



03081
12.
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
POSGRADO DEL C. C. H.**

**EXPRESION DEL PROTO - ONCOGENE C-FOS EN
HEPATOCITOS DE RATA: CONTROL HORMONAL Y
POR AGENTES QUE MODIFICAN EL ESTADO DE
FOSFORILACION DE LAS CELULAS,**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
DOCTORA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
PRESENTA LA M. EN IBB
CLAUDIA GONZALEZ ESPINOSA

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**Este trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Jesús Adolfo García-Sáinz
en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, y estuvo apoyado por los donativos
CONACyt 4711-N9406 y DGAPA IN 200193.**

A Ricardo y Esperanza, por su cariño sin límites. Por su preocupación constante. Porque nunca podré agradecerles lo suficiente.

A Kathy, Diana, Nadya y Ricardito, mis hermanos entrañables.

A mi compañero de todas las batallas, Alejandro.

A mi hijo Alejandro, porque es la razón de mi vida.

In memoriam

A la Doctora Aurora Brunner Leibshard, investigadora, maestra y amiga, cuyo recuerdo siempre estará conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor J. Adolfo García-Sáinz por su apoyo y guía a lo largo del desarrollo de este trabajo. Por permitirme trabajar en su laboratorio y por su preocupación continua en mi formación académica.

A todos mis compañeros de laboratorio: Rocío, Paty, Gloria, Alberto, Agustín, Gonzalo, Martha, Artemio, Minerva y José, por lograr que el quehacer cotidiano sea más divertido e interesante.

A Marina Macías, María Eugenia Torres, Tere Romero y Rafael Villalobos, por su gran ayuda y amistad sincera.

A los Doctores Roberto Hernández y Alejandro García Carrancá por su asesoría y sugerencias en los exámenes tutoriales realizados.

A los Doctores Rolando Hernández, Victoria Chagoya, Roberto Coria, Alejandro Zentella, Carmen Gómez y Ana María López Colome por la revisión crítica y sugerencias a este manuscrito.

A Lupita Ramírez por su buen humor a toda prueba, por su entusiasmo diario y su disposición para ayudarnos en el trabajo secretarial.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, por haberme permitido realizar todos los estudios, desde la licenciatura hasta el doctorado, gozando de una beca sin la cual, me hubiera sido imposible.

Al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por su vida académica y su gran riqueza científica y humana.

A la Unidad Académica de los Ciclos Profesional y Posgrado del CCH de la UNAM por ser un ejemplo de institución creativa, innovadora y eficiente, de la cual estoy muy orgullosa de haber egresado.

“No aceptar nunca como verdadera cosa alguna que no conociese yo evidentemente ser tal, es decir, evitar solícitamente la precipitación y el prejuicio, y abarcar en mis juicios nada más que lo que se presente a mi mente de modo tan claro y distinto, que no tuviese yo ocasión alguna de ponerlo en duda.

Dividir cada una de las dificultades que examinase en tantas partículas como fuese posible y necesario para solventarlas mejor.

Conducir con orden mis pensamientos, empezando por los objetos más sencillos y fáciles de conocer, para subir poco a poco, como por escalones, hasta el conocimiento de los más compuestos y suponiendo que existe orden aún entre aquellos que no se precedan naturalmente unos a otros.

Hacer enumeraciones tan completas y revisiones tan generales, que estuviese yo cierto de no omitir nada.

Tener en cuenta que fuera de nuestros pensamientos, no hay nada que esté completamente en nuestras manos.”

René Descartes (1596-1650)

“Nosotros somos los descendientes de esos hombres. Es de ellos sin duda que hemos heredado la existencia de la explicación, la angustia que nos impulsa a buscar el sentido de la existencia. Angustia creadora de todos los mitos, de todas las religiones, de todas las filosofías y de la ciencia misma. No dudo por mi parte que esta imperiosa necesidad sea innata, que esté inscrita en alguna parte del lenguaje del código genético y que se desarrolle espontáneamente.”

**Jacques Monod, “Le hasard et la nécessité”.
Editions du Seuil, Paris (1970).**

INDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY	2
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCION	4
OBJETIVOS	29
RESULTADOS Y DISCUSION	
Primer trabajo	30
Discusión del primer trabajo	44
Segundo trabajo	60
Discusión del segundo trabajo	83
CONCLUSIONES	99
BIBLIOGRAFIA	100

RESUMEN

Sabemos que en hepatocitos de rata la hormona angiotensina II y el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) inducen la expresión del proto-oncogene *c-fos*. En este trabajo estudiamos el posible mecanismo de inducción por estos agentes usando inhibidores de cinasas en serina-treonina ó tirosinas. Encontramos que el calphostin y la staurosporina, inhibidores de la proteína cinasa C y otras cinasas en serina-treonina, bloquean de forma dependiente de la dosis el efecto de angiotensina II y PMA. Sorprendentemente, la genisteína, un inhibidor de cinasas en tirosinas, también fue capaz de bloquear la acumulación del RNA del proto-oncogene, lo que indica que tal vez participen este tipo de cinasas en la transducción de la señal.

Utilizamos también inhibidores de fosfatasas de serina-treonina, a saber, el ácido okadaico, la microcistina LR y la caliculina, encontrando que inducen la acumulación del RNA de *c-fos*. Tales resultados indican que las fosfatasas mantienen un control negativo sobre la cantidad de ese RNA en el interior de la célula. El efecto de esos inhibidores de fosfatasas no se bloqueó por el calphostin, la staurosporina ni la genisteína. Nuestros resultados indican que la expresión del proto-oncogene *c-fos* en hepatocitos de rata está regulada por una compleja cascada de fosforilación-desfosforilación que incluye cinasas de serina-treonina y tirosina, además de fosfatasa en serinas y treonina.

Por otro lado, nos preguntamos a qué nivel de la expresión genética se regulaba la acumulación de ese mensajero por Angiotensina II y PMA. Encontramos que la acumulación se inhibía sólo parcialmente por actinomicina D, lo que indicaba que había otros factores además de la transcripción del gene. Estudiamos los efectos que sobre transcripción y estabilización del RNA tenían estos agentes.

Usando ensayos de run-off, observamos que tanto angiotensina II como PMA inducen un incremento en la transcripción *de novo* del proto-oncogene. La transcripción de un gene control, la GAPDH no se alteró por ningún tratamiento en nuestras células, lo que indica que no es un efecto general, sino específico sobre el promotor del proto-oncogene.

Además estudiamos el efecto que sobre la estabilidad del RNA tienen estos agentes, encontrando que la vida media del mensajero es muy corta (≈ 14 minutos) y que la angiotensina II y el PMA incrementan esa vida media (≈ 4 veces y ≈ 2 veces, respectivamente). La cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, provocó una mayor estabilidad del RNA de *c-fos*.

De esta manera, nuestros resultados indican que la hormona Angiotensina II y el PMA modulan tanto la transcripción *de novo* como el recambio del RNAm para *c-fos* en hepatocitos de rata.

SUMMARY

In isolated rat hepatocytes angiotensin II and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) induce the expression of *c-fos* proto-oncogene. In this work we studied the possible transduction pathway(s) involved in this effect using inhibitors of serine-threonine and tyrosine protein kinases. Calphostin and Staurosporine, inhibitors of protein kinase C and other serine-threonine protein kinases, block in a dose-dependent manner the effect of angiotensin II and PMA. Interestingly, genistein also blocks the induction of this proto-oncogene, suggesting a role for tyrosine protein kinases.

Inhibitors of serine-threonine protein phosphatases, such as okadaic acid, microcystin LR and calyculin also induce *c-fos* expression. These data suggest that protein phosphatases exert a tonic inhibitory control of *c-fos*. The effect of these phosphatase inhibitors were not blocked by staurosporine, calphostin or genistein. Our results suggest that the expression of *c-fos* in rat hepatocytes is regulated by complex phosphorylation-dephosphorylation cascade(s) probably involving serine/threonine and tyrosine protein kinase and protein phosphatase activities.

The increase in *c-fos* mRNA accumulation was only partially blocked by actinomycin D, suggesting that factors, in addition to transcription, were involved. The effects of angiotensin II and PMA on *c-fos* transcription and mRNA stability were investigated. Using nuclear Run-off transcription assays, it was observed that PMA and Angiotensin II induce a rapid increase in *c-fos* transcription. The transcription rate of the GAPDH gene did not change, indicating that the effect was not general on gene transcription.

The ability of these agents to modulate proto-oncogene mRNA stability was tested by measuring *c-fos* mRNA half-life. It was observed that *c-fos* mRNA half-life was relatively short (≈ 14 min) and that angiotensin II and PMA markedly stabilized mRNA increasing its half-life (≈ 4 -fold and ≈ 2 fold, respectively). The protein synthesis inhibitor cycloheximide increased mRNA stability to a much greater extent.

Our results clearly demonstrate that angiotensin II and PMA increased *c-fos* mRNA accumulation in liver cells through to actions: induction of *c-fos* gene transcription and increase in mRNA stability.

ABREVIATURAS

- AMPc.** Adenosin monofosfato cíclico.
Angio II. Angiotensina II.
AP-1. Factor 1 activador de la transcripción.
ARE. Elemento del RNA rico en AU.
ATF. Factor activador de la transcripción.
AUBF. Factor proteico que se une a las secuencias ARE de un RNA.
CHO. Células de ovario de hamster chino.
CRE. Elemento de respuesta al AMP cíclico.
CRE-BP. Proteína de unión al CRE.
cDNA. DNA complementario al RNAm.
DNA. Acido desoxirribonucleico.
EGF. Factor de crecimiento epidérmico.
FGF. Factor de crecimiento de fibroblastos.
GAPDH. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
G_i. Proteína G acoplada a la inhibición de la Adenilato Ciclasa.
G_p. Proteína G acoplada a la fosfolipasa C.
G_s. Proteína G acoplada a la estimulación de la Adenilato Ciclasa.
IC₅₀. Dosis para inhibir la mitad de la respuesta.
IEG's. Genes inmediatos y tempranos.
IFNs. Interferones.
IL-6. Interleucina 6.
IL-8. Interleucina 8.
IP₃. Inositol tri-fosfato.
ISGFs. Factores estimulados por interferones.
K_i. Constante de inhibición.
LIF. Factor inhibidor de la leucemia.
MAPK. Cinasa activada por mitógenos (MAP).
MEK. Cinasa de la cinasa MAP.
NGF. Factor de crecimiento neuronal.
NMDA. Acido N-metil-D-aspartico.
PABP. Proteína de unión a la cola de poli(A) de un RNAm.
PDGF. Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PKC. Proteína Cinasa C.
PLC. Fosfolipasa C.
PMA. Forbol miristato acetato.
PP1. Proteína fosfatasa tipo 1.
PP2. Proteína fosfatasa tipo 2.
RNA. Acido ribonucleico.
RNAm. RNA mensajero
SIE. Elemento inducible por *c-sis* (PDGF).
SIF. Factor de unión al SIE.
SRE. Elemento de respuesta a suero.
SRF. Factor que se une al SRE.

INTRODUCCION

Uno de los mayores retos que enfrentan los biólogos modernos es el de delinear los mecanismos moleculares por los cuales las células adaptan sus fenotipos en respuesta a señales ambientales y mensajeros químicos, como hormonas y neurotransmisores. Aunque se ha aprendido mucho acerca de los cambios rápidos y de corta duración que ocurren después de la estimulación hormonal, se conoce relativamente poco acerca de los procesos que convierten a los efímeros eventos mediados por segundos mensajeros en alteraciones a largo plazo del fenotipo celular. El estudio de este fenómeno es de enorme importancia para la medicina actual, que debe explicar cómo una estimulación rápida puede llevar a cambios en la función celular que perduren durante distintos tiempos dependiendo del evento que se lleve a cabo, ya sea en condiciones normales como el aprendizaje, el desarrollo, la regeneración o en condiciones patológicas, como el cáncer. Aunque las evidencias apuntan a que las respuestas a esa cuestión no son simples, los investigadores interesados en el campo han avanzado en tal estudio utilizando conceptos y agentes que provienen del estudio de los oncogenes. En particular, el proto-oncogene *fos* ha generado una nueva línea de investigación y un marcador útil con el cual se pueden caracterizar los efectos de estímulos hormonales, farmacológicos, eléctricos y mecánicos en diferentes tipos celulares.

Los resultados del proyecto de investigación que se presentan en esta tesis responden algunas interrogantes acerca de la regulación de la expresión del proto-oncogene *c-fos* en

células hepáticas de rata en respuesta a la estimulación con algunos agentes que provocan respuestas rápidas, como el forbol miristato acetato y la hormona angiotensina II.

A continuación se presenta una breve revisión acerca de los oncogenes y particularmente de lo que se conoce del proto-oncogene *c-fos*. Después de esto se encuentra una descripción de otros genes de inducción rápida y de las vías intracelulares que los activan (aquí también se incluyen algunos comentarios acerca de su significado biológico). A continuación, se habla de la hormona angiotensina II y del promotor de tumores forbol miristato acetato, potentes inductores de *c-fos* en el sistema celular de nuestro interés. Se termina la introducción con los antecedentes más inmediatos de la investigación que llevamos a cabo, mencionando los datos que nos llevaron a realizar los experimentos que se muestran en los artículos.

1. El origen de los oncogenes

Los oncogenes se describieron inicialmente como la información genética responsable de la inducción de tumores por virus de RNA de la clase *Retroviridae*. En 1989 el premio Nobel de medicina fue otorgado a Michel J. Bishop y Harold Varmus por el descubrimiento del origen celular de los oncogenes retrovirales (Stehelin et al, 1976), lo que quiere decir que los genes transformantes que se encuentran en los retrovirus fueron tomados del genoma de las células. Durante este proceso, mutan y su expresión ya no está regulada por las vías normales. La transformación celular ocurre cuando estos genes se expresan

inapropiadamente, fuera de sus restricciones naturales. El término "oncogene" ahora abarca mucho más; incluye algunos genes transformantes aislados directamente de tumores humanos así como los genes virales. Además, se han acuñado términos derivados como "anti-oncogene" y "oncogene recesivo" para referirse a genes que previenen la transformación neoplásica, o a genes que se enmascaran cuando se introducen en un genotipo normal. Los genes celulares normales de los cuales se derivaron los oncogenes se llaman "proto-oncogenes", lo que significa que representan a los progenitores de los oncogenes (Bishop, 1985).

Durante los últimos 10 años, el estudio de los oncogenes y sus productos ha revelado que los proto-oncogenes participan en algunos aspectos de los procesos de transducción de señales. Funcionan en la transmisión de información entre y dentro de las células. Pueden actuar como mensajeros polipeptídicos extracelulares, receptores en la superficie de las células, cinasas de proteínas, proteínas G y factores nucleares de transcripción. Esto no es sorprendente si observamos al cáncer como una disfunción en los procesos de comunicación entre las células. La célula cancerosa no responde, o lo hace mal, a señales ambientales y esta falla se traduce en un crecimiento desordenado. El hallazgo sorprendente es que las mismas moléculas que median la regulación del crecimiento participan en otros procesos, como son el mantenimiento celular, la diferenciación y la fisiología neuronal y endócrina.

2. La proteína Fos

El término *fos* se utilizó inicialmente para describir al oncogene codificado por el virus murino osteogénico del sarcoma de Finkel-Biskins-Jenkins (FBJ-MSV) (Curran and Teich, 1982). Como otros retrovirus oncogénicos, FBJ-MSV se derivó por recombinación de secuencias retrovirales con la información genética celular. A la secuencia celular normal de donde se derivó el oncogene viral (*v-fos*) se le llamó proto-oncogene *fos* o *c-fos* (Curran et al, 1983). Aunque se produjeron mutaciones en la generación de *v-fos* (Van Beveren, et al., 1983), no son necesarias para la función de transformación. La expresión sin control de *c-fos* también causa la transformación celular (Miller, et al, 1984. Lee, et al, 1988). Al principio fue difícil interpretar esta observación, ¿cómo podía una proteína proveniente de una célula no cancerosa producir cáncer?. Ahora está claro, sin embargo, que en muchos tipos celulares el nivel de la expresión de Fos está regulado y que las células están expuestas a niveles elevados de Fos solamente por periodos de unos cuantos minutos (Curran, 1988). Así, la transformación celular por Fos resulta de una expresión prolongada o sin control de la proteína. Los detalles moleculares exactos responsables de la transformación no se conocen aún. Se supone que hay genes blanco en las células transformadas que son regulados por Fos que llevan a una forma de estimulación autócrina de la proliferación celular.

La observación de que *fos* codifica para una proteína nuclear fue la primera evidencia de que Fos pudiera estar involucrado en la regulación de la expresión genética. Esta impresión fue reforzada por el hecho de que Fos estaba asociado a la cromatina y que podía unirse *in vitro*

al DNA acoplado a celulosa (Sambucetti y Curran, 1986). El gene *c-fos* codifica para una proteína de 62 kDa sujeta a varias modificaciones post-traduccionales, las cuales incluyen fosforilaciones en serina y treonina (Barber y Verma, 1987). Cabe mencionar que la proteína cinasa A y la proteína cinasa C son capaces de fosforilar a Fos *in vitro*. Fos forma parte de un complejo proteico con otra proteína llamada Jun, el producto del proto-oncogene *c-jun* (Rauscher et al, 1988). El complejo formado por las proteínas Fos y Jun constituye el factor de transcripción AP-1. Ambas proteínas están unidas entre sí por un cierre de leucinas. Este dominio, descrito primero como una secuencia con una leucina cada siete residuos, forma una estructura de rizo, con dos alfa hélices paralelas. Las leucinas conservadas están acompañadas de residuos hidrofóbicos en posiciones alternadas y permiten la interacción de un lado de una alfa hélice con otra, dando como consecuencia una interacción estable entre los dos polipéptidos unidos (Alber, T., 1992).

Por otro lado, anticuerpos dirigidos contra Fos son capaces de inmunoprecipitar un grupo de antígenos relacionados con Fos (Fra) y también algunas otras proteínas asociadas a Fos (Fap) (Franza, 1987). Algunos genes de proteínas relacionadas con Fos han sido clonados y secuenciados, mostrando algunas regiones de similitud con Fos, incluyendo el dominio de unión al DNA y la región del cierre de leucinas. La familia de proteínas Fos ahora incluye a siete miembros: las proteínas retrovirales FBR-v-Fos y FBJ-v-Fos y las proteínas celulares c-Fos, FosB, FosB2, Fra1 y Fra2. Cuatro de éstas (FBR-v-Fos, FBJ-v-Fos, c-Fos y FosB) son capaces de transformar líneas celulares de fibroblastos de ratón, mientras que las tres restantes (FosB2, Fra1 y Fra2) no lo hacen. Todos los miembros de la familia que si provocan transformación tienen un dominio de transactivación en el extremo carboxilo

terminal que no está en los otros miembros de la familia. Por otro lado, entre estas proteínas hay diferencias en la zona básica del cierre de leucinas, y afectan tanto la afinidad como la especificidad de unión a la secuencia blanco en el DNA (Wisdom, R., 1993). Como *c-fos*, *c-jun* es miembro de una familia multigénica que incluye *junB* (Ryder et al, 1988) y *junD* (Ryder et al, 1989). Se sabe que todos los miembros de la familia Jun pueden formar complejos con los miembros de la familia Fos y que el heterodímero interactúa con secuencias específicas llamadas sitios AP1 en diferentes genes. Algunos estudios han demostrado que no todas las combinaciones de Fos y Jun tienen la misma capacidad de unirse al sitio AP1 del DNA y que la combinación que en cierto momento se encuentra en la célula es la determinante para la respuesta a las hormonas.

Un ejemplo donde se aprecia la importancia de las combinaciones formadas es la respuesta de los fibroblastos NIH3T3 al suero. Poco después de la estimulación las proteínas Fos más abundantes son *c-Fos* y *FosB*, mientras que a tiempos más largos, *Fra1* y *Fra2* son más abundantes (Kovary, 1992). Tanto *Fra1* como *Fra2* forman combinaciones inactivas al unirse a *c-Jun* y *JunB*, así que es posible que el papel de *Fra1* y *Fra2* sea atenuar la respuesta a un nivel previo a la unión al DNA. No está claro el significado biológico de todas las posibles combinaciones de miembros de las familias Fos y Jun. Existen hipótesis que suponen que cada combinación es capaz de reconocer con mayor o menor afinidad al sitio AP1 (Kovary, 1992), pero también hay resultados que indican que puede cambiar el efecto que el dímero Fos-Jun tenga sobre el sitio AP1, encontrándose que algunas combinaciones pueden incluso inhibir la transcripción del gene blanco (Wisdom, 1993).

3. Inducción de la expresión de *c-fos*

En la mayor parte de los tipos celulares, el nivel basal del RNAm de *c-fos* y la expresión de la proteína son relativamente bajos, aunque hay algunas circunstancias excepcionales en las cuales las células mantienen niveles altos de expresión (Cohen y Curran, 1989). En estos tipos celulares, las señales externas se requieren constantemente para mantener los niveles elevados de expresión. Uno de los datos sobre *c-fos* que sugirió su función en los procesos de transducción de señales fue el descubrimiento de que su expresión podía ser inducida de forma transitoria a niveles muy altos (10 o 15 veces sobre el basal) por suero y por factores de crecimiento polipeptídicos (Greenberg y Ziff, 1984, Kruijer et al, 1985, Müller et al 1984). Aunque algunos investigadores interpretaron estos datos sugiriendo que *c-fos* intervenía exclusivamente en la regulación del ciclo celular, quedó claro casi desde el principio que la inducción no estaba necesariamente relacionada con la división celular (Bravo, et al, 1985), pero que sí era una consecuencia inmediata de la estimulación de receptores hormonales. Ahora sabemos que muchos tipos de estímulos, algunos asociados a procesos de diferenciación, y otros asociados a la excitación neuronal, son capaces de inducir de manera transitoria el RNAm de *c-fos* y la proteína (ver más adelante). El curso temporal de la inducción ha sido caracterizado en células tumorales en cultivo: se induce la transcripción desde los cinco minutos de estimulación y ésta continúa por 15-20 minutos (Greenberg y Ziff, 1984). El RNAm se acumula y alcanza un valor máximo a los 30-45 minutos post-estimulación (Müller, 1984), para después ser degradado. Su vida media es muy corta (\approx 12 minutos). La síntesis de la proteína se inicia minutos después de la

transcripción y decae con una vida media de cerca de 2 horas (Müller, 1984). En las células tumorales del feocromocitoma PC12, la inducción de *c-fos* se produce aún en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas, lo que sugiere que las proteínas requeridas para la expresión están presentes en las células no estimuladas y que se activan por modificaciones post-traduccionales. Estos datos llevaron a la clasificación de *fos* y otros genes inducibles rápidamente como el grupo de "genes inmediatos y tempranos" (immediate-early genes, IEG's) por analogía con los genes inmediatos y tempranos de los virus (Lau y Nathans, 1987). Algunos datos recientes indican que Fos por sí mismo, así como algunas proteínas similares a Fos, pueden estar involucradas en la autorrepresión.

Se ha demostrado que algunos elementos localizados en la región 5' no traducida de *c-fos* juegan un papel importante en controlar la inducción de la expresión del gene. Sabemos que hay una interacción compleja entre diferentes señales de segundos mensajeros y la región 5' de *c-fos* (ver la discusión al segundo trabajo, más adelante). Aunque muchos de los estudios sobre la regulación de *c-fos* se han concentrado en los cambios durante el inicio de la transcripción, existe evidencia de que también hay mecanismos de control en la elongación del RNAm (Fort, et al, 1987). Esto abre otra alternativa en el control de los niveles de *c-fos*. Las bases moleculares de esta regulación y su contribución relativa al control de la expresión del gene no se conocen con detalle.

4. Otros genes de expresión inmediata

Los resultados obtenidos con *fos* llevaron a otros grupos a determinar qué otros genes se inducían tempranamente después de estimular con suero a las células tumorales PC12 y a fibroblastos en cultivo. Mildbrant y colaboradores investigaron dos genes inducibles rápidamente en las células PC12 que se denominaron NGFI-A y NGFI-B (Milbrandt, 1987 y 1988). Ambos genes codifican proteínas nucleares que, como Fos y Jun, tienen la propiedad de ser factores de transcripción. NGFI-A codifica para una proteína que tiene un dedo de zinc (Changelian, et al, 1989). El mismo gene se describió con los nombres de *zif268*, *Krox24* y *egr2* por otros grupos. En estos trabajos se observó que el gene es inducible también por ésteres de forbol y por algunos factores de crecimiento, incluyendo al NGF (de allí su nombre). El gene NGFI-B codifica para una proteína perteneciente a la familia de los receptores a esteroides. Además se han descrito otros genes inmediatos que no tienen la capacidad de regular la transcripción génica, como el PC4, que es una citocina parecida a los interferones (Herschman, H. R., 1991).

5. Características de la respuesta transcripcional temprana.

El descubrimiento de que existen muchos genes de inducción rápida ha producido varias interrogantes en los años recientes, por ejemplo, el repertorio de genes inducibles ¿pone limitaciones al fenotipo celular?; para un tipo celular determinado ¿todos los estímulos

inducen el mismo grupo de genes?; si es así, ¿cambian los genes blanco de Fos y Jun dependiendo del tipo celular?; ¿qué determina la respuesta transcripcional de cierto tipo celular?. Sería un error dar una respuesta definitiva a estas preguntas, dado que la información con la que contamos es insuficiente como para hacerlo. En primer lugar, no se tienen estudios en un número suficientemente grande de líneas celulares; los modelos clásicos para este tipo de estudio han sido las células PC12 y los fibroblastos en cultivo, de hecho, casi no existe información sobre este tema en células diferenciadas y funcionales dentro de un organismo. Por otro lado, el estudio de la respuesta transcripcional y su modulación no puede hacerse correctamente sino hasta establecer los eventos moleculares detallados que la desencadenan, por lo tanto, es necesario conocer con cierta certeza los mecanismos de transducción de la señal externa hacia el interior de la célula, las cinasas, fosfatasas u otros intermediarios que sean capaces de llevar la señal desde la membrana plasmática hasta el promotor de los genes de respuesta temprana. Evidentemente, el campo ofrece en la actualidad muchas alternativas y decenas de preguntas interesantes. A continuación se analizan algunos datos que se han obtenido en el intento de responder las interrogantes fundamentales.

Sería prematuro sacar conclusiones acerca de las limitaciones fenotípicas que regulan la expresión de los genes de respuesta temprana. Hasta la fecha no se tienen muchos datos al respecto, pero parece que la mayoría de los genes de respuesta temprana exhiben una inducción estereotipada en casi todos los tipos celulares. Por ejemplo, muchos genes de respuesta temprana se inducen con una gran variedad de estímulos. *c-fos*, *egr-1*, *myb 77* y *PC4* se inducen por mitógenos, NGF, despolarización y neurotransmisores (Herschman,

1989). Herschman y cols. encontraron, caracterizando la expresión de la proteína TIS, que el gene *Tis10* puede ser inducido por una gran cantidad de mitógenos en células NIH3T3 (fibroblastos de ratón), pero no se induce por ningún factor de crecimiento en las células PC12 (de feocromocitoma murino); el gene *Tis10* tiene expresión restringida en las PC12. Otro ejemplo es la expresión de los genes *egr-1* y *egr-2*, que codifican para proteínas similares en estructura y función, y poseen promotores similares también, pero *egr-2* no puede expresarse en las células PC12 (Joseph, et al, 1988).

Un aspecto relacionado con lo anterior que ha despertado interés es la pregunta de si el patrón de genes inducidos depende del tipo de estímulo. El estudio más exhaustivo sobre esta pregunta se ha hecho en las células PC12 (Bartel, et al, 1989), en las cuales se encontró que el NGF y el EGF son potentes inductores de *c-fos*, *c-jun* y *egr-1*, mientras que la despolarización induce *c-fos*, pero tiene un efecto muy débil sobre la inducción de *c-jun* y *egr-1*. En esas células, la despolarización fue un estímulo mucho mejor que el EGF y que el NGF para inducir la cadena B del NGF-B. En astrocitos en cultivo, el gene NGF-1 también tiene regulación diferencial, porque se induce con ésteres de forbol pero no con EGF ó con FGF, en cambio *egr-1* y *c-fos* se inducen con los tres agentes (Arenander, 1989a). Los cultivos secundarios de astrocitos estudiados en este caso, poseen receptores para acetilcolina acoplados al sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio. La activación de esos receptores con carbacol produce la inducción de TIS1 (NGF-B), TIS7, y TIS 8 (NGF-A / *egr-1*) y en cambio sólo una inducción muy débil de TIS 11 y *c-fos* (Arenander, 1989b). Agonistas selectivos para varios receptores adrenérgicos también exhibieron especificidad para el tipo de genes tempranos que son inducidos en estos astrocitos (Arenander, 1989c).

