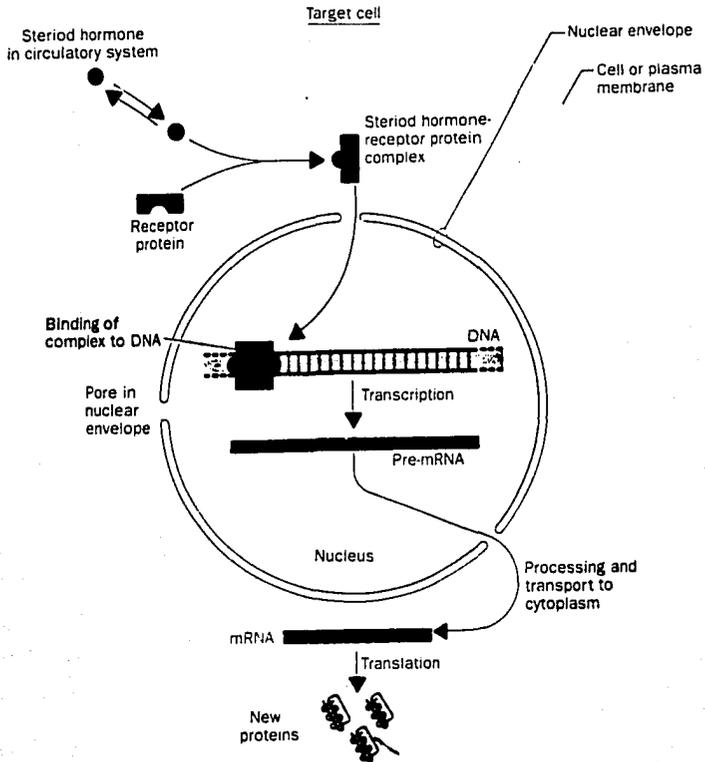


FIGURA 6. SISTEMA DE TRANSDUCCION DE HORMONAS ESTEROIDES.

En el caso de mensajeros hidrofóbicos como los esteroides, los receptores hormonales se encuentran en el citosol de la célula blanco. Se unen a la hormona, se dimerizan y viajan al núcleo donde directamente activan la transcripción de ciertos genes que desencadenan respuestas a largo plazo. Este esquema fue tomado de la referencia 2.

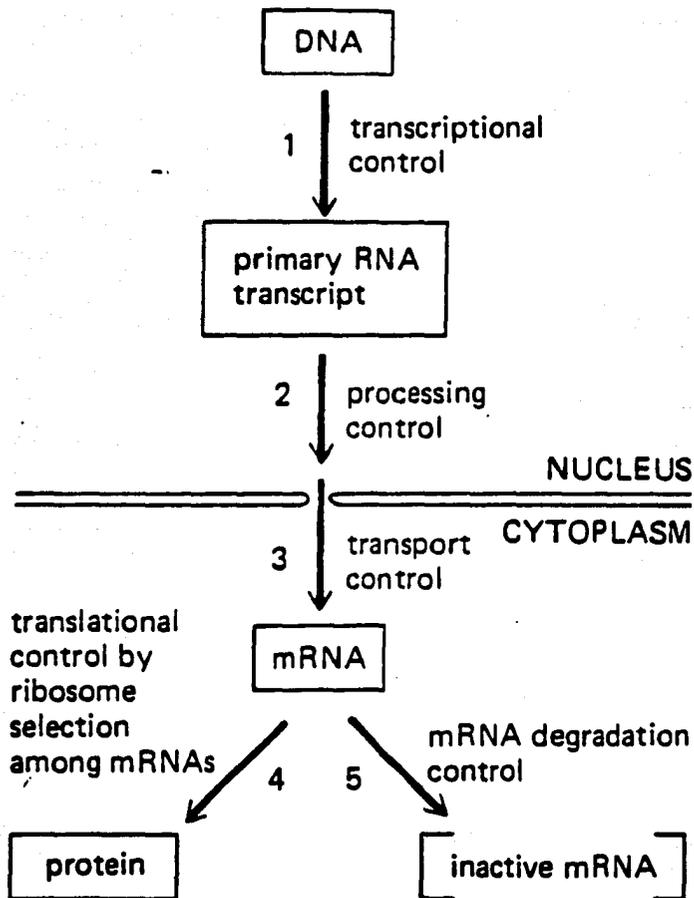


FIGURA 7. DIAGRAMA MOSTRANDO CINCO DIFERENTES NIVELES EN LOS CUALES PUEDE SER CONTROLADA LA EXPRESION GENETICA EN LOS EUCARIONTES.

dímero, el cual es la forma activa del receptor. Presumiblemente, la unión de la hormona causa un cambio conformacional en la proteína receptora así que no puede unirse más a la proteína citoplásmica. De este modo, el receptor ahora puede dimerizarse y volverse activo, ver la figura 8.

El complejo glucocorticoide-receptor activa la transcripción uniéndose a secuencias GRE en los sitios "aumentadores" de la transcripción de un gene ("enhancers"), localizados a diferentes distancias del gene inducible. Esta unión activa al promotor del gene en cuestión (25). Existen varios modelos para explicar la acción a distancia de los "enhancers", pero hasta la fecha no se tiene la respuesta definitiva aún.

Los elementos de respuesta a la hormona (HREs) que son capaces de fijar diferentes complejos hormona-receptor deben estar localizados específicamente, además de tener secuencias especiales para distinguir los complejos con una hormona o con otra. Por ejemplo, el HRE para glucocorticoides tiene esta secuencia: 5' -GGTACANNNTGTTGT- 3'(26), el HRE para estrógenos tiene la secuencia 5'-GGTCANNNTG-3'(27), y el HRE para hormonas tiroideas es 5'-CAGGGACGTGACCGCA-3' (28).

La estructura de los receptores para los esteroides está muy conservada. Las regiones N de las proteínas receptoras son las mas variables y las regiones centrales son muy conservadas porque allí se encuentran los sitios de unión a DNA. Las regiones C terminales contienen los dominios que unen a la hormona y éstas se conservan medianamente (29).

Una hormona esteroide dada, activa la expresión de genes particulares en ciertas células blanco y sin embargo, muchos de los detalles de tal inducción y sobre todo, de la regulación de la respuesta dada por cada célula permanece sin conocerse. En el estudio del sistema de los esteroides, los efectos en la transcripción génica se observan a largo plazo, digamos de 6 a 48 horas en células en cultivo (30). Sin embargo, también puede haber transcripción específica inducida al poco tiempo. Los responsables de tal inducción son mensajeros químicos que se unen a receptores con actividad de cinasas de tirosinas: los factores de crecimiento.

REGULACION DE LA TRANSCRIPCION GENETICA POR FACTORES DE CRECIMIENTO

La exposición de las células a un grupo de sustancias colectivamente llamadas mitógenos, lleva a que muchas de ellas, bloqueadas en la fase G1 del ciclo celular, entren en división.

Algunos mitógenos son los llamados factores de crecimiento y están presentes en el suero normal teniendo las funciones de mediadores fisiológicos de la replicación celular.

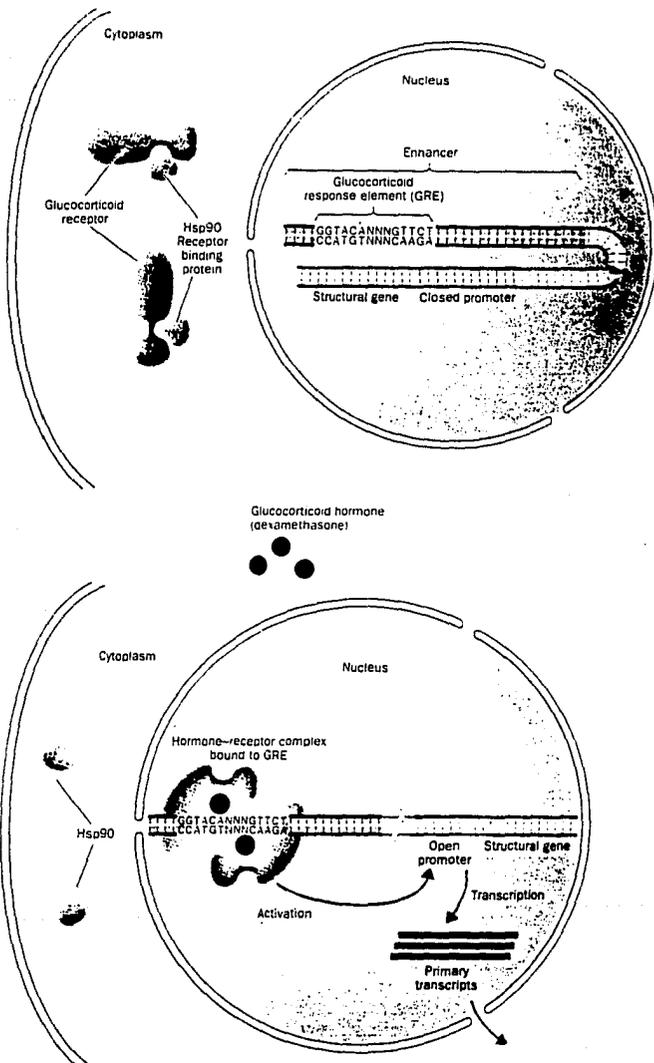


FIGURA 6. ESTA ES UNA REPRESENTACION DE LOS PASOS DE ACTIVACION DE UN RECEPTOR PARA GLUCOCORTICOIDES. Mientras no se encuentra unido a la hormona, interactúa con una proteína llamada HSP 90 (por Heat Shock Protein of 90 kD). Una vez que se une a la hormona, el receptor se dimeriza y ya no puede unirse a HSP 90. Se transloca hasta el núcleo y activa la transcripción. Esquema obtenido de la referencia 2.

La mayor parte de los factores de crecimiento son proteínas con pesos moleculares de 1 a 40 kilodaltones (ver tabla I). Para un factor de crecimiento dado, el número de receptores varía desde 5,000 hasta 500, 000. Algunos de estos receptores poseen una actividad de tirosina-cinasas y una topología bastante similar. Poseen un enorme y glucosilado dominio extracelular, responsable de fijar la hormona; tienen también una sola región transmembranal hidrofóbica y un dominio citoplásmico que contiene la región catalítica, con actividad enzimática (31). Por su conformación, éstas cinasa de tirosina pueden verse como enzimas alostéricas ancladas a la membrana. A diferencia de las enzimas citoplásmicas, el dominio de unión a ligando y el de actividad catalítica están separados por la membrana plasmática así que la activación del receptor involucra que la señal sea transducida a través del segmento transmembranal, ver la figura 9.

Con base en la similitud de secuencia y diferentes características estructurales, es posible clasificar a estos receptores en subclases (figura 10). La **subclase I** está formada por receptores que conservan dos secuencias repetidas ricas en cisteínas en el dominio extracelular del receptor. Estos son monoméricos y un ejemplo clásico es el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (32). La **subclase II** está formada por receptores heterotetaméricos con estructura 2 alfa y 2 beta. Tienen también secuencias repetidas ricas en cisteínas (33), como los de la subclase I. El receptor para la insulina es el ejemplo mas representativo de ésta familia. La **subclase III** (34) contiene receptores con cinco secuencias repetidas muy similares a las inmunoglobulinas en los dominios extracelulares, como ejemplo (35) citaremos al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). La **subclase IV** contiene receptores con tres secuencias repetidas como las inmunoglobulinas, siendo muy similares a los de la subclase III, tal es el caso del receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (35).

La unión del ligando con su receptor provoca la dimerización de los receptores monoméricos o un cambio conformacional en los de la subclase II. Esto ocasiona una activación del dominio de cinasa de tirosinas y provoca la autofosforilación del receptor además de la fosforilación de algunas proteínas celulares. Recordemos que la mayor parte de las fosforilaciones que ocurren en las proteínas celulares se llevan a cabo en residuos de serina o de treonina. Se ha probado (por lo menos para la insulina), que la fosforilación en tirosinas de algunas serín-treonín cinasas (36) provoca la activación de éstas últimas y así, la cascada de fosforilaciones puede ser mayor que la inicial y puede tener otro significado fisiológico para la célula.

