

005515



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Rej

FACULTAD DE QUIMICA

PAPEL DE LA PROTEINA Gi EN LA PROLIFERACION CELULAR DEL HEPATOMA AS30D

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

P R E S E N T A :
ALIESHA ARACELI GONZALEZ ARENAS

273443



MEXICO, D. F.

2

1999

TESIS CON
ALLA 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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Jurado Asignado

- PRESIDENTE Dr. Jorge Vázquez Ramos
VOCAL Dra. Claudia González Espinosa
SECRETARIO Dr. José Pedraza Chaverri
1er. SUPLENTE Dra. Martha Robles Flores
2o. SUPLENTE Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Esta tesis se realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UNAM, bajo el apoyo del donativo 213596 otorgado por DGAPA.

ASESOR: Dra. Ma. Eugenia Torres Márquez *M. E. T. Márquez*
SUSTENTANTE: Aliesha Araceli González Arenas *Aliesha Araceli González Arenas*

Para mi Mamá (Araceli), mi Papá (Luis) y mi Hermano (Luis A.)

Por todas las experiencias, sus consejos, su paciencia y sobre todo, por que lo bueno que tengo y que he hecho, ha sido gracias a su inagotable cariño.

Agradecimientos

A toda mi familia, especialmente a:

*Mis abuelos: Rome, Moy, Luis y Mago,
por ser la parte más dulce de mi vida.

*Mi tío Oscar, por estar aquí y
por los buenos momentos.

*Mi prima Mariana, por todas
las buenas experiencias.

*Bren, Luli, Samy, Brandon, Tere, Chuy,
Germán, Moisesito y Rome,
por su compañía.

*Mi tía Mago y a Mary, por su fe.

*Gelita, Javier y Tania, por sus cuidados.

A mis amigos:

*Diana, por estar siempre cerca.

*Marco, por que a tu manera siempre te
preocupas y estas ahí.

*Mayra, Gina y Frida, por confiar en mí.

*Dinorah, por tu ayuda y tus consejos.

*Lupita, mi maestra, por tu cariño.

*Sandra e Itzel, por los buenos momentos en
la maestría y con la
esperanza de que la amistad perdure.

*Miguelito, Enrique, Vic, Manuel, Marianita,
Gus, Tania y Ray, por los
buenos momentos.

*Judith y Alejandro, por esa amistad tan
especial.

A alguien muy singular:

*Jasso, por que de cualquier forma,
buena o mala, he aprendido mucho
gracias a ti.

A mi fiel compañía:

*Mirrus y Poncho

Finalmente a toda la gente que colaboró con este trabajo y que involuntariamente pudiera estar omitiendo.

Muchas Gracias.

Quiero agradecer a la Dra. Ma. Eugenia Torres Márquez, por estos dos años de trabajo, por la paciencia, las enseñanzas y los buenos momentos.

Gracias Alice V. por tu valiosa ayuda, pero especialmente gracias a ti y a Gerardo por hacer con su compañía una agradable estancia en el laboratorio.

Gracias a todo mi jurado y al Dr. Alejandro Zentella, por las críticas realizadas a este trabajo.

Gracias a CONACYT por el apoyo económico brindado durante mis estudios y durante la elaboración de esta tesis.

No. de beca: 121714

Toda nuestra ciencia,
comparada con la realidad,
es primitiva e infantil..
y sin embargo es lo máspreciado
que tenemos.

ALBERT EINSTEIN
(1879-1955)

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	III
INTRODUCCIÓN	
GENERALIDADES DE LA PROTEÍNA G	1
DIVERSIDAD DE PROTEÍNAS G	4
RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR	5
ACTIVACIÓN DE MAPK	7
ACTIVACIÓN DE MAPK-p44 y MAPK-p42 POR PROTEÍNAS G	10
EL HEPATOMA AS-30D	12
ANTECEDENTES	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	16
METODOLOGÍA	
-REACTIVOS	17
-PROPAGACIÓN DEL HEPATOMA	17
-CULTIVO DE CÉLULAS DE HEPATOMA	17
-CUANTIFICACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR	18
-TRATAMIENTO DE CÉLULAS DE HEPATOMA CON Ptx	19
-LAVADO DE CÉLULAS DE HEPATOMA	19
-OBTENCIÓN DE MEMBRANAS DE HEPATOMA	19
-ADP RIBOSILACIÓN	19
-SÍNTESIS DE DNA (INCORPORACIÓN DE BrdU)	20
-WESTERN BLOTT PARA DETECCIÓN DE MAPK-p44 y MAPK-p42 EN HEPATOCITOS Y HEPATOMA Y DE G _{β1} y G _{αi} EN HEPATOMA	22
-AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS	23
-DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MAPK-P44 Y MAPK-P42 EN HEPATOCITOS Y HEPATOMA	24
-ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	
-CUANTIFICACIÓN DE LAS BANDAS DEL INMUNOBLOT DE MAPK-p44 y MAPK-p42 Y DE LA FOSFORILACIÓN DE MBP	26
RESULTADOS	
Efecto de la toxina pertussis sobre la proliferación celular <i>in vivo</i> del hepatoma AS-30D	27
Efecto de Ptx sobre la síntesis de DNA <i>in vivo</i> del hepatoma AS-30D	27
ADP Ribosilación <i>in vivo</i> del hepatoma AS-30D	27
Fig. 1. Efecto de Ptx sobre el desarrollo del hepatoma AS30D <i>in vivo</i>	28
Fig. 2. Efecto de Ptx sobre la síntesis de DNA del hepatoma <i>in vivo</i>	29
Fig. 3. ADP ribosilación de Gi en hepatoma AS-30D <i>in vivo</i>	30

Efecto de toxina pertussis sobre la proliferación celular <i>in vitro</i> de hepatoma AS-30D	31
Efecto de toxina pertussis sobre la síntesis de DNA <i>in vitro</i> de hepatoma AS-30D	31
ADP ribosilación <i>in vitro</i> en el hepatoma AS-30D	31
Fig.4. Efecto de Ptx sobre la viabilidad del hepatoma <i>in vitro</i>	32
Fig. 5. Efecto de Ptx sobre la proliferación celular del hepatoma <i>in vitro</i>	33
Fig. 6. Efecto de Ptx sobre la síntesis de DNA del hepatoma <i>in vivo</i>	34
Fig. 7. ADP ribosilación de Gi en hepatoma <i>in vitro</i>	35
Existencia y actividad basal de MAPK-p44 MAPK-p42	36
Efecto de Ptx sobre MAPK-p44 y MAPK-p42 en el hepatoma AS-30D	36
Fig. 8. MAPK-p44 y MAPK-p42 en hepatoma	37
Fig. 9. Actividad basal de MAPK-p44 y MAPK-p42	38
Fig. 10. Efecto de Ptx sobre la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 en el hepatoma AS-30D	39
Actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 y disociación de Gi por GTPγS en el hepatoma AS-30D	40
Actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 por estimulación de receptores α-2 adrenérgicos	40
Fig. 11. Activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 por GTPγS	41
Fig. 12. G _β y G _α en ausencia y presencia de GTPγS	42
Fig. 13. Actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 tras la estimulación α-2 adrenérgica en hepatoma y hepatocitos	42
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	48
REFERENCIAS	49
APÉNDICES	i

ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
ADP	Adenosín 5'-difosfato
AMPc	Adenosín 5'-monofosfato cíclico
AS-30D	Hepatoma ascítico derivado de hepatoma AS30D
ATP	Adenosín 5'-trifosfato
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	Albúmina sérica de bovino
Ctx	Toxina del cólera
CHO	Células de ovario de hamster chino
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Medio Dulbecco esencial modificado
EGF	Factor epidérmico de crecimiento
G _{βγ}	Dímero βγ proveniente de proteínas G
G _{αi}	Subunidad α proveniente de proteína Gi
GDP	Guanosín 5'-difosfato
Gi	Proteína perteneciente a la familia de proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina que inhibe a la AC
GiPCRs	Receptores acoplados a proteínas Gi
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
Gq	Proteína perteneciente a la familia de proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina que activa a PLC
Grb2	Proteína adaptadora conformada por un dominio SH2 flanqueado por dos SH3, que unen a SOS.
Gs	Proteína perteneciente a la familia de proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina que activa a la AC
GTP	Guanosín 5'-trifosfato
GTPγS	Guanosín 5'-O-(3 -tiotriofosfato)
HGF	Factor hepático de crecimiento
JNK	Cinasa de la familia de MAPK, que se activa por factores de estrés.
MAPK	Proteína activada por mitógenos
MBP	Proteína mielínica básica
MEK	Cinasa de MAPK
MEKK	Proteína cinasa que activa a otra proteína con funciones similares a las de MEK
NGF	Factor neurológico de crecimiento
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con lauril sulfato de sodio

PBS	Buffer salino de fosfatos
PDGF	Factor plaquetario de crecimiento
PH	Dominios homólogos a la plekstrina
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNP	Paranitrofenol
PNPP	Paranitrofenolfosfato
POD	Peroxidasa
Ptx	Toxina pertussis
R α 2	Receptor alfa 2 adrenérgico
Raf	Cinasa de la cinasa de MAPK (MEK)
Ras	Proteína perteneciente a la familia de proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina que activa a Raf
SOS	Proteína intercambiadora de nucleótidos para Ras
SSI	Solución salina isotónica
TBS	Buffer salino de TRIS (Tris[hidroximetil]amino metano)
TCA	Ácido tricloroacético

RESUMEN

La proteína Gi participa en procesos relacionados con la proliferación celular, como la síntesis de DNA y la activación de la cascada de cinasas activadas por mitógenos (MAPK) a través de las subunidades $\beta\gamma$. Estos efectos se han visto en células transfectadas con alguno de los componentes involucrados en la vía de señalización, como receptores acoplados a proteínas G (GPCR) o proteínas Gi.

El hepatoma AS-30D, una línea tumoral de fácil mantenimiento, sobreexpresa a la proteína Gi y expresa receptores α -2 adrenérgicos (los cuales son GiPCR) de manera natural. Al contar con estos dos elementos, resulta de gran interés investigar si la proteína Gi está involucrada en la proliferación celular del hepatoma AS-30D y en eventos relacionados con ésta por acción del complejo $\beta\gamma$. Y de ser así, si la activación de los receptores α -2 adrenérgicos es uno de los mecanismos mediante el cual Gi participa en este proceso.

Para lo anterior se utilizó toxina pertussis (Ptx) que es capaz de ADP-ribosilar a G_{α_i} modificándola funcional y estructuralmente, con el fin de averiguar si en estas células, Gi estaba involucrada en la proliferación, síntesis de DNA y actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42. Para saber si la activación de Gi era capaz de producir un aumento en la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42, y si este incremento se debía a la acción del complejo $\beta\gamma$ se utilizó un análogo no hidrolizable de GTP, GTP γ S, que provoca la disociación de proteínas G. Por último se activaron los receptores α -2 adrenérgicos utilizando un agonista específico para estos, el UK14304, con la finalidad de saber si la respuesta α -2 adrenérgica era uno de los mecanismos mediante el cual Gi aumentara la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42.

La proliferación se determinó por cuantificación del número celular, la síntesis de DNA por incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU, análogo de timina), la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 por incorporación de fósforo radiactivo a la proteína mielínica básica y la disociación de la proteína Gi se detectó por western blot.

Se encontró que Ptx disminuyó la proliferación celular *in vivo*, así como la síntesis de DNA *in vitro* y la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42. El GTP γ S indujo un incremento en la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42, lo cual correlacionó con un aumento en la disociación de G β con G α_i . La respuesta α -2 adrenérgica estimulada con UK14304, no tuvo efecto sobre la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42.

Con lo anterior pudimos concluir que Gi está involucrada en las vías que llevan a la proliferación del hepatoma AS-30D ya que la ADP-ribosilación e inactivación de la subunidad α de Gi por Ptx, afectó el número celular, la síntesis de DNA y la actividad de MAPK. Al activarse Gi se produjo un aumento en la activación de MAPK-p44 y MAPK-p42, que se dio probablemente por acción del complejo $\beta\gamma$. La respuesta α -2 adrenérgica acoplada a Gi no fue capaz de aumentar la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42, por lo que probablemente este mecanismo de activación de Gi no sea el que participa en la proliferación celular del hepatoma AS-30D.

INTRODUCCIÓN

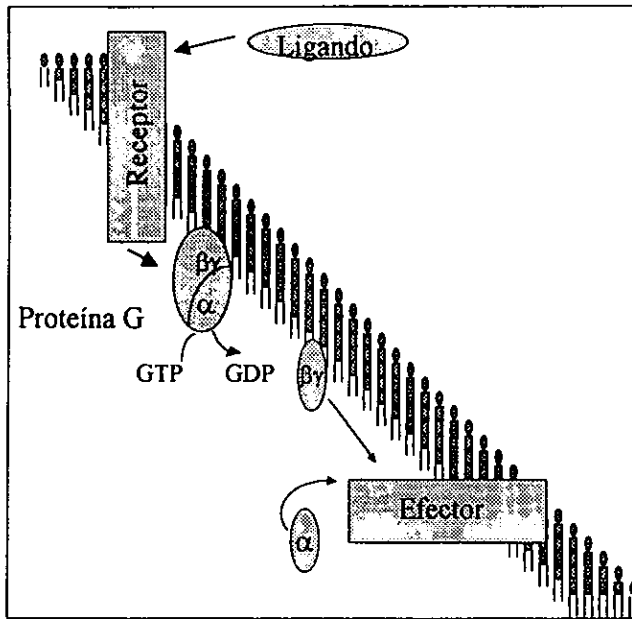
GENERALIDADES DE LAS PROTEÍNAS G

Las proteínas G constituyen un grupo de la familia de proteínas que unen GTP. Por definición, todas son heterotrímeros constituidos de subunidades α , β y γ , cada una codificada por distintos genes. La subunidad α es la que presenta similitud estructural y funcional con otros miembros de la superfamilia de proteínas que unen GTP. Estas enlazan nucleótidos de guanina con una alta afinidad y especificidad además de poseer actividad intrínseca de GTPasa. Las subunidades β y γ están asociadas estrechamente, de forma no covalente, para formar el complejo funcional $\beta\gamma$ (revisado por Neer, 1995).

La función de las proteínas G como transductores de información a través de la membrana celular es acoplar diversos receptores a efectores, los cuales interaccionan con G_{α} - GTP y con $G_{\beta\gamma}$ para mediar el efecto intracelular del ligando unido al receptor (revisado por van Biesen, 1996). Las proteínas G actúan como interruptores con un estado de "apagado y encendido" gobernado por el ciclo de la GTPasa (revisado por Spiegel et al., 1992).

Los receptores activados por una señal extracelular apropiada (hormonas, neurotransmisores, olores y fotones de luz), actúan sobre la proteína G permitiendo que el fuerte y estrecho enlace con GDP de la subunidad α sea reemplazado por el enlace con GTP (Linder et al., 1990; Casey et al., 1990; Carty et al., 1990).

El enlace con GTP conduce a un cambio en la conformación de la subunidad α (Bourne et al., 1991) que provoca la activación de las proteínas G y la disociación de la subunidad α enlazada al GTP del complejo $\beta\gamma$. Esta disociación resulta esencial para la regulación del efector, ya sea por la subunidad α , por el complejo $\beta\gamma$ o por ambos (Clapham y Neer, 1993), ver esquema I.1.



Esquema I.1 Proteínas G como transductores de señales hormonales.

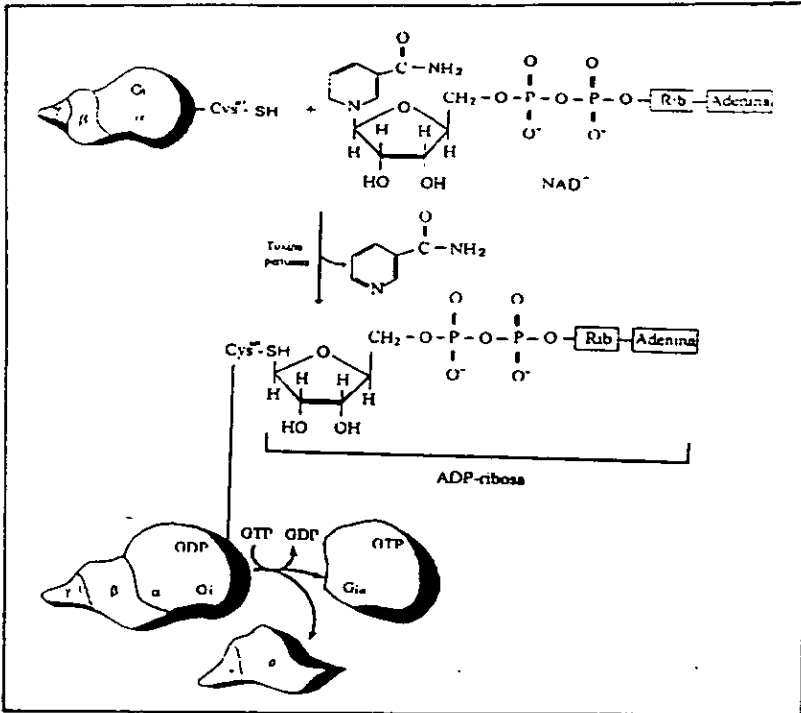
La transducción de señales hormonales por proteínas G consta de tres elementos principalmente: 1) el receptor que une al ligando en la parte extracelular, 2) la proteína G heterotrimérica que tras la unión ligando-receptor se disocia en subunidad α -GTP y complejo $\beta\gamma$, y 3) el efector que interactúa con G_{α} -GTP o $G_{\beta\gamma}$ para mediar el efecto intracelular del ligando unido al receptor.

