

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
Y FISIOLÓGIA**



TESIS DOCTORAL

**REGULACIÓN DE LA HIDROXIMETILGLUTARIL-COENZIMA A
REDUCTASA POR EL $\text{TNF}\alpha$ Y SU MENSAJERO INTRACELULAR
CERAMIDA EN CÉLULAS U-937, HL-60, HEP-G2 Y FRTL-5**

GERMÁN GALLARDO CAMPOS

Las Palmas de Gran Canaria, 1999

42/1998-99

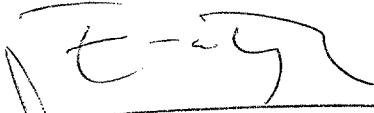
**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO**

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

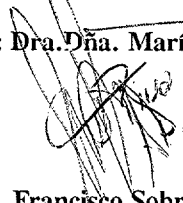
Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de SOBRESALIENTE "CON LAUDE" *por unanimidad.*

Las Palmas de Gran Canaria, a 21 de mayo de 1999.

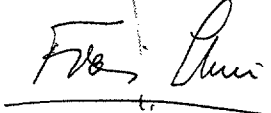
El/a Presidente/a: Dr. D. Eladio Montoya Melgaz,



El/a Secretario/a: Dra. Dña. María del Pino Santana Delgado,



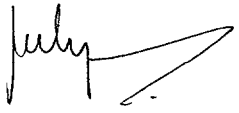
El/a Vocal: Dr.D. Francisco Sobrino Beneyto,



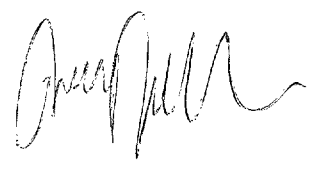
El/a Vocal: Dra. Dña. María José Toro Nozal,



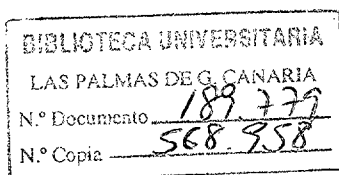
El/a Vocal: Dr.D. José Luis Pérez Arellano,



El Doctorando: D. Germán Gallardo Campos,



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD
DPTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
Y FISIOLÓGIA**



TESIS DOCTORAL

***REGULACIÓN DE LA HIDROXIMETILGLUTARIL-COENZIMA A
REDUCTASA POR EL $TNF\alpha$ Y SU MENSAJERO INTRACELULAR
CERAMIDA EN CÉLULAS U-937, HL-60, HEP-G2 Y FRTL-5***

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003



**GERMÁN GALLARDO CAMPOS
Las Palmas de Gran Canaria
1999**

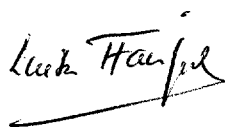
Dña. Luisa Fernanda Fanjul Rodríguez, Catedrática de Fisiología.
D. Manuel Ruiz de Galarreta Hernández, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular.

CERTIFICAN:

Que D. Germán Gallardo Campos, Licenciado en Ciencias Químicas (especialidad en Bioquímica) por la Universidad Autónoma de Madrid y alumno durante el bienio 92/94 del programa de Doctorado "*Fundamentos celulares y moleculares de la proliferación y diferenciación celular*", impartido por este Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología, ha realizado bajo nuestra dirección y supervisión el trabajo experimental titulado "*Regulación de la Hidroximetilglutaril-coenzimaA reductasa por el $TNF\alpha$ y su mensajero intracelular ceramida en células U-937, HL-60, Hep-G2 y FRTL-5*"

Considerando concluido el trabajo experimental y la redacción de sus conclusiones, y juzgando suficientemente novedosas las aportaciones científicas contenidas en el mismo, autorizamos su presentación y defensa para optar al grado de Doctor ante el tribunal encargado de juzgarla, y a los efectos oportunos firmamos el presente certificado.

Las Palmas de Gran Canaria, a 5 de Marzo de 1999



Dra. Luisa Fernanda Fanjul
Rodríguez



Dr. Manuel Ruiz de Galarreta
Hernández

**A mis padres,
por su incondicionalidad**

Índice

Índice

Ilustración de portada: Estructura tridimensional de la HMG-CoA reductasa de *Pseudomonas Mevalonii* (Lawrence et al., 1995. Science **268**: 1758-62).