Los factores de crecimiento ocasionan muchas respuestas celulares. Estas incluyen la estimulación del intercambiador Na H, entrada de calcio, activación de la fosfolipasa C y la estimulación del transporte de glucosa y de aminoácidos (37). Recordemos que la fosfolipasa C lleva a la generación de los segundos mensajeros IP₃ y DAG, liberando calcio del retículo

Name	Structure	Biological Properties
PDGF (platelet-derived growth factor)	Two disulfide-bonded chains; glycoprotein	Mitogen for cultured cells of mesenchymal origin; repair of vascular system in vivo
EGF (epidermal growth factor)	53 amino acids (preproEGF 1200 amino acids)	Mitogen for cells of ectodermal and mesodermal origin; role in early development in vivo?
TGF- α (transforming growth factor)	50 amino acids; (preproTGF- α 160 amino acids); homology with EGF	Mitogen like EGF but can make normal cells grow in agar; binds to EGF receptor; high levels in some cancer cells
TGF- β (transforming growth factor)	Homodimer of MW 25,000; no homology with TGF- α or EGF	Mitogen for some cells, growth inhibitor for others; stimulates growth in agar; synergy with TGF- α
NGF (nerve growth factor)	Two identical β chains of 118 amino acids; low homology to insulin	Development and maintenance of sympathetic and embryonic neurones
IGF-I (insulin-like growth factor-I; somatomedin C)	70 amino acids (preproIGF-I 130 amino acids); 45% homology with insulin	Intermediate in the action of growth hormone; skeletal elongation; mitogen for cells in vitro
IGF-II (insulin-like growth factor-II)	67 amino acids (preproIGF-II 180 amino acids); homology with insulin	In vivo role uncertain
GH (growth hormone; somatotropin)	191 amino acids	Synthesized in anterior pituitary; stimulates liver to produce somatomedins
GHRF (growth hormone releasing factor; somatoliberin)	44 amino acids (precursor about 100 amino acids)	Hypothalamic peptide; regulates synthesis of growth hormone in the pituitary
Insulin	Two disulfide-bonded chains; A is 21 amino acids, B is 30 amino acids; A, B cleaved from preproinsulin of 110 amino acids	Stimulates glucose uptake, protein synthesis, and lipid synthesis; can be mistaken for growth factor in vitro

TABLA I. Descripción de los principales factores de crecimiento reportados hasta la fecha. Todos están acoplados a la acción de receptores con actividad de cinasa de tirosinas. Tabla obtenida de la ref. 5.

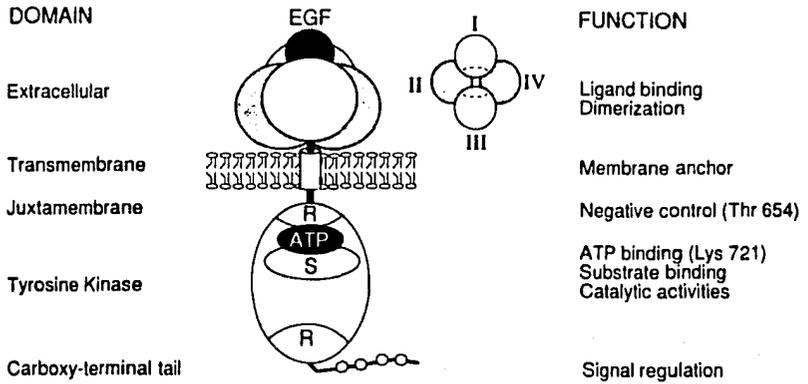


FIGURA 9. ESQUEMA REPRESENTANDO LA ESTRUCTURA DEL RECEPTOR PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO. Este receptor es también una cinasa de tirosinas. Estudios de mutagénesis dirigida y construcción de proteínas quiméricas, han arrojado información acerca de la estructura y función de este receptor. En este dibujo, obtenido de la referencia 10, pueden apreciarse los dominios funcionales más importantes de ésta molécula.

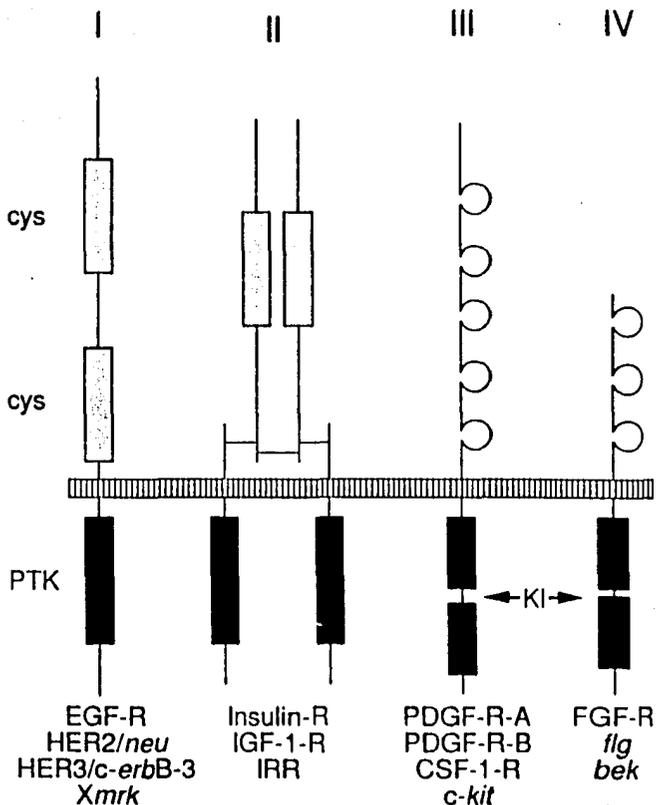


FIGURA 10. ESQUEMA CON LAS ESTRUCTURAS GENERALES DE LAS CUATRO FAMILIAS CON ACTIVIDAD DE CINASAS DE TIROSINA. Puede observarse que en la parte baja de cada modelo, aparecen los nombres de los receptores pertenecientes a cada subclase. PTK indica el dominio de cinasa de tirosinas y KI muestra una secuencia de inserción en las subclases III y IV, la cual interrumpe el dominio de cinasa sin alterar su actividad. Esquema obtenido de la referencia 35.

endoplásmico y activando a la proteína cinasa C (figura 11). De esta forma, se puede suponer que el sistema de transducción de recambio de fosfoinosítidos-calcio (que también utilizan hormonas como la vasopresina, la angiotensina y la epinefrina), pueden mimetizar algunas acciones de los factores de crecimiento.

La tabla II muestra algunas de las respuestas observadas en fibroblastos tratados con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Algunos efectos son **inmediatos**, siendo detectables en segundos o minutos después de añadir el factor. Estos cambios incluyen flujos iónicos rápidos, redistribuciones de citoesqueleto, fosforilación de proteínas, cambios en el metabolismo de lípidos de membrana y alteraciones en la maquinaria de la síntesis de proteínas. Otros efectos son llamados **tempranos** porque se pueden medir después de la primera media hora de incubación con el agente. Estos efectos involucran la expresión genética y la síntesis de nuevas proteínas (38).

REGULACION DE LA TRANSCRIPCION GENETICA POR SISTEMAS QUE INVOLUCRAN LA ACCION DE SEGUNDOS MENSAJEROS

Como ya se revisó, el modo de acción de las hormonas con receptores en la membrana plasmática normalmente involucra la producción de segundos mensajeros en el interior de la célula. Por regla general, estas hormonas ejercen sus efectos sobre el metabolismo de la célula en tiempos muy cortos (desde milisegundos hasta 5 o 10 minutos).

El primer sistema donde se describió la inducción de la transcripción genética por una hormona con receptor en la membrana plasmática fue un cultivo de células de la glándula mamaria de la rata (39). Primero se demostró que el RNA de la caseína se induce en respuesta a prolactina. La inducción se llevó a cabo después de 6 días con un tratamiento combinado de insulina, prolactina y cortisol. Después (40) se probó en un explante de glándula mamaria que la prolactina sola es capaz, en una hora, de incrementar el mRNA de la caseína. Se demostró que la hidrocortisona no es necesaria para la inducción, pero sí se requiere para la máxima acumulación del mRNA en el citosol. El trabajo hecho en 1978 fue la primera demostración de un incremento rápido de RNA en respuesta a una hormona peptídica.

Además de estudiar la influencia de la prolactina en el incremento de la transcripción en cultivo celular, se averiguó la contribución de los eventos postranscripcionales en la acción de la prolactina (41), encontrándose que en la primera hora, se incrementa la transcripción del gene de la caseína de 2 a 4 veces. Sin embargo, ésta transcripción incrementada no es suficiente para explicar la acumulación tan rápida del mRNA. Midiendo la vida media del mensajero, se sabe ahora que se incrementa de 17 a 25 veces en presencia de prolactina. Así, en 1979 se tuvo la primera evidencia de que la modulación de la

Immediate Events: 1-10 min and/or
Transcription-Independent

Early Events: 30-180 min and/or
Transcription-Dependent

- | | |
|--|---|
| 1. Tyrosine-specific phosphorylations | 1. PDGF can be removed from culture medium and cells still divide |
| 2. Inhibition of EGF binding | 2. Acquisition of intracellular signal as shown by cell fusion |
| 3. Inhibition of guinea pig insulin binding | 3. Induction of rare gene sequences encoding low-abundance mRNAs |
| 4. Stimulation of phospholipase A ₂ and prostaglandin release | 4. Appearance of rare cytoplasmic proteins |
| 5. Stimulation of polysome formation | 5. Stimulation of somatomedin binding |
| 6. Stimulation of phosphatidylinositol turnover | 6. Increase in low-density lipoprotein receptor content |
| 7. Reorganization of actin filaments | 7. Stimulation of amino acid A transport system |
-

SOURCE: C. D. Stiles, "The Molecular Biology of Platelet-Derived Growth Factor," *Cell* 33 (1983):653-655.

TABLA II. Todos los factores de crecimiento tienen la capacidad de activar respuestas a corto y a largo plazo. Tabla de la referencia 5.

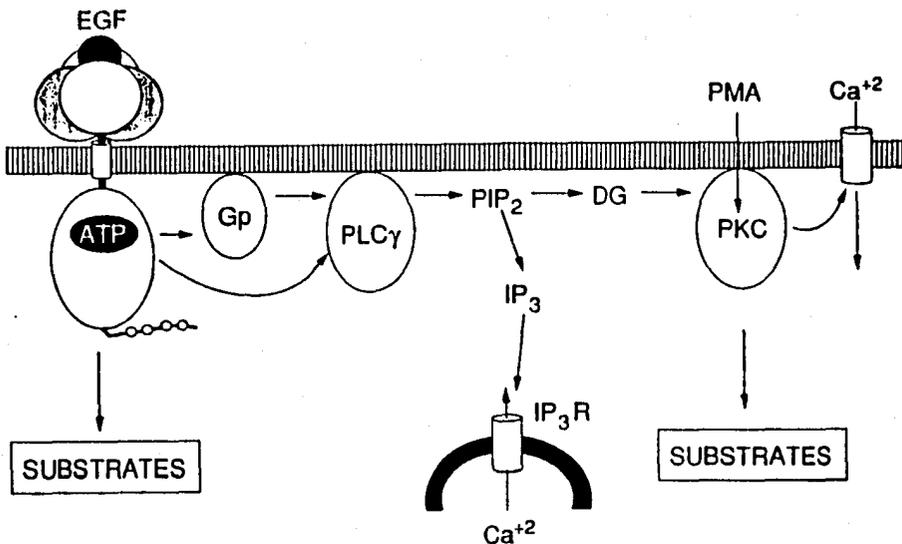


FIGURA 11. VIA DE ACTIVACION DEL SISTEMA DE RECAMBIO DE FOSFOINOSITIDOS -CALCIO POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO. Se ha demostrado que muchos factores de crecimiento provocan cambios a corto plazo activando a elementos de otros sistemas de transducción. Tal es el caso del receptor para EGF, que es capaz de fosforilar a la fosfolipasa C gamma, induciendo el recambio de fosfoinositidos y llevando a la liberación de calcio. Este tipo de conexiones, hicieron pensar que la respuesta mitogénica podría darse también con hormonas que actuaran a tiempos cortos.

estabilidad de los mRNA puede ser promovida por una hormona cuyos efectos eran principalmente a corto plazo.

Desde la exploración inicial de los genes inducidos por prolactina, han aparecido algunos otros ejemplos en diferentes tejidos donde algunas hormonas moduladores del metabolismo "rápido" pueden inducir cambios en la transcripción genética.

La enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) sirve como un modelo interesante para expresión por múltiples hormonas. Esta proteína se induce por glucocorticoides, los cuales incrementan la transcripción y la vida media del mensajero (42). Similarmente, el AMP cíclico también incrementa la transcripción de la PEPCK en hepatoma. Por su lado, en hepatoma también, la insulina inhibe la transcripción específicamente de la enzima cayendo hasta la mitad en los primeros 15 minutos (43).

Los genes de tirotropina y prolactina son activados por la hormona liberadora de tirotropina (TRH) en la pituitaria anterior. Se observa el máximo de estimulación a los 30 minutos y el mensajero se mantiene hasta los 60 minutos de exposición con el agonista (44). Se sabe también que los ésteres de forbol (activadores de la PKC) y el AMP cíclico inducen también el mensajero de la prolactina en estas células.