GTP-guanosín trifosfato, GDP-guanosín difosfato, $\beta\gamma$ -dímero proveniente de proteína G, α -subunidad proveniente de proteína G.

El recambio de GTP por GDP está dado por la actividad de GTPasa intrínseca de la subunidad α . El enlace de análogos no hidrolizables de GTP ó los iones fluoruro en forma de complejos de aluminio (que se enlazan de forma adyacente a GDP aparentando ser el grupo γ -fosfato del GTP), conducen a la activación persistente de la proteína G (Higashiyama et al., 1991).

Al hidrolizarse el GTP a GDP, la subunidad α regresa a su conformación original, teniendo otra vez una alta afinidad por el complejo $\beta\gamma$. La formación del heterotrímero se requiere para el acoplamiento de la proteína G con el receptor.

Las toxinas bacterianas como la toxina pertussis (Ptx) y la toxina del cólera (Ctx), son capaces de modificar la función de la proteína G. Estas toxinas están compuestas por dos dominios, unidos por un puente disulfuro. Uno de los dominios, conocido como A, es el que contiene la actividad enzimática mientras que el otro, denominado B, es el que media la unión y la penetración de la toxina a la célula. El dominio B es un oligómero que se une a azúcares ligados a lípidos o proteínas que se encuentran en la superficie celular. Después que las toxinas se unen a la superficie celular, son internalizadas en vesículas y de acuerdo con su especificidad toman diferentes vías en la región intracelular para llegar hasta el blanco al que van a modificar (Montecucco y Papini, 1995). La Ctx cataliza la ADP ribosilación de G_{α_s} en la arginina 201, inhibiendo la actividad de GTPasa, lo que activa constitutivamente a α_s , manteniéndola permanentemente unida a GTP, provocando el aumento en la actividad de la adenilato ciclasa y por ende la acumulación de AMPc (revisado por Spiegel et al., 1992). La Ptx ADP-ribosila a G_{α_i} en la cisteína 347, que es la cuarta antes del carboxilo terminal (West et al., 1985), esta modificación covalente no previene la disociación del trímero, es decir que no afecta la actividad de GTPasa (Huff y Neer, 1986), sin embargo bloquea a G_{α_i} en la forma GDP, evitando que la proteína pueda interactuar con el receptor. Lo anterior impide la acción inhibitoria de G_{α_i} sobre la AC, lo cual provoca un aumento en la acumulación de AMPc, efecto contrario al que se observa cuando α_i no está modificada (Katada y Ui, 1982, ver esquema I.2.) Actualmente se desconoce cual es el sitio de unión de esta subunidad G_{α_i} a la adenilato ciclasa.



Tomada de Lehninger, 1993 con modificaciones

Esquema 1.2 ADP ribosilación de G_i por la toxina pertussis (Ptx).

La Ptx, ADP-ribosila a $G_{i\alpha}$ en la cisteína 347 del carboxilo terminal (West et al., 1985). La ADP ribosa proviene de una molécula de NAD. Esta modificación covalente no previene la disociación del trímero (Huff y Neer, 1986), sin embargo bloquea a $G_{i\alpha}$ en la forma GDP evitando que la proteína pueda interactuar con el receptor, impidiendo así la acción inhibitoria de $G_{i\alpha}$ sobre la A.C., lo que provoca un aumento en la acumulación de AMPc (Katada y Ui, 1982). G_i -proteína G inhibitoria, Cys-cisteína, Rib-ribosa, ADP-adenosin difosfato, GTP-guanosín trifosfato, GDP-guanosín difosfato, $\beta\gamma$ -dímero proveniente de proteína G, α -subunidad proveniente de proteína G, A.C.-adenilato ciclasa, AMPc-adenosin monofosfato cíclico.

DIVERSIDAD DE PROTEÍNAS G

Las proteínas G se han identificado y caracterizado por su función, por ejemplo las proteínas G_s y G_i se denominaron así porque éstas estimulan e inhiben a la adenilato ciclasa respectivamente; la G_t (transducina) representa la proteína G fotorreceptora involucrada en el acoplamiento de rodopsina activada por luz a la fosfodiesterasa de GMPc (revisado por Spiegel et al., 1992).

La susceptibilidad a modificaciones covalentes y funcionales por toxinas bacterianas también resultó de utilidad en la identificación de las proteínas G.

Las distintas subunidades e isoformas de α tienen una masa molecular de 39 a 52 kDa, cuentan con cinco regiones altamente conservadas entre la superfamilia de proteínas que ligan GTP (Bourne et al., 1991; Johnson et al., 1991); una de las regiones participa en la unión de fosfatos β y γ del nucleótido y otra porción de esta región participa en la unión al ion magnesio. Otra de estas regiones participa en forma importante en el cambio conformacional que resulta del recambio de GDP por GTP, así como en la hidrólisis de GTP unido a la subunidad α . Las otras dos regiones participan en la unión del anillo de guanina del nucleótido (revisado por Spiegel et al., 1992).

El complejo $\beta\gamma$ presenta las siguientes funciones: 1) suprime la disociación de GDP y por tanto mantiene a la subunidad α en su estado inactivo, 2) es necesario para que la proteína G se acople con alta afinidad a su receptor, 3) está involucrado en la regulación directa de ciertos efectores, como la adenilato ciclasa tipos I, II y IV, el canal de potasio sensible a acetilcolina, la cinasa del receptor β adrenérgico y la fosfolipasa C β entre otros, y 4) colabora en la unión a la membrana celular (revisado por Spiegel et al., 1992).

La subunidad β está compuesta por una secuencia de alrededor de 340 a.a. dependiendo de la isoforma, tiene una masa molecular de 35-36 kDa; pertenece a la superfamilia de proteínas constituidas por motivos repetidos WD-40 con ocho de estos segmentos (Simon et al., 1991). La subunidad γ está compuesta por aproximadamente 70 aa y tiene un tamaño aparente de 5-10 kDa dependiendo de la isoforma (revisado por Spiegel et al., 1992).

RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Con el uso de toxina pertussis (Ptx) se tuvieron las primeras evidencias acerca de un gran número de mitógenos capaces de actuar sobre esta familia de receptores de superficie celular. Por ejemplo, Pouyssegur y colaboradores (1988) observaron que la síntesis de DNA en células CHO en respuesta a trombina se bloquea por tratamiento con

Ptx, mientras que la respuesta proliferativa a PDGF era insensible a esta toxina (Chambard et al., 1987; Pouyssegur et al., 1988). Estudios similares a los realizados por Pouyssegur (1988), llevaron al descubrimiento de que uno de los más potentes mitógenos presentes en el suero, el ácido lisofosfatídico (LPA), actuaba sobre receptores acoplados a proteína G (van Corven et al., 1989). Otros mitógenos, cuya acción era sensible a Ptx, fueron subsecuentemente identificados (revisado por van Biesen et al., 1996). Por otro lado investigaciones bioquímicas evidenciaron que diversos mitógenos actuaban sobre receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), aunque sus efectos biológicos eran mediados por proteínas G insensibles a Ptx. Estos mitógenos cuyos efectos biológicos eran sensibles e insensibles a Ptx se incluyen en la tabla I. 1:

Agonista	Sensibilidad del efecto biológico a Ptx
Trombina	(+)/(-)
Adenosina	(+)/(-)
Ácido lisofosfatídico	(+)/(-)
Bombesina	(+)/(-)
Acetilcolina/carbacol (receptores muscarínicos)	(+)/(-)
Serotonina	(+)
Angiotensina II	(+)
Histamina (receptores H1)	(+)
Substancia K	(+)/(-)

Modificada de Moolenaar, 1991 y van Biesen, 1996.

Tabla I.1 Mitógenos que actúan sobre receptores acoplados a proteínas G (GPCR).

En la tabla se muestran diversos mitógenos que actúan sobre GPCR y cuya acción es de tipo sensible o insensible a toxina pertussis (Ptx).

(+) sensible, (-) no sensible, (+)/(-) sus efectos biológicos se han visto mediados por ambos tipos de respuesta.

Así que distintos ligandos que actúan vía GPCRs pueden inducir una respuesta mitogénica en una variedad de tipos celulares, (revisado por Rozengurt, 1986; van Biesen et al., 1996), al mismo tiempo que son capaces de transducir las señales proliferativas actuando sobre proteínas G de manera sensible o insensible a Ptx.

Algunos estudios iniciales donde se involucran GPCRs en vías intracelulares de señalización relacionadas con efectos proliferativos, se enfocaron hacia los efectores, como la adenilato ciclasa y las fosfolipasas, y a la producción de segundos mensajeros como el AMPc y el Ca^{2+} . Otros estudios demostraron que en la mitogénesis, la fosfolipasa C- β 1 se activa y la hidrólisis de fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) aumenta (revisado por Rozengurt et al., 1986); no obstante, experimentos posteriores en donde se utilizaron mutantes de receptores de tirosina cinasa, evidenciaron que la hidrólisis de PIP_2 era necesaria más no suficiente para la mitogénesis (Coughlin et al., 1989; Mohammadi et al., 1992). Otros experimentos demostraron que agonistas que actúan vía GPCRs fueron capaces de inducir la hidrólisis de PIP_2 pero no de estimular la proliferación celular en células quiescentes (revisado por Moolenaar, 1991). Por el lado de la adenilato ciclasa se encontró una correlación entre el decremento en la actividad de la enzima, los niveles de AMPc y el aumento en la expresión de G_{α_i} durante la fase prereplicativa de hepatocitos en regeneración (Diehl et al., 1992); en otros estudios realizados en fibroblastos se observó que, al bloquear $G_{\alpha_{12}}$ microinyectando anticuerpos dirigidos contra esta proteína, la síntesis de DNA disminuyó (La Morte, 1992). Sin embargo, no se encontró una correlación directa entre eventos proliferativos y la disminución en la actividad de adenilato ciclasa y la acumulación de AMPc, por activación de receptores α_2 adrenérgicos en el hepatoma AS30D (Torres-Márquez 1997; Torres-Márquez et al., en preparación). La información anterior sugiere fuertemente que debe existir otra vía de señalización que involucre la participación de la proteína G_i y GPCRs con otros efectores. Uno de estos efectores pueden ser las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs).

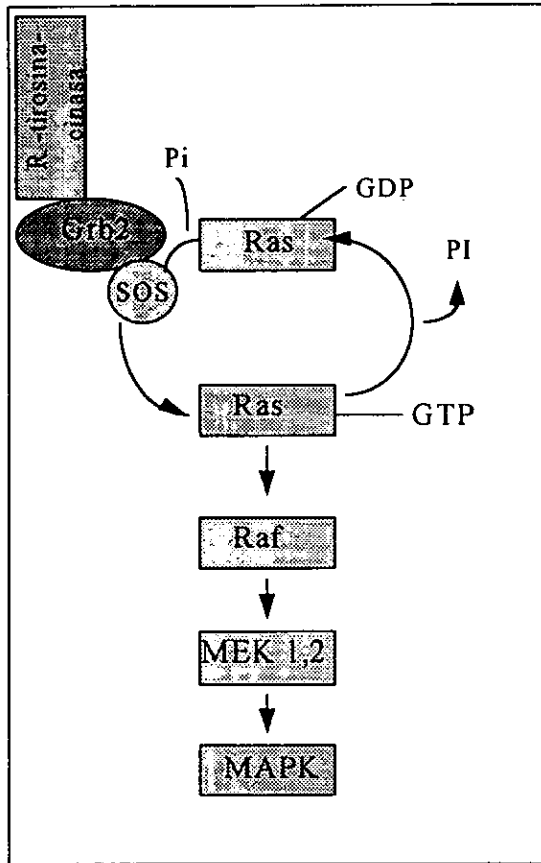
ACTIVACIÓN DE MAPK

Las células de mamífero tienen, por lo menos, tres tipos de proteínas cinasas activadas

por mitógenos (MAPKs) involucradas en la proliferación celular: 1) las MAPKs activadas por factores de estrés (como por ejemplo radiaciones UV), JNK y 2) p38^{MAPK} (Zanke et al., 1996), y finalmente 3) las p44^{MAPK} y p42^{MAPK}, las cuales son las cinasas que no necesitan de factores externos para activarse y por lo cual, son las principales implicadas en la vía de señalización que controla la proliferación celular (revisado por Marshal, 1995). La actividad enzimática de p44^{MAPK} y p42^{MAPK}, incrementa en respuesta a una estimulación mitogénica y al impedir su función se previene la proliferación celular en respuesta a factores de crecimiento (Pages et al., 1993).

El proceso de activación de MAPK por receptores de factores de crecimiento, o del tipo tirosina-cinasa, se da en múltiples pasos. Por ejemplo, la unión del factor epidérmico de crecimiento (EGF) a su receptor conlleva a la activación, por autofosforilación, del receptor en residuos de tirosina, lo que da lugar a la unión de una proteína adaptadora llamada Grb2 compuesta por un dominio SH2 flanqueado por dos dominios SH3 (estos dominios se denominan SH ya que poseen una región homóloga a una familia de proteínas de tipo tirosina cinasas llamadas Src). El dominio SH2 se encarga de la unión al receptor en tirosinas fosforiladas, mientras que los dominios SH3 se unen en residuos de prolina a SOS, que es una proteína intercambiadora de nucleótidos para Ras. Lo anterior provoca el subsecuente intercambio de GDP por GTP en Ras, lo que lleva a la activación por fosforilación de la cascada de proteínas cinasas. Primero se activa la cinasa de las cinasas de MAPK, Raf, en residuos de serina y treonina; de esta proteína se han identificado tres isoformas Raf-1, Raf-A y Raf-B, la primera es ubicua mientras que las otras dos son tejido específicas. Al activarse Raf se activan en residuos de serina las cinasas de MAPK, como MEK1 y MEK2 y finalmente se fosforilan p44^{MAPK} y p42^{MAPK} tanto en residuos de treonina como de tirosina (ver esquema I.3) (revisado por Malarkey et al., 1993; Gutkind 1998).

Las MAPKs ahora fosforiladas regulan la actividad de enzimas y proteínas nucleares, que regulan la expresión de genes esenciales para la proliferación (Davis, 1993). A pesar de lo establecido para los receptores de tipo tirosina-cinasa, poco se conoce sobre el mecanismo por el cual los GPCRs pueden activar a MAPK, pues la activación no siempre es dependiente de Ras.



Modificada de Malarkey et al., 1995

Esquema I.3 Activación de MAPK por receptores de tipo tirosina-cinasa.

Un receptor del tipo de tirosina cinasa es capaz de autofosforilarse al unir a su ligando, para así desencadenar la cascada de activación de MAPK, que comienza con el intercambio de GTP por GDP en Ras gracias a SOS la cual es reclutada por Grb2. Ras fosforila a Raf, ésta a MEK y finalmente se activa MAPK .

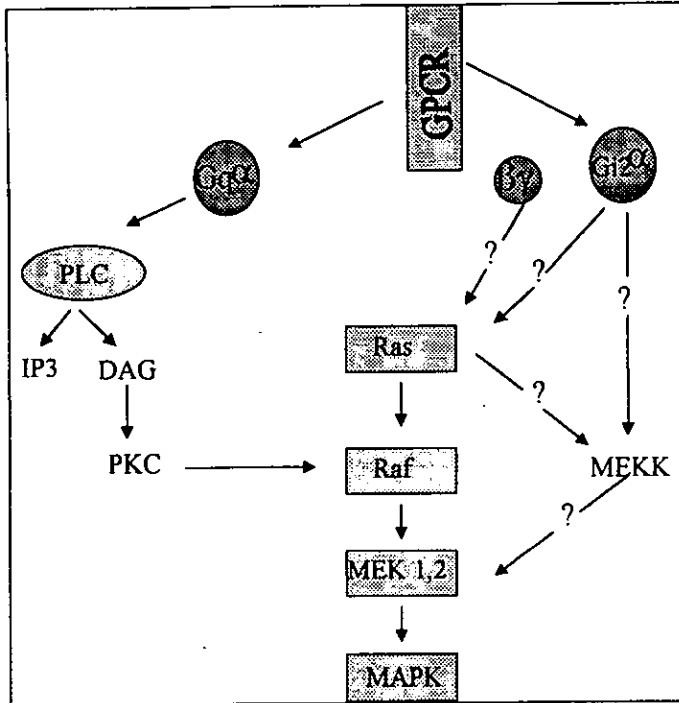
Grb2-proteína adaptadora formada por un dominio SH2 que se une al receptor y dos dominios SH3 que se unen a SOS, SOS-proteína intercambiadora de nucleótidos para Ras, Ras- proteína perteneciente a la familia de proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina que fosforila a Raf, Raf- cinasa de las cinasa de MAPK, MEK- cinasa de MAPK, MAPK- proteína cinasa activada por mitógenos.

