

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



* 5 3 0 9 5 4 1 8 1 0 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL ONCOGEN *cph*: UNA NUEVA
SECUENCIA TRANSFORMANTE ACTIVADA MEDIANTE
CARCINOGENESIS QUIMICA EN
FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE HAMSTER**

Memoria presentada por el licenciado
Juan Angel Velasco Perales para optar al
grado de Doctor en Biología.

V^oB^o del Director de Tesis

Fdo: Vicente Notario Ruiz

A toda mi familia

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Vicente Notario por permitirme formar parte de su laboratorio en la Universidad de Georgetown (Washington), por su ayuda y apoyo constantes. A lo largo de estos años, su dedicación y atención personal y profesional me han permitido no sólo la realización del presente trabajo sino también haber aprendido directamente de su propia mano todo aquello que no aparece en libros ni protocolos y que ha posibilitado mi formación como biólogo molecular.

Este trabajo ha sido posible también gracias a la contribución de tres extraordinarios científicos, los doctores Matías Avila, José Cansado y Rafael Castro, de cuyo soporte profesional y sobre todo de su amistad he tenido el privilegio de disfrutar.

Quiero asimismo agradecer a los doctores José Gavilanes y Manuel Benito todo el apoyo y consejo recibidos a lo largo del programa de doctorado.

Finalmente quisiera agradecer a Lurdes Prieto su paciencia y su ayuda para resolver todos los problemas administrativos que estos años han traído consigo, y por último a todos aquellos que siempre me han apoyado y alentado.

INDICE

INTRODUCCION	1
1.- Carcinogénesis experimental y transformación celular	3
1.1.- Concepto de carcinogénesis experimental	3
1.2.- Transformación neoplásica de células en cultivo	7
2.- Bases moleculares de la carcinogénesis: Oncogenes y genes supresores de tumores	10
2.1.- Análisis de las bases moleculares del cáncer mediante transfección	10
2.2.- Detección de oncogenes celulares mediante transferencia génica	13
2.3.- Implicación de los genes supresores de tumores en la carcinogénesis	16
3.- Oncogenes y carcinogénesis química	19
4.- Detección de secuencias transformantes en fibroblastos de hamster iniciados con carcinógenos químicos	22
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y METODOS	29
1.- Material biológico y reactivos	30
1.1.- Líneas celulares	30
1.2.- Vectores de clonaje	30
1.3.- Cepas bacterianas derivadas de <i>Escherichia coli</i>	30
1.4.- Compuestos radiactivos	31
1.5.- Medios de cultivo	31
2.- Cultivo de líneas celulares	31
3.- Construcción de una genoteca de transformantes del segundo ciclo	32
3.1.- Extracción del ADN de alto peso molecular	32
3.2.- Digestión parcial y fraccionamiento del ADN	32

3.3.- Preparación de la genoteca y aislamiento de cósmidos recombinantes	33
4.- Transfección de cósmidos recombinantes en fibroblastos de ratón (NIH/3T3)	36
4.1.- Precipitación del ADN con fosfato cálcico	36
4.2.- Aislamiento de focos de células transformadas	36
5.- Rescate de las secuencias transformantes	37
6.- Caracterización de las secuencias transformantes	38
6.1.- Subclonaje de fragmentos de ADN genómico	38
6.2.- Análisis del ADN en geles de agarosa, transferencia e hibridación	40
6.3.- Aislamiento de ARN total y purificación del ARN mensajero	41
6.4.- Análisis del ARN en geles de agarosa-formaldehído, transferencia e hibridación	42
6.5.- Secuenciación y análisis informático del ADN	42
7.- Construcción de genotecas de ADN complementario (ADNc)	44
7.1.- Síntesis de ADN complementario	44
7.2.- Construcción de la genoteca de ADN complementario	46
7.3.- Detección y aislamiento de clones positivos	49
8.- Análisis de la proteína producto del ADNc mediante transcripción y traducción "in vitro".	51
RESULTADOS	52
1.- Aislamiento de secuencias transformantes activadas en la línea celular 81C39	53
2.- Caracterización molecular del clon C-5	58
3.- Actividad biológica del clon C-5: definición de <i>cph</i> como oncogén	64
4.- Conservación evolutiva del locus <i>cph</i>	70
5.- Detección y aislamiento del ADN complementario (ADNc) derivado del locus <i>cph</i>	72
6.- Síntesis "in vitro" de la proteína codificada por el ADNc- <i>cph</i> -19. Búsqueda de dominios funcionales.	78

DISCUSION	83
1.- Estrategia para el aislamiento de nuevas secuencias transformantes: clonaje del oncogén <i>cph</i>	84
2.- Actividad biológica del oncogén <i>cph</i> : cooperatividad entre <i>cph</i> y H- <i>ras</i> en la transformación de fibroblastos NIH/3T3	90
3.- Conservación evolutiva del locus <i>cph</i> : detección de genes homólogos en levaduras y humanos.	94
4.- <i>cph</i> como miembro de la familia de proteínas reguladoras de GTP- asas.	96
CONCLUSIONES	99
BIBLIOGRAFIA	102

ABREVIATURAS

A: adenina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNt: ácido ribonucleico transferente

ATP: trifostato de adenosina

BS: bisulfito sódico

BSA: albúmina de suero bovino

BP: benzo-pireno

C: citosina

CIA: cloroformo-alcohol isoamílico

cm: centímetro

CTP: trifostato de citosina

DBACR: dibenzo-acridina

DMBA: dimetil-benzo-antraceno

DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco

DMN: metil(metoximetil)nitrosamina

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etileno diaminotetraacético

G: guanina

GTP: trifosfato de guanosina

h: hora

HEPES: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico

HOAAF: fluoruro de N-hidroxi-2-acetilamida

HODE: 1'-hidroxi-2'-3'-dihidroestragol

IPTG: isopropil-tio- β -galactósido

kb: kilobase

kDa: kilodalton

l: litro

M: molar
MCA: 3-metilcolantreno
mg: miligramo
mM: milimolar
MNNG: N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina
min: minuto
MOPS: ácido morfolino-propanosulfónico
ng: nanogramo
NIH: "National Institutes of Health"
NMU: nitroso metilurea
rpm: revoluciones por minuto
s: segundo
SDS: dodecil sulfato sódico
T: timina
TCDD: 2,4,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
T₁₀E₁: Tris 10 mM, EDTA 1 mM
tk: timidina quinasa
TNM: tetranitrometano
Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano
TTP: trifosfato de timidina
TPA: ácido 12-O-tetradecanoil forbol-13-acético
U: unidad
VC: vinilcarbarnato
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

Introducción

Desde que en 1981 las técnicas de transferencia génica permitieron el aislamiento del primer oncogén celular humano hasta la actualidad, una intensa actividad investigadora dirigida hacia la búsqueda de las bases moleculares del cáncer ha permitido la identificación de más de un centenar de genes cuya alteración ha sido asociada directa o indirectamente con el desarrollo neoplásico.

Estos genes han sido divididos en dos categorías, dependiendo del tipo de control que ejercen sobre los mecanismos de regulación de la proliferación celular: los **oncogenes**, inductores y mediadores positivos de la respuesta mitogénica, y los **genes supresores de tumores**, efectores negativos de la división celular. Aunque las posibles repercusiones que los recientes progresos sobre la caracterización molecular de estos genes puedan tener en relación con la terapia del cáncer son aún difíciles de evaluar, sí puede afirmarse que han contribuido a un mejor entendimiento de una de las áreas más importantes de la biología celular y molecular: la referente a los mecanismos que gobiernan el crecimiento y la diferenciación celular.

1.- Carcinogénesis experimental y transformación celular.

1.1. Concepto de carcinogénesis experimental.

La carcinogénesis se entiende como el proceso que, partiendo de una célula normal, conduce a la formación de una población de células tumorales, poseedoras de un fenotipo transformado. Se trata de un fenómeno progresivo y multifactorial provocado tanto por alteraciones genéticas (resultado de la interacción del ADN con agentes carcinogénicos), como epigenéticas (aquellas que no provocan daño directo al ADN)(Cohen y Ellwein, 1990). La conversión de una célula normal en una célula maligna implica una desregulación en los sistemas de control del crecimiento y la división celular, proporcionando a la célula transformada una ventaja en su capacidad de proliferación con respecto a las células normales. Este hecho es difícilmente explicable como consecuencia de una única alteración puntual. Por el contrario, parece responder a una acumulación de alteraciones que conducen a la adquisición del fenotipo transformado a través de distintos estadios que se suceden de forma escalonada.

El estudio de los mecanismos responsables de la transformación celular ha sido realizado mediante técnicas de carcinogénesis experimental, en las que la acción de distintos agentes carcinogénicos es evaluada tanto en modelos animales como en sistemas "in vitro". Los primeros han permitido reproducir prácticamente la totalidad de las formas de cáncer humano en especies animales mediante el tratamiento con diversos agentes carcinogénicos, contribuyendo al conocimiento de las bases biológicas de la susceptibilidad al cáncer y de los mecanismos subyacentes a los procesos metastáticos (Yuspa y Poirier, 1988). Sin embargo, el estudio de los procesos biológicos a nivel celular y molecular en sistemas animales está limitado por el largo periodo necesario para el desarrollo tumoral "in vivo", así como por la imposibilidad de obtener muestras de los distintos estadios del desarrollo tumoral en la mayoría de los tumores, que generalmente no representan una población celular única. El desarrollo de sistemas "in vitro" mediante el empleo de células en cultivo constituye un sistema de análisis a más corto plazo y ha sido uno de los métodos más utilizados

para el estudio de los procesos y mecanismos implicados en el desarrollo tumoral. Los sistemas "in vitro" ofrecen la posibilidad de analizar poblaciones celulares homogéneas, realizar estudios cuantitativos y aislar clones con un fenotipo concreto (*Harris y cols., 1992*).

Los procesos de carcinogénesis pueden ser inducidos por agentes de distinta naturaleza. De acuerdo con *Pitot y Dragan (1991)*, los agentes carcinogénicos pueden ser clasificados en cuatro categorías, como se representa en la **Tabla I**.

TABLA I: Clasificación general de los agentes carcinogénicos*

Categoría	Ejemplos
I. QUIMICOS	Hidrocarburos policíclicos, aminas aromáticas
II. FISICOS	Radiación gamma, rayos X
III. BIOLÓGICOS	Virus (papilomavirus, herpesvirus)
IV. GENÉTICOS	Elementos genéticos móviles, regiones con alta frecuencia de recombinación

* Modificado de *Pitot y Dragan, (1991)*

Las categorías III y IV implican la participación de moléculas portadoras del material hereditario como efectores del desarrollo neoplásico. El conocimiento de los carcinógenos biológicos se remonta a principios de siglo, cuando fue descubierta la capacidad de ciertos retrovirus de inducir la formación de tumores en animales (*Rous, 1911*). Como carcinógenos genéticos, de descubrimiento más reciente, se incluyen elementos presentes en la propia célula que sufre el proceso neoplásico: la existencia de elementos móviles en el genoma, secuencias amplificadoras o regiones con alta probabilidad de recombinación han sido frecuentemente asociadas con el desarrollo tumoral (*Thibodeau y cols., 1993; Uchida y cols., 1994*).

La carcinogénesis inducida mediante agentes físicos se produce bien como

consecuencia de la interacción directa de las partículas radiactivas con el ADN genómico (*Haseltine, 1983*) o, de manera indirecta, afectando a algunos de los mecanismos que controlan la división celular y la transducción de señales extracelulares al interior celular (*Uckun y cols., 1993; Hallahan y cols., 1991; Avila y cols., 1993*).

En cuanto a la carcinogénesis inducida químicamente, los primeros trabajos que describen la inducción de transformación neoplásica en cultivo mediante carcinógenos químicos se iniciaron hace treinta años (*Berwald y Sachs, 1965*). Dichos estudios incluyeron tanto agentes que producen alteraciones a nivel genético como aquellos que aparentemente no interaccionan con el ADN. Los primeros, denominados carcinógenos genotóxicos, han sido estudiados con más detalle. La mayoría de ellos son moléculas electrófilas que interaccionan con el ADN de forma directa. Como consecuencia de dicha interacción, el carcinógeno produce mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, e incluso reorganizaciones y cambios en la estructura de algunos cromosomas (*Cohen y Ellwein, 1990*). Como se describe en páginas posteriores de esta introducción, las alteraciones a nivel genético pueden afectar a genes reguladores del crecimiento y la proliferación celular (protooncogenes y genes supresores), cuyas formas alteradas son los determinantes directos del proceso tumoral.

Los mecanismos de carcinogénesis mediados por agentes no genotóxicos (también denominados epigenéticos), son aquellos que no implican una interacción directa con el ADN, sino que afectan al control de la expresión génica mediante alteraciones a nivel transcripcional y/o traduccional (*Weisburger, 1994*). Su identificación se produjo como consecuencia de la observación de que algunos carcinógenos tenían escasa reactividad con el ADN. Tal es el caso de la sacarina, el ácido nitrilotriacético, ácido 12-O- tetradecanoil forbol-13-acético (TPA) o el 2,4,7,8 - tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD). El mecanismo de acción de estos carcinógenos está mediado frecuentemente por receptores específicos, en algunos casos bien identificados. La unión del carcinógeno al receptor provoca alteraciones en el control de la expresión génica. La mayoría de los procesos neoplásicos provocados por este tipo de agentes requiere una exposición continuada al carcinógeno y periodos de incubación más prolongados que aquellos mediados por agentes genotóxicos (*Shaw y Jones, 1994*).

Los distintos modelos de carcinogénesis experimental en células humanas y de roedores han permitido definir una serie de eventos cuya sucesión desemboca en la transformación de una célula normal en neoplásica. En fases tempranas posteriores al tratamiento con un carcinógeno se observan tanto "in vivo" como "in vitro" células que aunque muestran alteraciones fenotípicas no están completamente transformadas. Estas células son consideradas preneoplásicas y requieren cambios adicionales para su conversión maligna completa. Por razones didácticas, estos eventos han sido agrupados en tres fases, denominadas **iniciación**, **promoción** y **progresión** tumoral (Farber, 1984). Aunque en ocasiones los límites entre ellas no están perfectamente definidos y constituyen una simplificación artificial a la hora de abordar la complejidad del proceso neoplásico, existen una serie de características y marcadores que permiten su distinción. Durante la **iniciación**, en la mayoría de las células tratadas se produce una alteración genética irreversible como consecuencia de la exposición al carcinógeno. Sin embargo, esta alteración no es suficiente para inducir el fenotipo maligno. En los modelos experimentales "in vitro" esta etapa se correlaciona con una transformación morfológica, primer marcador fenotípico observable en la carcinogénesis. La **promoción** supone una etapa reversible en la que se produce la expansión de las células "iniciadas" neoplásicamente siendo la inmortalización el marcador más característico de esta fase. La inmortalización se define como la propiedad de algunas células en cultivo de dividirse indefinidamente. Mientras las células primarias (aquellas procedentes de tejidos animales o embriones) crecen en cultivo durante un número limitado de generaciones (entre 50 y 100 divisiones, dependiendo del tipo celular), las células inmortales escapan de los mecanismos naturales de senescencia y se dividen de manera indefinida. Sin embargo, mantienen la inhibición por contacto, cualidad propia de las células primarias. Finalmente, la **progresión** viene definida por un acúmulo irreversible de alteraciones que provocan el paso de la población celular de un estado premaligno al neoplásico. Estas células malignas pierden la inhibición por contacto y son capaces de crecer en medios semisólidos, así como de formar tumores cuando son inyectadas en ratones inmunodeficientes.

En los modelos animales "in vivo" también se han definido otra serie de marcadores que han contribuido a determinar con mayor exactitud la existencia de estas

tres fases del desarrollo tumoral. Concretamente mediante el análisis de hepatocarcinomas inducidos químicamente en ratas, *Pitot y cols. (1991)*, han definido un buen número de marcadores bioquímicos e histológicos característicos de cada una de las fases.

1.2. Transformación neoplásica de células en cultivo.

La validez del estudio de la transformación neoplásica "in vitro" se basa en la observación de que las células en cultivo tratadas con carcinógenos y mantenidas durante un número de divisiones adquieren la propiedad de formar tumores cuando son inyectadas en animales inmunodeficientes. Este hecho significa que han alcanzado el fenotipo neoplásico completo en un modelo experimental relativamente más simple y cuyas variables son más fácilmente controlables que en los sistemas "in vivo".

En los experimentos de carcinogénesis "in vitro" se han utilizado tanto células de roedores como humanas, demostrando que ambos tipos celulares son similares en muchos aspectos, permitiendo la extrapolación de los resultados obtenidos en modelos animales al cáncer humano. Sin embargo las células humanas son intrínsecamente resistentes a la transformación por carcinógenos químicos, debido a su mayor estabilidad genética, presumiblemente relacionada con una mayor eficiencia de sus mecanismos de reparación del ADN. *Milo y DiPaolo (1980)* han descrito un protocolo para la transformación de células humanas que requiere la sincronización del cultivo antes del tratamiento con el carcinógeno, así como la selección de las células transformadas en medios ricos en vitaminas y aminoácidos. A pesar del éxito de conseguir la transformación de células humanas, la complejidad experimental de dicho protocolo ha llevado al desarrollo de otros sistemas alternativos. Entre ellos, la conversión neoplásica de fibroblastos embrionarios de hámster en cultivo ha constituido uno de los modelos más utilizados. Este tipo celular ofrece varias ventajas sobre otras líneas celulares: (1), son células diploides con una gran estabilidad genética; (2), muestran un índice de transformación espontánea muy bajo; (3), senescen al cabo de un número limitado de generaciones y (4), su conversión al estado neoplásico se produce en un corto periodo de tiempo (7 a 10 días).

La acción de un carcinógeno sobre estas células primarias de hámster se determina mediante el ensayo de transformación representado esquemáticamente en la **Figura 1**. Las células procedentes del embrión de hámster, de naturaleza fundamentalmente fibroblástica, son sembradas en cultivo. Transcurridas 24 horas, las células son sometidas a un tratamiento único con el carcinógeno y mantenidas posteriormente en cultivo durante varios días. En estas condiciones se produce la formación de colonias de células transformadas caracterizadas por un crecimiento apilado y entrecruzado, opuesto al de las células normales, dispuestas ordenadamente e inhibidas por contacto. El número de colonias transformadas es dependiente de la naturaleza y la dosis del carcinógeno así como del número de células susceptibles a la transformación. El análisis estadístico de los resultados indica que en este sistema el proceso neoplásico se produce como consecuencia de la inducción de la transformación provocada por el carcinógeno y no por la selección de células en estadios preneoplásicos previos al tratamiento. Los estudios de dosis-respuesta indican también que el proceso de transformación está iniciado por un único evento (la exposición al carcinógeno) aunque ello no signifique que una sucesión de alteraciones posteriores no esté también implicada en el proceso de transformación. Este sistema ha permitido no sólo evaluar la capacidad de determinados agentes carcinógenos para provocar la transformación celular, sino también profundizar en los mecanismos moleculares responsables de dicha transformación.

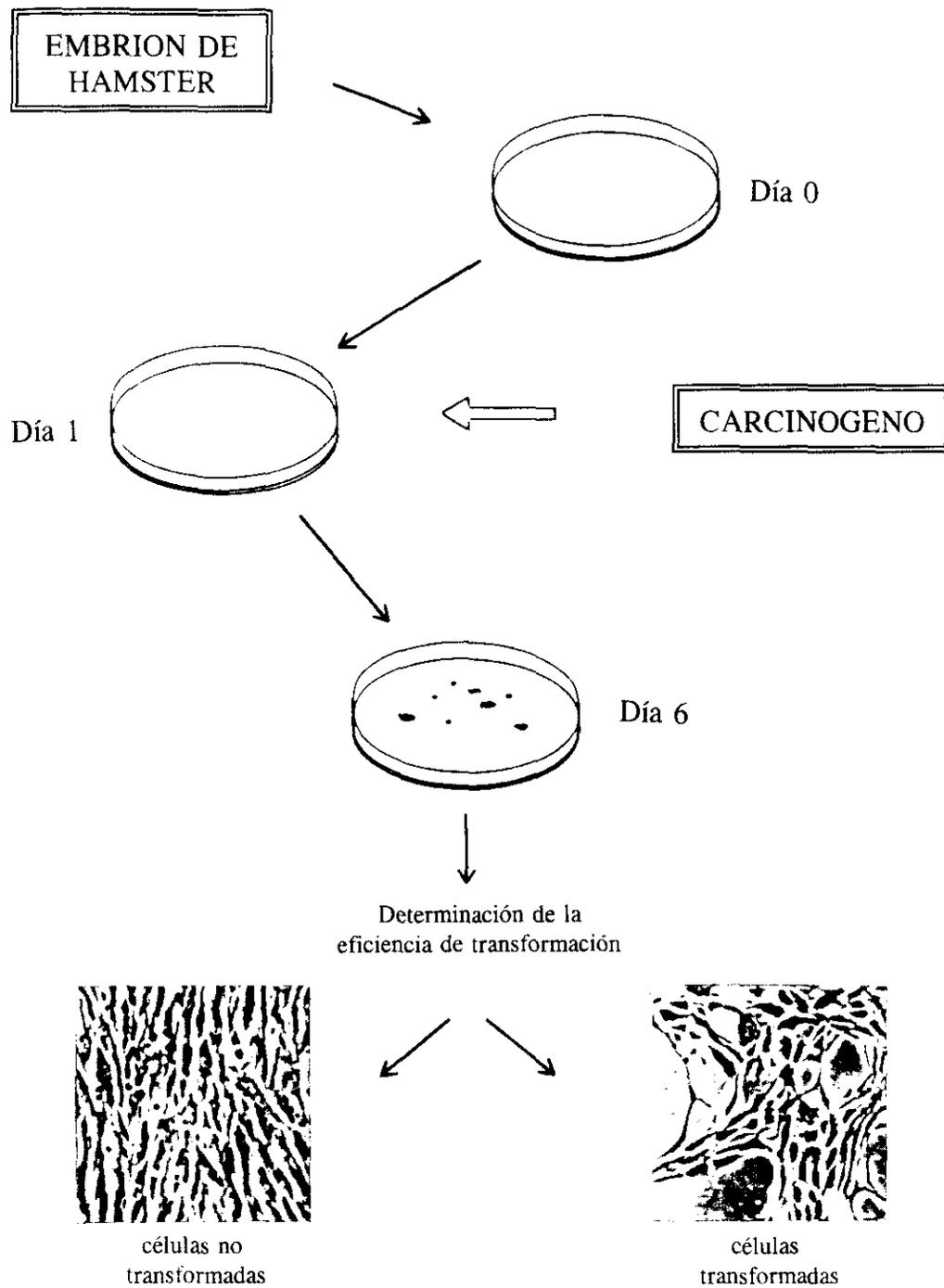


Figura 1: Representación esquemática del ensayo de transformación de células embrionarias de hámster. Después del tratamiento con el carcinógeno, las células son mantenidas en cultivo durante siete a diez días, transcurridos los cuáles la aparición de colonias de células transformadas se determina mediante la observación al microscopio óptico.

2.- Bases moleculares de la carcinogénesis: Oncogenes y genes supresores de tumores.

2.1. Análisis de las bases moleculares del cáncer mediante transfección.

El conocimiento de los mecanismos implicados en los procesos de carcinogénesis se ha ampliado enormemente gracias al desarrollo de las técnicas de biología molecular así como al descubrimiento de los métodos de transferencia génica o transfección. La aplicación de ambas técnicas al campo de la carcinogénesis experimental ha permitido determinar que las alteraciones de los distintos carcinógenos sobre el ADN afectan a dos tipos de genes reguladores del crecimiento: por un lado los **protooncogenes**, efectores positivos de la división celular cuyas formas alteradas u **oncogenes** son responsables de la transformación celular; por otro lado, los **genes supresores de tumores**, reguladores del control de la proliferación mediante señales negativas del crecimiento y cuya pérdida de función conduce igualmente al crecimiento celular desordenado. Antes del descubrimiento de estos dos grupos de genes reguladores existían tan sólo evidencias indirectas de que el ADN era el blanco de los procesos de transformación, basadas en la capacidad de algunos carcinógenos de actuar como mutágenos o provocar reorganizaciones cromosómicas.

La primera demostración directa de que la transformación mediante carcinógenos químicos implica la activación de oncogenes se produjo al comprobarse que la transfección de ADN procedente de varias líneas tumorales iniciadas químicamente podía inducir la conversión neoplásica de fibroblastos en cultivo, provocando la aparición de "focos" de células transformadas, resultado de la adquisición del oncogén activado en el proceso de transferencia génica (*Shih y cols., 1979*). Si estos focos eran expandidos en nuevos cultivos y el ADN extraído a partir de ellos se utilizaba nuevamente en ensayos de transfección sobre fibroblastos normales, se producía la aparición de nuevos focos de células transformadas, indicando que la secuencia responsable del fenotipo neoplásico se transfería a lo largo de los ciclos de transfección consecutivos (**Figura 2**).

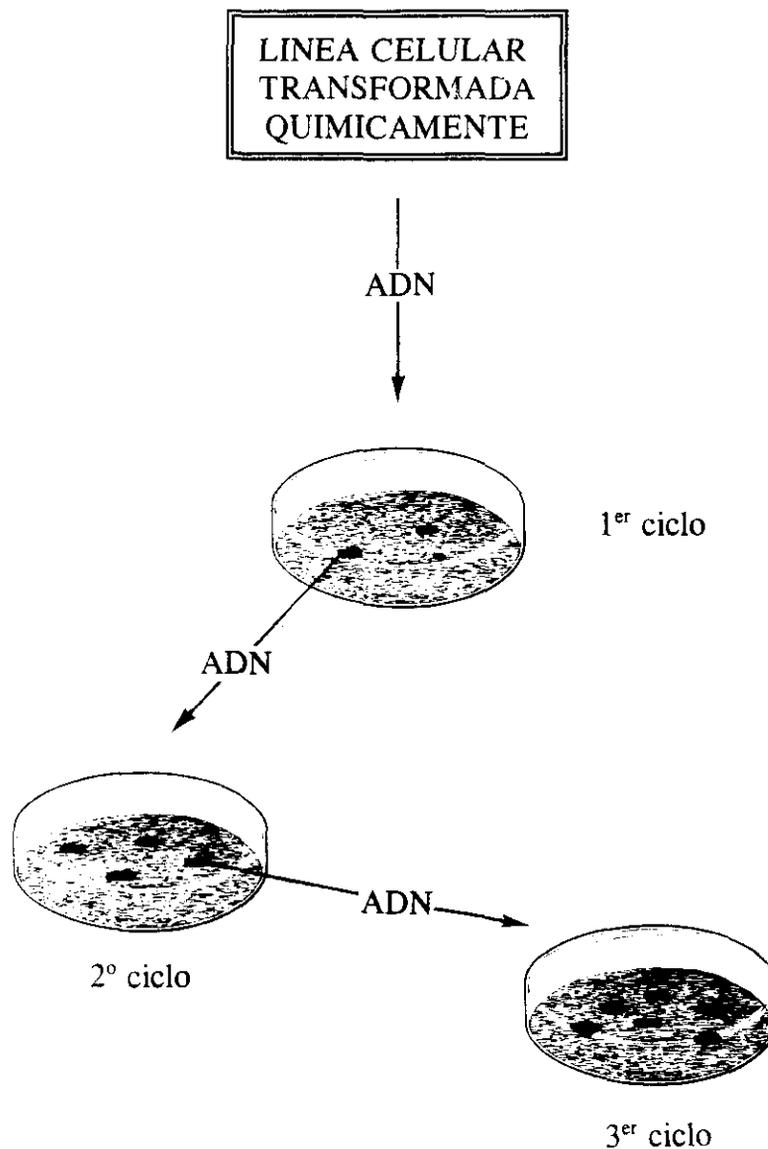


Figura 2: Transmisión del fenotipo neoplásico mediante transfección. El ADN procedente de la línea celular iniciada químicamente es precipitado con fosfato cálcico y añadido a un cultivo de fibroblastos NIH/3T3. La adquisición de secuencias transformantes produce la aparición de "focos", cuyo ADN puede ser utilizado para transformar nuevos cultivos en ciclos de transfección sucesivos.

La posibilidad de transferir fragmentos de ADN a células eucarióticas superiores fue descrita inicialmente por *Wigler y cols.*, (1977), mediante la utilización de fragmentos purificados del genoma del herpesvirus, portadores del gen de la timidina quinasa (*tk*). Cuando estos fragmentos eran precipitados con fosfato cálcico y añadidos a un cultivo celular de fibroblastos de ratón carentes de dicho enzima, incapaces por tanto de sintetizar trifosfato de timidina (TTP), el gen viral se internalizaba en algunas células, integrándose eficientemente y comenzando su replicación con el resto del genoma. Este gen era igualmente reconocido por la maquinaria transcripcional y traduccional de las células receptoras, de modo que éstas podían crecer en medios carentes de TTP. El ADN integrado podía transmitirse durante generaciones o incluso de manera indefinida siempre que el cultivo se mantuviera en condiciones de selección (*Pellicer y cols.*, 1980).

Experimentos similares fueron realizados utilizando ADN de diversos orígenes y transfiriéndolos a distintos tipos celulares, comprobándose que teóricamente cualquier gen podía ser transferido y expresado satisfactoriamente en cultivo (*Wigler y cols.*, 1980). Estas técnicas fueron aplicadas al ámbito de la investigación del cáncer, considerando que si la adquisición del fenotipo neoplásico estaba producida por la activación de determinados oncogenes dentro del genoma, la transfección de éste a una línea celular normal debería conducir a la aparición de células neoplásicas, receptoras del oncogén activado. Este hecho fue confirmado en aproximadamente un 30% de las líneas celulares transformadas o tumores cuyo ADN fue ensayado en experimentos de transfección, demostrando la existencia de oncogenes celulares activados capaces de inducir la transformación.

La identificación del primer oncogén humano mediante técnicas de transferencia génica se produjo a principios de la década de los ochenta, cuando los grupos de *Weinberg*, *Wigler* y *Barbacid*, partiendo de dos líneas celulares de carcinoma de vejiga (denominadas EJ y T24) aislaron la secuencia transformante responsable de la adquisición del fenotipo transformado a lo largo de sucesivos ciclos de transfección de fibroblastos en cultivo (*Shih y Weinberg*, 1982; *Goldfard y cols.*, 1982; *Pulciani y cols.*, 1982). La caracterización de dicha secuencia puso de manifiesto que se trataba del gen homólogo al oncogén *ras* del virus del sarcoma de Harvey (*Parada y cols.*,

1982; Santos y cols., 1982), un retrovirus que infecta células de roedores y que había sido caracterizado pocos años atrás. Posteriormente, a partir de una línea de carcinoma de pulmón se detectó otra secuencia transformante, muy similar a la ya descrita y también homóloga a otro oncogén de origen viral, el retrovirus del sarcoma de Kirsten (Der y cols., 1982). Las investigaciones de virus oncogénicos y la detección de los primeros oncogenes mediante transfección convergían en el concepto de que genes celulares, alterados en tumores primarios o líneas transformadas, eran los responsables del fenotipo transformado asociado a la transformación neoplásica y que dicho fenotipo podía ser transferido de unas células a otras mediante transfección.