La exploración de la transcripción genética mediada por hormonas de acción rápida recibió un gran empuje cuando se descubrió que muchos factores de crecimiento (mitógenos comprobados) activan el recambio de IP₃-calcio o a la adenilato ciclasa. Esto involucró directamente a los segundos mensajeros en el control de las actividades de división celular, surgiendo un puente entre los investigadores que trataban de explicar los mecanismos de acción hormonal y los que se dedicaban a averiguar el control de la proliferación de las células. El estudio del cancer ha abierto enormes perspectivas en este campo.

Se ha reportado que en respuesta a un estímulo hormonal rápido, en distintas células se puede activar la transcripción de un grupo de genes conocidos como "genes de respuesta inmediata". Estas secuencias se activan en muy poco tiempo de exposición al agonista (menos de 15 minutos) y alcanzan su máximo entre 10 y 30 minutos.

Dentro de esta familia de respuesta rápida se encuentran los genes c-fos y c-jun, que forman el factor de transcripción AP-1. Estos proto-oncogenes son similares a los oncogenes v-fos y v-jun aislados de retrovirus con probada capacidad de inducir división celular. Sabemos que c-fos y c-jun son dos miembros de una gran familia de protooncogenes celulares cuyos miembros están descritos en la figura 12.

La inducibilidad de estos genes está caracterizada en células transformadas (cancerosas), pero se desconoce su patrón de inducción en células normales, que tienen el gran inconveniente de no poder vivir mucho tiempo fuera del organismo

Proto-Oncogenes In The Signal Transduction Cascade

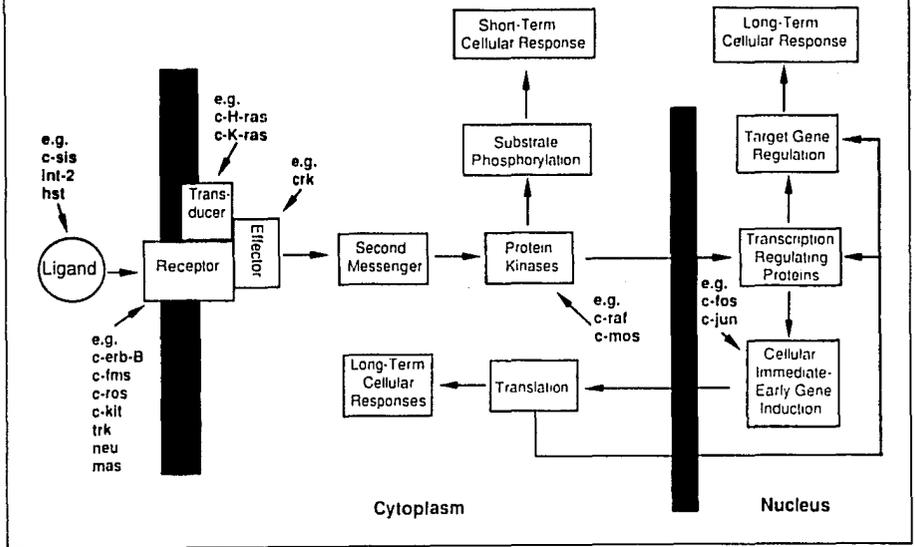


FIGURA 12. En este esquema, obtenido de la referencia 98, se muestran los componentes generales de cualquier sistema de transducción y se señalan también los oncogenes aislados que son copias truncadas o desreguladas de las proteínas normales. Como se aprecia, se han aislado oncogenes que codifican para varios elementos del sistema, lo que indica su importante participación en el mantenimiento del ciclo celular y el control de la división. Se ha encontrado que muchos oncogenes tienen la información para proteínas que participan en los sistemas de transducción de señales a corto plazo.

completo. Además, pocas son las células normales en las que se haya hecho un número grande de estudios sobre acción hormonal, requisito necesario para intentar dilucidar la vía de inducción de c-fos u otros genes.

Así, el mejor sistema celular para estudiar la regulación de la expresión genética temprana será aquel en el que se conozcan más o menos detalladamente los sistemas de transducción, y se tenga la posibilidad de observar la expresión de genes por medio del análisis del RNA mensajero.

A N T E C E D E N T E S

El hígado es el órgano mas grande del cuerpo de todos los mamíferos. En un hombre adulto constituye aproximadamente el 2.5% del peso de su cuerpo. La organización estructural de los elementos vasculares y parenquimales del hígado está adaptada para su función especial como el guardián que se interpone entre el tracto digestivo y el resto del cuerpo. Una consecuencia de esta interposición es el manejo de grandes cantidades de nutrientes como aminoácidos, carbohidratos, lípidos, vitaminas y otras substancias que entran al organismo disueltas en el agua o en la comida. Una de las funciones más importantes del hígado involucra el tomar los sustratos del intestino y su subsecuente almacenamiento, metabolismo y distribución a la sangre y al jugo biliar. Otra función del hígado es la transformación de drogas, venenos y metabolitos endógenos : éste proceso ocurre en el citosol de sus células, retículo endoplásmico y membrana nuclear. Algunos metabolitos pueden ser tóxicos o carcinogénicos. Complejos inmunes entran al hígado desde el sistema linfático (principalmente desde el bazo); endotoxinas entran desde la flora intestinal bacteriana, etc. El hígado es cuantitativamente el sitio más efectivo para fagocitosis de material sólido, como las bacterias. Además, el hígado acomoda en su estructura esponjosa, al menos 300 mililitros de sangre en hombres adultos normales y participa en la regulación del volumen y flujo sanguíneo (46).

El hígado como órgano tiene 6 características fundamentales específicas para llevar a cabo sus funciones:

- 1) Sus células tienen funciones tanto metabólicas como exócrinas.
- 2) Tiene muy buena irrigación con sangre esplénica de la vena portal que se convierte en un sistema microvascular; los solutos biliares son reabsorbidos en el intestino y entran en la circulación enterohepática.
- 3) Tiene una arquitectura específica de células individuales para facilitar el intercambio entre la sangre y los hepatocitos.
- 4) Espacios entre los hepatocitos y la membrana basal para facilitar el intercambio.
- 5) Circulación especial para la bilis y la sangre compartamentalizando las funciones de excreción del resto de sus

actividades.

6) Actividades bioquímicas específicas de los organelos hepatocíticos y membranas para regular su metabolismo (46).

El hígado tiene distintos tipos celulares: las células endoteliales, las células de Kupffer, las células parenquimatosas (hepatocitos) y las células de almacenamiento de grasa.

En el hígado de la rata, los hepatocitos constituyen el 90% de la masa total del órgano (47).

Los hepatocitos constituyen la unidad funcional fundamental del hígado. Su función, estructura y forma depende de su posición específica en el tejido hepático, sin embargo, cada hepatocito tiene la potencialidad de tener todas las funciones. Son células en forma de polihedro con 8 o más superficies. Su diámetro varía entre 13 y 30 μm con promedio de 25 μm (47).

Los receptores hormonales encontrados en el hepatocito contienen casi todos, residuos de galactosa. El prototipo específico de hígado es el receptor de asialoglucoproteína (también llamado receptor de Aswell- Morrell) (48).

Después de que la hormona se une a su receptor, se lleva a cabo la endocitosis del mismo, fenómeno que involucra un elaborado sistema vacuolar. En este sistema, los ligandos se desprenden de sus receptores como resultado de una acidificación por bombas de protones (49); algunos receptores y hormonas, como la transferrina, regresan a la membrana plasmática. Los ligandos (como muchas hormonas peptídicas) llegan al Golgi en cuestión de minutos donde sus receptores pueden ser degradados o glucosidados para su re-utilización. Otros ligandos, como la inmunoglobulina A en ratas (50), la inulina (51) o una fracción del EGF (52) son transferidos a la bilis. Algunos ligandos hidrosolubles, como la insulina, pueden llegar a los organelos celulares sin necesidad de receptor, como si fueran hormonas esteroides. Los mecanismos de flujo de proteínas en citosol no están dilucidados por completo aún (53).

REGULACION HORMONAL DE LA TRANSCRIPCION EN HIGADO

Los hepatocitos contienen una multitud de enzimas y proteínas de secreción. Responden esencialmente a todas las hormonas listadas en la figura 1. El hígado es, entonces, un modelo ideal para estudiar los efectos hormonales sobre la transcripción.

Tanto los glucocorticoides como las hormonas tiroideas influncian de manera importante un grupo selecto de proteínas hepáticas. Por ejemplo, la síntesis hepática de tres enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos (tirosín aminotransferasa, triptofano oxigenasa y fosfoenolpiruvato carboxicinas) se estimula por el tratamiento con glucocorticoides. En estos ejemplos se sabe que las hormonas

activan la transcripción de novo de los genes.

Asimismo, el hígado es blanco para las hormonas sexuales esteroides, se sabe que la administración de este tipo de hormonas está asociado con cambios en la concentración plasmática de algunas proteínas como los factores de coagulación VII y X (54), un decremento en el inhibidor de la coagulación antitrombina (55), un incremento en lipoproteínas de muy baja densidad (56) y sustrato de renina (57), y un incremento en plasma de la globulina fijadora de tiroxina (58).

La terapia con andrógenos está asociada con distintos efectos sobre éstas proteínas y el tratamiento con estrógenos incrementa la frecuencia de tumores hepáticos (59). Lo que no se ha podido estudiar con detalle hasta ahora es cuales de éstos cambios inducidos por los esteroides están mediadas por la interacción esteroide-hepatocito y cuáles son causados por efectos indirectos de las hormonas sobre el hígado.

En hígado, los genes regulados por glucocorticoides son:

- 1) Metalotioenina (60)
- 2) Tirosín aminotransferasa (61)
- 3) Triptofano oxigenasa (62)
- 4) alfa 2 microglobulina (63)
- 5) alfa glucoproteína ácida (64)

Un ejemplo interesante de regulación de la transcripción hepática lo constituye el gene de la albúmina, donde se requieren para su activación transcripcional 1) la región TATAA (65), 2) la región CCAAT (65), 3) la región de -90 a -120 (66) y una secuencia enhancer localizada a más de 10 Kb del promotor (67). Los enhancers han sido involucrados para el control hepático de la alfa proteína fetal (68), la proteína fijadora del retinol (69) y la alfa 1 antitripsina (70).

En cuanto a la transcripción de proto oncogenes en hígado de rata, se tienen algunos estudios en el modelo de regeneración hepática (71-75). Los genes c-fos, c-myc, H y K ras, se inducen durante la regeneración del órgano. La proteína Fos se induce desde los primeros 15 minutos, c-myc a los treinta minutos, ras de 18 a 24 horas después de la lesión hepática.

Decidimos estudiar el modelo hepático por la creciente cantidad de información a nivel de sistemas de transducción de señales hormonales. Y porque, siendo un tejido tan importante, se desconocen las vías de inducción transcripcional de proto-oncogenes de respuesta temprana en condiciones normales. No se sabe cuáles son los mediadores intracelulares que activan la transcripción en respuesta a la elevación de segundos mensajeros y aún no se han caracterizado los genes regulados por los factores de transcripción como c-fos y c-jun.

La caracterización mostrada en este trabajo es uno de los pocos estudios con células hepáticas de animales normales. Los protooncogenes utilizados en el estudio fueron c-myc, c-fos, y c-mos, los cuales han sido clasificados como de inducción temprana en otros sistemas modelo. Sin embargo, la caracterización mas detallada se hizo con el proto-oncogene c-fos.

O B J E T I V O

Tratando de profundizar un poco más en los mecanismos de transducción de señales a corto plazo y la regulación de la expresión genética mediada por hormonas, decidimos estudiar, en células de hígado normal de rata, las vías de inducción de algunos protooncogenes celulares. Se probaron factores de crecimiento (como el EGF), hormonas hidrosolubles (como la epinefrina, la vasopresina y la angiotensina), activadores de la PKC (como el TPA), análogos del AMPcíclico (dBAMPC) y un ionóforo de Calcio (el A23187).

RESUMEN DE RESULTADOS

De manera general, la estrategia experimental consistió en aislar células hepáticas de rata normal por medio de una digestión por colagenasa del hígado. Las células fueron incubadas a los tiempos señalados en cada experimento con las hormonas a las dosis indicadas. Después de la incubación, se purificó el RNA total y se goteó sobre membranas de nitrocelulosa. Estas membranas se hibridaron contra fragmentos de los proto-oncogenes marcados por una reacción enzimática con la DNasa I y la DNA polimerasa en presencia de un nucleótido radiactivo (Nick Translation).

Después de lavar los filtros y exponer placas de rayos X con pantallas amplificadoras, las placas fueron analizadas en un densitómetro para cuantificar la inducción.