ACTIVACIÓN DE MAPK POR RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

Recientemente se ha estudiado la activación de la cascada de MAPK en respuesta a agonistas cuyos receptores están acoplados a proteínas G, con el fin de clarificar su papel como mitógenos. Aunque se habían encontrado algunos agonistas ligados a receptores de proteínas G (GPCRs) capaces de estimular fuertemente la hidrólisis de fosfoinosítidos y la activación de proteína cinasa C (PKC), lo anterior no resultaba suficiente para iniciar la progresión del ciclo celular (McKenzie et al., 1992; Kahan et al., 1992).

Para un gran número de agonistas, se encontró que la activación de PKC esta íntimamente relacionada con la activación de MAPK (Granot et al., 1993). Además, en algunos casos la activación de MAPK mediada por PKC es inhibida por modulación negativa de esta última, mediante pretratamientos por tiempos prolongados con ésteres de forbol o preincubación con inhibidores. También se encontró que la PKC α puede fosforilar a Raf-1 *in vitro* en residuos de serina (Kolch et al., 1993) (ver esquema I.4).

Otros agonistas como la trombina y el LPA, son capaces de activar la vía de MAPK por un mecanismo independiente de los cambios en la activación de PKC (Kahan et al., 1992; Cook et al., 1993; van Corven et al., 1993; Hordijk et al., 1994). Por otro lado, como se mencionó anteriormente la activación de MAPK por estos agonistas es sensible a toxina pertussis, implicando la acción de Gi o G $\beta\gamma$ y que esta sensibilidad puede reflejarse a nivel de división celular. En fibroblastos de rata, la fosforilación de MAPK en residuos de tirosina, estimulada tanto por trombina como por LPA, está asociada con la activación de Ras y es sensible a toxina pertussis (Cook et al., 1993; van Corven et al., 1993; Hordijk et al., 1994). En fibroblastos se demostró que MAPK se mantiene constitutivamente activa cuando las células se transfectan con la oncoproteína G α_i deficiente en la actividad de GTPasa (*gip2*), lo que sugiere que la proteína G involucrada en la activación de RAS es Gi (Gupta, et al., 1992; Gardner et al., 1993). Más adelante se observó en células que se transfectaron con receptores acoplados a Gi2, como los α -2 adrenérgicos o los muscarínicos M2, que había una activación de Ras y MAPK sensible a toxina pertussis (Alblas et al., 1993). Estos experimentos sugieren que Gi participa en la activación de MAPK, pero aún no es claro si esto se realiza por la acción de G α_i o G $\beta\gamma$.



Tomada de Malarkey et al., 1995

Esquema I.4 Vías involucradas en la activación de MAPK por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).

Los GPCRs al unir un ligando son capaces de activar a proteínas G como Gq o Gi2. Estas proteínas al activarse se disocian en subunidad α y complejo $\beta\gamma$. G_{α_q} activa a PLC la cual rompe fosfatidilinositol en IP3 y DAG, este último activa a PKC la cual es capaz de iniciar la cascada de activación de MAPK, fosforilando a Raf. Tanto la subunidad α como el complejo $\beta\gamma$ son capaces de activar a MAPK, sin embargo se desconoce en que nivel de la cascada de activación actúan.

GPCRs- receptores acoplados a proteínas G, $\beta\gamma$ - dímero proveniente de proteína G, G_{α_q} -subunidad α de proteína Gq, PLC- fosfolipasa C, IP3- inositol trifosfato, DAG-diacilglicerol, PKC- proteína cinasa C. G_{α_i} - subunidad α de proteína Gi, Ras- proteína perteneciente a la familia de proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina que fosforila a Raf, Raf- cinasa de las cinasa de MAPK, MEKK- proteína cinasa que activa a otra proteína con funciones similares alas de MEK, MEK- cinasa de MAPK, MAPK- proteína cinasa activada por mitógenos.

En este sentido, existen evidencias que favorecen el papel de $\beta\gamma$ en la activación de Ras por GPCRs. No se observó la activación de MAPK en células Cos-7 transfectadas con una mutante de G_{α_i} constitutivamente activa; sin embargo, se encontró que la

sobreexpresión de subunidades $\beta\gamma$ particularmente $\beta 1\gamma 2$, era capaz de estimular MAPK (Faure et al., 1994; Crespo et al., 1994). En células de mamífero se ha propuesto que el complejo $\beta\gamma$ puede transducir la señal vía un mecanismo similar a la activación de la cinasa del receptor β adrenérgico (β ARK), el cual une heterodímeros $\beta\gamma$ libres a una región que contiene dominios homólogos de pleckstrina (PH) (Touhara et al., 1994). Un número de proteínas que regulan la actividad de Ras también expresan estos dominios de PH (Birney, 1994), estas subunidades $\beta\gamma$ libres pueden afectar la función de Ras enlazando dominios de PH de una o más proteínas reguladoras de Ras.

La sobreexpresión de las subunidades $\beta\gamma$ o de receptores acoplados a proteínas Gi normalmente se requiere para activar a Ras y a MAPK, lo que sugiere el papel de $\beta\gamma$ para aumentar la activación de Ras después de la estimulación de un receptor endógeno. Esto podría ser mediante el reclutamiento hacia la membrana de intermediarios adicionales que serán activados por otros mecanismos. El que la activación de Ras inducida por LPA se bloquee por inhibidores de tirosina cinasas (van Corven et al., 1993; Hordijk, 1994), mas la respuesta a la estimulación del receptor muscarínico M2 (Winitz et al., 1993) no se afecte, sugiere que se pueden requerir intermediarios adicionales a la acción de tirosina cinasa, para la activación de Ras por agonistas de receptores acoplados a proteína G.

EL HEPATOMA AS30D

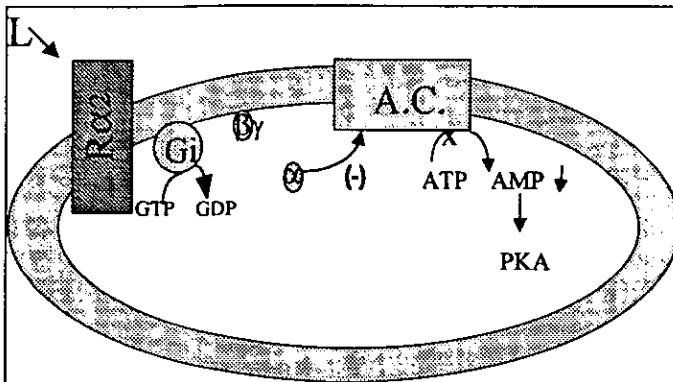
El hepatoma AS30D es un tumor de tipo ascítico obtenido por inducción con un compuesto azo llamado, 3'-metil-4 dimetilaminobenzeno, de un hepatocarcinoma 30D de rata. El hepatoma es una línea celular de fácil mantenimiento ya que se desarrolla en el peritoneo de las ratas y el tiempo de desarrollo óptimo es de 7 días. Estas células miden de 11 a 15 μ de diámetro, son multinucleadas y tienen la apariencia de hepatocitos (Smith et al., 1970).

En el hepatoma se han encontrado tres tipos de receptores acoplados a proteínas G: receptores para ATP (Torres-Márquez et al., 1993), receptores β -1 adrenérgicos (García-Sáinz et al., 1989) y actualmente en el laboratorio se han encontrado receptores α -2 adrenérgicos (Torres-Márquez, 1997). Ya que uno de los objetivos de este trabajo

involucra a estos últimos, a continuación se describe brevemente su función:

Los receptores α -2 adrenérgicos pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembranales que se acoplan a proteínas G. Los receptores α 2 -adrenérgicos al unir su ligando, se acoplan a una proteína G_i , que inhibe la actividad de la enzima adenilato ciclasa, provocando la disminución en la producción de AMPc (Esquema I.5).

El ligando natural para los receptores adrenérgicos es la epinefrina o adrenalina que tiene una $K_d=22.9$ nM (Nasseri y Minneman 1987); además de éste existen agonistas sintéticos para cada tipo de receptor como el UK 14304, el cual es específico para los receptores α -2 adrenérgicos y tiene diferentes valores de K_d para cada uno de los subtipos. Para los α 2A la $K_d=5.3$ nM; para los α 2B $K_d=22$ nM y para los α 2C $K_d=2$ nM (revisado por Bylund et al., 1998). La concentración máxima de UK14304 con la cual se saturan estos receptores es 100 nM.



Esquema I.5 Receptor α -2 adrenérgico acoplado a proteína G_i .

Los receptores α 2 -adrenérgicos al unir su ligando, se acoplan a una proteína G_i , que inhibe la actividad de la enzima adenilato ciclasa, provocando la disminución en la producción de AMPc.

G_i -proteína G inhibitoria, GTP-guanosín trifosfato, GDP-guanosín difosfato, $\beta\gamma$ -dímero proveniente de proteína G, α -subunidad proveniente de proteína G, A.C.-adenilato ciclasa, ATP- adenosín trifosfato, AMPc-adenosín monofosfato cíclico.

En el laboratorio se comparó la respuesta α -2 adrenérgica entre hepatocitos y hepatoma, además de comparar diferentes elementos de la vía de transducción de señales midiendo la cantidad de receptores y proteína G_{α_i} . Se encontró un aumento de G_{α_i} de 9 veces en el hepatoma en comparación con el hígado. La respuesta α -2 adrenérgica determinada por la inhibición en la acumulación de AMPc o en la actividad de la adenilato ciclasa estimulada por forskolina es de la misma magnitud en hepatoma y en hígado (Torres-Márquez, 1997).

Estos datos sugieren que la respuesta α -2 adrenérgica vista de una forma clásica, como la de G_{α_i} capaz de estimular la disminución de AMPc pudiera no estar participando en la regulación de la proliferación. Sin embargo, el incremento de G_{α_i} en hepatoma parece ser capaz de compensar la señal generada por el menor número de receptores α -2 adrenérgicos. Esto sugiere que la respuesta α -2 adrenérgica podría estar generando respuestas adicionales como por ejemplo, la cascada de MAPK a través de $\beta\gamma$.

Por otro lado la sobreexpresión de G_i pudiera de manera natural inducir alguna respuesta en éstas células en ausencia del agonista, como sucede cuando se sobreexpresa el receptor β -2 adrenérgico en ratones transgénicos (Milano et al., 1994).

ANTECEDENTES

Entre las evidencias que soportan la participación de G_i en eventos relacionados con proliferación celular están las siguientes:

- * Los receptores acoplados a proteína G_i promueven el ciclo celular en células transfectadas con estos receptores (Kumagai et al., 1993, Hordijk et al., 1994) incluyendo los α -2 adrenérgicos, (Alblas et al., 1993, Gupta et al., 1998).
- * El complejo $\beta\gamma$ de G_i activan la vía de activación de MAPK-p44 en fibroblastos transfectados con receptores acoplados a G_i (Crespo et al., 1994, Faure et al., 1994, van Biesen et al., 1995).
- * El oncogen de G_{α_i} *gip2* activa a MAPK-p44 en fibroblastos transfectados con este oncogen (Gardner et al., 1993, Gupta et al., 1992).
- * El bloqueo de G_{α_i} provoca disminución en la síntesis de DNA de fibroblastos

(La Morte et al., 1992).

* Durante la síntesis de DNA, en el hígado en regeneración, las concentraciones de AMPc están disminuidas al igual que la actividad de la adenilato ciclasa, proceso regulado por G α i (Diehl et al., 1992).

* La subunidad α de Gi se sobreexpresa en células hepatocarcinogénicas (Torres-Márquez, 1997, McKillop et al., 1998).

Con estos antecedentes queda claro que Gi participa en la proliferación de células que han sido transfectadas con GiPCR o proteínas Gi, con el fin de que sobreexpresen estos componentes. Por lo que resulta de gran interés investigar si la proteína Gi esta involucrada en la proliferación celular y en eventos relacionados con ésta, en el hepatoma AS-30D, una línea celular que naturalmente sobreexpresa esta proteína, además de expresar un tipo de GiPCR como los receptores α -2 adrenérgicos. De ser así, sería interesante conocer cuál es el mecanismo mediante el cual Gi participa en este proceso, Por lo anterior la hipótesis y los objetivos planteados para este trabajo fueron:

HIPÓTESIS

Si la proteína Gi está involucrada en las vías que llevan a la proliferación del hepatoma AS30D, entonces, 1) la Ptx que ADP ribosila e inactiva a la subunidad α de Gi, afectará algunos parámetros relacionados con la proliferación de estas células, como el número celular, la síntesis de DNA y la activación de MAPK-p44 y MAPK-p42.

2) Los análogos no hidrolizables de GTP como el GTP γ S, activarán a Gi en el hepatoma AS30D, promoviendo la activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 por el efecto del complejo $\beta\gamma$.

3) La actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 en el hepatoma AS-30D incrementará debido a la respuesta α -2 adrenérgica acoplada a Gi.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si G_i tiene algún efecto sobre la proliferación celular y eventos que anteceden a ésta, como la síntesis de DNA y activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 en el hepatoma AS-30D.

OBJETIVOS PARTICULARES

- * Medir el efecto de toxina pertussis (Ptx) sobre la proliferación celular del hepatoma AS30D.
- * Medir el efecto de Ptx sobre la síntesis de DNA en el hepatoma AS30D.
- * Medir el efecto de Ptx sobre la activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 en el hepatoma AS30D.
- * Medir el efecto de $GTP\gamma S$, un agonista no hidrolizable de GTP, que provoca la disociación de las proteínas G, sobre la acción de la MAPK-p44 y MAPK-p42.
- * Comprobar si el efecto de G_i sobre la activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 en el hepatoma AS-30D se debe al complejo $\beta\gamma$.
- * Medir el efecto del UK14304, agonista selectivo para receptores α -2 adrenérgicos, sobre la acción de MAPK-p44 y MAPK-p42.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

REACTIVOS

El ácido okadaico (#cat. 13166-012), la proteína mielínica básica (MBP) (#cat. 13228-010) y el medio Dulbecco esencial modificado (DMEM) (#cat. 430-1600) se adquirieron de GIBCO, el UK14304 (#cat. U-104) de RBI, la colagenasa (#cat. S6M597) de Worthington, el ^{32}P -NAD (#cat. BLU/NEG/023X) y el γ^{32} ATP (#cat. BLU/NEG/002A) de NEN, el papel de fosfo celulosa (#cat. 3698-915) de Whatman, los anticuerpos policlonales de conejo anti ERK-1 (dirigido en contra del carboxilo terminal, residuos 352-367, de MAPK-p44 y es capaz de reconocer también a MAPK-p42) (# cat. sc-93) y anti-G β (dirigido contra carboxilo terminal de β 1, residuos 321-340 y que es capaz de reconocer también a β 2, β 3 y β 4) (# cat. sc-378) al igual que la proteína A agarosa (# cat. sc-2001) son de Santa Cruz Biotechnology, el anticuerpo policlonal de conejo anti-G α_i (dirigido contra el carboxilo terminal, residuos KNNLOGLF) (# cat. 06-236) es de Upstate Biotechnology, las placas KODAK X-OMAT (# cat. F5513), el anticuerpo monoclonal de ratón anti -BrdU (# cat. B2531) y el anticuerpo policlonal anti IgG de ratón conjugado con fosfatas alcalina (# cat. A-5187) son de SIGMA, el kit de quimioluminiscencia para western blot (# cat. 1520-709) y el GTP γ S (# cat. 220-647) son de Boehringer.

METODOLOGÍA

PROPAGACIÓN DEL HEPATOMA

El hepatoma se propagó por la inoculación intraperitoneal (ip) de 1.5 ml de líquido de ascitis el cual se obtuvo de ratas Wistar de aproximadamente 250 g. Se dejó desarrollar durante 7 días (López-Gómez et al., 1993). Para el caso de las ratas tratadas con Ptx, el hepatoma se dejó desarrollar 6 días únicamente.