Ese mismo año fue definido el mecanismo que confería la capacidad transformante al oncogen *ras*. Comparando la secuencia de los genes procedentes de la línea celular original y el de las células normales, se comprobó que la única diferencia entre ambas secuencias era una mutación puntual, concretamente G-T. Dicha mutación producía la sustitución del aminoácido Gly por Val en la posición 12 de la secuencia de la proteína codificada por *ras*, confiriendo su potencial oncogénico (Tabin y cols., 1982; Santos y cols., 1982; Reddy y cols., 1982). Mutaciones similares fueron detectadas en el aminoácido 61, conduciendo nuevamente a formas oncogénicas de la proteína. La importancia de tales mutaciones puntuales en el proceso neoplásico se demostró experimentalmente al comprobarse que la inducción de mutaciones puntuales podía reproducirse empleando técnicas de carcinogénesis experimental, mediante el tratamiento de ratas con N-metil-N-nitrosourea (Sukumar y cols., 1983).

2.2. Detección de oncogenes celulares mediante transferencia génica.

Aunque en numerosas ocasiones la transformación celular mediante transfección, partiendo del ADN de tumores de diversos orígenes, está producida por la activación de genes pertenecientes a la familia *ras*, un número significativo de genes transformantes no relacionados con los genes *ras* han sido aislados utilizando las mismas técnicas. En la **Tabla II** aparece una relación de algunos de ellos, indicando la fuente de donde fueron aislados y la naturaleza de la proteína que codifican.

TABLA II: Clasificación de oncogenes aislados mediante ensayos de transfección, en función de su mecanismo de activación*

Gen	Origen	Proteína	Referencia
<u>- Oncogenes activados por mutaciones puntuales:</u>			
<i>H-ras</i>	carcinoma de vejiga	GTP-asa	Parada y cols, 1982
<i>K-ras</i>	carcinoma de pulmón	GTP-asa	Der y cols, 1982
<i>N-ras</i>	neuroblastoma	GTP-asa	Shimizu y cols, 1983
<i>neu</i>	neuroblastoma y glioblastoma	receptor tirosina quinasa	Bargmann y cols, 1986
<u>- Activación por reorganización génica:</u>			
<i>met</i>	células transformadas químicamente	receptor tirosina quinasa	Cooper y cols, 1984
<i>trk</i>	carcinoma de colon	receptor tirosina quinasa	Martín-Zanca y col, 1986
<i>ret</i>	linfoma	no definida	Takahashi y cols, 1985
<i>ros</i>	línea celular de cáncer de mama	proteína tirosina quinasa	Birchmeier y cols, 1986
<i>raf</i>	cáncer de estómago	serina-treonina quinasa	Shimizu y cols, 1985
<i>raf-B</i>	sarcoma Ewing	serina-treonina quinasa	Ikawa y cols, 1988
<i>dbl</i>	linfoma	unión a GTP	Eva y Aaronson, 1985
<i>vav</i>	carcinoma de esófago	unión a GTP	Coppola y cols, 1991
<i>ect2</i>	queratinocitos de ratón	unión a GTP	Miki y cols, 1993
<i>hst</i>	carcinoma de estómago	factor de crecimiento	Taira y cols, 1987
<i>fgf-5</i>	carcinoma de vejiga	factor de crecimiento	Zhan y cols, 1988
<i>mas</i>	carcinoma epidermoide	proteína transmembranar	Young y cols, 1986
<i>lbc</i>	células derivadas de leucemia	regulador de proteínas GTP	Toksoz y Williams, 1994
<i>cot</i>	carcinoma de tiroides	serina quinasa	Miyoshi y cols, 1991
<u>- Capacidad transformante por sobreexpresión:</u>			
<i>eps15</i>	queratinocitos de ratón	sustrato tirosina quinasa	Fazioli y cols, 1993
<i>est</i>	sarcoma Ewing	serina quinasa	Chan y cols, 1993a
<u>- Procesamiento alternativo del ARN:</u>			
<i>axl</i>	leucemia	receptor tirosina quinasa	O'Bryan y cols, 1991
<u>- Mecanismo de activación no determinado:</u>			
<i>UFO</i>	leucemia mielocítica	tirosina quinasa	Janssen y cols, 1991
<i>TIM</i>	células de mama inmortalizadas	unión a GTP	Chan y cols, 1994

*Esta tabla pretende recopilar la mayoría de oncogenes detectados mediante transfección

La práctica totalidad de estos oncogenes ha sido aislada mediante la utilización de los fibroblastos de ratón denominados NIH/3T3 como receptores del ADN transformante. Esta línea celular ofrece dos ventajas fundamentales que justifican su utilización frecuente: (1) se trata de una línea celular inmortalizada, lo que la convierte en extremadamente sensible a la transformación, de acuerdo con el modelo multiescalonado de desarrollo neoplásico previamente expuesto, y (2) son células que muestran una elevada eficiencia en la internalización e integración de ADN exógeno (Cooper, 1990).

La existencia de ADNs con capacidad transformante se ha detectado en diversos tipos de tumores primarios así como en líneas celulares transformadas. De especial interés en el campo de la carcinogénesis experimental son los descubrimientos de los oncogenes *met* y *neu* (Cooper y cols., 1984; Bargmann y cols., 1986) aislados a partir de líneas celulares transformadas mediante carcinógenos químicos (*met*) y tumores inducidos químicamente (*neu*).

La caracterización molecular de los oncogenes detectados por ensayos de transfección ha indicado que existen tres mecanismos fundamentales de activación, responsables del potencial oncogénico de estas secuencias: mutaciones puntuales, reorganizaciones y sobreexpresión génica. La existencia de mutaciones puntuales, demostradas para los oncogenes *ras*, ha sido también determinada en el caso de *neu*, un oncogén aislado a partir de neuroblastomas y glioblastomas inducidos químicamente en ratas; *neu*, que codifica un receptor con actividad tirosina quinasa, adopta una conformación activada constitutivamente mediante la sustitución de un único aminoácido en el dominio transmembranar (Bargmann y cols., 1986). Por otra parte, la inducción de mutaciones puntuales mediante experimentos de mutagénesis dirigida ha puesto de manifiesto la capacidad transformante de algunos genes ya descritos, como es el caso de MAPK-K, mediador de las señales mitogénicas, demostrando que la activación constitutiva de esta proteína es suficiente para transformar NIH/3T3 en experimentos de transfección (Cowley y cols., 1994).

Las reorganizaciones son la causa más frecuente de activación oncogénica entre los genes detectados por transfección. Estas reorganizaciones pueden conducir a deleciones en uno de los dos extremos de un gen, provocando la aparición de proteínas

con el extremo amino o carboxiterminal truncado (*vav*, *db1*) (Coppola y cols., 1991; Eva y cols., 1988). La reorganización puede provocar que dos genes independientes queden alineados produciendo una proteína de fusión como consecuencia de la transcripción de un "locus artificial". Estas reorganizaciones pueden tener lugar en el tumor o línea celular transformada (*trk*, *met*) (Martin-Zanca y cols., 1986; Park y cols., 1986), o por el contrario ocurrir durante el proceso de transfección (*ret*, *vav*) (Takahashi y cols., 1985; Coppola y cols., 1991). La adquisición de la capacidad transformante por sobreexpresión es también el resultado de procesos de reorganización o recombinación, no en la región codificadora del gen sino en sus elementos reguladores; este es el caso del oncogén *mas*, activado como consecuencia de un incremento en la transcripción génica provocado por un proceso de reorganización en la región 5' no codificante del gen (Young y cols., 1986). La activación oncogénica por sobreexpresión ha sido analizada recientemente mediante transfección de genotecas de expresión, en lugar de ADN genómico. En estos casos, en que los ADN complementarios (ADNc) son expresados bajo el control de un fuerte promotor, se ha comprobado que genes como *eps15* y *est* pueden transformar células NIH/3T3 si su transcripción está por encima de los niveles basales (Fazioli y cols., 1993; Chan y cols., 1993a). Experimentos similares han puesto de manifiesto que genes como $G\alpha12$, que codifica para un transductor de señales extracelulares, puede actuar como oncogén cuando es sobreexpresado (Chan y cols., 1993b).

2.3. Implicación de los genes supresores de tumores en la carcinogénesis.

Mientras que los oncogenes actúan como genes dominantes y son, por tanto, capaces de provocar la transformación cuando son transferidos de una célula a otra, los genes supresores de tumores se comportan como genes recesivos y no pueden ser detectados mediante el mismo tipo de análisis. Sin embargo, la implicación de los genes supresores en una proporción elevada de tumores humanos los ha convertido en uno de los grupos de genes más estudiados en los últimos años.

La participación de los genes supresores en el desarrollo neoplásico explica en parte el hecho de que el ADN procedente de muchos tumores no sea capaz de

transformar células NIH/3T3 en experimentos de transfección. La presencia en las células NIH/3T3 de formas normales de estos genes inhibidores de la proliferación puede enmascarar la alteración de ese mismo locus u otros relacionados en el ADN donador.

La detección de los genes supresores de tumores se produjo como consecuencia del análisis de híbridos formados por la fusión de células normales con células tumorales. Esta fusión producía en muchos casos la reversión de estas últimas, de manera que el híbrido no mostraba fenotipo neoplásico. Este hecho indicaba que la célula normal aportaba uno o varios genes que actuaban negativamente inhibiendo la proliferación celular descontrolada. La confirmación de la función de estos genes se produjo al observar que los "híbridos normales" revertían a menudo al fenotipo maligno, y que este fenómeno iba asociado a la pérdida de cromosomas concretos (*Stanbridge, 1990*).

El estudio de la transmisión hereditaria de ciertos tumores también ha contribuido al conocimiento de los genes supresores de tumores. En concreto, el estudio del retinoblastoma, un tumor ocular que se desarrolla en niños aproximadamente a los cinco años de edad condujo a la identificación de un gen localizado en el cromosoma 13. La propensión a contraer retinoblastoma se transmitía de padres a hijos de forma hereditaria, de acuerdo con la transmisión mendeliana de un solo locus. Mediante análisis cariotípicos se comprobó que dicha transmisión iba asociada a una delección en el cromosoma 13, concretamente la región 13q14, donde posteriormente se ha localizado el gen del retinoblastoma (*Rb*) (*Weinberg, 1991*).

Otro de los genes supresores de tumores mejor caracterizados es el denominado *p53*. Descubierta por su capacidad de unirse a la proteína T del virus SV40, fue catalogado inicialmente como oncogén debido a su propiedad de cooperar con *ras* en la transformación de fibroblastos primarios (*Hollingsworth y Lee, 1991*). Posteriormente se comprobó que dichos experimentos habían sido realizados con formas mutadas de *p53* que le aportaban capacidad oncogénica. De hecho, *p53* es el único gen bifuncional para el que se ha definido tanto una actividad oncogénica dominante causada por mutaciones puntuales, como una actividad efectora negativa del crecimiento (*Levine y cols., 1991*). Identificado recientemente como un factor de

transcripción con capacidad de unirse al ADN (*Kern y cols., 1991*), *p53* se constituye como el gen más comunmente mutado en el cáncer humano.

El estudio de los genes supresores de tumores también ha sido abordado mediante la utilización de técnicas de transferencia génica. En este caso, el objetivo no es provocar la transformación de células normales, sino revertir el fenotipo transformado de las células neoplásicas. Este tipo de experimentos ha permitido a *Schafer y cols. (1991)* identificar el gen supresor *NTS-1*, partiendo de fibroblastos transformados con el oncogén *H-ras*. Cultivos celulares de estos fibroblastos se transfectaron con ADN total de placenta normal humana, acompañado de un plásmido para la selección de recombinantes con higromicina. La población de células transfectadas, seleccionadas en dicho antibiótico fue tratada con ouabaina, una droga que destruye las células en división activa (*Schafer y cols., 1988*), obteniendo colonias que aún expresando *ras*, no se multiplicaban de manera activa y por lo tanto sobrevivían a la acción de la droga. Este fenómeno pudo ser reproducido en un segundo ciclo, partiendo de ADN de estas colonias, lo que permitió obtener nuevas poblaciones de células no transformadas a pesar de poseer el oncogén *H-ras* constitutivamente activado. Estos resultados indicaban que la adquisición de determinados genes procedentes del ADN humano transfectado confería a algunas células un fenotipo normal. Experimentos similares, partiendo de células transformadas con *K-ras* y mediante la transferencia de genotecas de ADNc realizadas a partir de células normales han llevado a la caracterización de *K-rev-1*, un gen supresor capaz de bloquear también la actividad transformante de *ras* (*Kitayama y cols., 1989*).

3.- Oncogenes y carcinogénesis química.

La mayoría de los sistemas animales de carcinogénesis química resultan en la detección de oncogenes activados pertenecientes a la familia *ras*. Así por ejemplo, la inducción de carcinomas en la glándula mamaria de ratas mediante tratamiento con nitroso-metilurea produce la activación de H-*ras* en casi un 90% de los casos analizados (*Sukumar y cols., 1983*). En otros estudios en hepatomas de rata inducidos mediante nitroso-dietilamina, la activación de H- y K-*ras* se produce en más de un 50% de las muestras. En algunos casos, como los publicados por *Ochiai y cols., (1985)* sobre hepatocarcinomas iniciados mediante distintos carcinógenos, la incidencia de H-*ras* ha sido demostrada en la totalidad de las muestras analizadas. La **Tabla III** recoge los resultados de los análisis de distintos tumores reproducidos en ratas y ratones mediante el tratamiento con distintos carcinógenos químicos, indicando el porcentaje de casos en los que se han descrito alteraciones de los distintos miembros de esta familia de oncogenes.

Sin embargo, la activación de *ras* no es suficiente para la transformación celular, sino que han de producirse alteraciones adicionales, bien genéticas (alteración de otros oncogenes o genes supresores de tumores) o epigenéticas, en las distintas fases de iniciación, promoción y progresión. La definición de la función de *ras* en cada una de estas etapas del desarrollo neoplásico es controvertida: existen teorías que defienden que *ras* actuaría como iniciador, mientras que otras predicen que su activación se produciría como consecuencia de la inducción neoplásica. Así, algunos experimentos sugieren que *ras* se altera en aquellas células que ya han desarrollado determinadas propiedades preneoplásicas (*Lu y Archer, 1992*), mientras que otros resultados indican que esta familia de oncogenes participaría en la iniciación del desarrollo tumoral (*Harris, 1991*). Esta última posibilidad está apoyada por las características mutagénicas de muchos carcinógenos, en consonancia con los mecanismos de activación de los oncogenes *ras* a través de mutaciones puntuales.

Tabla III: Incidencia de la activación de oncogenes *ras* en tumores animales inducidos mediante tratamiento con distintos carcinógenos

Especie	Carcinógeno	Tumor	Oncogén	Incidencia
Rata	NMU	carcinoma de mama	H-ras-1	80%
	DMBA	carcinoma de mama	H-ras-1	23%
	DMN	carcinoma de riñón	K-ras-2	40%
	TNM	carcinoma de pulmón	K-ras-2	74%
Ratón	DMBA	carcinoma de piel	H-ras-1	90%
	DBACR	carcinoma de piel	H-ras-1	80%
	DMBA	carcinoma de mama	H-ras-1	100%
	NMU	linfoma	N-K-ras-2	85%
	MCA	linfoma tímico	K-ras-2	83%
	MCA	fibrosarcoma	K-ras-2	50%
	HOAAF	carcinoma hepático	H-ras-1	100%
	VC	carcinoma hepático	H-ras-1	100%
	HODE	carcinoma hepático	H-ras-1	100%
	Furfural	carcinoma hepático	H-ras-1	85%
TNM	carcinoma de pulmón	K-ras-2	100%	

Abreviaturas: NMU, nitroso-metilurea; DMBA, dimetil-benzo-antraceno; DMN, metil(metoximetil)nitrosamina; TNM, tetranitrometano; DBACR, dibenzo-acridina; MCA, 3-metilcolantreno; HOAAF, fluoruro de N-hidroxi-2-acetilamina; VC, vinilcarbamat; HODE, 1'-hidroxi-2'-3'-dihidroestragol. Datos modificados de *Barbacid (1987)*.

A pesar esta alta incidencia de alteraciones de *ras* en los modelos animales de rata y ratón, un alto porcentaje de tumores humanos no han sido asociados a ningún oncogén conocido. De hecho, la función de la mayoría de los oncogenes en el desarrollo del cáncer humano es desconocida y tan sólo algunos genes transformantes como *raf*, *myc* y *erbB2*, además del propio *ras*, han sido asociados directamente al cáncer humano (*Brooks y cols., 1987; Kasid y cols., 1987; Slamon y cols., 1987*). En consecuencia, la determinación de las alteraciones genéticas responsables de la transformación neoplásica requiere la creación de modelos experimentales en los que la función de otros oncogenes no relacionados con *ras* pueda ser analizada.

Entre ellos, la transformación de células primarias de hámster mediante distintos

carcinógenos ha sido uno de los modelos más utilizados debido, como hemos comentado en el apartado 1.2., a la estabilidad genética de este tipo celular y a la posibilidad de correlacionar los resultados "in vitro" con los procesos "in vivo". Dicho modelo ha permitido en nuestro laboratorio analizar tanto la función de oncogenes (Notario y cols., 1990), como de genes supresores de tumores (Albor y cols., 1994) en distintos estadios del desarrollo neoplásico.

En este sistema, que se expone con detalle en el capítulo siguiente de esta introducción, se ha encontrado que las alteraciones de *ras* ocurren de manera infrecuente. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en otros laboratorios, utilizando el mismo tipo celular, tanto con carcinógenos químicos (Gilmer y cols., 1988) como físicos (Borek y cols., 1987).

4.- Detección de secuencias transformantes en fibroblastos de hámster iniciados con carcinógenos químicos.

Mediante la utilización de técnicas de transferencia génica similares a las descritas en páginas anteriores de esta introducción se ha detectado la presencia de secuencias transformantes activadas en el genoma de líneas celulares de hámster iniciadas neoplásicamente mediante el tratamiento con distintos carcinógenos químicos (*Notario y cols., 1990*).

Este estudio incluyó 22 líneas celulares neoplásicas generadas partiendo de fibroblastos primarios de hámster, denominados 84-3, mediante una única dosis de los siguientes carcinógenos: bisulfito sódico (BS), N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), benzo(a)-pireno (BP), 3-metilcolantreno (MCA), 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno (DMBA), propanosulfona (PS) o N-acetoxi-fluorenil-acetamida (3AF). Todas ellas provocaron la aparición de colonias en medio semisólido y/o tumores en ratones inmunodeprimidos.

La presencia de secuencias transformantes dominantes en el genoma se confirmó en 12 de las 22 líneas celulares, mediante extracción del ADN y transfección en fibroblastos NIH/3T3. Estas doce líneas positivas en la primera transfección fueron subsecuentemente analizadas mediante un segundo ciclo de transfección, partiendo del ADN de los focos obtenidos en el primer ciclo. Todas ellas resultaron positivas en la segunda transfección con una eficiencia de transformación superior a la obtenida partiendo del ADN original, producto del enriquecimiento en ADN transformante de las preparaciones en los sucesivos ciclos. En la **Tabla IV** aparece representada la actividad transformante del ADN de estas 12 líneas celulares, indicando el carcinógeno con que fueron iniciadas.

Una vez comprobada la activación de secuencias transformantes en estas líneas celulares (denominadas transfectantes) se evaluó la posibilidad de que éstas fueran miembros de la familia *ras*, teniendo en cuenta la elevada frecuencia con que alteraciones en estos oncogenes han sido descritas en otros modelos de carcinogénesis experimental. Para ello se llevaron a cabo dos tipos de análisis en los transfectantes del

segundo ciclo. Por una parte se determinó la movilidad electroforética de la proteína p21^{ras}, inmunoprecipitada con anticuerpos monoclonales a partir de extractos marcados, análisis que de acuerdo con *Srivastava y cols.*, (1985) permite distinguir la estructura nativa de p21^{ras}, respecto a la de las formas mutadas. Por otra parte se procedió a la hibridación del ADN genómico de las líneas celulares transformadas con sondas específicas de los distintos miembros de la familia *ras*. Mediante ambos análisis se determinó la existencia de *ras* activado tan sólo en tres de las doce líneas analizadas, todas ellas iniciadas con bisulfito sódico.

TABLA IV: Actividad transformante de los ADNs procedentes de las doce líneas celulares iniciadas con distintos carcinógenos químicos

	Primer ciclo		Segundo ciclo	
	Eficiencia (focos/ μ g ADN)	Tiempo (semanas)	Eficiencia (focos/ μ g ADN)	Tiempo (semanas)
BS-B2A2	0.012	3.5-4.0	0.13	3.5-4.0
BS-B2D1	0.362	2.5-3.0	1.88	2.5-3.0
BS-BSE1	0.713	2.0-2.5	8.73	1.5-2.0
BS-B2H1	0.087	3.5-4.0	0.34	3.0-3.5
BP-0BP	0.051	3.0-3.5	0.61	3.0-3.5
BP-7997	0.072	3.0-3.5	0.84	3.0-3.5
MC-81C10	0.037	3.0-3.5	0.47	3.0-3.5
MC-81C33	0.102	3.0-3.5	0.94	3.0-3.5
MC-81C39	0.450	3.0-3.5	3.87	2.5-3.0
MC-81C47	0.427	3.0-3.5	2.98	2.5-3.0
MC-81C52	0.025	3.5-4.0	0.39	3.5-4.0
AF-84-10	0.462	2.5-3.5	4.56	2.5-3.0

El nombre de las distintas líneas celulares (columna de la izquierda) va precedido por las iniciales del carcinógeno utilizado para su obtención: BS, bisulfito sódico; BP, benzo-pireno; MCA, 3-metilcolantreno; AF, N-acetoxi-fluorenil-acetamida. La eficiencia de transformación se define como el número de focos de células transformadas por μ g de ADN total. El tiempo se contabilizó desde el momento de la transfección hasta el día en que los focos fueron visibles macroscópicamente. Tomada de *Notario y cols.*, (1990).

Estos resultados significaban la activación de secuencias transformantes no relacionadas con *ras* en un 75% de los casos analizados, demostrando que la activación de este oncogén es un fenómeno poco frecuente en la transformación de fibroblastos embrionarios de hámster mediante carcinógenos químicos, convirtiendo este método experimental en un sistema válido para el estudio de otros oncogenes en el proceso de transformación celular.

La línea celular 81C39 (iniciada neoplásicamente con 3-metilcolantreno) fue elegida para el aislamiento y caracterización la secuencia transformante responsable de su fenotipo neoplásico. Esta línea celular fue seleccionada respecto a las demás basándose en sus características fenotípicas y en la alta eficiencia de transformación en los ciclos de transfección consecutivos. Para ello, partiendo de ADN de los transfectantes de segundo y tercer ciclo, generados de acuerdo con el modelo experimental representado en la **Figura 3**, se realizó un extensivo análisis de hibridación con más de medio centenar de sondas correspondientes a oncogenes descritos hasta el momento. En todos los casos se detectaron los patrones de hibridación característicos del proto-oncogén correspondiente presente en las células NIH/3T3. Estos resultados apoyaban sólidamente la posibilidad de que las secuencias transformantes activadas en la línea celular 81C39 y transferidas a los fibroblastos NIH/3T3, constituyeran un nuevo oncogén no descrito previamente.

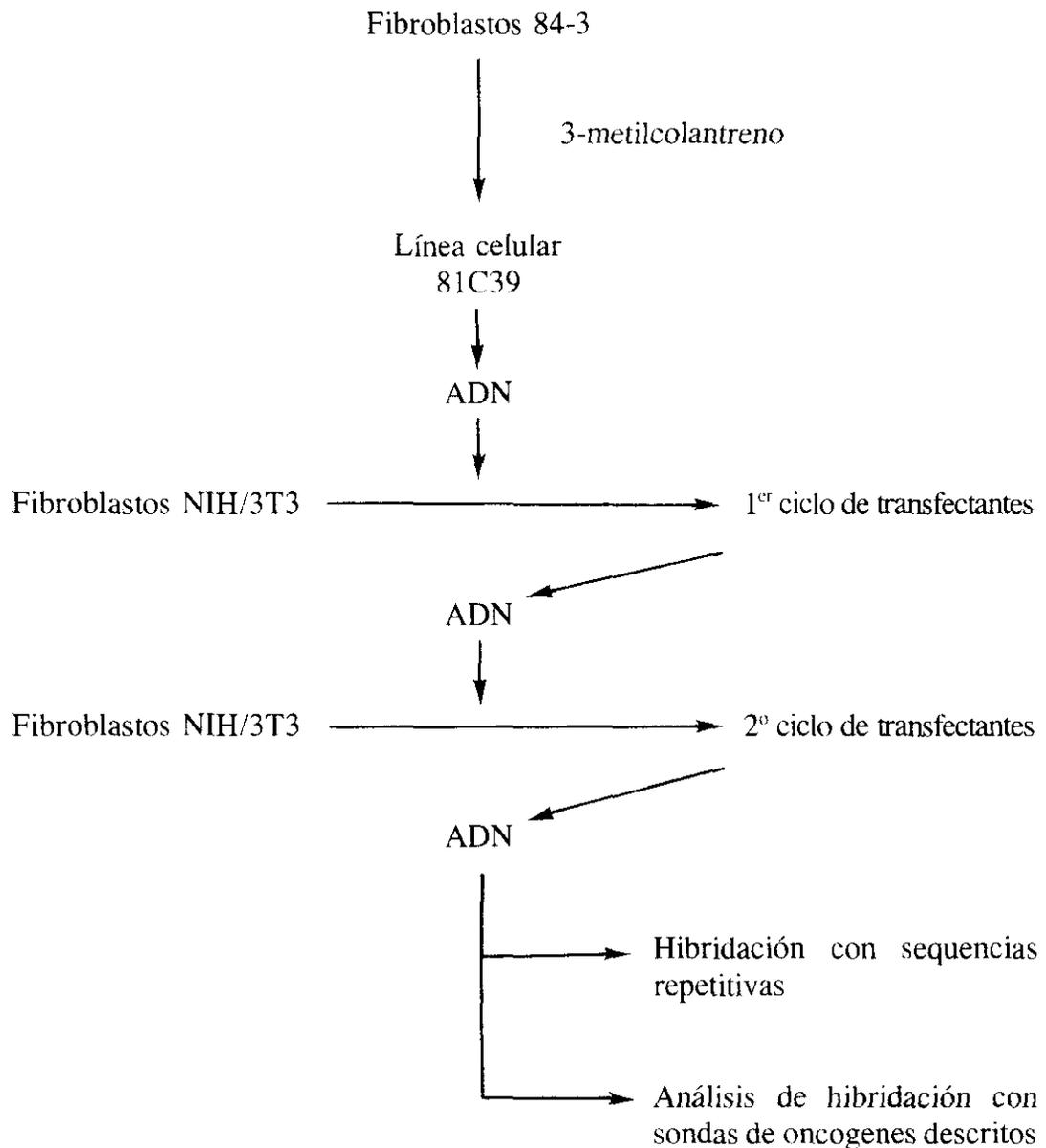


Figura 3: Esquema del proceso de detección de la secuencia transformante activada en el genoma de la línea celular 81C39, mediante tratamiento de fibroblastos de hámster 84-3 con 3-metilcolantreno. La presencia de secuencias activadas fue detectada mediante ciclos de transfección sucesivos en fibroblastos inmortalizados NIH/3T3. La presencia de ADN de hámster en las distintas líneas celulares transformadas (transfectantes) fue determinada mediante hibridación del ADN con sondas correspondientes a secuencias repetitivas específicas de hámster. Análisis de hibridación posteriores utilizando sondas correspondientes a oncogenes descritos sugerían la posibilidad de que un nuevo tipo de secuencia transformante era la responsable de la transformación neoplásica.

Objetivos

El planteamiento del presente trabajo parte de la hipótesis de que un tipo de secuencia transformante no caracterizada con anterioridad es la responsable del fenotipo tumoral de la línea celular 81C39. Como se describió en la introducción, esta línea celular fue iniciada neoplásicamente mediante un único tratamiento a fibroblastos embrionarios de hámster (84-3) con 3-metilcolantreno (Notario y cols., 1990), y se seleccionó para este proyecto por presentar una alta eficiencia de transformación, entre otras ventajas experimentales.

La presencia de un oncogén activado fue detectada mediante dos ciclos de transfección en fibroblastos NIH/3T3, partiendo del ADN de alto peso molecular de las células 81C39. En consecuencia, distintas líneas celulares (transfectantes), fueron generadas a partir de los focos de células transformadas en los ciclos de transfección sucesivos, activadas por la adquisición de ADN de hámster.

Utilizando este sistema experimental nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1.- Aislar la secuencia transformante, activada en las células 81C39 y responsable de la transformación de los fibroblastos NIH/3T3. Para ello se construyó una genoteca en cósmido partiendo del ADN total de un transfectante del segundo ciclo, procediendo después de acuerdo con el siguiente diseño experimental:
 - Transfección del ADN total de la genoteca en células NIH/3T3 para la obtención de focos de células transformadas, inducidos por la integración de cósmidos portadores de ADN de hámster.
 - Rescate de los cósmidos capaces de provocar la aparición de focos de células transformadas en los fibroblastos de ratón.
 - Análisis de los cósmidos rescatados, determinación de su capacidad transformante y de la presencia de ADN de hámster en sus insertos.
- 2.- Caracterizar molecular y biológicamente la nueva secuencia transformante. Este objetivo consistió en determinar si las secuencias rescatadas contenían un gen no descrito hasta la actualidad, confirmando la hipótesis inicial. Para ello se procedió como sigue:
 - Identificación de una unidad transcripcional en los fragmentos genómicos de hámster obtenidos mediante el rescate de cósmidos recombinantes.

- Selección de subfragmentos genómicos capaces de reconocer mensajeros específicos al ser utilizados como sondas en análisis de "Northern", partiendo de ARNm de las líneas celulares de hámster 84-3 y 81C39.
 - Clonaje de los subfragmentos para su secuenciación. Comparación de la secuencia obtenida con las bases de datos de secuencia GeneBank y EMBL para determinar la existencia de genes homólogos ya descritos.
- 3.- Aislamiento del ADNc derivado del locus genómico, partiendo del ARNm de la línea celular 81C39. Para ello se procedió a la construcción de una genoteca de ADNc, en la que se determinó la existencia de clones positivos utilizando fragmentos genómicos como sondas en ensayos de hibridación. Estos clones fueron analizados mediante:
- Secuenciación del ADNc y determinación de la naturaleza de la proteína deducida de la secuencia del ADNc.
 - Comprobación de la existencia de la proteína deducida a partir del ADNc mediante experimentos de transcripción y traducción "in vitro".

Durante el desarrollo de los experimentos y a medida que se fue teniendo un mejor conocimiento del fragmento genómico poseedor de la nueva secuencia transformante, se realizaron diversos experimentos para caracterizar con más detalle la actividad y la relevancia biológica del nuevo oncogén. Entre ellos, la determinación del grado de conservación evolutiva así como su comportamiento en ensayos de transfección con el oncogén *H-ras* han sido incluidos en el presente trabajo.

Materiales y métodos

1.- Material biológico y reactivos.

1.1. Líneas celulares.

- Fibroblastos 84-3: Células primarias de hámster procedentes de embriones completos en el día 9 del desarrollo.
- Línea celular 81C39: originada mediante el tratamiento de fibroblastos 84-3 con 3-metilcolantreno.
- Línea celular NIH/3T3: obtenida del Dr. Stuart A. Aaronson, del laboratorio de Biología Celular y Molecular del NCI ("National Cancer Institute", USA).