Los datos que a continuación se presentan constituyen la caracterización de la inducción de algunos proto-oncogenes celulares en hepatocitos de rata. Utilizamos antagonistas específicos para detectar el tipo de receptor involucrado en la respuesta para angiotensina, usamos derivados del forbol miristato acetato para estudiar el papel de la proteína cinasa C. Tratamos también a nuestras células con actinomicina D y cicloheximida, obteniendo datos que parecen indicar que la inducción del protooncogene c-fos se da, de manera importante, a nivel transcripcional.

Se presenta después de este resumen las galeras del artículo que fue aceptado para su publicación en el B. B. Acta en el mes de abril de 1992. En el artículo se describe en detalle la metodología utilizada y las estrategias experimentales. De aquí en adelante, el número de las figuras se referirá a las del artículo.

En la primera serie de experimentos (figura 1), las células fueron incubadas durante 30 minutos en ausencia (control), o en presencia de dosis óptimas de distintas hormonas, como angiotensina II, vasopresina, EGF y epinefrina. De éstas, sólo la angiotensina y el EGF provocaron una marcada inducción del mensajero de c-fos. Para tener idea del sistema de transducción involucrado en esta expresión, incubamos también con el forbol miristato acetato (PMA), que es un potente activador directo de la proteína cinasa C. En presencia de éste agente, la síntesis de c-fos se incrementó hasta tres veces su valor normal. Ni el dibutilil AMP cíclico, que es permeable en estas células, ni el A23187 que es un ionóforo de calcio, fueron capaces de inducir la síntesis del mensajero de c-fos. Como control, el RNA fue hibridado contra el cDNA del gene de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la expresión del mRNA no se vió afectada

por los tratamientos.

La respuesta de incremento en el RNA mensajero no fue específica para el proto-oncogene c-fos. Observamos (figura 2) que se induce la acumulación de otros mensajeros como la beta actina, c-mos y c-myc. Decidimos caracterizar la inducción de c-fos con mayor detalle y se realizó un análisis por Northern Blot comprobando que realmente se induce un mensajero de aproximadamente 2.1 kb, tamaño reportado para el mensajero maduro de c-fos (figura 3).

Analizando los resultados, fue interesante observar que, aunque vasopresina, angiotensina y epinefrina estimulan el sistema de recambio de IP3-calcio de manera muy similar, sólo la angiotensina II presentó capacidad para inducir el mensajero de c-fos. Este efecto parece mediado por la cinasa C dado que el PMA es, de hecho, un inductor muy bueno.

Se realizó un curso temporal (figura 4) para caracterizar el efecto de 4 PMA, angiotensina, vasopresina y epinefrina, encontrando que para PMA, el tiempo medio de inducción es de 7 minutos y para angiotensina es de 12 minutos. Vasopresina y epinefrina tuvieron un efecto muy discreto. Las dosis utilizadas en este experimento han sido caracterizadas como óptimas para otros parámetros, como la producción de IP3 (76), la activación de la fosforilasa (77) o la activación de la cinasa C (78).

Otros ésteres de forbol también provocaron la inducción de c-fos de una forma dependiente de la dosis (figura 5). Se probó un éster de forbol inactivo, el alfa forbol, y no se logró observar ninguna respuesta significativa. Realizamos también una curva dosis-respuesta para la inducción de c-fos por angiotensina y se muestra una de ellas en la figura 6. La EC 50 para angiotensina fue de 30 nM. Se realizaron también curvas dosis-respuesta para vasopresina y para epinefrina, pero no logramos ver la inducción tan marcada del mensajero (datos no mostrados).

Se han reportado dos tipos de receptores para angiotensina, a saber, los AT1 y los AT2. Los AT1 han sido involucrados en la inhibición de la adenilato ciclase y en la activación del recambio de IP3-calcio. Estos receptores son además, sensibles al antagonista no peptídico Losartán (DUP753) (79). Los AT2 parecen mediar la disminución de los niveles basales de GMP cíclico en células astrocíticas y son sensibles al antagonista no peptídico PD123177. Para distinguir qué tipo de receptor media la acción de la angiotensina sobre la estimulación de c-fos, se realizaron experimentos con dosis crecientes de los antagonistas para averiguar cuál de ellos bloqueaba la respuesta para angiotensina.

Encontramos (figura 7) que solamente el Losartán es capaz de bloquear la inducción y no así el PD123177, indicando que en el sistema de transducción está involucrado un receptor tipo AT1.

Finalmente, tratamos a las células con inhibidores de la

transcripción y de la síntesis de proteínas para tratar de distinguir a qué nivel se daba el incremento de c-fos. En la figura 8 se muestra que la preincubación con actinomicina D bloquea totalmente la inducción mediada por PMA u disminuye ostensiblemente la inducción provocada por angiotensina. Esto es una fuerte indicación de que la angiotensina II y el PMA ejercen sus efectos incrementando la síntesis de novo del mensajero de c-fos.

Cuando se trataron las células con cicloheximida, se observó una marcada inducción aún en el control. La cicloheximida provoca la acumulación del mensajero de c-fos impidiendo su degradación (80).

En presencia de cicloheximida, el PMA sigue ejerciendo sus efectos así como la angiotensina. Sin embargo, observamos que tanto la vasopresina como la epinefrina, al añadirse en presencia del inhibidor de la síntesis de proteínas, provocan una acumulación del mRNA para c-fos al doble del basal, lo que tal vez indique que estas hormonas pueden, en menor grado, inducir también al proto-oncogene por medio de mecanismos de control a nivel transcripcional.

BBAMCR 13223

Angiotensin II and active phorbol esters induce proto-oncogene expression in isolated rat hepatocytes

Claudia González-Espinosa and J. Adolfo García-Sáinz

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (México)

(Received 11 February 1992)

(Revised manuscript received 15 April 1992)

Key words: Hepatocyte; AT₁-receptor; Proto-oncogenes; Angiotensin II receptor; Phorbol ester; *c-fos*

In isolated rat hepatocytes PMA, Angiotensin II and to a lesser extent other hormones induce an early genetic response (increased expression of *c-fos*, *c-mos*, *c-myc* and β -actin) without altering the expression of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene. PMA, PDB and *O*-met-PMA, but not α -phorbol, stimulated *c-fos* expression. The effect of angiotensin II was inhibited by the AT₁ antagonist, Losartan (DuP 753) (K_i approx. 25 nM), but not by the AT₂ antagonist PD123177. Angiotensin II was much more effective than vasopressin or epinephrine in inducing proto-oncogene expression which suggests that angiotensin II receptors may exert actions in addition to those shared with the receptors for the other calcium-mobilizing hormones. The effect of PMA and angiotensin II on *c-fos* expression took place rapidly, with half times of 7 and 12 min, respectively. Actinomycin D markedly diminished basal *c-fos* expression whereas cycloheximide had the opposite effect. Actinomycin D diminished the effect of PMA and angiotensin II but it did not block them. PMA and the calcium mobilizing hormones increased *c-fos* expression above the level observed with cycloheximide alone. These data suggest that PMA and the calcium-mobilizing hormones increased both transcription of the *c-fos* gene and stabilization of the proto-oncogene mRNA.

Introduction

Extracellular molecules, such as many hormones, neurotransmitters and growth factors, in addition to their metabolic effects, exert prominent actions modulating cellular growth and differentiation [1-3]. In many instances, such actions involve their interaction with receptors, located in the plasma membrane, activation of transmembrane signal transduction processes, generation of intracellular signals or second messengers and activation/inhibition of protein kinases and phosphatases [1-3]. One of the earliest effects elicited by many of these hormones and growth factors is the induction of the early gene expression family, which includes among its members several proto-oncogenes such as *c-fos*. The induction of this proto-oncogene is one of the best characterized examples of early response in many cells; its product is a 39 kDa protein which, together with the *c-jun* protein, constitutes the AP-1 transcription factor that participates in the expression of many other genes in response to activation

of protein kinase C, increases in cytosol $[Ca^{2+}]$ or stimulation of adenylate cyclase [1-3].

The transcription of *c-fos* can be stimulated by different stimuli depending of the cell studied. For example, it can be induced by ATP in endothelial cells [4], NGF and EGF in PC12 cells [5], muscarinic agonists in astrocytoma cells [6], PDGF in fibroblasts [7], TNF in the adipogenic TA1 cell line [8], angiotensin II in aortic smooth muscle cells [9] and α - and β -adrenoceptors in myocardial cells [10].

Hepatocytes are fully differentiated cells that seldom divide in the normal intact animal. However, they actively proliferate during liver regeneration, carcinogenesis or even when the hepatic tissue is disrupted; under all these conditions an induction of *c-fos* has been observed [11-13]. We addressed the question as to whether proto-oncogene expression could be stimulated by hormones in these cells. It was observed that basal proto-oncogene expression is stimulated by the cell isolation procedure and it can be further increased by PMA, angiotensin II and to a lesser extent by other hormones. The characterization of the effects of these agents, the type of angiotensin receptor involved and the actions of actinomycin D and cycloheximide are here presented.

Correspondence to: J.A. García-Sáinz, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ap. Postal 70-248, 04510 México D.F.

Materials and Methods

Angiotensin II, vasopressin, epinephrine, dibutyryl cyclic AMP (But₂cAMP), A23187, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), phorbol 12,13-dibutyrate (PDB), phorbol 12-myristate 13-acetate-4-O-methyl ether (*O*-met-PMA), actinomycin D, cycloheximide, Mops, tRNA (yeast) and rRNA (rabbit liver) were obtained from Sigma. Losartan (DuP 753) and PD 123177 were generously provided by DuPont. Agarose, nitrocellulose membranes and ethidium bromide were from Bio-Rad. Amprobe *c-fos* and *c-myc*, [α -³²P]dCTP (6000 Ci/mmol) and the 'nick translation' kit were from Amersham. Restriction enzymes were from Bio-labs.

Experiments were performed with female Wistar rats (220–250 g) fed ad libitum. Hepatocytes were isolated by collagenase digestion [14,15] and were incubated (100–150 mg wet weight) in 1 ml of Krebs-Ringer bicarbonate buffer under an atmosphere of 95% O₂, 5% CO₂ (pH 7.4) at 37°C in a water bath shaker.

Cells were incubated for 30 min (or the times indicated) in the presence or absence of the agents to be tested; after this, the cells were frozen in an ethanol/dry ice bath to stop the reaction. Total RNA was extracted using phenol and precipitated with ethanol as described [16]. RNA (50–100 μ g) was spotted onto nitrocellulose filters and hybridized under high stringency conditions [16] with 50% formamide. After hybridization, the membranes were washed three times in 2 \times SSC (150 mM sodium chloride, 15 mM sodium citrate, pH 7.4), 0.1% SDS for 5 min at room temperature; twice in 0.1 \times SSC, 0.1% SDS at 50°C for 15 min and twice with 0.1 \times SSC at room temperature for 5 min.

Gene specific DNA probes were ³²P-labeled by nick translation to a specific activity > 10⁷ cpm/ μ g. In all the experiments 500 ng of radioactive probe were used for the hybridization. After the washes the filters were autoradiographed 3–10 days at –70°C. Care was taken that the films were within their linear range of sensitivity and were scanned using a LKB densitometer. In the figures, the mean \pm S.E. of 3–5 experiments is presented and the photograph of a representative film is also included.

Hybridization probes were as follows: human *c-fos* probe was the 408 bp *EcoRI-PstI* fragment of Amprobe *c-fos*; human *c-myc* was the 1.5 kb *EcoRI-HindIII* fragment of Amprobe *c-myc*; human *c-mos* probe was the 2.7 kb *EcoRI* fragment of the pHM2A plasmid; chicken β -actin probe was the *PvuII* fragment of a cDNA clone in pGM-3 [17]; for control experiments the cDNA clone of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [18] was used.

To perform the Northern blot analysis of *c-fos* transcripts, 100 μ g of total RNA were subjected to elec-

trophoresis in a 1.5% agarose gel with 17% formaldehyde; electrophoresis and electrotransfer were performed using standard conditions [16].

Results

In preliminary experiments we observed stimulation of *c-fos* expression at 30 min of incubation, therefore, the effect of several hormones and activators of protein kinases were tested at this time and the data are presented in Fig. 1. It can be observed that *c-fos* expression was clearly stimulated by PMA and angiotensin II; EGF, vasopressin and epinephrine also stimulated *c-fos* expression but their effects were much smaller, But₂cAMP and A23187 were without effect (Fig. 1). The expression of the GAPDH gene was not significantly altered by any of these agents (Fig. 1). Interestingly, the effect of PMA and angiotensin II on gene expression was not exclusive for *c-fos* but common to other genes of the early response, such as *c-myc*, *c-mos* and β -actin (Fig. 2); vasopressin induced very small effects.