CULTIVO DE CÉLULAS DE HEPATOMA

Dos millones de células de hepatoma se colocaron en multiplacas de 12 pozos, se añadieron 600 μ l de medio Dulbecco esencial modificado (DMEM) con 10% de suero

fetal bovino (SFB). En los experimentos donde el objetivo fue encontrar la concentración óptima de suero, este varió entre 2, 5 y 10%.

Las placas de cultivo se incubaron a 37 °C, en una atmósfera con 5% de CO₂, 95% de O₂ y humedad controlada.

Las curvas de viabilidad celular en diferentes medios de cultivo que inclufan diversas concentraciones de suero en DMEM arriba mencionadas, se muestran a continuación (figura M1).

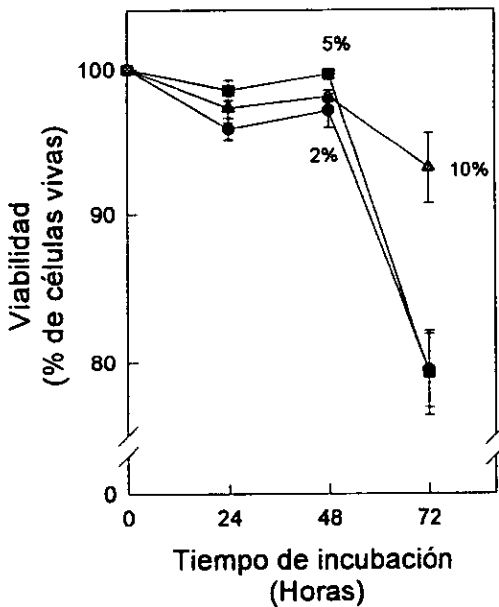


Fig. M1. Viabilidad del hepatoma dependiente de suero. Se realizaron curvas de viabilidad a los tiempos y concentraciones de suero, adicionados al medio, como se indicada en la figura. La viabilidad se determinó por exclusión con azul de tripan. El 100% de viabilidad equivale a 2 millones de células. Los valores corresponden a la $X \pm$ ESM de 2 experimentos realizados por triplicado.

CUANTIFICACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR

La cuantificación celular se realizó por conteo en hemocitómetro y la viabilidad se verificó por la exclusión con azul de tripano. Las células viables presentan una apariencia birrefringente y no se tiñen de azul.

TRATAMIENTO DE CÉLULAS DE HEPATOMA CON Ptx

in vivo.- Se inocularon ratas Wistar de 250-300 g de peso con hepatoma, a las 72 h de la inoculación se administraron 30 µg de Ptx vía intraperitoneal (García-Sainz et al., 1986).

Las ratas se sacrificaron 72 h después para obtener las células de hepatoma.

in vitro.- Se cultivaron 2 millones de células en DMEM + 10 % de suero, se añadieron 20 ng de Ptx/ml de medio (La Morte 1992). Las células se incubaron durante 16 h y se les midieron los parámetros indicados en las figuras.

LAVADO DE CÉLULAS DE HEPATOMA

Para los ensayos donde se indica, las células se lavaron de la siguiente manera. Se tomaron 5 ml de hepatoma, se agregaron 15 ml de solución salina isotónica (SSI) y se centrifugaron a 271 x g durante 1 min. El sobrenadante se decantó y se repitió el procedimiento dos veces más. Al botón se le adicionaron 5 ml de albúmina sérica de bovino (BSA) al 10% y 10 ml de SSI y se centrifugó a 271 x g por 1 min. El botón se separó por decantación, se realizó otro lavado con SSI y finalmente se resuspendió en el medio anterior.

OBTENCIÓN DE MEMBRANAS DE HEPATOMA

Se homogenizaron las células de hepatoma en un buffer que contenía sacarosa 250 mM, hepes 20 mM y EDTA 1 mM. Posteriormente la muestra se centrifugó a 1086 x g durante 5 min, se separó el sobrenadante y éste se homogenizó con percol en una relación 3:1 (3 de homogenizado + 2 de percol) durante 5 min y se añadió 1 ml de sacarosa 2.2 M, se centrifugó a 11,500 x g por 40 min. Se obtuvo una interfase la cual se separó y se le adicionó Tris 50 mM y Mg²⁺ 10 mM, se centrifugó a 24,000 x g durante 10 min y finalmente se separó el sobrenadante, en el precipitado estaban contenidas las membranas.

ADP RIBOSILACIÓN POR PTX a G₀

Se realizó por el método descrito por García-Sainz et al., 1989. Brevemente, se incubaron 100 µg de proteína membranal con $\alpha^{32}\text{P}$ -NAD en buffer de fosfatos pH 7.5 por 30 min a 30°C, en presencia o ausencia de toxina pertussis activada, según se indique. Posteriormente, las proteínas se separaron en un gel de PAGE-SDS al 10%. El gel se tiñó, se secó y se expuso a la placa del Phosphorimager para obtener su autoradiografía.

INCORPORACIÓN DE BrDU PARA LA DETERMINACIÓN DE SÍNTESIS DE DNA

El ensayo se realizó en base a lo descrito por Wilson, 1994 con algunas modificaciones. Las células obtenidas de las ratas inoculadas con hepatoma se lavaron como se explicó anteriormente, se tomaron 2 millones de éstas y se incubaron en SSI con bromodesoxiuridina (BrDU) 100 µM, durante 45 min en atmósfera de 5% de CO₂, 95% de O₂ y humedad controlada. Se centrifugaron a 27,000 x g durante 2 min. El precipitado se lavó con 1 ml de buffer salino de fosfatos o PBS y se centrifugó nuevamente. Las células se lisaron con 1 ml de HCl 2.5 N y se dejó reposar toda la noche, posteriormente la muestra se hirvió durante 30 min, se lavó 5 veces con PBS pH 7.8 y 2 veces con PBS pH 7.2 con la finalidad de neutralizar. La muestra se agitó en vortex por 20 seg, se centrifugó a 27,000 x g durante 4 min. El sobrenadante se retiró y al precipitado se le adicionaron 50 µl de un primer anticuerpo anti-BrDU (dilución 1:1000 en BSA 1%, Tween 20 0.5% en PBS pH 7.2). La muestra se incubó 1 h a 37 °C en agitación suave. Posteriormente se realizó un lavado con 1 ml de PBS pH 7.2, se centrifugó 1 min a 27,000 x g, se retiró el sobrenadante y se colocó un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (diluido 1:3000 en BSA 1%, Tween 20 0.5% en PBS pH 7.2). Se incubó 1 h a 37 °C en agitación suave, posteriormente se lavó 2 veces con 1 ml de PBS pH 7.2 y una vez con 1 ml de buffer de reacción que contenía: dietanolamina (DEA) 10 mM, MgCl₂ 0.5 mM en agua a pH 9.5, se centrifugó a 27,000 x g durante 30 seg. El sobrenadante se retiró y se añadió buffer de reacción que contenía parnitrofenol fosfato (pnpp) 2 mM disuelto en buffer de reacción. La muestra se incubó a 37 °C en agitación suave. Después de 20 min la reacción se detuvo en frío con NaOH 1 N. Finalmente la muestra se centrifugó a 27,000 x g durante 4 min y se leyó la absorbancia

del sobrenadante en un espectrofotómetro a 405 nm. La cantidad de BrDU incorporada es proporcional a la cantidad de pnp producto de la actividad de la fosfatasa alcalina sobre pnp. Los moles de pnp se obtuvieron utilizando el coeficiente de extinción molar para el pnp de $1.62 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

in vitro.- Las células se cultivaron como se describió anteriormente en DMEM + 10% de SFB, se les adicionó 20 ng de Ptx/ml de medio + BrDU 100 μM y se incubaron en atmósfera de 5% de CO_2 , 95% de O_2 y humedad controlada por 16 h. Las células se centrifugaron a 27,000 x g durante 2 min y se lavaron con 1 ml de PBS pH 7.2, centrifugando nuevamente a 27,000 x g por 1 min. Las células se lisaron con 1 ml de HCl 2.5 N durante 2 h, posteriormente se hirvieron durante 30 min. El resto del experimento sigue los mismos pasos que para las células *in vivo*.

Con el fin de optimizar la cantidad de células y el tiempo de incubación *in vitro* con BrdU necesario para observar una mejor incorporación de este análogo de timina, se realizaron incubaciones con BrdU a 4 y 16 h con diferente número de células, como se indica en la figura M2.

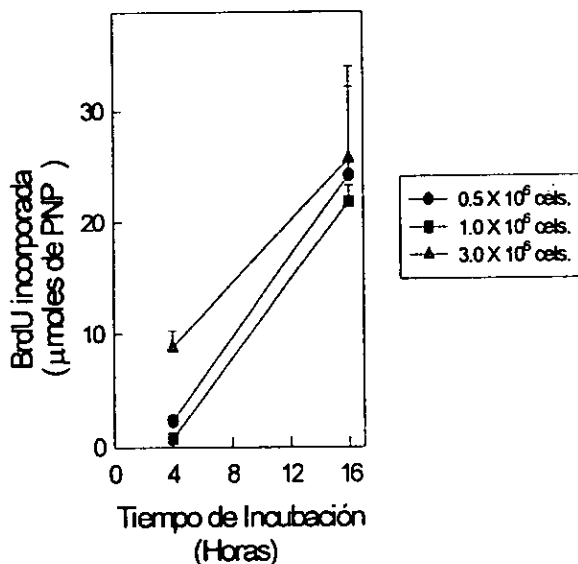


Fig. M2. Incorporación de BrDU en células de hepatoma *in vitro*. Se realizaron curvas de incorporación de BrDU a 4 y 16 h con la cantidad de células indicada. La BrDU incorporada es proporcional a los μ moles de paranitrofenol (pnp) generados por la actividad de fosfatasa alcalina, presente en el segundo anticuerpo, a partir de paranitrofenolfosfato (pnpp).

Los valores corresponden a la $X \pm$ ESM de 2 experimentos realizados por triplicado.

WESTERN BLOT PARA DETECCIÓN DE MAPK-p44 y MAPK-p42 EN HEPATOCITOS Y HEPATOMA Y DE G_β y G_α EN EL HEPATOMA

Se tomaron aproximadamente 2×10^7 células de hepatoma lavadas como se describió previamente y se agregaron 500 μ l de buffer de lisis (Tris-acetato 20 mM, sacarosa 0.27 M, EDTA 1mM, EGTA 1mM, ortovanadato 1mM, beta glicerol fosfato 10 mM, fluoruro de sodio 50 mM, pirofosfato de sodio 5 mM, Tritón x-100 1%, mercaptoetanol 0.1%, PMSF 0.2 mM, benzamidina 1mM , pH 7.5), se dejaron las muestras en hielo durante 30

min, se centrifugaron 15 min a 20,000 x g y se tomó el sobrenadante. Por otro lado, se tomó un fragmento de hígado, aproximadamente 1 g, al cual se le realizaron tres lavados con SSI, se homogenizó con buffer de lisis sin Tritón, se centrifugó a 1,000 x g durante 5 min, se tomó el sobrenadante y este se centrifugó a 20,000 x g durante 15 min. Se determinó proteína de ambas muestras por el método de Lowry (1951). Del sobrenadante obtenido del lisado se inmunoprecipitaron 5 mg de proteína para el caso de MAPK-p44 y MAPK-42, con 6 μ l de anticuerpo anti MAPK-p44 que reconoce también a MAPK-p42 [250 μ g/ml] + 16 μ l de proteína A agarosa; se usaron 3 mg de proteína para el caso de G_{β_i} con 6 μ l de anticuerpo anti $G_{\beta_{1,4}}$ [200 μ g/ml] + 18 μ l de proteína A agarosa, en hielo y con agitación suave durante 2 h. Posteriormente las muestras se centrifugaron 8 min a 27,000 x g, se lavaron los precipitados 2 veces con buffer de cinasas (HEPES 20mM, $MgCl_2$ 10mM y ditiotretitol 1mM), se les agregó 20 μ l de buffer muestra y la muestra inmunoprecipitada con anti $G_{\beta_{1,4}}$ se dividió en 2 fracciones. Las muestras se hirvieron durante 5 min y se corrieron en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% a 17 mA. Posteriormente al gel se le quitó el exceso de SDS con buffer de transferencia (Tris 6 mM, glicina 1.4 % y metanol 5mM). Se transfirió a papel de nitrocelulosa durante 2 h en buffer de transferencia a 380 mA aproximadamente. Posteriormente el papel se bloqueó durante 2 h con TBS (Tris 50 mM y NaCl 150 mM pH 7.5) conteniendo 5% de leche semidescremada. Se separaron los 3 carriles y cada uno se incubó por separado con un primer anticuerpo, ya sea anti MAPK-p44 y MAPK-p42 [250 μ g/ml], o anti G_{β_i} [200 μ g/ml], o anti $G_{\alpha_{1,2}}$ [1 μ g/ μ l] (dilución 1:1000 en TBS pH 7.5) durante toda la noche a temperatura ambiente y en agitación suave, después se hicieron tres lavados de 10 min cada uno con TBS-Tween (TBS+tween al 0.1%) para entonces incubar los diferentes papeles con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (POD) durante 1h a temperatura ambiente y en agitación suave. Se lavó nuevamente el papel con TBS-Tween durante 10 min, 3 veces. Finalmente se reveló la cantidad de proteína por quimioluminiscencia (ECL).

AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS

Los hepatocitos se aislaron por perfusión con colagenasa de acuerdo al método descrito

por Berry y Friend, 1969. En breve, se perfundió el hígado de una rata de 300 g de peso aproximadamente con buffer Ringer Krebs sin calcio pH 7.4 a 37°C con burbujeo de 95 % de O₂ y 5% de CO₂ durante 10 min. Posteriormente se perfundió el hígado con Ringer Krebs + calcio y colagenasa durante 12 min en las mismas condiciones de temperatura y burbujeo. Finalmente los hepatocitos se obtuvieron del hígado reblandecido y se lavaron 2 veces con buffer Ringer Krebs.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MAPK-p44 y MAPK-p42 EN HEPATOCITOS Y HEPATOMA

A) Ensayo en Gel.- Se basó en el ensayo de Marshall y Leever (1995) y Hawes et al., (1995), con algunas modificaciones como se describirá a continuación. Se tomaron aproximadamente 9×10^7 células de hepatoma y 2×10^7 hepatocitos. Se incubaron las células con o sin el agonista específico para receptores α -2 adrenérgicos, UK 14304 10^{-8} M, a 37°C durante 5 min. Las células se centrifugaron 5 min a $18,846 \times g$, se decantaron y se les agregó 500 μ l buffer de lisis + ácido okadaico 1 μ M; se dejaron las muestras en hielo durante 30 min. Para el caso de las células que se trataron con el análogo de GTP, éstas se incubaron en buffer de lisis + ácido okadaico durante 30 min, posteriormente se añadió GTP γ S 100 μ M y los lisados totales se incubaron 5 min a 37°C. Las muestras se centrifugaron a $27,000 \times g$ por 10 min y el sobrenadante se utilizó para la inmunoprecipitación. Las MAPK-p44 y MAPK-p42 se inmunoprecipitaron, para el caso de las células tratada con UK 14304 de la siguiente manera, se tomaron 5 mg de proteína del sobrenadante obtenido del lisado, se incubaron con 6 μ l de anticuerpo dirigido contra MAPK-p44, que reconoce también a MAPK-p42 [250 μ g/ml] + 15 μ l de proteína A agarosa y para el caso de las células tratadas con GTP γ S, las MAPK-p44 y MAPK-p42 se inmunoprecipitaron tomando 3 mg de proteína del sobrenadante del lisado, se incubaron con 6 μ l de anticuerpo anti MAPK-p44 y MAPK-p42 [250 μ g/ml] + 18 μ l de proteína A agarosa, en hielo y con agitación suave durante 2 h. Posteriormente las muestras se centrifugaron 8 min a $27,000 \times g$, se lavaron los inmunoprecipitados 2 veces con buffer de cinasas, a los precipitados se les añadió nuevamente ácido okadaico + el sustrato, proteína mielínica básica (MBP) a una concentración de 250 μ g/ml resuspendida en buffer

de cinasas, preincubandose a 30°C durante 3 min aproximadamente. Para arrancar la reacción de fosforilación se agregó ATP 20 mM y γ^{32} ATP 10 μ Ci/ml y se incubó durante 30 min, a la misma temperatura. Para finalizar la reacción se agregó TCA 5% final, dejando precipitar las proteínas durante 15 min en hielo, se centrifugaron a 27,000 x g durante 2 min, se retiró el sobrenadante y a los sedimentos se agregaron 60 μ l de buffer muestra (SDS 2.3%, glicerol 10%, mercaptoetanol 5%, EDTA 5 mM, Tris 62.5 mM, pH 6.8), se hirvieron las muestras durante 3 min y se corrieron en un gel de poliacrilamida SDS al 15%. Posteriormente el gel se secó y se expuso en una placa la cual se leyó en un phosphorimager, se obtuvo una autoradiografía del gel en donde se apreció la incorporación de γ^{32} P a la MBP .

