
Activación diferencial de fosfolipasa D en la regulación del crecimiento celular normal o tras la transformación por oncogenes *ras*

A. Cuadrado, A. Carnero y J.C. Lacal

Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC. Madrid.

Introducción

El suero y diversos factores de crecimiento estimulan la hidrólisis de fosfatidilinosíoles (PI) mediante la activación de una fosfolipasa C específica para PI (PI-PLC)¹. Como resultado, se generan dos importantes segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG), que constituye en sí un potente activador endógeno de la mayoría de las proteincinasas C (PKC) conocidas², y los inosítoles fosfato (IP) que regulan la homeostasis del Ca²⁺ intracelular³. Sin embargo, la activación de la PI-PLC no parece ser un requerimiento absolutamente necesario para la estimulación mitogénica, puesto que las células deplecionadas de actividad PI-PLC todavía responden mitogénicamente a factores de crecimiento^{4,6}. Por otra parte, la sobreexpresión de la enzima PLC γ no se correlaciona con un aumento de respuesta mitogénica a factores de crecimiento^{7,9}.

Recientemente, se han implicado otros lípidos en la regulación de la proliferación celular, incluyendo a la fosfatidilcolina (PC). Por ejemplo, en células estimuladas por suero, o células transformadas por oncogenes *ras*, existe un aumento de las concentraciones de DAG que no proviene de la hidrólisis de PI, y que es concomitante a un aumento de las concentraciones de fosforilcolina (*PCho*)¹⁰⁻¹³. Estos metabolitos pueden generarse mediante varias rutas alternativas, tales como activación de una fosfolipasa específica para PC (PC-PLC) o mediante rutas más complejas como, por ejemplo, activación de una fosfolipasa D (PLD) seguida de colinacinasasa (ChoK) y de la hidrolasa del ácido fosfatídico (PA-hidrolasa)^{2,14,15}. El descubrimiento inicial de una correlación entre las concentraciones de DAG y los de *PCho* en células transformadas por oncogenes *ras*¹¹ fue utilizado como argumento para postular la participación de una PC-PLC en este proceso¹⁶. Sin embargo, el hecho de encontrarse también un aumento de la actividad de la ChoK en células transformadas por oncogenes *ras*^{12,13}, así como en oocitos inyectados con proteínas mutadas p21-

*ras*¹⁰, indican que el mecanismo de producción de *PCho* y DAG puede ser más complejo que el originalmente propuesto de activación directa de una PC-PLC.

En el presente trabajo, hemos estudiado si la actividad mitogénica del suero y la transformación inducida por oncogenes *ras* está funcionalmente conectada a la actividad de una fosfolipasa C específica de PC (PC-PLC). Utilizando diferentes estrategias y fundamentalmente mediante un inhibidor de la ChoK, hemos sido capaces de desacoplar la producción de DAG de la producción de *PCho*, indicando que la producción de ambos metabolitos no se realiza mediante una PC-PLC. Además, hemos podido relacionar la formación de ambos metabolitos a la activación de una PLD con la generación de colina y ácido fosfatídico que posteriormente se convierten en *PCho* y DAG por acción de la ChoK y la PA-hidrolasa, respectivamente. El hallazgo de una activación transitoria de PLD en células normales tras la estimulación mitogénica con suero, pero constitutiva en células transformadas por oncogenes *ras*, establecen las bases que pueden explicar la diferencia de comportamiento entre células normales y células transformadas.

Materiales y métodos

Cultivos celulares

Las líneas utilizadas, NIH3T3 normales y transformadas por los oncogenes H-*ras* y K-*ras*, se hicieron crecer en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% suero de ternera (Gibco). Hemicholinium-3 y propranolol se adquirieron de Sigma Chem. Co.

Análisis de concentraciones de DAG

Las células se hicieron crecer en placas de 6 pocillos, se marcaron durante 24 h en pre-

sencia de 10 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]glicerol (159 $\mu\text{Ci/mmol}$, Amersham), y se privaron de suero durante 18 h previas al tratamiento. Tras la incubación indicada en cada figura a 37°C, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con 2 ml de etanol, raspadas y trasferidas a tubos conteniendo 2,5 ml de cloroformo y 1,25 ml de agua, para proceder a la extracción de los lípidos. Las fases orgánicas fueron secadas bajo un chorro de nitrógeno y resuspendidas en 50 μl de cloroformo. Las muestras se resolvieron en cromatografía de capa fina (TLC) en placas de sílica gel 60A LK6D (Whatman) para lo cual fue utilizado como solvente hexano:etiléter:ácido acético (60:40:1). Las placas se expusieron a un film de autorradiografía y las manchas correspondientes a DAG fueron raspadas y se cuantificaron utilizando un contador de centelleo.

Estimación de los derivados de colina

Las células se hicieron crecer como se ha descrito para DAG en presencia de 10 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]colina (50-60 Ci/mmol, Amersham). En estudios de las rutas catabólicas, previo al tratamiento con los compuestos indicados en cada figura, las células se lavaron con DMEM para eliminar el exceso de material radiactivo no incorporado y se estimularon con los diferentes factores. En estudios de las rutas anabólicas, las células fueron privadas de suero durante 18 h y estimuladas en presencia de 10 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]colina. En experimentos en que se requería un marcaje isotópico, las células fueron incubadas durante 24 h en presencia de 10 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]colina en ausencia de suero, y estimuladas con los diferentes factores en presencia del precursor radiactivo. En todos los casos, las células fueron fijadas tras la incubación deseada con 1 ml de TCA al 16%. El material soluble en TCA fue lavado cuatro veces con 4 volúmenes de etiléter saturado con agua y liofilizado. Las muestras se resuspendieron en 100 μl de agua y se resolvieron mediante TLC en placas de sílica gel, utilizando como solvente 0,9% NaCl:metanol:hidróxido amónico (50:70:5). Las placas fueron expuestas a películas de autorradiografía y las manchas correspondientes a colina, PCho y CDP-colina raspadas y cuantificadas mediante contadores de centelleo. El material insoluble en TCA conteniendo PC se resuspendió en 0,5 ml de 0,25 N hidróxido sódico, neutralizado con un volumen equivalente de 0,25 N HCl y cuantificado en un contador de centelleo.