In all the following experiments we concentrated on *c-fos* expression. Northern blot analysis showed *c-fos*-specific mRNA transcripts of 2.2 kb (Fig. 3); marked stimulations by PMA and angiotensin II and much smaller effects of vasopressin and epinephrine were observed (Fig. 3).

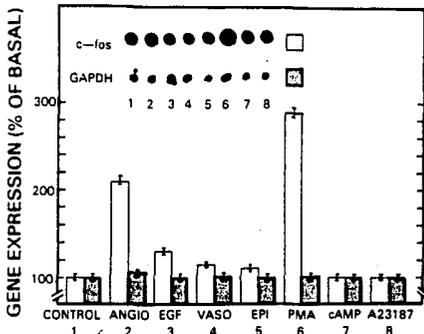


Fig. 1. Effect of hormones and activators of protein kinases on gene expression in isolated rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated for 30 min in the absence (Control, 1) or presence of 100 nM angiotensin II (ANGIO, 2); 10 nM epidermal growth factor (EGF, 3); 10 nM vasopressin (VASO, 4); 10 μ M epinephrine (EPI, 5); 1 μ M PMA (PMA, 6); 10 μ M But₂cAMP (cAMP, 7) or 10 μ M A23187 (A23187, 8). Total RNA was isolated and subjected to dot blot hybridization using *c-fos*- or GAPDH-specific DNA probes. Results are expressed as percentage of basal expression. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E. of the densitometric determinations of 3–6 experiments using different cell preparations. Inset shows a representative experiment.

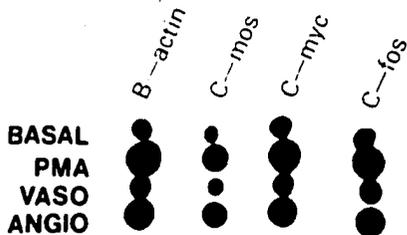


Fig. 2. Effect of PMA, vasopressin and angiotensin II on proto-oncogene expression. Hepatocytes were incubated for 30 min in the absence (Basal) or presence of $1 \mu\text{M}$ PMA, 10 nM vasopressin (VASO) or 100 nM angiotensin II (ANGIO). Total RNA was isolated and subjected to dot blot analysis using β -actin-, *c-mos*-, *c-myc*- or *c-fos*-specific DNA probes. Inset shows a representative experiment of 3 performed with identical results.

The time-course of *c-fos* expression is presented in Fig. 4. In agreement with a previous report [13], the expression of *c-fos* increased after cells isolation (Fig. 4). PMA further increased the expression of this oncogene; its effect took place very rapidly (half-time approx. 7 min) reaching its maximum (3-fold increase in expression) at 30 min and remaining at this level for further 60 min (Fig. 4). Angiotensin II induced a 2.5-fold increase in *c-fos* expression; its action took place a little more slowly (half-time of maximal expression 12 min) than that of PMA (Fig. 4). Vasopressin and

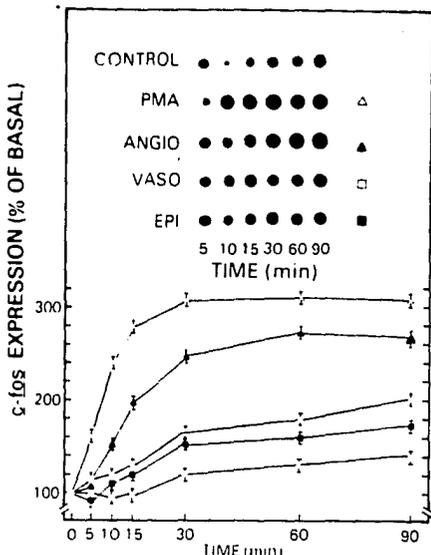


Fig. 4. Time-course of the effect of PMA, angiotensin II, vasopressin and epinephrine on *c-fos* expression. Hepatocytes were incubated for the times indicated in the absence (CONTROL, \circ) or presence of $1 \mu\text{M}$ PMA (Δ), 100 nM angiotensin II (ANGIO, \blacktriangle), 10 nM vasopressin (VASO, \square) or $10 \mu\text{M}$ epinephrine (EPI, \blacksquare). Total RNA was isolated and subjected to dot-blot analysis using a *c-fos*-specific DNA probe. Data were normalized to basal *c-fos* expression (control time 0, 100%). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E. of 3 experiments using different cell preparations. Inset shows a representative experiment.

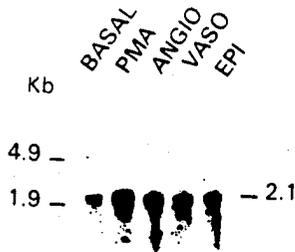


Fig. 3. Northern blot analysis of the effect of PMA, angiotensin II, vasopressin and epinephrine on *c-fos* expression. Hepatocytes were incubated for 30 min in the absence (BASAL) or presence of $1 \mu\text{M}$ PMA, 100 nM angiotensin II (ANGIO), 10 nM vasopressin (VASO) or $10 \mu\text{M}$ epinephrine (EPI). Total RNA was isolated and subjected to Northern blot analysis. The figure is representative of 3 experiments using different cell preparations.

epinephrine also induced *c-fos* expression though to a lesser extent and even more slowly (Fig. 4).

The effect of phorbol esters on *c-fos* expression was characterized. PMA increased the expression of this proto-oncogene, the EC_{50} was approx. 30 nM (Fig. 5; confirmed by Northern analysis, data not shown), which is within the range of other effects observed in hepatocytes [20–22]. PDB, but not α -phorbol, also induced this effect (Fig. 5). Surprisingly, *O*-met-PMA stimulated *c-fos* expression (Fig. 5).

Angiotensin II increased dose-dependently the expression of *c-fos* (Fig. 6) with an EC_{50} (approx. 30 nM) (confirmed by Northern analysis, data not shown). This action was dose-dependently inhibited by Losartan (DuP 753), a non-peptide AT_1 -antagonist [23] but not by PD123177, an AT_2 -antagonist [23] (Fig. 7). The antagonists by themselves were without effect on *c-fos* expression at the concentrations tested (data not shown).

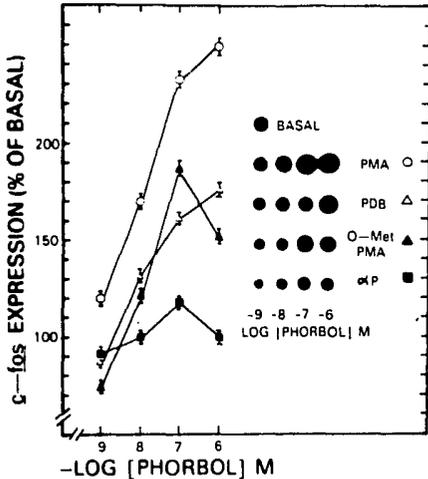


Fig. 5. Effect of phorbol esters on *c-fos* expression. Hepatocytes were incubated for 30 min in the absence (BASAL) or presence of the indicated concentrations of PMA (○), PDB (△), *O*-met-PMA (▲) or α -phorbol (α P). Other data as in Fig. 4.

We next studied the effect of actinomycin D and cycloheximide on *c-fos* expression. As expected, and in agreement with previous reports [11,13], we observed that whereas actinomycin D markedly decreases proto-oncogene expression, cycloheximide induces the opposite effect (Fig. 8; confirmed by Northern analysis, data not shown). The effects of PMA and angiotensin II were clearly decreased by the pre-treatment with actinomycin; nevertheless, they were still clearly ob-

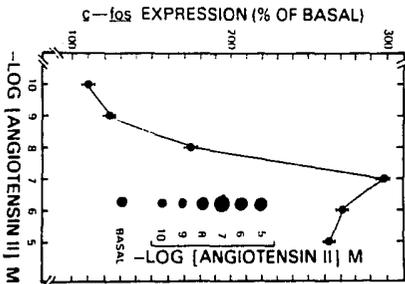


Fig. 6. Effect of angiotensin II on *c-fos* expression. Hepatocytes were incubated for 30 min in the absence (BASAL) or presence of different concentrations of angiotensin II. Other indications as in Fig. 4.

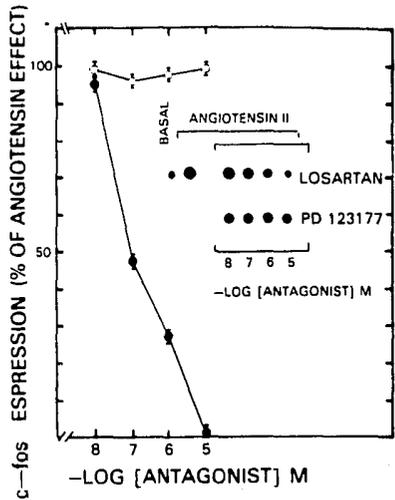


Fig. 7. Effect of losartan and PD123177 on the stimulation of *c-fos* expression induced by angiotensin II. Hepatocytes were incubated in the absence (BASAL) or presence of 100 nM angiotensin II alone or with different concentrations of Losartan (DuP 753) (●) or PD123177 (○). Results were normalized to the effect of angiotensin II alone (100%). Other indications as in Fig. 4.

servable when compared to proto-oncogene expression control cells treated with this inhibitor of transcription (Fig. 8; confirmed by Northern analysis, data not shown). Similarly, the effects of both PMA and Angiotensin II were clearly observable in the presence of cycloheximide as also were the smaller effects of vasopressin and epinephrine (Fig. 8; confirmed by Northern analysis, data not shown).

Discussion

Our present data confirm that dissociation of liver cells results in an increased expression of *c-fos* [13] which argue in favor of the role of cell-cell interaction via non diffusible messengers (juxtacrine communication) in modulating oncogene expression. In addition, we confirmed the ability of EGF to induce *c-fos* expression [13] and extended the observation to other external stimuli (endocrine communication).

It is becoming increasingly clear that some calcium-mobilizing hormones and neurotransmitters, whose actions are mainly associated with short-term effects, can also alter gene expression. In a recent, elegant study, Trejo and Brown [6] clearly showed using a glial cell line, that a brief (i.e., less than two min) exposure to an agonist is sufficient to give maximal increases in

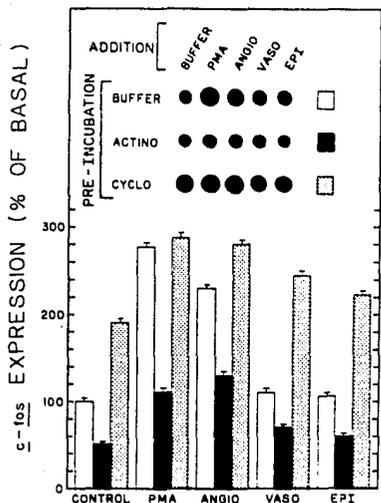


Fig. 8. Effect of actinomycin D and cycloheximide on *c-fos* expression. Hepatocytes were preincubated during 15 min in the absence (BUFFER, open bars) or presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of actinomycin D (ACTINO, solid bars) or 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of cycloheximide (CYCLO, dotted bars). After this preincubation the following agents were added: none (BUFFER); 1 μM PMA; 100 nM angiotensin II (ANGIO); 10 nM vasopressin (VASO) or 10 μM epinephrine (EPI), the incubation was continued for further 30 min. Results were normalized to the *c-fos* expression observed in cells pre-incubated and incubated with buffer alone (100%). Other indications as in Fig. 4.

c-fos and *c-jun* mRNA at later times. These results have the implication that events that take place within the initial first minutes of agonist stimulation (phosphoinositide turnover, calcium mobilization and activation of protein kinase C and other calcium-dependent kinases) are sufficient for induction of these early genes. In addition, these researchers [6] showed that down regulation of protein kinase C blocks the agonist-mediated gene induction which suggests a critical role of this kinase.

Our results are consistent with those findings. In hepatocytes, the stimulation of gene expression by PMA and PDB and the absence of effect of a phorbol suggest the involvement of protein kinase C. The effect of *O*-met-PMA is surprising and interesting; this phorbol ester is not active in some systems but it is capable of inducing a rapid decrease of protein kinase C activity in hepatocytes (as other active phorbol esters do) [21] and also weakly activates this protein kinase *in vitro* [21].

In this regard, the effect of angiotensin II is hardly surprising. This hormone activates phosphoinositide

turnover [23–25] which suggests a role of protein kinase C in this action. Nevertheless, a further degree of complexity is evidenced in these experiments since epinephrine and vasopressin which also stimulate phosphoinositide turnover to a comparable (epinephrine) or bigger (vasopressin) extent [26–27] have much smaller effect on *c-fos* expression. Therefore, the involvement of protein kinase C in the action of angiotensin II is suggested, but not definitively demonstrated and the possibility that additional factor(s) may participate can not be ruled out.