1.2. Vectores de clonaje.

- pCV108: cósmido para la construcción de genotecas (*Lau y Kan, 1983*)
- λ -ZAP: vector derivado del bacteriófago lambda, utilizado para la construcción de genotecas de ADNc (Stratagene, USA).
- pBluescript SK+ (Stratagene) y pUC18 (Pharmacia, USA), utilizados para el subclonaje y secuenciación de fragmentos genómicos.

1.3. Cepas bacterianas derivadas de *Escherichia coli*.

- VNC-1 para la infección de cósmidos recombinantes; esta cepa bacteriana fue derivada de la cepa 490A por el Dr. Notario mediante mutagénesis química y seleccionada por su elevada eficiencia para la replicación de cósmidos recombinates.
- C-600, HB-101, SURE (Promega), XL-1 blue (Stratagene), para la propagación de plásmidos.
- SOLR (Stratagene), para la escisión del plásmido contenido en la secuencia del bacteriófago λ -ZAP.

1.4. Compuestos radiactivos.

- [³⁵S]dATP (1000 Ci/mmol) obtenido de New England Nuclear
- [³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) " " " "
- [³²P]dATP (3000 Ci/mmol) " " " "
- [³⁵S]Metionina (1000 Ci/mmol) " " Amersham.

1.5. Medios de cultivo.

- Medio Eagle modificado según Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino (FBS) y antibióticos se obtuvieron de Gibco-BRL.
- Medios LB y NZY para el cultivo bacteriano se obtuvieron de Gibco-BRL.

Todos los demás reactivos empleados fueron de un grado de pureza adecuado a las técnicas de biología molecular y se adquirieron de las siguientes compañías: Sigma, Fluka, Boehringer Mannheim, Fisher y Baxter.

2.- Cultivo de líneas celulares.

Los fibroblastos embrionarios de hámster 84-3 y la línea celular transformada 81C39 fueron cultivados en medio DMEM suplementado con 1 mg/ml de piruvato sódico, glutamina (5 mM), 10% suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, a 37°C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. Los cultivos fueron expandidos en placas de 15 cm de diámetro, a fin de reducir el número de pases celulares de una placa a otra, crítico para las células 84-3, y fueron lisadas al 80% de confluencia con las soluciones adecuadas para la extracción de ácidos nucleicos. Los fibroblastos NIH/3T3 se cultivaron en medio DMEM, suplementado igualmente con suero y antibióticos en la misma concentración. El contenido de glucosa en el medio se redujo de 4,5 a 1,0 mg/l en los periodos de selección después de la transfección, a fin de favorecer el crecimiento de las células transformadas.

3.- Construcción de una genoteca de transformantes del segundo ciclo.

3.1. Extracción del ADN de alto peso molecular.

El tamaño molecular del ADN es una de las principales consideraciones para la preparación de una genoteca cuando se utilizan cósmidos como vectores de propagación. El ADN de partida ha de tener un tamaño medio muy superior a 50 kb, a fin de que después de ser digerido parcialmente con el enzima de restricción apropiado, los fragmentos obtenidos oscilen entre 40 y 50 kb.

Partiendo de cultivos de células NIH/3T3 transformantes del segundo ciclo, aproximadamente al 90% de confluencia, se procedió a la extracción del ADN mediante lisis con SDS y posterior purificación con disolventes orgánicos, siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- Resuspender las células (recogidas por centrifugación) en 10 ml de la solución de lisis (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,5%, pH 7,5).
- Añadir pronasa hasta una concentración final de 200 μ g/ml e incubar durante 16 h a 37°C.
- Extraer el ADN con un volumen de fenol (equilibrado con una solución de Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5), mediante agitación suave y centrifugación.
- Extraer el ADN de la fase superior con una solución de fenol (50%) y cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 (50%) (CIA).
- Repetir la extracción con 1 volumen de CIA, y recoger la fase superior.
- Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C y agitar cuidadosamente a fin de precipitar el ADN que es finalmente recuperado y secado en el liofilizador.
- Resuspender el ADN en T₁₀E₁ (Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM).

3.2. Digestión parcial y fraccionamiento del ADN.

La integridad y el tamaño medio del ADN de alto peso molecular obtenido fue comprobada mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. A continuación, distintas alícuotas de la preparación de ADN fueron digeridas con un número variable de unidades de la endonucleasa de restricción BamH I, por periodos de tiempo variables. Los productos de la digestión fueron igualmente analizados mediante electroforesis, hasta conseguir las condiciones óptimas para la obtención de un tamaño

medio de 40 a 50 kb. Las alícuotas de ADN se cortaron como sigue:

- 20 μ g de ADN de alto peso molecular
- NaCl 150 mM, MgCl₂ 6 mM, Tris 6 mM pH 7,5
- BSA 100 μ g/ml
- DTT 1 mM
- 1 unidad de la endonucleasa de restricción BamH I

La reacción se incubó durante 20 min a 37°C, en un volumen final de 60 μ l. Finalizada la reacción de restricción, el ADN fue extraído con fenol, fenol-CIA y CIA, y precipitado con etanol a -20°C.

A fin de purificar la fracción de ADN de un tamaño comprendido entre 40 y 50 kb, el ADN digerido parcialmente se sometió a centrifugación en un gradiente de sacarosa (sacarosa 10%-40% en NaCl 1 M, EDTA 1 mM, Tris 20 mM, pH 8,0, en tubos de ultracentrífuga SW28). Sobre los tubos conteniendo el gradiente se depositaron 250 μ g de la preparación de ADN parcialmente fraccionado, y se sometió a ultracentrifugación a 27.000 rpm durante 22 h. Durante este tiempo el ADN se distribuye en el gradiente de sacarosa de acuerdo con su tamaño molecular, quedando las moléculas más grandes en el fondo del tubo y las de menor tamaño más próximas a la superficie.

Un total de 36 fracciones de 1 ml fueron recogidas insertando una aguja en la parte inferior del tubo sin distorsionar el gradiente. Dichas fracciones fueron posteriormente diluídas con T₁₀E₁ hasta conseguir una concentración de sacarosa inferior al 10%. A continuación, el ADN se precipitó con etanol y se resuspendió nuevamente en T₁₀E₁. El tamaño medio de las distintas fracciones fue finalmente analizado mediante electroforesis.

3.3. Preparación de la genoteca y aislamiento de cósmidos recombinantes.

El vector utilizado para la construcción de la genoteca fue el cósmido pCV108 (*Lau y Kan, 1983*). Este vector posee la secuencia de reconocimiento *cos* que permite el empaquetamiento del ADN en partículas virales, las cuales pueden ser fácilmente transducidas en bacterias.

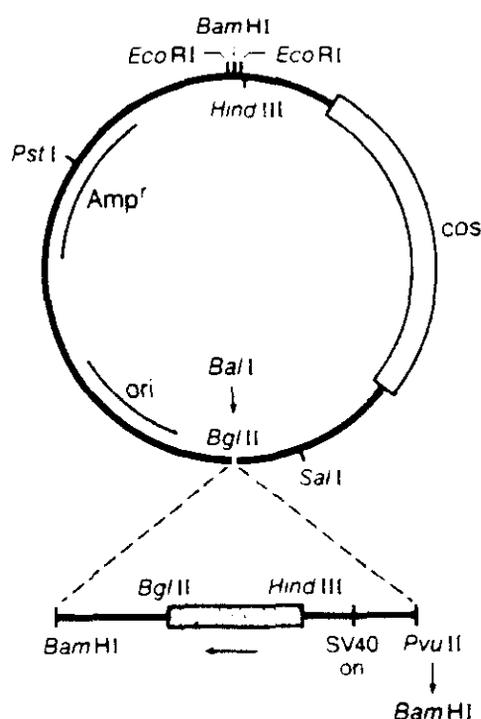


Figura 4: Mapa del vector pCV108

El vector pCV108 posee el gen que confiere resistencia a ampicilina (β -lactamasa), permitiendo su selección en bacterias Amp⁻, e incluye además el gen APH3'-II en el sitio de restricción Bgl II, cuya expresión esta regulada por el promotor del virus SV40. Este gen codifica el enzima aminoglicosil 3-fosfotransferasa (Neo), que permite la selección de las células de mamífero transfectadas con pCV108 en presencia de neomicina (G-418), además de proporcionar resistencia a kanamicina cuando la construcción es propagada en *E. coli*.

La ligación de la fracción de ADN seleccionada del gradiente y el vector se realizó en el sitio único de clonaje BamH I de pCV108. Para ello, 10 μ g del cósmido fueron linearizados con 20 unidades del enzima BamHI. A continuación se procedió a la defosforilación del vector (a fin de evitar la ligación del cósmido consigo mismo), incubando la reacción a 65°C durante 1 h con 150 unidades del enzima BAP (fosfatasa alcalina bacteriana). Después de linearizado y defosforilado, el vector fue purificado mediante extracción con fenol y CIA.

La ligación se llevó a cabo combinando 100 ng de la fracción de ADN con 300 ng de pCV108, utilizando 2 unidades del enzima T₄ ligasa en las condiciones de reacción adecuadas (Tris 50 mM pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, 50 µg/ml BSA, ATP 1 mM), en un volumen final de 20 µl. En estas condiciones se favorece la formación de concatémeros, alternando las secuencias vector-inserto-vector, quedando por lo tanto las secuencias de reconocimiento *cos* separadas alrededor de 40-50 kb, distancia apropiada para el empaquetamiento "in vitro" en bacteriófagos λ. Este se realizó utilizando el sistema comercial GigapackII-XL (Stratagene). El sistema consta de un primer extracto (I) que contiene las proteínas que constituyen la cabeza del fago, y un segundo extracto (II) que proporciona el resto de componentes necesarios para la formación del bacteriófago completo. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Combinar el extracto I con 2 µl de la reacción de ligación
- Añadir 15 µl del extracto II
- Incubar a temperatura ambiente durante 2 h.
- Añadir 0,5 ml del tampón SM (Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, MgSO₄ 10 mM, gelatina 0,01%) y 20 µl de cloroformo

La mezcla de reacción se centrifugó brevemente para recoger el sobrenadante portador de las partículas virales para su titulación. Esta se realizó infectando 200 µl de un cultivo estacionario de *E. coli* VNC-1 con alícuotas de 1,5 y 15 µl de la solución de fagos durante 15 min a 37°C y sembrando la reacción en placas de agar con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml). El ADN introducido en las bacterias comienza su replicación en forma de cósmido confiriendo resistencia a ambos antibióticos. Una vez que la solución de bacteriófagos fue titulada, se calculó el volumen de ésta necesario para la obtención de 2,5x10⁶ recombinantes, procediendo de nuevo a infectar la misma estirpe bacteriana. Los cósmidos fueron extraídos de las bacterias mediante la utilización de columnas comerciales de purificación de ADN (Qiagen), partiendo de cultivos líquidos de 250 ml.

4.- Transfección de cósmidos recombinantes en fibroblastos de ratón (NIH/3T3).

4.1. Precipitación del ADN con fosfato cálcico.

El ADN cósmídico total procedente de la genoteca completa preparada a partir de los transfectantes del segundo ciclo fue introducido en células NIH/3T3 mediante la técnica de precipitación con fosfato cálcico (*Wigler y cols., 1977*). La transfección se realizó en placas de cultivo con $2,5 \times 10^5$ células, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- Combinar 1/2 volumen de tampón 2xHBS [HEPES 50 mM (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etano sulfónico), NaCl 0,25 M, Na_2HPO_4 0,3 mM, pH 7,1] con 9/20 volumen de la preparación de ADN (desde 2 hasta 20 μg).
- Añadir gota a gota 1/20 volumen de 2 M CaCl_2 , manteniendo la solución de ADN en agitación constante. Mantener a temperatura ambiente durante 30 min.
- Añadir la preparación ADN-2xHBS- CaCl_2 a las placas de cultivo, de manera que la proporción de ésta con el medio de cultivo sea 1:7. Incubar a 37°C durante 18 h.
- Aspirar el medio, lavar las células con PBS y añadir medio fresco. Transcurrida una hora, las células son tripsinizadas y sembradas en nuevas placas.

4.2. Aislamiento de focos de células transformadas.

Después de la transfección las placas fueron mantenidas en el incubador a 37°C . El medio de cultivo fue reemplazado periódicamente cada tres días. En estas condiciones las células NIH/3T3 se dividen hasta formar una monocapa, momento en que la división se inhibe por contacto. Sin embargo, las células receptoras de secuencias transformantes prosiguen su división formando focos de células transformadas, que continúan su multiplicación apilándose unas sobre otras.

A fin de originar líneas celulares a partir de los focos de células transformadas, éstos son tripsinizados individualmente con la ayuda de unos pequeños cilindros huecos

estériles, fijados a la placa de cultivo mediante vaselina. Las células despegadas son transvasadas a nuevas placas de cultivo para su propagación.

Alternativamente puede determinarse el número de focos de células transformadas en cada placa de transfección mediante tinción con colorante Giemsa durante 20 min, después de fijar las células con metanol absoluto durante 20 min.

5.- Rescate de las secuencias transformantes.

El rescate de las secuencias transformantes de los focos obtenidos después de la transfección se realizó mediante el empaquetamiento del ADN en partículas virales λ . En este caso, el ADN de alto peso molecular extraído de las líneas celulares generadas a partir de los focos fue utilizado directamente como sustrato en reacciones de empaquetamiento "in vitro". La introducción de ADN en las partículas virales requiere la existencia de las secuencias de reconocimiento *cos*, de manera que los fragmentos de ADN de un tamaño apropiado flanqueados por estas secuencias son encapsidados utilizando un protocolo similar al descrito en el apartado 3.3 de esta sección. El ADN extraído de los fibroblastos NIH/3T3, carente de dichas secuencias, fue utilizado como control negativo. Alícuotas de 1 μ g de ADN procedentes de doce líneas celulares fueron empaquetadas en partículas virales. Estas preparaciones de ADN poseen las secuencias *cos*, procedentes del vector pCV108 de modo que el rescate puede efectuarse siempre y cuando la integración en el genoma de los fibroblastos NIH/3T3 se haya producido manteniendo dos sitios *cos* separados por una distancia de aproximadamente 40-50 kb. El extracto empaquetado fue mantenido en tampón SM (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgSO₄ 8 mM, gelatina 0,01%) a 4°C hasta que distintas alícuotas de esta solución se utilizaron para transducir células bacterianas VNC-1. Una vez que el ADN es inyectado en el hospedador, éste se replica en forma de plásmido, proporcionando resistencia a antibióticos y permitiendo la formación de colonias en placas de agar suplementadas con ampicilina (100 μ g/ml) y kanamicina (25 μ g/ml). Una muestra representativa de dichas colonias fue inoculada en cultivos líquidos para la extracción de ADN cosmídico y su posterior análisis.

6.- Caracterización de las secuencias transformantes.

6.1. Subclonaje de fragmentos de ADN genómico.

El subclonaje de fragmentos de ADN procedente de los cósmidos se realizó mediante ligación de éstos en los plásmidos pBluescript y pUC18, generando construcciones apropiadas para la secuenciación y la obtención de sondas para posteriores análisis de hibridación. Para ello, los cósmidos fueron digeridos con distintas enzimas de restricción hasta obtener fragmentos de un tamaño óptimo (entre 2 y 5 kb) para su introducción en plásmidos. Una vez definida el enzima de restricción apropiada, 50 μ g del cósmido fueron digeridos con 200 unidades de dicho enzima. El ADN cósmido cortado fue sometido a electroforesis en geles preparativos y después de ésta, las bandas de agarosa conteniendo los fragmentos de ADN de interés fueron cortadas del gel.

La extracción de los fragmentos de ADN de la agarosa se realizó disolviendo ésta en una solución de NaI 6 M a 50°C. A continuación el ADN se extrajo de la agarosa fundida mediante la adición de una solución compuesta de partículas de sílice (GeneClean II, Bio101), matriz a la que el ADN se une con gran afinidad. Tras una breve incubación de 5 a 10 min el complejo sílice-ADN es centrifugado durante 5 segundos. Después de dos lavados en una solución de Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, etanol 50%, el ADN fue separado de la matriz de sílice en presencia de $T_{10}E_1$ a 55°C durante 3 min. Finalmente, las partículas de sílice fueron precipitadas mediante centrifugación y el ADN fue recogido en el sobrenadante.

Los fragmentos purificados fueron ligados al vector plasmídico, previamente digerido con el mismo enzima de restricción y defosforilado. En las ligaciones se utilizaron 300 ng de ADN total, con una relación molar vector:inserto de 1:3 y 1 unidad de ligasa T4 en el tampón adecuado (Tris 50 mM pH7,6, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 10 mM, BSA 500 μ g/ml). Todas las reacciones de ligación se incubaron durante al menos 16 h a 8°C.

La obtención de plásmidos recombinantes portadores de insertos se realizó

mediante transformación de bacterias *E. coli* con alícuotas de la reacción de ligación y posterior extracción del plásmido a partir de cultivos bacterianos.

El protocolo para la transformación de *E. coli* fue el siguiente:

- Para cada reacción de transformación, preparar 5 ml de cultivo de *E. coli* C600 en LB, a una densidad óptica de 0,3 unidades a 560 nm.
- Centrifugar y resuspender las bacterias en 1/3 del volumen final de tampón de transformación (RbCl 100 mM, MnCl₂ 45 mM, acetato potásico 35 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 5 mM, LiCl 0,5 mM, sacarosa 15%, pH 5,8); mantener en hielo durante 5 min.
- Centrifugar y resuspender en 200 μ l de tampón de transformación. Mantener en hielo durante 15 min.
- Añadir 7 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO), mezclar y mantener en hielo durante 15 min, agitando cada 5 min.
- Añadir el ADN (1-50 ng), procedente de la reacción de ligación, y mantener en hielo durante 25 min, agitando cada 5 min.
- Incubar durante 100 segundos a -50°C (baño de hielo seco e isopropanol). Descongelar a temperatura ambiente y mantener la reacción en hielo durante 5 min.
- Incubar durante 90 segundos a 42°C y transvasar las muestra a un baño de hielo.
- Añadir 800 μ l de LB y mantener a 37°C durante 1 h.

Distintas alícuotas de la reacción de transformación (100 y 200 μ l) fueron sembradas en placas de agar con ampicilina (100 μ g/ml) y mantenidas a 37°C durante 16 a 20 h. En estas condiciones, las bacterias receptoras de plásmidos, Amp^r, forman colonias sobre la capa de agar. Mediante la adición a las placas de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido, 50 mg/ml de dimetil-formamida) e IPTG (isopropil-tio- β -galactósido, 250 mM), pueden diferenciarse las colonias portadoras de plásmidos recombinantes, de color blanco, de las bacterias receptoras de plásmidos sin inserto que forman colonias de color azul. Este fenómeno se debe a la capacidad de las células en las colonias bacterianas azules de degradar el X-gal mediante el enzima β -galactosidasa. El gen que codifica para este enzima está intacto en las moléculas de plásmido no recombinantes, mientras que la inserción del fragmento de ADN provoca la ruptura del gen en los plásmidos recombinantes en la mayoría de los casos.

La existencia de insertos en los plásmidos de las colonias blancas fue reconfirmada mediante la extracción de ADN plasmídico. Para ello, cultivos bacterianos de 2 ml procedentes de colonias individuales fueron lisados en una solución

NaOH 200 mM, SDS 1% y precipitados con 0,7 volúmenes de isopropanol. Después de centrifugar, el precipitado de ADN es resuspendido en $T_{10}E_1$.

Con el fin de obtener cantidades suficientes de plásmido para la purificación de sondas y la secuenciación de los insertos se prepararon cultivos de 250 ó 500 ml, partiendo de inóculos de los cultivos iniciales. El ADN fue extraído con el mismo procedimiento descrito para la purificación de cósmidos. Alícuotas de estos nuevos cultivos portadores del plásmido de interés fueron preservadas mediante la adición de 2 volúmenes de glicerol al 80% y mantenidas a -80°C .

6.2. Análisis del ADN en geles de agarosa, transferencia e hibridación.

Las muestras de ADN (plásmidos, cósmidos y ADN genómico) fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa. Las condiciones de la electroforesis (porcentaje de agarosa, voltaje, etc.) dependieron de la muestra a analizar. Todas se llevaron a cabo en tampón TAE (Tris 40mM, acetato sódico 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.7), conteniendo $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio a fin de visualizar las muestras de ADN y permitir la obtención de fotografías. Finalizada la electroforesis, el ADN en los geles de agarosa fue desnaturalizado mediante inmersión de éstos en una solución de HCl 0,25 M durante 30 min, seguido de un tratamiento en NaOH 0,5M NaCl 1M durante 30 min más. Finalmente el gel es equilibrado durante 1 h en una solución de Tris 1M pH 7,5 y NaCl 0,6 M procediéndose después a la transferencia del ADN a filtros de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo por capilaridad en un tampón 6xSSC (SSC: NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM). Los filtros se dejaron secar y el ADN se fijó a la nitrocelulosa en un horno de vacío a 85°C durante 2 h.

Antes de proceder a la hibridación, los filtros fueron prehibridados durante 6 h a 42°C , en una solución compuesta por formamida al 50%, 5xSSC, Na_2HPO_4 50 mM, glicina 1%, 1X Denhardtts (ficoll 400 0,1%, polivinilpirrolidona 0,1%, BSA 0,1%), y $250\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de ARN transferente (ARNt) de levadura.

El marcaje de sondas radiactivas se llevó a cabo mediante la técnica conocida como "*random primer*". Tras desnaturalizar el fragmento de ADN que va a ser

utilizado como sonda a 100°C durante 5 min, se procedió al anillamiento de las dos cadenas de ADN con una mezcla de hexanucleótidos de secuencia arbitraria, que al unirse en distintos puntos a las cadenas molde actúan como cebadores para la síntesis de las cadenas complementarias. Esta síntesis es llevada a cabo utilizando el fragmento "Klenow" de el enzima ADN polimerasa, que posee actividad polimerasa 5'-3' y no presenta actividad exonucleasa. La mezcla de reacción incluye los nucleótidos precursores dATP, dGTP, dTTP y un exceso de α -³²P-dCTP. Finalizada la reacción (5 min a 37°C), el fragmento de ADN marcado radiactivamente se purificó del resto de nucleótidos no incorporados haciendo pasar la mezcla de reacción por una columna de Sephadex G-50 que retiene en su matriz oligonucleótidos, mientras que los fragmentos de un tamaño superior a 50 pares de bases atraviesan la columna y son recogidos por centrifugación. La actividad específica de la sonda previamente combinada con líquido de centelleo se determinó mediante un contador de partículas β .

Sondas con una actividad específica superior a 10⁸ cpm/ μ g fueron utilizadas en los experimentos de hibridación, en los que el líquido de prehibridación fue reemplazado por la misma solución conteniendo entre 1-2x10⁶ cpm/ml de sonda marcada. La hibridación se mantuvo 20 h a 42°C, al cabo de las cuales la radiactividad no específica se eliminó de los filtros mediante tres lavados sucesivos con 2 x SSC y 0,1% SDS a temperatura ambiente seguidos de dos lavados con 0,1 x SSC y 0,1 % SDS a 42°C. Una vez secos, los filtros fueron expuestos a películas de rayos X.

6.3. Aislamiento de ARN total y purificación del ARN mensajero.

El ARN total fue obtenido de las líneas celulares 84-3, 81C39 y NIH/3T3 siguiendo una modificación del método descrito por *Chomczynski y Sacchi (1987)*. Las células procedentes de cultivos aproximadamente en un 80% de confluencia fueron lisadas en una solución de isotiocianato de guanidinio 4M, citrato sódico 25mM pH 7,0, sarcosil 0,5% y 2-mercaptoetanol 0,1 M. El lisado fue brevemente sonificado para reducir su viscosidad y sometido a ultracentrifugación sobre una solución de cloruro de cesio 5,7 M pH 7,0. Tras 18 h de centrifugación a 28.000 rpm se obtiene un

precipitado correspondiente al ARN, mientras que el ADN y las proteínas permanecen en la interfase. El ARN se resuspendió en agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC), que es un potente inhibidor de las ribonucleasas. La preparación de ARN fue finalmente sometida a una extracción con fenol-CIA (24:1) y precipitación con etanol.

La purificación del ARN mensajero se llevó a cabo mediante columnas comerciales de oligo dT-celulosa. La muestra de ARN total se pasó por una columna previamente equilibrada en el tampón adecuado (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0,5M, pH 7,4). La cadena de adeninas presente en el extremo 3' de la mayoría de los ARN mensajeros se une a la matriz de celulosa, portadora de oligonucleótidos de timina. Después de sucesivos ciclos de lavado, el ARNm fue eluido de la columna en una solución compuesta por Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 a 65°C. La muestra se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol a -20°C y fue finalmente resuspendida en H₂O tratada con DEPC.

6.4. Análisis del ARN en geles de agarosa-formaldehido, transferencia e hibridación.

Tras la determinación de la concentración del ARNm mediante la absorbancia de la solución final a 260 nm, 2,5 µg de ARNm de cada tipo celular fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1% en MOPS (ácido 3-morfolino-propanosulfónico 0,1 M pH 7,0, acetato sódico 40 mM, EDTA 5mM) con 1.1% de formaldehido. El ARN calentado a 65°C en una solución de MOPS, formamida al 40%, formaldehido al 6%, azul de bromofenol al 0,02% y 10 µg/ml de bromuro de etidio fue aplicado en los pocillos del gel, donde fue separado durante aproximadamente 16 h con una corriente de 25 voltios. Finalizada la electroforesis, el ARN fue transferido a filtros de nitrocelulosa por capilaridad en un tampón 20 x SSC (citrato sódico 0,3 M, cloruro sódico 3 M pH 7,0). Los filtros fueron procesados de igual forma que en las hibridaciones de ADN, descritas en el apartado 6.2.

6.5. Secuenciación y análisis informático del ADN.

Las reacciones de secuenciación se realizaron a partir del ADN plasmídico (pBluescript SK+ y pUC18), siguiendo el método de terminación de la cadena descrito inicialmente por *Sanger y cols., 1977*. La técnica está basada en la utilización de la ADN polimerasa del bacteriófago T₇ para llevar a cabo la síntesis de ADN que, comenzando en un punto común, se extiende a lo largo del molde generando una colección de fragmentos de longitud variable, al incorporar nucleótidos modificados que detienen la reacción. Dichos fragmentos son finalmente separados mediante electroforesis.

Los cebadores utilizados inicialmente correspondieron a secuencias localizadas en los vectores plasmídicos: T₃ y T₇ para el vector pBluescript y M-13 directo e inverso para pUC18. La secuencia completa de los insertos fue determinada en ambas direcciones mediante la utilización de cebadores internos (obtenidos comercialmente) complementarios a las regiones del inserto previamente secuenciadas.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo mediante el uso del sistema "Sequenase" versión 2.0 (United States Biochemical). Una reacción de secuenciación típica se llevó a cabo desnaturalizando 2 µg de plásmido, en combinación con 10 ng de cebador en presencia de NaOH 100 mM a 68°C, en un volumen de 10 µl. El anillamiento se realizó después de añadir 4 µl de tampón de reacción (Tris 200 mM, pH 7,5, MgCl₂ 100 mM, NaCl 250 mM). La polimerización se realizó como se describe a continuación:

- dGTP 7,5 µM, dCTP 7,5 µM, dTTP 7,5 µM
- α-³⁵S ATP 7,5 µM (1000 Ci/mmol, 12,5mCi/ml)
- Tris 10 mM pH7,5, DTT 5mM, BSA 50 mg/ml
- 13 unidades ADN polimerasa T₇

Esta reacción se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, transcurridos los cuales, la reacción se dividió en cuatro alícuotas, cada una de las cuales se incubó en presencia de cada ddNTP 8mM durante diez minutos más.

Los fragmentos así generados fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-urea al 6%, a 2500 voltios durante 4 a 6 horas. El gel fue secado al vacío a 75°C y expuesto a continuación sobre una película Kodak BioMax MR-1.

Las secuencias obtenidas en las distintas autorradiografías se analizaron con la ayuda del programa informático "GCG Package DNA software". Todas las búsquedas para la determinación de posibles homologías se realizaron en las bases de datos "GeneBank" (*Bilofsky y Burks, 1988*) y "EMBL" (*Hamm y Cameron, 1986*), con la ayuda del programa FASTA (*Pearson y Lipman, 1988*). El análisis de pautas de lectura capaces de dirigir la síntesis de proteínas se realizó utilizando los métodos descritos por *Fickett (1982)* y *Sheperd (1990)*.

7.- Construcción de genotecas de ADN complementario (ADNc).

7.1. Síntesis de ADN complementario.

La genoteca de ADN complementario (ADNc) fue generada a partir de ARN mensajero de la línea celular transformada 81C39. La primera hebra de ADN se sintetizó enzimáticamente utilizando la cadena de ARNm como molde, la cual incorpora una cola de nucleótidos de adenina. Un oligonucleótido poli-T sirvió como cebador para la transcriptasa inversa del retrovirus M-MuLV (cepa Moloney del virus de la leucemia murina). Este oligonucleótido posee además un sitio de restricción Xho I que permite la ligación direccional del ADNc en el vector.

La síntesis de la segunda hebra requiere la generación previa de pequeñas rupturas en la cadena de ARN (*nicks*), mediante el enzima ARNasa H. La cadena complementaria de ADN se sintetizó entonces mediante la incubación con ADN polimerasa I. Ambas reacciones fueron monitorizadas mediante el uso de nucleótidos marcados radiactivamente con ^{32}P , a fin de comprobar tanto la integridad como el tamaño medio del ADNc sintetizado.

Una vez que ambas cadenas fueron sintetizadas, el ADNc se incubó con ADN polimerasa T_4 en presencia de nucleótidos a fin de generar extremos romos, a los que posteriormente se ligaron unos adaptadores EcoR I. Finalmente, la digestión con el enzima Xho I generó una población de ADNc con un extremo cohesivo EcoR I en posición 5', y un sitio Xho I inmediatamente a continuación de la cola de adeninas en

posición 3'. El protocolo detallado para la síntesis de ambas cadenas se describe a continuación.

- Síntesis de la primera hebra de ADN:

Condiciones de reacción:

- Tris 50 mM pH 7,5, KCl 70 mM
- DTT 10mM
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP 0,6 mM
- Cebador (50ng)
- Inhibidor de ARNasas (RNasin, 40 unidades)
- ARN mensajero (5 μ g)
- H₂O estéril, hasta un volumen de 50 μ l

Incubar 10 minutos a temperatura ambiente para favorecer la unión del cebador a la cadena de adeninas del ARN mensajero. Añadir 50 unidades de transcriptasa inversa e incubar durante 1 hora a 37°C. En este punto, 1/10 del volumen final de la reacción se incuba en presencia de 0,5 μ l de dATP marcado radiactivamente con ³²P, a fin de monitorizar la síntesis de la primera hebra.

-Síntesis de la segunda cadena de ADNc:

A los 45 μ l de la reacción anterior se añaden:

- | | |
|---|---------------|
| - Tris 0,5 M pH 7,4, MgCl ₂ 50 mM | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ 10 mM | 40,0 μ l |
| - 100 mM DTT | 15,0 μ l |
| - Mezcla de nucleótidos (10 mM cada uno) | 3,0 μ l |
| - H ₂ O estéril | 280,6 μ l |
| - α - ³² P-dATP (800 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l) | 2,0 μ l |
| - ARNasa H (1U/ μ l) | 4,5 μ l |
| - ADN polimerasa I (3.2 U/ μ l) | 6,9 μ l |

Incubar durante 2,5 horas a 16°C

Extraer el ADNc con fenol-CIA (1:1) y CIA. Añadir 1/10 del volumen final de acetato sódico 3 M y precipitar con 2,5 volúmenes de etanol.