Los agonistas β adrenérgicos inducen la expresión de todos los genes tempranos investigados (excepto TIS7) con cinética igual a la observada con EGF y con ésteres de forbol. Los agonistas α -adrenérgicos también inducen todos los genes tempranos estudiados, incluyendo TIS7, pero de una manera más transitoria que los agonistas beta. El tratamiento de los astrocitos con mezclas de agentes alfa y beta adrenérgicos inducen todos los genes tempranos conocidos y aumentan el tiempo de permanencia de los RNAm en el citosol de éstas células. De esta forma, parece que la eficiencia del acoplamiento entre los diferentes sistemas de segundos mensajeros y los elementos de respuesta en los genes no es la misma. Esta diferencia en el acoplamiento puede ser lo que ocasiona el efecto diferencial de varios inductores sobre *c-fos* y otros genes inducibles, así como lo que provoca las diferencias fenotípicas en la sensibilidad de ciertos genes a ser inducidos con uno u otro agonista. Eso podría explicar, por ejemplo, el hecho de que los ésteres de forbol sean inductores muy débiles de *c-fos* en células PC12 y son potentes inductores en las células humanas SY5Y, provenientes del mismo tipo de tumor (Morgan y Curran, 1991).

6. Señales extracelulares que inducen la respuesta transcripcional temprana

Se han realizado numerosos estudios para probar directamente que, además de las vías que siguen los factores de crecimiento, las vías de transducción que utilizan hormonas y

neurotransmisores también pueden inducir respuestas que involucran al proto-oncogene *c-fos*. La expresión de *c-fos* puede estimularse por ATP en células endoteliales (Boutherin, et al, 1990), por agonistas muscarínicos en células de astrocitoma (Trejo y Brown, 1991), por TNF en la línea celular adipogénica TA1 (Haliday et al., 1991), por angiotensina en células de músculo liso de aorta (Taubman et al., 1989) y por agonistas α y β adrenérgicos en células de miocardio (Iwaki, et al., 1990), entre otros.

Es importante señalar que los modelos experimentales en los que se habían estudiado muchos agentes que inducían el proto-oncogene hasta 1991 era un grupo limitado de líneas celulares, como las NIH 3T3 o las PC12. Sin embargo, durante los últimos 3 años, el número de modelos se ha incrementado, aunque sigue predominando el cultivo celular, siendo casi todas las células de origen neuronal.

En las células PC12, al menos tres vías activan a *c-fos* y son la de recambio de fosfoinosítidos-calcio, la de la adenilato ciclasa y las que involucran fosforilaciones en tirosina como las que siguen el NGF, el EGF, el FGF, y la IL-6 (Greenberg et al, 1985., Satoh, et al, 1988). En células gliales en cultivo, parece que múltiples vías convergen en la inducción de *c-fos* (ver más adelante).

En las células PC12, un determinante intracelular crítico para la inducción de *c-fos* es la concentración libre de calcio. La despolarización por la elevación del potasio extracelular resulta en una inducción del proto-oncogene (Morgan y Curran, 1986). El mismo resultado se obtuvo al despolarizar a las células con veratridina, un alcaloide que mantiene a los

canales de sodio en su estado abierto. A diferencia del NGF, tanto la veratridina como el potasio elevado requieren que haya calcio presente en el medio para que la inducción pueda ocurrir, lo que sugiere que la movilización de calcio dependiente de voltaje es importante para la regulación de este gene. En esta misma línea de pensamiento, se probó que los antagonistas de la calmodulina bloquean la inducción del gene por agentes despolarizantes (Morgan y Curran, 1986). Como se analizará más adelante, cuando se activa el sistema de Recambio de Fosfoinosótidos-Calcio, la concentración intracelular del ión se incrementa, activándose diferentes cinasas dependientes de Calcio-Calmodulina, que probablemente sean las directamente involucradas en la inducción del gene (Morgan y Curran, 1991).

7. Las vías de transducción de señales desde el citosol hasta el núcleo.

¿Cuál es el camino que sigue la señal desde la membrana celular hasta los genes en el núcleo?

La investigación reciente ha demostrado que algunas vías de transducción de señales desde el citosol hasta el núcleo, donde se inducen los genes tempranos, (Hunter, 1992; Thomas, 1992; Montminy, 1993; Egan, 1993; Hunter, 1993) son tortuosas y llenas de intermediarios, mientras que otras son elegantemente directas.

Las tres principales estrategias de flujo de información hacia el interior de la célula e inductoras de los genes inmediatos y tempranos (IEG's) son, hasta ahora, las siguientes (figura 1):

1) La ruta de la cinasa activada por mitógenos (MAP), en donde el paso de la señal lleva a la estimulación de cinasas que se activan y se translocan al núcleo, donde actúan sobre los factores de transcripción existentes y cambian sus afinidades hacia sus sitios de unión al DNA ó sus funciones de transactivación.

2) La vía del factor transductor y activador de la transcripción de 91 kDa (Stat 91), que involucra la fosforilación directa de un factor de transcripción por un receptor hormonal o una cinasa asociada a ese receptor, llevando a la translocación de ese factor al núcleo, donde activa a diferentes genes.

3) La vía del factor nuclear κ B, en donde la fosforilación libera a un factor de transcripción de su ancla citosólica o proteína inhibidora, provocando su translocación al núcleo, la unión a sus genes blanco y al inicio de la transcripción.

Las tres rutas tienen algunas características en común, la más obvia es la fosforilación reversible de algún (os) componentes (Hunter, 1992). Esta característica involucra también la fosforilación de elementos de una vía sobre elementos de las otras, así que no operan de manera independiente y aislada, lo que indica que en lugar de vías, son redes de transducción de la señal las que desencadenan respuestas transcripcionales (Nigg, 1990).

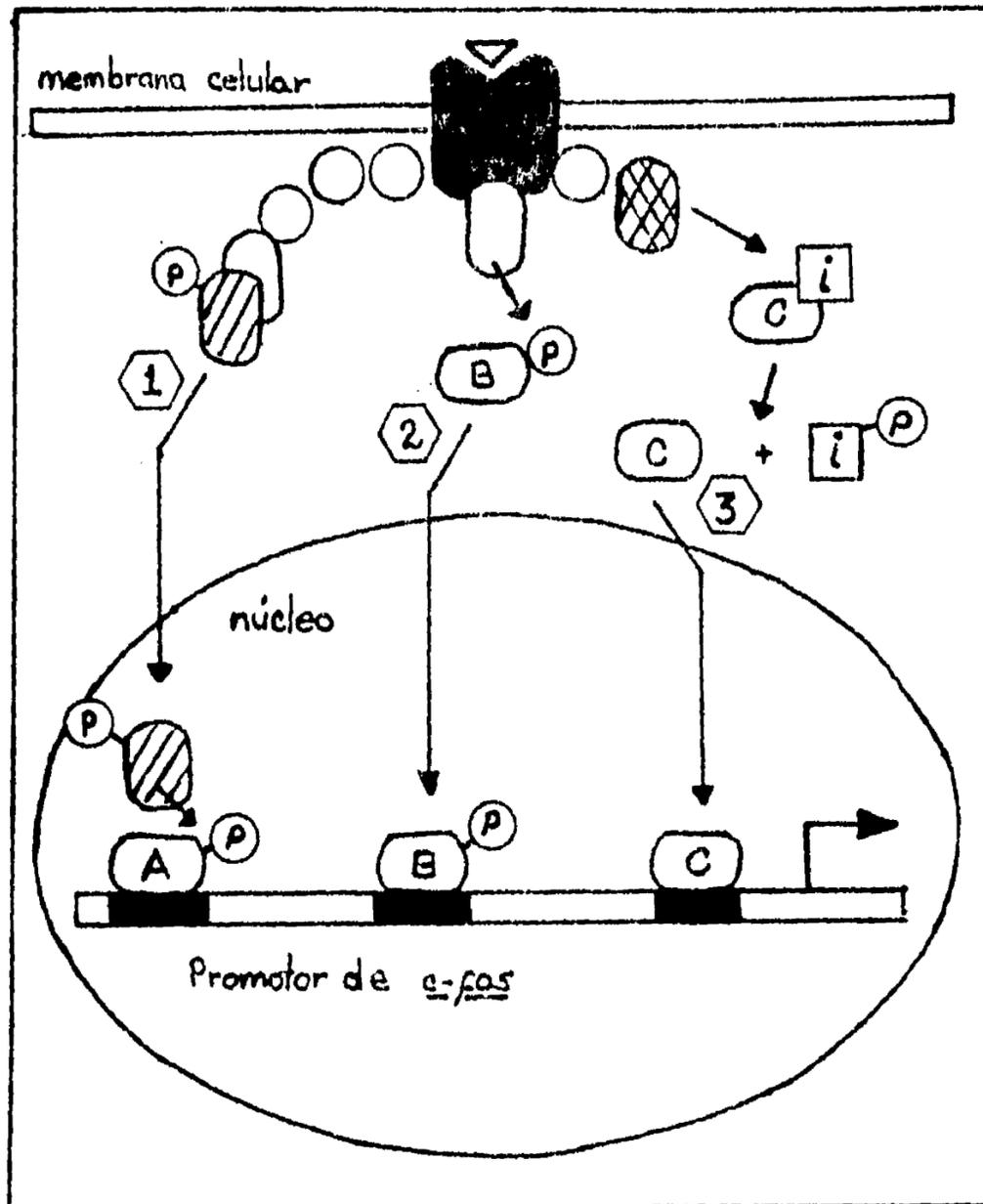


Figura 1. Las tres vías generales del paso de información desde la membrana plasmática hasta el núcleo en una célula de mamífero. El receptor para alguna hormona o factor de crecimiento, una vez activado, puede asociarse con varias proteínas dentro de la célula. El número 1 muestra a la vía de la cinasa MAP, donde una cinasa activada lleva la señal al núcleo y fosforila al factor de transcripción A. Este factor altera sus propiedades de unión a DNA y se fija a una secuencia específica en los genes blanco. El número 2 muestra cómo el factor de transcripción B se activa por la fosforilación por una cinasa de tirosina, translocándose al núcleo. Este es el caso del Stat 91 (ver texto). El número 3 muestra la vía donde el receptor activa a una cinasa que fosforila a la proteína inhibidora de un factor de transcripción inactivo. Esto lleva a la disociación del complejo y a la translocación del factor de transcripción C, como es el caso del factor κ B.

Las interacciones entre elementos de una vía y otra tienen un efecto modulador en la respuesta a largo plazo que se puede observar en un determinado sistema. Estudios recientes han demostrado que por lo menos dos de estas tres vías son las que modulan la expresión de *c-fos* en distintos modelos celulares.

8. Inducción de la respuesta transcripcional temprana en células hepáticas.

El hígado tiene muchas funciones complejas: es el responsable del mantenimiento del suplemento energético del organismo y es la estación de control más importante en el sistema endócrino (Jungerman y Katz, 1989).

El hígado mantiene el abastecimiento energético en un organismo porque 1) captura el exceso de glucosa durante la fase de absorción después de una comida y libera glucosa para uso del sistema nervioso central y los eritrocitos durante la fase de post-absorción; 2) produce cuerpos cetónicos como sustratos energéticos para ahorrar glucosa, que es el sustrato normal, cuando hay periodos largos sin alimento; 3) cataboliza muchos de los aminoácidos ingeridos o derivados del metabolismo muscular; 4) remueve el amonio formado por el rompimiento de los aminoácidos o de los compuestos nitrogenados en el intestino sintetizando urea; y 5) procesando los triglicéridos de la dieta y los ácidos grasos de los adipocitos. Por otro lado, el hígado tiene muchas funciones biosintéticas y degradativas importantes: 1) juega un papel clave en el metabolismo de fosfolípidos y colesterol; 2)

sintetiza y probablemente degrada una parte importante de las proteínas plasmáticas como albúmina, transferrina o factores de coagulación; 3) forma la bilis, lo cual implica la síntesis de los ácidos biliares a partir de colesterol producido por el hígado o proveniente de otros órganos, así contribuye al mantenimiento de las actividades digestivas; y 4) es el órgano más importante para la defensa contra xenobióticos, como drogas o agentes adictivos, transformándolas por diversos procesos químicos para eliminarlas por la orina y la bilis.

Como la estación de control más importante en el sistema endócrino, el hígado 1) degrada la mayor parte de las hormonas circulantes y así contribuye al mantenimiento de los niveles hormonales sistémicos y 2) sintetiza y libera muchos factores humorales, como las somatomedinas.

Todas las funciones hepáticas se llevan a cabo gracias a los diferentes tipos celulares que lo constituyen, células tanto parenquimatosas (los "hepatocitos") como no parenquimatosas (endoteliales, Kupfer, Ito y otras). La actividad de estas células se regula por las concentraciones de sustratos en el torrente circulatorio, los niveles circulantes de hormonas y la innervación autónoma del órgano . Así pues, es uno de los tejidos que mejor responden a una gran colección de mensajeros químicos que viajan por la sangre, y el conocer los efectos que sobre el hígado tienen las diversas hormonas es de gran importancia en la endocrinología actual.

Como se ha venido mencionando, es en el sistema nervioso en donde se han realizado mayor número de experimentos encaminados a caracterizar la inducción temprana de genes como c-

fos. Sin embargo, de otros sistemas y tejidos, como el hepático, se sabe muy poco. Se sabe que la expresión de varios oncogenes se encuentra incrementada en hepatocarcinomas humanos y de rata (Corcos, et al, 1984., Fausto y Shank, 1983., Guguen-Guillozo, et al, 1988). Entre esos oncogenes se encuentran *c-fos* y *c-myc* y se sabe que la sobreexpresión de éstos no es un requisito necesario para el mantenimiento del estado tumoral. Por otro lado, en el estado de regeneración por hepatectomía parcial y en hepatocitos en cultivo, se ha reportado la inducción de *c-fos* (Kruijer et al., 1986).

En nuestro laboratorio se realizaron experimentos para determinar la inducibilidad del proto-oncogene *c-fos* en hepatocitos frescos de rata, utilizando la hibridación de sondas específicas para cada gene de nuestro interés, con el RNA total de las células tratadas con diferentes agentes. En dicho trabajo, (González-Espinosa, 1992), quedó demostrado que la hormona Angiotensina II y el agente promotor de tumores Forbol Miristato Acetato (PMA) inducen una respuesta genética temprana que involucra la expresión de *c-fos*, *c-mos*, *c-myc* y β actina, sin alterar la expresión del gene de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

Este efecto de la hormona Angiotensina II sobre células hepáticas no había sido demostrada hasta esa fecha y se trataba de un resultado muy interesante, puesto que todos los efectos de la angiotensina caracterizados en el hígado eran a corto plazo, y no involucraban transcripción genética (González-Espinosa y García-Sáinz, 1992).

9. La hormona Angiotensina II

La Angiotensina II (Angio II) es una hormona octapeptídica que juega un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis de electrolitos y de la función cardiovascular. Es un mensajero vasoconstrictor que afecta numerosos órganos, incluyendo las paredes vasculares, las glándulas suprarrenales, el riñón, el hígado, el cerebro y las gónadas. Sus efectos están mediados por receptores con estructura similar a los acoplados a proteínas G (con siete segmentos transmembranales). Aunque la hormona se conoce por su papel en la función cardiovascular y la homeostasis de fluidos, se ha acumulado evidencia de que la Angio II también participa en la neurosecreción, la proliferación y la diferenciación celular.

A la fecha se han caracterizado tres formas de angiotensina, a las que por convención se les ha denominado tipo I, II y III. Estas hormonas se sintetizan a partir de una proteína plasmática, el angiotensinógeno, sobre la cual ejerce acciones hidrolíticas la renina, produciendo un decapeptido inactivo denominado angiotensina I (AI). Cuando la AI se hidroliza por la enzima convertidora de angiotensina se produce la forma activa que corresponde a la angiotensina II. La Angiotensina II es sensible a proteólisis y cuando se hidroliza por una aminopeptidasa específica (para ácido aspártico), se origina la angiotensina III, que es un compuesto bioactivo, en general mucho menos potente que la Angio II. Finalmente, la inactivación de las angiotensinas ocurre por la acción de varias peptidasas (ver figura 2). La importancia fisiológica de la Angio II se manifiesta por el hecho de que sus receptores están distribuidos por todos los tejidos. Clínicamente, el papel

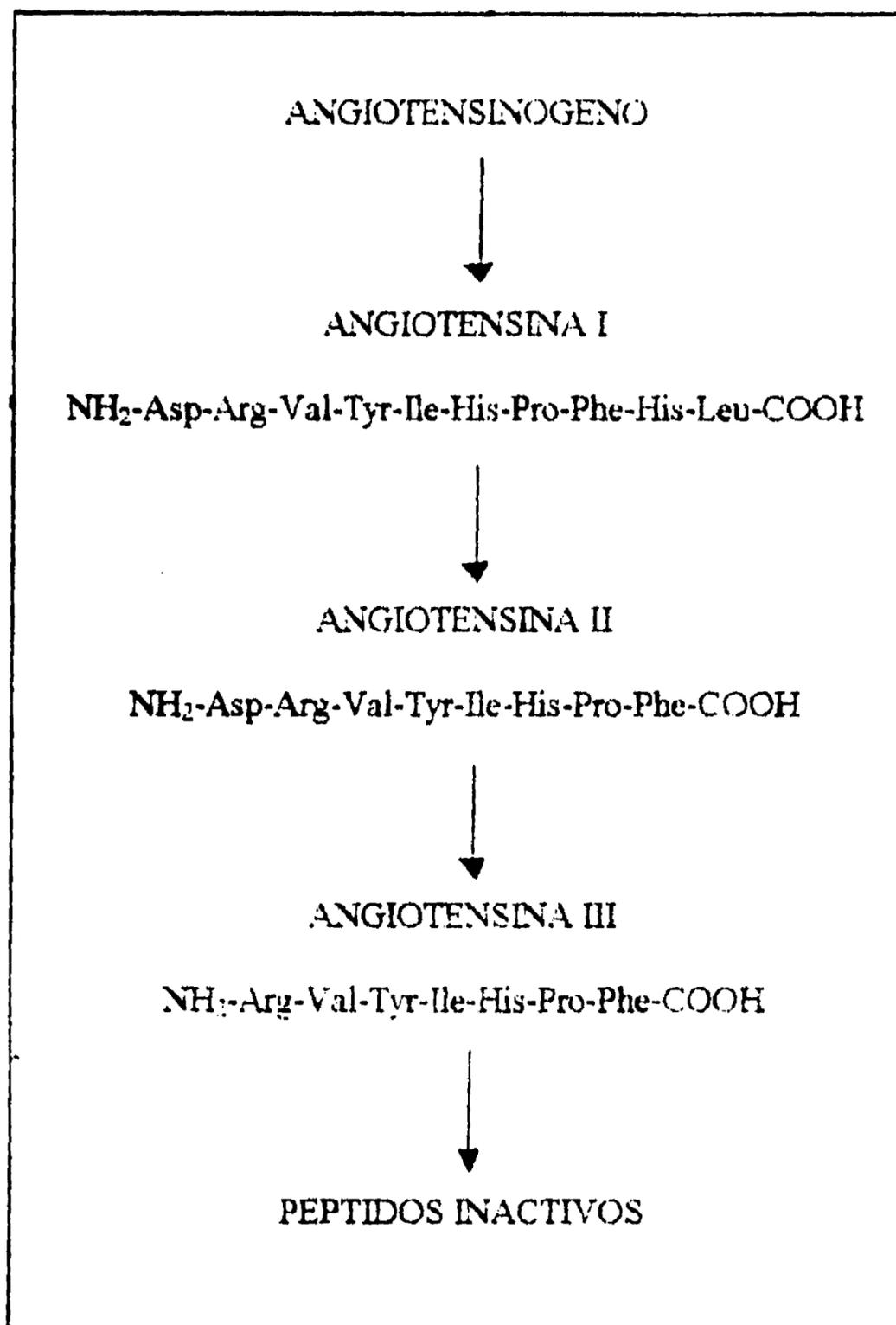


Figura 2. Síntesis y degradación de las diferentes Angiotensinas.

de Angio II en la hipertensión arterial y en las enfermedades cardiovasculares la han convertido en un blanco de mucha importancia para el tratamiento terapéutico. La inhibición farmacológica de la síntesis de Angio II usando inhibidores de la enzima convertidora de la Angiotensina ha sido una terapia muy efectiva contra la hipertensión arterial (Sandberg, 1994).

10. Tipos de receptores para Angiotensina

Hay dos clases de receptores para Angio II distinguibles farmacológicamente (AT_1 y AT_2), de los cuales la clase AT_1 es, aparentemente, la responsable de muchos de los efectos fisiológicos de la Angio II; aunque algunas funciones relacionadas con los receptores AT_2 comienzan a ser encontradas (Wong et al, 1992). Sabemos que los receptores para Angio II presentes en el hígado de la rata pertenecen al tipo AT_1 (García-Sáinz y Maclás-Silva, 1990).

La caracterización fina del receptor AT_1 se logró con un sistema de clonación por expresión en células COS-7. Se clonaron casi al mismo tiempo el de rata (rAT_{1a}) (Murphy et al, 1991) y el de vaca (bAT_1) (Sasaki et al, 1991). Subsecuentemente se clonaron los cDNAs de otras especies de mamíferos, incluyendo otro de rata (rAT_{1b}) (Sandberg et al, 1992), ratón (mAT_{1a} y mAT_{1b}) (Sasamura et al, 1992), conejo ($rbAT_1$) (Burns et al, 1993), cerdo (pAT_1) (Itazaki et al, 1993) y perro (dAT_1) (Clark et al, comunicación personal a Sandberg, 1994). Todos los cDNAs que se han clonado codifican para una sola cadena polipeptídica de 359 aminoácidos con un peso molecular de 41, 000 Da. El análisis de hidrofobicidad indica que posee siete

segmentos transmembranales, una estructura típica de los receptores acoplados a proteínas G (figura 3). Recientemente, los cDNAs para dos receptores de anfibio α AT₁ (Ji et al, 1993) y β AT₁ (Bergsman et al, 1993), y uno de ave (tAT) (Murphy et al, 1993) han sido clonados y secuenciados. Los receptores que no son de mamífero son farmacológicamente distintos de los que sí lo son..

Con base en estudios de mapeo por hibridación tipo Southern y de clonas genómicas, se ha encontrado solamente un gene para el receptor AT₁ en humanos (Bergsma et al, 1992), conejos (Burns et al, 1993), y pavos (Carsia et al, 1993), mientras que en ratas (Elton et al, 1992), ratones (Sasamura et al, 1992) y ranas (Ji et al, 1993) se han encontrado dos genes.

Analizando el RNAm en varias especies de mamíferos y en diferentes tejidos se ha encontrado que existen múltiples RNAm del receptor AT₁: en ratas, cerdos y conejos predomina una especie molecular de 2.3 kb, mientras que en la cabra predomina una forma de 3.3 kb. La presencia de diferentes mensajeros puede ser el resultado de un procesamiento diferencial de algún precursor o distinto grado de poliadenilación.

11. Sistemas de transducción activados por Angiotensina II

Los receptores α AT₁ se han expresado de manera estable en células CHO y se ha demostrado que unen a su ligando con una afinidad similar a la de las células con el receptor nativo. En ese estudio de transfección se encontró que estos receptores están acoplados a

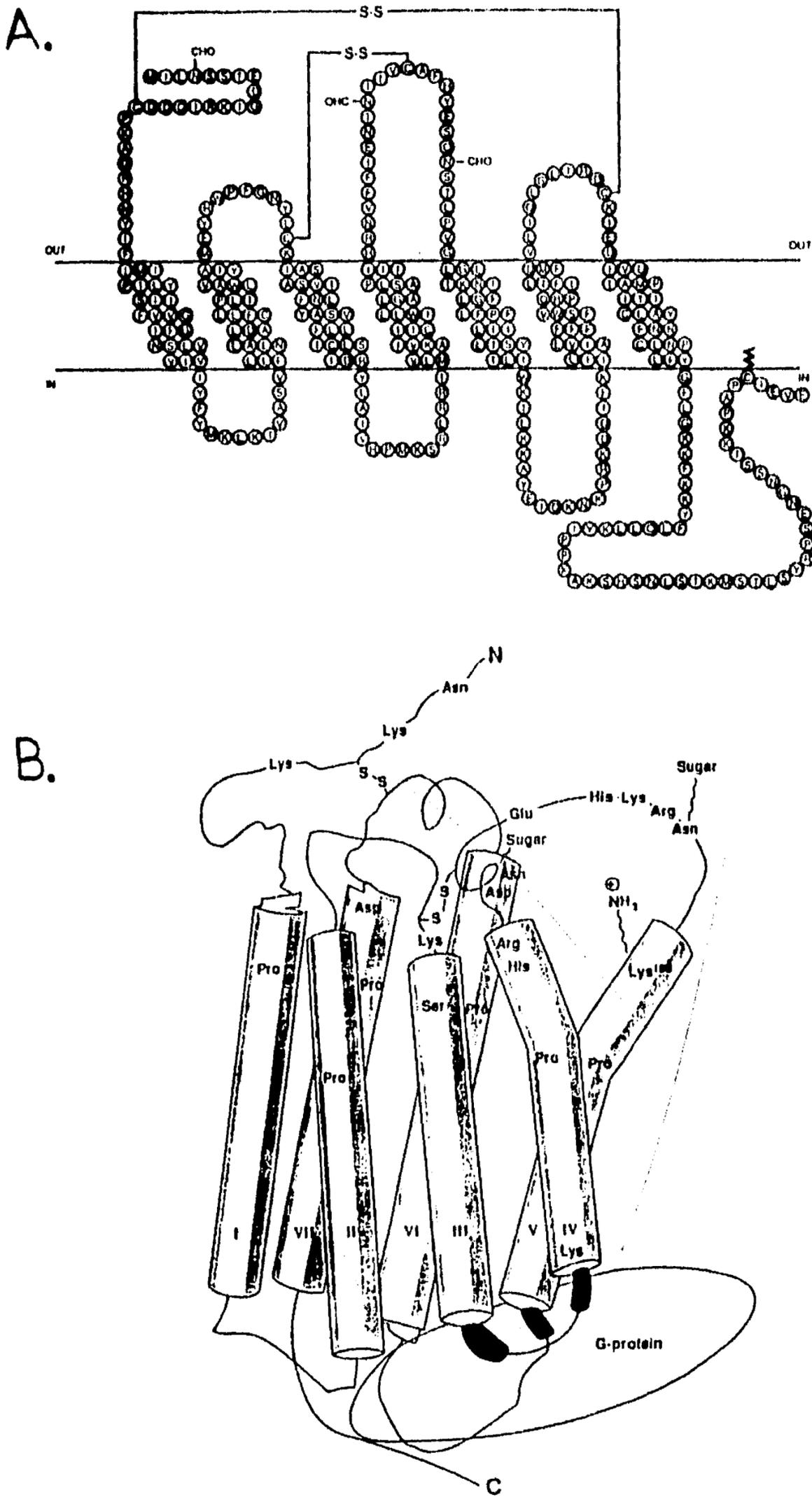


Figura 3. Estructura del receptor AT₁ para angiotensina. Panel A. Se muestra el modelo del receptor AT₁ de bovino, resaltando sus siete dominios transmembranales y la tercera asa citosólica, que es muy pequeña. Deben observarse los dos puentes disulfuro que le confieren sensibilidad a los agentes reductores, como el ditiotreitól. Panel B. Modelo tridimensional del receptor AT_{1A} de rata.

través de proteínas G, a la producción de fosfatos de inositol y la movilización de calcio (sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio) por un lado, y a la inhibición de la adenilato ciclasa por otro. Los receptores AT_1 median el incremento en la síntesis de DNA, el crecimiento celular y la activación de canales de calcio sensibles a las dihidropiridinas (Tetusch et al, 1992; Ohnishi et al, 1992).

Otros estudios han demostrado que la hormona es capaz de inducir fosforilación en tirosinas de varias proteínas, al igual que algunos factores de crecimiento como EGF y PDGF (Huckle et al, 1992). También se ha demostrado que la Angio II activa a la fosfolipasa D (Lassègue et al, 1991); a la fosfolipasa A_2 (Douglas et al, 1990) y que inhibe canales de potasio (Quinn et al, 1987). Estos datos indican que un solo tipo de receptor para la hormona puede estar acoplado a más de una vía de transducción de señales (ver figura 4) (Dohlinan et al, 1991).

Se ha demostrado además que la hormona es capaz de inducir la expresión de genes tempranos durante la diferenciación de células musculares de las paredes de los vasos sanguíneos, por lo que se le considera, para éste tejido, como un factor de crecimiento (Taubman et al, 1989).

En las células del hígado, se ha probado que los receptores para Angio II están acoplados al recambio de fosfoinosítidos-Calcio y a la inhibición de la adenilato ciclasa (figura 5). No se conocen los efectos a largo plazo de la hormona sobre estas células.