Análisis de concentraciones de ácido fosfatídico

Las células se hicieron crecer según lo expuesto anteriormente, en presencia de 10 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]glicerol o [^3H]palmitato (Amersham). Tras el marcaje, las células fueron tratadas con un 10% de suero de ternera (NIH3T3) o permanecieron sin tratamiento (células transformadas por *ras*). La extracción de lípidos se realizó de acuerdo al protocolo de Song et al¹⁷. Las concentraciones de ácido fosfatídico se determinaron por TLC utilizando como solvente la fase superior resultante de combinar etilacetato: trimetilpentano:ácido acético:agua (90:50:20:100). Las placas fueron expuestas a películas de autorradiografía y las manchas correspondientes a PA cuantificadas por contador de centelleo.

Ensayo de actividad PLD

La actividad de PLD puede ser determinada mediante su actividad de transfosfatidilación sobre butanol con la generación de fosfatidilbutanol¹⁷. Tras el marcaje de las células en presencia de 10 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H] palmitato, (Amersham) las células fueron tratadas con un 10% de suero de ternera (NIH3T3) o permanecieron sin tratamiento (células transformadas por *ras*). Durante la última hora de tratamiento, se añadió un 0,5% de butanol. La producción de fosfatidilbutanol se determinó mediante el protocolo de Song et al¹⁷.

Determinación de masa intracelular de colina y PCho

Las concentraciones intracelulares de colina y PCho se realizaron de acuerdo al protocolo de Murray et al¹⁸. La concentración intracelular se determinó considerando un volumen celular de 4 $\mu\text{l/mg}$ de proteína total.

Resultados

La observación de concentraciones elevadas de DAG y PCho a tiempos tardíos tras la estimulación mitogénica (posterior a 3 h) ha servido como base para especular con la participación de una PC-PLC en la regulación de la proliferación celular^{19,20}. Por tanto, hemos analizado las concentraciones de DAG y PCho a tiempos tardíos de la estimulación mitogénica, para investigar la posible participación del metabolismo de PC en este proceso. Cuando las

TABLA I
ESTIMULACIÓN DE PRODUCCIÓN DE DAG
POR SUERO

Tiempo (h)	Controles	10% de suero	% control
3	1.021 ± 149	1.636 ± 58	160
6	1.041 ± 214	1.762 ± 9	169
9	1.108 ± 237	1.863 ± 114	168
12	1.109 ± 21	2.114 ± 252	191

Células NIH 3T3 fueron incubadas con [¹⁴C]glicerol como se describe en «Materiales y métodos». A los tiempos indicados, se analizaron las concentraciones de DAG por cromatografía en capa fina. Se indican los valores correspondientes en cpm/10⁶ células incluyendo la desviación estándar.

células se marcaron isotópicamente con [¹⁴C]glicerol, y se estimularon con suero, se observó un aumento de las concentraciones de DAG en un 50% entre la 3 y la 12 h de la estimulación (tabla I). Al mismo tiempo, en células marcadas con [¹⁴C]colina, se observó un aumento de las concentraciones de PCho de 3 veces entre las 6 y las 12 h (fig. 1A), paralelo

a un aumento de la incorporación de [¹⁴C]colina en PC (fig. 1B). Estos resultados indican que el metabolismo de PC está alterado tras la estimulación mitogénica por suero. Sin embargo, puesto que ambos DAG y PCho pueden metabolizarse rápidamente, el sistema enzimático involucrado en la generación de estos metabolitos puede ser más complejo que la simple activación de una PC-PLC.

Una aproximación útil en el estudio de otras posible rutas es el análisis de la movilización de las reservas intracelulares mediante el marcaje con [¹⁴C]colina durante el tiempo de la estimulación (ruta anabólica) o mediante pulso y caza (ruta catabólica). La incorporación de [¹⁴C]colina en PCho y PC se determinó mediante marcaje simultáneo al tratamiento con suero (figs. 1C y D), observándose una incorporación rápida, indicativa de la activación de la ruta anabólica de PC durante la estimulación mitogénica.

La hidrólisis de PC inducida por activación de una PC-PLC debería ser aparente mediante la generación de PCho a partir de una reserva de PC radiactiva previa a la estimulación por sue-

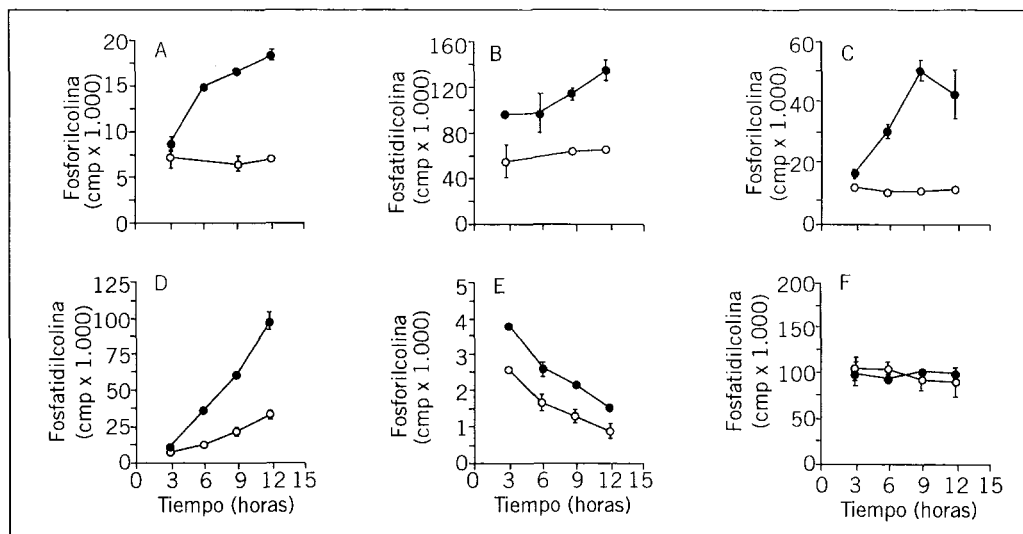


Fig. 1. Producción de PCho y DAG tras la estimulación con suero. A, B: las células fueron marcadas isotópicamente con [¹⁴C]colina y estimuladas con un 10% de suero a los tiempos indicados, y las concentraciones de PCho (A) y fوسفاتیدیلcolina (B) fueron determinadas según se describe en «Materiales y métodos» (C, D). Las células fueron marcadas con [¹⁴C]colina al mismo tiempo que se estimularon con suero y se determinaron las concentraciones de PCho (C) y fوسفاتیدیلcolina (D). E, F: las células fueron marcadas con [¹⁴C]colina durante 24 h y lavadas para eliminar el exceso de precursor radiactivo, anteriormente a la estimulación con suero. Tras la estimulación fueron procesadas para determinar las concentraciones de PCho (E) y fوسفاتیدیلcolina (F); (●): células estimuladas con un 10% de suero; (○): células sin estimular.