Ilustración de contraportada: Estructura tridimensional del trímero del TNF α humano (Protein Data Bank).

<i>Índice</i>	<i>vii</i>
<i>Agradecimientos</i>	<i>xv</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>xix</i>
<i>Relación de Figuras y Tablas</i>	<i>xxiii</i>
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 El Factor de necrosis tumoral y sus efectos biológicos en células inmuno y no inmunocompetentes	3
1.1.1 <i>La molécula del TNFα</i>	4
1.1.2 <i>Los receptores del TNFα</i>	5
1.2 La hidrólisis de esfingomielina como vía de señalización intracelular	6
1.2.1 <i>La hidrólisis de esfingomielina</i>	7
1.2.2 <i>La ceramida como mensajero intracelular</i>	9
1.2.3 <i>La ceramida en la señalización intracelular del TNFα</i>	10
1.3 La hidroximetilglutaril-Coenzima A reductasa y la proliferación celular	13
1.3.1 <i>Los productos de la HMG-CoA reductasa</i>	13
1.3.2 <i>Los isoprenoides y la proliferación celular</i>	15
1.3.3 <i>Las funciones celulares del colesterol</i>	18

Índice

1.3.4	<i>La regulación de la expresión y la actividad de la HMG-CoA reductasa</i>	19
2	OBJETIVOS	27
3	MATERIAL Y MÉTODOS	31
3.1	Productos y material utilizados	33
3.1.1	<i>Precursores radiactivos</i>	33
3.1.2	<i>Hormonas y tratamientos</i>	33
3.1.3	<i>Productos y material para cultivos celulares</i>	33
3.1.4	<i>Productos y material para cromatografía y electroforesis</i>	33
3.1.4.1	<i>Cromatografía</i>	33
3.1.4.2	<i>Electroforesis</i>	34
3.1.5	<i>Productos y material utilizados para inmunoprecipitación y Western-blot</i>	34
3.1.6	<i>Productos de biología molecular usados en las técnicas de RT-PCR y fragmentación de DNA (DNA ladder)</i>	34
3.1.7	<i>Productos y material utilizados en la tinción con bisbencimida</i>	35
3.1.8	<i>Otros productos de laboratorio</i>	35
3.2	Cultivos celulares	35
3.2.1	<i>Cultivo de células leucémicas promielocíticas humanas HL-60</i>	35
3.2.2	<i>Cultivo de células de linfoma histiocítico humano U-937</i>	36

3.2.3	<i>Cultivo de células de hepatoma humano Hep-G2</i>	36
3.2.4	<i>Cultivo de células de tiroides de rata FRTL5</i>	36
3.3	Ensayo de la actividad enzimática de la HMG-CoA reductasa	37
3.4	Estudio de la expresión de la HMG-CoA reductasa y el receptor de LDL mediante técnicas de RT-PCR	40
3.4.1	<i>Aislamiento de RNA total</i>	40
3.4.2	<i>Síntesis de cDNA</i>	40
3.4.3	<i>Amplificación por Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)</i>	41
3.4.4	<i>Separación y detección de los productos amplificados</i>	45
3.5	Estudio de la farnesilación de p21^{ras} mediante marcaje metabólico e inmunoprecipitación	46
3.5.1	<i>Marcaje metabólico</i>	46
3.5.2	<i>Inmunoprecipitación</i>	46
3.5.3	<i>Electroforesis y cuantificación</i>	49
3.6	Estudio de la apoptosis celular	49
3.6.1	<i>Contaje de células apoptóticas teñidas con bisbencimida</i>	50
3.6.2	<i>Determinación de la fragmentación del DNA (DNA ladder)</i>	50
3.6.2.1	<i>Extracción y purificación del DNA de bajo peso molecular</i>	50
3.6.2.2	<i>Marcaje del DNA</i>	50
3.6.2.3	<i>Separación y detección de los fragmentos de DNA</i>	51