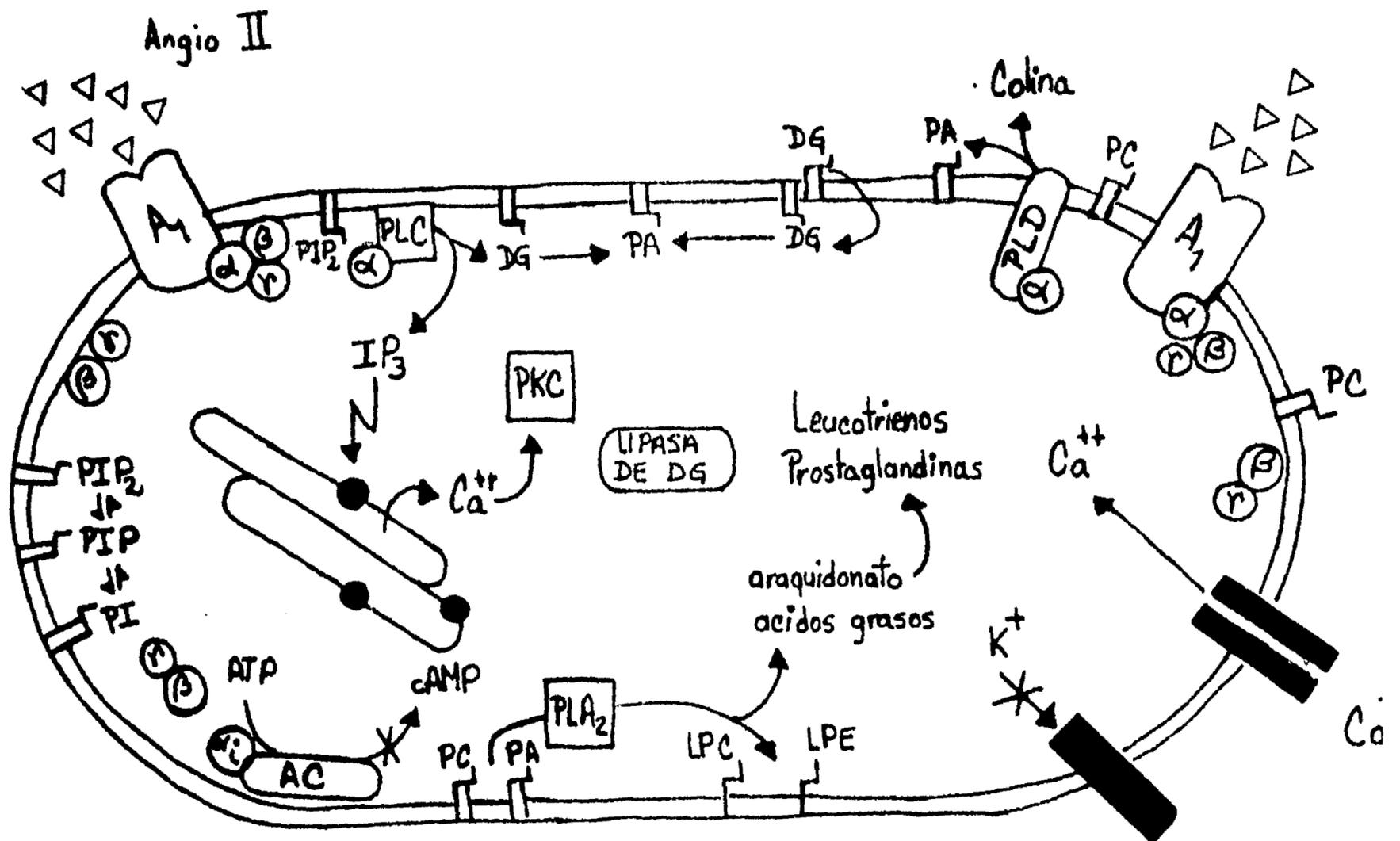


Figura 4. Vías de transducción acopladas al receptor AT₁. La hormona Angiotensina II se une al receptor AT₁ (R), el cual activa a las fosfolipasas C (PLC), D (PLD), y A₂ (PLA₂) e inhibe a la adenilato ciclasa (AC). El receptor está acoplado al efector por medio de proteínas G (los trimeros están representados por α, β y γ). α inhibe a la adenilato ciclasa, disminuyendo la síntesis de AMP cíclico a partir del ATP. La fosfolipasa C hidroliza al fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), un metabolito del fosfatidil inositol (PI), para producir inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DG). El IP₃ se une a un receptor específico que induce la liberación de calcio de compartimientos intracelulares. El calcio y el diacilglicerol activan a la proteína cinasa C (PKC). La fosfolipasa D hidroliza fosfatidilcolina (PC) hasta ácido fosfatídico (PA) y colina. PA y DG se pueden interconvertir: el segundo se puede degradar hasta ácidos grasos y glicerol por la lipasa del diacilglicerol. La fosfolipasa A₂ hidroliza la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina (PE) hasta los lisofosfolípidos correspondientes (LPC y LPE), y ácidos grasos. Un ácido graso que frecuentemente se libera por la PLA₂ y la lipasa del DG es el ácido araquidónico, un precursor de leucotrienos y prostaglandinas. Angiotensina II también puede abrir canales de calcio a través de los cuales entra calcio extracelular y cierra canales de potasio, inhibiendo la difusión del potasio celular hasta la parte extracelular.

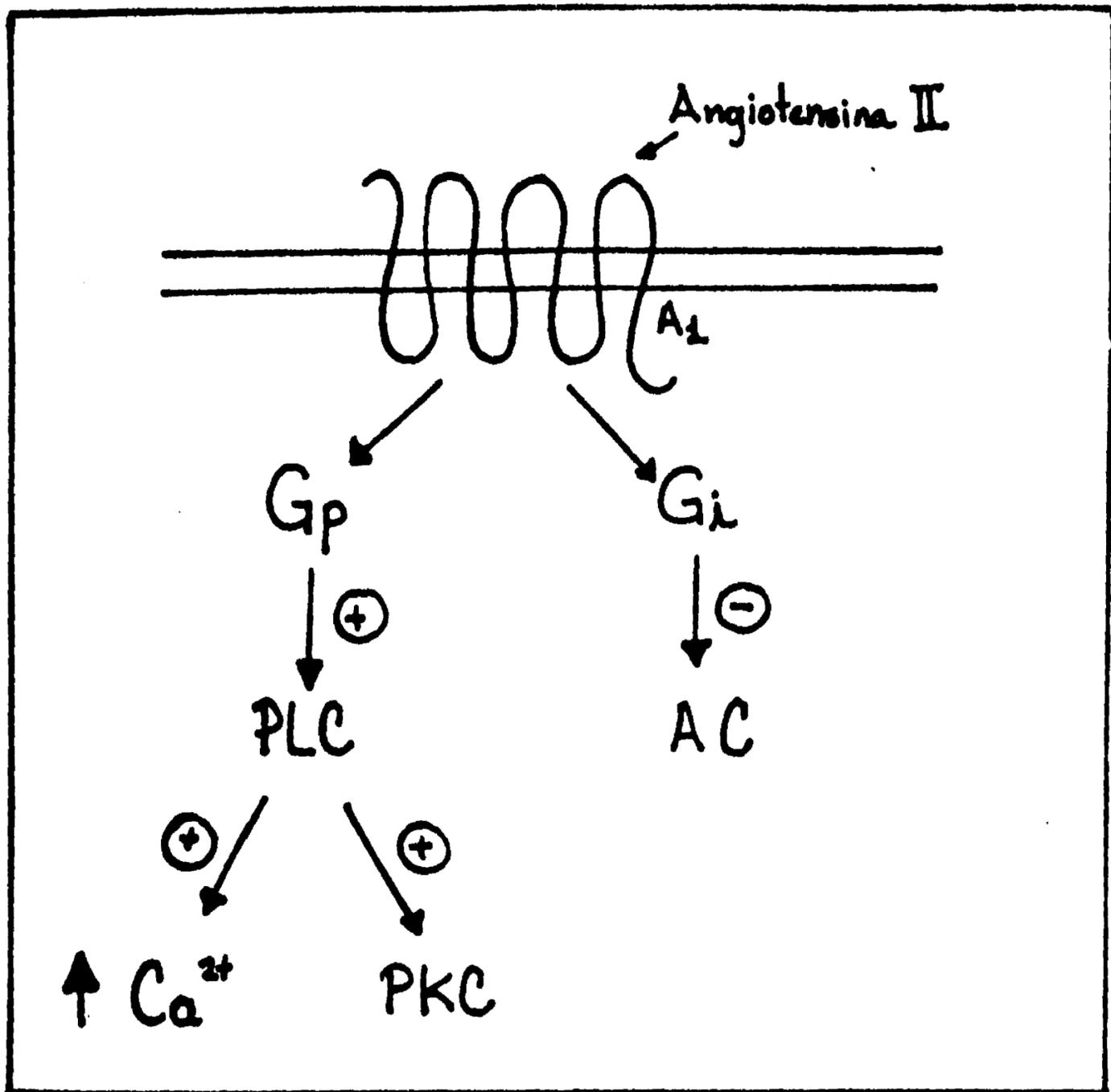


Figura 5. Vías de transducción a las que está acoplado el receptor AT₁ en hepatocitos. En este tipo celular en presencia de Angiotensina II se induce el recambio de fosfoinosítidos y la liberación de calcio por una proteína G_p, por un lado, y se inhibe a la adenilato ciclasa via una proteína G_i, por el otro.

12. El forbol miristato acetato (PMA)

La proteína cinasa C (PKC) es una enzima clave en el sistema de transducción de recambio de fosfoinosítidos-calcio (activado por Angio II en hepatocitos), ya que se activa de manera sinérgica con el diacil-glicerol producido por la ruptura del inositol 4, 5 bifosfato y con el calcio liberado por el IP₃ del retículo endoplásmico de la célula. Esta enzima es la encargada de fosforilar a una serie de intermediarios que amplifican la señal hormonal en el interior de la célula (figura 6). La PKC sirve también como receptor para promotores de tumores: los ésteres de forbol. Entre éstos compuestos diterpénicos se encuentra el forbol miristato acetato (PMA) (figura 7) obtenido de la semilla del árbol *Croton tiglium*, contiene en su estructura una zona similar a la del diacilglicerol, se intercala rápidamente en la membrana y activa directamente a la PKC tanto *in vivo* como *in vitro*. Como el diacilglicerol, los ésteres de forbol aumentan la afinidad de la enzima por el calcio, sin embargo no se metabolizan rápidamente y sus efectos pueden ser de larga duración (Castagna et al., 1982).

En el hepatocito de rata, además del PMA, otros agentes promotores de tumores y activadores de la proteína cinasa C, como el forbol dibutirato (PDB) y el orto-metil PMA inducen también la expresión de *c-fos* (González-Espinosa y García-Sáinz, 1992). El hecho de que los ésteres de forbol tengan algún efecto en la inducción del gene, sugiere la participación de la proteína cinasa C en el fenómeno observado. De esta forma, una posible

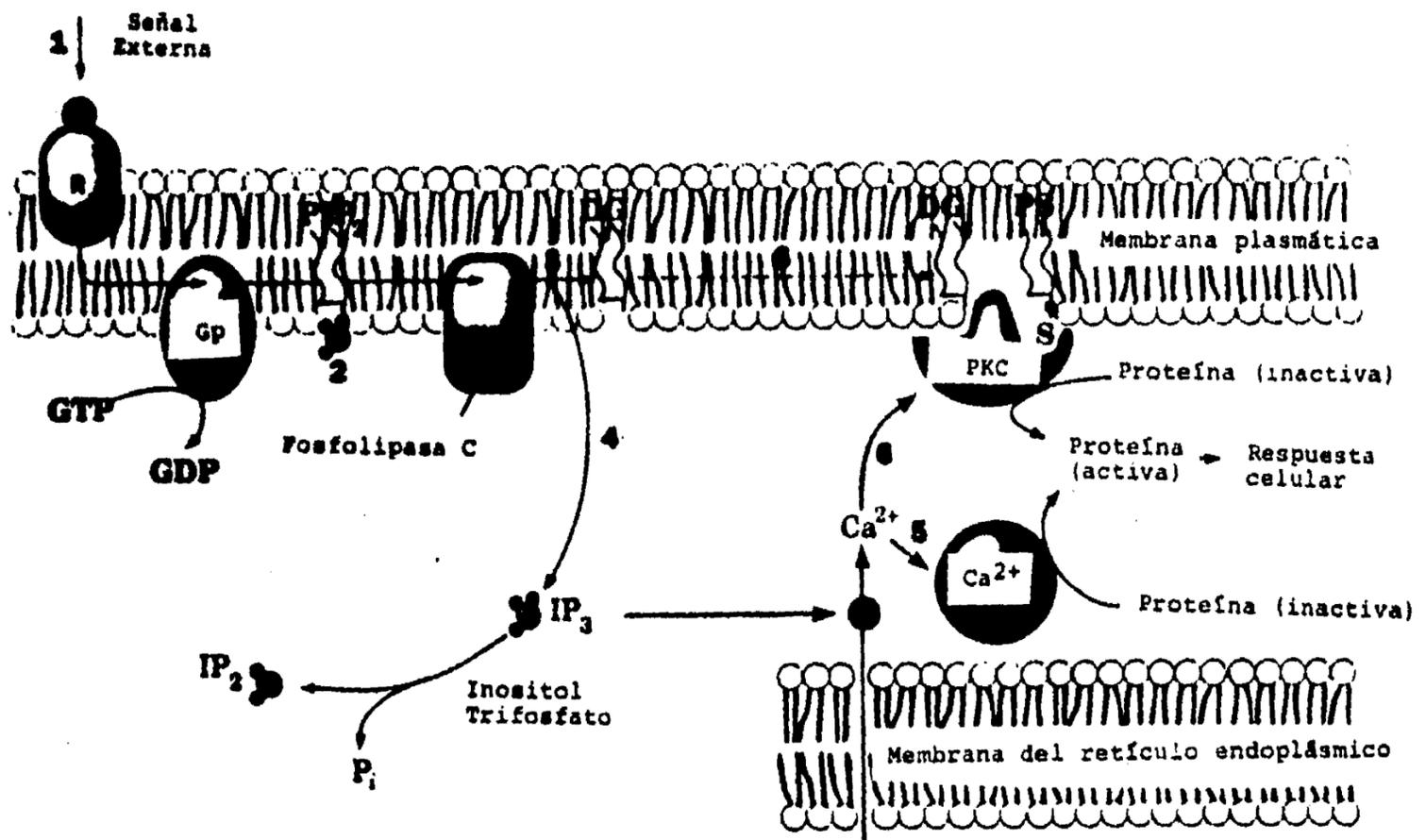


Figura 6. La Proteína Cinasa C (PKC) es una enzima clave en el Sistema de Recambio de Fosfoinosítidos-Calcio. Este sistema se activa cuando una hormona se fija a su receptor en la membrana plasmática, provocando que se acople a una proteína G heterotrimérica. La proteína G se disocia entonces en dos: la subunidad α y el complejo $\beta\gamma$. Las subunidades de la proteína G activan a la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza al fosfatidilinositol 4, 5, bifosfato (PIP_2), convirtiéndolo en diacilglicerol (DG) y fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato (IP_3). El IP_3 promueve la liberación de calcio de depósitos intracelulares y este calcio, junto con el diacilglicerol y la fosfatidil serina (PS), activan a la PKC. La enzima es una cinasa en serina-treonina que tiene varios sustratos intracelulares, es la encargada de iniciar una cascada de fosforilación en respuesta a un ligando particular. Esta enzima puede ser activada directamente por el PMA, así que cuando se añade el éster de forbol, se logra incrementar su actividad sin aumentar la concentración de calcio dentro de la célula.

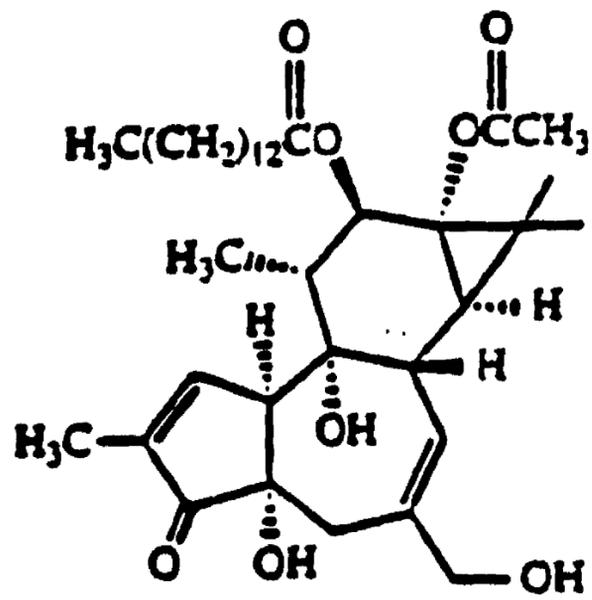


Figura 7. La estructura del Forbol Miristato Acetato (PMA).

explicación a la inducción de *c-fos* por Angio II y PMA es que la hormona actúe a través del sistema de recambio de IP_3 -Calcio.

13. Otros antecedentes

En los hepatocitos de rata, la acumulación del RNAm del proto-oncogene *c-fos* por la hormona Angiotensina II (Angio II) se inhibe por el antagonista selectivo para el subtipo de receptor AT_1 , Losartán, con una K_i aprox. de 25 nM. La hormona Angio II fue más potente que la vasopresina o la epinefrina en inducir la respuesta del proto-oncogene, lo que sugiere que los receptores para Angio II pueden estar acoplados a efectores distintos a los de otras hormonas que también movilizan calcio intracelular en el hígado de rata. El efecto del PMA y de la Angio II sobre *c-fos* es un efecto rápido, con tiempos medios de 7 y 12 minutos, respectivamente.

El pre-tratamiento con el inhibidor de la transcripción actinomicina D disminuye enormemente el basal del mensajero de *c-fos* mientras que el pre-tratamiento con cicloheximida tiene el efecto contrario. La actinomicina D disminuye el efecto del PMA y de la Angio II, pero no los bloquea por completo. Además, el PMA y la Angio II estimulan la acumulación del mensajero de *c-fos* sobre el incremento observado con cicloheximida sola (figura 8). Esos datos sugieren que el PMA y la Angio II son capaces de inducir tanto la transcripción como la estabilización del mensajero del proto-oncogene (González E., y García-Sáinz, J. A., 1992).

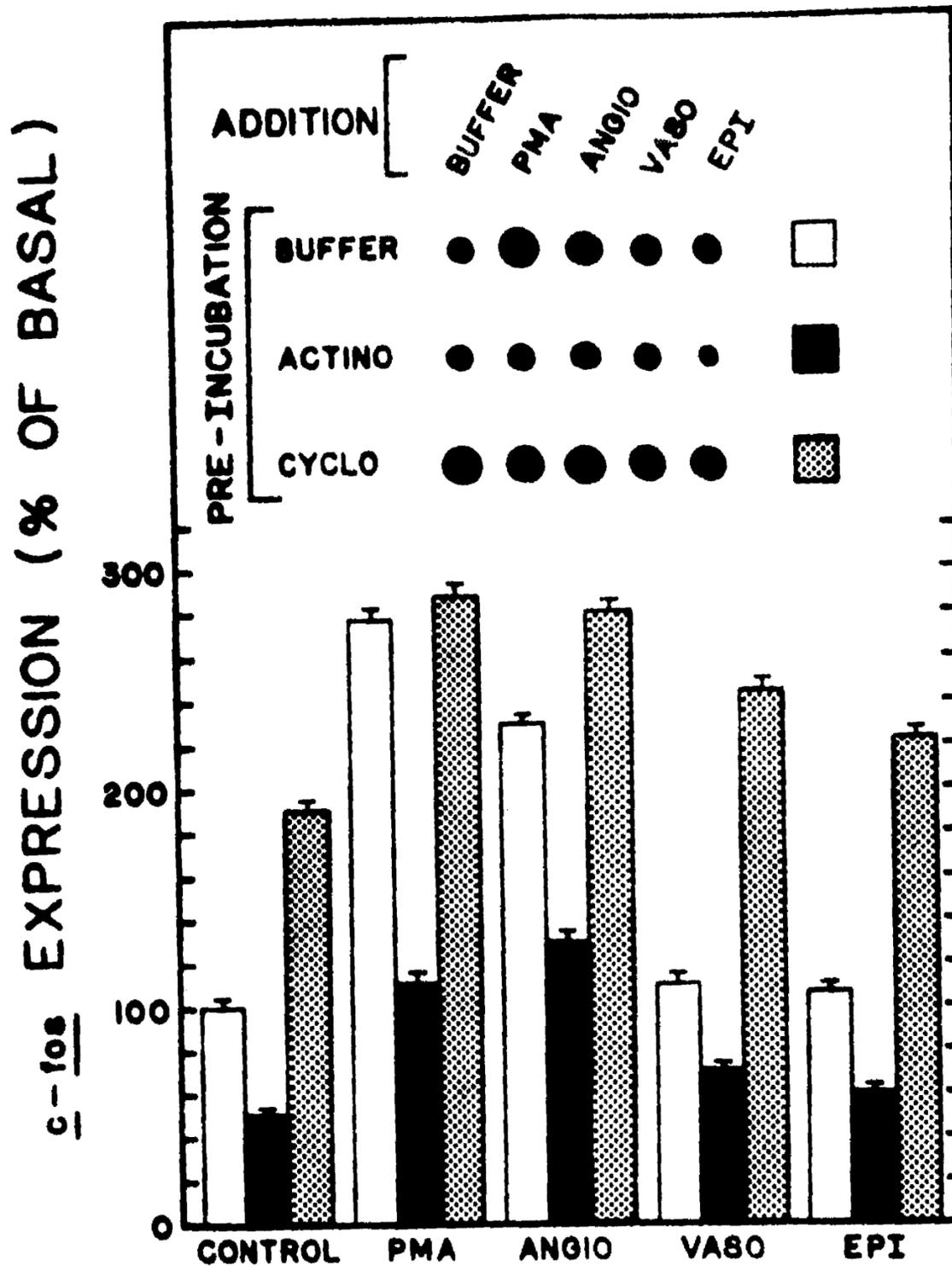


Figura 8. El efecto de la Actinomicina D y la Cicloheximida en la expresion de *c-fos*. Los hepatocitos se pre-incubaron durante 15 minutos en ausencia (Buffer, barras blancas) o en presencia de 5µg/ml de actinomicina D (Actino, barras negras) o 10µg/ml de cicloheximida (Ciclo, barras punteadas). Después de esta pre-incubación, se añadieron los siguientes agentes: buffer (CONTROL); PMA 1µM (PMA); Angiotensina 100nM (ANGIO); Vasopresina 10nM (VASO); o Epinefrina 10µM (EPI), la incubación se mantuvo durante 30 minutos más y se extrajo el RNA total para ser hibridado. Los resultados estan normalizados con los datos obtenidos de células pre-incubadas e incubadas con buffer solo (100%).

Decidimos estudiar con más detalle el mecanismo de inducción de *c-fos* por Angio II y PMA en hepatocitos de rata, analizando aspectos tales como el papel de diferentes cinasas y fosfatasa, el papel de la inducción transcripcional y la posible participación de la estabilización del RNAm en este incremento del proto-oncogene. El sistema que utilizamos para la detección del proto-oncogene fue la hibridación del RNA total de hepatocitos tratados con los agentes de interés con una sonda de 615 pb del exón 4 de *c-fos* humano. Si bien esta sonda puede dar reacción cruzada con *fosB* y *fra1* humanos, las condiciones de hibridación utilizadas fueron muy estrictas y dan como resultado una sola banda de hibridación en experimentos tipo Northern en este sistema celular. Sin embargo, hay que hacer notar que los resultados que a continuación se mencionan, deben ser interpretados tomando en cuenta que la señal de hibridación puede provenir de uno o varios miembros de la familia Fos.

OBJETIVOS

Pretendemos estudiar los siguientes aspectos del mecanismo molecular de la expresión del proto-oncogene *c-fos* por Angiotensina y PMA en hepatocitos de rata:

- 1. El papel de las fosfatasas en el control de la expresión de *c-fos* en hepatocitos, utilizando inhibidores de esas fosfatasas.**
- 2. El papel de las cinasas de serina-treonina en el control de la expresión del proto-oncogene por la Angio II y el PMA, utilizando inhibidores de cinasas en serina-treonina.**
- 3. El papel de las cinasas en tirosina en el control de *c-fos* por la Angio II y el PMA, utilizando inhibidores específicos para este tipo de cinasas.**
- 4. Las etapas de la expresión genética que son moduladas por la Angiotensina II y el PMA para permitir la acumulación del RNAm del proto-oncogene *c-fos* (transcripción y estabilización del RNA mensajero del proto-oncogene).**

RESULTADOS

Los resultados de la investigación se resumen en los siguientes trabajos. El primero de ellos ha sido publicado en la revista Life Sciences.

Los materiales y métodos utilizados se detallan en cada manuscrito y en las referencias que ahí se señalan.



**PROTEIN KINASES AND PHOSPHATASES MODULATE *c-fos* EXPRESSION
 IN RAT HEPATOCYTES. EFFECTS OF ANGIOTENSIN II
 AND PHORBOL MYRISTATE ACETATE.**

Claudia González-Espinosa and J. Adolfo García-Sáinz

Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología
 Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.
 Apartado Postal 70-248; 04510 México D. F.

(Received in final form December 19, 1994)

Summary

In isolated rat hepatocytes angiotensin II and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) induce the expression of *c-fos*. We studied the possible transduction pathway(s) involved in this effect using inhibitors of serine-threonine and tyrosine protein kinases. Calphostin and staurosporine, inhibitors of protein kinase C and other serine-threonine protein kinases, block in a dose-dependent manner the effect of angiotensin II and PMA. Interestingly, genistein also blocks the induction of this proto-oncogene, suggesting a role for tyrosine protein kinases.

Inhibitors of serine-threonine protein phosphatases, such as okadaic acid, microcystin LR and calyculin also induce *c-fos* expression. These data suggest that protein phosphatases exert a tonic inhibitory control of *c-fos* expression. The effect of these phosphatase inhibitors were not blocked by staurosporine, calphostin or genistein. Our results suggest that the expression of *c-fos* in rat hepatocytes is regulated by complex phosphorylation-dephosphorylation cascade(s) probably involving serine/threonine and tyrosine protein kinase and protein phosphatase activities.

Key Words: protein kinase, *c-fos* expression, hepatocytes, angiotensin II, phorbol myristate acetate

It is now clear that many hormones and neurotransmitters, that exert actions in very short periods of time, are also capable of inducing longer term responses, such as promoting the expression of specific genes (1-3). Among the genes whose expression is rapidly stimulated by these hormones and neurotransmitters are some transcription factors, such as *c-fos*, which can amplify cellular responses over time, increasing possibilities for metabolic regulation.

Angiotensin II is, without any doubt, an interesting case among these agents. This peptide hormone is an extremely potent contractile agonist, a modulator of metabolism and also, a growth factor capable of stimulating cell proliferation and oncogene expression in different cell preparations (4-9).

In liver cells, angiotensin II activates A_1 receptors stimulating phosphoinositide turnover/calcium signalling and phosphorylase activity (8,10). Interestingly, in these cells this

receptor subtype seems to be also coupled in an inhibitory fashion to adenylate cyclase (10). We previously showed that in hepatocytes, this vasopressor peptide, induces an early gene expression response, involving genes such as *c-fos*, *c-myc*, *c-mos* and actin (9). Interestingly, active phorbol esters, such as phorbol 12-myristate, 13-acetate (PMA), were also able to induce this early gene expression response, suggesting a role of protein kinase C (PKC)(9). In the present study, we investigated the role(s) of protein kinases and phosphatases on *c-fos* expression by using inhibitors; our results indicate a clear role of phosphorylation/dephosphorylation cascades in *c-fos* expression and suggest that in the actions of angiotensin II and PMA, both threonine/serine and tyrosine protein kinases and protein phosphatases could be involved.

Materials and Methods

Materials.- Okadaic acid, microcystin LR and genistein were obtained from Research Biochemicals Inc. Calphostin was from Kamiya Biomedical CO. Staurosporine, Phorbol Myristate Acetate (PMA) angiotensin II, and chemicals for plasmid extraction and dot blot hybridization of RNA were from Sigma Chemical Co. Restriction enzymes were from Biolabs and agarose was from BioRad.

Cell incubations.- Hepatocytes were obtained from female Wistar rats (220-250 gr) fed *ad libitum* by the method of Berry and Friend (11). Cells (100-150 mg wet weight) were incubated in 1 ml of Krebs Ringer bicarbonate buffer (9) under an atmosphere of 95% O₂, 5% CO₂, (pH 7.4) at 37°C in a water bath shaker. Incubation was usually for 30 minutes in the presence or absence of the agents tested. When a pre-incubation was necessary, it was for 15 minutes previous to the addition of the agent to be tested.