Centrifugar, lavar el precipitado con etanol al 70% y liofilizar. Resuspender en agua destilada (43,5 μ l).

Rellenar los extremos del ADNc a fin de generar extremos romos en las siguientes condiciones de reacción:

- Tris 60 mM pH 8,2, MgCl₂ 6 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP 125mM
- ADN polimerasa T₄ (150 unidades)

Incubar 30 minutos a 37°C. Extraer con fenol-CIA y precipitar. Resuspender el ADNc en 7 µl de una solución que contiene adaptadores EcoR I (1 µM) y añadir

- Tampón de ligasa 10x (apartado 3.3) 1 µl
- ATP 10 mM 1 µl
- ADN ligasa T₄ 1 µl

Incubar durante 18 horas a 8°C, inactivar la ligasa (70°C, 30 min). A continuación se procede a fosforilar los extremos para permitir la ligación con el vector así como a la restricción con Xho I para producir ADNc 5'-EcoR I-Xho I-3'. Las condiciones de reacción fueron:

- Tampón de ligasa 10x (apartado 3.3) 1 µl
- ATP 10 mM 2 µl
- H₂O estéril 6 µl
- Polinucleótido quinasa T₄ (10 U/µl) 1 µl

Incubar durante 30 minutos a 37°C. Inactivar posteriormente el enzima a 70°C durante 30 minutos y añadir 120 unidades de Xho I. A continuación, incubar durante 2 horas a 37°C. Extraer con fenol-CIA y precipitar. Resuspender el ADNc en agua estéril (10 µl). En este punto, si no se desea realizar ningún fraccionamiento según el tamaño molecular del ADNc, éste está listo para la ligación en el vector.

7.2. Construcción de la genoteca de ADNc.

El ADNc sintetizado como se describió anteriormente fue ligado en el vector λ-ZAP II, un derivado del fago lambda que permite la orientación direccional de los clones. Además de la alta eficiencia de los vectores derivados del fago λ, el sistema permite la posibilidad de recuperar los ADN clonados en forma de plásmido (pBluescript SK+), a través de un proceso de escisión "in vivo" llevado a cabo mediante la coinfección del vector λ-ZAP y un bacteriófago filamentoso (f1) en la estirpe bacteriana adecuada (SORL). Este sistema de clonaje ofrece también la posibilidad seleccionar los clones recombinantes mediante coloración de las placas de

lisis mediante la utilización de X-Gal e IPTG. La **Figura 5** muestra un mapa del vector utilizado así como el esquema del mecanismo de escisión.

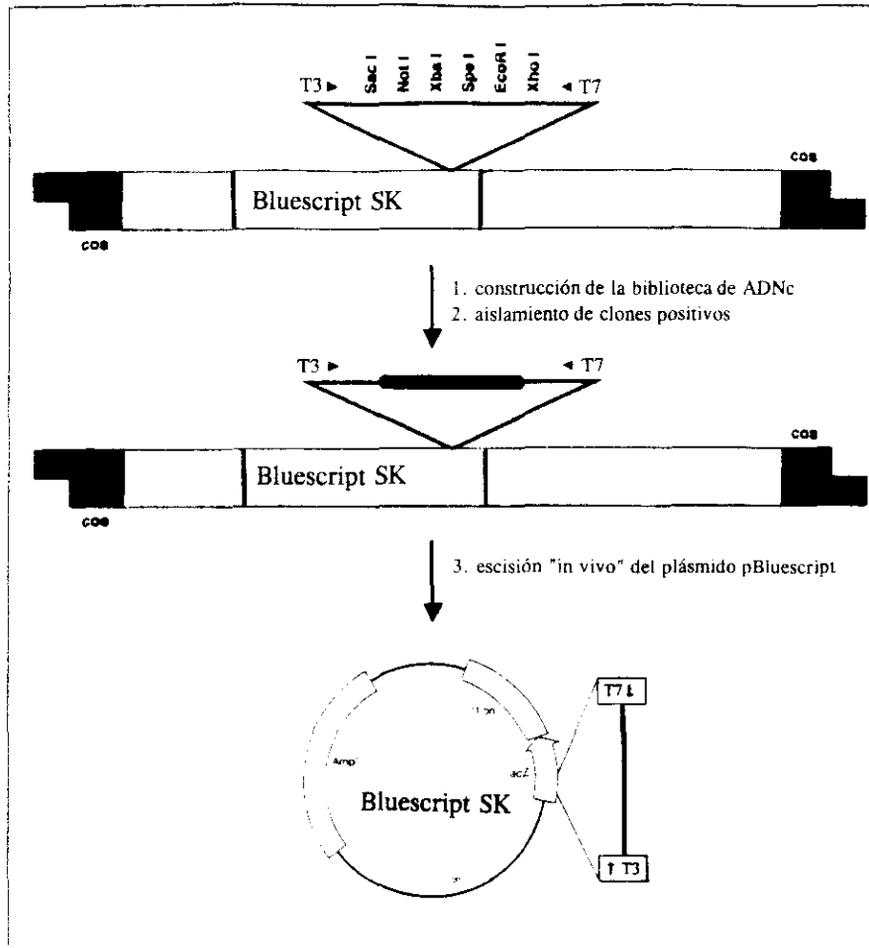


Figura 5: Mapa del bacteriófago λ -ZAP II y del plásmido pBluescript-SK(+), obtenido mediante escisión "in vivo".

La ligación del ADNc y los brazos del fago puede realizarse directamente si el vector ha sido adquirido predigerido con EcoR I y Xho I, y posteriormente defosforilado. La reacción se llevó a cabo ligando 1 μ g de vector y 100 ng de inserto (ADNc). Debido a la limitada cantidad de inserto disponible y a la necesidad de ajustar

la concentración lo mejor posible, ésta se determinó mediante la utilización de placas de agarosa con bromuro de etidio. Para ello se prepararon placas Petri con una mezcla de agarosa 0,8% en Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM con una concentración final de bromuro de etidio de 10 $\mu\text{g/ml}$. Sobre la placa solidificada se depositó un rango conocido de concentraciones patrón (desde 500 hasta 10 ng de ADN del bacteriófago λ en 10 μl); a la vez se depositó la muestra y se fotografió bajo la luz ultravioleta. La comparación de la intensidad de la fluorescencia permitió estimar la concentración de ADN con bastante exactitud. Después de mantener la ligación durante 16 horas a 10°C, la genoteca estaba lista para ser empaquetada.

- Empaquetamiento de la genoteca:

El protocolo seguido para introducir el ADN en partículas virales fue fundamentalmente el descrito en el apartado 3.3., partiendo de 1/10 del volumen total de ligación. En este caso se utilizó la estirpe SURE de *E. coli*, que cuenta con un índice muy bajo de recombinación espontánea.

La genoteca empaquetada fue titulada, a fin de determinar el número de placas de lisis por μl de la solución de fagos. Para ello, 200 μl de células SURE precrecidas en medio LB conteniendo maltosa 0,2% y MgSO_4 10 mM fueron infectadas durante 15 minutos a 37°C con 1 μl de la solución de fagos. A continuación se añadieron 3 ml de medio NZY con un 0,8% de agar precalentado a 48°C, y rápidamente la mezcla se extendió sobre placas con medio NZY con un 2% de agar.

El medio NZY-0,8% agar fue suplementado con X-Gal e IPTG para determinar el porcentaje de fagos recombinantes mediante la formación de placas de lisis blancas, en contraposición a las placas azules producidas por los no recombinantes.

La determinación del título, corregido de acuerdo con el porcentaje de recombinantes, permitió calcular el volumen de la solución de fagos que debía utilizarse para conseguir el número deseado de placas de lisis para su posterior análisis. Si el título de la solución es muy bajo o si se desea analizar un elevado número de placas es necesario amplificar la genoteca a fin de obtener un título mas alto. El título obtenido en la genoteca de ADNc de la línea 81C39 fue de 200.000 placas de lisis por μl de solución de fagos, en un volumen final de 500 μl , por lo que no fue necesario

amplificar la genoteca, evitando los múltiples problemas asociados a los procesos de amplificación.

Con el fin de analizar 500.000 placas de lisis, 240 μ l de la solución de fagos se utilizaron en un total de 24 reacciones de infección en células SURE, precrecidas a una densidad óptica de 0,5 U a 600 nm. Las reacciones se combinaron con 7,5 ml de medio NZY-0,8% agar, precalentado a 48°C y fueron extendidas en placas de cultivo de 15 cm. Todas las placas se incubaron a 39°C durante 6 h, después de las cuáles se mantuvieron a 4°C hasta la mañana siguiente para la transferencia a nitrocelulosa.

- Transferencia de los bacteriófagos a filtros de nitrocelulosa:

Los bacteriófagos fueron transferidos a filtros de nitrocelulosa, previamente saturados en una solución 6 x SCC. Los filtros fueron cuidadosamente dispuestos sobre las placas, manteniéndolos durante 4 min. Transcurrido este tiempo, los fagos transferidos se desnaturalizaron mediante la inmersión de los filtros en una solución alcalina de NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M durante 2 min. Finalmente los filtros se sumergieron en una solución neutralizante NaCl 1,5 M Tris 0,5 M pH 7,5 durante 15 min, con objeto de prevenir la degradación del ADN transferido.

7.3. Detección y aislamiento de clones positivos.

Las condiciones de prehibridación e hibridación fueron básicamente las descritas en el apartado 5.1, utilizando un fragmento obtenido del cósmido rescatado como sonda. Después de lavados sucesivos, los filtros marcados se expusieron durante 48 h a películas de rayos X. Al cabo de este tiempo se pudieron identificar los clones positivos. Sin embargo, dada la casi saturación de las placas de lisis, resultó imposible aislar fagos individuales en un primer ciclo de hibridación. Por ello, una población heterogénea de fagos conteniendo el clon de interés fue extraída de las placas de agar utilizando pequeños cilindros huecos, alineados con la señal positiva de las autorradiografías y las placas Petri. Las distintas muestras de bacteriófagos se dejaron difundir de los bloques de agar en 500 μ l de tampón SM. Esta suspensión de fagos se utilizó en un segundo ciclo de infección, extendiendo de nuevo la reacción sobre nuevas

placas Petri para aislar clones individuales.

El ADN de los fagos que formaron placas de lisis bien individualizadas fue transpasado nuevamente a papel de nitrocelulosa e hibridado con la misma sonda. Así se consiguió por una parte obtener clones de bacteriófagos con un inserto único y por otra parte reconfirmar la autenticidad de la señal de hibridación a través de un segundo ciclo.

- Conversión del bacteriófago λ en plásmido pBluescript mediante escisión "in vivo":

El vector de clonaje utilizado permite la recuperación de los clones aislados en forma de plásmido, de más fácil manejo que los vectores derivados del fago λ . El proceso de escisión se realizó mediante la coinfección de estirpes bacterianas adecuadas con el vector λ -ZAP y con un bacteriófago filamentoso ("ExAssist"). Este último produce una serie de proteínas que sólo reconocen señales de iniciación y terminación de la replicación, estratégicamente dispuestas flanqueando el inserto clonado, que es de esta manera escindido del fago λ , replicado y encapsulado en forma de virus filamentoso.

La coinfección se realizó a 37°C durante 15 min combinando:

- 200 μ l *E. coli* XL-1 blue (cultivo saturado)
- 100 μ l solución de fagos λ -ZAP
- 1 μ l bacteriófago filamentoso f1 ("ExAssist")

la mezcla se incubó durante 2 h más en 3 ml de medio YT y después se calentó a 70°C durante 20 min, a fin de destruir la bacteria y obtener una suspensión de fagos filamentosos. Estas nuevas partículas virales fueron utilizadas para infectar una estirpe no supresora de *E. coli* (SORL). El bacteriófago filamentoso "ExAssist" es portador de una mutación ámbar y no puede replicarse en la bacteria, mientras que las nuevas partículas virales portadoras del vector plasmídico sí pueden hacerlo, formando moléculas circulares del plásmido pBluescript. Las colonias bacterianas portadoras del plásmido fueron seleccionadas finalmente en placas de agar con ampicilina. Preparaciones convencionales de ADN permitieron la obtención del plásmido portador del ADNc direccionalmente orientado en los sitios de restricción EcoR I y Xho I.

8.- Análisis de la proteína producto del ADNc mediante transcripción y traducción "in vitro".

La construcción formada por el ADNc en el vector pBluescript fue utilizada en experimentos de transcripción y traducción "in vitro" utilizando un lisado comercial de reticulocito de conejo (Promega), con el fin de confirmar la existencia de una pauta de lectura capaz de dirigir la síntesis de una proteína. En una reacción en un solo paso partiendo de ADN circularizado, el sistema genera una cadena de ARN mensajero transcribiendo la construcción partiendo de la secuencia del promotor de la polimerasa T₃, localizada en el plásmido inmediatamente anterior al comienzo del ADNc. El ARNm sintetizado es utilizado inmediatamente por los componentes del lisado de reticulocitos para dirigir la síntesis de proteínas codificadas por el ADNc. Esta síntesis se realiza en presencia de metionina marcada con ³⁵S, lo que permite la identificación de la proteína mediante autorradiografía, después de ser sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS.

Las condiciones de reacción para un volumen de 50 µl fueron las siguientes:

- 25 µl de lisado de reticulocitos
- tampón de reacción (Tris 40mM, pH 7,5, MgCl₂ 6 mM, espermidina 2 mM, NaCl 10mM)
- mezcla de ribonucleótidos (ATP, GTP, CTP, UTP) 2,5 mM
- 20 unidades de ARN polimerasa T₃
- mezcla de aminoácidos sin metionina 200 µM
- 40 µCi de ³⁵S-metionina (1000 Ci/mmol)
- 40 unidades de inhibidor de ribonucleasas ("RNasin")
- 1 µg de ADN

La reacción se incubó durante 90 min a 30°C. A continuación, 1/10 del volumen final fue analizado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS. La muestra se combinó con 5 volúmenes de tampón de muestra de electroforesis (glicerol 10%, SDS 2%, Tris 50 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,1%, 2-mercaptoetanol 350 mM), y se aplicó en un gel de poliacrilamida al 12,5%, preparado según la técnica descrita por *Laemmli, (1970)*.

Resultados

1.- Aislamiento de secuencias transformantes activadas en la línea celular 81C39.

La estrategia empleada para el aislamiento y rescate de las secuencias responsables del fenotipo transformante de la línea celular 81C39 aparece representada esquemáticamente en la **Figura 6**. Inicialmente se procedió a la construcción de una genoteca a partir del ADN genómico total de una línea celular procedente de un segundo ciclo de transformación. La correlación entre la aparición del fenotipo transformante y la adquisición e integración de ADN de hámster procedente de la línea original 81C39 se había establecido previamente en estos transformantes de segundo ciclo (*Notario y cols., 1990*).

Para la construcción de la genoteca se procedió a la extracción del ADN de alto peso molecular de dicha línea celular. Este fue digerido parcialmente con el enzima de restricción BamH I y fraccionado posteriormente en un gradiente de sacarosa. La fracción enriquecida en ADN de un tamaño comprendido entre 40 y 50 kb fue seleccionada para la ligación en el sitio único BamH I del cósmido pCV108 (*Lau y Kan, 1983*).

El producto de la reacción de ligación, compuesto mayoritariamente por concatémeros en los que cada fragmento de ADN genómico aparece flanqueado por secuencias *cos*, fue utilizado en protocolos de empaquetamiento "in vitro" en partículas virales λ . El ADN empaquetado se utilizó para infectar una cepa de *E. coli* lisogénica $amp^r kan^r$, donde una vez transducido dentro de la bacteria comienza su replicación en forma de plásmido, proporcionando resistencia a ambos antibióticos.

Inicialmente la solución de bacteriófagos fue titulada para determinar el número de recombinantes, mediante la infección de una pequeña alícuota en un cultivo bacteriano. Después de la infección, dicho cultivo se sembró en placas de agar suplementadas con antibiótico y se procedió al contaje de colonias resistentes portadoras de cósmidos recombinantes. Una vez determinado el título, se calcularon las condiciones para una nueva infección a mayor escala y obtener $2,5 \times 10^5$ recombinantes. Dicha población de cósmidos se extrajo posteriormente mediante

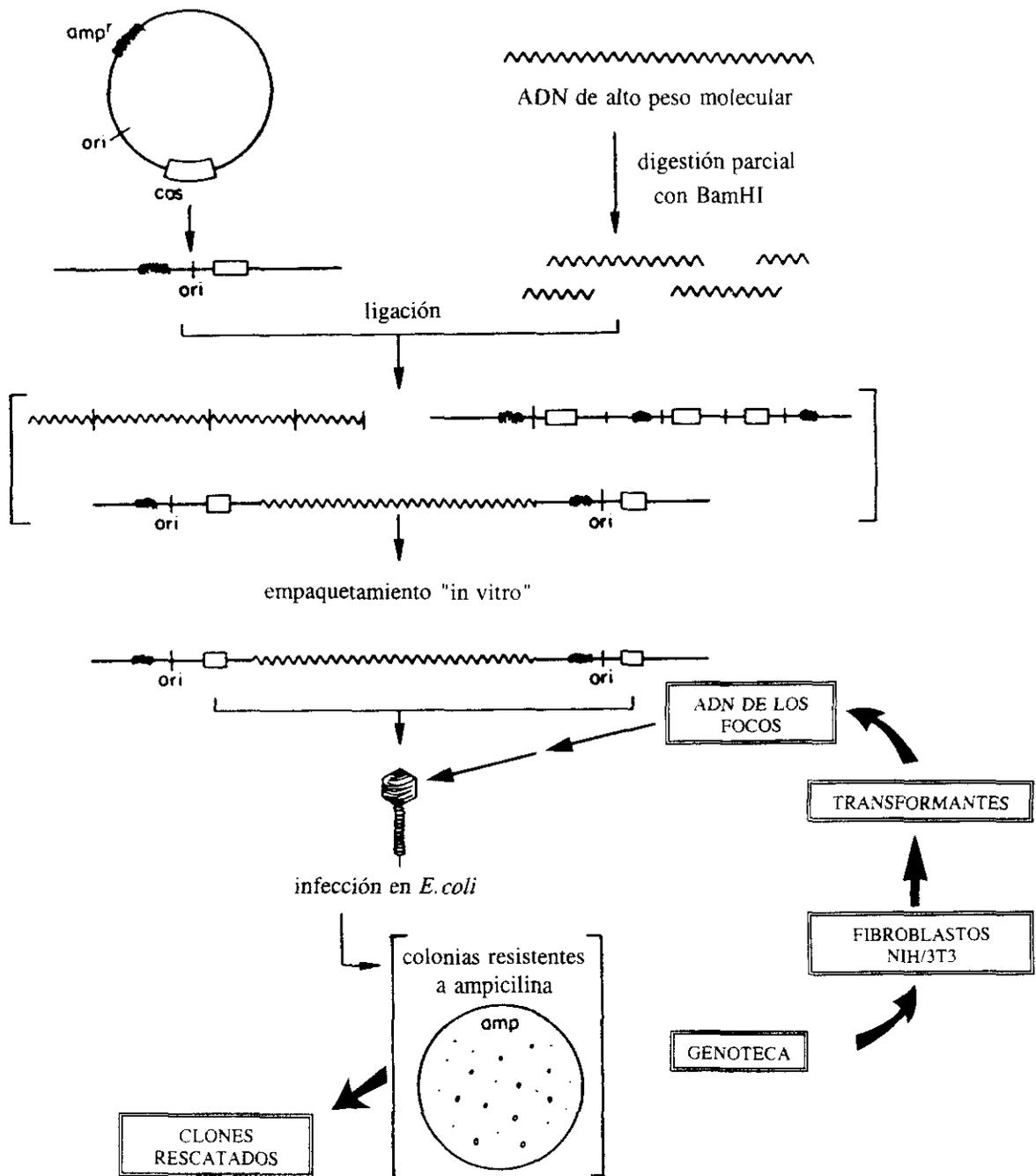


Figura 6: Esquema del proceso que condujo al aislamiento de las secuencias transformantes procedentes de la línea celular 81C39 mediante la construcción de una genoteca y transfección de ésta en fibroblastos NIH/3T3.

técnicas convencionales, y el ADN cosmídico procedente de la genoteca así obtenido se utilizó en ensayos de transfección en células NIH/3T3.

Cuatro semanas después de la transfección se aislaron 12 focos de células transformadas capaces de crecer en presencia de neomicina, con el fin de rescatar las secuencias transformantes responsables de la alteración morfológica de las células NIH/3T3, mediante la técnica de rescate de cósmidos (*Lau y Kan, 1983*). El ADN extraído de las 12 líneas celulares obtenidas después de la transfección de la genoteca se utilizó nuevamente en protocolos de empaquetamiento "in vitro" utilizando ADN de las células NIH/3T3 como control negativo. Solamente el ADN flanqueado por los sitios de reconocimiento *cos* puede ser detectado y encapsidado en forma de bacteriófago λ . En este caso, el único ADN con capacidad transformante flanqueado por secuencias *cos* ha de provenir de la genoteca de transformante del segundo ciclo.

Alicuotas de todas las reacciones de empaquetamiento se utilizaron para infectar cultivos de *E. coli* VNC-1, especialmente desarrolladas para conseguir una alto índice de replicación de cósmidos recombinantes. Las bacterias infectadas con ADN cosmídico fueron seleccionadas en placas con ampicilina y kanamicina. En las doce reacciones de rescate partiendo de ADN de las células transformadas se aislaron 171 colonias, mientras que no se detectó ninguna colonia partiendo del ADN de los fibroblastos NIH/3T3 utilizados como control negativo.

El análisis de todos los cósmidos obtenidos en el rescate se llevó a cabo mediante tres tipos de técnicas distintas: análisis de restricción, hibridación con sondas específicas de secuencias repetitivas de hámster y transfección.

- Análisis de restricción: Todos los cósmidos obtenidos presentaron insertos con un tamaño molecular comprendido entre 37 y 45 kb. La digestión con el enzima de restricción BamH I y posterior electroforesis de los fragmentos obtenidos puso de manifiesto la existencia de 11 patrones de restricción distintos, que fueron denominados desde el tipo A hasta el K. La mayoría de ellos (115 de los 171) poseían el denominado "prototipo de restricción" C, consistente con la aparición de 5 fragmentos de restricción BamH I (denominados desde B-1 hasta B-5), tal y como se observa en la **Figura 7**. El resto de los cósmidos presentaron patrones de restricción bastante similares al tipo C, aunque la presencia de fragmentos adicionales sugería la posibilidad de

reorganizaciones producidas durante el rescate.

- Hibridación con sondas específicas de secuencias repetitivas de hámster. Con el fin de confirmar el origen del ADN en los insertos de los cósmidos, éstos fueron hibridados con una sonda específica de secuencias repetitivas de hámster denominada HRS ("hamster repetitive sequence"). Los 115 clones del tipo C resultaron positivos en el experimento de hibridación, determinándose en todos ellos la existencia de secuencias específicas de hámster en el fragmento B-4 (**Figura 7**). Se puso así de manifiesto que los cósmidos recuperados de los transformantes NIH/3T3 del segundo ciclo contenían ADN de hámster, que presumiblemente había sido el responsable de la transformación de estos fibroblastos.

- Determinación de la capacidad transformante de los cósmidos rescatados mediante transfección. Dos clones de cada uno de los once prototipos fueron utilizados nuevamente en ensayos de transfección para determinar su capacidad transformante. Cuatro semanas después de la transfección, sólo los cósmidos del tipo C fueron capaces de producir focos de células transformadas en fibroblastos NIH/3T3. Los cósmidos C-1 y C-5, seleccionados al azar entre todos los clones del tipo C, produjeron 32 y 46 focos de células transformadas por ensayo (10 μ g), respectivamente. La autenticidad de los focos obtenidos fue verificada mediante selección con G-418, ya que en su presencia los focos de transformación espontáneos no pueden sobrevivir. En estos ensayos se comprobó que más del 80% de los focos obtenidos eran resistentes a neomicina, demostrando de esta forma que la transformación era el resultado de la adquisición del ADN de hámster contenido en los cósmidos.

El clon C-5 fue elegido de entre los cósmidos del prototipo C para su caracterización molecular y funcional, a fin de definir el fragmento de ADN genómico responsable del efecto biológico transformante.

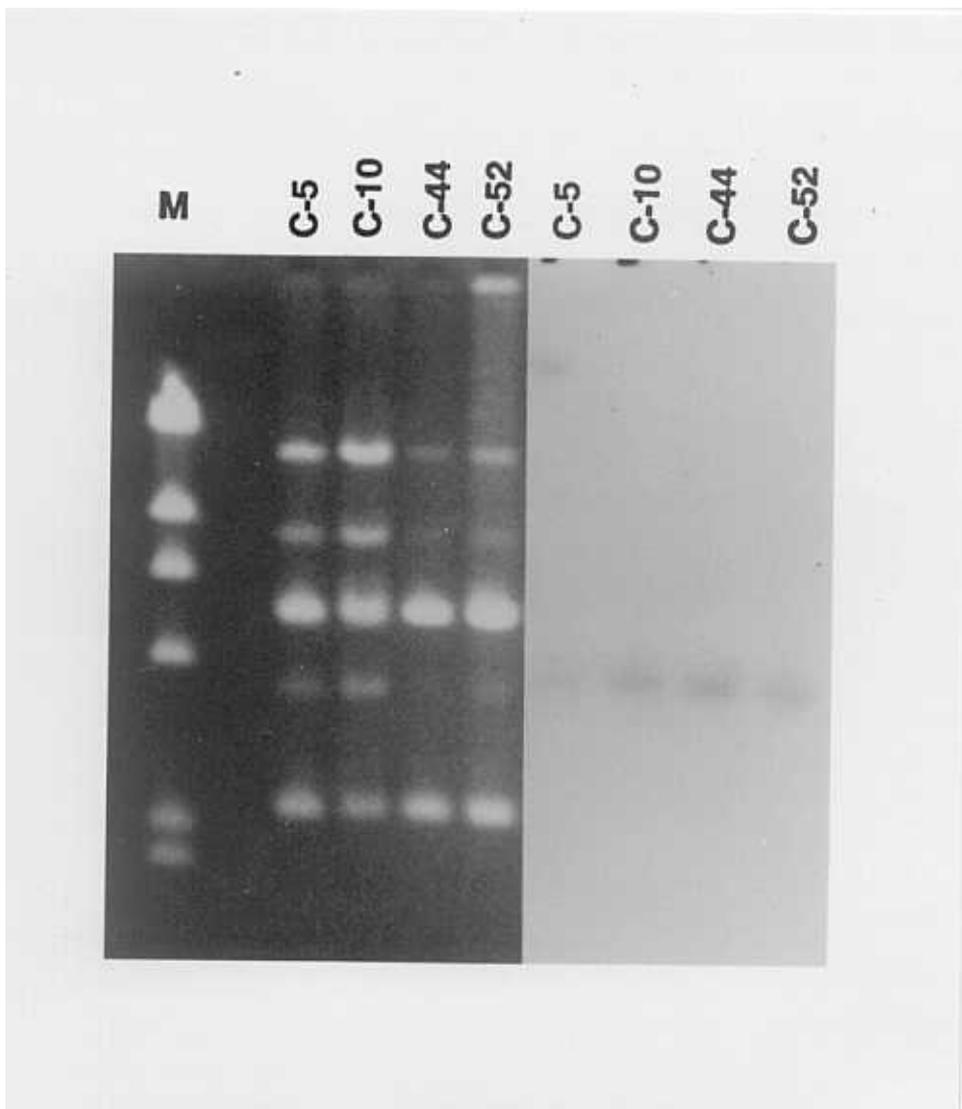


Figura 7: Análisis de restricción con el enzima BamH I de algunos cósmidos representativos del prototipo C. El panel de la izquierda muestra la movilidad electroforética de los fragmentos en un gel de agarosa, teñidos con bromuro de etidio. M: ADN del bacteriófago λ digerido con Hind III y utilizado como marcador de tamaños moleculares. El panel de la derecha muestra el análisis de Southern del mismo gel con la sonda correspondiente a la secuencia HRS, elemento repetitivo específico de hámster.

2.- Caracterización molecular del clon C-5.

La primera aproximación para el análisis de las 42 kb de ADN genómico de hámster contenidas en el cósmido C-5 fue tratar de identificar la existencia de uno o varios genes, transcripcionalmente activos, y que pudieran por tanto detectarse mediante análisis de hibridación de ARN ("Northern"). Para ello, después de ensayar diferentes enzimas de restricción, C-5 fue digerido con BamH I y los fragmentos obtenidos, (denominados desde B-1 hasta B-5, de mayor a menor tamaño molecular), fueron purificados a partir de los geles de agarosa. Los cinco fragmentos y el cósmido completo fueron marcados radiactivamente con ^{32}P y utilizados como sondas en análisis de hibridación sobre filtros de nitrocelulosa con ARNm de la línea celular no transformada 84-3, así como de la línea tumoral original 81C39. Como se observa en la **Figura 8**, sólo el fragmento B-1 produjo una señal positiva en el ensayo de hibridación, igual a la producida por el cósmido C-5. Ninguno de los otros cuatro fragmentos analizados reconoció ningún ARNm. Tras una corta exposición de los filtros hibridados con el fragmento B-1 (19 kb) se detectó la presencia de varias bandas, una de las cuales (de un tamaño aproximado de 2,0 kb, tanto en la línea celular normal como en la transformada) presentó mayor intensidad. Este resultado delimitaba la existencia de una posible unidad transcripcional en el fragmento B-1.

Una vez identificado B-1 como la región de C-5 activa transcripcionalmente se procedió a la realización de un mapa de restricción detallado y a la identificación de subfragmentos que de nuevo detectasen bandas en análisis de ARN de las líneas 84-3 y 81C39. Para ello C-5 fue digerido con las enzimas BamH I, Sac I, EcoR I y Pvu II individualmente y en digestiones dobles, a fin de determinar el mapa de restricción y poder identificar fragmentos para análisis de "Northern". La **Figura 9** muestra dicho mapa de restricción, con la localización del fragmento B-1 como parte del cósmido C-5 y la disposición de los fragmentos internos de B-1.