TABLA II
EFECTO DE HC-3 SOBRE LA ACTIVIDAD *IN VITRO* DE FOSFOLIPASAS

Enzima	Origen	Control	HC-3 (20 mM)	% control
PLD				
Tipo I	Repollo	6.939 ± 760	7.075 ± 600	102
Tipo IV	Repollo	16.620 ± 1.300	18.500 ± 500	111
Tipo V	Repollo	2.950 ± 400	3.500 ± 700	119
Tipo VI	<i>S. chromofuscus</i>	37.100 ± 1.100	43.300 ± 2.300	117
Tipo VII	<i>Streptomyces</i>	41.000 ± 6.300	50.000 ± 1.600	122
PLC				
Tipo III	<i>B. cereus</i>	13.600 ± 300	12.500 ± 500	92
Tipo V	<i>B. perfringens</i>	14.560 ± 960	15.220 ± 1.490	104
Tipo XI	<i>B. cereus</i>	8.049 ± 630	8.555 ± 630	106
PLA2	Veneno avispa	506 ± 9	466 ± 9	92

Como sustrato de la reacción se utilizó fosfatidil-N-metil-[¹⁴C]-colina. La actividad de cada enzima se valoró mediante la cuantificación de la liberación de [¹⁴C]-colina (PLD), [¹⁴C]-fosforilcolina (PLC) o lisofosfatidilcolina (PLA2).

ro. En estas condiciones, no se detectó incremento en las concentraciones de *PCho* radiactiva (fig. 1E), y tampoco se observó una disminución significativa en las concentraciones del precursor, PC (fig. 1F). En realidad, se observó una disminución de las concentraciones intracelulares de *PCho* radiactiva similar en células control y células estimuladas con suero, lo que indica su utilización en rutas metabólicas. En las mismas condiciones, se determinaron las concentraciones totales por estimación de masa, de Cho y *PCho*. A las 6 h de estimulación con suero, las concentraciones de *PCho* aumentaron de 350 μM a 808 μM, mientras que las concentraciones de colina aumentaron de 196 μM a 285 μM. Por tanto, el incremento en masa de las concentraciones de *PCho* tras la estimulación por suero no se produce por una activación directa de una PC-PLC.

Producción de fosforilcolina y diacilglicerol en células estimuladas con suero

Mediante la utilización de inhibidores de la ChoK y de la PA-hidrolasa, hemos investigado la ruta de generación de *PCho* y DAG en células normales estimuladas por suero. Hemicolinio-3 (HC-3) es un inhibidor de la ChoK tanto *in vivo* como *in vitro*^{21,22}. Por otra parte, se ha demostrado que HC-3 no tiene efecto inhibidor sobre PLC²². Hemos estudiado el posible efecto inhibidor de HC-3 sobre diversas isoenzimas de PLA2, PLC y PLD y hemos encontrado que a concentraciones de hasta 20 mM HC-3 no tiene efecto alguno sobre su actividad enzimática (tabla II). Cuando se incubaron células NIH 3T3 con HC-3 a diferentes con-

centraciones, observamos una inhibición completa de la actividad de la ChoK *in vivo* a partir de 2 mM HC-3. Por tanto, para todos los estudios posteriores se utilizó una concentración saturante de 6 mM HC-3. En estas condiciones, la producción de *PCho* se redujo drásticamente incluso en células estimuladas con suero (fig. 2A), lo que indica que la generación de *PCho* es dependiente de la actividad de la ChoK. Sin embargo, la generación de DAG no se vio afectada en células tratadas con HC-3 a concentraciones que bloquean totalmente la producción de *PCho* (fig. 2B), lo que indica que la generación de estos dos metabolitos está desacoplada y se produce por vías independientes.

Producción de DAG y *PCho* en células transformadas por *ras*

En estudios anteriores, hemos demostrado que la transformación de células NIH3T3 por oncogenes *ras* inducen un incremento en las concentraciones basales de *PCho* y DAG¹¹. Hemos investigado si la producción de estos dos metabolitos está acoplada, o, por el contrario, sigue un patrón parecido al descrito en células estimuladas con suero. Para ello, células transformadas por los oncogenes H-*ras* o K-*ras* se marcaron con [¹⁴C]-glicerol o [¹⁴C]-colina en presencia o ausencia de 6 M HC-3 y se determinaron las concentraciones de *PCho* o DAG. Mientras que las concentraciones basales de *PCho* en ambos clones transformados son al menos 2 veces superiores a las de células normales (fig. 2C), el tratamiento con HC-3 reduce las concentraciones a las encontradas en células normales, siguiendo un patrón idéntico al