Dot blot and Northern analysis.- After incubation, the cells were pelleted by centrifugation and total RNA was extracted as described by Chomzinski and Sacchi (12). RNA (50-100 µg) was spotted onto nylon membranes (Hybond, Amersham) and hybridized under high stringency conditions (13). After hybridization, the membranes were washed twice in 0.2 X SSC and 0.2% SDS at 55° C, twice in 0.1 X SSC and 0.1% SDS at 55° C and once in 0.1 X SSC without SDS. Gene-specific probes were as follows: human *c-fos* probe was the 408 bp EcoRI-PstI fragment of the Amprobe *c-fos* (Amersham), and for control experiments the cDNA clone of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used. The probes were ³²P-labeled by Nick Translation to a specific activity < 10⁷ cpm/µg. In each experiment 500 ng of labeled probe was used. After the washes, the filters were autoradiographed 5-10 days at -70°C. The films were scanned using a Beckman DHU 650 spectrophotometer. Each figure represent the mean ± S. E. M. of 4 to 6 experiments and the photograph of a representative film is also included (insets). Northern analysis was performed as described (9).

Results

In agreement with previous findings, it was observed that angiotensin II and PMA stimulated *c-fos* expression in rat hepatocytes, which was observed using dot blot and Northern analysis (data not shown, 9). In order to explore the possibility that PKC could be involved, the effect on the inhibitors staurosporine (14) and calphostin (15) was tested. It can be observed in Fig. 1 that these agents inhibit in dose-dependent fashions the effects of near-maximal concentrations of angiotensin II (100 nM) and PMA (1 µM). Interestingly, in all the experiments the concentration-response curves using angiotensin II appeared to be shifted to the right as compared to those using PMA, i. e. bigger concentrations of the inhibitors were apparently required to induce a similar blockade. However, such shifts do not seem to be real since the action of PMA was

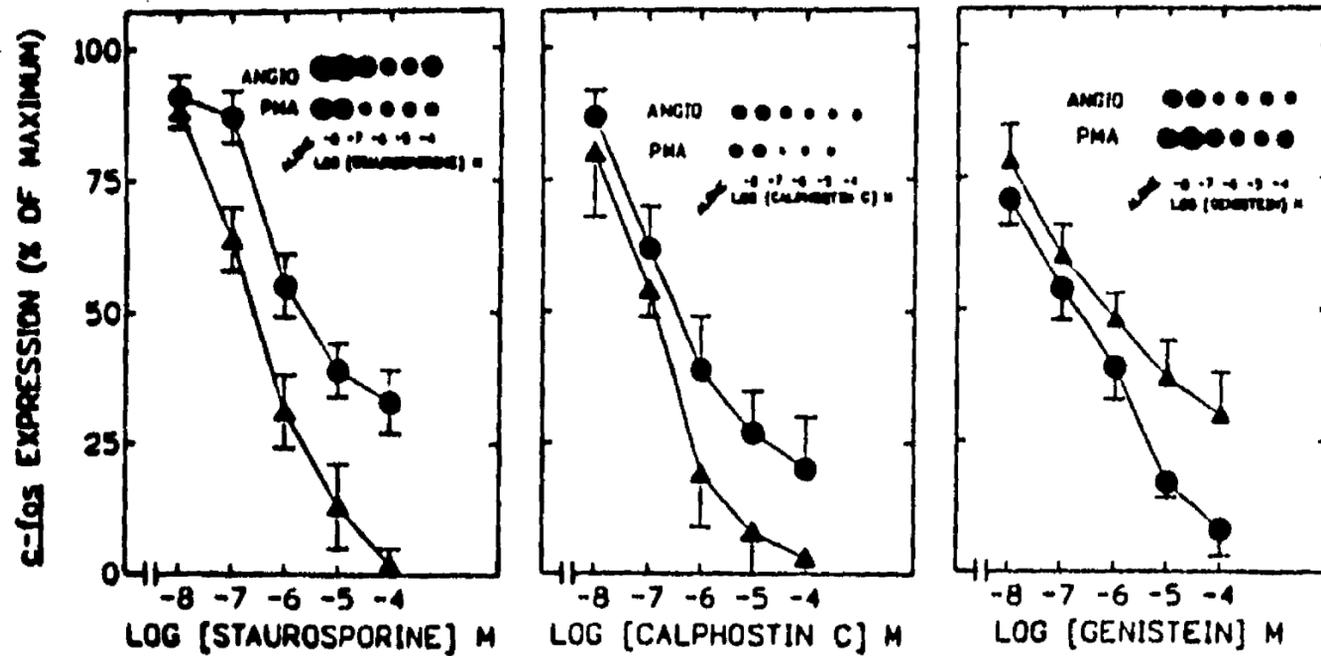


FIG. 1

EFFECT OF STAUROSPORINE, CALPHOSTIN AND GENISTEIN ON *c-fos* EXPRESSION MEDIATED BY ANGIOTENSIN II AND PMA. Cells were incubated during 30 minutes with angiotensin II (100 nM, closed circles) or PMA (1 μ M, closed triangles) and the indicated concentrations of staurosporine (left panel), calphostin (middle panel) and genistein (right panel). Results are expressed as % of the effect induced by 100 nM angiotensin II (292 ± 8 % of basal *c-fos* expression) or 1 μ M PMA (326 ± 20 % of basal *c-fos* expression); plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of six experiments using different cell preparations. Insets: representative dot blots.

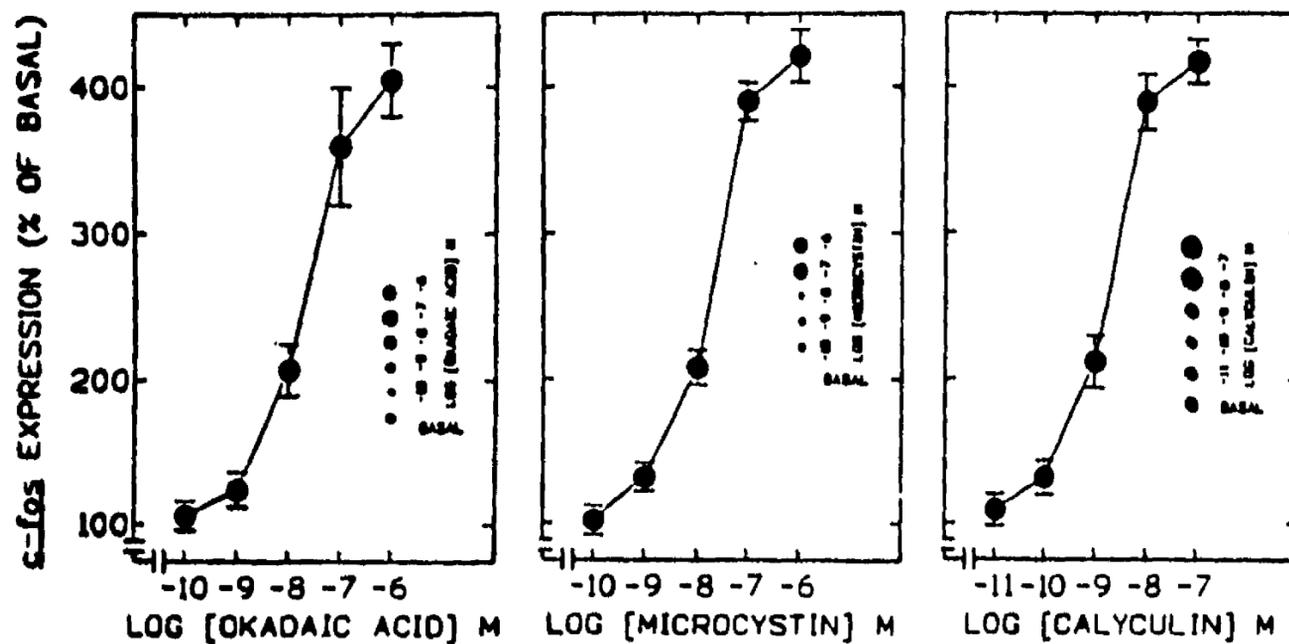


FIG. 2

EFFECT OF OKADAIC ACID, MICROCYSTIN LR AND CALYCULIN ON *c-fos* EXPRESSION. Hepatocytes were incubated for 30 minutes with different concentrations of okadaic acid (left panel), microcystin LR (middle panel) and calyculin (right panel). Results are presented as percent of basal (buffer) *c-fos* expression, plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 4-5 independent experiments. Insets: representative dot blots.

almost completely blocked whereas that of angiotensin II was only partially inhibited. Taking into account this fact, the IC_{50} values for inhibiting the actions of angiotensin and PMA were almost identical, i.e. = 100-150 nM for staurosporine and =150-200 nM for calphostin. These IC_{50} values are similar to those previously observed by us (30-50 nM) to inhibit other actions of PMA in hepatocytes (16). Calphostin and staurosporine did not modify the basal expression of *c-fos*.

The effect of the protein tyrosine kinase inhibitor, genistein (17), on angiotensin II- and PMA-mediated expression of *c-fos* was tested. The results are presented in Fig. 1 (right panel). Genistein inhibited in concentration-dependent fashion the effects of both agents but, interestingly, in this case the blockade of the angiotensin II-mediated effect was almost complete whereas that of PMA was only partial. The IC_{50} values again were very similar in the range 100-200 nM (Fig. 1, right panel). Epidermal growth factor also induced *c-fos* expression ($203 \pm 20\%$ of basal) and its effect was completely blocked by genistein. Genistein did not modify the basal expression of *c-fos*.

We next examined the effect of three inhibitors of protein phosphatases, okadaic acid (18), microcystin (19) and calyculin A (20) on *c-fos* expression. The results are presented in Fig. 2. It can be observed that these protein phosphatase inhibitors induce the expression of *c-fos* in concentration-dependent fashions. The potency orders were: calyculin (EC_{50} 1 nM) > okadaic acid (EC_{50} 10 nM) = microcystin (EC_{50} 10 nM). The expression of *c-fos* induced by these protein phosphatase inhibitors was not blocked by staurosporine, calphostin or genistein up to 100 μ M (data not shown).

Discussion

Proto-oncogene expression is a well-documented phenomena in response to a very large list of cellular messengers. In rat liver, there is enhanced expression of *c-fos*, *c-myc*, and *c-ras* during sex-differentiated carcinogenesis (21), during liver regeneration (22) and extended damage (23). It is also observed during the initial phases of culture in normal adult rat hepatocytes (24). In freshly isolated rat hepatocytes, the proto-oncogene expression is induced when the cells are exposed to phorbol esters (PMA), angiotensin II or epidermal growth factor (9). In hepatoma cells, insulin and PMA stimulate *c-fos* transcription (25). The detailed biochemical mechanism(s) that mediate these rapid inductions of the proto-oncogene is(are) unknown, but there is evidence which indicates a role of different protein kinases.

Protein phosphorylation is one of the most common biochemical mechanisms through which cells regulate their metabolism (26). The function of various proteins involved in signal transduction is modulated for phosphorylation/dephosphorylation cycles and also some transcription factors alters their DNA binding properties with the level of phosphorylation (27). Phosphorylation on serine and threonine residues, which together account for >99% of total cellular protein phosphate, are recognized as key elements in the regulation of such diverse pathways as glycogen metabolism, protein biosynthesis, and cell surface receptor signalling (28). Phosphorylation on tyrosine residues, which accounts for <5% of protein bound phosphate (29), has been linked broadly with the control of cell proliferation.

In our experiments, the blockade of PMA- and angiotensin II-mediated *c-fos* expression by staurosporine and calphostin was not surprising. These compounds are relatively selective inhibitors of PKC. The only partial blockade of the angiotensin II-mediated effect suggested the possibility that other protein kinases could be involved in the action of the peptide. The inhibitory action of genistein suggested the participation of tyrosine protein kinases in these effects. It has been reported that angiotensin II stimulates protein-tyrosine phosphorylation in rat hepatic WB cells (30)

and in other cell types, such as smooth muscle cells (31) and rat cardiac fibroblast (32). In addition, very recently it was shown that angiotensin II-stimulated tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1 is responsible for early signal transduction events in smooth muscle cells (33). Our results are consistent with these findings and suggest a role of protein tyrosine kinase activity in the effect of angiotensin II and to a lesser extent also in that of PMA on *c-fos* expression.

We previously observed that vasopressin and epinephrine (α_{1B} -adrenergic effect) stimulate *c-fos* expression to a much lesser extent than angiotensin II (9). These three hormones seem to share a similar mechanism of signal transduction. The former data suggested that additional factors could be involved in the action of angiotensin II. Our present data suggests that one such additional factors could be the activation of protein tyrosine kinase(s).

Okadaic acid is a polyether fatty acid which inhibits type 1 and 2A protein phosphatases. Microcystin and calyculin A are also potent inhibitors of these serine-threonine protein phosphatases and all of them induced *c-fos* expression in hepatocytes. These data support the idea that a fine-tuned equilibria of the phosphorylation/dephosphorylation state of certain proteins regulate proto-oncogene expression. Our results also suggest that protein phosphatases are responsible for a tonic turn off of *c-fos* expression.

It is worth mentioning that protein phosphatase inhibitors are potent hepatotoxins that alter cytoskeletal structure, induce blebbing and decrease receptor-mediated and G-protein mediated inositol phosphate production (35-38). It is clear that our results do not allow us to define the protein kinases and phosphatases involved in *c-fos* expression. The only relative selectivity of the available inhibitors and the difficulties in determining their intracellular concentrations, preclude such task at the present. Nevertheless, the data strongly suggest that complex pathways involving protein kinases and phosphatases regulate the expression of this proto-oncogene. These activities seem to mediate rapid responses in non-dividing liver cells.

Acknowledgements

This research was partially supported by Grants from CONACyT (4711-N9406) and DGAPA (IN 200193). The authors express their gratitude to Ms. Guadalupe Ramírez for typing the manuscript. They also thank Dr. Roberto Hernández and Dr. Alejandro García-Carrancá for advice and suggestions during the course of these experiments.

References

1. M.E. GREENBERG and E.B. ZIFF, *Nature* **311** 433-438 (1984).
2. L.J. RANSONE and I.M. VERMA, *Annu. Rev. Cell. Biol.* **6** 539-559 (1990).
3. A. SCHÖNTAL, *Cell. Signal.* **2** 215-225 (1990).
4. G.N. GILL, C. R. III and M.H. Simonian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** 5569-5573 (1977).
5. J.A. TREJO and J. H. BROWN, *J. Biol. Chem.* **266** 7876-7882 (1991).
6. A.J.L. CLARK, T. BALLA, M.R. JONES and K.J. CATT, *Mol. Endocrinol.* **6** 1889-1898 (1992).
7. D. MILLET, C. DESGRANGES, M. CAMPAN, A.P. GADEAU and O. COSTEROUSSE, *Eur. J. Biochem.* **206**, 367-372 (1992).
8. J.A. GARCÍA-SÁINZ and M. MACÍAS-SILVA, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **172** 780-785 (1990).
9. C. GONZÁLEZ-ESPINOSA and J.A. GARCÍA-SÁINZ, *Biochim. Biophys. Acta* **1136** 309-314 (1992).

10. P.H. BAUER, A.T. CHIU and J.C. GARRISON, *Mol. Pharmacol* **39** 579-585 (1991).
11. M.N. BERRY and D.S. FRIEND, *J. Cell Biol.* **43** 506-520 (1967).
12. P. CHOMCZYNSKI and N. SACCHI, *Anal. Biochem.* **162** 156-159 (1987).
13. K.A. HEINDEREICH, T. ZEPPELIN and L.J. ROBINSON, *J. Biol. Chem.* **268** 14663-14670 (1993).
14. T. YANAGIHARA, E. TACHIKAWA, F. IZUMI, S. YASUGAWA, H. YAMAMOTO and E. MIYAMOTO, *J. Neurochem.* **56** 294-299 (1991).
15. E. KOBAYASHI, H. NAKANO, M. MORIMOTO and T. TAMAOKI, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159** 548-552 (1989).
16. J.A. GARCÍA-SAINZ, F.J. LÓPEZ-GÓMEZ, and M. ROBLES-FLORES, *Biochem. Int.* **28** 761-766 (1992).
17. T. AKIYAMA, J. ISHIDA, S. NAKAGAWA, H. OGAWARA, S. WATANABE, N. ITOH, M. SHIBUYA and Y. FUKAMI, *J. Biol. Chem.* **262** 5592-5598 (1987).
18. C. BIALOJAN and A. TAKAI, *Biochem. J.* **256** 283-290 (1988).
19. M. F. CICIPRELLI, *Focus* **14** 16-20 (1992).
20. M. SUGANUMA, H. FUJIKI, H. FURUYA-SUGURI, S. YOSHIZAWA, S. YASUMOTO, Y. KATO, N. FUSEYANI and T. SUGIMURA, *Cancer Res.* **50** 3521-3526 (1990).
21. I. PORSCHE-HÄLSTRÖM, A. BLANCK, L. C. ERIKSSON and J. A. GUSTAFSSON, *Carcinogenesis* **10** 1793-1800 (1989).
22. W. KRUIJER, H. SKELLY, F. BOTTERI, H. VAN DER PUTTEN, J. R. BARBER, I. M. VERMA and H. LEFFERT, *J. Biol. Chem.* **261** 7929-7933 (1986).
23. R.A. BARKE, P.S. BRADY, S. ROY, R. CHARBONEAU and L.J. BRADY, *Surgery* **112** 412-418 (1992).
24. P.L. ETIENNE, G. BAFFET, B. DESVERGNE, M. BOISNARD-RISSEL, D. GLAISE and C. GUGUEN-GUILLOUZO, *Oncogene Res.* **3** 255-262 (1988).
25. J.L. MESSINA, M.L. STANDAERT, T. ISHIZUKA, R.S. WEINSTOCK and R.V. FARESE, *J. Biol. Chem.* **267** 9223-9228 (1992).
26. P. COHEN, *Nature* **296** 613-620 (1982).
27. M. SHENG, G. MC. FADDEN and M.E. GREENBERG, *Neuron* **4**, 571-582 (1990).
28. A.M. EDDELMAN, D.K. BLUMENTHAL and E.G. KREBS, *Ann. Rev. Biochem.* **56** 567-613 (1987).
29. J.A. COOPER, B.M. SEFTON and T. HUNTER, *Methods Enzymol.* **99** 387-402 (1983).
30. W.R. HUCKLE, C.A. PRKOP, R.C. DY, B. HERMAN and S. EARP, *Mol. Cell. Biol.* **10** 6290-6298 (1990).
31. M.D. HOLLENBERG, *Trends Pharmacol. Sci.* **15** 108-114 (1994).
32. W. SCHORB, T.C. PEELER, N.N. MADIGAN, K.M. CONRAD and K.M. BAKER, *J. Biol. Chem.* **269** 19626-19632 (1994).
33. M.B. MARRERO, W.G. PAXTON, J.F. DUFF, B.C. BERK and K.E. BERNSTEIN, *J. Biol. Chem.* **269** 10935-10939 (1994).
34. T. PALKAMA, S. MATIKAINEN and M. HURME, *FEBS Lett.* **319** 100-104 (1993).
35. J.E. ERIKSSON, D. TOIVOLA, J.A. MERILUOTO, H. KARAKI, Y.G. HAN and D. HARTSHORNE, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173** 1347-1353 (1990).
36. J.A. GARCIA-SAINZ, M. MACIAS-SILVA and M.T. ROMERO-AVILA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179** 852-8858 (1991).
37. M. MACIAS-SILVA and J. ADOLFO GARCIA SAINZ, *Toxicol* **32** 105-112 (1994).
38. R.R. MATTINGLY and J.C. GARRISON, *FEBS Lett.* **296** 225-230 (1992).

DISCUSION SOBRE EL PRIMER TRABAJO.

Sabemos que la angiotensina II es una de las principales hormonas peptídicas que regulan el metabolismo hepático. Los estudios que se han realizado sobre las acciones de la angiotensina en hígado han mostrado que esta hormona disminuye los niveles de AMP cíclico y que también estimulan el recambio de fosfoinosítidos y la movilización de calcio; estos efectos pueden observarse al poco tiempo de exponer las células a la hormona (0-2 min). Sin embargo, nosotros hemos encontrado que además de estos efectos a corto plazo, la angiotensina II es capaz de inducir una acumulación del mensajero del proto-oncogene *c-fos*. No se sabe cuáles son las moléculas intermediarias entre la activación del receptor y el efecto sobre el RNAm del proto-oncogene. Actualmente está claro que casi todas las hormonas, actuando a través de distintos sistemas de transducción, median sus acciones fisiológicas alterando la fosforilación de proteínas específicas, y que esta modificación es un mecanismo regulador muy importante en diversos procesos como la motilidad, el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación (Shenolikar, 1988). La fosforilación o desfosforilación de residuos de serina, treonina o tirosina dispara cambios conformacionales en algunas proteínas, alterando sus propiedades biológicas, así, el nivel de fosforilación en cualquier instante de la vida celular refleja las actividades relativas de las cinasas y fosfatasas de proteínas que participan en todos los procesos que esa célula está llevando a cabo. En este primer trabajo tratamos de analizar globalmente el mecanismo molecular que la hormona sigue para inducir la acumulación del mensajero de *c-fos*. Nos planteamos varias preguntas: ¿el paso de la señal desde la membrana plasmática hasta el gene (en el núcleo) requiere de

la fosforilación de alguna (s) proteína (s)? Para responderla, incubamos a las células en presencia del inductor (AngioII y PMA), pero además, añadimos inhibidores de cinasas intracelulares de serina-treonina (staurosporina y calfostin) y tirosina (genisteina).

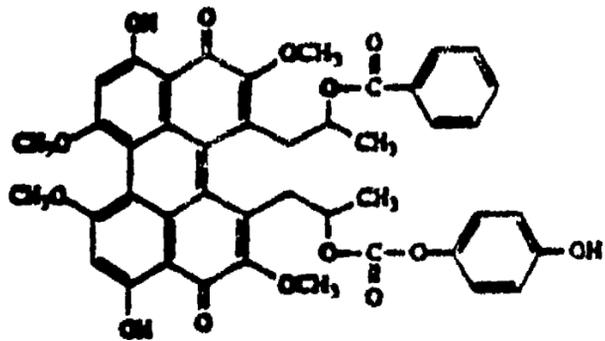
La staurosporina es un alcaloide microbiano que además inhibe de manera muy potente a la proteína cinasa C (PKC) por interactuar con su dominio catalítico (Tamaoki, *et al.*, 1986). Este agente ha sido utilizado para investigar el papel fisiológico de la PKC en la regulación de varias respuestas celulares, como la desensibilización de la movilización de calcio estimulada por el leucotrieno D4 en células leucémicas de rata (Vegesna, *et al.*, 1988) y la acumulación de polifosfatos de inositol inducida por trombina en plaquetas humanas (King y Rittenhouse, 1989).

Por otro lado, también hay resultados que indican que este agente puede inhibir a la proteína cinasa II dependiente de calcio-calmodulina (Yanagihara, *et al.*, 1991) y a la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) (Nakano, *et al.*, 1987), esta inhibición se observa a concentraciones muy altas. Existen datos que sugieren que la staurosporina es un inhibidor relativamente específico de la PKC en arterias intactas de cerdo a concentraciones bajas (0.1 μM), y que en altas concentraciones puede tener efectos no relacionados con esa inhibición, entre los cuales se incluye el bloqueo de la entrada de calcio en células de músculo liso a través de un canal de calcio dependiente de voltaje (Kageyama, *et al.*, 1991). Todas las fosforilaciones inhibidas por la staurosporina suceden en los aminoácidos serina ó treonina y por lo tanto se le utiliza como un inhibidor general que permite conocer en forma global la

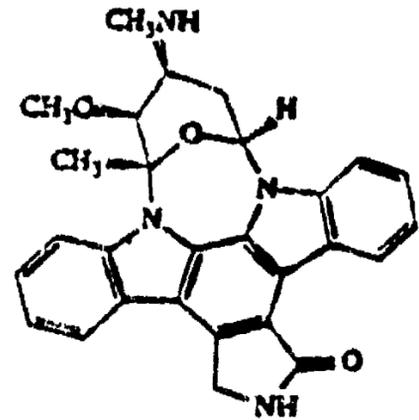
participación de ese tipo de fosforilaciones en cualquier fenómeno celular. Su estructura se muestra en la figura 9.

El calfofostin C (UCN-1028C), por su parte, es un compuesto aislado de *Cladosporium cladosporioides*, y es un inhibidor potente y específico de la PKC (figura 9). Es un agente mil veces más potente para inhibir a la PKC ($IC_{50} \approx 0.05 \mu M$) que a otras cinasas como la PKA ó a cinasas de tirosina ($IC_{50} > 50 \mu M$). El calfofostin, que es sensible a la luz, interactúa con el dominio regulador de la PKC y es capaz de inhibir la unión de forbol dibutirato a la PKC *in vitro*. Tiene actividad citotóxica y actividad antitumoral, al parecer porque inhibe a las isoformas α , β , y γ de la PKC. Este compuesto es mucho más específico para la PKC que la staurosporina, sin embargo aún no se descarta que a dosis mayores de $100 \mu M$ pueda inhibir a otras cinasas en serina-treonina (Kobayashi, *et al.*, 1989).

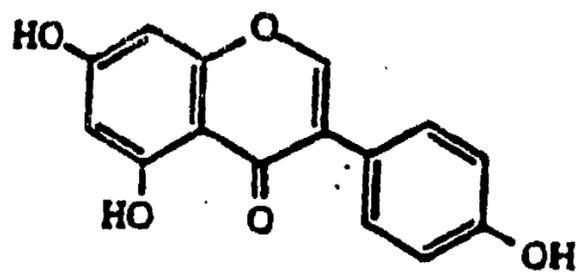
La staurosporina y el calphostin inhibieron la acumulación del mensajero de *c-fos* de una forma dependiente de la dosis, con IC_{50} similares para ambos agentes ($\approx 100-150$ nM para staurosporina y $\approx 150-200$ nM para calphostin). Sin embargo, en todos los experimentos las curvas de inhibición de los efectos de la Angio II están corridas hacia la derecha con respecto a las de inhibición del efecto del PMA, lo que indica que se requiere mayor cantidad de inhibidor para bloquear el efecto de la Angio II que del PMA. Estos resultados sugieren que probablemente las cinasas en serina-treonina que se activan por la Angio II sean distintas a las estimuladas por el PMA; tal vez los dos agentes compartan ciertas cinasas, pero no todas. Por otro lado, siempre quedó una estimulación residual por la Angio II que



CALFOSTIN



STAUROSPORINA



GENISTEINA

Figura 9. Estructura de los inhibidores de cinasas de serina-treonina: la staurosporina y el calfostin C; y del inhibidor de cinasas de tirosina: la genisteína.

no pudo ser bloqueada por estos dos inhibidores ($\approx 30\%$ del efecto máximo). Es probable que la Angio II tenga un mecanismo de acción distinto al del PMA.

Todavía más interesantes son los datos obtenidos con un inhibidor de cinasas de tirosina, como la genisteína. Este es un compuesto isoflavonoide (figura 9) producido por *Pseudomonas sp* que inhibe la actividad de cinasa de tirosina del receptor a EGF, compitiendo con el ATP (donador del fosfato). La genisteína inhibe muy pobremente a las cinasas en serina-treonina. Por su especificidad, es una buena herramienta para dilucidar procesos celulares que estén mediados por fosforilaciones en tirosina, en particular, las cascadas moleculares involucradas en proliferación celular, transformación y diferenciación (Akiyama *et al.*, 1987). Sorpresivamente, la genisteína inhibió las acciones del PMA y la Angio II sobre el mensajero de *c-fos*.

La inhibición de los efectos de la Angio II y del PMA por genisteína no fue exactamente igual. El efecto de la Angio II fue inhibido completamente, mientras que el del PMA no. Esto indica que probablemente el PMA active a cinasas en tirosinas pero, evidentemente, el efecto sobre *c-fos* no se da exclusivamente por esas cinasas. En presencia de genisteína, la actividad residual de la angiotensina (observada en las gráficas con staurosporina y calphostín) se bloqueó completamente, lo que indica que esa parte de la respuesta por lo menos, está mediada por fosforilaciones en tirosina. Los datos de este trabajo nos indican que la inducción de *c-fos* puede darse por las vías señaladas en la figura 10.