B) Ensayo en papel de fosfoceulosa.- Éste se realizó solo para determinar la actividad basal y con UK14310. Se siguió el mismo procedimiento del ensayo en gel hasta la obtención del inmunoprecipitado de MAPK-p44 y MAPK-p42. Los inmunoprecipitados se lavaron 2 veces con buffer de lisis + NaCl 0.5 M. Se agregó MBP 500 μ g/ml resuspendida en buffer de reacción (Tris 36 mM pH 7+ 0.1 mM de EGTA) + $MgCl_2$ 10 mM+ ácido okadaico 1 μ M + ortovanadato 0.1mM. preincubandose a 30°C durante 3 min aproximadamente; para arrancar la reacción de fosforilación se agregó ATP 0.2 mM y γ^{32} P-ATP 400 μ Ci/ml y se incubó a la misma temperatura durante 20 min. Para finalizar la reacción se agregó TCA 5% final, y se dejaron reposar las muestras durante 15 min en hielo, se centrifugaron a 27,000 x g durante 2 min, se retiraron los sobrenadantes y los sedimentos se colocaron en cuadros de papel de fosfoceulosa (2.5 x 2.5 cm). Una vez secos los papeles se lavaron 4 veces durante 5 min cada vez, con ácido fosfórico 0.5% y finalmente se realizó un último lavado con acetona, los papeles se colocaron en viales con líquido de centelleo los cuales se llevaron a un contador para determinar la cantidad de fósforo γ^{32} P incorporado a MBP.

Nota: la concentración de ATP no radiactivo varía entre los ensayos realizados en gel y en papel debido a que el tiempo de reacción que se utiliza para el ensayo en gel es 10 min mas largo que el utilizado en el ensayo en papel, por lo que el ATP debe estar a una mayor concentración con el fin de que no resulte limitante para la reacción.

Con respecto al ATP radioactivo, los μ Ci utilizados en el ensayo en gel están en una

proporción 40 veces menor a los utilizados en el ensayo en papel, debido a la posible pérdida del producto en los lavados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todo el análisis estadístico de resultados se realizó mediante la prueba *t* de student.

CUANTIFICACIÓN DE LAS BANDAS DEL INMUNOBLOT DE MAPK-p44 y MAPK-p42 Y DE LAS FOSFORILACIONES DE MBP

La cuantificación del inmunoblot para MAPK-p44 y MAPK-p42 se realizó por densitometría mediante el uso del programa Scion Image. La cuantificación del incremento en la fosforilación de MBP en todos los geles se realizó determinando el volumen y la intensidad de las bandas mediante el programa contenido en el phosphorimager.

NOTA: Para consultar la metodología de incorporación de BrdU y actividad de MAPK en diagrama de flujo, consultar los apéndices I, II y III.

RESULTADOS

Efecto de toxina pertussis sobre la proliferación celular *in vivo* en el hepatoma AS-30D

El primer experimento para estudiar el papel de G_i en la proliferación celular o en eventos relacionados con ésta, consistió en observar el efecto de Ptx en el desarrollo del hepatoma *in vivo*. Esta toxina es capaz de ADP ribosilar a G_{α_i} modificándola de forma estructural y funcional. Las células de hepatoma se obtuvieron de ratas inoculadas con hepatoma y tratadas con Ptx tal y como se describe en métodos. Se pudo observar (fig. 1) que el desarrollo del hepatoma *in vivo* disminuyó al estar en contacto con la toxina.

Efecto de Ptx sobre la síntesis de DNA *in vivo* en el hepatoma AS-30D

Otro evento relacionado con la proliferación celular y que antecede a la mitosis es la síntesis de DNA, por lo que mediante el uso de Ptx en células de hepatoma, se estudió si G_i pudiera tener efecto sobre este proceso.

Se montó la metodología para incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), pues ésta al ser un análogo de timina permite determinar si existe un aumento o una disminución en la síntesis de DNA.

No se encontró *in vivo* ningún efecto de la Ptx sobre la síntesis de DNA del hepatoma (fig. 2). No obstante, el tiempo de incubación con BrdU fue muy corto (45 min) y dado que la incubación con BrdU fue una limitante en esta determinación, los experimentos realizados con las células en cultivo son más confiables en este sentido y serán mostrados más adelante.

ADP Ribosilación *in vivo* en el hepatoma AS-30D

Para verificar si la Ptx tuvo algún efecto sobre la proteína G_i en las células *in vivo* se realizó el ensayo de ADP ribosilación, en las membranas obtenidas de ratas inoculadas con hepatoma y tratadas con la toxina pertussis.

En la fig. 3 se observa el gel que muestra la ADP ribosilación de las membranas de hepatoma AS30D. En el carril I se muestra la ADP ribosilación de membranas de

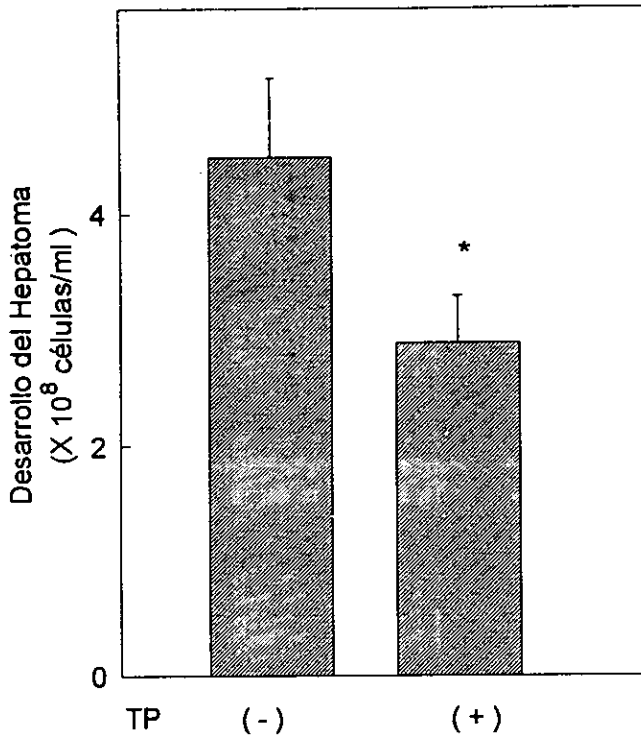


Fig.1. Efecto de Ptx sobre el desarrollo del hepatoma AS30D *in vivo*. A las 72 h de la inoculación del hepatoma a las ratas, se inyectaron intraperitonealmente (ip) 30 μ g de Ptx. Después de 72 h las ratas se sacrificaron, se obtuvo el hepatoma y se determinó el número celular en hemocitómetro. Los valores corresponden a la media (X) \pm el error estándar de la media (ESM) de determinaciones realizadas por duplicado de 5 animales.

* $p < 0.05$. Nota: En la figura TP=Ptx

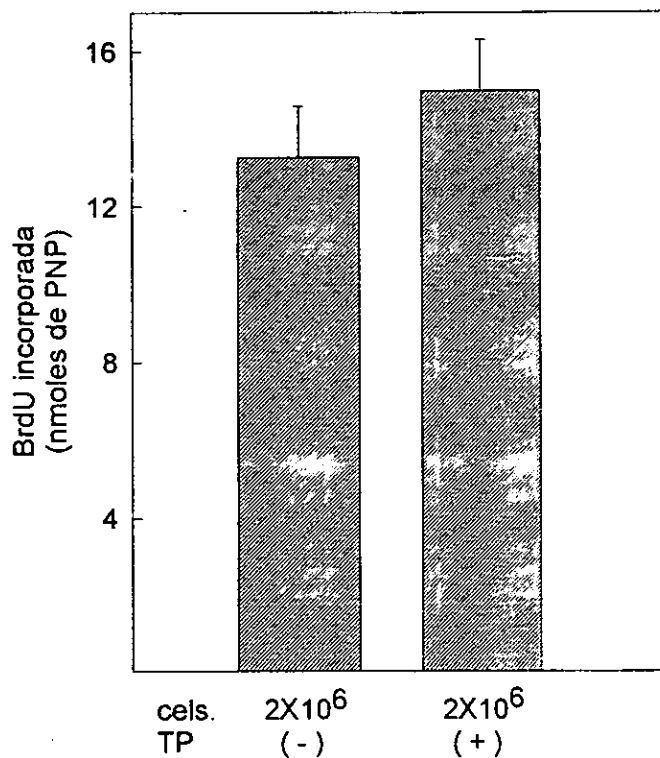


Fig.2. Efecto de Ptx sobre la síntesis de DNA del hepatoma *in vivo*. Las células se trataron y obtuvieron como se describió en la fig. 1. La síntesis de DNA se determinó por incorporación de BrdU (bromodesoxiuridina) como se describe en métodos. Los valores corresponden a la $X \pm$ ESM de 3 a 4 experimentos realizados por duplicado.

No hubo diferencia significativa ($p = ns$). *Nota: En la figura TP = Ptx*

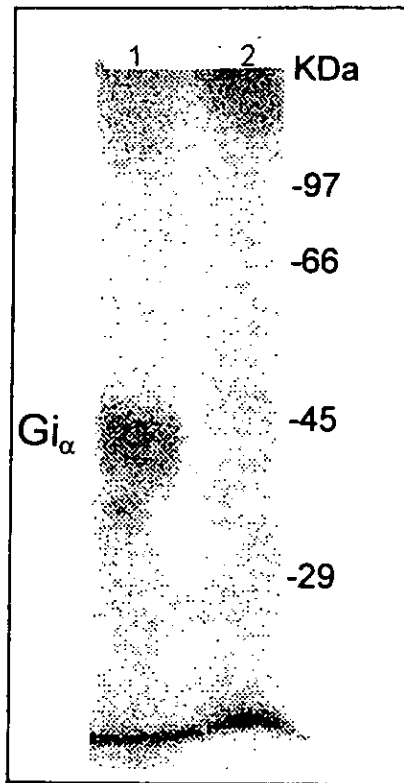


Fig.3. ADP ribosilación de G_i en Hepatoma AS30D *in vivo*. Se obtuvieron membranas de ratas con hepatoma AS30D sin tratamiento con Ptx (carril 1) o membranas de hepatoma de ratas tratadas con Ptx (carril 2). Estas membranas se incubaron con mezcla de reacción que contenía ^{32}P -NAD con Ptx. Posteriormente se sometieron a PAGE-SDS al 10 %. El gel se expuso a una placa de phosphorimager. Experimento representativo de 2.

hepatoma, se puede distinguir una banda ADP ribosilada de aproximadamente 41 kDa, como se espera para G_{α_i} . En el segundo carril se muestran membranas de células pretratadas con Ptx y se observa que la banda que aparecía ADP ribosilada en las membranas de hepatoma desaparece. Esto es debido a que el pretratamiento con la toxina debió haber ADP-ribosilado a la proteína, por lo que ya no existe sustrato libre que pueda ser aceptor de la ADP-ribosa por efecto de Ptx.

Efecto de toxina pertussis sobre la proliferación celular *in vitro* en el hepatoma AS-30D

Las células se expusieron a la Ptx. Se determinó la viabilidad para verificar si la toxina no actuaba de manera tóxica sobre las células (fig. 4). Se encontró que las células de hepatoma mantienen una viabilidad mayor al $90 \pm 1.4 \%$, independientemente de la presencia de la Ptx.

Se realizó también el experimento para saber el efecto de la Ptx sobre la proliferación celular del hepatoma *in vitro*. Se hizo la determinación en células en cultivo incubadas con Ptx durante 16 h; se observa en la fig. 5 que el número celular permaneció sin variaciones con o sin Ptx.

Efecto de la toxina pertussis sobre la síntesis de DNA *in vitro* en el hepatoma AS-30D

Debido a que los resultados obtenidos *in vivo* para la síntesis de DNA no resultaron informativos, se decidió realizar el ensayo de incorporación de BrdU *in vitro*. Después de 16 h de incubación de las células con toxina y BrdU, se observó que la toxina indujo una disminución de 4.6 veces de la síntesis de DNA en el hepatoma (fig. 6).

ADP ribosilación *in vitro* en el hepatoma AS-30D

Para verificar que la Ptx actuaba sobre la proteína G_i en las células *in vitro* se realizó el ensayo de ADP ribosilación. En la fig. 7, se puede ver que donde se muestran membranas de células control (carril 1), existe una banda ADP ribosilada con una masa molecular semejante a la de G_{α_i} , 41 kDa. En donde se muestran membranas de células pretratadas con Ptx esta banda desaparece (carril 2).

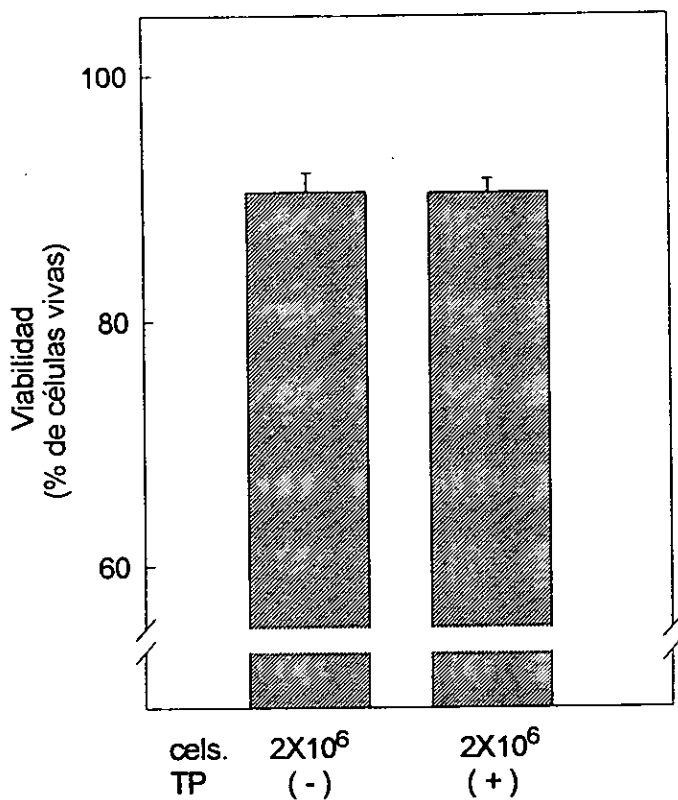


Fig. 4. Efecto de Ptx sobre la viabilidad del hepatoma *in vitro*. Se determinó la viabilidad por exclusión con azul de tripan, después de 16 h de haber expuesto o no a las células de hepatoma a 20 ng de Ptx/ml de medio. El 100% corresponde a 2 millones de células. Los valores corresponden a la $X \pm$ ESM de 3 experimentos realizados por duplicado. No hubo diferencia significativa ($p=ns$). Nota: En la figura TP=Ptx

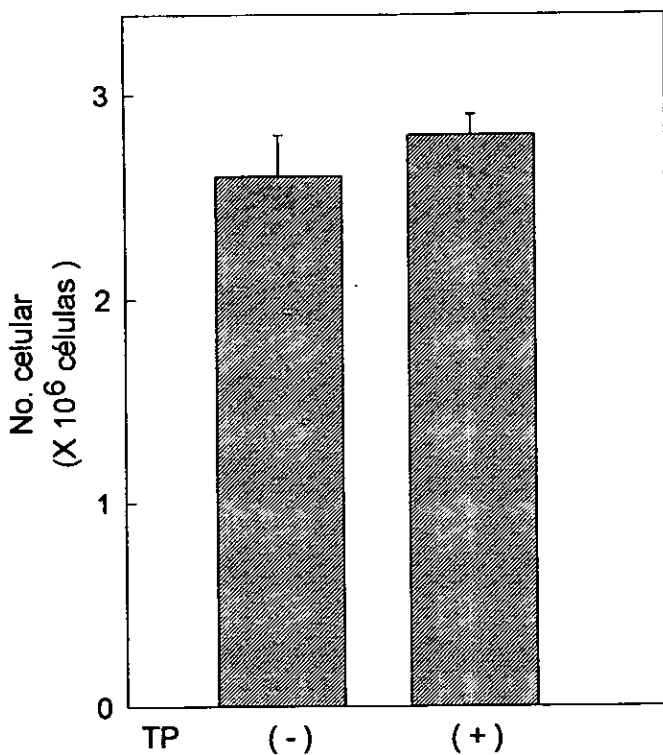


Fig.5. Efecto de Ptx sobre la proliferación celular del hepatoma *in vitro*. Se determinó la proliferación *in vitro* cuantificando el número celular en hemocitómetro después de 16 h de haber o no expuesto células de hepatoma a Ptx. Los valores corresponden a la $X \pm$ ESM de 3 experimentos realizados por duplicado. No hubo diferencia significativa ($p=ns$). Nota: En la figura TP=Ptx