Los subfragmentos denominados P4, S5P2, S6 y PB, cuya situación en B-1 aparece señalada en la **Figura 9** fueron purificados y utilizados como sondas en análisis de "Northern". En los cuatro casos, se obtuvieron patrones de hibridación similares,

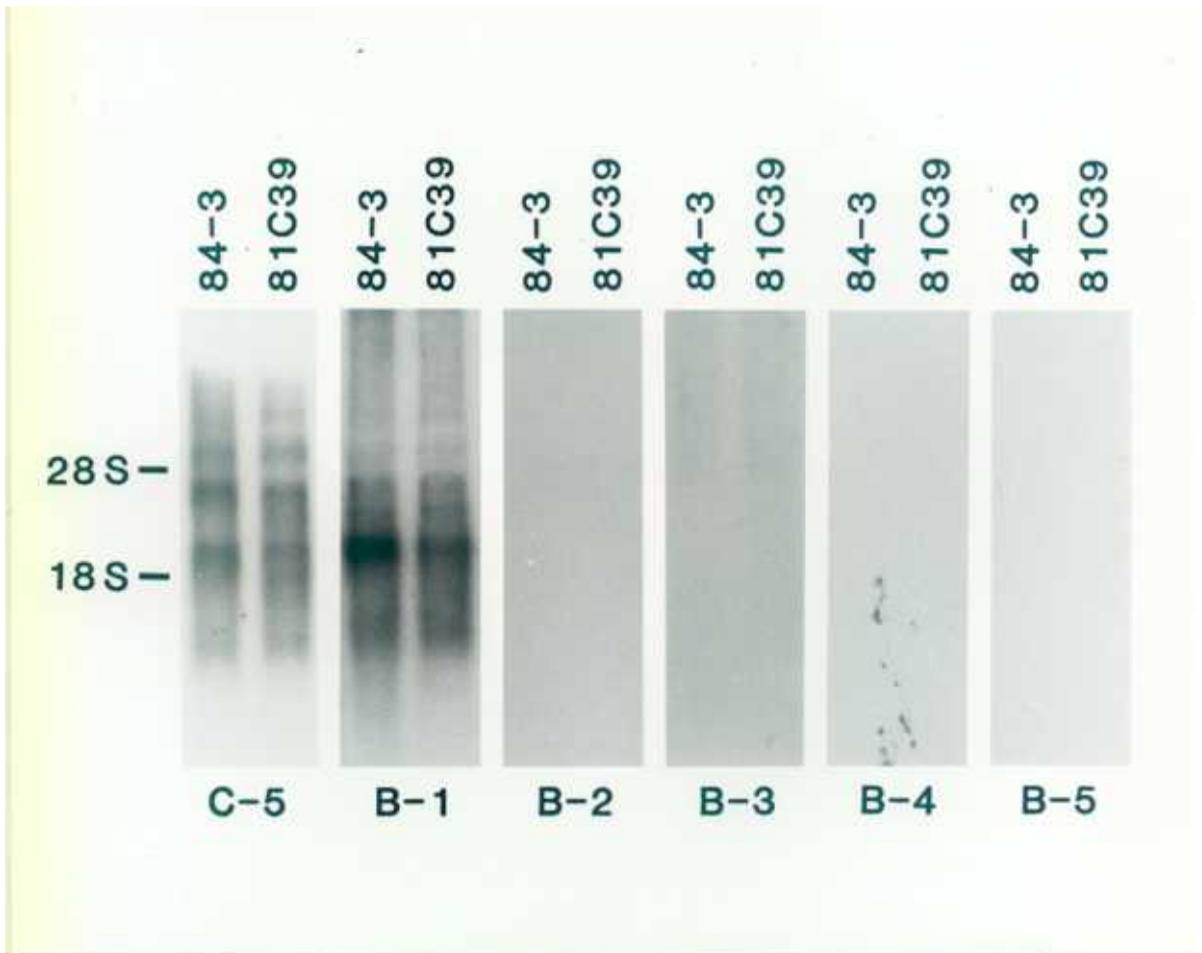


Figura 8: Análisis mediante la técnica de "Northern" del ARNm extraído de las líneas celulares 84-3 y 81C39 con sondas procedentes del cósmido C-5. Seis filtros de nitrocelulosa con $2 \mu\text{g}$ de ARNm de cada línea celular se hibridaron con los fragmentos de ADN purificados a partir del cósmido C-5 (B-1 a B-5). El propio C-5 fue utilizado como control positivo. La movilidad electroforética de los ARN ribosomales (ARNr) 28S y 18S, utilizados como marcadores de peso molecular, aparece indicada a la izquierda.

:

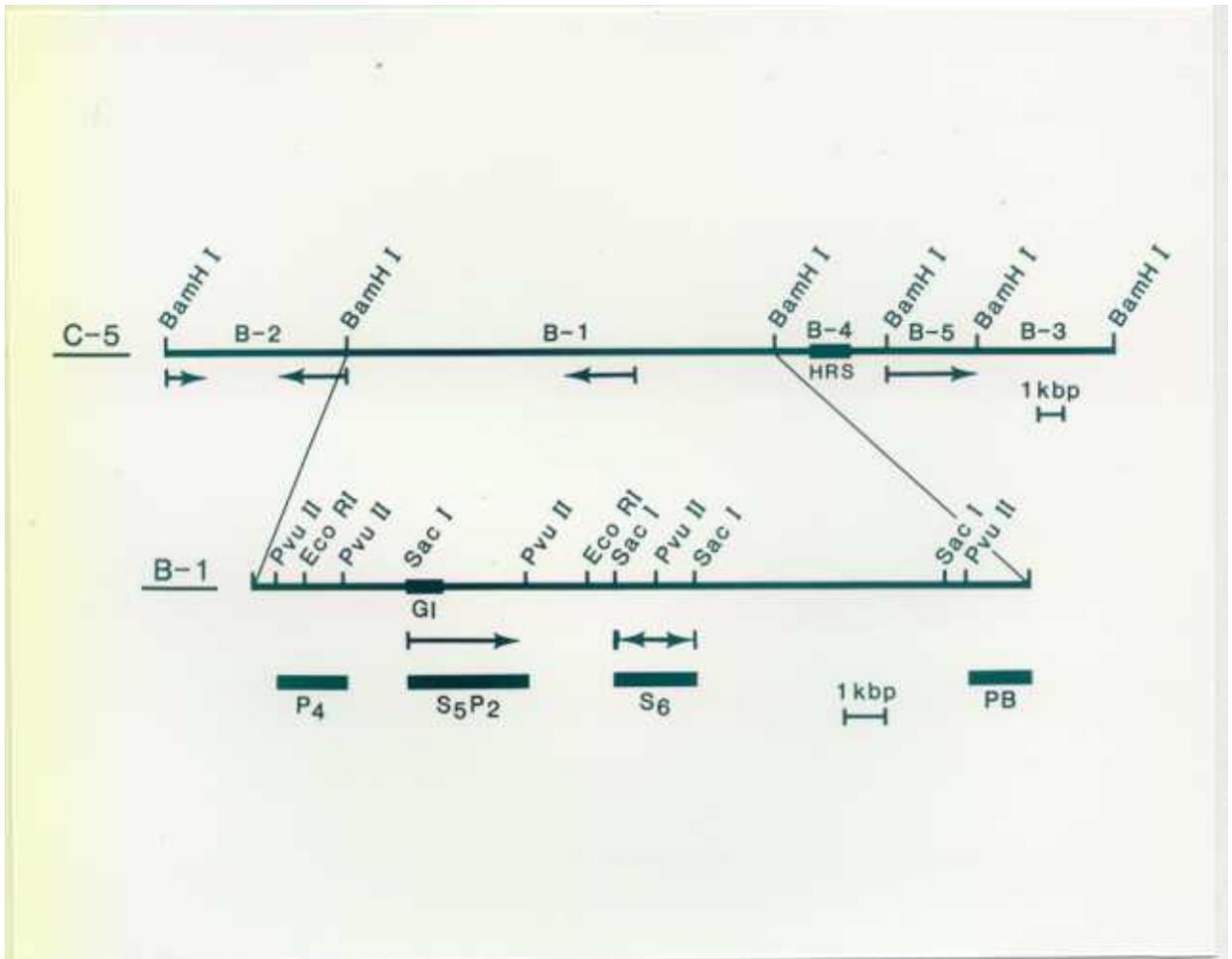


Figura 9: Mapa de restricción del cósmido C-5. La posición relativa de los cinco fragmentos obtenidos mediante digestión con BamHI aparece indicada. El fragmento B-1, analizado con más detalle, se representa en la parte inferior. La localización de las secuencias repetitivas HRS aparece indicada en el fragmento B-4. Las flechas corresponden a regiones del cósmido cuya secuencia de nucleótidos ha sido determinada mientras que las barras oscuras (G1, P4, S5P2, S6 y PB) indican fragmentos purificados del cósmido y utilizados para análisis posteriores.

sugiriendo la existencia de una unidad de transcripción única que comprendía la casi totalidad del fragmento B-1. Cuando el mismo análisis se llevó a cabo partiendo de ARNm de fibroblastos NIH/3T3 no se detectó banda alguna, demostrando la especificidad de las sondas para reconocer secuencias propias de hámster. La **Figura 10** muestra un ejemplo de dicho patrón de hibridación utilizando la sonda S6 en filtros conteniendo ARN de las líneas de hámster 84-3 y 81C39. Una vez probada la actividad transcripcional de los subfragmentos de B-1, éstos fueron subclonados en plásmidos digeridos con Sma I, Sac I, y Sma I/Sac I, y su secuencia de nucleótidos fue determinada. La totalidad de las regiones secuenciadas no mostró homologías significativas con ninguna secuencia depositada en las bases de datos del "GeneBank" y "EMBL", confirmando la idea de que C-5 contenía secuencias transformantes no descritas con anterioridad.

Una vez determinada la existencia de un patrón similar de hibridación en los análisis de "Northern" se procedió a utilizar las mismas sondas en experimentos de Southern, con el objetivo de determinar posibles alteraciones de las secuencias transformantes a nivel genómico. La **Figura 11** muestra el resultado de dicho análisis (utilizando ADN de las líneas celulares 84-3 y 81C39) en el que no se observa ninguna reorganización genética utilizando la sonda S6. Análisis similares han sido realizados con otras sondas procedentes del fragmento B-1 y digiriendo el ADN total con distintos enzimas de restricción. En todos los casos se ha obtenido el mismo patrón de bandas en el ADN de ambas líneas celulares, sugiriendo la ausencia de reorganizaciones en el locus correspondiente a las nuevas secuencias transformantes.

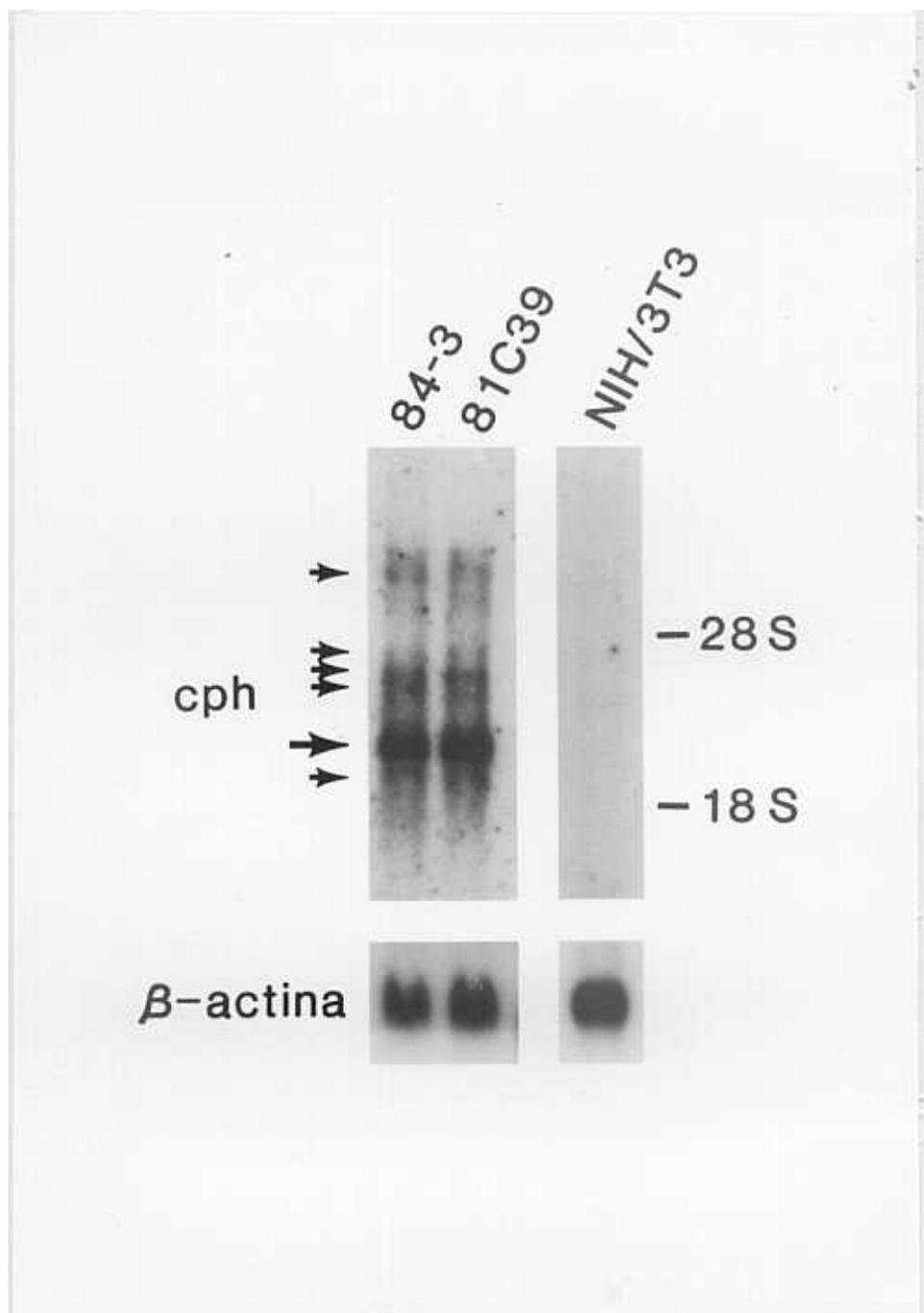


Figura 10: Detección de ARNm específicos en las líneas celulares 84-3, 81C39 y NIH/3T3 mediante hibridación con la sonda S6 derivada del clon C-5 (ver Figura 9). La movilidad electroforética de las distintas especies de ARNm se indica con flechas a la izquierda de la fotografía. La posición de los ARNr 28S y 18S, utilizados como marcadores de peso molecular, se indican a la derecha. Los mismos filtros fueron hibridados con una sonda del gen de la β -actina para el control de la cantidad de ARN empleado en la electroforesis.

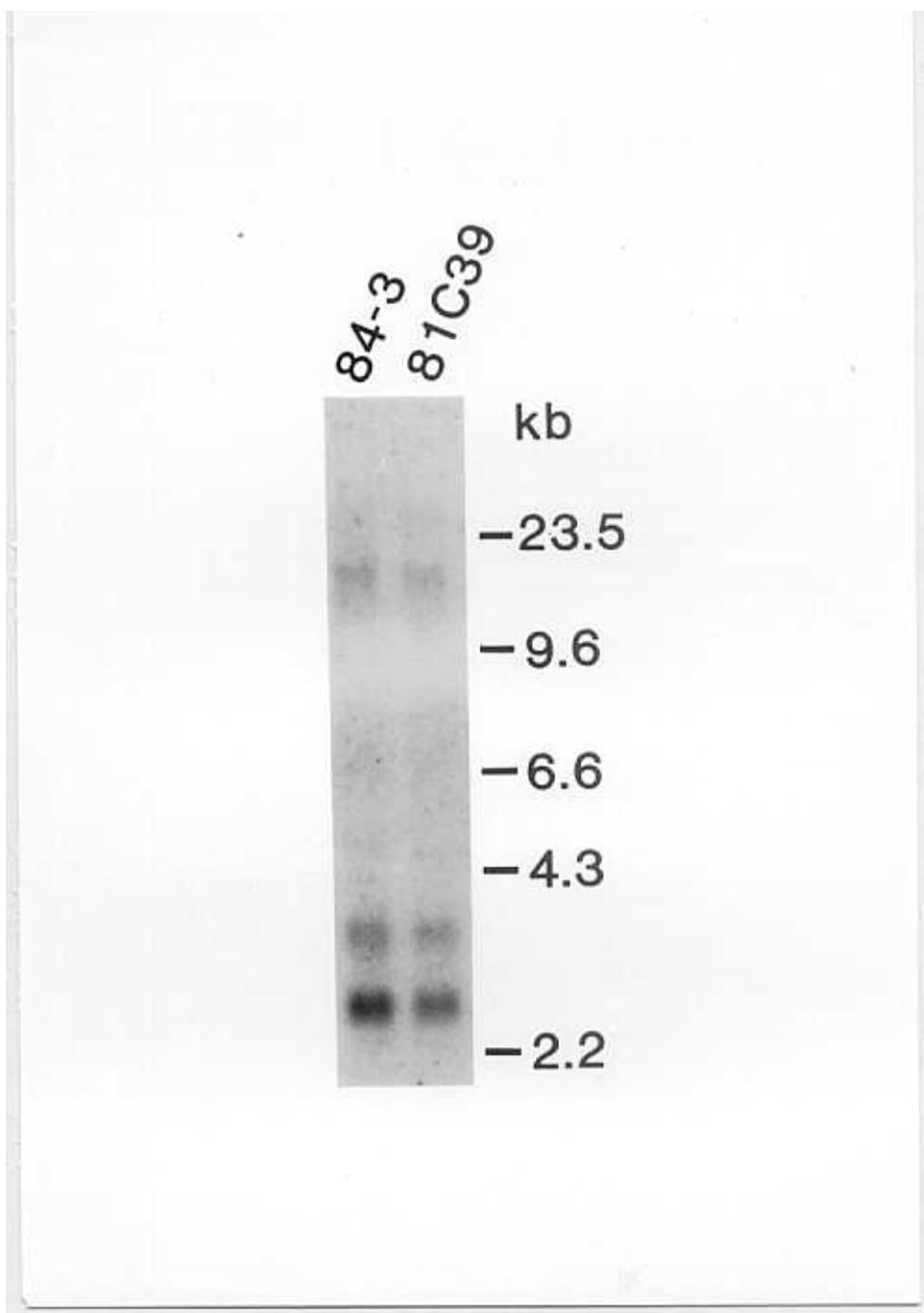


Figura 11: Ausencia de reorganizaciones en la secuencia transformante activada en las células 81C39. El ADN total de las líneas celulares 84-3 y 81C39 fue extraído, digerido con Sac I y analizado mediante la técnica de Southern, utilizando el fragmento S6 (Figura 9) como sonda. La migración de los fragmentos procedentes de la digestión del ADN del fago lambda con Hind III, utilizados como marcadores de peso molecular, aparece indicada a la derecha.

3.- Actividad biológica del clon C-5: definición de *cph* como oncogén.

Paralelamente a la caracterización molecular del clon C-5, se realizaron diferentes ensayos de transfección a fin de determinar la capacidad transformante del fragmento genómico clonado y definir por tanto su naturaleza oncogénica. Para ello, 5 μg de C-5 fueron precipitados con fosfato cálcico y transfectados en células NIH/3T3. Después de un periodo de aproximadamente 4 semanas, alrededor de una veintena de focos de células transformadas se distinguieron perfectamente sobre la monocapa de fibroblastos normales en cada placa de transfección. La **Figura 12** (panel inferior), muestra la morfología típica de uno de estos focos, en comparación con la apariencia de un cultivo control de fibroblastos NIH/3T3 después de cuatro semanas. Debido al largo periodo transcurrido desde la transfección hasta la aparición de los focos, y a fin de descartar la posibilidad de fenómenos de transformación espontánea, las células transformadas fueron crecidas en medio suplementado con neomicina, confirmando la adquisición de ADN C-5 como responsable de la transformación.

Además de los experimentos de transfección utilizando C-5 intacto, se realizaron experimentos similares utilizando C-5 previamente digerido con BamH I o Sac I, a fin de correlacionar los datos obtenidos a nivel molecular con la actividad biológica. Los primeros habían delimitado la localización de la unidad transcripcional dentro del fragmento B-1, sobre el que habían sido localizados hasta cuatro sitios de restricción Sac I. La **Tabla V** muestra los resultados obtenidos en estos ensayos de transfección. En varios experimentos, 5 μg de C-5 intacto produjeron alrededor de 25 focos de células transformadas en cada placa de cultivo de fibroblastos NIH/3T3. Cuando los mismos experimentos se realizaron con C-5 digerido con BamH I se reprodujo la capacidad oncogénica del cósmido completo, obteniendo eficiencias de transformación muy similares. Sin embargo, cuando C-5 fue cortado previamente con Sac I (que produce la ruptura del fragmento B-1) no se detectó ningún foco de células transformadas.

Una vez determinada la actividad biológica del clon C-5, demostrada su capacidad oncogénica en ensayos de transfección, y comprobada la ausencia de

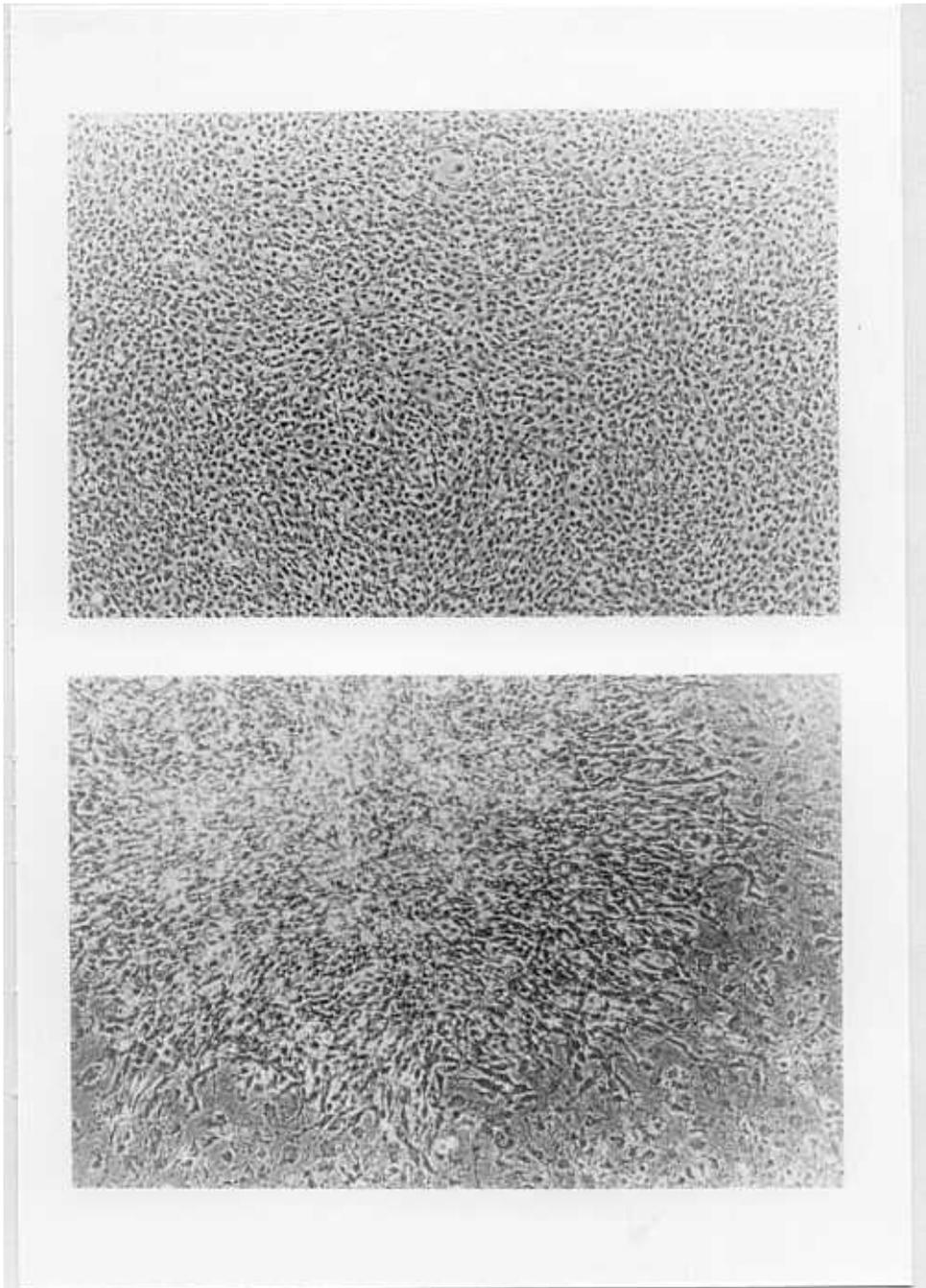


Figura 12: Fotografía superior: Aspecto de una monocapa de fibroblastos NIH/3T3 después de cuatro semanas de permanencia en cultivo. Fotografía inferior: morfología típica de un foco de células transformadas con el cósmido C-5, cuatro semanas después de la transfección.

homologías significativas entre la secuencia de nucleótidos de las regiones analizadas y las bases de datos, la secuencia transformante presente en C-5 se denominó como el oncogén *cph* (Velasco y cols., 1994), utilizando las iniciales en inglés del sistema de Progresión Carcinógena en células embrionarias de Hámster ("Carcinogenic Progression in Hamster cells"), al ser éste el modelo experimental que permitió su detección.

TABLA V: Actividad transformante del oncogén *cph*

ADN transfectado	Eficiencia de transformación*	Periodo de aparición (semanas)
C-5 (5µg)	20-27	3 1/2-4
C-5/BamHI	17-22	3 1/2-4
C-5/SacI	0	5
H-ras(pT24) (2.5µg)	30-36	1 1/2-2
C-5(2µg) + H-ras	138-154	2
C-5(5µg) + H-ras	187-212	2
C-5(10µg) + H-ras	286-303	2
pCV108 (10µg)	0	5

*La eficiencia de transformación se determinó como el número de focos en cada placa de transfección

**El periodo de aparición fue contabilizado desde el día de la transfección hasta el día en que las colonias fueron teñidas para el conteo de focos.

La actividad biológica del nuevo oncogén fue caracterizada con más detalle mediante experimentos de cotransfección utilizando *cph* y el oncogén H-ras, con la intención de evaluar la presencia de rutas de transformación sinérgicas, previamente descritas para otros oncogenes (Weinberg, 1989). Cuando 5 µg de *cph* y 2,5 µg de H-ras se transfectaron en células NIH/3T3, el número de focos de células transformadas

en cada placa de ensayo ascendió por encima de 180 colonias en un periodo de tan sólo dos semanas, indicando un potente efecto cooperativo en la actividad transformante de ambos oncogenes. De hecho, *cph* incrementó la capacidad transformante de *ras* en 6 veces, y por otro lado, la presencia de *ras* indujo un aumento en la capacidad transformante de *cph* de más de 18 veces. Cuando se realizaron experimentos en los que una cantidad constante de *ras* se tranfectó en combinación con cantidades crecientes de *cph* (desde 2 hasta 10 μg), se observó un incremento paralelo en el número de focos de células transformadas (**Tabla V**). Un ejemplo representativo de estos experimentos aparece en la **Figura 13**.

La adquisición de la secuencia *cph* en los focos obtenidos de la cotransfección fue comprobada inicialmente mediante selección con neomicina. Además se seleccionaron al azar varios focos que fueron expandidos en líneas celulares para determinar la integración de *cph* en el genoma de las células cotransfectadas con *cph* y *ras*. Para ello, el ADN de alto peso molecular extraído de 4 de estas líneas, fue digerido con BamH I, separado mediante electroforesis y posteriormente transferido a nitrocelulosa e hibridado con la sonda S6. La detección mediante autorradiografía de una banda de 19 kb, correspondiente al tamaño molecular del fragmento B-1, puso de manifiesto la integración de *cph* de manera intacta (**Figura 14**).

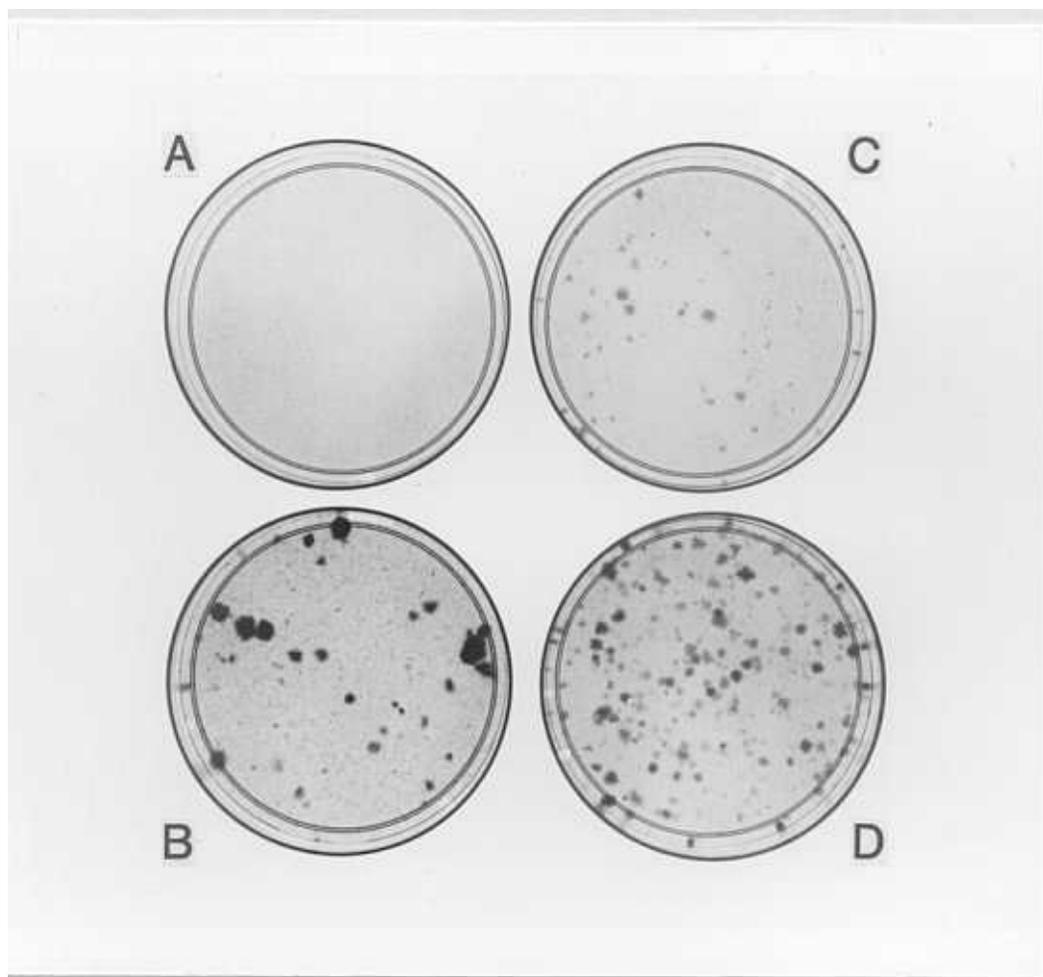


Figura 13: Demostración del efecto sinérgico entre los oncogenes *cph* y *H-ras* en la transformación de fibroblastos NIH/3T3. Las placas fueron fijadas con metanol y teñidas con cristal violeta para determinar el número de focos de células transformadas después de la transfección con: (A) 5 μg del vector pCV108; (B) 2,5 μg del plásmido pT24-C3 portador del oncogén *H-ras*; (C) 5 μg del cósmido C-5, portador del oncogén *cph* activado; (D) la combinación de ambos oncogenes (2,5 μg de *H-ras* y 5 μg de *cph*). Las placas A, B y D fueron teñidas dos semanas después de la transfección, mientras que la placa C lo fue después de cuatro semanas.