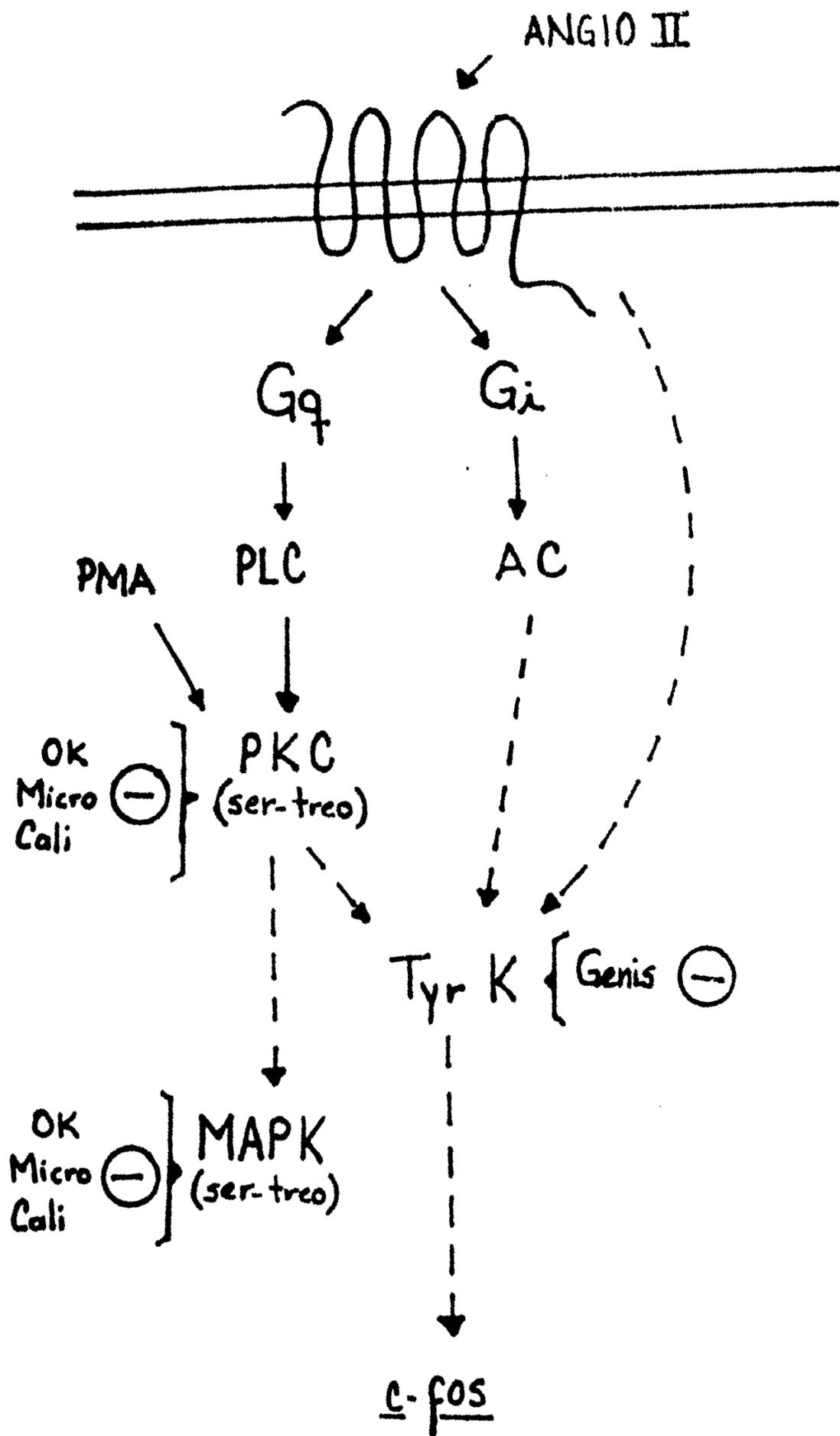


Figura 10. Posibles vías de inducción del proto-oncogene *c-fos* en hepatocitos de rata por Angiotensina II y PMA. Sólo las líneas continuas han sido demostradas en hígado.

El interés por las cinasas de tirosina, como elementos clave en las vías de transducción de señales hormonales, se inició en la década de los 80s por el descubrimiento de que el gene transformante del virus tumorigénico del sarcoma de Rous ($p60^{v-src}$) codifica para una cinasa que fosforila en tirosina a una gran variedad de sustratos (Collet y Erickson, 1978). Este hallazgo promovió una intensa búsqueda de otras cinasas de tirosina, tanto de origen viral como de origen celular, y llevó a la caracterización de los sustratos celulares relevantes que pudieran intervenir en el fenotipo transformante de las células infectadas con $p60^{v-src}$. En la actualidad se ha descrito una gran familia de esas cinasas de tirosina (Hanks, *et al.*, 1988) y se han caracterizado tres subclases generales: 1) los receptores hormonales que son cinasas de tirosina y que se encuentran en la membrana plasmática, como el receptor a EGF y a PDGF; 2) las cinasas de tirosina citoplásmicas que no son receptores hormonales, como el caso de los productos oncogénicos Abl y Fes; y 3) las cinasas de tirosina asociadas a la membrana, que no son receptores hormonales, como las ocho isoenzimas descritas de la $p60^{v-src}$. Se han identificado varios sustratos de estas cinasas en tirosina, como la fosfolipasa C (PLC) y la cinasa MAP, las cuales están directamente relacionadas con la transducción de señales (Glenney, 1992).

La fosforilación en tirosinas por la Angio II ha sido demostrada en las células WB de rata, utilizando geles de poliacrilamida para separar las proteínas fosforiladas y revelando con un anticuerpo anti-fosfotirosina (Huckle, *et al.*, 1990); también se ha reportado en las células GN4 (Huckle, *et al.*, 1992), en células de músculo liso de aorta de rata (Molloy, *et al.*, 1993) y en fibroblastos cardiacos de rata (Schorb, *et al.*, 1994). Todos estos modelos requieren del cultivo celular y algunas de las líneas son tumorales. Nuestro trabajo es la primera

demostración de que la fosforilación de tirosinas media alguna acción de la hormona en células normales, no transformadas, de rata. Además, demuestra que la hormona puede ejercer esas acciones, parecidas a los factores de crecimiento, en células hepáticas y no sólo en las musculares, donde sus acciones han sido clásicamente estudiadas.

A la fecha, el papel potencial de las cinasas de tirosina y sus sustratos en la transducción de señales se ha analizado en el contexto de las respuestas a largo plazo mediadas por factores extracelulares, como el crecimiento celular, que ocurre en un periodo de tiempo que va de horas a días. Por otro lado, los hallazgos en el estudio de los factores de crecimiento indican que, además de sus acciones a largo plazo, inducen respuestas rápidas como la acumulación de IP_3 o la liberación de calcio. Así pues, las cinasas de tirosina pueden ser la clave para relacionar ambos tipos de respuestas (rápidas y de largo plazo) y su estudio nos puede permitir el conocer mejor los mecanismos moleculares de integración de la información en una célula normal.

Los datos obtenidos utilizando al EGF (como prototipo de factor de crecimiento) combinado con diversas hormonas que activan receptores acoplados a distintas proteínas G en sistemas contráctiles que responden a EGF, han revelado marcadas similitudes en los sistemas de transducción activados por estos dos tipos de agentes. Así, es probable que algunas vías que involucran cinasas de tirosinas citoplásmicas jueguen un papel importante en el acoplamiento farmacomecánico en los músculos vasculares y gastrointestinales. Los datos obtenidos con cultivos celulares apuntan hacia 1) un papel del calcio intracelular en la modulación de la fosforilación de tirosinas y 2) un papel de las cinasas de tirosina en la

regulación de los flujos de calcio mediados por agonistas (ver figura 11). En el sistema hepático, el trabajo no está tan avanzado, sabemos que evidentemente la Angio II no puede modificar la contractilidad del hepatocito; consecuentemente desconocemos el fenómeno celular a largo plazo modulado por esta hormona y el papel de *c-fos* ó los genes modulados por él. Aún falta mucho por hacer en este campo, pero estudios como éste acercan un poco más a la resolución del problema.

Sobre las proteínas específicas fosforiladas en tirosina por la acción de la hormona Angio II sabemos poco. En 1994, Mario B. Marrero y cols. demostraron que en un cultivo de células vasculares de músculo liso de rata, la hormona induce la fosforilación de la fosfolipasa $C\gamma$; esta fosforilación se da en un curso temporal similar a la formación de inositol trifosfato en estas células (Marrero, *et al.*, 1994), y es muy parecida a la observada en otros modelos (Kumjian, *et al.*, 1991) con el EGF y con el PDGF (Margolis, *et al.*, 1989). Es posible que en hepatocitos se observe también la fosforilación de la PLC en respuesta a la Angio II, ya que la producción de fosfatos de inositol se inhibe en un 30% cuando las células se pre-incuban con genisteína y se estimulan con la hormona .

Con el fin de averiguar si la fosforilación juega un papel importante en la inducción de la acumulación de *c-fos*, se investigó si algunos inhibidores de fosfatasas mimetizaban el efecto de la Angio II ó del PMA. Esto sería cierto si es que las cinasas fueran las encargadas de disparar la señal, y las fosfatasas de apagarla. Decidimos probar si el ácido okadaico, la microcistina y la caliculina podían inducir *c-fos* en el sistema celular hepático.

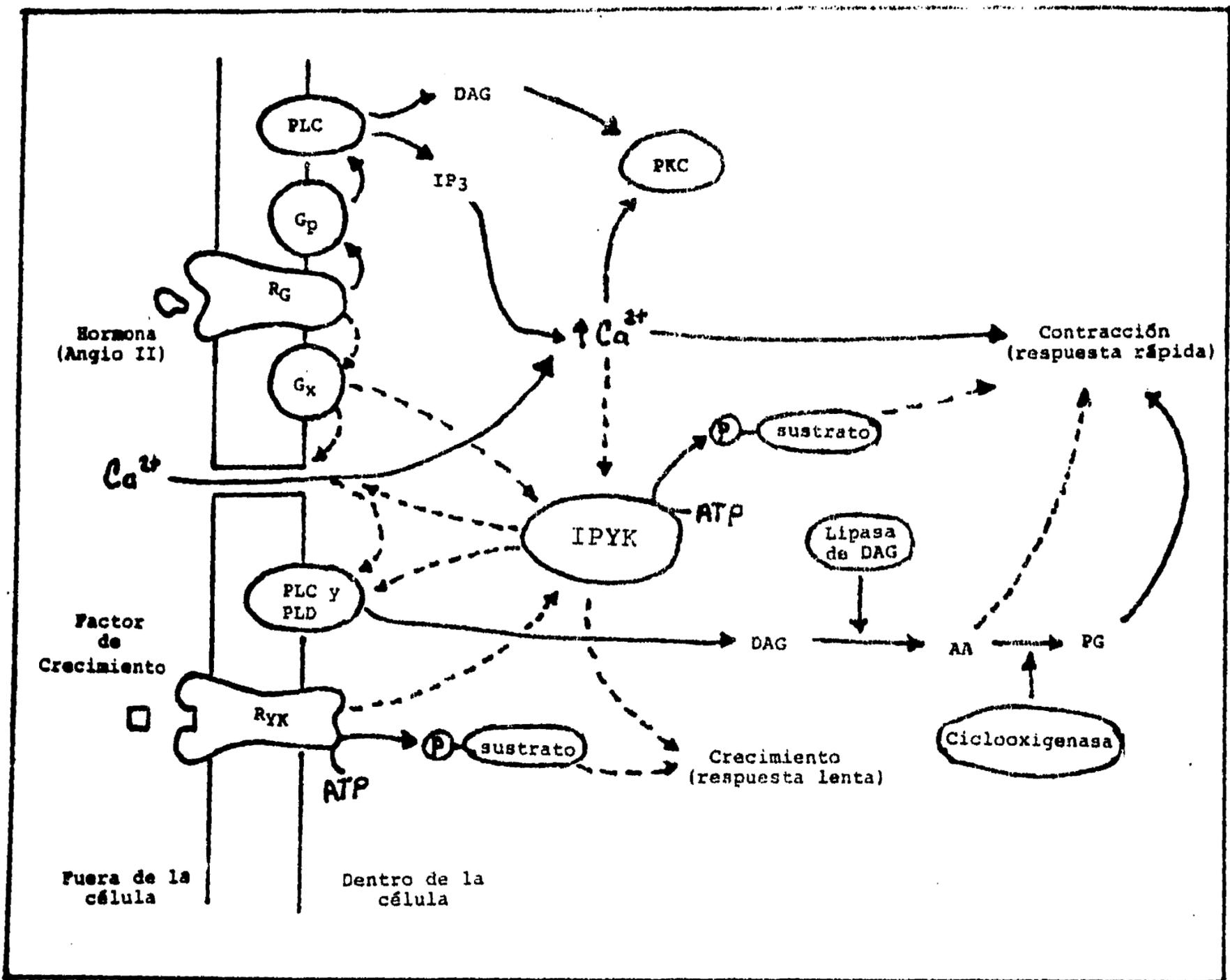


Figura 11. Integración de las señales provocadas por Angio II y por un factor de crecimiento. Se muestran las vías de transducción de señales involucradas en la contracción muscular causada por factores de crecimiento o agonistas que activan receptores acoplados a proteínas G (R_G). Un agonista, como la angiotensina II, activa a la fosfolipasa C (PLC) (via una proteína G, G_p) para dar diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3), resultando en una elevación del calcio intracelular, lo que ocasiona contracción rápida. Una vía alternativa involucra la participación de un camino convergente en alguna cinasa de tirosinas intermediaria (IPYK) que puede ser activada por un receptor con actividad de cinasa de tirosinas (R_{YK}) o por un receptor acoplado a proteínas G, con G_x . La IPYK puede estimular la entrada de calcio, activar a las fosfolipasas C y D (PLC y PLD) y por otros sustratos desconocidos, promover la contracción también. La activación de la PLD y la PLC resulta en la producción de DAG, el que es sustrato de la lipasa del DAG y resulta en la producción de prostaglandinas de contracción (PG). Las líneas punteadas indican vías especulativas. AA, indica ácido araquidónico.

El uso de diversos inhibidores de fosfatasas de residuos de serina ó treonina, ha sido muy útil en los estudios sobre la importancia de la fosforilación de proteínas. Algunos de estos inhibidores como el pirofosfato, el β glicerofosfato, el fluoruro de sodio y el vanadato de sodio sirven para mantener el estado fosforilado de las proteínas en extractos celulares y evitan la interferencia de fosfatasas en los ensayos de cinasas de proteínas. Todos estos inhibidores son inespecíficos, por lo tanto únicamente han favorecido una expansión del campo de las cinasas de proteínas y no del de las fosfatasas de proteínas (Cicirelli, 1992). El campo de las fosfatasas de serina-treonina se ha desarrollado poco. Inicialmente, estas enzimas fueron divididas en dos grupos, el tipo 1 y el tipo 2. Las fosfatasas tipo 1 (PP1) preferentemente desfosforilan la subunidad β de la fosforilasa cinasa y son inhibidas por dos pequeñas proteínas estables al ácido y al calor, denominadas inhibidor 1 (I1) e inhibidor 2 (I2). Las fosfatasas de proteínas del tipo 2 (PP2) prefieren desfosforilar a la subunidad α de la fosforilasa cinasa y son insensibles a los inhibidores 1 y 2. Las PP2 a su vez se han subdividido en tres enzimas distintas, PP2A, PP2B y PP2C, con base en su dependencia de ciertos cationes divalentes. Las PP2B y PP2C tienen un requerimiento absoluto por calcio y magnesio, respectivamente, mientras que la PP2A (así como la PP1) es activa para algunos sustratos en ausencia de cationes divalentes. Se ha observado también que los cuatro tipos de fosfatasas se encuentran ampliamente distribuidos en las células de mamíferos (Cohen, 1989 y 1991).

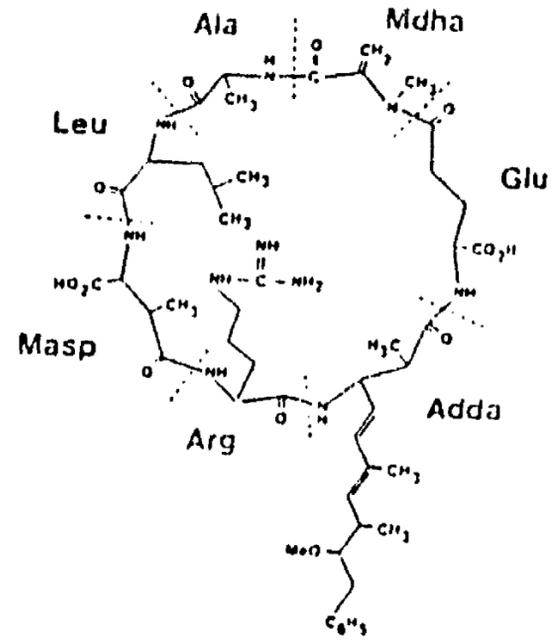
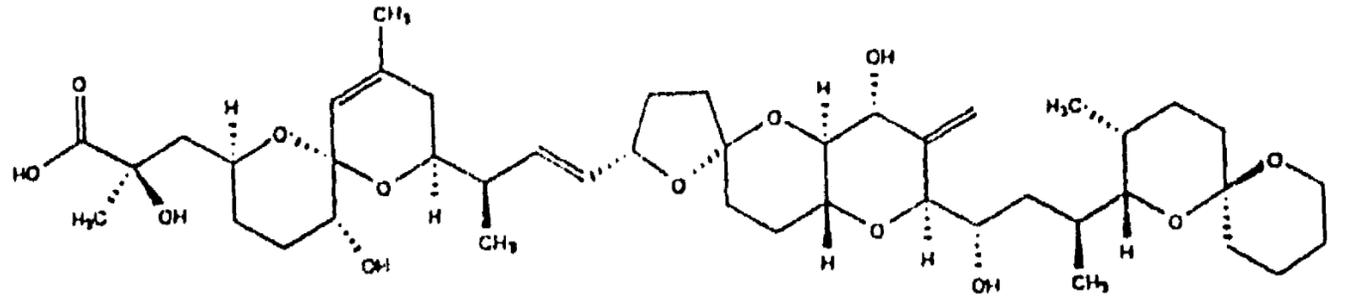
Además de ayudar a la clasificación de las fosfatasas de proteínas, los inhibidores 1 y 2, han sido útiles en la demostración de que esas fosfatasas se regulan y cambian su actividad en respuesta a hormonas y factores de crecimiento. Desafortunadamente, estos inhibidores no

están disponibles comercialmente, sólo se han caracterizado en estudios *in vitro* y no inhiben a todos los tipos de PP1. Recientemente, una nueva generación de inhibidores de fosfatasa de proteínas han sido aislados de varios microorganismos y están disponibles comercialmente. Estos inhibidores, el ácido okadaico (Bialojan, 1988), la microcistina-LR (Cicirelli, 1992), la caliculina A (Ishihara, *et al.*, 1989) y la tautomocina, parecen entrar a las células en diferentes grados y potencialmente inhibir a la PP1 y PP2A de una manera diferencial. De tal manera que éstos inhibidores resultan ser muy útiles en la identificación de procesos biológicos regulados por la fosforilación reversible de proteínas (Cicirelli, 1992). Para una descripción detallada ver figura 12 y tabla I.

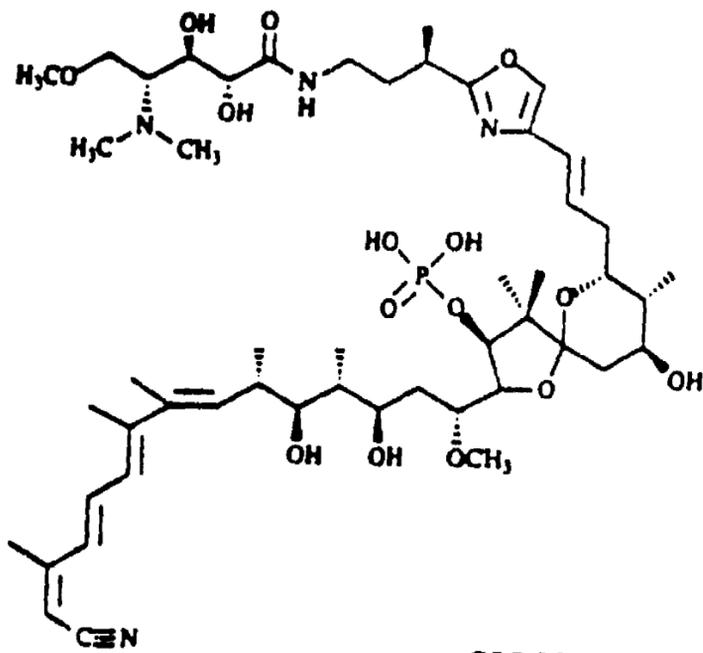
Como se puede apreciar en el trabajo, tanto el ácido okadaico, como la microcistina y la caliculina indujeron la acumulación del mensajero de *c-fos* en una forma dependiente de la dosis. El orden de potencia fue caliculina > ácido okadaico = microcistina. Esta acumulación del proto-oncogene no se inhibió por los inhibidores de cinasas de serina-treonina ó cinasas de tirosina.

Los inhibidores utilizados no parecen tener efecto directo sobre otras fosfatasas de proteínas ni sobre las cinasas de proteínas (Haystead, *et al.*, 1989). Sin embargo, pueden ejercer cuando menos dos tipos de efectos indirectos sobre las cinasas de proteínas y sus sustratos. Primero, las cinasas de proteínas cuya actividad se regula por fosforilación reversible pueden ser estimuladas en la ausencia de actividad de fosfatasas. Segundo, algunos de los sustratos de las cinasas pueden acumularse en un estado de fosforilación sostenida cuando las fosfatasas están bloqueadas. Así, sucede que el bloqueo de las PP1 y PP2A por el ácido

ACIDO OKADAICO



MICROCISTINA-LR



CALICULINA

Figura 12. Estructura de las hepatotoxinas inhibidoras de fosfatasa.

PROPIEDAD	ACIDO OKADAICO	MICROGISTINA	CALICULINA	TAUTOMICINA
Peso molecular (Da)	805	994	1009	767
Descripción	ácido graso poliéster	heptapéptido hepatotóxica	N.D.	N.D.
Toxicidad	tóxico	tóxico	tóxico	tóxico
Penetración en células	si	no excepción	si	si excepción
Inhibición de la PP1 (IC50) (Ki)	10-60 nM 10-20 nM	0.1 nM 0.06 nM	0.5-2 nM N.D.	0.2-22 nM 0.16 nM
Inhibición de la PP2A (IC50) (Ki)	0.1-1 nM 0.03-0.2 nM	0.1 nM <0.01 nM	0.1-1 nM N.D.	1-32 nM 0.4 nM
Inhibición de la PP2B (IC50)	5-10 µM	0.2 µM	N.D.	80 µM
Inhibición de la PP2C (IC50)	>10 µM	>4 µM	N.D.	>100 µM

N.D. = no determinado.

Tabla I. Propiedades de los principales inhibidores de fosfatasa que se han empleado en el estudio de los sistemas de transducción de señales.

okadaico, la microcistina y la caliculina desvían el balance de fosforilación de proteínas hacia un incremento en la fosforilación (Schöntal, 1992). Estos inhibidores han sido empleados en diversos estudios. El uso de estos agentes en extractos libres de células ha llevado a la identificación de varias proteínas cuyas actividades son controladas por fosforilación. Su uso en células intactas ha sido útil en la identificación de sustratos fisiológicos de la PP1 y PP2A.

El hecho de que los tres inhibidores de fosfatasa mimeticen los efectos de la Angio II y del PMA sobre el RNA del proto-oncogene *c-fos* indica que son las fosfatasa las que mantienen un control negativo sobre la expresión de este gene en hepatocitos de rata. Cualquier alteración en el estado de fosforilación/desfosforilación en residuos de serina-treonina en las células, es capaz de modificar la expresión de este proto-oncogene. Por otro lado, es interesante mencionar que ninguno de los agentes estudiados induce *c-fos* más de 5 veces, resultado idéntico al que se produce al estimular con 1 μ M de PMA, esto tal vez indique que la inducibilidad del sistema es de solamente \approx 400-500 por ciento. Estos datos contrastan con otros sistemas celulares donde la inducción del proto-oncogene puede llegar hasta diez veces su valor basal (Greenberg, 1986). Es de esperarse que en un futuro se sinteticen inhibidores específicos para cada tipo de fosfatasa, en cuyo caso, se podrá estudiar mejor a la (s) proteína (s) que regula (n) negativamente a *c-fos* en las células hepáticas.

SEGUNDO TRABAJO.

Este manuscrito ha sido enviado al comité editorial del Journal of Biological Chemistry, para que sea considerada su publicación.

**"HORMONAL MODULATION OF *c-fos* EXPRESSION IN ISOLATED HEPATOCYTES.
EFFECTS OF ANGIOTENSIN II AND PHORBOL MYRISTATE ACETATE
ON TRANSCRIPTION AND mRNA DEGRADATION"**

Claudia González-Espinosa and
J. Adolfo García-Sáinz.

Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular;
Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-248;
México D. F. 04510.

*This research was partially supported by Grants from DGAPA (IN
200193) and CONACyT (4711-N9406).

Running Title: Regulation of *c-fos* mRNA transcription and
degradation.

Correspondence should be sent to:

J. Adolfo García-Sáinz
Inst. Fisiol. Celular, UNAM
Ap. postal 70-248
México D. F. 04510
Tel 011 (525) 622 5612
FAX 011 (525) 622 5613

SUMMARY

It has been previously shown that angiotensin II and PMA increase the expression of proto-oncogenes (*c-fos*, *c-myc* and *c-mos*) in liver cells. Interestingly, the increase in *c-fos* mRNA accumulation was only partially blocked by actinomycin D, suggesting that factors, in addition to transcription, were involved.

The effects of angiotensin II and PMA on *c-fos* transcription and mRNA stability were investigated. Using nuclear run-off transcription assays, it was observed that PMA and angiotensin II induce a rapid (observed as soon as 1 min after the addition of these agents to the cells) increase in *c-fos* transcription. The transcription rate of the GAPDH gene did not change, indicating that the effect was not general on gene transcription.

The ability of these agents to modulate proto-oncogene mRNA stability was tested by measuring *c-fos* mRNA half-life. It was observed that *c-fos* mRNA half-life was relatively short (\approx 14-18 min) and that angiotensin II and PMA markedly stabilized mRNA increasing its half-life (\approx 4-fold and \approx 2-fold, respectively). The protein synthesis inhibitor cycloheximide increased mRNA stability to a much greater extent.

Our results clearly demonstrate that angiotensin II and PMA increased *c-fos* mRNA accumulation in liver cells through two actions: induction of *c-fos* gene transcription and increase in mRNA stability.

INTRODUCTION

It is now becoming clear that, in addition to growth factors, many hormones, neurotransmitters and autacoids are also able to induce changes at the level of genetic expression in very short periods of time (1,2). The earliest known set of genes that respond to growth factors and hormones are the so-called, immediate early genes (3-5). These genes are transcriptionally activated (i. e., they are under the control of transactivating proteins that bind DNA and regulate gene transcription). One of the most interesting immediate early genes is *c-fos*. This proto-oncogene is the cellular homolog of *v-fos*, the bone transforming gene of the FBJ murine osteosarcoma virus (6,7) and its product, Fos, is a constituent of the AP1 transcription factor (8). The physiological significance of the rapid induction of immediate early genes is not yet clear, however, the mechanisms that mediate such changes in gene expression start to be delineated.

Angiotensin II is an octapeptide mediator that induces rapid responses such as increasing the production of IP₃ and the mobilization of intracellular calcium, activation or inactivation of regulatory enzymes, contraction, secretion, etc., and long-lasting phenomena, such as cell proliferation, hypertrophy, differentiation, etc. (see 12 and references therein). In liver cells, angiotensin II activates phosphorylase activity via the phosphoinositide turnover/calcium mobilization signal transduction pathway through A₁ receptors (13,14); this receptor subtype seem to be also coupled in and inhibitory fashion to adenylylcyclase in

these cells (14).

63

Angiotensin II and PMA¹ induce proto-oncogene mRNA accumulation in isolated rat hepatocytes (15); serine/threonine and tyrosine protein kinases seem to participate in these effects (16). Interestingly, the increases in expression of *c-fos* induced by these agents were only partially blocked by actinomycin D, indicating that not all the effects of the vasopressor peptide and the tumor promoter were at transcriptional level. We further investigated the processes that angiotensin II and PMA modulate to alter the expression of *c-fos* mRNA. Our results clearly indicate that the effects of these agents have two important components: increase in *c-fos* transcription and stabilization of mRNA.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Angiotensin II, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), actinomycin D, cycloheximide, Denhardt's solution reagents and Nonidet P-40 were obtained from Sigma Chemical Co. Agarose was from BioRad. Nylon membranes, nick translation kits, dCTP (6000 Ci/mmol), UTP (3000 Ci/mmol) and the nucleotides used for the run-off assays were from Amersham. Restriction enzymes and molecular weight standards were from New England Biolabs.

Cell isolation. Experiments were performed with liver cells isolated from female Wistar rats (220-250 g) fed *ad libitum*. Hepatocytes were isolated by the method of Berry and Friend (17) and were incubated in Krebs Ringer bicarbonate buffer under an

atmosphere of 95% O₂/ 5% CO₂, pH 7.4 at 37°C (13, 15, 16).

Nuclear run-off transcription assays. Nuclei were obtained from freshly isolated hepatocytes treated with the agents indicated, essentially as described by Greenberg et al (18). Briefly, 100 mg of hepatocytes were incubated for the times indicated with the agents of interest. The cells were pelleted and lysed with Nonident P-40 containing buffer (18), nuclei were isolated by rapid centrifugation, resuspended in glycerol-containing buffer (18) and frozen in liquid nitrogen until their use. For the transcription assays, nuclei were thawed and mixed with reaction buffer (18) containing 100 µCi of [³²P]UTP and incubated for 30 min at 30°C. The labeled RNA was isolated by the method of Chomczynski and Sacchi (19). DNA binding to nylon membranes (18) and RNA hybridization with nylon-fixed DNA (4) were performed as described. The plasmids used were the *c-fos* Amprobe from Amersham and the cDNA clone of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (20).