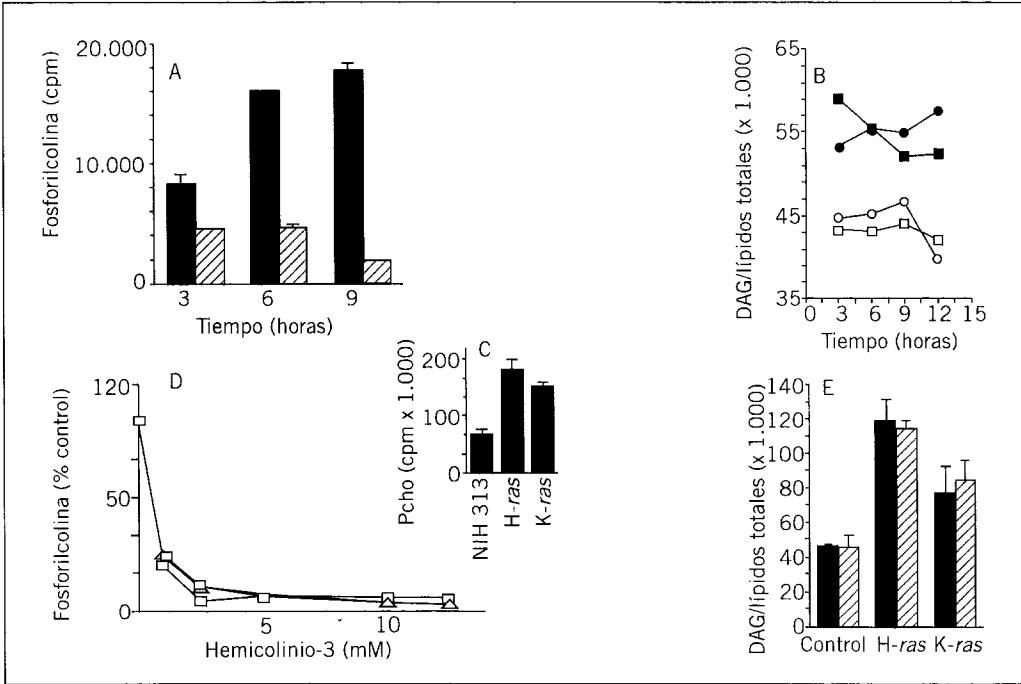


Fig. 2. Efecto del HC-3 en la producción de PCho. A: Concentraciones de PCho en células marcadas isotópicamente con [¹⁴C]colina en ausencia (■) o en presencia (▨) de 6 mM HC-3; B: producción de DAG en células marcadas con [¹⁴C]glicerol; (○, □): células control; (●, ■): células tratadas con suero; (○, ●): células sin HC-3; (□, ■): células tratadas con HC-3; C: concentraciones basales de PCho en células normales y transformadas por *ras*; D: curva dosis-respuesta de la producción de PCho en presencia de HC-3; (○) NIH 3T3; (△): células transformadas por *H-ras*; (□): células transformadas por *K-ras*; E: concentraciones de DAG en células tratadas (■) o no (▨) con HC-3.

de células normales (fig. 2D). Por el contrario, en las células *H-ras* y *K-ras* tratadas con HC-3, las concentraciones de DAG no varían con respecto a las de las células sin tratar (fig. 2E) y que oscilan entre un 50 y un 100% por encima de las de células normales. Estos resultados demuestran que, de forma similar a lo encontrado en células normales estimuladas por suero, la producción de PCho y DAG en células transformadas por *ras* sigue vías independientes. En ambos casos, la producción de PCho es sensible a HC-3, un inhibidor de la ChoK.

La producción de PCHO y DAG en células estimuladas con suero o transformadas por genes *ras* es consecuencia de la activación de una PLD

Los resultados mostrados en los apartados anteriores demuestran que la generación de PCho y DAG en células NIH 3T3 estimuladas mitogé-

nicamente con suero o transformadas por oncogenes *ras*, no se producen de forma acoplada como consecuencia de la activación de una PLC. Por tanto, debe existir una ruta alternativa que explique la producción de estos metabolitos fosfolipídicos. Una explicación sencilla es la participación de una PLD que hidrolizase PC en colina y PA y su posterior conversión en PCho y DAG como consecuencia de la actividad de una ChoK y una PA-hidrolasa, respectivamente.

Hemos realizado medidas de la posible participación de una PLD en estos dos sistemas celulares de varias formas alternativas. En primer lugar, se determinaron las concentraciones de producción de colina total desde las 3-12 h, a partir de células marcadas durante 24 h con [¹⁴C]-colina. Cuando las células NIH 3T3 quiescentes se trataron con suero se observó la liberación de colina (fig. 3A) que aumentó en presencia de HC-3 (fig. 3B). En las células transformadas por genes *ras*, se observó una

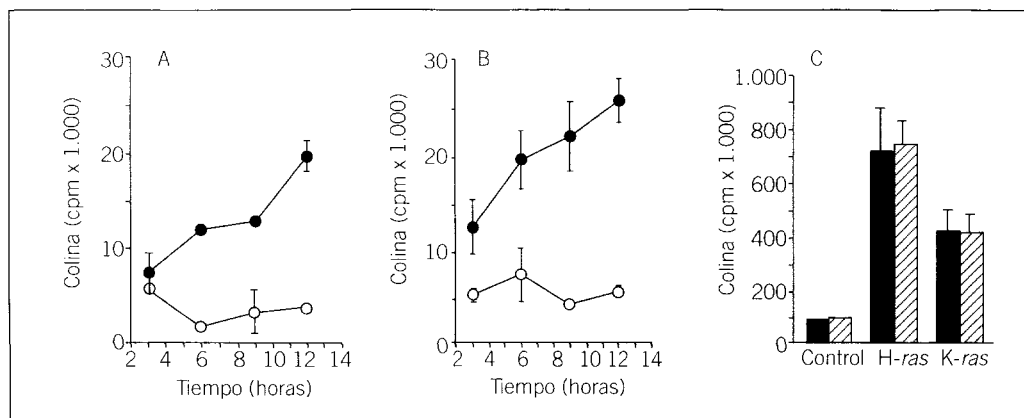


Fig. 3. Liberación de colina en células estimuladas por suero y células transformadas por ras. Células NIH 3T3 fueron marcadas con [¹⁴C]colina durante 24 h y deprivadas de suero durante 24 h, lavadas exhaustivamente con DMEM y tratadas con un 10% de suero (A), o suero más 6 mM HC-3 (B); (O): control; (●): células tratadas con un 10% de suero; C: células NIH 3T3 control o transformadas con H-ras o K-ras fueron marcadas como se indica anteriormente e incubadas durante 9 h con medio solo (■) o con medio conteniendo 6 mM HC-3 (▨).

liberación basal de colina superior a la de células normales pero equivalente a la de células estimuladas por suero e insensible al tratamiento con HC-3 (fig. 3C). Estos resultados sugieren la activación de una PC-PLD en ambos sistemas celulares.

Como estudio alternativo, hemos utilizado propranolol, un inhibidor de la PA-hidrolasa que bloquearía la conversión de PA en DAG, sin afectar las actividades de PLC o PLD^{23,24}. Se marcaron las células a equilibrio con [¹⁴C]-glicerol durante 24 h y se estimularon con suero durante 9 h. Durante la última hora de tratamiento, las células se incubaron en presencia o ausencia de propranolol y se determinaron las concentraciones de DAG. Como se observa en la figura 4A, el tratamiento con propranolol en células estimuladas con suero redujo las concentraciones de DAG a las concentraciones basales de células no estimuladas, lo que indica que la producción de DAG depende de la actividad PA-hidrolasa y, por tanto, de la conversión de PA en DAG.