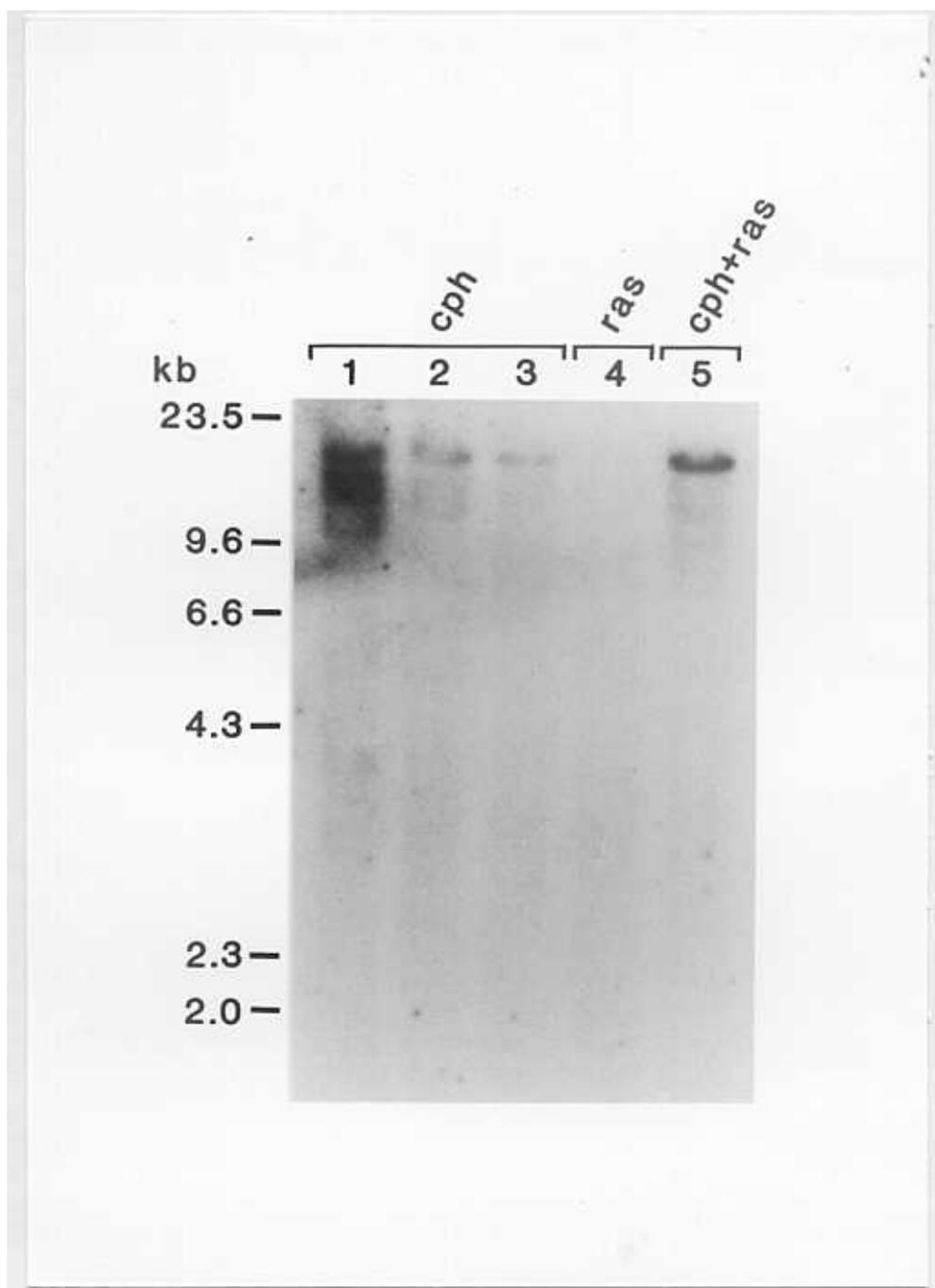


Figura 14: Integración de B-1 en las líneas celulares resultantes de la transfección de *cph* y *cph+rass*. El ADN total de tres líneas celulares transfectadas con *cph* y una línea cotransfectada con ambos oncogenes fue digerido con BamH I y analizado mediante la técnica de Southern. El ADN de células transformadas con *ras* fue utilizado como control negativo. El filtro de nitrocelulosa se hibridó con la sonda radiactiva correspondiente al subfragmento S6 (ver Figura 9) de C-5.

4.- Conservación evolutiva del locus *cph*.

Con el propósito de determinar el grado de conservación evolutiva del locus *cph* en la escala filogenética se realizaron experimentos de hibridación partiendo de ADN de diferentes organismos. Se eligieron dos especies de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, como representantes más significativos de eucariotas unicelulares. El aislamiento del ADN de estas levaduras se realizó a partir de protoplastos obtenidos mediante digestión enzimática de la pared celular, de acuerdo con las condiciones rutinariamente utilizadas en nuestro laboratorio (Avila y cols., 1994). También se utilizó ADN genómico de riñón de rata (*Rattus norvegicus*) y ratón (*Mus musculus*), así como ADN genómico humano obtenido de placenta.

Las distintas muestras de ADN de diversos orígenes fueron digeridas con varios enzimas de restricción y sometidas a electroforesis. Después de transferir el ADN a filtros de nitrocelulosa se procedió a la hibridación de éstos con diferentes sondas genómicas procedentes de la región B-1. Las condiciones de hibridación fueron modificadas disminuyendo la proporción de formamida en la solución de hibridación por debajo del 50%, a fin de facilitar la detección de secuencias relacionadas. Los niveles moderados y bajos de estringencia se obtuvieron mediante la utilización de soluciones de hibridación al 35% y 20% de formamida, respectivamente.

La **Figura 15** muestra algunos ejemplos representativos de estos experimentos de Southern. En todos los ADNs analizados se detectaron fragmentos de distinto tamaño molecular, indicando la existencia de fragmentos homólogos al locus *cph* de hámster desde levaduras hasta humanos. En la hibridación con ADN de *S. cerevisiae* se detectaron dos bandas de aproximadamente 10 y 3 kb utilizando como sonda el fragmento S6, mientras que esta misma sonda reconoció una banda única de 8 kb en el genoma de *S. pombe*. En las dos especies de roedores analizadas se observaron fragmentos homólogos de aproximadamente 5 kb. En cuanto a los análisis de ADN humano, se determinó la existencia de una banda de 20 kb, utilizando el fragmento B-1 como sonda en condiciones moderadas de hibridación. Cuando el mismo experimento se repitió en condiciones más relajadas, se observó una banda adicional de unas 25 kb.

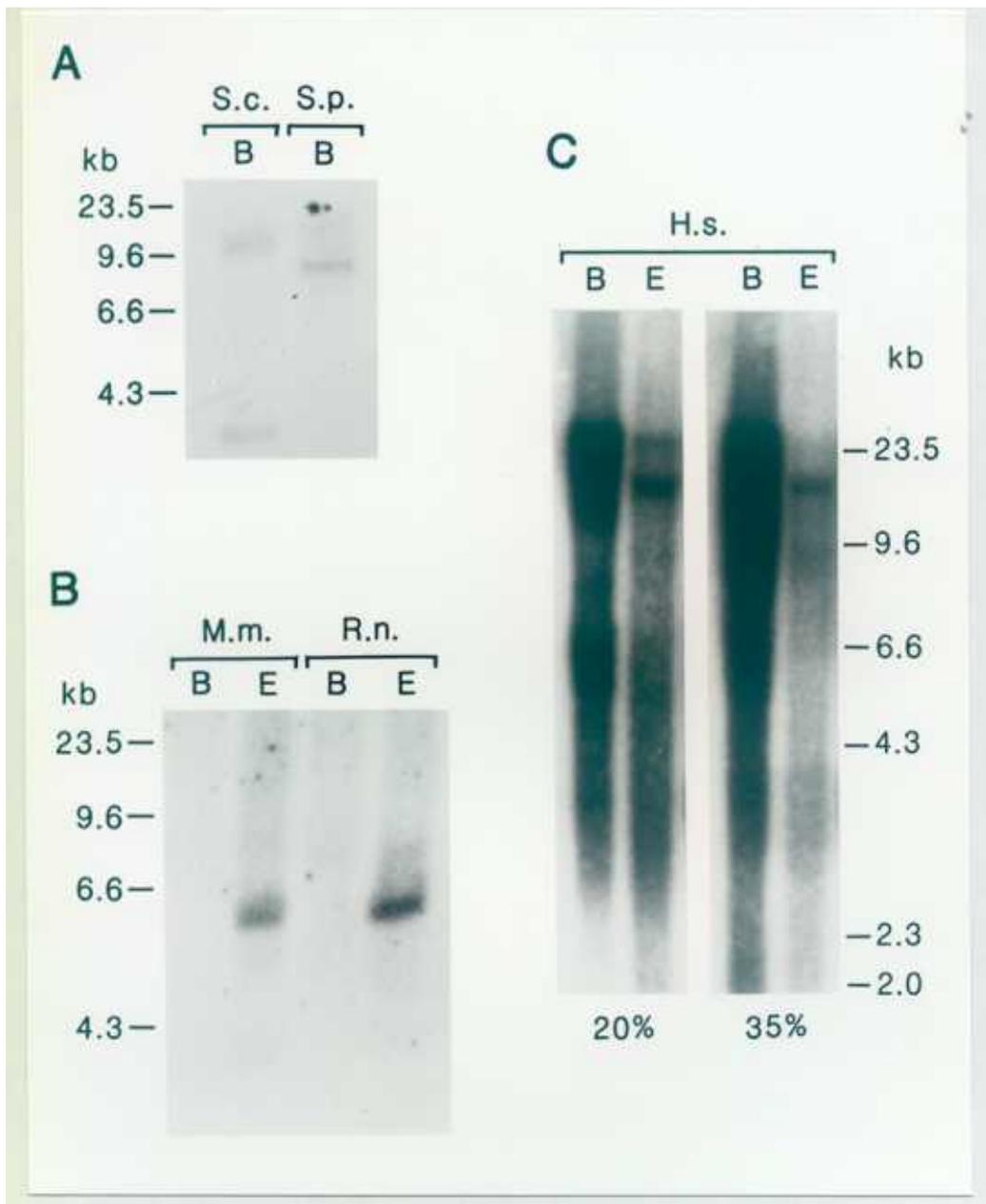


Figura 15. Conservación evolutiva del locus *cph*. En la fotografía se muestran los resultados del análisis de Southern con la sonda S6 (paneles A y B) y B-1 (panel C), partiendo del ADN total de levaduras (panel A), roedores (panel B) y humanos (panel C). Las muestras de levaduras (S.c., *Saccharomyces cerevisiae*; S.p., *Schizosaccharomyces pombe*) fueron digeridas con el enzima BamH I (B). Los ADNs de roedores (M.m., *Mus musculus*; R.n., *Rattus norvegicus*) y humanos (H.s., *Homo sapiens*) fueron digeridas con BamH I (B) y EcoR I (E). Las hibridaciones correspondientes a los paneles A y B se realizaron con una concentración de formamida en la solución de hibridación del 35%. En el panel C se muestran los resultados obtenidos en condiciones de hibridación moderadas (35%) y permisivas (20%). La migración de los marcadores de peso molecular se indica en todos los casos.

5.- Detección y aislamiento del ADN complementario (ADNc) derivado del locus *cph*.

La presencia de varias bandas en los análisis de ARN constituía una de las principales dificultades para la caracterización de *cph*. El patrón obtenido en los análisis de "Northern" podía significar la existencia de distintos elementos de una familia de genes relacionados, o podría obedecer a distintas formas de procesamiento procedentes de un gen único.

La identificación y caracterización de los ADNc asociados al locus *cph* fue llevada a cabo mediante la construcción de una genoteca de ADNc partiendo de ARN mensajero obtenido a partir de la línea celular transformada 81C39, como se describe en el apartado 7 de la sección de métodos. La detección de clones positivos se realizó analizando aproximadamente 25×10^5 placas de lisis transferidas a filtros de nitrocelulosa hibridados posteriormente con la sonda S6. La elección de esta sonda para el clonaje de los ADNc se basó en su patrón de hibridación en análisis de "Northern" y en la ausencia de elementos repetitivos que pudieran provocar hibridaciones inespecíficas.

Después de una exposición corta de los filtros se detectaron un total de 20 clones positivos en las autorradiografías. Todos ellos fueron seleccionados y sometidos a un segundo ciclo de hibridación que permitiera el aislamiento de placas de lisis individuales que contuviesen clones únicos. De los 20 clones obtenidos en la primera hibridación, 15 resultaron también positivos en el segundo ciclo de hibridación. Estos 15 clones positivos fueron convertidos en ADN plasmídico mediante escisión "in vivo", generando moléculas de pBluescript que contenían ADNc en forma de inserto. Todos los clones fueron amplificados en *E. coli* de donde se realizaron preparaciones de ADN plasmídico para su posterior análisis.

La caracterización inicial de los clones se llevó a cabo mediante digestión con diversos enzimas de restricción, a fin de confirmar la existencia de insertos y su tamaño molecular. Todos los clones poseían ADNs complementarios de un tamaño comprendido entre 1 y 4 kb. Un análisis preliminar con el enzima BamH I (**Figura 16A**), demostró la existencia de varias poblaciones de ADNc. Ocho clones aparecían

como fragmentos linearizados en la electroforesis, indicativo de la ausencia de sitio de restricción BamH I en los insertos (BamH I aparece como sitio único en el vector pBluescript). Los siete ADNc restantes presentaron al menos un sitio BamH I en su secuencia. La autenticidad de la señal obtenida en el proceso de clonaje fue reconfirmada repitiendo la hibridación con la sonda S6, aunque esta vez sobre un filtro de nitrocelulosa que contenía ADN de los 15 clones. Todos ellos resultaron positivos en el experimento (**Figura 16B**); sin embargo, la intensidad de la señal obtenida en la autorradiografía fue muy superior en tres de los quince clones, que fueron denominados 8, 13 y 19.

Estos resultados apoyaban la existencia de una posible familia de genes relacionados aislados mediante la hibridación con secuencias genómicas del locus *cph*. La intensa señal obtenida en los clones 8, 13 y 19 sugirió una mayor homología entre el fragmento genómico empleado como sonda y el ADNc de sus insertos respecto a los demás clones. Este hecho nos llevo a su caracterización en primera instancia.

La **Figura 17** muestra un análisis de restricción de los clones seleccionados, utilizando la endonucleasa Pvu II, pudiendo observarse que los clones 8 y 19 presentan el mismo mapa de restricción. De hecho, posteriormente se comprobó mediante secuenciación que los insertos de ambos clones eran idénticos. Por su parte, el clon 13 presentó un patrón de restricción diferente, con un inserto de mayor tamaño (2,5 kb frente a los algo menos de 2 kb de los clones 8 y 19). Cuando el inserto presente en el clon 13 fue secuenciado se comprobó la existencia de una reorganización en el extremo 3' del ADNc: la región con la secuencia T₇ había desaparecido y secuencias de ADN plasmídico aparecían en el inserto, resultado de una posible escisión incorrecta del bacteriófago. Como consecuencia, este clon fue descartado.

Se procedió por tanto a secuenciar completamente el inserto del clon 19 (denominado ADNc-*cph*19) como el primer ADNc asociado al oncogén *cph*. Dicha secuencia, iniciada a partir de los extremos T3 y T7 y continuada mediante el uso de cebadores internos, se determinó en ambas cadenas del ADNc, y aparece representada en la **Figura 18**. Se trata de un ADNc de 1727 pares de bases, clonado en los sitios de restricción EcoR I y Xho I del vector. El extremo 3' posee una cadena de 18 adeninas. La secuencia reconfirmó la existencia del sitio de restricción BamH I y la

localización de las dianas Pvu II.

A continuación, la secuencia de nucleótidos obtenida fue analizada para determinar la existencia de homologías con genes ya descritos. Para ello fue comparada con todas aquellas depositadas en las bases de datos del GeneBank y el EMBL con la ayuda del programa "Fasta" (*Pearson y Lipman, 1988*). El resultado de este análisis puso de manifiesto la ausencia de secuencias homólogas al ADNc-*cph19*, confirmando los resultados de la secuenciación de los fragmentos genómicos que permitieron el aislamiento del ADNc, y demostrando el hecho de que *cph* constituía un gen no descrito hasta la fecha.

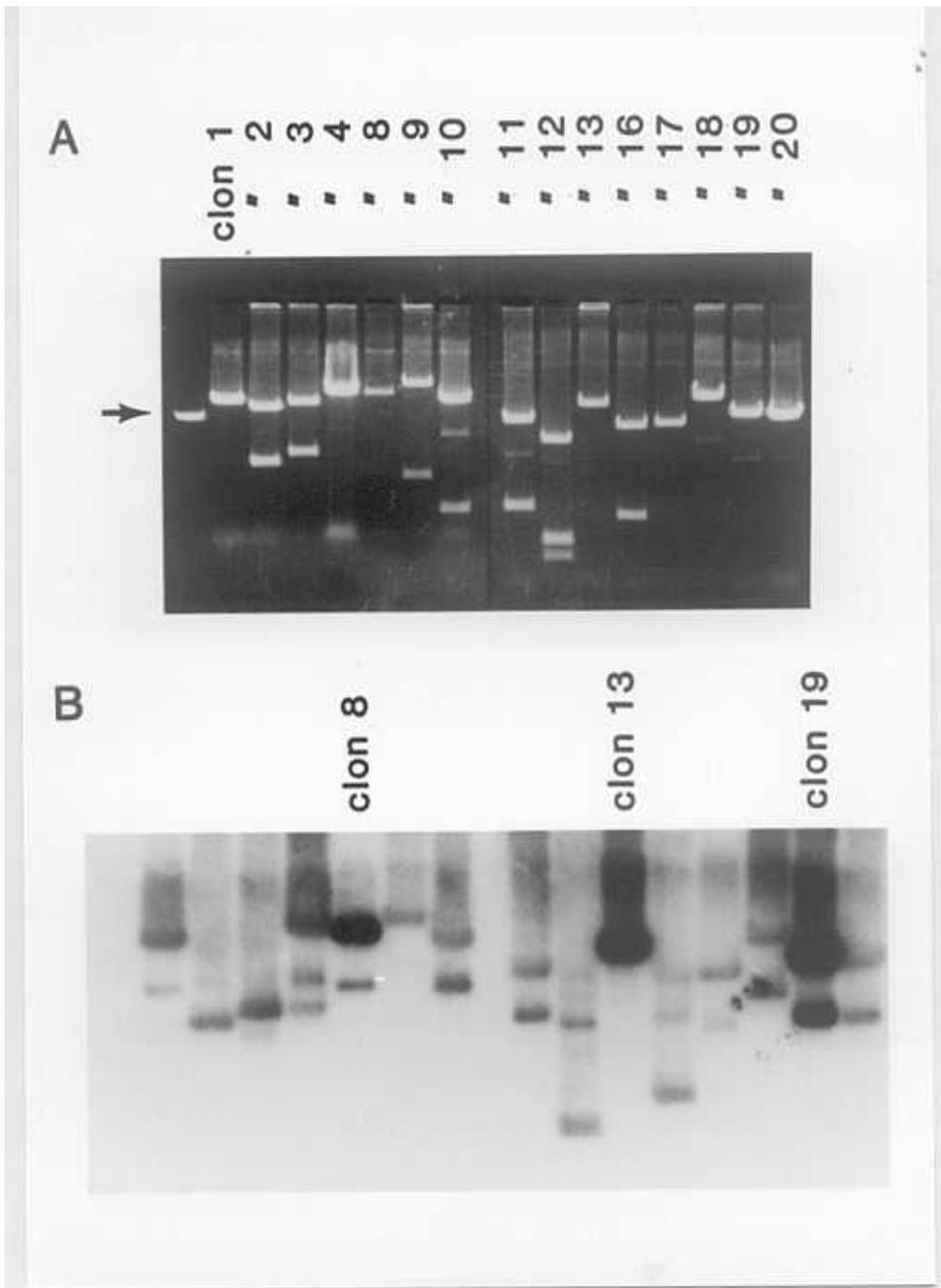


Figura 16: Confirmación de la presencia de secuencias homólogas a la sonda S6 en los clones aislados de la genoteca de ADNc de la línea celular 81C39. (A), fotografía del gel de agarosa donde se analizaron los 15 clones positivos mediante digestión con BamH I. La flecha indica la movilidad del plásmido pBluescript linearizado. La presencia de insertos correspondientes a ADNc se observó mediante la menor movilidad electroforética y/o la presencia de fragmentos adicionales. (B), análisis de Southern del mismo gel, hibridado con la sonda S6.

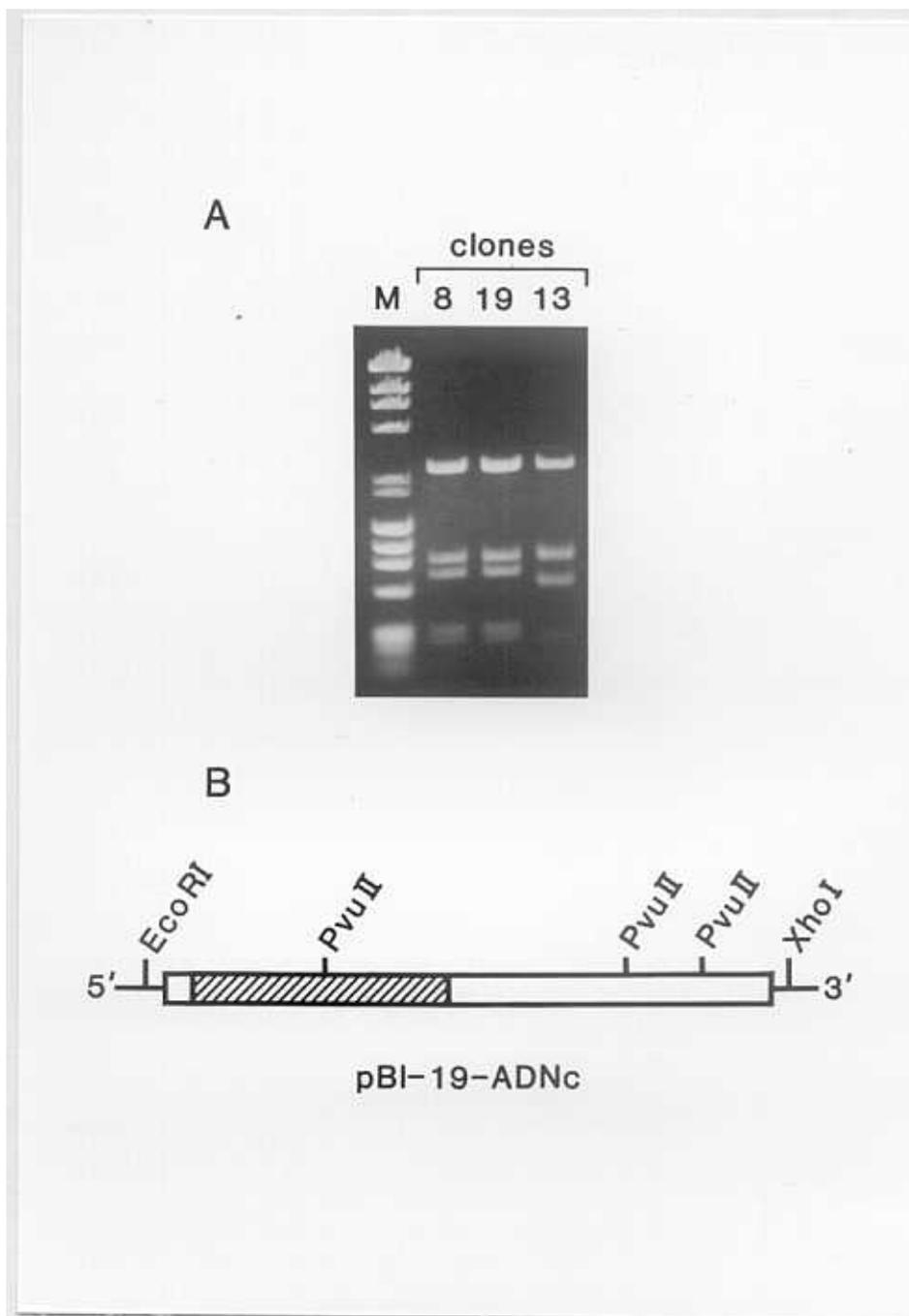


Figura 17: (A) Análisis de restricción de los clones 8, 13 y 19. Electroforesis de los fragmentos obtenidos después de la digestión de los clones con el enzima Pvu II. M: marcadores de peso molecular (ADN del bacteriófago λ digerido con Hind III y del ϕ x174 digerido con Hae III). (B) Mapa de restricción del inserto del clon 19. La región sombreada corresponde a la pauta de lectura abierta deducida después de la secuenciación completa del ADNc insertado en los sitios de restricción EcoR I y Xho I del plásmido pBluescript. La localización de las dianas para el enzima Pvu II se indica en el mapa.

```

1      TGTGAGCAACACTGCTGCAGCAGCAAAGGCTCAGGCCACATCCTGGGAA
51     GGACATGGCCACTCCCTGGGGTGCTGTCTTCTTCTGCTCATGATAGCCT
           M A T P W G A V F F L L M I A
101    GTGCTGGCAGCACTGTCTTCTACAGAGAACAGCAGACTTGGTTTCGAGGGC
           C A G S T V F Y R E Q Q T W F E G
151    GTCTTCTTGTCTTCCATGTGCCCCGCTAATGTGAGTCCAGCACCTTTTA
           V F L S S M C P A N V S A S T F Y
201    TGGAAATTATGTTTGTGCGGGCAGCACGGGAAGTCCGATTTCATGTTTATA
           G I M F D A G S T G T R I H V Y
251    CTTTCGTGCAGAAAGCAGCAGGACAGCTCCCCTTTCTGGAAGGTGAAATT
           T F V Q K A A G Q L P F L E G E I
301    TTTGATTCTGTGAAGCCAGGACTTTCTGCTTTTGCAGACCAACCCCAAGCA
           F D S V K P G L S A F A D Q P K Q
351    GGGTGCTCAGACTGTTTCATGCACTCTTAGAGGTGGCCAAAGACTCAATTC
           G A Q T V H A L L E V A K D S I
401    CCAGAAGTCACTGGAAAAGGACCCAGTGGTTCTGAAAGCAACAGCTGGA
           P R S H W K R T P V V L K A T A G
451    CTGCGTTTACTGCCTGAACAGAAGGCCAGGCTCTGCTCTTAGAGGTAGA
           L R L L P E Q K A Q A L L L E V E
501    GGAGATCTTCAAGATGTCACCTTCTGCTGGTCCCAGATGACAGTGTAGCA
           E I F K M S P F L V P D D S V S
551    TCATGGATGGGTCTATGAAGGCATATTAGCTTGGGTCACTGTGAACTTT
           I M D G S Y E G I L A W V T V N F
601    CTAACAGGTCAACTGCATGGCCACAGCCAGGAGACTATGGGGACCCTTGA
           L T G Q L H G H S Q E T M G T L D
651    CCTGGGGGTGCCTCCACCCAGATCACATTTCTACCCAGTTTCGAAAAC
           L G G A S T Q I T F L P Q F R K
701    CCTGGAACAAACACCTAGGGACTACCTCACTTCCCTTTGAGATGTTTAAAC
           P W N K H L G T T S L P L R C L T
751    GCACTTTTAAGCTCTATACACATAGTTACTTGGGATTTGGATTGAAAGCT
           A L L S S I H I V T W D L D *
801    GCAAGACTGGCAACCCTGGGAGCCCTGGAACAGAAGGGACCGATGGACA
           TACTTTTCGAAGTGCCTGTCTACCAAGATGGCTGGAAGCAGAGTGGATCT
901    TTGGGGGTGTGAAATATCAGTATGGTGGCAACCAAGAAGGGGAGATGGGC
           TTCGAGCCCTGCTATGCAGAAGTGCTGAGGGTGGTGCAGGGGAAACTGCA
1001   CCAGCCGGAAGAGATTCCGGGGAAGCTCCTTTTATGCCTTCTCCTACTATT
           ATGACCCGAGCTGCCGATACGCACTTGATTGATTATGAAAAGGGTGGTGT
1101   TAAAAGTTGAAGATTTTGAAGAAAAGCCAGGGAAAGTGTGTGATAACTT
           GGAGAGCTTCACTTCAAGCAGTCCCTTTCCTATGCATGGATCTCAGTTACA
1201   TCACGGCTTTATTTAAAAGATGGCTTTGGTTTTGCAGATGGGACCTTTTA
           CAGCTCACAAAGAAAGTGAACAACATAGAGACGGGCTGGCCTGGGGGCCA
1301   CCTTTCACCTGCTGCAGTCTCTGGGCATCTCCAGCTGAGGCTCAGCGTGC
           CCTTGGAAACCTGCACTTCTGAACTTCTTTTTACAGGAAGGAGAGGACTC
1401   GGGCATTCTTCTGCAACTACGCTGGCGAAAGCCTGGCCTGAAACCCATTGA
           CTGGCTTTATTAGGAGGGAGGGGTTTATAATGAGTGTGCCCCCTTGAGC
1501   CTAGTGATTTGGTCTTAATCAGTTTTGCACATCTAATGTGAACAGCTCCC
           TAACCACTTGGCAGGTGCACAGCTGGTGCCAGAGTACAAATCTTTTGAGA
1601   TTCTTTGTATGTACAGAGTCTGTGAAGAAAAAGAGTAGGTTTGGAACT
           CCATGTTAGATTGCGAGTTCAGAGATGGGTCAATGGGAACCAAGAAAAA
1701   TCTCATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 18: Secuencia de nucleótidos del ADNc derivado del locus *cph* (clon 19). La deducción de la estructura primaria de la proteína producto aparece alineada debajo de la pauta de lectura determinada dentro de la secuencia, y ha sido representada de acuerdo con el código de una sola letra.

6.- Síntesis "in vitro" de la proteína codificada por el ADNc-*cph19*. Búsqueda de dominios funcionales.

La ausencia de homologías significativas entre la secuencia de nucleótidos del ADNc contenida en el clon 19 y los genes depositados en las bases de datos no nos permitió obtener ninguna información acerca de la naturaleza del nuevo oncogén.

Con el fin de averiguar el posible papel biológico de esta nueva secuencia, se evaluó la posible existencia de una proteína codificada por el ADNc-*cph19*. Para ello su secuencia de nucleótidos se analizó buscando pautas de lectura capaces de dirigir la síntesis de cadenas polipeptídicas mediante el programa "Translate" (Devereux, 1989). Este programa determinó la presencia de una pauta abierta de lectura desde el nucleótido en la posición 55 hasta la posición 795, iniciada por un codón de iniciación ATG y finalizada por uno de terminación TGA. Esta región del ADNc, de 750 nucleótidos de extensión, poseía la información para codificar una cadena polipeptídica de 245 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 26 kDa. Esta secuencia ha sido representada igualmente en la **Figura 18**, alineando los codones del ADNc y los aminoácidos de la cadena polipeptídica.

Con el fin de comprobar la existencia real de esta proteína, la construcción portadora del ADNc-*cph19* se utilizó en reacciones de transcripción y traducción "in vitro", en las cuales el ADNc del inserto dirige la síntesis de un ARNm que es sustrato para la traducción de las posibles pautas de lectura contenidas en la secuencia. Esta técnica permite obtener la proteína cuya secuencia de aminoácidos ha sido deducida de manera teórica a partir de la secuencia de nucleótidos del ADNc.

Para transcribir el ADNc en sentido 5'-3' se utilizó el enzima ARN polimerasa T₇. El control negativo se realizó en las mismas condiciones con el plásmido pBluescript, circular y sin inserto alguno.

Como se observa en la **Figura 19**, el ADNc del clon 19 dirigió la síntesis de una proteína de un tamaño aproximado de 26 kDa, perfectamente distinguible y ausente en la reacción control. El resto de las bandas, presentes en ambas reacciones, correspondieron al procesamiento de pautas de lectura procedentes del plásmido

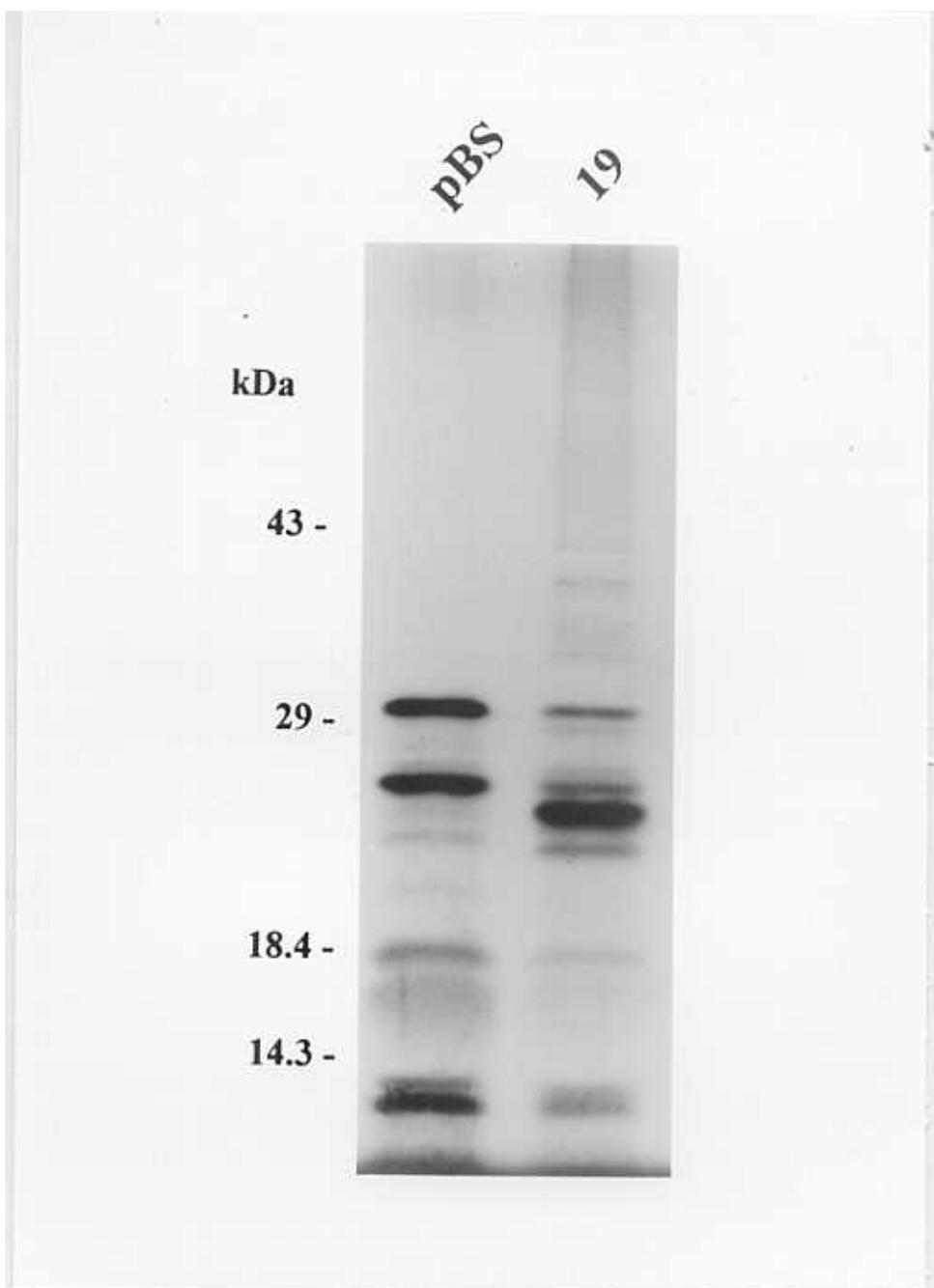


Figura 19: Transcripción y traducción "in vitro" del ADNc-*cph*. La construcción ADNc-*cph*19 (19) y el plásmido pBluescript (pBS) fueron utilizadas en experimentos de transcripción y traducción en una reacción única en presencia de metionina marcada radiactivamente. Los productos de la reacción se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5%. Los geles, después de ser secados, se expusieron sobre películas de rayos X. Una mezcla de proteínas de peso molecular conocido marcadas radiactivamente con ^{14}C se utilizó como marcador de peso molecular. La flecha indica la posición de la proteína sintetizada específicamente por el clon ADNc-*cph*19.

pBluescript. Estos resultados corroboraron los obtenidos en los análisis informáticos, indicando la existencia de una cadena polipeptídica real del mismo tamaño.

Una vez deducida la secuencia de aminoácidos y comprobada la existencia real de la proteína mediante transcripción y traducción "in vitro" investigamos la existencia de dominios funcionales en dicha secuencia, que al ser comparados con bases de datos pudieran proporcionar información de las funciones biológicas de *cph*. Tras la comparación con las bases de datos de proteínas "Swissprot" y "Pir-protein", se comprobó la existencia de una homología moderada con la proteína codificada por el oncogén *dbl*, concretamente con una región de ésta, denominada "dominio dbl" (**Figura 20**) y que comprende 231 aminoácidos de la región central. El grado de identidad de ambas secuencias alcanzó el 20%. Además, cuando se consideraron las sustituciones conservativas entre aminoácidos, la identidad entre el dominio *dbl* y la proteína codificada por el ADNc-*cph19* se elevó al 46%. La existencia de otras proteínas poseedoras de este dominio, con un nivel de homología similar al encontrado entre *dbl* y *cph* ha sido descrita para un grupo de genes reguladores del crecimiento, entre los que destacan *cdc-24* (Ron y cols., 1991), *tim* (Chan y cols., 1994), *ect2* (Miki y cols., 1993) y *vav* (Adams y cols., 1992). Los productos de estos genes han sido encuadrados en un grupo de proteínas reguladoras de la familia de proteínas con actividad GTP-asa o superfamilia ras.

Con objeto de identificar la zona de mayor homología dentro de esta región conservada se procedió a alinear la secuencia del dominio *dbl* con la secuencia deducida del ADNc-*cph19* y los otros miembros de este grupo de genes reguladores, en los cuales había sido definido recientemente la existencia de un subdominio más conservado (Chan y cols., 1994). El alineamiento de estos genes con *cph* reveló igualmente la existencia de este subdominio en el último gen (**Figura 21**). Concretamente la presencia de una secuencia consenso dentro de este subdominio, definida como fundamental para la actividad biológica de *dbl*, ha sido también localizada en *cph*.