Half-life mRNA measurements. Hepatocytes were incubated for the times indicated with the agents of interest. Cells were immediately frozen in a dry ice-ethanol bath and RNA isolated (19). Integrity of total RNA was verified in agarose-formaldehyde gels stained with ethidium bromide. RNA was quantified by A₂₆₀ and equal amounts were spotted onto Nylon membranes. RNA was crosslinked and hybridized with nick translated probes for *c-fos* and GAPDH genes as described (15, 16). Filters were autoradiographed and the signals were analyzed using a DHU Beckman densitometer.

RESULTS AND DISCUSSION

The effects of angiotensin II and PMA on the rates of transcription in isolated nuclei were studied, in order to investigate the mechanism(s) involved in the increase in *c-fos* mRNA accumulation induced by these agents. For this purpose, cells were incubated in the absence (buffer alone) or presence of near maximally effective concentrations of angiotensin II (100 nM) or PMA (1 μ M) during the times indicated; nuclei were isolated and run-off transcription assays were performed. Results are presented in Fig. 1. It can be observed that in cells incubated in the absence of any agent the rate of transcription is similar at 1 and 5 min of incubation and markedly decreased at later times (Fig. 1). These results are consistent with the observation that cell isolation or even the simple manipulation of the liver is capable of inducing *c-fos* expression (21). Therefore, our data indicate that our "basal" actually represents an stimulated state due to the cell isolation procedure and that such stimulus progressively vanishes. PMA and angiotensin II markedly stimulated transcription. As early as 1 min after the addition of these agents clear increases, relative to the "basal", were observed and such effects were much more marked when the cells were incubated for 5 or 15 min with angiotensin II or PMA. At 30 min of incubation the effects of these agents decreased but the rate of *c-fos* transcription was clearly much bigger than that observed in cells incubated in the absence of these agents (Fig. 1). It should be mentioned that the

magnitude and the temporal course of the effects of angiotensin II and PMA were not identical. The effect of PMA was consistently bigger in magnitude than that of angiotensin II and declined more rapidly after 15 min of incubation; the effect of angiotensin II was of smaller magnitude but decreased more slowly. This is consistent with the bigger efficacy of PMA to increase *c-fos* expression in liver cells (15) and may also suggest differences in the mechanisms of action of these agents. In this regard, we would like to mention that studies using inhibitors have suggested that serine/threonine and tyrosine protein kinases participate in the increase in *c-fos* expression in hepatocytes induced by PMA and angiotensin II but that some differences were observed (16).

In experiments where actinomycin D (5 $\mu\text{g/ml}$) was added to the cells 15 min before angiotensin II or PMA, no induction of transcription was observed in isolated nuclei (data not shown). In addition, the transcription rate of GAPDH was fairly constant during the course of the experiments and there was no major change due to angiotensin II or PMA (Fig. 1). These data clearly indicate that the effects on transcription were not general but relatively specific, i. e., possibly affecting other immediate early genes (15).

As mentioned, in whole cells the accumulation of *c-fos* mRNA induced by angiotensin II and PMA was greatly reduced by preincubation with actinomycin D (15); however, basal *c-fos* expression was also reduced and an effect of both angiotensin II and PMA even in the presence of the transcription inhibitor,

actinomycin D, was evident (15). These data clearly suggested that PMA and angiotensin II exerted effect(s) at post-transcriptional level(s).

In order to test this hypothesis we measured *c-fos* mRNA half-life. Two types of experiments were performed. In one set of experiments cells were incubated in the absence of any agent or presence of angiotensin II (100 nM), PMA (1 μ M) or cycloheximide (10 μ g/ml) during 30 min; this time was selected to obtain maximal *c-fos* mRNA accumulation (15). After this time, actinomycin D (5 μ g/ml) was added to block transcription and total RNA was isolated at the times indicated (Fig. 2). As it can be observed, in cells incubated with buffer alone, the level of expression of *c-fos* mRNA rapidly decreased. The rate at which the amount of *c-fos* mRNA diminished was slowed down by treatment with PMA or angiotensin II (Fig. 2). Interestingly, the effect of angiotensin II on mRNA stability was clearly more marked than that of PMA, in contrast with the effects on transcription (Fig. 2). Cycloheximide markedly increased *c-fos* mRNA stability (Fig. 2). The half-life values obtained from these experiments are presented in Table I. These results clearly indicate that angiotensin II and PMA are able to modulate post-transcriptionally the level of expression of this proto-oncogene.

In another set of experiments, the cells were preincubated with actinomycin D for 15 min before the addition of any agent. After this preincubation hepatocytes were incubated for 30 min (maximal *c-fos* accumulation) in the absence or presence of

angiotensin II, PMA or cycloheximide and the incubation continued for different times (Fig. 3). The amount of *c-fos* mRNA was much lower than that in the previous set of experiments (~ 50%). Nevertheless, as it can be observed, the data obtained were very similar to those in Fig. 2., i.e., in cells incubated with buffer alone a very rapid decrease in the signal was observed, such decrease was slowed down by PMA, angiotensin II and cycloheximide. Again, angiotensin II was more effective than PMA and cycloheximide enormously stabilized mRNA (Fig. 3). The half-life values obtained from these experiments are presented in Table I. It can be observed that the values are remarkably similar in both sets of experiments; the data indicate that angiotensin and PMA modulate the level of *c-fos* mRNA at a post-transcriptional level and that such an effect is also independent of *de novo* transcription. In other words, that such modifications of mRNA half-life occurred through molecular entities already present in the cell repertoire.

The ability of cycloheximide to induce proto-oncogene expression in liver has been extensively documented both *in vivo* and *in vitro* (15, 16, 21, 22). It is well known that agents that inhibit protein synthesis (such as cycloheximide) promote *c-fos* mRNA accumulation in different cell types (23). Indeed the mRNA for these genes is "superinduced" in the presence of cycloheximide and anisomycin which suggest that short-lived protein(s) continuously synthesized *de novo* inhibit mRNA turnover (24).

The effects of PMA and angiotensin II on proto-oncogene mRNA stabilization in liver cells have not been described before. The

angiotensin II receptor that mediates this effect in liver cells is of the AT₁ subtype (13, 15). This receptor subtype has already been cloned and belongs to the seven transmembrane domains family of receptors, coupled to G proteins (25, 26). Activation of these receptors in liver cells stimulate the phosphoinositide turnover/calcium mobilization signal transduction process (13, 14). Surprisingly, activation of other receptors coupled to the same signal transduction pathway in these cells, such as the α_{1B} -adrenoceptors or the V₁ vasopressin receptors, does not increase *c-fos* expression as stimulation of the AT₁ receptor does (14); this suggests that additional signalling pathways could be involved. In fact, it has been shown that angiotensin II is able to induce tyrosine phosphorylation of different proteins in vascular smooth muscle cells (27), GN4 liver epithelial cells (28) and neonatal fibroblast (29). It has also been recently reported that activation of AT₁ receptors induced tyrosine phosphorylation of phospholipase C γ in vascular smooth muscle cells and that this action is, at least, partially responsible of the increase in IP₃ production induced by angiotensin II in these cells (30). This effect is similar to that induced by EGF on phospholipase C γ (31). Additional similarities in the effects of stimulation of AT₁ angiotensin II receptors as compared to those of growth factor receptors with tyrosine kinase activity exist: angiotensin II, like PDGF, is able to stabilize JE (monocyte chemoattractant) mRNA in cultures of vascular smooth muscle cells (32).

The ability of PMA to stabilize mRNA has been reported in

human HL-60 leukemic cells. In these cells, the presence of phorbol ester-regulated translational inhibitors has been demonstrated (33). It is possible that PMA may induce *c-fos* mRNA stabilization through a similar mechanism, however, the existence of such translational inhibitors in liver cells remains to be experimentally shown.

In liver cells there is evidence of postranscriptional control of gene expression by hormones. Glucagon induces PEPCK gene expression and such induction is correlated with the binding of a cytosolic protein to the 3' end of the PEPCK mRNA which modulates its half-life (34). In addition, it has been shown that insulin and glucagon antagonize each other at the levels of both PEPCK gene expression and binding of cytosol proteins to PEPCK mRNA (35). Insulin modulates the expression of several proto-oncogenes such as *c-fos* and *c-myc* in H4 hepatoma cells (36,37). Interestingly, the effect of insulin on *c-fos* expression seems to be partially mediated through activation of protein kinase C.

In summary, our present findings clearly indicate that angiotensin II and PMA modulate *c-fos* expression by increasing both gene transcription and mRNA stability. The effects of angiotensin II are particularly interesting since similarities in the action of this mediator and growth factors are evidenced.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to Gerardo Coello, Ana María Escalante and Fernando López for help and advice. The expert secretarial assistance of Mrs. Guadalupe Ramírez is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Shöntal, A. (1990) *Cell. Signal.* **2**, 215-225.
2. Herschman, H.R. (1991) *Ann. Rev. Biochem.* **60**, 281-319
3. Curran, T., and Morgan, J.Y. (1987) *Bioessays* **7**, 255-258
4. Greenberg, M.E., Ziff, E.B., Green, L.A. (1984) *Nature* **311**, 433-438.
5. Kruijer, W., Cooper, J.A., Hunter, T., Verma, I.M. (1984) *Nature* **312**, 711-716.
6. Verma, I.M. (1988) *Trends in Genetics* **4**, 93-96.
7. Verma, I.M. (1987) *Adv. Cancer Res.* **49**, 29-52
8. Rauscher, F.J. III, Cohen, D.R., Curran, T., Bos, T.J., Vogt, P.K., Bohman, D., Tjian, R., Franza, B.R. Jr., (1988) *Science* **240**, 1010-1016.
9. Trejo, J.A., and Brown, J.H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 7876-7882.
10. Shapr, F.R., González, M.F., Hisanaga, K., Mobley, W.C., Sagar, S.M. (1989) *Neurosci. Lett.* **100**, 117-122.
11. Morgan, J.I., and Curran, T. (1991) *Ann. Rev. Neurosci.* **14**, 421-451.
12. Saavedra, J.M. and Timmermans P.B.M.W.M. (1994) *Angiotensin Receptors* Plenum Press, New York.
13. García-Sáinz, J.A and Macías-Silva, M. (1990) *Biochem. Res. Comm.* **172**, 780-785.
14. Bauer, P.H., Chiu, A.T., and Garrison, J.C. (1991) *Mol. Pharmacol.* **39**, 579-585.
15. González-Espinosa, C., and García-Sáinz, J.A., (1992) *Biochim.*

- Biophys. Acta* 1136, 309-314.
16. González-Espinosa, C. and García-Sáinz J.A. (1995) *Life Sci.* 56, 723-728.
 17. Berry, M.N. and Friend, D.S. (1969) *J. Cell. Biol.* 43, 506-520.
 18. Greenberg, M.E., Greene, L.A. and Ziff, E.B. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14101-14110.
 19. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
 20. Fort, Ph., Marty, L., Piechaczyk, S., Sabrouy, E., Dani, Ch., Jeanteur, Ph. and Blanchard, J.M. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13, 1431-1442.
 21. Kruijer, W., Skelly, H., Botteri, F., Van der Putten, H., Barber, J.R., Verma, I.M. and Leffert, H. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 7929-7933.
 22. Etienne, P.L., Baffet, G., Desvergne, M., Boissard-Rissel, M., Glaise, D., and GuguenGuillozo, C. (1988) *Oncogene Res.* 3, 255-262.
 23. Mahadevan, I.C. and Edwards, D.R. (1991) *Nature* 349, 747-748.
 24. Robertson, M.R. (1988) *Nature* 334, 100-102.
 25. Sasaki, K., Yamano, Y., Bardham, S., Iwai N., Murray, J.J., Hasegawa, M., Matsuda, y., and Inagami, T. (1991) *Nature* 351, 230-232.
 26. Murphy, T.J., Alexander, R.W., Griending, K.K., Runge, M.S., and Bernstein, K.E. (1991) *Nature* 351, 233-236.
 27. Molloy, C.J., Taylor, D.S. and Weber, H. (1993) *J. Biol. Chem.*

- 268, 7338-7345.
28. Huckle, W.R., Dy, R.C. and Earp, S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 8837-8841.
 29. Schorb, W., Peeler, T.C., Madigan, N.N., Conrad, K.M. and Baker, K.M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 19626-19632.
 30. Marrero, M.B., Paxton, W.G., Duff, J.L., Berk, B.C. and Bernstein, K.E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 10935-10939.
 31. Wahl, W., Nishibe, S., Suh, P.-G., Rhee, S.G., and Carpenter, G. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1568-1572.
 32. Taubman, M.B., Rollins, B.J., Poon, M., Marmur, J., Green, R.S., Berk, B.C. and Nadal-Ginard, B. (1992) *Circulation Research* **70**, 314-325.
 33. Konno, S., Borelli, T.J. and Wu, J.M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 5010-5017.
 34. Christ, B. and Nath, A. (1993) *Eur. J. Biochem.* **215**, 541,547.
 35. Christ, B., Heise, T., and Jungermann, K. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 641-649.
 36. Messina, J.L. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 11700-11705.
 37. Messina, J.L., Standaert, M.L., Ishizuka, T., Weinstock, R., and Farese, R.V. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9223-9228.

Abbreviations used are:

PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase.

FIGURE 1. Analysis of *c-fos* transcription in isolated nuclei. Plasmid DNAs for *c-fos* proto-oncogene and GAPDH gene were spotted onto nylon membranes and hybridized with ³²P-labeled run-off transcripts from nuclei isolated at different times (0-30 min) after the addition of buffer (□, ■), 0.1 μM angiotensin II (○, ●) or 1 μM PMA (◇, ◆) to hepatocytes. Radioactivity was visualized by autoradiography and quantified by densitometric analysis. Plotted are the means of four independent experiments for hybridization using the *c-fos* gene (solid symbols), or the GAPDH cDNA (open symbols). Data are presented in arbitrary densitometric units (S.E.M. are within the symbols). The inset shows a representative film.

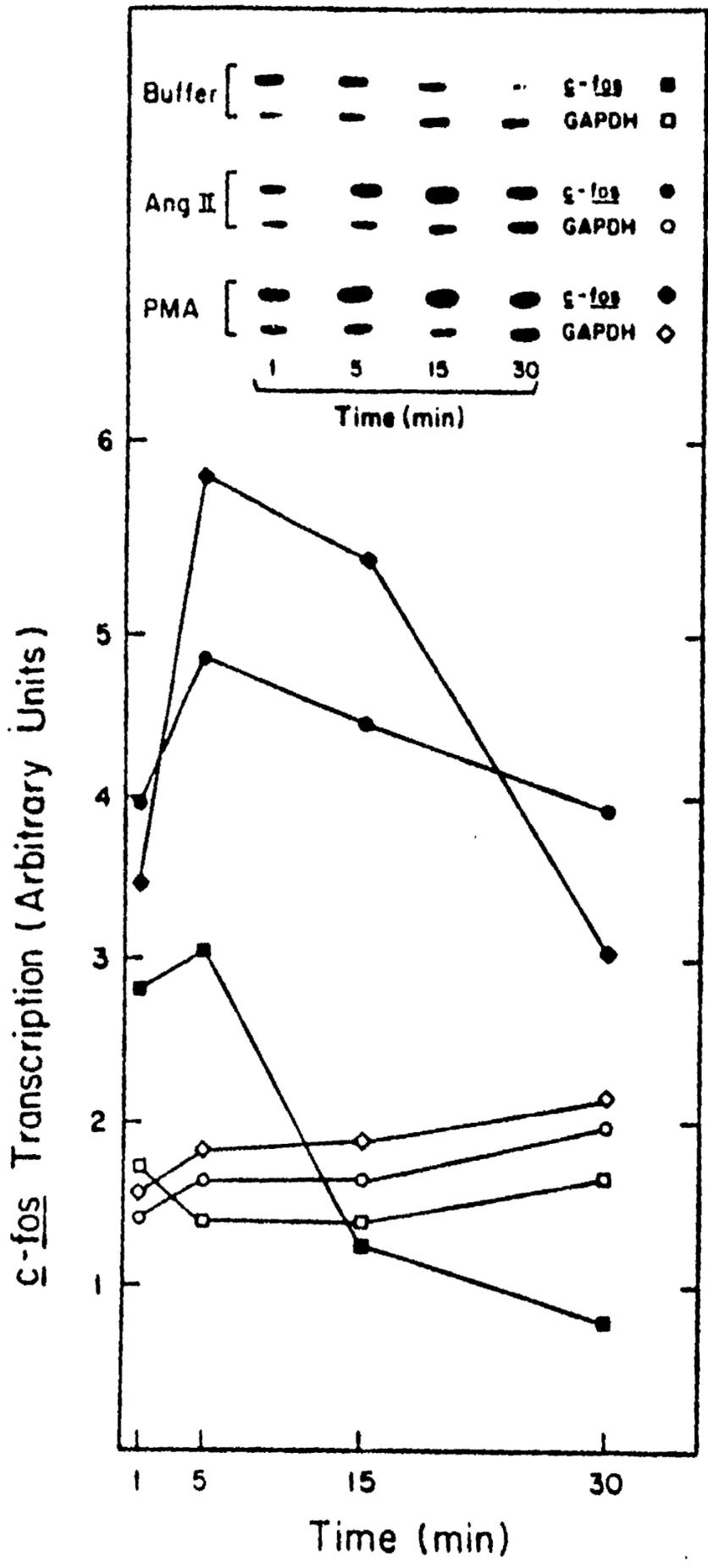


FIGURE 2. Analysis of *c-fos* mRNA stability. Cells were pre-incubated for 15 minutes with buffer, at this point 0.1 μ M angiotensin II (Δ), 1 μ M PMA (o) or 10 μ g/ml cycloheximide (\blacktriangle) were added. Incubation was continued for 30 minutes and then 5 μ g/ml actinomycin D was added. Incubation further continued for the times indicated and total RNA was isolated, spotted onto nylon membranes and hybridized with Nick-translated *c-fos* probe. Plotted are the means of five independent experiments (S.E.M. are within the symbols), data are presented as percentage of initial values (time 0). Insets shows a representative experiment.

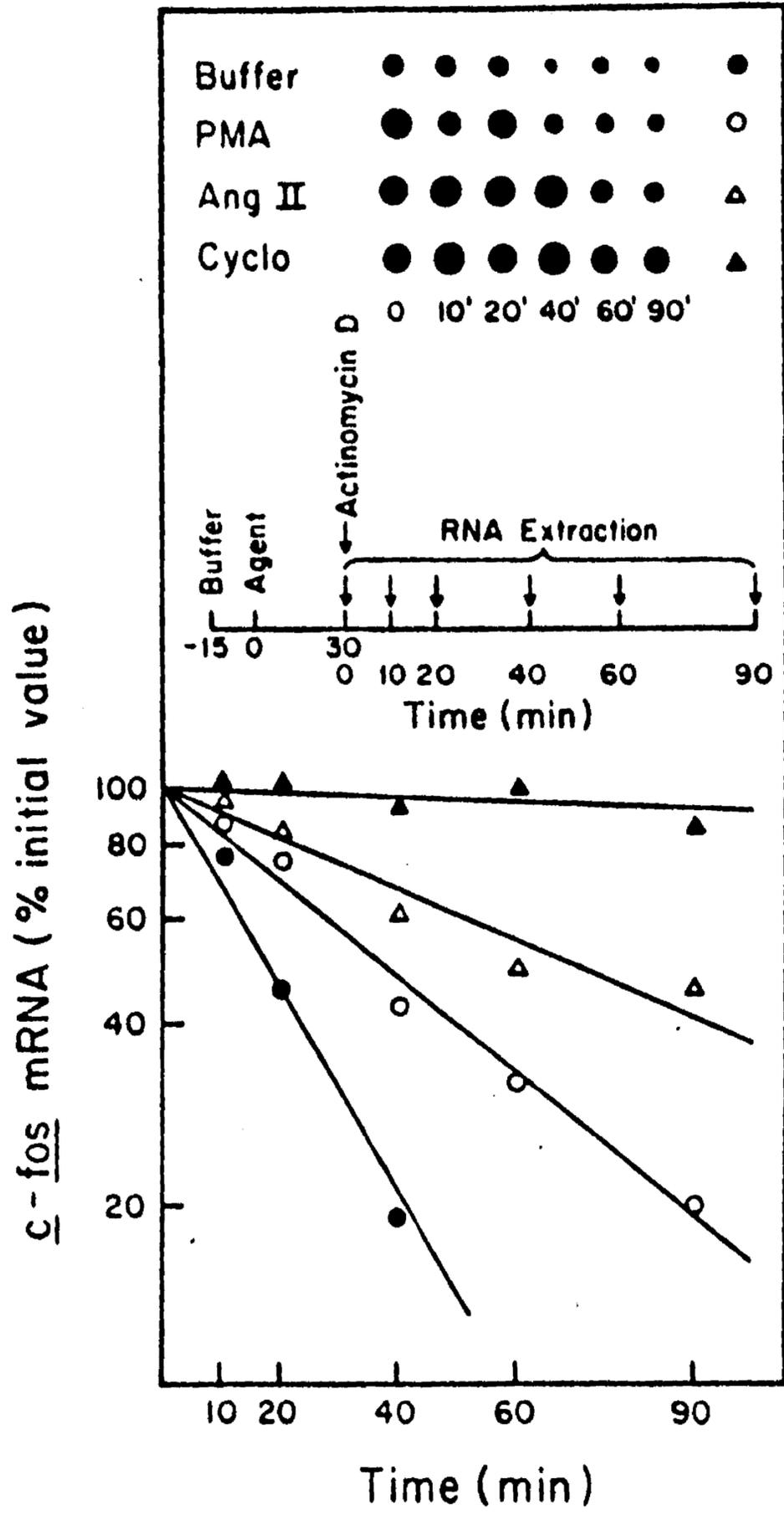


FIGURE 3. Analysis of *c-fos* mRNA stability. Cells were preincubated with 5 μ g/ml actinomycin D, at this point agents were added (symbols as in figure 2). Incubation was continued for 30 minutes and at the times indicated total RNA was isolated as in Fig. 2. Plotted are the means of five independent experiments (S.E.M. are within the symbols), data are presented as percentage of initial values (time 0). Inset shows a representative experiment.

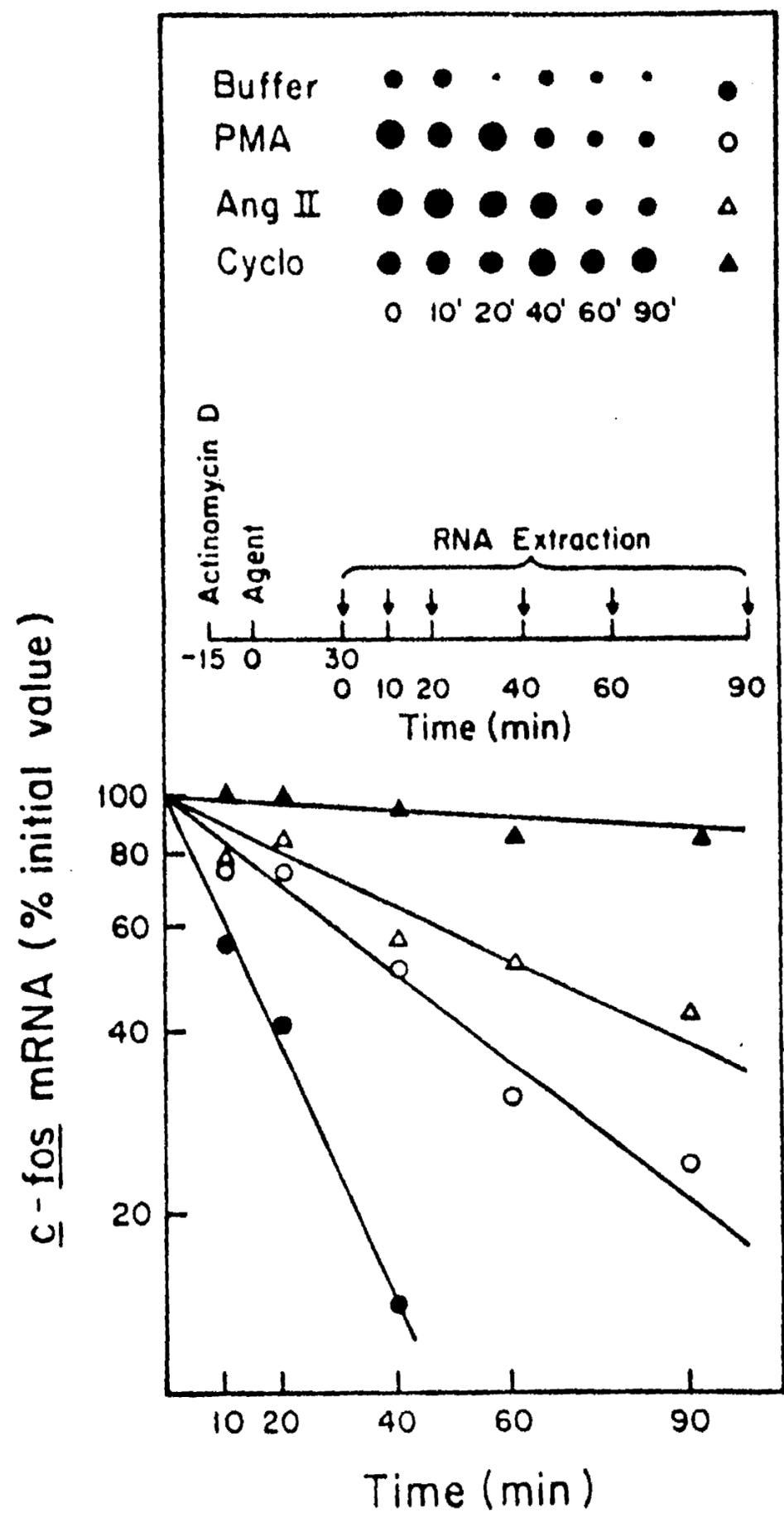


TABLE I. Half-life values of *c-fos* mRNA. Data were obtained from the regression analysis of values in Figs. 2 and 3. Data are the means \pm S.E.M. of 5 experiments.

Agent Added	Condition	
	Addition of Actinomycin D After 30 minutes of incubation with the Agents (Fig. 2)	Pre-incubation with Actinomycin D (Fig.3)
	Half Life (min)	
Buffer	18 \pm 5	14 \pm 5
Angiotensin II	71 \pm 7	65 \pm 6
PMA	38 \pm 4	40 \pm 5
Cycloheximide	>> 90	>> 90

DISCUSION DEL SEGUNDO TRABAJO

La expresión genética desde el DNA hasta la proteína es un proceso complejo, con muchas etapas, mismas que pueden ser reguladas para controlar la síntesis de alguna proteína en especial. Las células pueden modular la expresión genética controlando 1) la transcripción (inicio, elongación y terminación), 2) el procesamiento del RNA (adición del cap en el 5', la cola de poli (A) y la remoción de intrones, 3) el transporte del RNA del núcleo al citosol, 4) la traducción del RNA, 5) la acumulación del RNA mensajero y su degradación, y 6) la localización y procesamiento de la proteína.

En este segundo trabajo nos preguntamos ¿qué niveles de la expresión de la información genética están siendo modificados por la hormona Angio II y el PMA para permitir la acumulación del mensaje para *c-fos* en los hepatocitos normales?. Encontramos que ambos agentes modifican tanto la transcripción *de novo* como la vida media del mensajero.

1. El control transcripcional de la expresión de *c-fos*.

Es evidente, por los ensayos de Run-off, que tanto la hormona angiotensina II como el PMA inducen la transcripción *de novo* de *c-fos*. Este efecto es muy rápido, observándose desde el primer minuto de exposición al agente.

Se sabe que el control transcripcional de *c-fos* involucra algunos elementos reguladores que actúan en cis en el promotor del gene (figura 13). Los más importantes son el elemento de respuesta al suero (SRE), y el elemento inducible por *c-sis* (factor de crecimiento derivado de plaquetas) (SIE). El SRE consiste en una serie de sitios de unión a factores de transcripción, algunos regulables y otros no, por la proteína cinasa C (PKC) (Marais, 1993). Su secuencia central une a un dímero de la proteína SRF (factor de respuesta a suero) . Otras proteínas se unen junto al SRF, como la proto-oncoproteína Elk-1, miembro de la familia Ets (Gutman, 1991). El pegado de Elk-1 depende de que se haya unido el SRF, sugiriendo que se necesita un complejo ternario Elk-1-SRF-SRE para inducir la síntesis de *c-fos* regulada por el SRE (ver figura 14). Hacia el 5' del SRE se encuentra el SIE, que se identificó inicialmente por su inducibilidad con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Wagner, 1990). El SIE puede unir a varias proteínas, como el factor inducible por PDGF (SIF), la proteína p91 (Fu, 1993), y el Stat91 (Sadowski,1993) (figura 14).

El complejo ternario de Elk1-SRF-SRE parece ser la maquinaria nuclear sensible a los componentes de la vía de la cinasa MAP, mientras que el sitio de Stat91 es representativo de un control más directo, con sólo algunos intermediarios que pueden ser activados por ciertos factores de crecimiento , citocinas e interferones (IFN's), (Shuai, 1993).