Una vez demostrada la participación de la PA-hidrolasa en la generación de DAG en células NIH 3T3 estimuladas con suero, investigamos la posible participación de esta enzima en la generación de DAG en células NIH 3T3 transformadas por oncogenes *ras*. Ambos clones, H-*ras* y K-*ras*, fueron tratados en condiciones idénticas a las descritas para células NIH 3T3, en presencia o ausencia de propranolol. De acuerdo con resultados publicados anteriormente^{11,25-27},

en las células transformadas por oncogenes *ras* aparecen concentraciones basales de DAG elevadas en un 50-100% respecto a los de células normales. Cuando estas células fueron tratadas con propranolol, las concentraciones de DAG descendieron hasta las encontradas en células normales, lo que indica de nuevo la participación de la PA-hidrolasa en la generación de DAG, de forma semejante a la descrita para células NIH 3T3 estimuladas por suero.

Activación de PLD en células estimuladas por suero y transformadas por oncogenes

Los resultados expuestos anteriormente sugieren fuertemente la activación de una PLD en células estimuladas por suero o transformadas por oncogenes *ras*, como responsables en primera instancia de la generación de concentraciones elevadas de PCho y DAG. La actividad enzimática de PLD se midió directamente mediante la determinación de su capacidad de transfosfatidilación a butanol¹⁷. Las células fueron incubadas en presencia de [³H]palmitato en ausencia de suero y posteriormente estimuladas con un 10% de suero durante 9 h, con la adición de un 0,5% de butanol durante la última hora de incubación. Como se demuestra en la figura 5, a las 9 h de la estimulación con suero, sólo se observó un ligero aumento (20%) de la actividad PLD. Sin embargo, en células transformadas por H-*ras* o K-*ras* sin estimular con suero, se observó una estimulación de 5 ve-

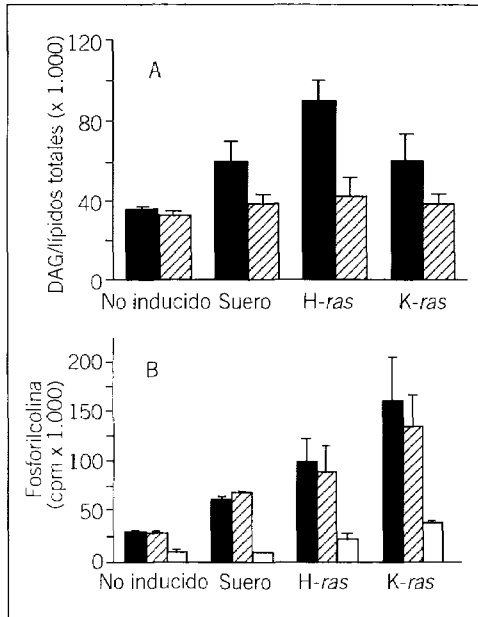


Fig. 4. Efecto de propranolol en las concentraciones de DAG. A: células NIH 3T3 normales o transformadas por oncogenes ras (H-ras, K-ras) fueron marcadas en presencia de [¹⁴C]glicerol y estimuladas con un 10% de suero (NIH 3T3) o incubadas sin suero (NIH 3T3, H-ras, K-ras) durante 9 h. Durante la última hora de incubación, las células fueron tratadas (□) o no (●) con 300 μM de propranolol; B: las células fueron marcadas con [¹⁴C]colina y analizadas a las 9 h sin tratar (NIH 3T3, H-ras, K-ras) o estimuladas con un 10% de suero en ausencia (■) o en presencia (▨) de 30 μM de propranolol o 6 mM de HC-3 (□). Durante la última hora de incubación, el tratamiento con propranolol se elevó a 300 μM.

ces en la actividad basal de PLD en comparación con la de células normales, lo que indica la activación constitutiva de una PLD en células transformadas por oncogenes ras. El tratamiento de las células con HC-3 o propranolol no modificó los valores de actividad, lo que indica que los inhibidores no afectan a la actividad PLD endógena.

Por último, un nivel de actividad basal elevado de PLD debería reflejarse en un aumento de las concentraciones basales de PA en células transformadas por oncogenes ras. En la figura 5B, se muestran los resultados de la valoración de las concentraciones de PA en células NIH 3T3 quiescentes y estimuladas con suero y las concentraciones de PA basales en los clones de células transformadas por ras. Se observó un

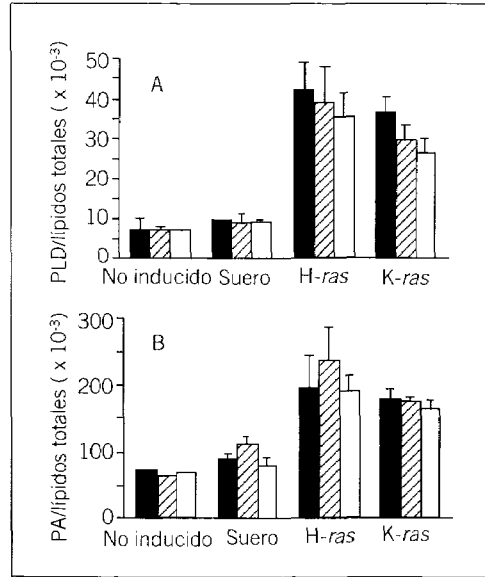


Fig. 5. Concentraciones de actividad PLD en células normales y células transformadas por oncogenes ras. A: la actividad PLD basal en células estimuladas por suero y células transformadas por oncogenes ras se determinó mediante la actividad de transfosfatidilación de butanol como se describe en «Materiales y métodos». A: las células fueron tratadas con medio control (■), 6 mM de HC-3 (▨) o 300 μM de propranolol (□); B: producción de ácido fosfatídico (PA). Las células fueron incubadas en presencia de [³H]palmitato durante 24 h y mantenidas sin tratar o estimuladas con un 10% de suero durante 9 h en presencia de medio solo (■), o medio suplementado con 6 mM de HC-3 (▨), o 300 μM de propranolol (□).

aumento de 2 veces en las concentraciones de PA específicamente en las células transformadas por ras. Además, las concentraciones de PA no se afectaron en presencia de HC-3 o propranolol, de acuerdo a los resultados obtenidos en la valoración de la actividad PLD.

Discusión

A raíz de nuestra primera observación en 1987¹¹, diversos laboratorios han encontrado concentraciones elevadas de PCho^{12,13} y DAG²⁵⁻²⁸ en células normales estimuladas por suero y en células transformadas por oncogenes. Por analogía con la ruta de señalización intracelular generada por hidrólisis de fosfatidilinositoles (PI) a través de una PLC, se ha suge-

rido también la posible implicación de una PLC específica para PC en la síntesis de *PCho* y DAG^{16,18-20}, y como paso tardío esencial en la regulación de la síntesis de DNA²⁰. Sin embargo, mientras que existe evidencia abundante que relaciona la ruta de PI-PLC con las señales iniciadas por factores de crecimiento³, no existe todavía evidencia directa que relacione de forma similar la ruta de PC-PLC². Por otra parte, tanto *PCho* como DAG pueden generarse mediante mecanismos más complejos tales como la activación secuencial de una PLD específica para PC, seguida de una ChoK y una PA-hidrolasa.