```

dbl VLNELIQTERVYVRE----LYTVLLG--YRAEMDNPEMFDLMPPLLRNKK
:| . . . . | : || : . | : | : . . | : : . . . . :
cph LLMIACAGSTVIFYREQQTWFEGVFLSSMCPANVSASTFY-----

dbl DILFGNMAEIIYEFHNDIFLSSLENCAHAPERVGPFCFLERKDDFQMYAKYC
:| : | : | : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
cph GIMFD--AGSTGTRIHVYTFVQKAAGQLPFLEGEIFDSVKPGLSAFAD--

dbl QNQPRSETIWRKYSECAFFQECQRKL--KHRLRLDSYL-----LKPVQ
| | . . : | : | : : : . . : : : | : | . | : : : | : |
cph QPKQGAQTHV-----ALLEVAKDSIPRSHWKRTPVVLKATAGLRLLEPEQ

dbl RITKYQLLL--KELLKYSKDCEGSALLKKALDAMLDLLKSVNDSMHQIAI
: . . | | | . | : : | | . : : : | . : : | : : : : :
cph KAQ--ALLEVEEIKMSP-----FLVPDDSVSIMDGSYEGILAWVTV

dbl NGYIGNLNELGKMIMQGGFSVWIGHKKGATKMKDLARF-KPMQRHL
| . . | . | : : : . . | . . : : : : . | : . | | | . : | |
cph NFLTGQLHGHSQETMGT-----LDLGGASTQITFLPQFRKPWNKHL

```

Figura 20: Homología entre la secuencia del dominio *dbl* (*Ron* y *cols.*, 1991) y la proteína deducida del ADNc-*cph19*. La comparación se realizó mediante el programa "Fasta" (*Pearson y Lipman, 1988*), analizando la región central de la proteína codificada por el oncogén *dbl* y la secuencia deducida del ADNc-*cph19*. Los aminoácidos han sido representados de acuerdo con el código de una sola letra. La comparación ha sido representada de acuerdo con los siguientes símbolos: (|), aminoácidos idénticos; (:), sustituciones conservativas entre aminoácidos; (.), sustituciones semiconservativas. Los huecos introducidos en la secuencia para conseguir el alineamiento óptimo han sido representados por guiones (-).

<i>dbl</i>	R	L	R	L	D	S	Y	L	L	K	P	V	Q	R	I	T	K	Y	Q	L	L	L
<i>tim</i>	R	L	S	L	K	S	F	L	I	L	P	F	Q	R	I	T	R	L	K	L	L	L
<i>cdc</i>	K	L	E	L	Q	S	F	L	Y	K	P	V	Q	R	L	C	R	Y	P	L	L	V
<i>brc</i>	K	N	S	L	E	T	L	L	Y	K	P	V	D	R	V	T	R	S	T	L	V	L
<i>vav</i>	R	F	T	L	R	D	L	L	M	V	P	M	Q	R	V	L	K	Y	H	L	L	L
<i>grf</i>	E	R	T	L	E	T	F	L	T	Y	P	M	F	Q	I	P	R	Y	I	L	T	L
<i>ect2</i>	R	Q	S	L	V	E	L	L	I	R	P	V	Q	R	L	P	S	V	A	L	L	L
<i>cph</i>	T	A	G	L	R	-	L	L	-	-	P	E	Q	K	A	Q	-	-	A	L	L	L

Figura 21: Alineamiento de las secuencias correspondientes al subdominio *dbl* generado mediante el programa "Pileup" (Devereux, 1989). Las secuencias representadas corresponden al subdominio funcional definido para los oncogenes *dbl* (Ron y cols., 1991) y *ect2* (Miki y cols., 1993) e identificados en la secuencia de *cdc24*, *bcr*, *vav* (Chan y cols., 1994) y *ras-GRF* (Shou y cols., 1992). La secuencia obtenida a partir del ADNc-*cph19* ha sido alineada mediante la introducción de huecos (-) para conseguir la homología óptima. Los recuadros indican las secuencias consenso descritas en el subdominio *dbl* e identificados en la proteína *cph19*.

Discusión

1.- Estrategia para el aislamiento nuevas secuencias transformantes: clonaje del oncogén *cph*.

El principal obstáculo para el aislamiento de un nuevo tipo de secuencia transformante es la ausencia de una sonda específica que permita su detección. Este obstáculo ha sido solventado mediante el uso de sondas específicas correspondientes a elementos repetitivos que, dispersos por el genoma, cosegregan con la secuencia transformante en los ciclos sucesivos de transfección (*Shimizu y cols., 1985; Takahashi y col., 1985*). Esta estrategia es particularmente útil para la identificación de oncogenes humanos mediante transfección en células de ratón, debido a la existencia en el genoma humano de secuencias repetitivas denominadas *Alu*. Dichas secuencias poseen dos características fundamentales que han llevado a su utilización: (1), su amplia distribución a lo largo de todo el genoma humano (aproximadamente 1 millón de copias), de manera que todo fragmento de ADN con un tamaño superior a 10 Kb tiene una alta probabilidad de contener al menos uno de estos elementos, y (2), la secuencia *Alu* difiere sustancialmente de la de otros elementos repetitivos presentes en el genoma de roedores, permitiendo por tanto monitorizar la existencia de ADN humano en el genoma de los fibroblastos de ratón mediante hibridación (*Jurka y Smith, 1988; Korenberg y Rykowski, 1988*).

El aislamiento de secuencias transformantes activadas en el genoma de células de hámster presenta una dificultad adicional: debido a la proximidad evolutiva entre el genoma del hámster y el del ratón, la mayoría de los elementos repetitivos presentes en hámster están conservados en los demás grupos de roedores. Tal es el caso de los dos tipos de secuencias repetitivas más frecuentemente representadas en hámster, denominadas elementos G y B₁. En ambos casos, aunque su secuencia difiere de la descrita para otros elementos presentes en ratón, se obtiene hibridación cruzada entre ambas especies, impidiendo su utilización como marcador (*Miles y Meuth, 1989*).

Recientemente se ha descrito la existencia de un elemento repetitivo específico del genoma de hámster que no presenta hibridación cruzada con el ADN de células NIH/3T3 (*Diamond, datos no publicados*). Dicha secuencia, denominada HRS, ha sido

utilizada para monitorizar la presencia de ADN de hámster en las sucesivas transfecciones. Sin embargo, HRS está representada tan solo varios millares de copias por genoma, dificultando su detección en un tercer ciclo de transfección.

Teniendo en cuenta la baja probabilidad de que la secuencia transformante y el elemento repetitivo se localizaran próximos y pudiera por tanto aislarse la primera con la ayuda de la sonda HRS, se optó por construir una genoteca a partir de un transformante del segundo ciclo, mediante ligación del ADN de alto peso molecular en el cósmido pCV108. La genoteca fue nuevamente transfectada en fibroblastos NIH/3T3 para la obtención de focos de células transformadas. Dicha estrategia proporciona dos ventajas fundamentales:

(1) El cósmido posee un marcador de resistencia a neomicina que puede ser utilizado para confirmar la autenticidad de los focos obtenidos. Esta comprobación es fundamental cuando el periodo hasta la aparición de los focos se prolonga por espacios de tiempo superiores a tres semanas, como se ha descrito para algunos oncogenes (*Young y cols., 1986; O'Bryan y cols., 1991; Fazioli y cols., 1993*). En este periodo, se produce la aparición de focos espontáneos de transformación en las propias células NIH/3T3, resultado de mutaciones en el genoma y no de la adquisición de ADN exógeno en la transfección. Por tanto, la capacidad de los focos obtenidos en la transfección de crecer en medio suplementado con G418 fue comprobada sistemáticamente en todos los experimentos. En todos los casos, más de un 80% de los focos obtenidos resultaron resistentes a G418, consecuencia de la adquisición del ADN transfectado.

(2) La secuencia transformante introducida en un vector cósmídico puede ser rescatada con relativa facilidad de la línea celular. De esta forma, la presencia de elementos repetitivos, aunque confirmaría la identidad del ADN rescatado, no es indispensable para el aislamiento de la secuencia transformante.

La posibilidad de rescatar un fragmento de ADN después de haber sido transfectado está basada en la existencia de fenómenos de recombinación homóloga que, de acuerdo con la hipótesis más aceptada, tienen lugar después de la transfección y previamente a la integración del ADN en el genoma de la célula hospedadora (*Folger y cols., 1982*). La existencia de estos mecanismos de recombinación se demostró poco

después del descubrimiento de la transfección, a principios de la década de los ochenta, al comprobarse que las moléculas de ADN introducidas en una célula no se integraban de forma aislada y al azar en el genoma de la célula hospedadora, sino que por el contrario, éstas aparecían integradas en uno o escasos puntos, formando concatémeros, generalmente de dos moléculas de ADN dispuestas cabeza-cola. Este fenómeno era independiente de la técnica empleada para la introducción del ADN, ya fuera mediante transfección con fosfato cálcico (*Robins y cols., 1981*), fusión de protoplastos (*Saint Vincent y cols., 1981*), o microinyección directa del ADN en el núcleo celular (*Folger y cols., 1982*). Además, los últimos autores citados demostraron (utilizando el vector pBR322 en las microinyecciones) que la integración era independiente de que las moléculas de ADN a transfectar fueran circulares o hubieran sido linearizadas.

En los experimentos que condujeron al aislamiento del oncogén *mcf3*, *Birchmeier y cols., (1986)* también demostraron procesos similares de recombinación homóloga en cósmidos. Este oncogén fue aislado a partir de una línea celular transformada mediante ciclos de transfección en células NIH/3T3, comprobando que se trataba de un locus genómico de aproximadamente 70 kb. Debido a su gran tamaño molecular, el gen completo no pudo ser aislado en un cósmido único y en consecuencia, ningún clon fue capaz de reproducir el fenotipo transformante en experimentos de transfección. Estos mismos autores comprobaron que la cotransfección de tres cósmidos, cuyos insertos se expandían a lo largo de todo el locus *mcf3*, producía la aparición de focos de células transformadas. La importancia de estos sorprendentes resultados radicaba en el hecho de que en la célula hospedadora se producía la formación de una unidad *mcf3* intacta, producto de dos recombinaciones homólogas en las zonas de solapamiento de las tres construcciones.

Para el rescate de las secuencias transformantes partiendo de las líneas celulares obtenidas tras la transfección de la genoteca es necesario que se produzca la integración de la unidad transcripcional intacta, y ésta ha de quedar flanqueada por dos moléculas de cósmido, cada una de ellas portadora de un sitio de reconocimiento *cos*. La probabilidad de que se produzca este fenómeno ha sido evaluada por los propios diseñadores del vector pCV108, mediante experimentos de transfección y rescate del gen de la β -globina (previamente clonado en dicho cósmido) en células COS-7 (*Lau y*

Kant, 1983): todos los cósmidos rescatados en las reacciones de empaquetamiento eran portadores de insertos que contenían secuencias relacionadas con el gen de la β -globina. Además, el 20% de ellos presentaba un patrón de restricción idéntico al de los cósmidos que habían sido transfectados. El otro 80% contenía la mayoría del gen intacto.

Los protocolos descritos por *Lau y Kan, (1983)* para el rescate del gen de la β -globina de las células COS fueron aplicados en nuestro laboratorio para la recuperación del cósmido recombinante responsable de la transformación de los fibroblastos NIH/3T3 tras la transfección con el ADN de la genoteca. Para ello se extrajo el ADN total de varias líneas celulares procedentes de los focos de células transformadas. De las líneas celulares que resultaron positivas en las reacciones de empaquetamiento se obtuvieron varios tipos de cósmidos recombinantes, un 67% de los cuáles presentó idéntico mapa de restricción, sugiriendo la idea de que la secuencia transformante debería haberse mantenido intacta. Este hecho fue comprobado mediante transfección partiendo del ADN cósmido, análisis que reveló la capacidad oncogénica de los cósmidos "C". Este resultado descartaba la posibilidad de que la transformación hubiese sido provocada por la integración de un cósmido en un gen regulador de las células NIH/3T3 (por ejemplo un gen supresor) cuya disrupción hubiese desembocado en la transformación celular. En este hipotético caso sería posible rescatar cósmidos portadores de ADN de hámster aunque éstos no resultarían positivos en transfecciones posteriores.

Una vez comprobada la existencia de un oncogén en el cósmido C-5 se procedió a la obtención de sondas capaces de reconocer ARNm en análisis de "Northern" y cuya secuenciación revelara la identidad de la secuencia transformante. *Birchmeier y cols., (1986)* han utilizado aproximaciones experimentales similares para la identificación del oncogén *mcf3*. En nuestro caso fue necesario realizar previamente un mapa de restricción preciso para eludir la presencia de secuencias repetitivas de hámster en los subfragmentos obtenidos y utilizados como sondas.

La ausencia de homologías significativas entre las regiones secuenciadas del fragmento B1 y las bases de datos de secuencia indicaba que la secuencia transformante clonada en el cósmido C-5 era un nuevo gen no caracterizado hasta la fecha. Una vez

determinada su capacidad oncogénica fue denominado *cph*, siguiendo el criterio más aceptado de denominar a los oncogenes con tres letras, iniciales bien de la línea celular o del tumor del que fueron aislados, o del sistema experimental que permitió su identificación.

El clonaje del oncogén *cph* confirma las hipótesis de *Borek y cols., (1987)* y *Gilmer y cols., (1988)* de que oncogenes distintos de *ras* pueden ser activados en fibroblastos embrionarios de hámster iniciados neoplásicamente mediante carcinogénesis experimental y prueba la hipótesis planteada por *Notario y cols., (1990)* de que un nuevo tipo de secuencia transformante es la responsable de la transformación neoplásica de los fibroblastos 81C39. Recientemente, la detección de mutaciones puntuales en el gen supresor tumoral *p53* en el mismo modelo experimental (*Albor y cols., 1994*) confirma la validez del sistema de hámster para el análisis molecular de los genes implicados en la carcinogénesis.

Para determinar el mecanismo de activación del oncogén *cph* las sondas procedentes de B1 fueron utilizadas en análisis de "Northern" y Southern. La detección de un patrón complejo en los análisis de "Northern" puso de manifiesto la posibilidad de que *cph* perteneciese a una familia de genes relacionados entre sí como se ha descrito para los oncogenes *ras*, *trk* o *erbB* (*Barbacid, 1987; Barbacid, 1993; Carraway III y Cantley, 1994*), circunstancia que dificulta la determinación del mecanismo de activación. Como se ha descrito en el capítulo correspondiente a la introducción, las causas más frecuentes de activación oncogénica son la presencia de mutaciones puntuales (*Reddy y cols., 1982; Bargmann y cols., 1986*), la reorganización génica (*Eva y Aaronson, 1985; Martín-Zanca y cols., 1986*) y los procesos de amplificación (*Sakamoto y cols., 1986*). La detección de niveles similares de expresión de ARNm en la línea celular normal de hámster (84-3) y en la transformada (81C39) sugieren que la sobreexpresión génica no es la causa de activación de *cph*. Además, el hecho de que en ambos casos se detectaran las mismas especies de mensajeros sugirió que no se habían producido recombinaciones del locus *cph* en la conversión neoplásica de las células 81C39. Este hecho fue confirmado mediante análisis de Southern, y a diferencia de los casos publicados por *Martín-Zanca y cols., (1986)* y *Testa y cols., (1990)* (donde se describen alteraciones en los análisis de Southern para

los oncogenes *trk* y *met*), los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron que aparentemente no se ha producido ninguna reorganización en el locus *cph* en la línea celular 81C39. Por tanto, la existencia de mutaciones puntuales (no detectables mediante "Northern" o Southern) parece la causa más probable de activación, aunque este hecho sólo podrá ser demostrado después del clonaje y el análisis comparativo de todos los ADNc derivados del locus genómico *cph*, tanto de las células normales como de las neoplásicas.

2.- Actividad biológica del oncogén *cph*: cooperatividad entre *cph* y *H-ras* en la transformación de fibroblastos NIH/3T3.

La actividad oncogénica del cósmido C-5 fue analizada en experimentos de transfección, determinando una eficiencia de transformación moderada (entre 4 y 5 focos/ μ g ADN). El periodo necesario para la aparición de los focos (alrededor de cuatro semanas) fue superior a la media descrita para otros oncogenes (*Takahashi y cols.*, 1985; *Coppola y cols.*, 1991; *Chan y cols.*, 1993a). Sin embargo hay que considerar que muchos de estos resultados no han sido realizados con clones genómicos, sino obtenidos partiendo de los ADNc transformantes de mucho menor tamaño (lo que facilita su introducción en las células) y cuya transcripción está dirigida por un fuerte promotor (*Janssen y cols.*, 1991; *Chan y cols.*, 1993a; *Chan y cols.*, 1994; *Toksoz y Williams*, 1994). En este sentido, las eficiencias de transformación disminuyen mucho cuando las transfecciones se realizan con ADN genómico, hasta el punto que para el caso del oncogén *cot*, cuyo ADNc posee una elevada capacidad transformante, no se ha podido aislar ningún clon genómico con potencial oncogénico (*Miyoshi y cols.*, 1991).

Una vez determinada la capacidad transformante del oncogén *cph* en ensayos de transfección se procedió a analizar su posible interacción con otros oncogenes, en busca de mecanismos de transformación sinérgicos. La existencia de estos mecanismos de cooperación fue descrita inicialmente por *Rassoulzadegan y cols.* (1982), al comprobar que dos oncogenes de origen viral (denominados *MT* y *LT*) eran capaces de provocar la transformación neoplásica de fibroblastos embrionarios de rata. Sin embargo, ninguno de ellos de forma individual producía tal efecto, lo que indicaba que ambos contribuían parcialmente a la aparición del fenotipo transformado. La misma observación fue comprobada posteriormente para otros oncogenes, hasta el punto de proponerse un modelo que definía la necesidad de al menos dos oncogenes para inducir la transformación de fibroblastos primarios (*Land y cols.*, 1983).

El caso de cooperatividad mejor estudiado lo constituye el sinergismo entre *ras* y *myc* en la transformación de fibroblastos de rata. Ninguno de ellos produce de

manera individual el fenómeno observado cuando ambos son transfectados en combinación. De acuerdo con *Land y col. (1986)*, dicho comportamiento se debería a la participación de los dos oncogenes en estadios diferentes del desarrollo tumoral. Así, *myc* contribuiría inicialmente al proceso de inmortalización de las células primarias, mientras que *ras* participaría en fases posteriores del proceso neoplásico favoreciendo la progresión tumoral. Basándose en estas observaciones, *Weinberg (1989)* propuso una clasificación de ciertos oncogenes en dos categorías, dependiendo de su capacidad para cooperar con *ras* o *myc* en la transformación de fibroblastos primarios. Un primer grupo sería el constituido por H-, N- y K-*ras*, *src*, *ros*, *yes* y otros oncogenes citoplásmicos. El segundo grupo lo formarían N- y L-*myc*, *p53* y la oncoproteína E-7 de papilomavirus, capaces de cooperar con elementos del primer grupo.

La cooperatividad entre distintos oncogenes también ha sido analizada en fibroblastos NIH/3T3. Estas células inmortalizadas son susceptibles de transformación por un único oncogén. Sin embargo, la transfección combinada de dos oncogenes puede provocar un aumento en el número de focos de células transformadas, muy superior al producido por cada oncogén por separado. De esta manera se definió la existencia de un mecanismo de cooperatividad entre *cph* y *ras*. Cada uno de ellos indujo por separado la formación de focos de transformación en ensayos de transfección. Sin embargo, mientras que los focos originados por *ras* fueron visibles dos semanas después de la transfección, los producidos por *cph* tardaron hasta cuatro semanas en aparecer. Algunos autores describen eficacias de transformación para el oncogén *ras* superiores a las obtenidas en nuestros experimentos (*Santos y cols., 1982; Toksoz y Williams, 1994*). Esta discrepancia puede deberse a la diferencia en el número de células de la población transfectada. Mientras en la mayoría de los protocolos de transfección se parte de una población celular superior a 10^6 células, nuestras transfecciones se realizaron en placas con tan sólo $2,5 \times 10^5$ células, con el fin de reducir el índice de transformación espontánea de los propios fibroblastos NIH/3T3.

Los resultados de los experimentos de cooperatividad entre *cph* y *ras* mostraron un incremento de seis órdenes de magnitud en la capacidad transformante del oncogén *ras* cuando es cotransfectado con *cph*. Además, el efecto fue claramente visible en tan sólo dos semanas, resultados que suponen un incremento de la capacidad oncogénica

de *cph* en presencia de *ras* de casi 20 ordenes de magnitud. Resultados similares han sido descritos por Cuadrado y cols., (1993) en cotransfecciones de *ras* y *raf* en las propias células NIH/3T3, determinando que *raf* multiplica en más de diez veces el efecto transformante de *ras*. Sin embargo, este efecto ha sido observado únicamente cuando éste último oncogén es transfectado en bajas concentraciones ya que la transformación provocada por altos niveles de expresión de *ras* no puede llegar a ser amplificada por *raf*.

Una posible explicación para estos fenómenos de cooperación puede encontrarse en el contexto de los mecanismos de transducción de las señales que producen la respuesta mitogénica. Dicha respuesta se produce de manera desregulada como consecuencia de un acúmulo de alteraciones en diferentes estadios de la transmisión de la señal. Los estudios de cooperatividad entre oncogenes han contribuido a identificar genes mediadores de las respuestas de proliferación así como las rutas a través de las cuales actúan. De esta manera, Cuadrado y cols., (1993), a la vez que definieron el sinergismo entre *ras* y *raf*, demostraron que otros genes que codifican la síntesis de enzimas reguladores de segundos mensajeros implicados en respuestas mitogénicas no amplificaban la capacidad transformante de *ras* en experimentos de transfección. Tal es el caso de la fosfolipasa C- γ y proteína quinasa C- γ , demostrando la especificidad de *raf* en la transmisión de las señales mediadas por *ras*. Recientemente se ha comprobado que dicha especificidad se produce mediante la participación directa de ambos genes en la misma ruta de transmisión de las señales extracelulares al núcleo celular (Stokoe y cols., 1994).

También han sido descritos casos de cooperatividad implicando oncogenes que comparten homologías parciales con *cph*. Este es el caso de la cooperación con *ras* de los oncogenes *dbl* y *vav*, ambos poseedores del denominado "dominio *dbl*" (Ron y cols., 1991). Sin embargo, y refiriéndonos concretamente a *vav*, la cooperatividad no se produce por la participación de los dos oncogenes en la misma ruta de transmisión de la señales. Este hecho ha sido demostrado recientemente por Bustelo y cols., (1994), al comprobar que la capacidad transformante de *vav* es independiente de la actividad de *ras*, en experimentos realizados bloqueando la actividad de la proteína p21^{ras} y

determinando la capacidad transformante de *vav*. Estos resultados indican que al menos en los fibroblastos NIH/3T3 (donde estos experimentos han sido realizados) la actividad mitogénica de *vav* está mediada por una ruta de transmisión no dependiente de *ras*.

La determinación de la ruta de transmisión de las señales por parte de *cph* y la implicación directa o indirecta de *ras* en dicha ruta permanecen aún sin resolver. *Bustelo y cols.*, (1994), han definido una serie de criterios morfológicos para apoyar el hecho de que dos genes participen o no en la misma ruta de transmisión: así por ejemplo, las células transformadas por *ras* son fusiformes, refringentes y crecen de forma entrecruzada y desordenada. Este fenotipo es similar al de las células transformadas por *cdc25*, gen cuya proteína actúa como activador en la misma ruta de transmisión. Sin embargo, las células transformadas por el oncogén *vav* no son refringentes, forman focos muy densos y se observan a menudo células gigantes multinucleadas. Tomando en consideración estos criterios morfológicos podemos afirmar que las células transformadas por *cph* difieren en su morfología de aquellas transformadas por *ras*, sobre todo en el hecho de que la aparición de células gigantes multinucleadas es un fenómeno relativamente frecuente. Sin embargo, la determinación de la ruta de transmisión de las señales por las que *cph* conduce a la respuesta mitogénica y la explicación del sinergismo con el oncogén *ras* no pueden definirse hasta que se realicen ensayos bioquímicos partiendo de la proteína producto del oncogen *cph*.

3.- Conservación evolutiva del locus *cph*: detección de genes homólogos en levaduras y humanos.

Un alto grado de conservación evolutiva ha sido considerado como una propiedad de aquellos genes con funciones esenciales para la célula, frecuentemente relacionadas con la regulación del ciclo celular. Numerosos genes implicados en los procesos de transformación han sido localizados en la escala filogenética desde levaduras hasta humanos. Tal es el caso del gen humano *eps15*, capaz de transformar fibroblastos NIH/3T3 mediante sobreexpresión del ADNc, y al que Wong y cols., (1994) atribuyen un papel en la regulación del crecimiento celular debido a su conservación evolutiva y a su expresión generalizada en todos los tejidos.

Con el fin de determinar el grado de conservación evolutiva del oncogén *cph*, se han realizado análisis de Southern utilizando sondas procedentes del locus genómico, encaminados a la búsqueda de genes relacionados en levaduras y humanos. Si bien el interés de determinar la presencia de genes homólogos en humanos resulta obvio, la detección de genes homólogos en levaduras también es relevante al permitir en muchas ocasiones un mejor estudio de la función del gen, debido a la mayor facilidad que presentan estos microorganismos para realizar análisis genéticos. La trascendencia de la caracterización de los genes reguladores del ciclo celular presentes en levaduras, y su relación con la biología molecular del cáncer ha sido demostrada recientemente en el descubrimiento del gen supresor *MTS1* (Kamb y cols., 1994), cuya alteración podría constituir una de las causas más frecuentes en la etiología del cáncer humano. El análisis de la secuencia de *MTS1* puso de manifiesto que se trataba del gen homólogo a un gen aislado pocos meses antes en *Schizosaccharomyces pombe* (Serrano y cols., 1993), y cuya proteína, denominada p16, actúa como inhibidor del ciclo celular.

Sin embargo el grado de conservación evolutiva tanto de oncogenes como de genes supresores en levaduras es muy variable. Así por ejemplo, mientras *ras* aparece perfectamente conservado en *S. cerevisiae* y *S. pombe* (Barbacid, 1987), todos los intentos de identificar genes homólogos a *p53* en estas dos especies de levaduras han resultado negativos (Soussi y cols., 1990). En nuestro caso, los estudios de

conservación evolutiva nos han llevado a la definición de genes homólogos al oncogén *cph* tanto en *Saccharomyces cerevisiae* como en *S. pombe*. Concretamente la existencia de un fragmento de 9 kb en el genoma de *S. pombe* supone la posibilidad de que la totalidad del gen homólogo pueda ser clonada con relativa facilidad. Su aislamiento y el análisis de la función en esta levadura de fisión constituyen una de las prioridades en la continuación del presente proyecto. Por otra parte es interesante indicar que el mismo gen en especies distintas puede tener una función diferente. Este es el caso del gen *ras*, para el que han sido definidos funciones muy diferentes en *S. cerevisiae* y *S. pombe*. Así, mientras los dos genes *ras* caracterizados en *S. cerevisiae* (*ras1* y *ras2*) son esenciales para el crecimiento al estar implicados en la actividad adenilato ciclasa y por tanto en el control de los niveles de AMPc (Toda y cols., 1985), la función del homólogo en *S. pombe* no parece regular los niveles de AMPc y aunque su participación es esencial para la conjugación y la esporulación, su actividad no es indispensable para el crecimiento vegetativo (Nadin-Davis y cols., 1986).

Por su parte la detección de secuencias homólogas en el genoma humano reafirma la existencia de un gen relacionado. Es interesante destacar que en función de las condiciones de hibridación pueden detectarse una o dos bandas fundamentales en el análisis de Southern, resultados que apuntan a la existencia de dos genes, posiblemente miembros de una misma familia. Esta circunstancia, unida al complejo patrón de hibridación en los análisis de ARN de hámster, apunta a la necesidad de caracterizar en primera instancia todos los genes asociados al oncogén *cph* en el modelo de hámster (con el fin de identificar el gen transformante de la línea celular 81C39) antes de abordar el estudio de los genes homólogos al locus *cph* de hámster en humanos.

4.- *cph* como miembro de la familia de proteínas reguladoras de GTP-asas.

Una de las estrategias más comunmente utilizadas para la caracterización de nuevos oncogenes en los últimos años ha sido el aislamiento de sus ADNc. Mediante el análisis del ADNc es posible obtener información de la naturaleza de la proteína codificada por un determinado oncogén, así como generar líneas celulares con altos niveles de expresión de dicha proteína. Estas dos posibilidades son técnicamente mucho más difíciles de llevar a cabo partiendo del locus genómico (de mucho mayor tamaño debido a la presencia de intrones), circunstancia que ha provocado que para muchos oncogenes (entre los que podemos citar *cot*, *tim* o *lbc*) sólo se haya descrito y caracterizado el ADNc sin que existan referencias de la estructura de sus respectivos loci genómicos (Miyoshi y cols., 1991; Chan y cols., 1994; Toksoz y Williams, 1994).