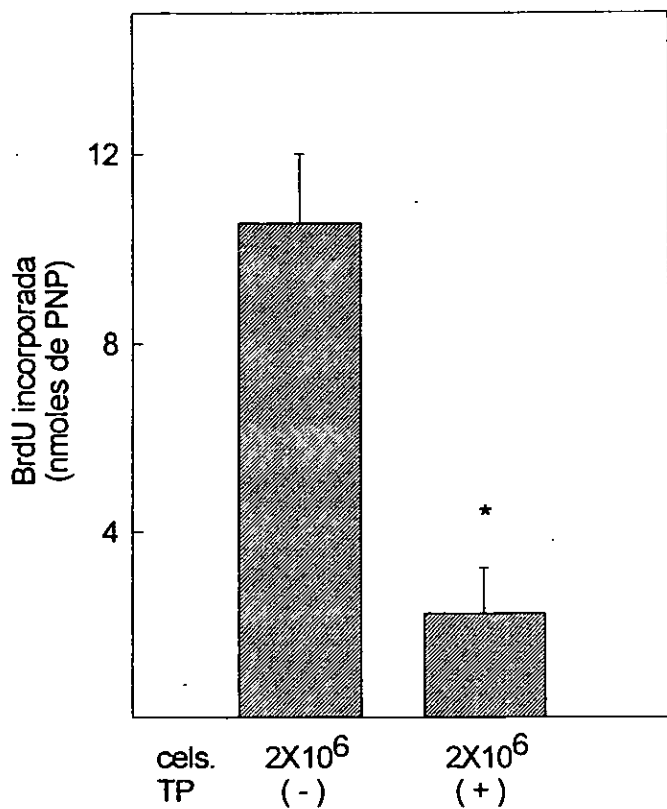


Fig.6. Efecto de Ptx sobre la síntesis de DNA del hepatoma *in vitro*. La síntesis de DNA en hepatoma se determinó en ausencia y presencia de Ptx + BrdU por 16 h *in vitro*. Los valores corresponden a la $\bar{X} \pm$ ESM de 3 a 6 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0.005$. Nota: En la figura TP=Ptx

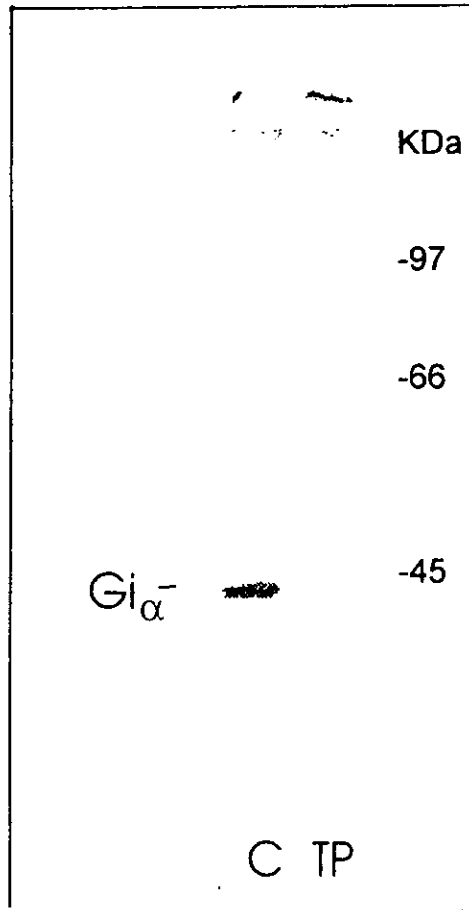


Fig.7. ADP ribosilación de G_i en hepatoma *in vitro*. Se obtuvieron membranas de dos grupos de células diferentes: carril 1.- membranas de hepatoma AS30D sin preexposición a Ptx, carril 2.- membranas de hepatoma pretratadas con Ptx durante 16 h. Estas membranas se incubaron en una mezcla de reacción, descrita en métodos, que contenía ^{32}P -NAD con Ptx. Posteriormente se sometieron a PAGE-SDS al 10 %. El gel se expuso a una placa de phosphorimager. Experimento representativo de 2. *Nota: En la figura TP=Ptx*

Existencia y actividad basal de MAPK.

Efecto de toxina pertussis sobre MAPK-p44 y MAPK-p42 y MAPK-42 en el hepatoma AS-30D

Si la síntesis de DNA disminuyó por el tratamiento con Ptx, tal vez este efecto pudiera correlacionar con una disminución en la actividad de MAPK; por ser este un evento previo en el ciclo celular.

Se realizaron entonces experimentos para verificar la presencia y actividad de la MAPK-p44 y MAPK-p42 en el hepatoma. Al realizar un western blot para detectar la presencia de MAPK-p44 y MAPK-p42, utilizando hepatocitos como control positivo, se encontró que estas cinasas existen en el hepatoma (fig. 8). Se observó también que se encuentran en una proporción menor (71 %) a la que existe en el hígado.

Se procedió entonces a medir la actividad basal de las enzimas (fig. 9), por medio de un ensayo en papel de fosfocelulosa, utilizando como sustrato a la proteína mielínica básica (MBP) y (γ - 32 P) ATP de tal forma que pudiera cuantificarse. En la figura 9 se puede observar, la incorporación de fósforo al sustrato que resulta de la actividad de las enzimas, la cual fue de 79.4 ± 4 fmol/min/mg de proteína en el hepatoma AS-30D. El ensayo también se realizó en hepatocitos, utilizados como control positivo, donde se obtuvo una actividad de 55.25 ± 5 fmol/min/mg de prot. Esta actividad es similar a la que se puede calcular de los experimentos de Tombes et al., (1998), que es de 61 ± 3 fmol/min/mg de prot. Entonces, a pesar de la menor cantidad de MAPK-p44 y MAPK-p42 en el hepatoma con relación al hepatocito su actividad es en un 44 % mayor.

Si Gi estaba participando en la activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 en el hepatoma, la Ptx debía tener efecto sobre la actividad de las cinasas, por lo que se determinó la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 en células en cultivo incubadas con Ptx durante 16 h. Se encontró que la actividad de las enzimas disminuyó 3 veces en presencia de Ptx (fig. 10), lo que sugiere que sí hay participación de Gi en la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 en el hepatoma AS-30D.

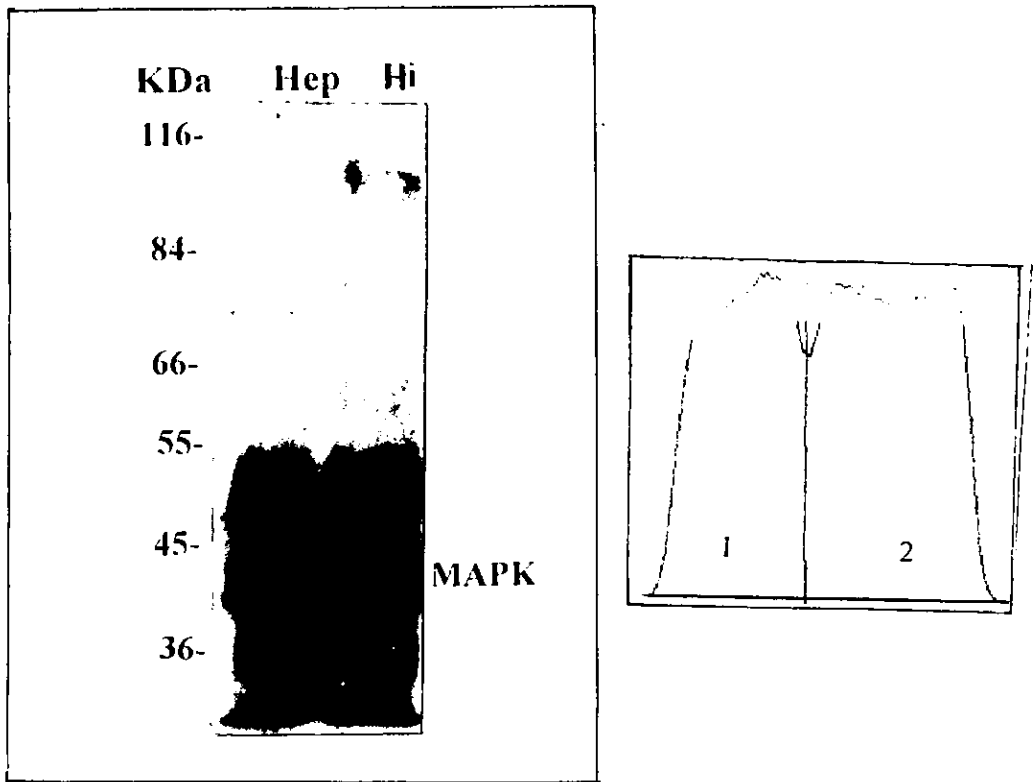


Fig.8. MAPK-p44 y MAPK-p42 en hepatoma. MAPK-p44 y MAPK-p42, se inmunoprecipitaron de lisados (5 mg de proteína total) de hepatoma (carril 1) o hepatocitos (carril 2). Los inmunoprecipitados se corrieron en PAGE-SDS al 10 %, se transfirieron a papel de nitrocelulosa, que se incubó con anticuerpo anti-MAPK-p44 que también es capaz de reconocer a MAPK-p42. La detección del complejo MAPK-p44 y MAPK-p42 anticuerpo anti- MAPK-p44 y MAPK-p42 se realizó por quimioluminiscencia (ECL). La MAPK-p44 y MAPK-p42 se observan como un doblete en 44 y 42 kDa. La banda que se observa en 52 kDa es la cadena pesada de el anticuerpo y la que se observa en 35 kDa son productos de degradación. Los valores de la izquierda corresponden a marcadores de masa molecular y las curvas que se muestran al lado derecho de la figura corresponden a la densitometría. Experimento representativo de 2. Los porcentajes de aumento de MAPK-p44 y MAPK-p42 fueron de 36% y 24 % (ver fig. 8) para los experimentos realizados. Los porcentajes obtenidos dan como resultado una media de $X=30\%$.

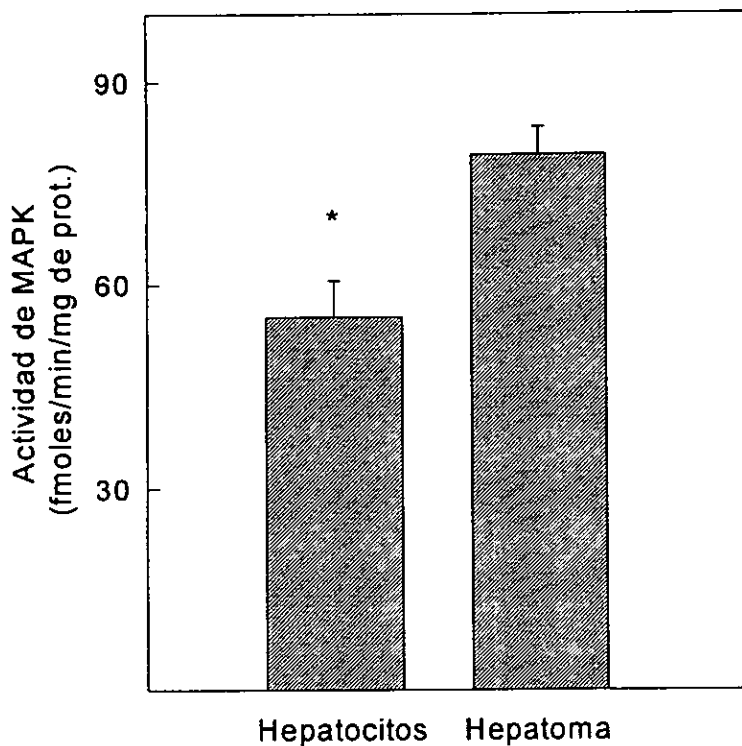


Fig.9. Actividad basal de MAPK-p44 y MAPK-p42. Se inmunoprecipitaron las MAPK-p44 y MAPK-p42 de lisados (5 mg de proteína total) de hepatocitos o hepatoma. La reacción para determinar la actividad de la enzima sobre papel se realizó como se describió en métodos. Los valores corresponden a la $X \pm$ ESM de 3 a 5 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0.005$.

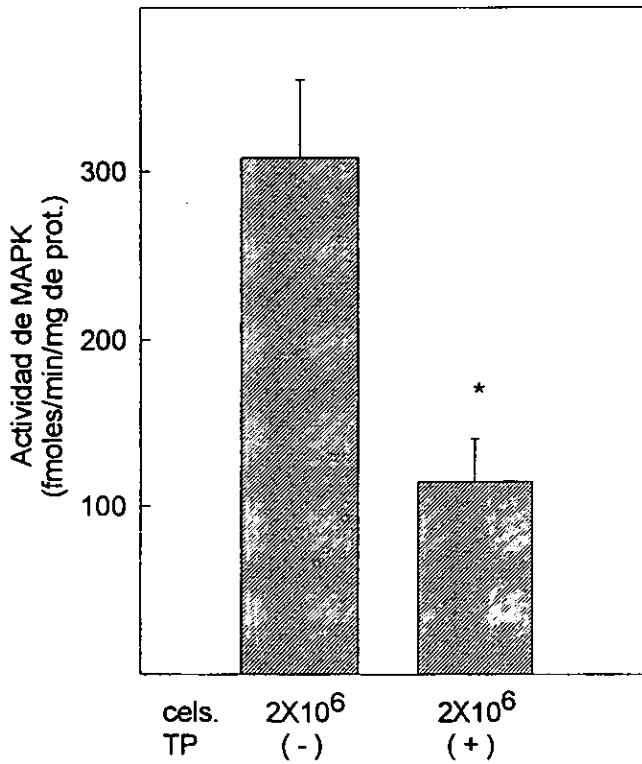


Fig.10. Efecto de Ptx sobre la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 de hepatoma. Se inmunoprecipitaron las MAPK-p44 y MAPK-p42 de lisados de hepatoma (5 mg de proteína total), después de 16 h de incubar a las células de hepatoma con o sin Ptx. La actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 se determinó sobre papel de fosfocelulosa como se describe en métodos. Los valores corresponden a la $X \pm$ ESM de 3 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0.025$. Nota: En la figura TP=Ptx

Activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 y disociación de Gi por GTP γ S en el hepatoma AS-30D

Con el fin de observar si la activación de Gi provocaba un aumento en la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42, se indujo la disociación del trímero, por medio de un análogo de GTP no hidrolizable como el GTP γ S; ya que este análogo no es permeable, la exposición al agente se realizó en lisados totales de células de hepatoma. Como se observa en la fig. 11, la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 aumenta en un 50.5 % en presencia de GTP γ S.

Debido a que la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 aumentó en presencia de GTP γ S, ahora había que comprobar si este incremento pudiera deberse a la acción del complejo $\beta\gamma$. Mediante el tratamiento con GTP γ S, se observó (fig. 12) que al realizar la coimmunoprecipitación de G α_i con el anticuerpo anti- β , aumentó la disociación de G β con G α_i . Así que la activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 en presencia del análogo de GTP correlaciona con la disociación de la proteína Gi.

Actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 por estimulación de receptores α -2 adrenérgicos en hepatocitos y en el hepatoma AS-30D

Con el fin de activar una vía de transducción involucrada en la activación de Gi y la activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 por $\beta\gamma$, se estimularon los receptores α -2 adrenérgicos, que se expresan de forma natural en el hepatoma AS-30D. Para estos experimentos la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 se determinó por el ensayo en gel, utilizando como sustrato a la proteína mielínica básica (MBP) y γ ³²P-ATP, pero a diferencia del ensayo anterior la fosforilación de la MBP que resulta de la activación de la enzima se visualiza mediante una autoradiografía del gel (Marshall y Leever 1995). Para ver el efecto que la activación de receptores α -2 adrenérgicos tiene sobre MAPK, se utilizó el agonista UK 14304 selectivo para este tipo de receptores. Se observó que en el hepatoma no existe una estimulación en la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 por el agonista UK14304 [10^{-8} M] (fig. 13A). Esta determinación también se realizó en hepatocitos como control positivo de la acción α -2 adrenérgica y se encontró a diferencia del hepatoma, que la respuesta de MAPK-p44 y MAPK-p42 aumentó (fig. 13B).