The recent availability of selective non-peptide angiotensin II antagonists [23] has allowed the clear definition of two receptor subtypes, i.e., the AT_1 receptors coupled to phosphoinositide turnover and calcium mobilization [23,24,28,29] and the AT_2 receptors which seem to be associated to decreases in cyclic GMP accumulation [30]. Interestingly, activation of AT_1 receptors, in hepatocytes, also inhibits adenylate cyclase [24]. It is possible that both actions may contribute to the marked effect of angiotensin II on *c-fos* expression. We would like to comment on several aspects of this point. There is evidence that a single G protein can modulate several membrane effectors (αGs , for example, modulates adenylate cyclase and calcium channels [31]) and it is also conceivable that a single receptor may act on more than one G protein. It is, therefore, not possible to rule out the possibility that the actions of the AT_1 receptors may have some differences with those of other receptors for calcium-mobilizing hormones. Similarly, the possibility that more than one type of angiotensin II receptors, with high affinity for Losartan (DuP 753) could be involved in the hepatic actions of angiotensin II can not be ruled out. The recent cloning of the AT_1 receptor [28,29] will certainly help to resolve this matter. We would like to add that, since the inhibition of adenylate cyclase by angiotensin II is sensitive to pertussis toxin [32] we attempted to determine if the toxin could inhibit its action on *c-fos* expression; however, we observed that the toxin by itself markedly altered oncogene expression which precludes its use for this purpose (data not shown). The partial blockade by actinomycin D of PMA- and angiotensin II-mediated *c-fos* expression strongly suggested that an increased transcription of the *c-fos* gene is involved. Nevertheless, since the blockade was not complete, other factors could probably be involved. Elevated levels of expression of *c-fos* by cycloheximide, previously observed in hepatocytes by other authors [11,13], suggest that short-lived proteins participate in the regulation of *c-fos* mRNA, which in most cells has a very high turnover rate [2]. The experiments with actinomycin D and cycloheximide suggest that both increased transcription and mRNA stabilization may play a role in the actions of PMA and calcium mobilization hormones on *c-fos* expression.

Finally, the fact that the expression of proto-oncogenes is observed during the active proliferation that follows partial hepatectomy [11], during carcinogenesis [12] and in the aged liver [33], together with its juxtacrine and endocrine control indicate its physiological importance and suggest that hepatocytes are an attractive model to study the role of these proto-oncogenes in proliferation and differentiation under normal and pathological conditions.

Acknowledgements

The authors want to express their gratitude to Drs. Patricio Gariglio, Alejandro Zentella and Joan Masagué for kindly donating some of the plasmids used in this work. They also thank Drs. Aurora Brunner and Roberto Hernández for their advice and Drs. Ronald D. Smith and Andrew Chiu (DuPont) for their generous gift of Losartan (DuP 753) and PD 123177. The efficient secretarial work of Ms. G. Ramírez is gratefully acknowledged. This research was partially supported by Grants from CONACyT (0310-N9107) and DGAPA (IN201889).

References

- Ransone, L.J. and Verma, I.M. (1990) *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6: 539-559.
- Schönthal, A. (1990) *Cell. Signal.* 2, 215-225.
- Verma, I.M. and Sassone-Corsi, P. (1987) *Cell* 51, 513-514.
- Boutherin-Falson, O., Reuse, S., Dumont, J.E. and Boeynaems, J.M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 306-312.
- Greenberg, M.E., Greene, L.A. and Ziff, E.B. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14101-14110.
- Trejo, J.A. and Brown, J.H. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 7876-7882.
- Krujjer, W., Cooper, J.A., Hunter, T. and Verma, I.M. (1984) *Nature* 312, 711-716.
- Haliday, E.M., Ramesha, Ch.S. and Ringold, G. (1991), *EMBO J.* 10, 109-115.
- Taubman, M.B., Berk, B.C., Izumo, S., Tsuda, T., Alexander, R.W. and Nadal-Ginard, B. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 526-530.
- Iwaki, K., Sukhatme, V.P., Shubeita, H.E. and Chien, K.R. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 13809-13817.
- Krujjer, W., Skelly, H., Botteri, F., van der Putten, H., Barber, J.R., Verma, I.M. and Leffert, H.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 7929-7933.
- Porsch-Hällström, I., Blanck, A., Eriksson, L.C., and Gustafsson, J.-Å. (1989) *Carcinogenesis* 10, 1793-1800.
- Etienne, P.L., Baffet, G., Desvergne, B., Boissard-Rissel, M., Glaise, D. and Gughen-Guillouzo, C. (1988) *Oncogene Res. J.* 255-262.
- Berry, M.N. and Friend, D.S. (1969) *J. Cell. Biol.* 43, 506-520.
- Seglen, P.O. (1973) *Exp. Cell. Res.* 76, 25-30.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning. A laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbour, MA.
- Cleveland, D.W., Lopata, M.A., MacDonald, R.J., Cowan, N.J., Rutter, W.J. and Kirschner, M.W. (1980) *Cell* 20, 95-105.
- Fort, Ph., Marty, L., Piechaczyk, S., Sabrouy, E., Dani, Ch., Jeanneur, Ph. and Blanchard, J.M. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13, 1431-1442.
- García-Sáinz, J.A., Mendlovic, F. and Martínez-Olmedo, M.A. (1985) *Biochem. J.* 228, 277-280.
- Corvera, S., Schwarz, K.R., Graham, R.M. and García-Sáinz, J.A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 520-526.
- Robles-Flores, M., Alcántara-Hernández, R. and García-Sáinz, J.A. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1094, 77-84.
- Chiu, A.T., Herblin, W.F., McCall, D.E., Ardecky, R.J., Carini, D.J., Duncia, J.V., Pease, L.J., Wong, P.C., Wexler, R.R., Johnson, A.L. and Timmermans, P.B.M.W.M. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 196-203.
- García-Sáinz, J.A. and Macías-Silva, M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 172, 780-785.
- Bauer, P.H., Chiu, A.T. and Garrison, J.C. (1991) (1991) *Mol. Pharmacol.* 39, 579-585.
- Hernández-Sotomayor, S.M.T. and García-Sáinz, J.A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 968, 138-141.
- García-Sáinz, J.A. (1987) *Circ. Res.* 61 (Suppl. II), 1-5.
- Lynch, C.J., Blackmore, P.F., Charest, R. and Exton, J.H. (1985) *Mol. Pharmacol.* 28, 93-99.
- Murphy, T.J., Alexander, R.W., Griendling, K.K., Runge, M.S. and Bernstein, K.E. (1991) *Nature* 351, 233-236.
- Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J.J., Hasegawa, M., Matsuda, Y., Inagami, T. (1991) *Nature* 351, 230-232.
- Summers, C., Tang, W., Zelezna, B. and Raizada, M.K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7567-7571.
- Hamilton, S.L., Codina, J., Hawkes, M.J., Yatani, A., Sawada, T., Strickland, F.M., Froehner, S.C., Spiegel, A.M., Toro, L., Stefani, E., Birnbaumer, L. and Brown, A.M. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 19528-19535.
- Pobiner, B.F., Hewlett, E.L. and Garrison, J.C. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 16200-16209.
- Fujita, T. and Maruyama, N. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 178, 1485-1491.

D I S C U S I O N

El gene c-fos es miembro de una familia de genes que se inducen rápidamente después de estimular a las células con un número considerable de mitógenos y factores de crecimiento. Este grupo de genes incluye también a las actinas del citoesqueleto, proteínas de matriz extracelular y un número grande de proteínas reguladoras de la transcripción. La estimulación de esta respuesta temprana no requiere la síntesis de proteínas, implicando que los factores reguladores están presentes antes de la estimulación (81).

En este trabajo hemos intentado la caracterización de la respuesta genética temprana en hepatocitos de rata adulta tratados con distintas hormonas, alguna de ellas con efectos a corto plazo ya bien caracterizados en estas células.

Encontramos que el nivel basal de c-fos se incrementa después de la disgregación del órgano, comprobando (82) los datos obtenidos por otros grupos. También comprobamos que el EGF induce la síntesis del mensajero de c-fos pero no observamos el máximo de estimulación porque únicamente dejamos que el factor actuara 30 minutos, en lugar de dos hora, como está reportado (83).

Sorprendentemente, hormonas como la angiotensina y activadores de la proteína cinasa C fueron capaces de inducir la respuesta transcripcional "temprana" en el hepatocito de rata.

Esta inducción génica involucra la síntesis simultánea de otros mensajeros, como el de la beta actina, el de c-myc y el de c-mos por lo menos, indicandio que en hígado, la respuesta transcripcional es compleja está formada por un grupo de genes que puede ser numeroso.

Sabemos que c-fos codifica para un factor de transcripción, el cual puede formar dímeros unidos por un cierre de leucinas con el producto del gene c-jun, otro proto- oncogene (84). Estas dos proteínas constituyen el factor de transcripción AP1.

Miembros de la familia Fos pueden formar heterodímeros con cualquier miembro de la familia Jun por medio de cierres de leucinas. Estos dímeros interactúan con la secuencia canónica para el factor AP1 en el DNA y allí regulan la transcripción génica.

El gene humano de c-fos ha sido clonado y secuenciado, identificándose un elemento específico que media la transcripción por componentes del suero (85). A esta secuencia se le llama

"serum response element" (SRE) y dentro de ésta secuencia se han caracterizado dos partes: el Cyclic AMP Response Element (CRE) y el TPA Response Element (TRE). El análisis fino del promotor de c-fos humano, se muestra en la figura 13.

Se han encontrado proteínas que específicamente se unen al promotor de c-fos en respuesta a la estimulación por AMP cíclico: a éstas se les ha llamado CREBPs por "Cyclic AMP Response Element Binding Proteins". Son proteínas que pueden dimerizarse por cierres de leucinas y tienen la particularidad de ser fosforilada cuando se activa a la proteína cinasa A (dependiente de AMP cíclico); a la fecha se sabe que requieren fosforilación para inducir la transcripción a partir del SRE, pero el mecanismo fino no se conoce. De hecho, podría ser que no fuera directamente la cinasa A quien las fosforilara, sino una cinasa dependiente de fosforilación por la cinasa A (86).

c-jun puede formar heterodímeros con algunas de éstas proteínas. Asociándose con CREBP-1, Jun puede considerarse más como una CREBP que como una proteína del factor AP1. Así, dependiendo del compañero molecular, los miembros de Jun pueden unirse a la secuencia AP-1 ó a la secuencia CRE (87).

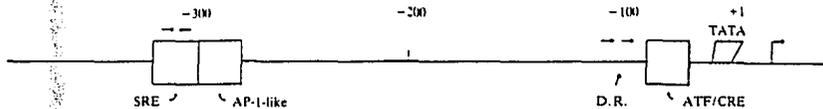
Nosotros probamos el dibutiril AMP cíclico para observar si la inducción de c-fos puede darse por la vía de la PKA en el hepatocito de rata, pero aparentemente no es así. Este hecho podría deberse a varias causas: probablemente no existan las CREBPs adecuadas en este tejido.

Probamos también si el sistema de recambio de IP3-calcio puede inducir c-fos en éstas células y lo hicimos de 3 formas: con el ionóforo de calcio A23187, con el activador de la PKC, forbol miristato acetato y con hormonas acopladas al sistema: angiotensina, vasopresina y epinefrina. El incremento de calcio fue incapaz de inducir la transcripción de c-fos. Pero la activación de la PKC por PMA tuvo un efecto dramático.

El PMA es capaz de inducir la acumulación de c-fos en un tiempo corto. Esta acumulación ocurre también con otros ésteres de forbol activos, pero no sucede nada con el alfa forbol, un derivado inactivo que no tiene efectos reportados sobre la PKC. Dado que el PMA activa a la cinasa, podemos decir que ésta proteína está jugando un papel importante en el acoplamiento del mensaje extracelular y el inicio de la transcripción de c-fos en hígado.

Los resultados obtenidos con las hormonas no son fáciles de explicar. Si bien angiotensina II, vasopresina y epinefrina inducen el recambio de IP3-calcio, sólo la primera es capaz de provocar una acumulación importante del mensajero de c-fos. Al parecer, no se trata del tiempo de acción (realizamos cursos temporales) ni de la dosis empleada (datos no mostrados). Este es tal vez el hallazgo más importante de nuestro estudio.