Después de la secuenciación de distintas regiones del oncogén *cph* y de la obtención de sondas genómicas se procedió al aislamiento de los ADNc derivados de este nuevo locus partiendo de una genoteca de la línea celular 81C39. Como consecuencia ha sido posible el clonaje del primer ADNc derivado del *cph* (ADNc-*cph*19). La secuenciación completa de este clon reveló una pauta de lectura capaz de codificar una proteína de un peso molecular teórico de 26 kDa, partiendo del primer codón de iniciación ATG situado en posición +55 (ver figura 18). La presencia de otros codones de iniciación en la misma pauta de lectura (concretamente en las posiciones 91, 166 y 208) planteaba la posibilidad de que la proteína real fuera más pequeña que la deducida teóricamente, si alguno de estos codones internos era el verdadero iniciador de la traducción. En este sentido, Kozak (1981) ha definido la existencia de una secuencia consenso localizada alrededor del codón ATG para que éste pueda actuar eficientemente como iniciador de la traducción (xxA/GxxATGG). En el caso del ADNc-*cph*19, una secuencia consenso favorable para la iniciación ha sido determinada tan sólo alrededor del primer ATG (agGacATGG), mientras que no ha sido identificada en los otros tres codones internos.

La existencia real de la proteína deducida previamente mediante análisis

informático fue confirmada aplicando los protocolos de transcripción y traducción "in vitro". Esta técnica ha sido aplicada en nuestro laboratorio (*Laborda y cols., 1993; Velasco y cols., 1993*) y en otros muchos grupos para la identificación de proteínas cuya secuencia ha sido deducida de manera teórica. Mediante estas técnicas se han sintetizado entre otros los productos de los oncogenes *cot*, *tim* y *eps15* (*Miyoshi y cols., 1991; Chan y cols., 1994; Fazioli y cols., 1993*). En nuestro caso, la obtención de una proteína de un tamaño aproximado de 26 kDa partiendo del ADNc-*cph-19* reconfirmó la existencia real de la proteína deducida.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el ADNc-*cph19* y la búsqueda de dominios funcionales reveló la existencia de una zona de homología entre la práctica totalidad de la secuencia *cph* y una región de la proteína producto del oncogén *dbl*. Esta región (denominada "dominio *dbl*") ha sido encontrada en la secuencia de los oncogenes *ect2*, *vav*, *tim*, en la proteína denominada ras-GRF así como en la proteína *cdc24* de *S. cerevisiae* (*Ron y cols., 1991*). Los productos de todos estos genes han sido encuadrados dentro de un subgrupo de proteínas reguladoras de las denominadas proteínas pequeñas con capacidad de unión a nucleótidos de guanina ("small GTP-binding proteins") (*Hall, 1990*). Estas proteínas (entre las que se encuentran los productos de los protooncogenes H-, N- y K-*ras*) tienen una función fundamental en la transmisión de las señales extracelulares en los procesos de división, crecimiento y diferenciación celular (*Chardin, 1991*). Su acción como mediadores en estas rutas de transmisión está basada en su capacidad de unir e hidrolizar nucleótidos de guanina, alternando entre una conformación activa (cuando están unidas a GTP) y una pasiva (cuando lo están a GDP) (*Satoh y cols., 1992*).

La regulación de estas proteínas con capacidad de unirse a nucleótidos de guanina se realiza en la célula mediante el control del paso de la forma activa a pasiva y viceversa. Este control es realizado por tres grupos de mediadores: (1), proteínas GAP ("GTPase activating proteins") que estimulan la hidrólisis del GTP unido a GDP, provocando la inactivación de una proteína que une GTP (*Downward, 1992*); (2), proteínas GDI ("GDP-dissociation inhibitors") que provocan la inactivación de una proteína que une GTP en ausencia de estímulo externo, al impedir la disociación del GDP y (3), GEF ("GDP/GTP exchange factors"), que promueven el intercambio del

GDP unido por GTP, potenciando por tanto la transmisión de la señal al mantener la proteína que une GTP en su conformación activa.

El producto del oncogén *dbl* posee actividad GEF, al ser capaz de mantener activada la proteína cdc42Hs, otro miembro de la familia Rho de proteínas que unen GTP (*Hart y cols., 1991*). Es más, recientemente ha sido demostrado que esta actividad está mediada por la secuencia de la proteína correspondiente al subdominio *dbl* (*Hart y cols., 1994*). La existencia de actividad GEF ha sido también demostrada para *ect2* (*Miki y cols., 1993*) y *ras-GRF* (*Shou y cols., 1992*). Por lo tanto, la presencia del dominio *dbl* en la secuencia de la proteína *cph* convierte a esta última en un claro candidato a pertenecer a la familia de proteínas reguladoras de GTP-asas mediante su capacidad intercambiadora de GDP/GTP.

Sin embargo, la sola presencia de esta secuencia consenso definida como dominio *dbl* no es suficiente para demostrar su actividad como GEF sobre *ras*, circunstancia recientemente demostrada por *Bustelo y cols., (1994)* para el oncogén *vav*. Si bien la cooperatividad descrita entre el oncogén *cph* y *ras* apoya la hipótesis de que ambos participen en la misma ruta de señalización, la verdadera definición de *cph* como un gen implicado en la regulación de la superfamilia de proteínas *ras* requiere la demostración de la capacidad funcional de su proteína. Este y otros objetivos constituyen las líneas de continuidad del presente proyecto, encaminado finalmente a definir la función biológica de este nuevo gen en el complejo entramado de genes reguladores de la proliferación celular.

Conclusiones

- Partiendo de una línea celular transformada químicamente con 3-metilcolantreno ha sido aislada una secuencia transformante capaz de producir la conversión neoplásica de fibroblastos NIH/3T3 mediante transfección. El aislamiento de esta secuencia transformante ha sido realizado mediante la aplicación de técnicas de rescate cósmico a partir de una genoteca de transfectantes del segundo ciclo.
- Mediante la secuenciación de regiones transcripcionalmente activas se ha determinado que la secuencia transformante clonada en el cósmido C-5 es un gen no descrito hasta la fecha. En consecuencia, ha sido denominado como el oncogén *cph*, utilizando las iniciales del sistema experimental que permitió su detección ("Carcinogenic Progression in Hamster cells")
- El cósmido portador del oncogén *cph* es capaz de provocar la transformación de fibroblastos NIH/3T3 mediante transfección. Este oncogén posee además un efecto sinérgico con el oncogén *H-ras* resultante en un aumento en la capacidad transformante de ambos oncogenes cuando son transfectados en combinación.
- Secuencias homólogas al oncogén *cph* de hámster han sido detectadas en la escala filogenética en distintas especies de levaduras, roedores y humanos, demostrando su alto nivel de conservación evolutiva.
- Mediante el análisis de una genoteca de ADNc de la línea celular 81C39 ha sido clonado el primer ADNc derivado del locus genómico *cph*. Este ADNc posee una pauta de lectura de 740 nucleótidos capaz de dirigir la síntesis de una proteína de un peso molecular de 26 kDa. La existencia de esta proteína ha sido confirmada mediante transcripción y traducción "in vitro".

- La secuencia de aminoácidos deducida de la proteína cph posee una homología parcial con el producto del oncogén *dbl*, concretamente con una región de éste caracterizada como "dominio dbl". El hecho de que el dominio dbl haya sido definido para un grupo de proteínas con función reguladora de las denominadas proteínas con capacidad de unión a GTP convierte a cph en un posible miembro de la familia de proteínas reguladoras de GTP-asas.

Bibliografía

- Adams, J.M., Houston, H., Allen, J., Lints, T., Harvey, R. (1992). The hematopoietically expressed *vav* proto-oncogene shares homology with the *dbl* GDP-GTP exchange factor, the *bcr* gene and a yeast gene (*CDC24*) involved in cytoskeletal organization. *Oncogene* 7, 611-618.
- Albor, A., Flessate, D.M., Soussi, T., Notario, V. (1994). 3-methylcholantrene inactivates the p53 gene in syrian hamster embryo fibroblasts by inducing a specific intronic point mutation. *Cancer Res.* 54, 4502-4507.
- Avila, M.A., Otero, G., Cansado, J., Dritchilo, A., Velasco, J.A., Notario, V. (1993). Activation of phospholipase D participates in signal transduction pathways responsive to gamma-radiation. *Cancer Res.* 53, 4474-4476.
- Avila, M.A., Velasco, J.A., Smulson, M.E., Ditschilo, A., Castro, R., Notario, V. (1994). Functional expression of human Poly(ADP-Ribose) polymerase in *Schizosaccharomyces pombe* results in mitotic delay at G₁, increased mutation rate, and sensitization to radiation. *Yeast* 10, 1003-1017.
- Barbacid, M. (1987). *ras* genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 779-827.
- Barbacid, M. (1993). Nerve growth factor: a tale of two receptors. *Oncogene* 8, 2033-2042.
- Bargmann, C.I., Hung, M.C., Weinberg, R.A. (1986). Multiple independent activations of the *neu* oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* 46, 649-657.
- Berwald, Y., Sachs, L. (1965). "In vitro" transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.* 35, 641-661.
- Bilofsky, H.S., Burks, C. (1988). The GeneBank (R) genetic sequence data bank. *Nucleic Acids Res.* 16, 1861-1864.
- Birchmeier, C., Birnbaum, D., Waiches, G., Fasano, O., Wigler, M. (1986). Characterization of an activated human *ros* gene. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3109-3116.
- Borek, C., Ong, A., Mason, H. (1987). Distinctive transforming genes in x-ray-transformed mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 794-798.
- Brooks, B.J., Battery, J., Nau, M.M., Gazdar, F.F., Minna, J.D. (1987). Amplification and expression of the *myc* gene in small-cell lung cancer. *Adv. Viral Oncol.* 7, 155-172.
- Bustelo, X.R., Suen, K.L., Leftheris, K., Meyers, C.A., Barbacid, M. (1994). Vav cooperates with Ras to transform rodent fibroblasts but is not a Ras GDP/GTP exchange factor. *Oncogene* 9, 2405-2413.

- Carraway III, K.L., Cantley, L.C. (1994). A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell* 78, 5-8.
- Chan, A.M.L., Chedid, M., McGovern, E.S., Popescu, N.C., Miki, T., Aaronson, S.A. (1993a). Expression cDNA cloning of a serine kinase transforming gene. *Oncogene* 8, 1329-1333.
- Chan, A.M.L., Fleming, T.P., McGovern, E.S., Chedid, M., Miki, T., Aaronson, S.A. (1993b). Expression cDNA cloning of a transforming gene encoding the wild-type G α 12 gene product. *Mol. Cell. Biol.* 13, 762-768.
- Chan, A.M.L., McGovern, E.S., Catalano, G., Fleming, T.P., Miki, T. (1994). Expression cDNA cloning of a novel oncogene with sequence similarity to regulators of small GTP-binding proteins. *Oncogene* 9, 1057-1063.
- Chardin, P. (1991). Small GTP-binding proteins of the Ras family: a conserved functional mechanism?. *Cancer Cells* 3, 117-126.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Cohen, S.M., Ellwein, L.B. (1990). Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* 249, 1007-1011.
- Cooper, C.S., Park, M., Blair, D.G., Tainsky, M.A., Huebner, K., Croce, C.M., Vande Woude, G. F. (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed cell line. *Nature* 311, 29-33.
- Cooper, G.M. (1990) Identification of cellular oncogenes by gene transfer. En: *Oncogenes, Jones and Bartlett Publishers*, 67-81.
- Coppola, J., Bryant, S., Koda, T., Conway, D., Barbacid, M. (1991). Mechanism of activation of the *vav* protooncogene. *Cell Growth Differ.* 2, 95-105.
- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., Marshall, C.J. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77, 841-852.
- Cuadrado, A., Bruner, J.T., Heideran, M.A., App, H., Rapp, U.R., Aaronson, S.A. (1993). H-*ras* and *raf-1* cooperate in transformation of NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 8, 2443-2448.

- Der. C.J., Krontiris, T.G., Cooper, G.M. (1982). Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3637-3640.
- Devereaux, J. (1989). The GCG sequence analysis software package, version 6.0. Genetics Computer Group, INC. University Research Park.
- Downward, J. (1992). Regulatory mechanism for *ras* proteins. *BioEssays* 14, 177-184.
- Eva, A., Aaronson, S.A. (1985). Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature* 316, 273-275.
- Eva, A., Vecchio, G., Rao, D., Tronick, S.R., Aaronson, S.A. (1988). The predicted *DBL* oncogene product defines a distinct class of transforming proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2061-2065.
- Farber, E. (1984). The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.* 44, 4217-4223.
- Fazioli, F., Minichiello, L., Matoskova, B., Wong, W.T., Di Fiore, P.P. (1993). *eps15*, a novel tyrosine kinase substrate, exhibits transforming activity. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5814-5828.
- Fickett, J.W. (1982). Recognition of protein coding regions in DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 10, 5303-5318.
- Folger, K.R., Wong, E.A., Wahl, G., Cappechi, M.R. (1982). Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: Evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1372-1387.
- Gilmer, T.M., Annab, L.A., Barret, J.C. (1988). Characterization of activated proto-oncogenes in chemically transformed Syrian hamster embryo cells. *Mol. Carcinogen.* 1, 180-188.
- Goldfard, M., Shimizu, K., Perucho, M., Wigler, M. (1982). Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cell. *Nature* 296, 404-409.
- Hall, A. (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 249, 635-640.

- Hallahan, D.E., Virudachalam, S., Sherman, M.L., Huberman, E., Kufe, D.W., Weichselbaum, R.R. (1991). Tumor necrosis factor gene expression is mediated by Protein Kinase C following activation by ionizing radiation. *Cancer Res.* 51, 4565-4569.
- Hamm, G.H., Cameron, G.N. (1986). The EMBL data library. *Nucl. Acids Res.* 14, 5-10.
- Harris, C.C. (1991). Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990's. *Cancer Res.* (suppl.) 51, 5023s-5044s.
- Harris, C.C., Hirohashi, S., Ito, N., Pitot, H.C., Sugimura, T., Terada, M., Yokota, J. (1992). Multi-stage carcinogenesis: the twenty-second international symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. *Cancer Res.* 52, 4837-4840.
- Hart, M.J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S.A., Cerione, R.A. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the *dbl* oncogene product. *Nature* 354, 311-314.
- Hart, M.J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S.A., Evans, T., Cerione, R.A., Zheng, Y. (1994). Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain of the *dbl* oncogene product. *J. Biol. Chem.* 269, 62-65.
- Haseltine, W.A. (1983). Ultraviolet light repair and mutagenesis revisited. *Cell* 33, 13-17.
- Hollingsworth, R.E., Lee, W.H. (1991). Tumor suppressor genes: New prospects for cancer research. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 91-96.
- Ikawa, S., Fukui, M., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Yamamoto, T., Toyoshima, K. (1988). *B-raf*, a new member of the *raf* family, is activated by DNA rearrangement. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2283-2290.
- Janssen, J.W.G., Schulz, A.S., Steenvoorden, A.C.M., Schmidberger, M., Strehl, S., Ambros, P.F., Bartram, C.R. (1991). A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene* 6, 2113-2120.
- Jurka, J., Smith, T. (1988). A fundamental division in the *Alu* family of repeated sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4775-4778.
- Kamb, A., Gruis, N.A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitigian, S.V., Stockert, E., Day III, R.S., Johnson, B.E., Skolnick, M.H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436-440.

- Kasid, V., Pfeifer, A., Weichselbaum, R., Dritschilo, A., Mark, G.E. (1987). The *raf* oncogene is associated with a radiation-resistant human laryngeal cancer. *Science* 237, 1039-1041.
- Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., Vogelstein, B. (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252, 1708-1711.
- Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y., Noda, M. (1989). A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56, 77-84.
- Korenberg, J.R., Rykowski, M.C. (1988). Human genome organization: Alu, LINES, and the molecular structure of the metaphase chromosome bands. *Cell* 53, 391-400.
- Kozak, M. (1981). Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 9, 5233-5252.
- Laborda, J., Sausville, E.A., Hoffman, T., Notario, V. (1993). *dlk*, a putative mammalian homeotic gene differentially expressed in small cell lung carcinoma and neuroendocrine tumor cell line. *J. Biol. Chem.* 268, 3817-3820.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Land, H., Parada, L.F., Weinberg, R.A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.
- Land, H., Chen, A.C., Morgenstern, J.P., Parada, L.F., Weinberg, R.A. (1986). Behavior of *myc* and *ras* oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1917-1925.
- Lau, Y.F., Kan, Y.W. (1983). Versatile cosmid vectors for the isolation, expression, and rescue of gene sequences: Studies with the human α -globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5225-5229.
- Leever, S.J., Paterson, H.F., Marshall, C.J. (1994). Requirements for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 369, 411-414.
- Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A. (1991). The p53 tumor suppressor gene. *Science* 351, 453-456.

- Lu, S.J., Archer, M.C. (1992). *ras* oncogene activation in mammary carcinomas induced by N-methyl-N-nitrosourea in Copenhagen rats. *Mol. Carcinog.* 6, 260-265.
- Martín-Zanca, D., Hughes, S.H., Barbacid, M. (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosin kinase sequences. *Nature* 319, 743-748.
- Miki, T., Smith, C.L., Long, J.E., Eva, A., Fleming, T.P. (1993). Oncogene *ect2* is relative to regulators of small GTP-binding proteins. *Nature* 362, 462-465.
- Miles, C., Meuth, M. (1989). G-repeats: a novel hamster sine family. *Nucleic Acids Res.* 17, 7221-7228.
- Milo, G.E., DiPaolo, J.A. (1980). Presentation of human cells with extrinsic signals to induced chemical carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 26, 805-812.
- Miyoshi, J., Higashi, T., Mukai, H., Ohuchi, T., Kakunaga, T. (1991). Structure and transforming potential of the human *cot* oncogene encoding a putative protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4088-4096.
- Nadin-Davis, S.A., Nasim, A., Beach, D. (1986). Involvement of *ras* in sexual differentiation but not in growth control in fission yeast. *EMBO J.* 5, 2963-2971.
- Notario, V., Castro, R., Flessate, D.M., Doniger, J., DiPaolo, J.A. (1990). Frequent activation of non-*ras* transforming sequences in neoplastic Syrian hamster cells initiated with chemical carcinogens. *Oncogene* 5, 1425-1430.
- O'Bryan, J.P., Frye, R.A., Cogswell, P.C., Neubauer, A., Kitch, B., Prokop, C., Espinosa, R., Le Beau, M.M., Earp, H.S., Liu, E.T. (1991). *axl*, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5016-5031.
- Ochiai, M., Nagao, M., Tahira, T., Ishikawa, F., Hayash, K., Ohgaki, H., Terada, M., Tsuchida, N., Sugimura, T. (1985). Activation of K-*ras* and oncogenes other than *ras* family in rat fibrosarcoma induced by 1,8-dinitropyrene. *Cancer Lett.* 29, 119-125.
- Parada, L.F., Tabin, C.J., Shih, C., Weinberg, R.A. (1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene. *Nature* 297, 474-478.

- Park, M., Dean, M., Cooper, C.S., Schmidt, M., O'Brien, S.J., Blair, D.G., Vande Woude, G.F. (1986). Mechanism of *met* oncogene activation. *Cell* 45, 895-904.
- Pearson, W.R., Lipmann, D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444-2448.
- Pellicer, A., Robins, D., Wold, B., Sweet, R., Jackson, J., Lowy, I., Roberts, J.M., Sim, G.K., Silverstein, S., Axel, R. (1980). Altering genotype and phenotype by DNA-mediated gene transfer. *Science* 209, 1414-1422.
- Pitot, H.C., Dragan, Y.P. (1991). Facts and theories concerning the mechanism of carcinogenesis. *FASEB J.* 5, 2280-2286.
- Pitot, H.C., Dragan, Y., Sargent, L., Xu, Y.H. (1991). Biochemical markers associated with the stages of promotion and progression during hepatocarcinogenesis in the rat. *Environ. Health Perspect.* 93, 181-189.
- Pulciani, S., Santos, E., Lauver, A.V., Long, L.K., Robbins, K.C., Barbacid, M. (1982). Oncogenes in human tumor cell lines: Molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2845-2849.
- Rassoulzadegan, M., Cowie, A., Carr, A., Glaichenhaus, N., Kamen, R., Cuzin, F. (1982). The roles of individual polyomavirus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* 300, 713-718.
- Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E., Barbacid, M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder oncogene. *Nature* 300, 149-152.
- Robins, D.M., Ripley, S., Henderson, A.S., Axel, R. (1981). Transforming DNA integrates into the host chromosome. *Cell* 23, 29-39.
- Ron, D., Zannini, M., Lewis, M., Wickner, R.B., Hunt, L.T., Graziani, G., Tronick, S., Aaronson, S.A., Eva, A. (1991). A region of proto-*dbl* essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, *CDC24*, and the human breakpoint cluster gene, *brc*. *New Biologist* 3, 372-379.
- Rous, P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cell. *J. Exp. Med.* 13, 397-411.
- Saint Vincent, B.R., Delbruck, S., Eckhart, W., Meinkotk, J., Vitto, L., Wahl, G. (1981). The cloning and reintroduction into animal cells of functional CAD gene, a dominant amplifiable genetic marker. *Cell* 27, 267-278.

- Sakamoto, H., Mori, M., Taira, M., Yoshida, T., Matsukawa, S., Shimizu, K., Sekiguchi, M., Terada, M., Sugimura, T. (1986). Transforming gene from human stomach cancers and a noncancerous portion of stomach mucosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3997-4001.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminator inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Santos, E., Tronick, S.R., Aaronson, S.A., Pulciani, S., Barbacid, M. (1982). T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal homologue of BALB- and Harvey-MSF transforming gene. *Nature* 298, 343-347.
- Satoh, T., Nakafuku, M., Kaziro, Y. (1992). Function of ras as a molecular switch in signal transduction. *J. Biol. Chem.* 267, 24149-24152.
- Schafer, R., Iyer, J., Iten, E., Nirkko, A.C., Balmer, J., Klemenz, R. (1991). Molecular and functional analysis of tumor-suppressor genes by transfection. *Environ. Health Perspect.* 93,79-82.
- Schafer, R., Iyer, I., Iten, E., Nirkko, A.C. (1988). Partial reversion of the transformed phenotype of HRAS-transfected tumorigenic cells by transfer of a human gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1590-1594.
- Serrano, M., Hannon, G.J., Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cycling D/CDK 4. *Nature* 366, 704-707.
- Shaw, I.C., Jones, H.B. (1994). Mechanism of non-genotoxic carcinogenesis. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 89-93.
- Sheperd, J.C.W. (1990). Ancient patterns in nucleic acid sequences. *Methods Enzymol.* 183, 180-192.
- Shih, C., Shilo, B.Z., Goldfard, M.P., Dannenberg, A., Weinberg, R.A. (1979). Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfections of DNA and chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5714-5718.
- Shih, C., Weinberg, R.A. (1982). Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* 29, 161-169.
- Shimizu, K., Goldfard, M., Perucho, M., Wigler, M. (1983). Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 383-387.

- Shimizu, K., Nakatsu, Y., Sekiguchi, M., Hokamura, K., Tanaka, K., Terada, M., Sugimura, T. (1985). Molecular cloning of an activated human oncogene, homologous to *v-raf*, from primary stomach cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5641-5645.
- Shou, C., Farnsworth, C.L., Neel, B.G., Feig, L. A. (1992). Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21. *Nature* 358, 351-354.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the *HER-2/neu* oncogene. *Science* 235, 177-181.
- Soussi, T., Caron de Fromentel, C., May, P. (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5, 945-952.
- Srivastava, K.S., Yuasa, Y., Reynolds, S.H., Aaronson, S.A. (1985). Effects of two major activating lesion on the structure and conformation of human ras oncogene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 38-42.
- Stanbridge, E.J. (1990). Human tumor suppressive genes. *Annu. Rev. Genet.* 24, 615-657.
- Stokoe, D., MacDonald, S.G., Cadwallader, K., Symons, M., Handcock, J.F. (1994). Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 264, 1464-1467.
- Sukumar, S., Notario, V., Martin-Zanca, D., Barbacid, M. (1983). Induction of mammary carcinomas in rats by nitrosomethylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature* 306, 658-661.
- Taira, M., Yoshida, T., Miyagawa, K., Sakamoto, H., Terada, M., Sugimura, T. (1987). cDNA sequence of human transforming gene *hst* and identification of the coding sequence required for transforming activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2980-2984.
- Tabin, C.J., Bradley, S.M., Bargmann, C.I., Weinberg, R.A., Papageorge, A.G., Skolnick, E.M., Dhar, R., Lowy, D.R., Chan, E.H. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300, 143-149.
- Takahashi, M., Ritz, J., Cooper, G.M. (1985). Activation of a novel transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell* 42, 581-588.

- Testa, J.R., Park, M., Blair, D.G., Kalbakji, A., Arden, K., Vande Woude, G.F. (1990). Analysis by pulse field electrophoresis reveals complex rearrangements in two *MET* alleles in a chemically-treated human cell line, MNNG-HOS. *Oncogene* 5, 1565-1571.
- Thibodeau, S.N., Bren, G., Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260, 816-819.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K., Wigler, M. (1985). In yeast, *RAS* proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40, 27-36.
- Toksoz, D., Williams, D.A. (1994). Novel human oncogene *lbc* detected by transfection with distinct homology regions to signal transduction products. *Oncogene* 9, 621-628.
- Uchida, T., Wada, C., Wang, C., Egawa, S., Ohtani, H., Koshiha, K. (1994). Genomic instability of microsatellite repeats and mutations of H-, K-, and N-ras, and p53 genes in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 54, 3682-3684.
- Uckun, F.M., Schieven, G.L., Tuel-Ahlgren, L.M., Dibirdik, I., Myers, D.E., Ledbetter, J.A., Song, C.W. (1993). Tyrosine phosphorylation is a mandatory proximal step in radiation-induced activation of the protein kinase C signaling pathway in human B-lymphocyte precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 252-256.
- Velasco, J.A., Castro, R., Avila, M.A., Laborda, J. DiPaolo, J.A., Cansado, J., Notario, V. (1994). *cph*, a novel oncogene which cooperates with H-ras in the transformation of NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 9, 2065-2069.
- Velasco, J.A., Cansado, J., Pena, M.C., Kawakami, T., Laborda, J. Notario, V. (1993). Cloning of the dihydroxyacid dehydratase-encoding gene (*ILV3*) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 137, 179-185.
- Weinberg, R.A. (1989). Oncogenes, antioncogenes and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 49, 3713-3721.
- Weinberg, R.A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science* 254, 1138-1146.
- Weisburger, E.K. (1994). General principles of chemical carcinogenesis. En: Carcinogenesis (Eds Waalkes, M.P., Ward, J.M.) *Raven press*, 1-23
- Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L.S., Pellicer, A., Chen, Y., Axel, R. (1977). Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to culture mouse cells. *Cell* 11, 223-232.

- Wigler, M., Perucho, M., Kurtz, D., Dana, S., Pellicer, A., Axel, R., Silverstein, S. (1980). Transformation of mammalian cells with an amplifiable dominant gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3567-3570.
- Wong, W.T., Krauss, M.H., Carlomagno, F., Zelano, A., Druck, T., Croce C.M., Huebner, K., Di Fiore, P.P. (1994). The human *eps15* gene, encoding a tyrosine kinase substrate, is conserved in evolution and maps in 1p31-32. *Oncogene* 9, 1591-1597.
- Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C., Fasano, O., Wigler, M. (1986). Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 45, 711-719.
- Yuspa, S.H., Poirier, M.C. (1988). Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. *Adv. Cancer Res.* 50, 25-70.
- Zhan, X., Bates, B., Hu, X., Goldfarb, M. (1988). The human *FGF-5* oncogene encodes a novel protein related to fibroblasts growth factors. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3487-3495.