Índice

3.6.3	<i>Estudio de la degradación de lamina B mediante Western-blot</i>	51
3.7	Estudios de proliferación y viabilidad celular	53
3.7.1	<i>Marcaje con [³H]Timidina</i>	53
3.7.2	<i>Tinción de Azul de Tripán</i>	53
3.8	Otros métodos	53
3.8.1	<i>Activación de la Lovastatina</i>	53
3.8.2	<i>Preparación de la resina Bio Rex 5</i>	54
3.8.3	<i>Preparación de la proteína A-sefarosa</i>	54
3.8.4	<i>Determinación de proteínas</i>	54
3.9	Métodos estadísticos	55
4	RESULTADOS	57
4.1	Estudio de la actividad HMG-CoA reductasa en respuesta a TNFα y ceramida en células U-937, HL-60, Hep-G2 y FRTL-5	59
4.1.1	<i>El TNFα y la ceramida inhiben la actividad HMG-CoA reductasa en células U-937 y HL-60</i>	59
4.1.2	<i>El TNFα y la ceramida inducen la actividad HMG-CoA reductasa en células Hep-G2 y FRTL-5</i>	61
4.2	Estudio de la expresión de HMG-CoA reductasa en respuesta a TNFα y ceramida en células U-937, HL-60, Hep-G2 y FRTL-5	61
4.2.1	<i>El TNFα y la ceramida inhiben la expresión de HMG-CoA reductasa en células U-937 y HL-60</i>	65

4.2.2	<i>El TNFα y la ceramida inducen la expresión de HMG-CoA reductasa en células Hep-G2 y FRTL-5</i>	68
4.2.3	<i>El TNFα y la ceramida inducen la expresión del receptor de LDL en células Hep-G2</i>	68
4.3	Estudio de la farnesilación de p21^{ras} en respuesta a TNFα y ceramida en células HL-60 y Hep-G2	72
4.3.1	<i>El TNFα y la ceramida inhiben la maduración de p21^{ras} en células HL-60</i>	72
4.3.2	<i>El TNFα y la ceramida no afectan a la maduración de p21^{ras} en células Hep-G2</i>	74
4.4	Estudio de la viabilidad/proliferación en respuesta a ceramida de células HL-60 y Hep-G2	74
4.4.1	<i>La ceramida disminuye la viabilidad de las células HL-60</i>	74
4.4.2	<i>La ceramida no afecta a la proliferación de las células Hep-G2</i>	77
4.5	Medida de la apoptosis en respuesta a TNFα y ceramida en células U-937, HL-60 y Hep-G2	77
4.5.1	<i>El TNFα y la ceramida inducen apoptosis, medida por incorporación de bisbencimida, en células U-937 y HL-60</i>	77
4.5.2	<i>El TNFα y la ceramida no inducen apoptosis, medida por incorporación de bisbencimida, en células Hep-G2</i>	80
4.5.3	<i>El TNFα y la ceramida inducen apoptosis, medida como fragmentación de DNA, en células U-937</i>	80
4.5.4	<i>El TNFα y la ceramida inducen apoptosis, medida en función de la degradación de lamina B, en células HL-60</i>	84
4.5.5	<i>El TNFα y la ceramida no inducen apoptosis, medida en función de la degradación de lamina B, en células Hep-G2</i>	84

Índice

5	<i>DISCUSIÓN</i>	89
6	<i>CONCLUSIONES</i>	101
7	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	105

Agradecimientos

Agradecimientos

Agradecimientos

La ciencia requiere de quien la practica, además de una metodología precisa, un juego intelectual a caballo entre la intuición y la deducción. En este sentido, me siento deudor de los Doctores Luisa Fernanda Fanjul Rodríguez y Carlos Manuel Ruiz de Galarreta, cuya distinta (y complementaria) forma de enfocar el análisis científico me ha permitido adquirir mi propia manera de enfrentar la investigación.