En el presente trabajo hemos estudiado el origen de ambos metabolitos, *PCho* y DAG, utilizando diversas estrategias tales como cinéticas de incorporación en lípidos de los precursores radiactivos, experimentos de pulso y caza, inhibidores de enzimas claves en la generación de estos metabolitos, y análisis directo de su actividad enzimática. Basados en la cinética de generación de *PCho*, nuestros resultados claramente demuestran que no existe una PC-PLC responsable de la generación de *PCho* en células normales estimuladas por suero, puesto que a pesar de existir una producción neta en masa tras la estimulación con suero, la *PCho* generada no procede de un reservorio de PC radiactivo premarcado. De acuerdo con estos resultados, el aumento inducido por suero es sensible a HC-3, un inhibidor de la ChoK. Además, conjuntamente con la reducción en las concentraciones de *PCho* se observa un aumento en las concentraciones de colina, de acuerdo con trabajos anteriores que indican que HC-3 no afecta la actividad de fosfolipasas²². En conclusión, nuestros resultados demuestran que la generación de *PCho* es consecuencia de la actividad de la ChoK y no de la PC-PLC.

Hemos observado la liberación de colina tras la estimulación mitogénica del suero. El aumento de la liberación de colina podría generarse mediante la actividad de una PC-PLD, o alternativamente, por aumento en su transporte al exterior celular o por activación de una hipotética *PCho*-fosfatasa. El aumento de liberación de colina no puede explicarse por modificaciones del sistema de transporte puesto que el reservorio intracelular de colina es muy pequeño e insuficiente para justificar la liberación observada tras la estimulación con suero. Por otra parte, recientemente se ha demostrado que no existe una actividad detectable de *PCho*-fosfatasa en fibroblastos de mamífero²⁹. Estos resultados sugieren que los aumentos de colina observados sólo se pueden generar por ac-

ción directa de una PC-PLD. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la activación mitogénica del suero activa como efecto tardío el catabolismo de PC a través de la activación de una PC-PLD y cuestionan seriamente la hipótesis de la participación de una PC-PLC. Otros grupos han observado también la activación de una PLD como acontecimiento temprano tras la estimulación mitogénica^{17,29-31}.

La inhibición de la ChoK por el hemicolinio 3 (HC-3) elimina la generación de *PCho* tanto en células normales estimuladas por suero como en células transformadas por *ras* sin efecto sobre las concentraciones de DAG. Por otra parte, propranolol, un inhibidor de la PA-hidrolasa, reduce las concentraciones de DAG en ambos casos, sin afectar a las concentraciones de *PCho*. Por tanto, la producción de DAG es sensible al inhibidor de la PA-hidrolasa, y la generación de *PCho* es sensible al inhibidor de la ChoK. Estos resultados indican que ambos metabolitos se generan por vías independientes, y no por acción directa de una PC-PLC.

Las concentraciones constitutivamente elevadas de liberación de colina y producción de PA, conjuntamente con las concentraciones basales elevadas de *PCho* y DAG, en células transformadas por oncogenes *ras*, sugieren que ambos metabolitos se producen por acción de una PLD. Como consecuencia de esta activación, se generan PA y colina que posteriormente se convierten en DAG y *PCho* por acción de la PA-hidrolasa y la ChoK, respectivamente. Un aumento en las concentraciones de la ChoK en células transformadas por oncogenes *ras*^{12,13} y en ocitos inyectados por p21-*ras* oncogénica¹⁰, apoyan esta hipótesis. En el presente trabajo, presentamos evidencia adicional en apoyo de esta hipótesis al determinar que la actividad de la PLD es 5 veces superior en células transformadas por *ras* que la encontrada en células normales.

Una evidencia similar a la descrita para células transformadas por oncogenes *ras* se ha encontrado en células normales estimuladas por suero, pues las concentraciones de colina, DAG y *PCho* también se encuentran elevadas a tiempos tardíos (más de 3 h) en células estimuladas por suero. Estos resultados sugieren que la PLD puede ser también crítica en la regulación de la proliferación de células normales por factores de crecimiento³¹⁻³³. Sin embargo, la actividad de PLD a tiempos tardíos mostró tan sólo un pequeño incremento de actividad y únicamente se observó un aumento de un 20% en las concentraciones de PA. Estos resultados

pueden interpretarse como una diferencia importante entre células normales y células transformadas. Mientras que una activación transitoria de PLD inducida por suero sería suficiente para la entrada en un ciclo normal de proliferación, sería insuficiente para disparar la señal de transformación celular. Por contra, la activación constitutiva de PLD en células transformadas por oncogenes *ras* sería un paso esencial en el mecanismo de transformación. Nuestros resultados implican un mecanismo de activación de la PLD en células estimuladas por suero y en las transformadas por oncogenes *ras*: PLD sólo es activada transitoriamente en células normales y está constitutivamente activada en células transformadas por oncogenes *ras*.

Varias líneas de investigación previas han implicado a la PLD en la ruta de regulación de la proliferación celular. Entre ellas destaca la evidencia de que tanto PA como liso-PA son potentes mitógenos en células NIH 3T3^{34,35}. Por otra parte, la generación de DAG y PCho en células transformadas por *ras* podría ser un proceso esencial en la transformación celular^{11,25-27}. DAG podría ser la señal intracelular más importante producida por p21-*ras* oncogénica en fibroblastos, puesto que *ras* requiere PKC funcional para la inducción de proliferación³⁶. Sin embargo, todavía quedan por resolver algunos puntos importantes. Por ejemplo, no sabemos si PA es capaz de disparar la señal de transformación o debe ser convertido en DAG, como mecanismo dependiente de PKC. También, la producción de PCho constituye en sí una importante señal en la regulación de la proliferación celular (resultados no mostrados), y requiere especial atención. PLD podría, por tanto, generar un amplio espectro de señales con potencial mitogénico. Aunque se requiere un estudio más profundo para desvelar la completa implicación del metabolismo de PC en el control de la proliferación celular tanto en células normales como en células transformadas, nuestros resultados implican que la actividad de una PC-PLD es importante en estos procesos. Además, la regulación de la PLD parece seguir patrones diferentes en células normales y en células transformadas, resultados que sugieren que esta enzima desempeña un papel esencial en la regulación del crecimiento celular.