Desde hace ya tiempo, se ha aceptado que las tres hormonas



Sequence elements	Factor bound	Function	References
Serum regulatory element (SRE) -317 to -298 <u>GATGTC</u> CA <u>TATTAGGACATC</u>	SRF	serum induction in NIH-3T3 EGF induction in HeLa and A431 TPA induction in HeLa, BALB/c-3T3, CHO and in stably transfected A431 c-sis (PDGF) induction in BALB/c-3T3 insulin induction in CHO cAMP induction in NIH-3T3	1, 2, 3 4 3, 4, 5 6 3 5 7
AP-1-like -298 to -289 CTGCGTCAGC	AP-1 ATF/CREB	EGF and TPA induction in stably transfected HeLa cAMP induction in NIH-3T3	8 7
-225 to -99	?	cAMP induction in NIH-3T3	7
Direct repeats -97 to -77 GCGCCACC	DRF	basal level expression 5-10× effect	4
"-60" element -63 to -57 GTGACGT	ATF/CREB	basal level expression 5-10× effect cAMP induction in NIH-3T3	4, 9 7
TATA -31 to -23	TFIID		
Outside, -2000 to +42	?	calcium ionophore A23187 induction in HeLa and A431	4

The *c-fos* promoter is diagramed, and sequence elements involved in regulation are listed. Nuclear factors that have been shown to bind to these elements and functions that have been demonstrated are listed. References: (1) Treisman (1985, 1986); (2) Greenberg et al. (1987); (3) Gilman (1988); (4) Fisch et al. (1987); (5) Stumpo et al. (1988); (6) Fisch (1988); (7) T.M. Fisch et al., in prep.; (8) T.M. Fisch et al., in prep.; (9) Gilman et al. (1986).

FIGURA 13. Se muestra un análisis detallado de la secuencia reguladora del gene *c-fos* humano. Este esquema es una copia textual obtenida de la referencia 85.

estudiadas están acopladas al sistema donde la unión del ligando con el receptor provoca un cambio conformacional tal que permite su interacción con una proteína G, la cual activa a la fosfolipasa C, produciendo IP3 y DAG como segundos mensajeros (ver figura 14). Sin embargo, y también desde hace tiempo, nuestro laboratorio y otros han acumulado evidencias que parecen indicar que hay diferencias significativas en el mecanismo de acción de las tres hormonas. La insulina, por ejemplo, bloquea las acciones alfa 1 adrenérgicas pero no así las respuestas a vasopresina o a angiotensina II (88). En las ratas hipotiroides, no hay efecto glucogenolítico de vasopresina, angiotensina II y A23187, pero continúa la acción de la adrenalina vía receptores alfa 1 adrenérgicos (89).

Además, a diferencia de vasopresina y angiotensina II, se ha sugerido que la acción alfa 1 adrenérgica puede tener dos vías:

1) Independiente de calcio, sensible a insulina y regulada por glucocorticoides.

2) Dependiente de calcio, insensible a insulina y regulada por hormonas tiroideas (90).

Cuando se mide ureogénesis en hígado, el orden de potencia es vasopresina > angiotensina > epinefrina, aunque los incrementos absolutos fueron: epinefrina, 100% sobre el basal; angiotensina y vasopresina, 75% sobre el basal (91).

Cuando se mide recambio de fosfoinosítidos, vasopresina da una estimulación mayor (100%) sobre el basal) que angiotensina (60% sobre el basal) y que epinefrina (70% sobre el basal) (91).

Midiendo la producción de diacilglicerol, epinefrina estimula un 65% sobre el basal, angiotensina 80% sobre el basal y vasopresina un 180% sobre el nivel basal (92).

Como ha podido observarse, si bien las tres hormonas poseen capacidad de generar los mismos segundos mensajeros, no son exactamente iguales sus efectos. De las tres hormonas, angiotensina fue la única capaz de estimular la síntesis de c-fos de una manera importante y dependiente de la dosis. Este es un efecto mediado por un receptor específico, ya que puede ser bloqueado por Losartán, un antagonista selectivo para los receptores tipo AT1 (que son los más abundantes en hígado) (93).

Los receptores para estas hormonas pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, con siete segmentos transmembranales. Recientemente (94), se han clonado el de angiotensina (AT1) de células aórticas de rata. El de vasopresina de hígado de rata (95), y el alfa 1 B de hamster (96). Cabe mencionar que el oncogene mas parece codificar para un receptor atípico de angiotensina (97).

No sabemos el punto donde la señal hormonal dada por

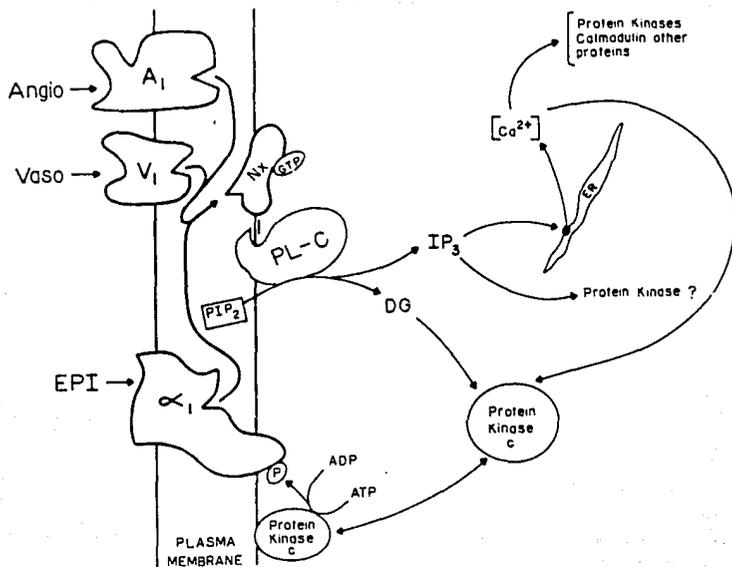


FIGURA 14. Se muestra el sistema de transducción al que están acopladas las hormonas angiotensina II, vasopresina y epinefrina en células hepáticas. Las tres activan el recambio de IP₃-Calcio, pero, es evidente, que existen diferencias entre los tres mecanismos. Nota: Nx indica la proteína Gp. Ref.91

vasopresina, angiotensina y epinefrina se convierte en distintas señales para la transcripción genética. En la caracterización de los sistemas de transducción, hay hipótesis que se basan en la existencia de isoformas para casi todos los elementos del sistema: varios receptores para la hormona, distintas poblaciones de proteínas G, varias fosfolipasas y cinasas C podrían explicar que, si bien se produjeran los mismos segundos mensajeros, la respuesta celular no fuera exactamente igual.

En nuestro caso, los datos con PMA parecen dar un papel importante a la PKC. Como ya se mencionó antes, la PKC es en realidad una familia de isoenzimas relacionadas, cada una con distintas características. En el hígado, se ha reportado la existencia de varias isoformas diferentes (78). Probablemente podamos explicar los efectos distintos de las hormonas si pensamos que están activando de manera diferencial a distintas isoformas de la proteína cinasa C. Existe controversia acerca de la activación de la cinasa por vasopresina, por ejemplo.

El estudio que realizamos abre un campo mayor de estudio si suponemos activación preferencial de ciertas isoformas de cinasa en la transducción de señales hormonales.

La inducción de c-fos se lleva a cabo de modo preferencial a nivel de inicio de la transcripción, ya que si las células se preincubaban con actinomicina D, se bloquea la inducción por angiotensina y por PMA. Sin embargo, no podemos descartar un control postranscripcional, ya que si preincubamos a las células con cicloheximida inducimos de manera importante al proto-oncogene. Llama enormemente la atención el hecho de que tanto epinefrina como vasopresina incrementen el mensajero de c-fos en presencia de cicloheximida más que cicloheximida solamente. Esto puede indicar que tanto vasopresina como epinefrina son capaces de provocar un aumento en el mensajero regulando otros niveles de control. Dentro de los muchos experimentos que faltan por hacer, se encuentran los análisis de la proteína Fos mediante inmunoprecipitación después de la exposición al agonista. De esta forma, podría conocerse si las tres hormonas tienen el mismo efecto final: la acumulación del factor de transcripción Fos, aunque los mecanismos sean diferentes.

Nuestro estudio demuestra que en el hígado normal de rata existen vías de inducción del proto-oncogene c-fos en respuesta a la activación de la proteína cinasa C. La caracterización de los elementos en detalle, el bloqueo de la activación de la PKC y la búsqueda de isoformas específicas (si las hay) del sistema de angiotensina, es trabajo que falta por hacer.

¿Qué es lo que da especificidad hormonal a la respuesta de una célula?

En el sistema de transducción de las hormonas esteroides, donde la transcripción es un evento regulado finamente, es claro que la secuencia de nucleótidos en el HRE y su interacción con el dímero de receptores activados por la hormona, controlan

específicamente la síntesis de RNAs mensajeros. El sistema es sencillo y elegante porque el factor de transcripción es el propio receptor para la hormona.

Cuando analizamos la transcripción mediada por factores de crecimiento, el sistema de control génico se complica un poco más porque ya no es el receptor el encargado de iniciar la transcripción sino, probablemente, alguna proteína fosforilada directamente por el receptor. En este sistema, la especificidad de la respuesta puede estar dada por las cinasas que fosforilen a factores de transcripción específicos (puede existir una familia), que se unan al DNA en secuencias especiales para la estimulación por EGF, PDGF, FGF, etc. Una cascada de fosforilaciones podría explicar el paso de la señal y la síntesis de factores de transcripción tejido-específicos, pueden explicar, con cierta facilidad, la especificidad de la respuesta.

Sin embargo, cuando la transcripción está mediada por segundos mensajeros, la señal intracelular es el incremento en la concentración de un metabolito (AMP cíclico, IP-, calcio, DAG) que tendrá efectos pleiotrópicos sobre una gran cantidad de enzimas: cinasas específica, por ejemplo. En el caso de hormonas que comparten el mismo sistema de transducción, no se tiene una explicación sencilla. Probablemente la respuesta se encuentre en la activación de isoformas específicas y en la formación de dímeros únicos de los factores de transcripción adecuados.

Sabemos que las familias de Fos y Jun son numerosas y que tienen distintas afinidades por el sitio AP-1. Así, dependiendo de las concentraciones relativas de cada miembro de la familia, se formarán dímeros diferentes que podrán activar genes especiales para cada estímulo, figura 15.

Nuestros experimentos demuestran que el sistema hepático de rata normal es un buen modelo de estudio para la regulación transcripcional a corto plazo. Los hepatocitos son células que pueden mantenerse en cultivo primario por semanas y poseen receptores prácticamente a todas las hormonas.

La caracterización reportada aquí abre camino para muchos estudios posteriores y demuestra que el proto-oncogene c-fos está involucrado en el sistema de transducción de la hormona angiotensina II. Cuando caractericemos los genes activados por AP-1 en hígado de rata en respuesta a angiotensina, comprenderemos mejor la regulación hormonal de la vida de éstas células.

Stimulus - Transcription Coupling: Role of *fos*- and *jun*- Like Genes.

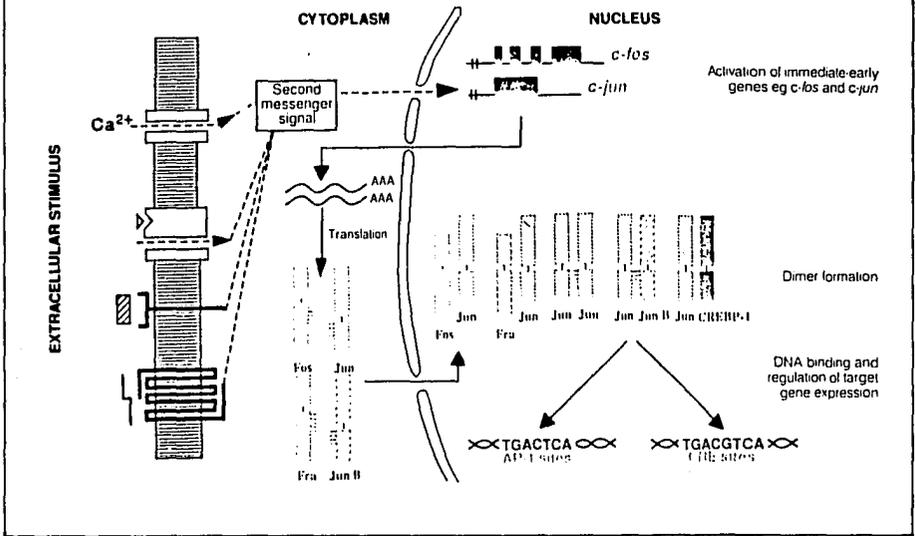


FIGURA 15. La estimulación hormonal que produce segundos mensajeros puede desencadenar una respuesta génica activando la transcripción de proto-oncogenes como *c-fos* y *c-jun*. La especificidad de la respuesta es, hasta el momento, difícil de explicar. Una de las hipótesis más aceptadas es la formación de heterodímeros FOS-JUN específicos para activar la transcripción de distintos genes. Sin embargo, aún falta mucho por hacer.

CONCLUSIONES

1. En hepatocitos normales de rata se induce el protooncogene c-fos en respuesta al factor de crecimiento epidérmico y a la hormona Angiotensina II.