Por otra parte, la ciencia se sostiene (si cabe aun más hoy en día) sobre el principio del intercambio de información de forma cooperadora. Es por esto que quiero agradecer a todos los investigadores del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de esta Universidad, su colaboración desinteresada y crítica a lo largo de todo el proceso de elaboración de este trabajo. En particular, al Dr. José Quintana por su asesoramiento en las técnicas de Biología Molecular, y en especial, a los Dres. Francisco Estévez, Pino Santana, Juan González, Vandi Hernández, Ignacio Robaina, Carlos Tabraue, Javier Cabrera y Felix Lopez por estar siempre dispuestos a la discusión constructiva, imprescindible en el trabajo de laboratorio.

Pero la ciencia es una actividad social, y como tal, precisa de un ambiente de buen compañerismo en el que desarrollar el trabajo. Esta ha sido una característica a resaltar entre todos los componentes de este Departamento a lo largo de estos años.

Por último, quisiera agradecer a Raquel Díaz su afecto y cariño (y mucho más) y a Carlos, Nati, Geor, Fran y Janet su sólida amistad, conseguidos mientras se realizaba esta memoria y que, confío, perduren siempre.

Abreviaturas

Abreviaturas

AMV-RT	Transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar
AP-1	Proteína activadora 1
ATP	Adenosina trifosfato
bHLH-ZIP	Hélice vuelta hélice básica-cremallera de leucina
BSA	Albúmina de suero bovino
C2-ceramida	N-acetil esfingosina
CAPK	Proteína quinasa activable por ceramida
CAPP	Proteína fosfatasa activable por ceramida
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CED-3	Gen de muerte celular anormal de <i>Caenorhabditis elegans</i>
Cer	Ceramida (N-acil esfingosina)
CHAPS	(3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano-sulfonato)
DAG	1,2-diacilglicerol
DD	<i>Dead domain</i>
DEPC	Dietil pirocarbamato
Dig-11-dUTP	Digoxigenina-11-deoxiuridina trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Deoxinucleotidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidermoide
EGFR	Receptor del EGF
EGTA	Ácido Etilenglicol-bis(β-aminoetiléter)-N, N, N', N'-tetraacético
FAN	Factor asociado con la activación de la nSMasa
FBS	Suero Bovino Fetal
G3PDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GTP	Guanosina trifosfato
HEPES	N-[2-hidroxietil] piperazino N'-[2-etanosulfanílico]
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril-coenzima A
HMG-CoA red.	Hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa
I-κB	Proteína inhibitoria-κB
ICE	Enzima convertidor de interleuquina-1β
IL	Interleuquina
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLR	Receptor de LDL
LPL	Lipasa de lipoproteínas
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína quinasa activable por mitógeno
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero



Abreviaturas

MVA	Mevalonato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NC	Nitrocelulosa
NCS	Suero de ternera recién nacida
NF-κB	Factor nuclear-κB
NF-1	Factor nuclear 1
OSBP	Proteína de unión a oxiesteroles
PA	Ácido fosfatídico
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PARP	Polimerasa poli(ADP-ribosa)
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pd(T)	Polideoxitimidina
PDK1	Quinasa dependiente de fosfoinosítido 1
PH	Dominio con homología <i>pleckstrina</i>
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PIP₂	PI 4,5-bifosfato
PKA	Proteína quinasa A
PKB/Akt	Proteína quinasa B/producto de v-akt del retrovirus AKT8
PKC	Proteína quinasa C
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de metilsulfonilfenilo
PP	Proteína fosfatasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
RT	Transcriptasa inversa
SAPK/JNK	Proteína quinasa activada por stress/quinasa terminal de <i>Jun</i>
SCAP	Proteína activadora de la rotura de SREBP
SDS	Dodecil sulfato sódico
SM	Esfingomielina
SMasa	Esfingomielinasa (Esfingomielina-fosfodiesterasa)
SOS	<i>Son of sevenless</i> , factor intercambiador GDP/GTP de ras
SRE	Elemento de respuesta a esteroides
SREBP	Proteína de unión al SRE
Taq DNA pol	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Ácido tricloro acético
TEMED	N, N, N, N'-tetrametil-etilendiamina
TNF	Factor necrótico tumoral
tRNA	Ácido ribonucleico transferente