Agradecimiento

Este trabajo ha sido financiado por la DGICYT, Laboratorios Serono y Fundación Ramón Areces. Amancio Carnero es becario de la DGICYT.

BIBLIOGRAFÍA

1. Taylor SJ, Exton MJ. Guanine nucleotide and hormone regulation of phosphoinositide phospholipase C activity of rat liver plasma membranes. Bivalent cation and phospholipid requirements. *Biochem J* 1987; 248: 791-799.
2. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992; 258: 607-614.
3. Berridge MJ. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 159-194.
4. Hill YD, Dean NM, Mordan LJ, Lau AF, Kanemitsu MY, Boynton AL. PDGF-induced activation of phospholipase C is not required for induction of DNA synthesis. *Science* 1990; 248: 1.660-1.663.
5. Mohammadi AM, Dionne CA, Li W, Li N, Spivak T, Honegger AM et al. Poin mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis. *Nature* 1992; 358: 681-684.
6. Peters KG, Marie J, Wilson E, Ives HE, Escobedo J, Rosario M et al. Poin mutation of an FGF receptor abolishes phosphatidyl inositol turnover and Ca²⁺ flux but not mitogenesis. *Nature* 1992; 358: 678-681.
7. Cuadrado A, Molloy CJ. Overexpression of phospholipase C γ in NIH 3T3 fibroblast results in increases phosphatidylinositol hydrolysis in response to Platelet-derived growth factor and basis fibroblast growth factor. *Mol Cell Bio* 1990; 10: 6.069-6.072.
8. Margolis B, Zilberstein A, Franks C, Felder S, Kremer S, Ullrich SA et al. Effect of phospholipase C γ overexpression on PDGF-induced second messenger and mitogenesis. *Science* 1990; 248: 607-610.
9. Sultzman L, Ellis C, Lin LL, Pawson, Knopf J. Platelet-derived growth factor increases the in vivo activity of phospholipase C γ -1 and phospholipase C γ -2. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 2.018-2.025.
10. Lacal JC. Diacylglycerol production in *Xenopus laevis* oocytes after microinjection of p21-*ras* proteins is a consequence of activation of phosphatidylcholine metabolism. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 333-340.
11. Lacal JC, Moscat J, Aaronson SA. Novel source of 1,2 diacylglycerol elevated in cells transformed by Ha-Ras oncogene. *Nature* 1987; 330: 269-271.
12. Macara IC. Elevated phosphocholine concentration in ras-transformed NIH 3T3 cells arises from increased choline kinase activity, not from phosphatidylcholine breakdown. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 325.
13. Teegarden D, Taparowsky EJ, Kent C. Altered phosphatidylcholine metabolism in C3H10T1/2 transfected with the Harvey-*ras* oncogene. *J Biol Chem* 1990; 265: 6.042-6.047.
14. Exton JH. Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J Biol Chem* 1990; 265: 1-4.

15. Warden CH, Fiedkin M. Regulation of choline kinase activity and phosphatidylcholine biosynthesis by the mitogenic growth factors in 3T3 fibroblast. *J Biol Chem* 1985; 260: 6.006-6.011.
16. López-Barahona M, Kaplan PL, Cornet ME, Díaz-Meco MT, Larrodera P, Díaz Laviada I et al. Kinetic evidence of a rapid activation of phosphatidylcholine hydrolysis by Ki-ras oncogene. Possible involvement in late steps of the mitogenic cascade. *J Biol Chem* 1990; 265: 9.022-9.026.
17. Song J, Pfeffer LM, Foster DA. v-src increases diacylglycerol levels via type D phospholipase-mediated hydrolysis of phosphatidylcholine. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4.903-4.908.
18. Murray JJ, Dinh TT, Truet AP, Kennerly DA. Isolation and enzymic assay of choline and phosphocholine present in cell extracts with picomole sensitivity. *Biochem J* 1990; 270: 63-68.
19. Díaz-Laviada ID, Larrodera P, Díaz-Meco MT, Cornet ME, Guddal PH, Johansen T et al. Evidence for a role of phosphatidylcholine-hydrolysing C in the regulation of kinase C by ras and src oncogenes. *Embo J* 1990; 3.907-3.912.
20. Larrodera P, Cornet ME, Díaz-Meco MT, López-Barahona M, Díaz-Laviada I, Gudal PH et al. Role of phosphatidylcholine hydrolysing phospholipase C in the regulation of the protein kinase C by ras and src oncogenes. *J* 1990; 9: 3.907-3.912.
21. Cannon JG, Lee TM, Chang Y, Nyanda AM, Bhattacharya B, Flynn JR et al. Structure-Activity relationship studies of hemicholinium (HC-3) congeners. *Pharm Res* 1988; 5: 359-364.
22. Daly PF, Lyon RC, Faustino RJ, Cohn JS. Phospholipid metabolism in cancer cells monitored by 31P NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 1987; 262: 14.875-14.878.
23. Billah MM, Eckel S, Mullmann TJ, Egan WR, Siegel M. Phosphatidylcholine hydrolysis by PLD determines phosphatide and diglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. Involvement of phosphatidate phosphohydrolase in signal transduction. *J Biol Chem* 1989; 264: 17.069-17.077.
24. Koul O, Hauser G. Modulation of rat brain cytosolic phosphatidate phosphohydrolase: effect of cationic amphiphilic drugs and divalent cations. *Arch Biochem Biophys* 1987; 253: 453-461.
25. Fleischman LF, Chahwala SB, Cantley L. Ras-transformed cells: altered levels of phosphatidylinositol 4-5-bisphosphate and catabolites. *Science* 1986; 231: 407-410.
26. Preiss J, Loomis CR, Bishop WR, Stein R, Niedel JE, Bell RM. Quantitative measurement of sn-1,2-diacylglycerols present in platelets, hepatocytes, and ras- and sis-transformed normal rat kidney cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 8.597-8.600.
27. Wolfman A, Macara IG. Elevated levels of diacylglycerol and decreased phorbol ester sensitivity in ras transformed fibroblast. *Nature* 1987; 325: 359-362.
28. Besterman JM, Duronio V, Cuatrecasas P. Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: a pathway for generation of a second messenger. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6.785-6.789.
29. Blitterswijk WJ, Hilkmann H, Widt J, Van der Bend. Phospholipid metabolism in bradikinin-stimulated human fibroblast. I. Biphasic formation of DAG from phosphatidylinositol and phosphatidylcholine controlled by PKC. *J Biol Chem* 1991; 266: 10.337-10.343.
30. Blitterswijk WJ, Hilkmann H, Widt J, Van der Bend. Phospholipid metabolism in bradikinin-stimulated human fibroblast. II. PC breakdown by phospholipases C and D; involvement of PKC. *J Biol Chem* 1991; 266: 10.344-10.350.
31. Plevin R, Cook SJ, Palmer S, Wakelam MJO. Multiple sources of sn-1,2-diacylglycerol in platelet-derived-growth-factor-stimulated Swiss 3T3 fibroblast. Evidence for activation of phosphoinositidase C and a phosphatidylcholine-specific phospholipase D. *Biochem J* 1991; 279: 559-565.
32. Cook SJ, Wakelam MJO. Analysis of the water soluble products of phosphatidylcholine breakdown by a ion exchange chromatography. Bombesin and TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) stimulate choline generation in Swiss 3T3 by a common mechanism. *Biochem J* 1989; 263: 581-587.
33. Cook SJ, Wakelam MJO. Hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase D is a common response to mitogens which stimulate inositol lipid hydrolysis in Swiss 3T3 fibroblast. *Biochem Biophys* 1991; 1092: 265-272.
34. Van Corven EJ, Groeninck A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH. Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* 1989; 59: 45-54.
35. Moolenaar WH, Kruijer W, Tilly BC, Verlaan I, Bierman AJ, De Laat SW. Growth factor-like action of phosphatidic acid. *Nature* 1986; 323: 171-173.
36. Lacal JC, Fleming TP, Warren BS, Blumberg PM, Aaronson SA. Involvement of functional protein kinase C in mitogenic response to the H-ras oncogene product. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 4146.