2. La inducción parece estar mediada por la proteína cinasa C dado que el TPA mimetiza los efectos de la Angiotensina.

3. La inducción por Angiotensina está mediada por un receptor tipo AT1 porque es sensible al bloqueo por Losartán.

4. La inducción por Angiotensina y PMA está se lleva a cabo a nivel de inicio de la transcripción ya que se puede bloquear por la actinomicina D.

5. La expresión de c-fos no parece ser un evento general en éstas células, ya que ni epinefrina ni vasopresina fueron capaces de activar su transcripción.

6. El modelo de células de hígado normal de rata es un buen sistema para el estudio de la regulación genética mediada por hormonas.

REFERENCIAS

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1990) "Molecular Biology of the Cell". Garland Publishing, U. S. A.
2. Gardner, E. J., Simmons, M. J., Snustad, P.D. (1991) "Principles of Genetics" John Wiley and Sons, INC. U.S.A.
3. Biggin, M. D., and Tijan, R., (1989) Trends in Genetics 5: 377-383
4. Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steits, J. A. and Weiner, A. M. (1987). "Molecular Biology of the gene". The Benjamin/ Cummings Publishig Company, INC.
5. Wilson, J. D., and Foster, D. W. "Textbook of endocrinology" 7th. Edition. (1981). W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA.
6. "Molecular Biology of Signal Transduction" Vol.LII, (1988). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
7. Affloter, H., and Coronado, R., (1985) Biophys. Journal. 48: 341-347.
8. Garbers, D. L. (1989). The Journal of Biological Chemistry 264:9103-9107
9. Codina, J., Grenet, A., Yatani, L. Birbaumer and Brown, A. M., (1987) FEBS lett. 216:104-106
10. Urlich, A., and Schlessinger, J. (1990), Cell 51:203-212
11. Hunter, T., (1989). Cell 58:1013-1016
12. Sutherland, E. W. (1972). Science 177: 401-408
13. Rodbell, M. (1980). Nature 284:17-22
14. Spiegel, A. CM. (1990), en Nahorski, S. R.(Ed.) "Transmembrane Signalling, Intracellular Messengers and implications for drug development". Wiley- Interscience Publishers. England. pp. 31-41.
15. Berridge, M. J. and Irvine, R. F. (1989). Nature 341:197-204.
16. Fain, J. N. and García-Sáinz, J. A. (1980). Life Sciences 26: 1183-1194

17. Raymond, J. R., Albers, F. J., Middleton, J. P., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., Oberd, L. M., Dennis, V.W. (1991). *J. Biol. Chem.* 266:372-379.
18. García-Sáinz, J. A. and Macías-Silva, M. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172:780-785
19. Nishizuka, Y. (1988). *Nature* 334: 661-665
20. Nishizuka, Y. (1988). *Science* 233: 305-312
21. Beato, M. (1989). *mCell* 56: 335-344
22. Baumann, H., Firestone, G. L., Burgess, T. L., Gross, K. W., Yamamoto, K. R., and Held, W. A. (1983). *J. Biol. Chem.* 258: 563-570.
23. Geisse, S., Scheidereit, C., Westphal, H. M., Hynes, N. E., Groner, B., and Beato, M. (1982). *EMBO Journal* 1613-1619
24. Dennis, M., Poellinger, L., Wikstöm, A. C., and Gutafsson, J. A., (1988). *Nature*, 333: 686-688
25. Schüle, R., Muller, M., Otsuka-Murakami, H., and Renkawitz, R. (1988). *Nature* 332:87-90
26. Danesh, U., Gloss, B., Schmid, W., Schültz, G., and Renkawitz, R. (1987). *EMBO Journal* 6: 625-630
27. Hecht, A., Berkenstam, A., Strömstedt, P. E., Gutafsson, J. A., and Sippel, A. E. (1988). *EMBO Journal* 7:2063-2073
28. Glass, C. D., Holloway, J. M., Devary, O. V., and Rosenfeld, M. G. (1988). *Cell* 54: 313-323
29. Evans, R. M. (1988). *Science* 240:889-895
30. Jensen, E. V., Suzuki, T., Dawashima, T., Stumpf, W. E., Jungblut, T. W. and de Sombre, E. R. (1968). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 59:632-637
31. Yarden, Y., and Urich, A. (1988). *Ann. Rev. Biochem.* 57: 443-478
32. Carpenter, ÇG., Cohen, S., (1979). *Ann. Rev. Biochem.* 48:193-216
33. Czech, M. (1989). *Cell* 59:235-238
34. Heldin, C., Erlund, A., Rorsman, C., and Rönstrand, L. (1989). *J. Biol. Chem.* 264:8905-8912
35. Ruta, M., Burgess, W., Givol, D., Epstein, J., Neiger, N.,

- Kaplow, J., Crumley, G., Dionne, C., Jaye, M., and Schlessinger, J. (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8722-8726
36. Czech, M. P., Klarlund, J. K., Yagaloff, K. A., Bradford, A. P., and Lewis, R. E. (1988). J. Biol. Chem. 263:11017-11020
37. Wahl, M., Nishibe, S., Suh, T. G., Rhee, S. G., and Carpenter, G. (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1568-1572
38. Stiles, C. D. (1983). Cell 33:653-655
39. Matusik, R. J., and Rosen, J. M. (1978). J. Biol. Chem. 253:2343-2347
40. Terry, P. M., Banerjee, M. R. and Lui, R. M. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:2441-2445
41. Guyette, W. A., Matusik, R. J., and Rosen, J. M. (1979). Cell 17:1013-1023
42. Iynedjian, P. B., and Hanson, R. W. (1977). J. Biol. Chem. 252:8398-8403
43. Sasaki, K., Cripe, T. P., Koch, S. R., Androne, T. L., Petersen, D. D., Beale, E. G., and Granner, D. K. (1984). J. Biol. Chem. 259:15242-15251
44. Murdoch, G. H., Franco, R., Evans, R. M., and Rosenfeld, M. G. (1983). J. Biol. Chem. 258:15239-15335
45. Abate, C., and Curran, T., (1990) Cancer Biol. 1:19-26
46. Arias, I. M., Jakoby, W. B., Popper, H., Schachter, E., Shafritz, D. H. (1988). The Liver. Raven Press. New York, USA.
47. Blouin, A. (1977). Kupffer Cells and other liver sinusoidal cells. Elsevier, Amsterdam.
48. Burwen, S. J., Barker, M. E., Goldman, I. S., Hradek, G. T., Raper, S. E., and Jones, A. L. (1984). Journal of Cell Biology 99:1259-1265
49. Arias, I. M. (1986). Progress in Liver Disease, vol VIII. Edited by Popper, H. and Schaffner, F. Grune and Stratton, Orlando, USA.
50. Hoppe, C.- A., Connolly, T. P., and Hubbard, A. L. (1985). J. Cell. Biol. 101:2113-2123
51. Lorenzini, I., Sakisaka, S., Meier, P. J., y Boyer, J. L. (1986) Gastroenterology 91:1278-1288
52. Burwen, S. J., Barker, M. E., Goldman, I. S., Hradek, G. T., Raper, S. E., and Jones, A. L. (1984). J. Cell. Biol. 99:1259-1265

53. Griffiths, G., and Simmons, K. (1986). *Science* 234:438-443
54. Daugdale, M. and Masi, A. T., (1971). *J. Chronic. Dis.* 23:775-790
55. Conrad, J., Samama, M., and Salomon, Y. (1972). *Lancet* 2:1148-1149
56. Wynn, V., Doar, J. W. H., Mills, G. L. and Stoker, T. (1969). *Lancet* 2 756-760
57. Laragh, J. H., Baer, L., Brunner, H. R., Buhler, F. R., Sealey, J. E. and Vaughan, E. D. (1972). *Am. J. Med.* 52:633-649
58. Lee, D. C., Mc. Knight, G. S., and Palmiter, R. D. (1978). *J. Biol. Chem.* 253:3494-3503
59. Klatskin, G., (1977). *Gastroenterology* 73:386-394
60. Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., et al. (1984). *Nature* 308:513-519
61. Scherer, G., Schmid, W., Strange, C. M., Rowekamp, W., and Schutz, G., (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7205-7208
62. Danesh, V., Hashimoto, S., Renkawitz, R., and Shultz, G., (1983). *J. Biol. Chem.* 258:4750-4753
63. Fulton, R., and Birnie, G. D., (1985). *Nucl. Acid. Res.* 13:6467-6482
64. Vannice, J. L., Taylor, J. M., and Ringold, G. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4241-4245
65. Friedman, J. M., Babiss, L. E., Clayton, D. F., and Darnell, J. E. Jr. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:3791-3797
66. Cereghini, S., Blumenfeld, M., Raymondjean, M., Carranca, A. G., and Yaniv, M. (1987). Factors involved in control of tissue-specific expression of the albumin gene. En: *Regulation of Liver Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
67. Pinkert, C. A., Ornitz, D. M., Brinster, R. L., and Palmiter, R. G. (1987). *Genes Develop.* 1:268-276
68. Costa, R. H., Lai, E., and Darnell, J. E. Jr. (1986) *Mol. Cell Biol.* 6:4697-4708
69. Colantuoni, V., Pirozzi, A., Blance, C., and Cortese, R. (1987). *EMBO J.* 6:631-637
70. Cilliberto, G., Dente, L., and Cortese, R. (1985). *Cell* 41:531-540

71. Goyette, M., Petropoliuss, C. J., Shank, P. R. and Fausto, N. (1983). *Science* 219:510-512
72. Goyette, M., Petropoliuss, C. A., Shank, P. R., and Fausto, N. (1984). *Mol. Cell. Biology*. 4:1493-1498
73. Thompson, N. L., Mead, J. E., Braun, L., Goyette, M., Shank, P. R., and Fausto, N. (1986) *Cancer Res.* 46:311-317
74. Huber, B. E., Heilman, C. A., Wirth, P. J., Miller, M. J., and Thorgeirsson, S. S. (1986) *Hepatology* 6:209-219
75. Clayton, D. F., Weiss, M., and Darnell, J. E., Jr. (1985). *Mol. Cell. Biol.* 5:2633-2641
76. Blair, J. B., James, M. E., Foster, J. L. (1979). *J. Biol. Chem.* 254:7579-7584
77. García-Sáinz, J. A., Macías-Silva, M. and Romero-Avila, M. T. (1991). *B.B.R.C.* 179:852-858
78. Robles-Flores, M., Alcántara-Hernández, R., and García-Sáinz, J. A. (1991). *Biochem. Biophys. Acta* 1094:77-84
79. Catt, K. and Abbot, A., (1991). *TIPS* 12:279-281
80. Etienne, P. L., Baffet, G., Desvergne, B., Boissnard-Rissel, G., Glaise, D. and Guillouzo, G. C. (1988) *Oncogene Res.* 3:255-262
81. Curran, T., (1988). "Oncogene Handbook" E. P. Readdy Editor, Elsevier, Amsterdam Holland.
82. Summers, C., Tang, W., Zelezna, B., and Raizada, M., (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7567-7571
83. Greenberg, M. E., Greene, L. A., y Ziff, E. B. (1985). *J. Biol. Chem.* 260:14101-14110
84. Angel, P., Allegretto, S., Okino, E., Hattori, W., Boyle, T., Hunter, E. and Karin, M. (1989). *Nature* 332: 166-171
85. Treisman, R. (1988). *Cell* 42:889-896
86. Prywes, R. and Roeder, R. G., (1986). *Cell* 47:777-784
87. Bohman, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P., and Tijan, R. (1987). *Science* 238:1386-1388
88. Pushpendran, C. K., Corvera, S. and García-Sáinz, J. A. (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118:451-459
89. Corvera, S. and García-Sáinz, J. A. (1983). *FEBS lett.* 153:366-368

90. García-Sáinz, J. A. and Hernández-Sotomayor S.M.T. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6727-6730
91. García-Sáinz, J. A. (1987). Circulation Research 61 (suppl. II): II-1-II-5.
92. Bocckino, S. B., Blackmore, P., and Exton, J. H. (1985). J. Biol. Chem. 260:14201-14207
93. García-Sáinz, J. A. and Macías-Silva, M. (1990). Biochem. Biophys. Res. Commun. 172:780-785
94. Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S. and Bernstein, K. E. (1991). Nature 351:233-235
95. Morel, A., O'Carroll, A. M., Brownstein, M. J., and Lolait, S. J. (1992). Nature 356:523-526
96. Cotecchia, S., Schwinn, D. A., Randall, R., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., and Kobilka, B. K. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7159-7163
97. Brown, K. (1989). T I P S 10:87-89
98. Morgan, J. I. "Protooncogene expression in the nervous system". Discussions in neurosciences, vol VII-4 August, 1991.