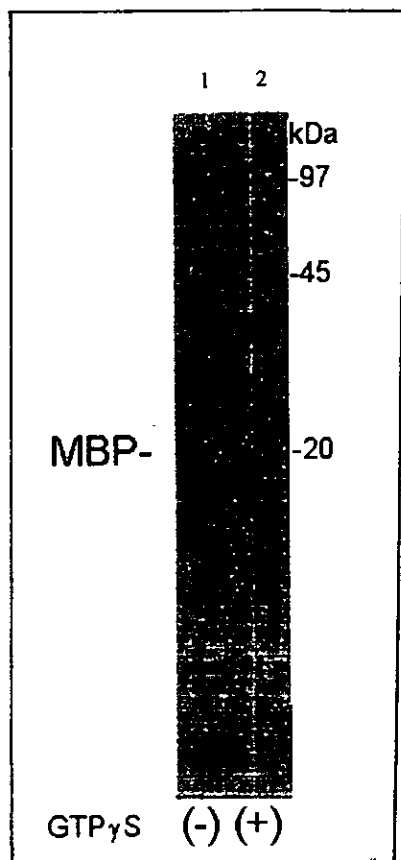


Fig.11. Activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 por GTP γ S. Se inmunoprecipitaron las MAPK-p44 y MAPK-p42 de células de hepatoma (3 mg de proteína total) tratadas sin (carril 1) o con (carril 2) GTP γ S [10^{-4} M]. La actividad de la enzima se verificó en PAGE-SDS al 15 %, como se describe en métodos. Los valores de la derecha corresponden a marcadores de peso molecular. Experimento representativo de 2. Los porcentajes de activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 fueron de 58 % (ver fig. 11) y 43 % para los experimentos realizados. Los porcentajes obtenidos dan como resultado una media de $X=50.5$ %.

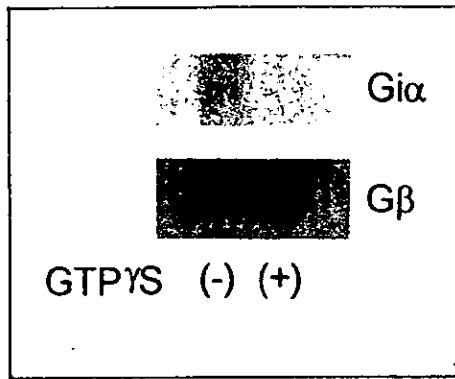


Fig.12. G β y G α en ausencia y presencia de GTP γ S. Se inmunoprecipitaron las G β de lisados de hepatoma (3 mg de proteína total) tratados sin (carril 1) o con (carril 2) GTP γ S. Se corrieron en PAGE-SDS, se realizó un western blott y se incubó con anticuerpo anti- β o anti- α . La detección se realizó por ECL. Experimento representativo de 2.

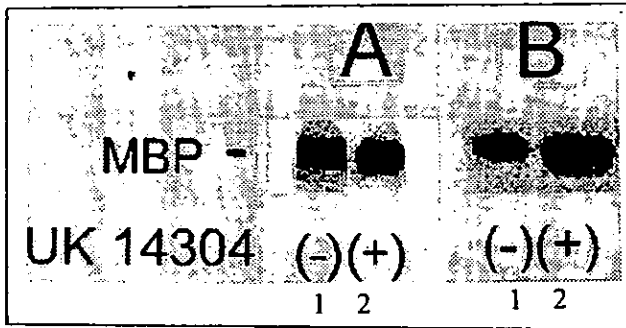


Fig.13. Actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 tras la estimulación α -2 adrenérgica en hepatoma. Las células se incubaron sin (1) y con (2) el agonista UK14310 [10^{-6} M] por 5 min, se lisaron durante 30 min, se inmunoprecipitaron 3 mg de proteína total del lisado con anticuerpos anti-MAPK-p44 y MAPK-p42 de lisados de hepatoma (A) o hepatocitos (B). La actividad de la enzima se determinó en PAGE-SDS al 15 %, como se describe en métodos. Experimento representativo de 2 para los experimentos realizados en el hepatoma. Los porcentajes obtenidos para la activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 estuvieron -5% (ver fig. 13) y -10% por debajo del basal. Los porcentajes obtenidos dan como resultado una media de X=-7.5% por debajo del basal. Para los hepatocitos solo se realizó un experimento, pues éste se utilizó solamente como control positivo.

DISCUSIÓN

La división celular es la culminación de una serie de eventos que conforman el ciclo celular. Entre estos eventos figuran la síntesis de DNA y la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42. Como ya se mencionó anteriormente la proteína Gi se ha visto implicada en estos importantes procesos, en células que sobreexpresan de manera artificial GiPCR o proteínas Gi. En el hepatoma AS-30D, una línea celular altamente proliferativa que sobreexpresa de manera natural a Gi, se encontró que la Ptx fue capaz de afectar la proliferación celular del hepatoma *in vivo*, lo que pudo ocurrir por que la toxina tuvo un efecto directo sobre Gi del hepatoma y/o porque ésta afecta a algún factor que se encuentra en el huésped (la rata), que es necesario para la proliferación del hepatoma. Por ejemplo, en la rata existen un gran número de factores que podrían ser utilizados por el hepatoma para activar la cascada de MAPK-p44 y MAPK-p42 vía GiPCR como la acetilcolina, la trombina, la angiotensina II, etc., o vía receptores de tipo tirosina-cinasa, con factores de crecimiento como el PDGF, EGF, HGF. Sin embargo se puede sugerir que el efecto fue solo sobre Gi del hepatoma, porque hasta ahora no existen reportes en los que se establezca un daño directo sobre alguno de los factores antes mencionados por efecto directo de Ptx.

Si bien la proliferación celular se afectó por el efecto de Ptx sobre Gi, la síntesis de DNA *in vivo*, proceso que antecede a la división celular, no sufrió modificaciones. Lo anterior seguramente se debió a que el tiempo de incubación con BrdU fue muy corto como para detectar un cambio significativo. La incorporación de BrdU a diferentes tiempos de incubación llega a ser una limitante en esta determinación. No fue posible prolongar el tiempo de incubación ya que para estos experimentos, las células de hepatoma fuera del peritoneo se incuban con BrdU en solución salina y bajo estas condiciones, las células después de 2 h, empiezan a morir rápidamente (datos no mostrados). Ya que en la proliferación celular *in vivo* sí se obtuvo un efecto significativo, esto sugiere que el problema técnico fue la razón principal para no ver cambios en la síntesis de DNA *in vivo*.

La ADP ribosilación *in vivo*, permitió comprobar que al administrar Ptx

intraperitonealmente, ésta tiene efecto sobre las células de hepatoma AS-30D ADP ribosilando a las subunidades α de Gi o G_o existentes, en más del 90%. Se puede sugerir que la banda que aparece es G_{αi} ya que si G_{αo} estuviera presente, debiese apreciarse un doblete, conformado por la banda de G_{αi} con una masa molecular de 41 kDa y otra banda perteneciente a G_{αo} con una masa molecular de 39 kDa, por otro lado G_{αo} es una proteína muy abundante en cerebro y hasta el momento no se ha descrito su presencia en hepatocitos. Si el hepatoma AS-30D es una línea celular derivada de hepatocitos lo anterior puede sugerir que la proteína sensible a Ptx existente en el hepatoma es Gi y no G_o.

La idea de realizar los experimentos *in vitro* surgió básicamente por tres razones: 1) La cantidad de Ptx utilizada para el sistema *in vivo* resultaba muy alta (30 µg de toxina por cada rata de 250-300 g) y, por tanto, costosa 2) el tiempo de incubación con BrdU no podía ser mayor a 45 min por lo tanto la incorporación de BrdU no fue la adecuada y no permitió detectar el efecto de Ptx sobre la síntesis de DNA y, sobre todo, 3) podrían existir elementos que no se pudieran controlar en el animal completo.

El que no se detectara un efecto en la proliferación del hepatoma *in vitro* por el efecto de Ptx, se debe a que la incubación con la toxina para estos experimentos fue de 16 h y por lo menos durante las primeras 24 h de cultivo las células de hepatoma *in vitro* no son capaces proliferar (datos no mostrados), por lo tanto no se puede discernir el efecto de la Ptx sobre la división celular.

Aún cuando no se observó un cambio significativo en la proliferación del hepatoma *in vitro*, se decidió realizar el ensayo de incorporación de BrdU *in vitro* para determinar síntesis de DNA, evento que sucede en la fase S del ciclo celular y antecede a la división celular que ocurre en la fase M. Si bien el tiempo en que las células se incubaron con Ptx (16 h) no fue suficiente para observar un efecto significativo en la proliferación, este tiempo bastó para apreciar la capacidad de la Ptx para disminuir la síntesis de DNA (La Morte et al., 1992, 1993) en el hepatoma, lo que sugiere la participación de Gi en este evento. Pudiera pensarse que la Ptx pudiera actuar directamente sobre el DNA afectándolo directamente, propiciando así el encendido de mecanismos de reparación. Si esto hubiese sido cierto, por un lado no se hubiese observado una disminución

significativa en la incorporación de BrdU, por otro lado hasta la fecha no existen reportes en los cuales se haya descrito un efecto tóxico de Ptx sobre DNA.

La ADP ribosilación *in vitro*, permitió observar que la Ptx tuvo efecto sobre más del 90% de subunidades α que posiblemente pertenecen a proteínas Gi, por lo anteriormente explicado para la ADP ribosilación *in vivo*.

Se encontró una menor cantidad de MAPK-p44 y MAPK-p42 en el hepatoma con relación al hepatocito, que no correlaciona con la actividad basal de esta cinasa, la cual es mayor en las células tumorales. En este trabajo el objetivo principal no fue el de ahondar en las diferencias que presenta la activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 entre hepatoma y hepatocitos; básicamente el hecho de haber medido la expresión y la actividad basal de estas cinasas en hepatocitos fue como un control positivo para verificar que las técnicas empleadas estaban funcionando en nuestro sistema; sin embargo el hecho de que existan diferencias en la expresión y actividad de MAPKs en ambas líneas celulares nos podría sugerir que la activación de cascadas capaces de activar a MAPKs en el hepatoma puede estar incrementada, por ser éste una línea celular altamente proliferativa.

El que la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 se afecte por el efecto de Ptx, no porque ésta actuara de forma tóxica, sugiere la participación de Gi en la activación de la cascada de MAPK, que al igual que la síntesis de DNA es un evento previo a la mitosis.

La actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 aumenta en presencia de GTP γ S, ya que éste a la concentración utilizada [10^{-4} M] es capaz de activar directamente a todas las proteínas G existentes en el hepatoma, incluyendo evidentemente a Gi. Este incremento en la actividad de MAPKs, se debió probablemente a la acción del complejo $\beta\gamma$, ya que en la presencia de este análogo no hidrolizable de GTP la disociación de G_{β} con G_{α} aumenta.

El GTP γ S activa a Gi pero éste no existe en la naturaleza, sin embargo los receptores α -2 adrenérgicos sí son capaces de activar a Gi de forma natural en el hepatoma AS-30D (Torres-Márquez, 1997) ya que estos se expresan naturalmente en estas células con un número de 23.4 ± 4.4 fmol/min/mg de proteína membranal. En los experimentos realizados por Alblas (1993), en fibroblastos transfectados, la cantidad de receptores α -2 adrenérgicos fue de $3,451 \pm 479$ fmol/mg de prot membranal de acuerdo con el método utilizado por Milligan (1991). Tras la estimulación de estos receptores con UK14304, se

observó un aumento en la actividad de MAPK; en los hepatocitos la cantidad de receptores α -2 adrenérgicos fue de 203 ± 84 fmol/mg de proteína membranal (Torres-Márquez, 1997), con éstos se logró aumentar la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 tras la estimulación con UK14304. En el hepatoma, no se apreció ningún cambio en la actividad de MAPKs, lo cual pudo deberse a que el número de receptores en el hepatoma es 10 veces menor que en el hígado (Torres-Márquez, 1997); por lo tanto, la respuesta α -2 adrenérgica que se puede generar disociando a G_i , no es suficiente para provocar aumento en la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 por $\beta\gamma$.

Para comprobar que la ausencia de efecto en la actividad de MAPK-p44 y MAPK-42, tras la estimulación de los receptores α -2 adrenérgicos, no se debía a que el UK14304 no activase a los receptores, se realizó el ensayo de actividad de MAPKs en hepatocitos. Se observó que el aumento en la actividad de las cinasas MAPK-p44 y MAPK-p42 es por efecto del UK14304.

La proteína G_i participa en la activación de MAPK, en un sistema que expresa esta proteína de forma natural, como lo es el hepatoma AS-30D, sin embargo esta activación no es mediada por la respuesta α -2 adrenérgica.

Por lo anterior está abierta la pregunta de que mecanismos naturales pueden ser los responsables del aumento en la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 en el hepatoma, capaz de disociar al trímero y provocar que $\beta\gamma$ actúe para activar esta cinasa; en la tabla D.1 se enlistan activadores naturales capaces de actuar de manera directa o vía receptor sobre la proteína G_i .

Otro aspecto interesante es saber el mecanismo por el cual el dímero $\beta\gamma$ de G_i actúa sobre MAPK. Este dímero es capaz de reconocer dominios homólogos a la plekstrina (PH) (Touhara et al., 1994); tanto Ras (Cook y Mc Cormick, 1994) como MAPK-p44 y MAPK-p42, tienen estos dominios por lo que se abren dos posibilidades: 1) $G_{\beta\gamma}$ es capaz de unirse a Ras o 2) $G_{\beta\gamma}$ capaz de unirse a MAPK-44 y MAPK-42. Por otro lado, se ha visto que al estimular la respuesta α 2 adrenérgica en fibroblastos, las actividades de Ras y MAPK, que aumenta debido a la acción de $G_{i\beta\gamma}$, requiere de la activación de proteínas del tipo tirosina cinasa, que directa o indirectamente regulan la fosforilación en proteínas adaptadoras para la cascada de activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 como la Shc,

proteína con un solo dominio SH2 que comparte dominios de homología con la colágena y es fosforilada en residuos de tirosina por el receptor de EGF (Touhara et al., 1995). Lo anterior sugiere intercomunicación entre las vías de activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 por receptores acoplados a proteína G y por receptores del tipo de tirosina cinasa, de los cuales el receptor insulínico de crecimiento parece existir en el hepatoma AS-30D (Fanciulli et al., 1989). Si bien la respuesta α -2 adrenérgica no es capaz de generar un incremento en la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 por $\beta\gamma$, cualquier otro mecanismo que sea capaz de disociar el heterotrímero de cualquier proteína G, también estará disociando subunidades de G_i que podrían estar participando en la actividad de MAPK-p44 y MAPK-p42 junto con receptores de tipo tirosina-cinasa en el hepatoma AS30D.

TABLA D.1

Lista de sustancias naturales capaces de activar a G_i directamente o vía receptor

<i>Sustancia</i>	<i>Vía</i>
Poliaminas	Directa
Espermina, Esprmidina etc.	
Neuropeptidos	
Sustancia P	Directa + Receptor de neuropéptidos
Neuropeptido Y	Directa + Receptor de neuropéptidos
Dinorfina	Receptor de neuropéptidos
Anafilotoxinas	
C3a (y sus análogos)	Receptor de anafilotoxinas
Ácido lífosfatídico	Receptor de LPA
Trombina	Receptor de α -trombina
Carbacol	Receptor 2 muscarínico de acetilcolina
Angiotensina II	Receptor de angiotensina II
Bradicinina	Receptor de bradicinina

Odagaki, Y. et al., 1998.

CONCLUSIONES

- La proteína Gi está involucrada en las vías que llevan a la proliferación del hepatoma AS-30D ya que la ADP ribosilación e inactivación de la subunidad α de Gi por Ptx, afectó el número celular, la síntesis de DNA y la activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 (parámetros relacionados con la proliferación de estas células).
-
- El complejo $\beta\gamma$ puede estar involucrado en la activación de MAPK-p44 y MAPK-p42, debido a que la activación de Gi por análogos no hidrolizables de GTP, como el GTP γ S, aumentó la disociación de $\beta\gamma$ y la activación de MAPK-p44 y MAPK-p42.
- La respuesta α -2 adrenérgica acoplada a Gi no participa en la activación de MAPK-p44 y MAPK-p42 del hepatoma AS-30D, ya que la estimulación de los receptores α -2 adrenérgicos con UK14304 no fue capaz de aumentar la actividad de estas cinasas. Lo anterior sugiere que esta respuesta no está involucrada con la proliferación celular.