Probablemente la cinasa MAP podría ser el puente entre un receptor hormonal acoplado a proteínas G (como el de Angio II en este caso) y el promotor de *c-fos* . Existe una gran cantidad de evidencia que indica que hay varias formas en las que los receptores hormonales pueden activar a esa cinasa. El esquema general se muestra en la figura 15, en la que se

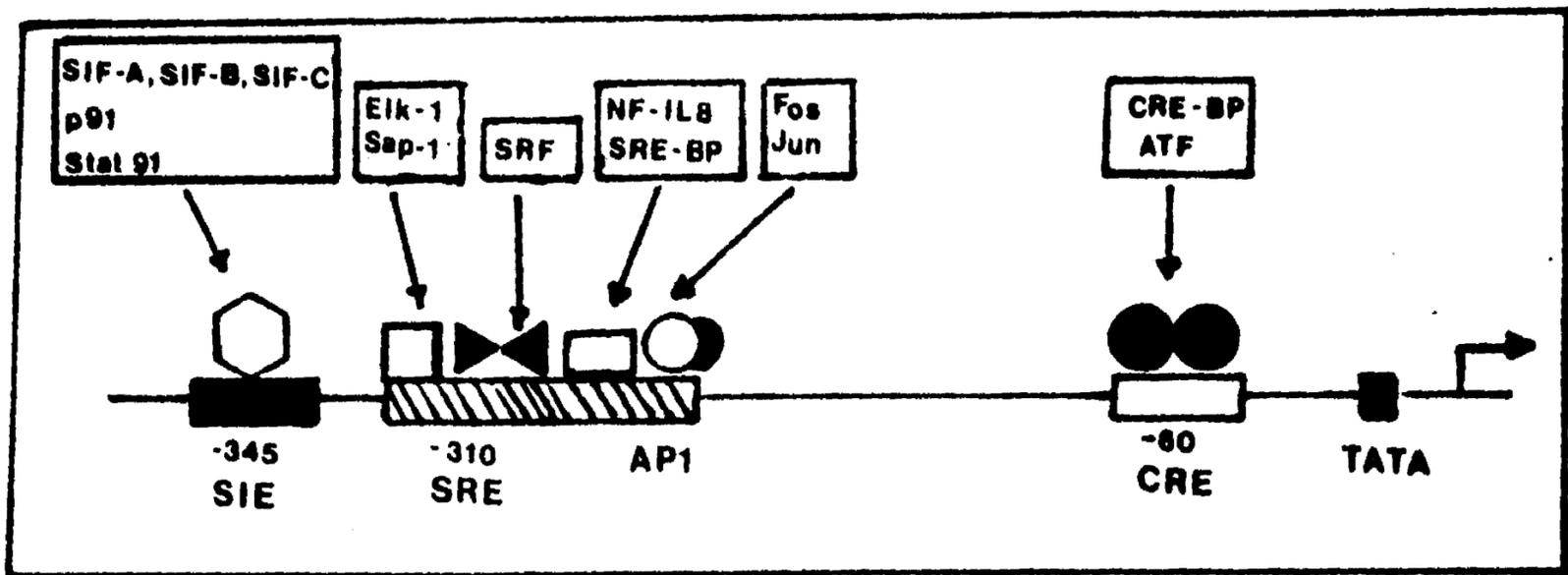


Figura 13. Organización de los sitios de unión a varios factores en el promotor de *c-fos*. Los elementos actuantes en *cis* que se muestran son: CRE (por cyclic AMP-response-element); AP-1 (por activating protein 1); SRE (por serum-response-element) y SIE (por sis-inducible-element). También se muestran ejemplos de factores que se pueden unir a estas secuencias, como el ATF (por activating-transcription-factor); CRE-BP, (por CRE-binding-protein); NF-IL6 (por nuclear factor-interleukin 6); SIF (por c-Sis-inducible factor); SRF (por serum-response-factor); Stat91 (por signal transducer and activator of transcription 91).

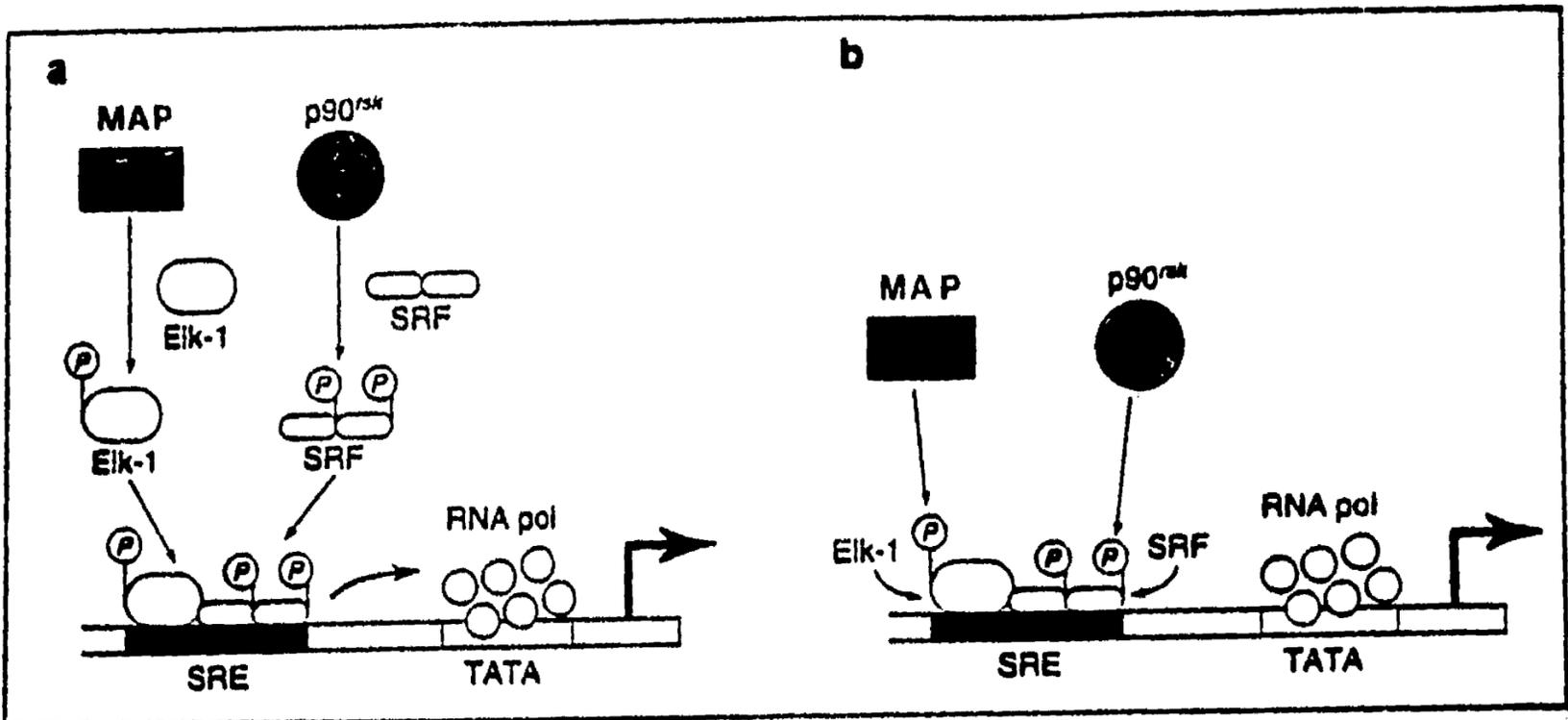


Figura 14. Dos esquemas alternativos que puede seguir la vía de la cinasa MAP para activar la transcripción de *c-fos*. Panel A. Después de su activación y su translocación al núcleo, la cinasa MAP y p90^{rk} fosforilan a Elk-1 y al factor de respuesta a suero (SRF), respectivamente, induciendo la unión a DNA y la transactivación de la transcripción. Panel B. Las cinasas no afectan el pegado al DNA de los factores, pero la fosforilación cambia su conformación para que puedan llevar a cabo sus funciones de transactivación.

resumen los resultados obtenidos en muchos sistemas durante los últimos 5 años (Blumer, 1994). Se observa que la estimulación de un receptor con siete dominios transmembranales puede llevar a la disociación de uno o varios tipos de proteínas G (las que parecen llevar a cambios en la expresión génica son G_{12} y G_q). A su vez, las subunidades α y $\beta\gamma$ son capaces de activar a la fosfolipasa $C\beta$ y a Ras, desencadenando una cascada de activación de cinasas, como la PKC (cinasa de serina-treonina), la cinasa Raf (de serina-treonina), la MEK (de treonina-tirosina) y la MAPK (de serina-treonina). Se ha demostrado una rápida translocación de la MAP y de la cinasa $p90^{rk}$ (cinasa ribosomal S6) del citoplasma al núcleo después de la estimulación con suero de fibroblastos (Chen, 1992). El activador de la cinasa MAP (la cinasa de la cinasa MAP, MEK) se queda en el citosol (Lenormand,1993). La translocación de la cinasa MAP se correlaciona temporalmente con el incremento en el RNAm de *c-fos* (Chen,1992). No se sabe el mecanismo de translocación al núcleo, es posible que la fosforilación cause un cambio conformacional que, 1) exponga un epítopo para la translocación hacia el núcleo; 2) libere a las proteínas de anclas citoplásmicas, como en el caso del $NF\kappa B$, o 3) permita que se asocien con proteínas "lanzadera" que las escolten hacia el núcleo.

En el caso de la activación transcripcional de *c-fos*, los intermediarios citosólicos en fibroblastos en cultivo, parecen ser la cinasa MAP y la $p60^{rk}$, pero aún no está claro el mecanismo por el cual llegan a modificar la transcripción del gene. Hay dos alternativas que se muestran en la figura 14. Tanto el SRF como Elk-1 modifican su capacidad de unirse a DNA cuando son fosforiladas (Rivera, 1993), pero también se ha demostrado que el SRE está ocupado antes y después de la inducción con suero (Marais, 1993), lo que sugiere que la

fosforilación de los factores que ya están unidos, altera su capacidad de trans-activar a la maquinaria de transcripción. Lo que sí está claro es que el extremo carboxilo terminal de Elk-1 es sustrato de fosforilación por la cinasa MAP (Janknecht, 1993) y mutaciones en ese sitio, evitan la transactivación de la transcripción sobre *c-fos*. Por otro lado, se sabe que la cinasa $p60^{src}$ puede fosforilar al SRF, incrementando su afinidad por el SRE. Aún falta mucho por descifrar y parte del problema radica en la purificación de las proteínas nucleares, sin que se altere el estado de fosforilación artificialmente.

Otra de las vías que pueden controlar la transcripción de *c-fos* es la del Stat91, la cual se activa por interferones (IFN's), factores de crecimiento y citocinas.

Esta vía se identificó estudiando el sistema de transducción de señales de varios IFN's (Muller, 1993). Los receptores para interferón no tienen actividad de cinasas de tirosina, pero se ha demostrado que su activación induce la fosforilación de tirosina y provoca de factores genéticos estimulados por interferones (ISGFs), los cuales son factores de transcripción que se translocan al núcleo donde se unen a genes blanco y estimulan la transcripción (Silvennoinen, 1993). Las fosforilaciones observadas se llevan a cabo por miembros de la familia de cinasas JAK (por "Just Another Kinase"), que son cinasas de tirosina pero no son receptoras para ninguna hormona. Esta familia incluye a JAK1, JAK2 y Tyk2 (Muller, 1993). Las cinasas JAK también se activan por receptores a citocinas, como la eritropoyetina y la hormona de crecimiento, y la familia que comprende al factor inhibidor de la leucemia (LIF), a la interleucina 6 (IL-6) y la oncostatina M (Stahl, 1994).

Se ha demostrado que el ISGF3 contiene tres proteínas (p113, p91 y 84) que se fosforilan en tirosinas al exponer a las células a los interferones α ó β ; después de la fosforilación viajan al núcleo, donde se unen a otra proteína llamada p48 y estimulan la transcripción (Shuai, 1993). La investigación sobre *c-fos* identificó al SIF como un factor que se une al SIE induciendo la transcripción del gene después de la estimulación con el PDGF y se demostró que SIF era idéntico al p91 del ISGF3 (Silvennoinen, 1993). Esos hallazgos llevaron a la publicación de una enorme cantidad de trabajos, y se acuñó el término Stat91 para esa proteína de 91 kDa capaz de ser fosforilada en tirosinas tanto por miembros de la familia JAK como directamente por los receptores a factores de crecimiento con actividad de cinasas de tirosina (Montminy, 1993). Sabemos que la fosforilación de un solo residuo del Stat91 es suficiente para activarlo, translocarlo y permitir que induzca la transcripción de *c-fos*. Stat91 tiene un dominio SH2 que parece ser importante en su interacción con otros miembros de su familia (las proteínas Stat) (Ruff-Jamison, 1993).

No podemos descartar la participación del Stat 91 en el efecto transcripcional observado con la Angio II y el PMA en los hepatocitos de rata, dado que desconocemos si el receptor de la Angio II puede activar a las cinasas JAK, pero es un hecho que la genisteína (un bloqueador de las actividades de cinasas de tirosinas) inhibió el efecto sobre *c-fos* (primer trabajo). Por otro lado, en la figura 15 se señala la participación de la cinasa MEK, la cual tiene actividad de cinasa en treonina-tirosina, y probablemente, pueda fosforilar a Stat91.

En el caso de las célula hepáticas, se han caracterizado sólo algunos de los componentes señalados en la maquinaria de transducción de la señal hacia el núcleo: se ha demostrado el

acoplamiento de los receptores AT_1 a G_i y a G_q , se sabe que existen varias isoformas de la PKC que pueden ser activadas por la Angio II así como por distintos tipos de ésteres de forbol. Aunque no se han caracterizado las cinasas MAP en el hígado, en otros sistemas se sabe que se activan con la Angio II (Duff, 1992). No sabemos si los mismos sitios de control transcripcional de *c-fos* reportados en fibroblastos y otras líneas transformadas, operan en las células hepáticas. Los esquemas y las posibles explicaciones que hemos mencionado para nuestros resultados, carecen de comprobación directa en el sistema hepático.

Con respecto a la tercera vía principal de transducción de señales al núcleo, la del NF κ B, sabemos que en fibroblastos, no regula de ninguna forma la expresión del proto-oncogene *c-fos*.

Existen otras vías del paso de señales desde el citoplasma hasta el promotor de *c-fos* reportadas en células en cultivo. Se ha demostrado que la vía de la proteína cinasa A (PKA) puede involucrar tanto la disociación de anclas citoplásmicas como la translocación de la cinasa. En ese caso, la subunidad reguladora puede verse como el ancla citoplásmica de la subunidad catalítica, la que se desprende cuando se une el AMP cíclico. La subunidad catalítica se transloca al núcleo y fosforila a varios factores de transcripción como los miembros de la familia CREB (cAMP-response-element-binding) y los miembros de la familia ATF (activating-transcription-factor), que se unen a los CRE (cAMP-response-elements) del promotor del proto-oncogene (Nigg, 1992). Resultados previos que indican que la vía del AMP cíclico no induce de manera importante la activación de *c-fos* en hepatocitos de rata.

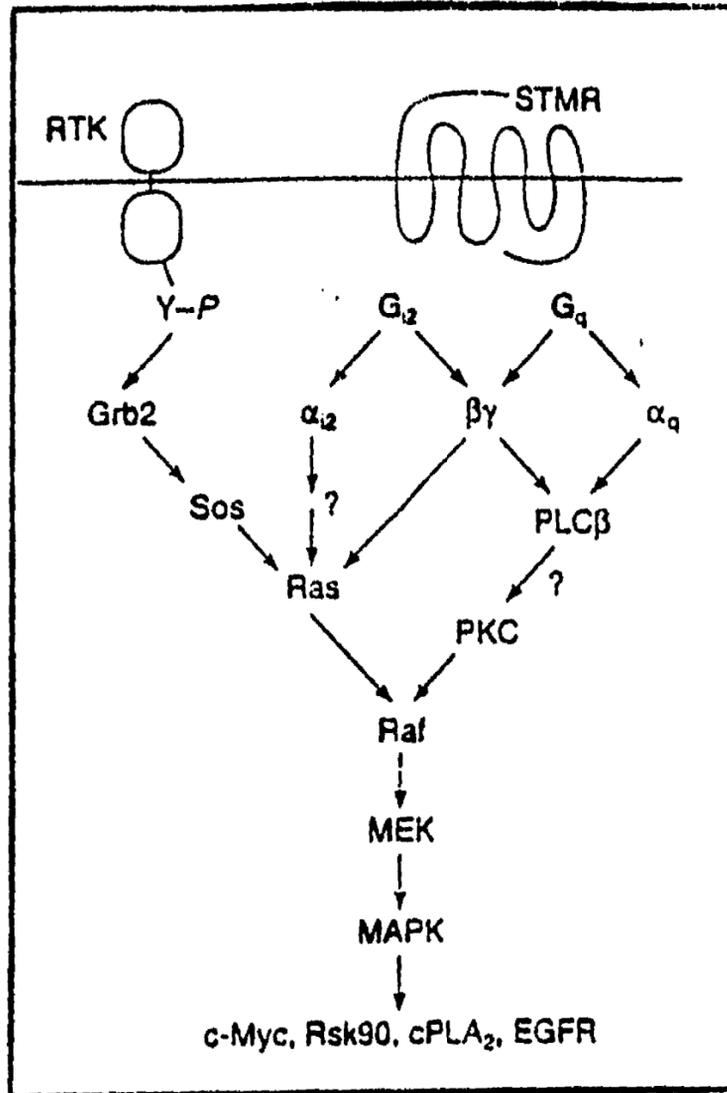


Figura 15. Vías de activación de la cinasa MAP en células de mamífero. Cuando los receptores a factores de crecimiento (RTK) se autofosforilan en tirosina, reclutan a Grb2 y a Sos a la membrana provocando la activación de Ras. Los receptores con siete dominios transmembranales (STMR) acoplados a proteínas G también pueden activar a Ras. Los intermediarios entre α_{12} y Ras no se conocen. Las actividades de las cinasas Raf, MEK, MAPK y $p90^{rsk}$ se explican en el texto.

2. El control post-transcripcional de la expresión de *c-fos*

Encontramos previamente que tanto la hormona Angio II como el PMA inducen una estabilización del RNAm para *c-fos*. Este cambio en la vida media del RNA es dramático, pasando de 18 minutos en condiciones normales hasta más de 40 minutos en presencia del PMA ó 60 minutos en presencia de la Angio II. Este efecto sobre el recambio de *c-fos* es independiente de la transcripción, dado que se observa aún en células pre-incubadas con el inhibidor de la transcripción Actinomicina D.

Ya se trató extensamente lo que se sabe de la regulación transcripcional de *c-fos*, y a continuación se describirá lo que se sabe de su degradación en citosol. En la figura 16 se muestran los posibles puntos de control sobre la degradación de un mensajero eucarionte típico. Se sabe que sobre el de *c-fos*, operan casi todos ellos (Hentze, 1991).

Muchos estudios de inducción de *c-fos* por factores de crecimiento demostraron que el RNAm para este gene se acortaba \approx 200 nucleótidos antes de ser degradado. Este decremento en el tamaño del RNA se debe a que se remueve la cola de poli (A) (Shyu, 1991). Este mensajero se desadenila rápidamente al llegar al citosol, pero se observa un período de latencia antes de que la señal radiactiva (la cual indica hibridación del RNA con la sonda marcada) comience a disminuir. Ese período corresponde al tiempo de remoción de las adeninas terminales (Shyu, 1991), después de lo cual la degradación procede

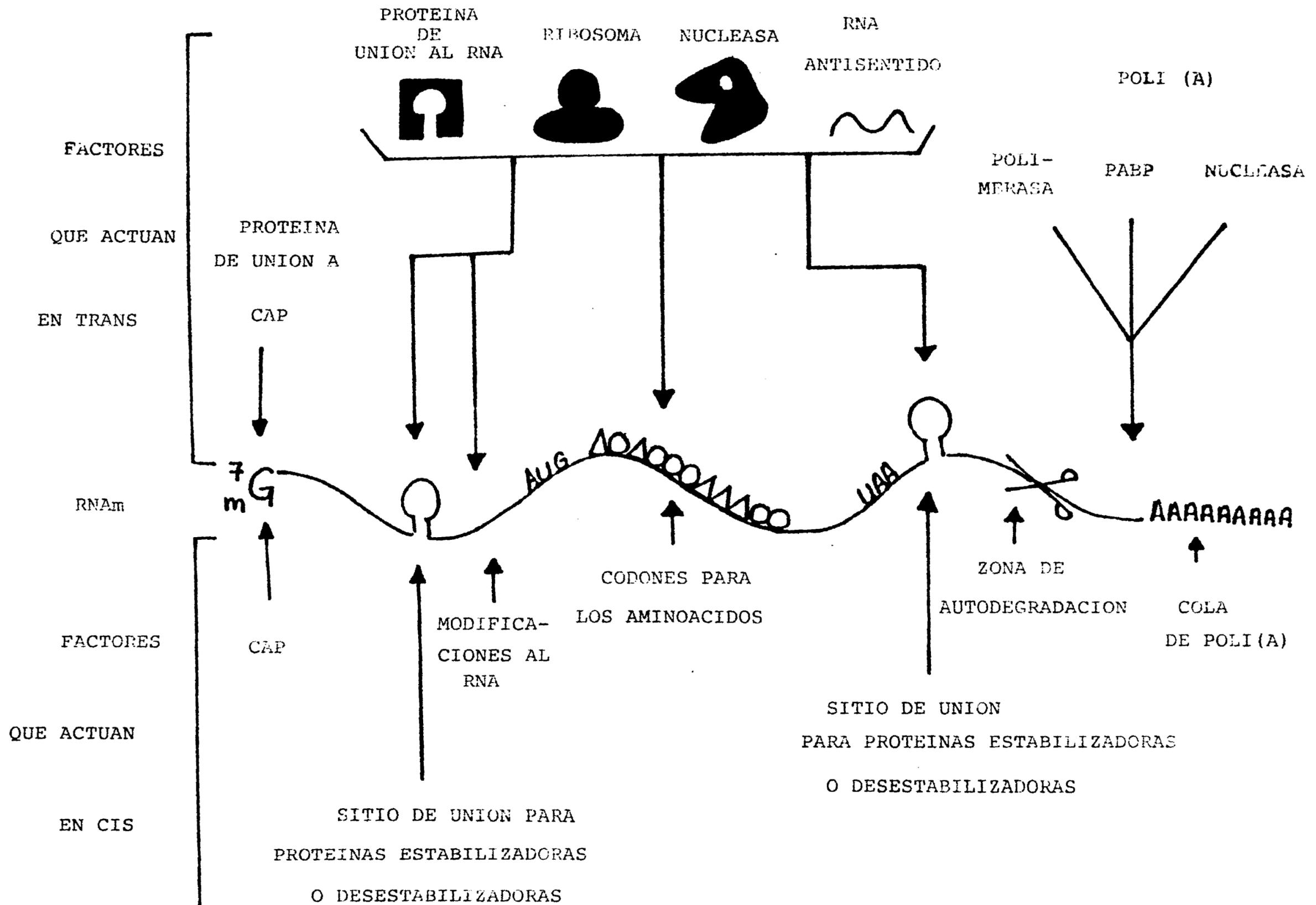


Figura 16. Representación esquemática de los elementos del RNAm que pueden afectar su recambio en el citosol y los factores que pueden reconocer a estos elementos. Casi todos estos niveles de control se ejercen sobre el mensajero de *c-fos* (ver el texto).

rápidamente, (vida media de aproximadamente 15 minutos), dependiendo del modelo celular que se estudie. En contraste con el RNAm de *c-fos*, un RNAm de β globina expresado a partir del promotor de *c-fos* y con el poli (A) de *c-fos* en fibroblastos estimulados con factores de crecimiento, se desadenila lentamente, de tal manera que aun 8 horas después, sigue teniendo una cola de poli (A) de por lo menos 60 nucleótidos. Aunque tanto el mensajero de *c-fos* como el de la construcción de β globina se desadenilan, la diferencia en la velocidad de desadenilación indica que el proceso está controlado por determinantes dentro de la secuencia de cada uno de los mensajeros. Haciendo diversas fusiones entre el mensajero de la β globina y *c-fos*, se han reportado por lo menos dos secuencias que se han llamado "determinantes de inestabilidad" en el mensajero del proto-oncogene (Shyu, 1991, ver más adelante). Se han montado sistemas *in vitro* donde se pueden estudiar los diferentes determinantes de inestabilidad de los RNAs mensajeros y se ha demostrado que, como lo indicaban los experimentos *in vivo*, la desadenilación precede a la degradación (Brewer, 1988).

Bernstein y cols. en 1989 estudiaron el efecto de una proteína que se unía a la cola de poli(A) sobre la degradación de varios RNAs; esta proteína se le llamó PABP (por poli (A) binding protein). Entre otras cosas encontraron que varias moléculas de PABP se unen con gran especificidad a la cola de poli (A) de los mensajeros de eucariontes, con una distancia entre centro y centro de 27 nucleótidos. Propusieron la hipótesis de que la PABP protege a la cola de poli(A) de la degradación por el ataque de las nucleasas específicas. Para probarla, se midió la disminución del RNAm para β globina usando extractos celulares conteniendo

PABP y extractos que ya no la tenían (la PABP se eliminó por cromatografía a través de poli (A) sefarosa). Se encontró que el mensajero se degradaba siete veces más rápido con los extractos sin PABP que con los extractos que contenían PABP. Esto apoyó la idea de que la PABP protegía a los mensajeros contra una nucleasa que actuaba por el lado 3' del mensajero.

Extrapolando estos datos al mensajero de *c-fos*, Schiavi y cols. propusieron en 1992 la idea de que los determinantes de inestabilidad de este RNA podían desestabilizar la asociación de la cola poli (A) con PABP, permitiendo la acción de las exonucleasas. Ellos demostraron que las colas de poli (A) de mensajeros que no tienen determinantes de inestabilidad fijan con mayor afinidad a la PABP. Sin embargo, el modelo de desestabilización se ha complicado por datos que provienen de modelos como la levadura (Sachs, 1989). En *S. cerevisiae*, cuando se inactiva una mutante termolábil de PABP, se incrementa la cola poli (A) de casi todos los mensajeros de la célula. Estos experimentos sugieren que la PABP unida puede estimular la remoción de la cola poli (A) de los RNAs *in vivo*, más que protegerlos de la degradación por nucleasas. Esta posibilidad, además, es consistente con el descubrimiento de una nucleasa de poli (A) dependiente de PABP en la levadura (Lindsten, 1989).

No se sabe si lo observado en la levadura es relevante para la regulación de los mensajeros de mamífero, pero es posible diseñar un modelo de degradación de RNAs de mamífero que incorpore los datos de levadura. En tal modelo, la desadenilación de los mensajeros estables e inestables ocurre por una nucleasa dependiente de PABP; dicha enzima degradaría,

solamente las colas de poli (A) que tuvieran PABP. La desadenilación de los RNAs estables procedería hasta llegar a un mínimo de poli (A), apenas suficiente para unir una o dos moléculas de PABP. Las PABPs asociadas con ese fragmento de poli(A) protegerían al mensajero de la degradación. En el caso de los mensajeros muy inestables, como el de *c-fos*, la presencia de los determinantes de inestabilidad puede afectar a la nucleasa dependiente de PABP de dos maneras: 1) estos determinantes de inestabilidad aumentarían la velocidad de desadenilación por la nucleasa y 2) estos determinantes permitirán la remoción de todo el poli (A) posiblemente uniendo un factor que lleve a la nucleasa de poli (A) a desadenilar en ausencia de la PABP. Este mensajero desadenilado, se degradará rápidamente (Schiavi, 1992).

La relación entre estas observaciones y los resultados obtenidos con la Angio II y el PMA en hepatocitos de rata es que esta proteína PABP puede ser fosforilada en una serina (Bernstein, 1989). Desafortunadamente en ese estudio, no se determinó qué cinasa puede fosforilar a la PABP, ni tampoco el efecto que esta fosforilación tiene sobre su afinidad a la cola poli (A) de los mensajeros. Sin embargo, el dato es interesante ya que tanto la Angio II como el PMA pueden desencadenar cascadas de activación de distintas cinasas, alguna de las cuales podría modificar a la PABP y, de esta forma, modular la vida media del proto-oncogene que medimos.