Relación de Figuras y Tablas

Relación de Figuras y Tablas

INTRODUCCIÓN

<i>Figura 1</i>	<i>Esquema de la hidrólisis de esfingomielina</i>	<i>8</i>
<i>Figura 2</i>	<i>Esquema de las principales vías de señalización iniciadas por el TNFα</i>	<i>11</i>
<i>Figura 3</i>	<i>Esquema de la síntesis del Colesterol</i>	<i>14</i>
<i>Figura 4</i>	<i>Esquema de la farnesilación y posterior procesamiento de p21^{ras}</i>	<i>17</i>
<i>Figura 5</i>	<i>Esquema de las distintas formas de regulación de la HMG-CoA reductasa</i>	<i>20</i>
<i>Figura 6</i>	<i>Esquema de la activación de SREBP y su translocación al núcleo</i>	<i>23</i>

MATERIAL Y MÉTODOS

<i>Figura 7</i>	<i>Estudio de la linealidad de la reacción enzimática en el ensayo de la actividad HMG-CoA reductasa</i>	<i>39</i>
<i>Tabla I</i>	<i>Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los distintos enzimas estudiados en esta memoria</i>	<i>42</i>
<i>Figura 8</i>	<i>Estudio de la linealidad de la señal de amplificación de HMG-CoA red., LDLR y G3PDH respecto al número de ciclos de amplificación</i>	<i>43</i>
<i>Figura 9</i>	<i>Estudio de la linealidad de la señal de amplificación de HMG-CoA red. , LDLR y G3PDH respecto a la cantidad de RNA</i>	<i>44</i>
<i>Tabla II</i>	<i>Número de ciclos de amplificación utilizado en la técnica de RT-PCR para cada uno de los enzimas estudiados y según el tipo celular analizado</i>	<i>45</i>

Relación de Figuras y Tablas

Figura 10	Caracterización por tamaño (pb) del producto de RT-PCR utilizando los cebadores de HMG-CoA reductasa	47
Figura 11	Caracterización por tamaño (pb) del producto de RT-PCR utilizando los cebadores de LDLR	48
Figura 12	Determinación de la especificidad del anticuerpo contra lamina B y su fragmento proteolítico	52

RESULTADOS

Figura 13	El $TNF\alpha$ y la ceramida inhiben la actividad de la HMG-CoA reductasa en células U-937	60
Figura 14	La ceramida inhibe la actividad de la HMG-CoA reductasa en células HL-60	62
Figura 15	El $TNF\alpha$ y la ceramida inducen la actividad de la HMG-CoA reductasa en células Hep-G2	63
Figura 16	El $TNF\alpha$ y la ceramida inducen la actividad de la HMG-CoA reductasa en células FRTL-5	64
Figura 17	El $TNF\alpha$ y la ceramida inhiben la expresión de la HMG-CoA reductasa en células U-937	66
Figura 18	La ceramida inhibe la expresión de la HMG-CoA reductasa en células HL60	67
Figura 19	El $TNF\alpha$ y la ceramida inducen la expresión de la HMG-CoA reductasa en células Hep-G2	69
Figura 20	El $TNF\alpha$ y la ceramida inducen la expresión de la HMG-CoA reductasa en células FRTL5	70
Figura 21	El $TNF\alpha$ y la ceramida inducen la expresión del receptor de LDL en células Hep-G2	71
Figura 22	El $TNF\alpha$ y la ceramida inhiben la maduración de $p21^{ras}$ en células HL-60	73

Relación de Figuras y Tablas

<i>Figura 23</i>	<i>El TNFα y la ceramida no afectan a la maduración de p21^{ras} en células Hep-G2</i>	75
<i>Figura 24</i>	<i>La ceramida disminuye la viabilidad de las células HL-60</i>	76
<i>Figura 25</i>	<i>La ceramida no afecta a la proliferación de las células Hep-G2</i>	78
<i>Figura 26</i>	<i>Microscopía de fluorescencia en células U-937 teñidas con bisbencimida</i>	79
<i>Figura 27</i>	<i>El TNFα y la ceramida inducen apoptosis, medida por incorporación de bisbencimida, en células U-937</i>	81
<i>Figura 28</i>	<i>El TNFα y la ceramida inducen apoptosis, medida por incorporación de bisbencimida, en células HL-60</i>	82
<i>Figura 29</i>	<i>El TNFα y la ceramida no inducen apoptosis, medida por incorporación de bisbencimida, en células Hep-G2</i>	83
<i>Figura 30</i>	<i>El TNFα y la ceramida inducen apoptosis, medida como fragmentación de DNA, en células U-937</i>	85
<i>Figura 31</i>	<i>El TNFα y la ceramida inducen apoptosis, medida en función de la degradación de lamina B, en células HL60</i>	86
<i>Figura 32</i>	<i>El TNFα y la ceramida no inducen apoptosis, medida en función de la degradación de lamina B, en células Hep-G2</i>	87