REFERENCIAS

- Alblas, J., van Corven, E.J., Hordijk, P.L., Graeme, M., y Moolenaar, W.H. (1993). *J. Biol. Chem.* 268, 22235.
- Berry, M.N. y Friend, D.J. (1969). *J. Cell Biol.* 43, 506.
- Birney, E. (1994). *Trends Biochem. Sci.* 19, 349.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. y McCormick, F. (1991). *Nature* 348, 125.
- Bylund, D.B., Bond, R.A., Clarke, D.E., Eikenburg, D.C., Hieble, J.P., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Molinoff, P.B., Ruffolo, R.R., Strosberg, A.D., y Trendelburg, U.G. (1998). *The IUPHAR Receptor Compendium* Pp 61-73.
- Carty, D.J., Padrell, E., Codina, J., Birnbaumer, L., Hildebrand, J.D. y Iyengar, R. (1990). *J. Biol. Chem.* 265, 6282.
- Casey, P.J., Fong, H.K.W., Simon, M.I. y Gilman, A.G. (1990). *J. Biol. Chem.* 265, 2383.
- Chambard, J.C., Paris, S.G. y Pouyssegur, J. (1987). *Nature* 326, 800.
- Clapham, D.E. y Neer, E.J. (1993). *Nature* 365, 403.
- Cook, S.J., Rubinfeld, B., Albert, I. y McCormick, F. (1993). *EMBO J.* 12, 3475.
- Coso, O., Montaner, S., Fromm, C., Laca C.J., Prywes R., Teramoto, H. y Gutkind, S. (1997). *J. Biol. Chem.* 272, 20691.

COMUNIDAD DE INVESTIGADORES
DE LA BIBLIOTECA

- Coughlin, S.R., Escobedo, J.A. y Williams L.T. (1989). *Science* 243, 1191.
- Crouch, M.F., y Simson, L. (1997). *FASEB*. 11, 189.
- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F. y Gutkind, S. (1994). *Nature* 369, 418.
- Davis, R.J. (1993). *J. Biol. Chem.* 268, 14553.
- Diehl, A.M., Yang, S.Q., Wolfgang, D. y Wand, G. (1992). *J. Clin. Invest.* 89, 1706.
- Fanciulli, M., Paggi, M.G., Mancini, A., Del Carlo, C., Floridi, A., Taylor, S.I. y Perrotti, N. (1989). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 168.
- Faure, M., Voyno-Yasenetskaga, A. y Bourne, H.R. (1994). *J. Biol. Chem.* 269, 7851.
- Françoisian, J. (1993). *Eur. J. Surg. Oncol.* 19, 561.
- Fung, B.K. y Nash, C.R. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 10503.
- García-Sainz, A., Ayala, J.J. y Valles, E.V. (1986). *Toxicon* 25, 1987.
- García-Sainz, J.A. y Huerta-Baena, M.E. (1989). *Am. J. Physiol.* 256, C387.
- García-Sáinz, J.A., Alcantara, R., Hernandez-Sotomayor, S.M. y Mas-Oliva J. (1989). *Life Sci.* 44, 1767.
- Gardner, A.M., Vaillancourt R.R., y Johnson, G.L. (1993). *J. Biol. Chem.* 268, 17896.
- González-Arenas, A. y Torres-Márquez, M.E. (1998). *Memorias del XXII Congreso Nacional de Bioquímica.* Pp 177.

-Granot, Y., Erickson, E., Fridman, H., Van Putten, V., Williams, B., Schirier, R.W. y Maller, J.L. (1993). *J. Biol. Chem.* 268, 9564.

-Guilman, A.G. (1987). *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615.

-Gupta, S.K., Gallego, C., Johnson, G.L. y Heasley, L.E. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 7987.

-Gupta Williams, N., Zhong, H. y Minneman, K.P. (1998). *J. Biol. Chem.* 273, 24624.

-Gutkind, J.S. (1998). *Oncogene.* 17, 1331.

-Hawes, B.E., van Biesen, T., Koch, W.J., Luttrell, L.M. y Lefkowitz, R.J. (1995). *J. Biol. Chem.* 270, 17148.

-Higashiyama, T., Grazano, M.P., Suga, H., Kaino Sho, M.J. y Gilman, A.G. (1991). *J. Biol. Chem.* 266, 3396.

-Hodijk, P.L., Verlaan, I., van Corven, E.J. y Moolenaar, W.H. (1994). *J. Biol. Chem.* 269, 645.

- Huff, R.M. y Neer, E.J. (1986). *J. Biol. Chem.* 261, 1105.

-Johnson, G.L. y Dhanasekaran, N. (1989). *Endocrine Reviews* 10, 317.

-Kahan, C., Seuwen, K., Meloche, S. y Poyssegur, J. (1992). *J. Biol. Chem.* 276, 13369.

-Katada, T. y Ui, M. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 3129.

- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marmé, D. y Rapp, U.R. (1993). *Nature (London)* 364, 249.
- Kumagai, N., Morii, N., Fujisawua, K., Yoshimasa, T., Nakao, K. y Nuriyama, S. (1993). *FEBS Lett.* 329, 273.
- La Morte, V.J., Harootunian, A.T., Spiegel, A.M., Tsien, Y. y Feramisco, J.R. (1993). *J. Cell. Biol.* 121, 91.
- La Morte, V.J., Goldsmith, P.K., Spiegel, A.M., Meinkoth, J.L. y Feramisco, J.R. (1992). *J. Biol. Chem.* 267, 691.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. *Principles of Biochemistry*. 2ª ed. Ed. Worth. Pp 774. EUA. 1993.
- Linder, M.E., Ewald, D.A., Miller, R.J. y Gilman, A.G. (1990). *J. Biol. Chem.* 265, 8243.
- Logothetis, D.E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E.J., y Clapham, D.E. (1987). *Nature* 325, 321.
- López-Gómez, F., Torres-Márquez, M.E., y Moreno-Sánchez, R. (1993). *Int. J. Biochem.* 25, 373.
- Lowry, O., Roserbrough, N., Farr, A. y Ryall, R. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Malarkey, K., Belham, D.M., Paul, A., Graham, A., McLees, A., Scott, P.H. y Plevin, R. (1995). *Biochem. J.* 309, 361.

- Marshal, C.J. (1995). *Cell* 80, 179.

- Marshall J, y Leever J. Mitogen Activated Protein Kinase Activation en Methods in Enzymology, vol.255. Bergmeyer. Academic Press Inc. Pp 273-285. EUA.1995.

- McKenzie, F., R., Seuwen, K. y Poyssegur, J. (1992). *J. Biol. Chem.* 267, 22759.

- McKillop, I.H, WuY., Cahill, P.A. y Sitzmann, J.V. (1998). *J. Cell. Physiol.* 175, 295.

- Milano, C.A., Allen, L.F., Rockman, H.A., Dolber, P.C., McMinn, T.R., Chien, K.R., Johnson, T.D., Bond, R.A. y Lefkowitz, R.J. (1994). *Science* 264, 582.

- Milligan, G., Carr, C., Gould, G.W., Mullaney, I. y Lavan, B.E. (1991). *J. Biol. Chem.* 266, 6447.

- Mohammadi, M., Dionne, C.A., Li, W., Li, N., Spivak T, Honegger, A.M., Jaye, M. y Schlessinger J. (1992). *Nature* 358, 681.

- Moolenaar, W.H. (1991). *Cell Growth Differ.* 2, 359.

- Montecucco, C. y Papini, E. (1995). *Trends Microbiol.* 3, 165.

- Nasser, A. y Minneman, P. (1987). *Mol. Pharmacol.* 32, 655.

- Odagaki, Y., Nishi, N. y Koyama, T. (1998). *Life Sciences* 62, 1537.

- Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J.C., Meloche, S. y Pouyssegur, J. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 8319.

- Pouysségur, J., Chambard, J.C., L'Allemain, G., Magnaldo, I. y Seuwen, K. (1988). *Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* (1988). 320, 427.
- Regan, J.W., Kobilka, T.S., Yang-Feng, T.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. y Kobilka, B.K. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 6301.
- Reuveny, E., Slesinger, P.A., Inglese, J., Morales, J.M., Iñiguez-Lluhi, J.A., Lefkowitz, R.J., Bourne, H.R., Jan, Y.M. y Jan, L.Y. (1994). *Nature* 370, 143.
- Rozengurt, E. (1986). *Science* 234, 161.
- Sanae, J., Miyamoto, K., y Koshiura, R. (1989). *Can. Res.* 49, 6246.
- Schelessinger, J. (1993). *Trends. Biochem. Sci.* 18, 273.
- Smarcka, A.V. y Sternweis, P.C. (1993). *J. Biol. Chem.* 268, 9667.
- Smith, D.F. Walborg, E.F. y Chang, J.P. (1970). *Cancer Res.* 30, 2306.
- Spiegel, A.M., Shenker, A. y Weinstein, L.S. (1992). *Endocrine Reviews.* 13, 536.
- Takuwa, N., Iwamoto, A., Kumada, M., Yamashita, K., y Takuwa, Y. (1991). *J. Biol. Chem.* 266, 1403.
- Tombes, M.R., Auer, L.K., Mikkelsen, R., Valerie, K., Wymanns, P.M., Marshall, C.J., McMahon, M. y Dent, P. (1998). *Biochem. J.* 330, 1451.
- Torres-Márquez, M.E., Mejia, S. y Moreno-Sánchez, R. (1993). *Int. J. Biochem.* 25, 1109.

- Torres-Márquez, M.E. (1997). BEB.16, 138.

- Touhara, K., Inglese, J., Pitcher, J.A., Shaw, G. y Lefkowitz, R.J. (1994). *J. Biol. Chem* 269, 10217.

- Touhara, K., Hawes, BE., van Biesen, T. y Lefkowitz, R.J. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9284.

- Katada, T. y Ui, M. (1986). *Proc. Nac. Acad. Sci.* 79, 3129

- van Biesen, T., Luttrell, L.M., Hawes, B.E. y Lefkowitz, R. (1996). *Endocrine Reviews* 17, 698.

- van Corven, E.J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T. y Moolenaar, W.M. (1989). *Cell* 59, 45.

- van Corven, E.J., Groenik, A., Jalink, K., Eichholtz T y Moolenaar, W.H. (1993). *Cell.* 59, 45.

- Weinshank, R.L., Zgombick, J.M., Macchi, M., Adham, N., Lichtblau, H., Branchek, A.T. y Hartig, P.R. (1990). *Mol. Pharmacol.* 38, 681.

- West Jr., R.E., Moss, J., Vaughan, M., Liu, T., y Liu, T.Y. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 14428.

- Wickman, K.D., Iñiguez-Lluhi, J.A., Davenport, P.A., Taussig, R., Krapivinsky G.B., Linder, M.E., Gilman, A.G. y Clapham, D.E. (1994). *Nature* 368, 255.

- Wilson, G. *BrdU incorporation en Flow Cytometry a Practical Approach.* 2nd. ed. De. Ormerod M.G. IRL Press. Pp 137-149. EUA. 1994.

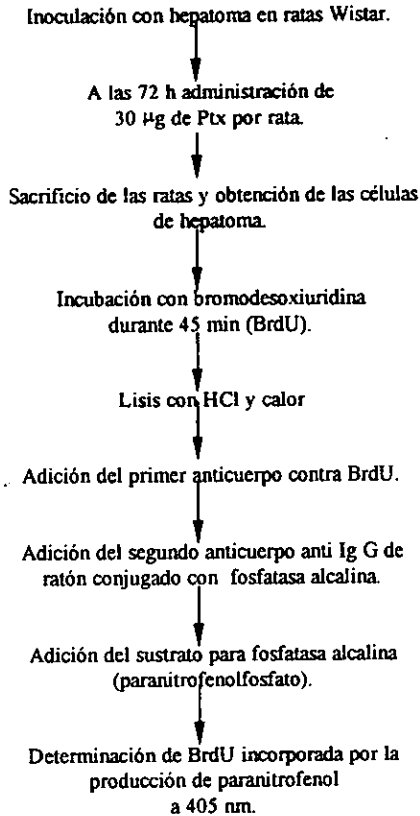
-Wilson, B.A., Zhu, X., Ho, M. y Lu, L. (1997). *J. Biol. Chem.* 272, 1268.

-Winitz, S., Russel, M., Qian, N.X., Gardner, A., Dweyer, L. y Johnson, G.L. (1993).
J. Biol. Chem. 268, 19196.

Apéndice I

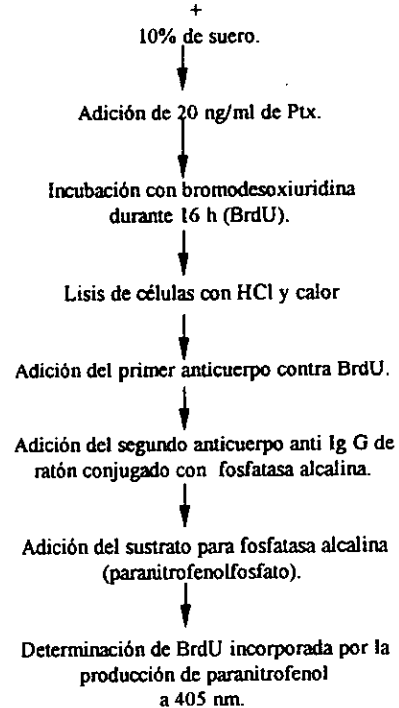
Modificación de la técnica de Wilson 1994.

* *Medición in vivo del efecto de toxina pertussis (TP) sobre la síntesis de DNA:*



* *Medición in vitro del efecto de toxina pertussis (TP) sobre la síntesis de DNA:*

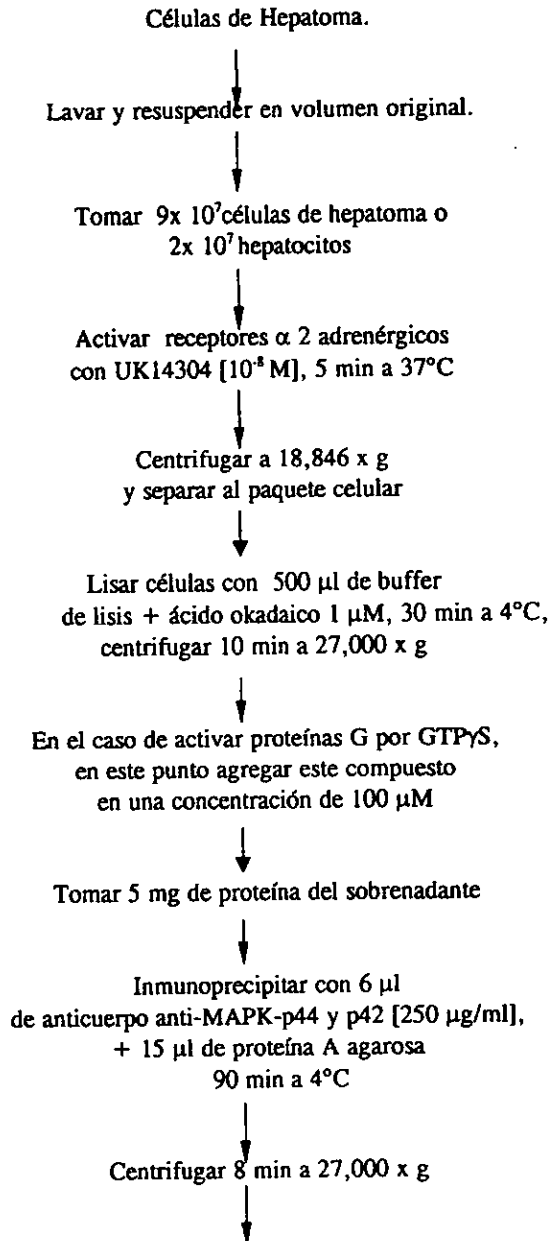
1 y 2 millones de células de hepatoma en DMEM



Apéndice II

* Ensayo en gel para la medición de la actividad de MAPK

Basado en la técnica de Marshall y Leever 1995.



Lavar el pp. 2 veces con
200 μ l de buffer de cinasas
(tener cuidado de no resuspender el pellet)



Añadir al pellet 20 μ l de MBP disuelta
en buffer de cinasas [500 μ g/ml] +
ácido okadaico 1 μ M



Incubar 3 min a 30°C



Añadir 10 μ l de ATP conteniendo la marca
[(γ -³²P) ATP 10 μ Ci/ml
ATP no radiactivo 17 mM]



Incubar 30 min a 30°C



Agregar TCA al 5% durante 15 min



Centrifugar a 27,000 x g por 2 min



A los sedimentos agregar 30 μ l de buffer muestra



Neutralizar con NaOH 1 N



Correr en PAGE-SDS al 15 % a 18 mA



Secar el gel en una placa para autoradiografía



Leer la placa en un phosphorimager
para determinar la actividad de MAPK

Apéndice III

** Ensayo en papel de fosfocelulosa para la medición de la actividad de MAPK:*

Basado en la técnica de Marshall y Leever 1995.