Otra forma en la que los agentes mencionados podrían modular la vida media de *c-fos* sería modificando la función de sus determinantes de inestabilidad, y no de la cola poli (A). El mensajero de *c-fos* tiene por lo menos dos secuencias que modulan su degradación: una

secuencia de 75 nucleótidos rica en AU (ARE, por AU-rich element), localizada en la región 3' no traducida del mensajero (3'UTR). Esta zona rica en AU contiene múltiples repeticiones de la secuencia AUUUA y por fusiones con el gene de la β globina se sabe que estas zonas incrementan la degradación del mensajero. Se han caracterizado por lo menos 4 proteínas que se unen al ARE de la 3'UTR en *c-fos* (Bonnieu, 1990); uno de esos polipeptidos recibió el nombre de AUBF (por adenosine-uridine-binding factor) (Gillis, 1991). Los tres polipeptidos presentan un alto contenido de fosfoserina y fosfotreonina y se sabe que en el caso del mensajero para la interleucina 2, que también tiene un ARE, el AUBF es fosforilado por la PKC (Ohmura, 1990). Es posible que tanto la Angio II como el PMA promuevan la fosforilación de las proteínas que se unen al ARE del mensajero y provoquen su estabilización.

El otro determinante de inestabilidad de *c-fos* se encuentra en la región codificante. Se supone que este determinante es el que vincula la degradación del mensajero con la síntesis de la proteína (Wisdom, 1991). Los primeros estudios demostraron que los inhibidores como la cicloheximida inhibían el degradación de los RNAs que contenían las regiones desestabilizantes en la región codificante del mensajero (Rahmsdorf, 1987). Dado que la cicloheximida inhibe la traducción de todos los RNAs mensajeros de la célula, estos estudios no permitieron establecer si es la traducción del mensajero *per se* o la síntesis de una proteína lábil lo que se necesita para la degradación rápida mediada por este determinante. Estudios recientes (Koeller, 1991) demostraron que no es la síntesis del propio RNAm de *c-fos* lo que ocasiona su rápida degradación. Es posible que inhibidores de

la traducción, como la cicloheximida, retarden la degradación del RNA inhibiendo la síntesis de proteínas lábiles importantes para ese proceso.

Se sabe que el PMA puede regular la actividad de varios inhibidores intrinsecos de la síntesis de proteínas en células leucémicas HL-60 (Konno, 1986). La actividad traduccional de estas células deja de inhibirse cuando se añade PMA. En este caso, el éster de forbol deja que la síntesis de proteínas continúe, pero puede ser que en otros sistemas celulares, ocurra lo contrario (Konno, 1986). De ser cierto que el PMA modula directamente la actividad traduccional de las células, es posible que la hormona Angio II sea capaz de hacer lo mismo, por el sistema de recambio de IP_3-Ca^{2+} , que activa a la PKC. En los hepatocitos de rata, la cicloheximida produjo la acumulación del mensajero de *c-fos* y un alargamiento de su vida media a más de 90 minutos. Desconocemos el efecto que tanto la Angio II como el PMA tengan en la maquinaria traduccional de las células hepáticas de rata, y no descartamos la posibilidad de que la regulación que estamos observando sea a este nivel.

Recientemente se encontró que la iniciación de la síntesis de proteínas se regula por el complejo PABP/poli(A), que induce interacciones entre el RNA, PABP y la subunidad ribosomal 60S, lo que facilita que se forme el complejo de iniciación (Munroe, 1990). Este hallazgo relaciona la unión de PABP con la eficiencia traduccional de un mensajero y nos da otro nivel de control, más complejo, que puede ser afectado tanto por la Angio II como por el PMA en los hepatocitos.

Finalmente, otra posibilidad de regulación del recambio de un RNA ha sido recientemente descrita: el glucagon induce la unión de una proteína en la región 3' del mensajero de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa en hepatocitos en cultivo; esta unión se revierte en presencia de insulina (Christ, 1993). Al parecer, la proteína es específica para la estimulación por glucagon y no se trata de la PABP. Nosotros no podemos descartar la posibilidad de que alguna proteína de este tipo sea inducida por la Angio II y el PMA para estabilizar específicamente el mensajero de *c-fos*, ni tampoco se puede afirmar que el mensajero del proto-oncogene sea el único estabilizado por estos dos agentes.

En procariontes y eucariontes, la activación transcripcional es el principal modulador del fenotipo celular (Ptashne, 1986). Sin embargo, la regulación postranscripcional puede jugar un papel importante en modular el nivel de expresión de una molécula particular. En general, los productos génicos que deben ser producidos rápidamente, funcionan durante un tiempo muy corto, son rápidamente eliminados y tienden a ser regulados post-transcripcionalmente (Raghow, 1987; Brawerman, 1989). Dicha regulación puede ser tan directa y rápida como la fosforilación y desfosforilación de proteínas pre-existentes, o más complicada, involucrando la estabilización y desestabilización de todo el conjunto de RNAs mensajeros en el citosol. El tipo de control empleado refleja el significado funcional y fisiológico de la molécula.

El efecto de la Angio II y el PMA sobre *c-fos* no es el único ejemplo de RNAs específicos modulados por hormonas a nivel post-transcripcional. Existen otros casos muy bien documentados. Las hormonas esteroideas regulan la estabilidad de muchos RNAs mensajeros

(Nielsen, 1990; Shapiro, 1987); en particular, los mensajeros de la hormona de crecimiento, la vasopresina (Paek, 1987; Atwater, 1990), la apo-lipoproteína de muy baja densidad (Cochrane, 1988) y la insulina (Muschel, 1986) se estabilizan por hormonas.

Otro ejemplo que se conoce desde ya hace varios años es el de la estabilización del RNAm de la vitelogenina de *Xenopus* en presencia de estrógenos (Brock, 1983). Además, sabemos que en hepatocitos tratados con estrógenos, el RNAm para la vitelogenina se incrementa hasta 50 veces (Atwater, 1990). Aunque la transcripción también se incrementa, el mecanismo dominante es el aumento en la vida media del RNA, que pasa de 16 a 500 horas en presencia de estrógenos. Este efecto es específico para la vitelogenina. Una explicación fue propuesta en 1990 por Nielsen et al, quienes afirmaron que el complejo receptor-hormona promueve la síntesis de proteínas estabilizadoras. Estas proteínas deben ser muy estables, ya que el efecto continúa por varios días aún cuando se añaden inhibidores de la síntesis de proteínas (Brock, 1983). Cochrane y Deely, en 1984 observaron que el estradiol induce la fosforilación reversible de dos proteínas en la subunidad ribosomal 40S, lo cual podría contribuir a estabilizar el RNA.

La estabilidad del RNA de la pro-colágena también se regula por hormonas; se afecta por glucocorticoides y por tratamiento con factores de crecimiento (Raghow, 1987). Este mensajero se desestabiliza por dexametasona y se estabiliza por el factor transformante β . Ambos efectos se contrarrestan si las células se tratan con inhibidores de la síntesis de proteínas, lo que indica que hay factores lábiles que median este fenómeno.

El RNAm de la caseína también es modulado post-transcripcionalmente en presencia de prolactina tanto *in vivo* como *in vitro* (Rosen, 1978). Cuando los cultivos de células de glándula mamaria se tratan con prolactina, se observa un incremento de 2 a 4 veces en el RNAm de la caseína. El efecto, más que transcripcional, es a nivel del RNA pre-existente, cambiando la vida media por un factor de 20.

Por otro lado, las hormonas no son las únicas moléculas que pueden generar cambios en el recambio de los distintos RNAm. La glucosa, por ejemplo, ayuda a estabilizar el mensajero de la insulina en células pancreáticas (Carter, 1991). Una infección viral puede influir en la estabilidad de los RNAs mensajeros tanto del huésped como del virus. El recambio de los RNAs del adenovirus cambia conforme avanza la infección (Cleveland, 1983). La infección de células Vero con el virus del herpes simple, ocasiona la estabilización de los mensajeros para histonas y tubulina (Schek, 1985). Por otro lado, el recambio de los RNAs que codifican para citocinas, linfocinas, oncogenes e histonas, varía en función del ciclo celular (Carter, 1991).

Finalmente, durante los últimos cuatro años, muchos grupos han publicado que los agentes que tienen acciones a muy corto plazo sobre el metabolismo celular, pueden ejercer sus efectos a través de la regulación del recambio de los RNAs, como en el caso de la angiotensina en el sistema de células hepáticas. Por mencionar algunos de esos agentes, mencionaremos que 1) el carbacol induce la desestabilización del RNAm del receptor muscarínico m1 para la acetilcolina (Lee, 1994); 2) la concanavalina A produce la estabilización del RNAm para una fosfatasa de tirosinas en linfocitos T (Rajenrakumar,

1993); 3) la norepinefrina desestabiliza el RNAm del receptor α_{1B} adrenérgico en células de músculo liso (Izzo, 1994); 4) el glucagon incrementa la vida media del RNAm de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas en hepatocitos de rata (Christ, 1993); 5) la insulina desestabiliza el RNAm de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas en hepatocitos de rata (Christ, 1993); 6) la insulina desestabiliza el RNAm de la glucógeno sintetasa en células de hepatoma (Okubo, 1991); 7) los glucocorticoides y el AMP cíclico inducen estabilización del RNAm para la tirosina hidroxilasa en células PC18 (de feocromocitoma murino) (Fossom, 1992); 8) el cadmio estabiliza el RNAm para la metalotioneína en células de pollo y de ratón (De, 1991); 9) los grupos hemo desestabilizan el RNAm de la 5-aminolevulinato sintasa en células hepáticas (Hamilton, 1991); y 10) la glucosa estabiliza el mensajero de la sintasa de los ácidos grasos en células HepG2 (Semenkovich, 1993).

Se ha demostrado que la activación de la PKC por ésteres de forbol es capaz de estabilizar al mensajero de la tirosina hidroxilasa en células PC12 (Vyas, 1990), por un lado, y por otro, hay evidencia de que la Angio II estabiliza el mensajero de la proteína JE en células vasculares (Taubman, 1992). Nuestro trabajo indica que el proto-oncogene *c-fos* puede ser regulado post-transcripcionalmente por la Angio II y por el PMA, lo que indica que aún no conocemos el alcance del efecto de la hormona angiotensina II en células que no están en división activa, como los hepatocitos. Todavía falta un largo camino por recorrer y experimentos futuros serán necesarios para esclarecer la vía intracelular de control de este gene.

CONCLUSIONES

En la acumulación del RNA mensajero del proto-oncogene *c-fos* por la Angiotensina II y el PMA intervienen cinasas que fosforilan residuos de serina-treonina, además de cinasas que fosforilan residuos de tirosina.

Esta acumulación del RNAm del proto-oncogene está regulada negativamente en forma tónica por fosfatasas.

La hormona Angiotensina II y el PMA inducen la transcripción *de novo* del gene *c-fos*.

La hormona Angiotensina II y el PMA inducen la estabilización del RNA mensajero del proto-oncogene en la célula hepática.

REFERENCIAS

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Agawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., Fukami, Y., 1987. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5592-95.

Alber, T. 1992. *Curr. Op. in Genet. and Development* **2**, 205-210.

Arenander, A. T., de Vellis, J., Herschman, H. R. 1989a. *J. Neurosci. Res.* **24**, 107-14

Arenander, A. T., Lim, R. W., Vanum, B. C., Cole, R., de Vellis, J., Herschman, H. R. 1989b. *J. Neurosci. Res.* **23**, 247-56

Atwater, J. A., Wisdom, R., Verma, Y. M. 1990. *Ann. Rev. Genet.* **42**, 519-540.

Barber, J. R., Verma, Y. M., 1987. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2201-2211

Bartel, D. P., Sheng, M., Lau, L. F., Greenberg, M. 1989. *Genes Dev.* **3**, 304-13

Berkowitz, L. A., Riabowol, K. T., Gilman, M. Z. 1989 *Mol. Cell. Biol.* **9**, 4292-81

Bergsma, D. J., Ellis, C., Kumar, C., 1992. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 989-995.

Bergsma, D. J., Ellis, C., Nuthulaganti, P., 1993. *Mol. Pharmacol.* **44**, 277-284

Bernstein, P., Peltz, S. W., Ross, J. 1989. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 659-670.

Bishop, J. M., 1985. *Cell* **42**, 23-38

Blumer, K. J., Johnson, G. L. 1994. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 236-240.

Bonnieu, A., Roux, P., Marty, L., Jeantour, P., Piechaczyk, M. 1990. *Oncogene* **5**, 1585-1588.

Bravo, R., Burckhardt, J., Curran, T., Müller, R. 1985. *EMBO J.* **4**, 1193-97

Brawerman, G. 1989. *Cell* **57**, 9-12.

Brewer, G., Ross, J. 1988. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1697-1708.

Brock, M. L., Shapiro, D. J. 1983 *J. Biol. Chem.* **258**, 5449-5455.

Burns, K. D., Inagami, T., Harris, R. C., 1993. *Am. J. Physiol.* **264**, F645-654

- Carsia, R. V., McIlroy, P. J., Kowalsky, K. Y., Tilly, J. L. 1993. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 1073-1080
- Carter, B. Z., Malter, J. S. 1991. *Laboratory Invest.* **65**, 610-621.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y., 1982. *J. Biol. Chem.* **257**, 7847-51
- Changelian, P. S., Feng, P., King, T. C., Milbrandt, J. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 377-81
- Chen, R. H., Samecki, C., Blenis, J. 1992. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 915-917.
- Christ, B., Nath, A. 1993. *Eur. J. Biochem.* **215**, 541-547.
- Cicirelli, M. F. 1992. *FOCUS* **14**, 16-20.
- Cleveland, D. W., Havercroft, J. C. 1983. *J. Cell. Biol.* **97**, 919-923.
- Cochrane, A. W., Delly, R. G. 1984. *J. Biol. Chem.* **259**, 15408-15412.
- Cochrane, A. W., Delly, R. G. 1988. *J. Mol. Biol.* **203**, 555-560.
- Cohen, P. 1989. *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 453-508.
- Cohen, D. R., Curran, T. 1989. *Crit. Rev. Oncogen.* **1**, 65-88
- Collett, M. S., Erickson, R. C. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 2021-24
- Comb, M. C., Birnberg, N. C., Seascholtz, A., Herbert, E., Goodman, H. M. 1986. *Nature* **323**, 353-56
- Corcos, D., Defer, N., Raymodjean, M., Paris, B., Corral, M., Tichonicky, L., Kruh, J., Glaise, D., Saunier, A., Guguen-Guillouzo, C., 1984. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **122**, 259-264
- Curran, T., Teich, N. M. 1982. *J. Virology* **42**, 114-122
- Curran, T., MacConell, W.P., van Straaten, F., Verma, Y. M. 1983. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 914-921
- Curran, T., Franza, B. R., Jr. 1988. *Cell*, **55**, 395-397
- Dani, C., Blanchard, J.M. Piechaczyck, M., El Sabouty, S., Marty, L., Jeantour, P. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 7046-7050.

- De, S. K., Enders, G. C., Andrews, G. K. 1991. *Biochim. Biophys. Acta.* **1090**, 223-229.
- Dohlman, H. G., Thorner, J., Caron, M. G., Lefkowitz R. J., 1991. *Ann. Rev. Biochem.* **60**, 653-688
- Douglas, J. G., Romero, M., Hopfer, U., 1990. *Kidney Int. Suppl.*, **30**, s43-s47.
- Duff, J. L., Berk, B. C., Corson, M. A., 1992. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 257-264.
- Egan, S. E., Weinberg, R. A. 1993. *Nature* **365**, 781-783
- Elton, T. s., Stephan, C. c., Taylor, g. R., 1992. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 1067-1073
- Fausto, N., Shank, P. R., 1983. *Hepatology* **3**,1016-1023
- Fort, P., Rech, J., Piechaczyk, M., Bonnieu, A., Jeanteur, P., Blanchard, J. M. 1987. *Nucleic Acid Res.* **15**, 5657-67
- Fossom, L. H., Sterling, C. R., Tank, A. W. 1992. *Mol. Pharmacol.* **42**, 898-908.
- Franza, B. R. Jr., Smbucetti, L. C., Cohen, D. R., Curran, T. 1987. *Oncogene* **1**, 213-21
- Fu, X. Y., Zhang, J. J. 1993. *Cell* **74**, 1135-1145.
- García-Sáinz, J. A., Macías-Silva, M., 1990. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 780-785
- Gilman, M. Z., Wilson, R. N., Weinberg, R. A. 1986. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 4305-16
- Gilman, M. J. 1988. *Genes Dev.* **2**, 394-402
- Gillis, P., Malter, J. S. 1991. *J. Biol. Chem.* **266**, 3172-3177.
- Glenney, J. R., Jr. 1992. *Biochim. Biophys. Acta.* **1134**, 113-127.
- González -Espinosa, C. 1992. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UNAM.
- González -Espinosa, C., García-Sáinz, J. A. 1992. *Biochim. Biophys. Acta.* **1136**, 309-314
- Greenberg, M. E., Ziff, E. B. 1984. *Nature*, **311**, 433-38
- Greenberg, M. E., Hermanowski, A. L., Ziff, E. B. 1986. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1050-57
- Greenber, M. E., Greene, L. A., Ziff, E. B., 1985. *J. Biol. Chem.* **260**, 14101-10

Guiguen-Guillouzo, C., Baffet, G., Etienne, P. L., Glaise, D., 1988. Experimental hepatocarcinogenesis. Roberfroid M. De. (New York, Plenum Press) pp.245-253

Gutman, A., Wasylyk, B. 1991. *Trends Genet.* 7, 49-54

Haliday, E. M., Ramesha, Ch. S., Ringold, G. 1991. *EMBO J.* 10, 109-115

Hamilton, J. W., Bement, J. W., Sinclair, P.R., Sinclair, J. F., Alcedo, J. A., Wetterhahn, K. E. 1991. *Arch. Biochem. Biophys.* 289, 387-392.

Hanks, S. K., Quinn, A. M., Hunter, T. 1985 *Science* 241,42-52.

Hershman, H. R., 1989. *Trends Biochem. Sci.* 14, 455-58

Hershman, H. R., 1991. *Ann. Rev. Biochem.* 60, 281-319

Hill, C. S. 1993. *Cell* 73,395-406.

Huckle, W. R., Dy, R. C., Earp, H. S., 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 89, 8837-8841

Hunter, T., Karin, K. 1992 *Cell* 70, 375-387

Hunter, T. 1993. *Nature* 366, 114-116

Ishihara, H., Martin, B. L., Brautigan, D.L. 1989. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 871-877

Iwaki, K., Sukhatme, V.P., Shubeita, H. E., Chien, K. *Eur. J. Pharmacol.* 245, 147-156.

Itazaki, K., Shigeri, Y., Fujimoto, M., 1993. R., 1990. *J. Biol. Chem.* 265, 13809-13817

Janknecht, R., Ernst, W. H., Pingoud, V., Nordheim, A., 1993. *EMBO J.* 12, 5097-5104

Ji, H., Sandberg, K., Zhang, Y., Catt, K. J., 1993. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 194, 756-762

Josephs, L. J., Le Beau, M. M., Jamieson, G. A., Acharya, S., Showa, T. B. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 85, 7164-68

Jungerman, K., Katz, N., 1989. *Physiological Reviews* 69, 708-764

Kageyama, M., Mori, T., Yanagisawa, T., Taira, N. 1991. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259, 1019-26.

King, W.G., Rittenhouse, S. E., 1989. *J. Biol. Chem.* 264, 6070-74.

- Kobayashi, E., Nakano, H., Morimoto, M., Tmaoki, T. 1989. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 548-553.
- Koeller, D. M., Horowitz, J. A., Casey, J. L., Klausner, R. D. Hardford, J. B. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 7778-7782.
- Konig, H., Ponta, H., Rahmsdorf, U., Buscher, M., Schöntal, A. 1989. *EMBO J.* **8**, 2559-66
- Konno, S., Boreli, T.J., Wu, J. M. 1986. *J. Biol. Chem.* **261**, 5010-5017.
- Kovary, K., y Bravo, R. 1992. *Mol. Cell Biol.* **12**, 5015-5023
- Kruijer, W., Schubert, D., Verma, I. M. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7330-34
- Kruijer, W., Skelly, H., Botteri, F., van der Putten, H., Barber, J. R., Verma, Y. M., Leffert, H. L., 1986. *J. Biol. Chem.* **261**, 7929-7933
- Kunjian, D. A., Bernstein, A., Rhee, S. G. and Daniel, T. O. 1991. *J. Biol. Chem.* **266**, 3973-3980.
- Lassègue, B., Alexander, R. W., Clark, M., 1991. *Biochem. J.* **267**, 19-25
- Lau, L. F., Nathans, D., 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1182-86
- Lee, N. H., Earle-Hughes, J., Fraser, C. 1994. *J. Biol. Chem.* **269**, 4291-4298.
- Lee, W. M. F., Lin, C., Curran, T., 1988. *Mol. Cell Biol.* **8**, 5521-27
- Lenormand, P. 1993. *J. Cell Biol.* **122**, 1079-1088.
- Lindsten, T., June, C. H., Ledbetter, J. A., Stella, G., Thompson, C. B. 1989. *Science* **244**, 339-343.
- Marais, R., Wynne, J., Treisman, R. 1993. *Cell* **73**, 381-393.
- Margolis, B., Rhee, S. G., Felder, S., Mervic, M., Lyall, R., Levitzki., Ulrich, A. 1989. *Cell* **57**, 1101-1107.
- Marrero, M. B., Paxton, W. G., Duff, J. L., Berk, B. C., Bernstein, K. E. 1994. *J. Biol. Chem.* **269**, 10935-39.
- Milbrandt, J. 1987. *Science* **238**, 797-99
- Milbrandt, J. 1988. *Neuron* **1**, 183-88

- Miller, A. D., Curran, T., Verma, Y. M. 1984. *Cell* **36**, 259-268
- Molloy, C. J., Taylor, D. S., Weber, H. 1993. *J. Biol. Chem.* **268**, 7338-45
- Montminy, M. 1993. *Science* **261**, 1694-1695
- Morgan, J. Y., Curran, T., 1986. *Nature* **322**, 552-55
- Morgan, J. Y., Curran, T. 1991. *Ann. Rev. Neurosci.* **14**, 421-451
- Muller, M., 1993. *Nature* **366**, 129-135.
- Müller, R., Bravo, R., Burkhardt, J., Curran, T. 1984. *Nature* **312**, 716-720
- Munroe, D., Jacobson, A. 1990. *Gene (Amst.)* **91**, 151-158
- Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S., Bernstein, K. E., 1991. *Nature* **351**, 233-236
- Murphy, T. J., Nakamura, Y., Takeuchi, K., Alexander, R. W., 1993. *Mol. Pharmacol.* **44**, 1-7
- Mushel, R., Khoury, G., Reid, L. M. 1986. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 337-342.
- Nakano, H., Kobayashi, E., Takahashi, Y., Tamaoki, Y., Kuzuu, Y., Iba, H., 1987. *J. Antibiot.* **40**, 706-708
- Nielsen, D. A., Shapiro, D. J. 1990. *Mol. Endocrinol.* **4**, 953-956.
- Nigg, E. A. 1990. *Adv. Cancer Res.* **55**, 271-310.
- Ohnishi, J., Ishido, M., Shibata, T. 1992. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1094-1101
- Okubo, M., Villar-Palasi, C., Nagasaka, Y., Lerner, J., Lerner, A. C., Bai, G., Lee, E. Y. C. 1991. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 126-130
- Ohmura, T., Onoue, K. 1990. *Int. Immunol.* **2**, 1073-1079.
- Paek, Y., Axel, R. 1987. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1496-1502
- Prywes, R., Roeder, R. G. 1987. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3482-89
- Ptashne, M. 1986. Gene control in phage λ . In *Genetic Switch*, p 119-124. Palo Alto, Cal., y Cambridge, M.A. Blackwell Scientific Publication and Cell press.

- Quinn, S. J., Cornwall, M.C., Williams, G. H., 1987. *Endocrinology*, **120** 1581-1589
- Raghow, R. 1987. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 358-362.
- Raghow, R., Postlethwaite, A. e., Keski-oja, Moses, H., Kang, A. H. 1987. *J. Clin. Invest.* **79**, 1285-1293.
- Rahmsdorf, H. J., Schontal, A., Angel, P., Litfin, M., Ruther, U., Herrlich, P. 1987. *Genes Dev.* **3**, 60-72.
- Rajendrakumar, G. V., Radha, V., Swuarup, G. 1993. *Biochim. Biophys. Acta.* **1216**, 205-212.
- Rauscher, F. J. III, Cohen. D. R., Curran. T., Bos, T. J., Vogt, P. K. 1988. *Science* **240**, 1010-1016
- Rivera, V. M., 1993. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6260-6273.
- Rosen, J. M., O'Neal, D. L., Mc. Hugh, J. E., Comstoch, J. P. 1978. *Biochemistry* **17**, 290-294.
- Ruff-Jamison, S., Chen, K., Cohen, S. 1993. *Science* **261**, 1733-1736
- Ryder, D., Lau, L. F., Nathans, D. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1487-91
- Ryder, D., Lanahan, A., Perez-Albuerne, E., Nathans, D. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1500-1503
- Sachs, A. B., Davis, R. W. 1989. *Cell* **58**, 857-867.
- Sadowsky, H. B., Shuai, D., Darnell, J. E., Jr., Gilman, M. Z. 1993. *Science* **261**, 1739-1744
- Sambucetti, L. C., Curran, T. 1986. *Science* **234**, 1417-1419
- Sandberg, K., Ji, H., Clark, A. J. L., Shapira, H., Catt, K. J. 1992. *J. Biol. Chem.* **267**, 9455-9458
- Sandberg, K., 1994. *Trends Endocrinol. and Metab.* **5**, 28-35
- Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., 1991. *Nature* **351**, 230-232
- Sasamura, H., Hein, L., Kreger, J. E., 1992. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **185**, 253-259
- Satoh, T., Nakamura, S., Taga, T., Matsuda, T., Hirano, T., 1988. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3546-3549

- Schek, N., Bachenheimer, S. L. 1985. *J. Virol.* **2**, 889-893.
- Schorb, W., Peeler, T. C., Madigan, N.N., Conrad, K. M., Baker, K. M. 1994. *J. Biol. Chem.* **269**, 19626-32.
- Schroter, H., Shaw, P., Nordheim, A. 1987. *Nucl. Acid. Res.* **15**, 10145-58
- Semenkovich, C. F., Coleman, T., Goroff, R. 1993. *J. Biol. Chem.* **268**, 6961-6970.
- Shapiro, D. J., Blume, J. E., Nielsen, D. A. 1987. *BioEssays* **6**, 221-226.
- Schiavi, S. C., Belasco, J. G., Greenberg, M. E. 1992. *Biochim. Biophys. Acta.* **114**, 95-106.
- Sheng, M., McFadden, G., Greenberg, M. E. 1990. *Genes Dev.* **3**, 321-27
- Shenolikar, S. 1988. *FASEB J.* **2**, 2753-2764.
- Shuai, K., Stark, G. R., Kerr, Y. M., Darnell, J. E. Jr. 1993. *Science* **261**, 1744-1746.
- Shuai, K. 1993. *Nature* **366**, 580-583.
- Shyu, A. B., Belasco, J. G., Greenberg, M. E. 1991. *Genes Dev.* **5**, 221-231.
- Silvennoinen, O., Schindler, C., Schlessinger, J., Levy, D. E., 1993. *Nature* **366**, 583-585.
- Silvennoinen, O., Schindler, C., Schlessinger, J., Levy, D. E., 1993. *Science* **261**, 1736-1739
- Stahl, N. 1994. *Science*, **263**, 92-95.
- Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J.M., Vogt, P. K. 1976. *Nature* **260**, 170-173.
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, Y., Kato, Y., Morimoto, M., Tomita, F. 1986. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**, 397-402
- Taubman, M. B., Berk, B. C., Izumo, S., Tsuda, T., Alexander, R. W., Nadal-Ginard, B. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**, 526-530
- Taubman, M. B., Barret, J. R., Poon, M., Marmur, J., Green, R. S., Berk, B.C., Nadal-Ginard, B. 1992. *Circ. Research.* **70**, 314-325.
- Teutsch, B., Bihoreau, C., Monnot, C., 1992. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1381-1388
- Thomas, G. 1992. *Cell* **68**, 3-6.

- Treisman, R. 1985. *Cell*, **42**, 889-902
- Trejo, J. A., Brown, J. H. 1991. *J. Biol. Chem.* **266**, 7876-82
- Van Beveren, C., van Straaten, F., Curran, T., Müller, R., Verma, Y. M. 1983. *Cell*, **32**, 1241-55
- Vegesna, R. K. V., Wu, H. L., Mong, S., Crooke, S. T., 1988. *Mol. Pharmacol.* **33**, 537-42.
- Vyas, S., Faucon, N., Mallet, J. 1990. *EMBO J.* **9**, 3707-3712
- Wagner, B. J., Hayes, T. E., Hoban, C. J., Cochran, B. H. 1990. *EMBO J.* **9**, 4477-4484
- Wisdom, R., Lee, W. 1991. *Genes. Dev.* **5**, 232-243.
- Wisdom, R., Verma, I. M. 1993. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7429-7438.
- Wong, P. C., Chiu, A. T., Duncia, J. V., 1992. *Trends Endocrinol. Metab.* **3**, 211-217
- Yanagihara, N., Tachikawa, E., Izumi, F., Yasugawa, S., Yamamoto, H., Miyamoto, E. 1991. *J. Neurochem.* **56**, 294-98.