DISCUSIÓN

<i>Figura 33</i>	<i>Esquema de las distintas fases de la apoptosis celular</i>	94
<i>Figura 34</i>	<i>Esquema de la activación de las caspasas que sigue a la unión del TNFα a su receptor</i>	97

Relación de Figuras y Tablas

<i>Figura 35</i>	<i>Esquema de la activación de PKB/Akt y su hipotética relación con la HMG-CoA reductasa</i>	<i>99</i>
<i>Figura 36</i>	<i>Papel de la HMG-CoA reductasa en los mecanismos de la apoptosis inducidos por el TNFα</i>	<i>100</i>

Introducción

Introducción

1.1 El Factor de necrosis tumoral y sus efectos biológicos en células inmuno y no inmunocompetentes

Una gran variedad de estados patológicos tienen como causa aparente la sobreexpresión de mecanismos inmunes originariamente desarrollados para la protección de los organismos vivos. En años recientes se han obtenido evidencias de que varias proteínas involucradas en la respuesta inmune causan enfermedad alterando, además de la función del agente biológico agresor, al propio huésped. Entre ellas se encuentra una citoquina, la caquectina (Beutler y Cerami, 1988), corresponsable de la producción de la anorexia, adelgazamiento extremo y shock terminal que acompaña a las enfermedades infecciosas crónicas y las neoplasias.

La caquectina, fue identificada a mediados de los 70 como responsable de la caquexia producida durante las enfermedades crónicas, utilizando un modelo de caquexia inducida por tripanosoma. Durante la fase terminal de la infección, los conejos y otros animales experimentales utilizados, desarrollan anorexia y pierden más de la mitad de su peso inicial, en paralelo con un paradójico y espectacular aumento de los triglicéridos (Rouzer y Cerami, 1980). Los mismos animales muestran una disminución marcada de la lipasa de lipoproteínas (LPL), de lo que se deduce que el aumento en los niveles de los triglicéridos, que ocurre esencialmente a expensas de las lipoproteínas de muy baja densidad, es una consecuencia de la disminución en la degradación de los mismos.

La misma supresión en la síntesis de LPL fue encontrada, posteriormente, en ratones tratados con endotoxina, y se demostró que era el resultado del aumento de un factor existente en el plasma, cuyo origen fue localizado en los macrófagos y al que se denominó caquectina (Kawakami y Cerami, 1981). La caquectina fue purificada a homogeneidad (Beutler *et al.*, 1985a) del plasma que contenía actividad supresora de LPL, como un polipéptido de PM 17 kDa, que resultó ser producido en grandes cantidades por los macrófagos activados con lipopolisacárido (LPS), así como por animales tratados con agentes capaces de inducir infecciones crónicas (Beutler *et al.*, 1985b). La caquectina se une con gran afinidad a las membranas de células en cultivo y de tejidos obtenidos de animales vivos, en los que es capaz de producir anorexia y efectos tóxicos agudos (Torti *et al.*, 1985).