DISCUSIÓN

V. VICENTE-GARCÍA: Con el empleo clínico de los factores de crecimiento, específicamente del factor granulocítico, con el que tenemos ya una relativa experiencia, se ha descrito recién-

temente un trastorno de la agregación plaquetaria. Ante ello, uno se puede plantear que está usando un factor de crecimiento teóricamente específico de una línea celular pero que

puede afectar a vías celulares en principio independientes. Estos hallazgos sugieren que, posiblemente, estos factores de crecimiento no son específicos de línea celular: ¿cuál es la situación actual de estos mediadores o factores de crecimiento?, ¿son específicos?, ¿existe analogía de receptores?

J.C. LACAL: Los factores de crecimiento constituyen una línea de investigación apasionante. En los últimos años, desde el descubrimiento de que uno de los oncogenes mejor conocidos correspondía realmente al factor de crecimiento derivado de plaquetas ha habido una gran proliferación de clonaciones y purificaciones de diferentes factores. En principio, como líneas generales, que siempre hay excepciones, se puede decir que existe una gran versatilidad y una gran plasticidad en el sistema de interacción entre factores de diferentes receptores. Sin embargo, al mismo tiempo existe una gran especificidad. Nos encontramos con algo similar a lo que se descubrió hace algunos años al investigar la complejidad del sistema inmunológico. Para obtener una señal mitogénica completa se requieren normalmente dos señales, una contenida en los factores de iniciación y la otra en los factores de progresión. La naturaleza ha diseñado unas aduanas especiales para controlar que una célula sólo crezca en las condiciones idóneas. Por eso se requieren varias alteraciones de los oncogenes para producir una transformación celular completa. Lo normal, en líneas generales, es que exista una marcada especificidad, y que sólo un grupo determinado muy específico de células que expresan el receptor de un determinado factor sea sensible a ese factor de crecimiento. Ahora bien, no siempre que exista el mismo receptor y que, por tanto, sea sensible al mismo factor, se va a producir la misma respuesta ya que las señales intracelulares pueden ser distintas. Es decir, la respuesta, aun siendo específica, refleja en general un proceso complejo y está determinada no sólo por el factor, sino también por la estructura completa del sistema de transducción de la señal, desde el propio factor de crecimiento hasta el factor de transcripción, pasando por los intermediarios citoplásmicos disponibles en cada línea celular.

V. VICENTE GARCÍA: Teniendo en cuenta lo que usted apunta, en el caso concreto que he mencionado en mi anterior intervención la posible activación plaquetaria inducida por factores de crecimiento podría estar perfecta-

mente mediada a través de la estimulación del ciclo de endoperóxidos o fosfolipasas.

J.C. LACAL: Sí, de hecho recientemente se han publicado varios trabajos que indican que las fosfolipasas se activan por al menos dos mecanismos alternativos como componentes de la cascada estructural que he descrito, y una de las funciones reguladas por factores es la activación plaquetaria.

F. RUIZ-CABELLO: Quería preguntarle su opinión sobre el hecho de que las vías biosintéticas que conducen tanto a la proliferación como a la diferenciación celular parecen tener muchos elementos en común. Me refiero a esta ruta biosintética que usted ha expuesto, que puede ser observada tanto en células que están comprometidas con diferenciación, como con proliferación. Esto induce a pensar que a pesar de la aparente complejidad realmente estamos ante una simplicidad de la cuestión.

J.L. LACAL: Como he comentado anteriormente, existe una gran redundancia en la utilización de los sistemas, pero lo llamativo del caso es que en cada sistema celular incluso cuando se emplea el mismo componente estructural la respuesta final puede ser distinta. No es un sistema simple sino muy versátil en función de los componentes disponibles.

F. RUIZ-CABELLO: Otro aspecto que me gustaría conocer es si fosforilcolina se libera también con señales de diferenciación.

J.L. LACAL: Todavía no hemos empezado a investigar la diferenciación, ya que los recursos de que disponemos son limitados, y por ahora nos centramos básicamente en la regulación de la proliferación normal por parte del factor de crecimiento, y en células transformadas por una batería de oncogenes.

A. CANO: Es bien conocida la generación de fosforilcolina en células transformadas por *ras*, y me gustaría saber si ustedes tienen datos acerca de la transformación por otros oncogenes.

J.L. LACAL: Todos los factores de crecimiento que tienen capacidad de proliferación inducen concentraciones elevadas de fosforilcolina. Esta es una constante que hemos observado también con todos los oncogenes que hemos analizado hasta ahora en el sistema de fibroblastos que hemos descrito en la exposición. Cuando pasemos a otro tipo de sistemas celulares comprobaremos si este hallazgo es universal o es específico de fibroblastos, y si se conserva la respuesta con diversos factores y oncogenes.