Desde finales del siglo XIX se conoce que los caldos de cultivo de bacterias del genero *Streptococo* y *Serratia* inducen la necrosis hemorrágica de tumores humanos, asociada con efectos tóxicos (Coley, 1893, 1894, 1896 y 1906). En 1936 se aisló el producto bacteriano responsable de la inducción de la necrosis tumoral y se denominó polisacárido bacteriano a la molécula que ahora se conoce como lipopolisacárido (LPS) (Shear y Andervont, 1936). En 1975 se demostró que el plasma de animales enteros inyectados con LPS tenía actividad citotóxica en una gran variedad de células mantenidas en cultivo (Carswell *et al.*, 1975; Helson *et al.*, 1975). La actividad fue denominada factor de necrosis tumoral y la proteína responsable, el TNF, fue aislada en 1985 (Aggarwal *et al.*, 1984). La secuencia de cDNA que codifica para el TNF se obtuvo (Shirai *et al.*, 1985;

Introducción

Wang *et al.*, 1985) y demostró ser la que predice con exactitud la secuencia amino terminal de la caquectina (Fransen *et al.*, 1985; Pennica *et al.*, 1985; Caput *et al.*, 1986). El alto grado de homología hallado entre la caquectina de ratón y el TNF humano, y la coincidencia de los efectos biológicos de ambos, condujo a la inevitable conclusión de que la caquectina era, en realidad, el TNF, denominación que ha persistido (Beutler *et al.*, 1985c).

El TNF es pues, una proteína sintetizada por los macrófagos con un alto grado de diferenciación, en todas sus localizaciones tisulares (Decker *et al.*, 1987), que se secreta en grandes cantidades en respuesta al LPS como parte de la respuesta inmune del organismo. El TNF puede ser sintetizado y secretado, también, por células linfoides y además del LPS, los virus, las bacterias Gram positivas, el interferón γ , la IL-2 y el factor estimulante del crecimiento de colonias (GM-CSF), son capaces de activar su síntesis y secreción (Nedwin *et al.*, 1985a; Aderka *et al.*, 1986; Beutler *et al.*, 1986; Collart *et al.*, 1986; Cannistra *et al.*, 1987).

La familia del TNF incluye dos proteínas diferentes pero relacionadas estructural y funcionalmente, el TNF α o caquectina (Carswell *et al.*, 1975; Beutler *et al.*, 1985b), producido fundamentalmente por los monocitos y/o macrófagos, y el TNF β o linfotoxina (Williams y Granger, 1968; Ruddle y Walksman, 1968), que es un producto de las células linfoides. Aunque los estudios iniciales que llevaron a su aislamiento limitaron la naturaleza de su actividad biológica a la de agentes antitumorales, los dos factores se consideran actualmente como citoquinas inflamatorias y se encuentran siempre en los lugares en los que ocurre inflamación con infiltración de mononucleares (Vilcek y Lee, 1991). Ambos juegan un importante papel como inmunoestimulantes y mediadores de la resistencia a la infección por un gran número de agentes y, posiblemente, al desarrollo e invasión tumoral (Old, 1985; Havell, 1987). Por otra parte, como ya se ha descrito, la superproducción de TNF α durante la infección, es una de las causas de la severa toxicidad e incluso la muerte que sobreviene por shock séptico en las infecciones por Gram negativo. Además, el TNF α podría estar involucrado en la patogenia de algunas enfermedades autoinmunes y en la reacción de rechazo postransplante (Piguet *et al.*, 1987; Pujol-Borrel *et al.*, 1987; Tracey *et al.*, 1987).

1.1.1 La molécula del TNF α

Los genes del TNF α y el TNF β son de copia única, localizados en el brazo corto del cromosoma 6 humano (Nedwin *et al.*, 1985b; Spies *et al.*, 1989) y del cromosoma 17 murino (Muller *et al.*, 1987), en la frontera de la región que contiene los genes del complejo de histocompatibilidad clase I y III. Los dos genes tienen un tamaño de aproximadamente 3 kpb, conteniendo cuatro exones y tres intrones, similitud que sugiere que ambos derivan de la duplicación de un gen común. La regulación de la transcripción de los dos genes debe ser, sin embargo, diferente porque, a pesar de su alto grado de homología, no existe parecido en las regiones del extremo 5' de los dos genes que

contienen la mayoría de los elementos responsables de la regulación de la transcripción (Shakhov *et al.* 1990).

El clonaje del TNF (Gray *et al.*, 1984; Pennica *et al.*, 1985) puso de manifiesto la existencia de una homología de más del 30% entre la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas. El TNF α maduro es una proteína de 157 aminoácidos (156 en conejos y roedores) y el TNF β contiene 171 residuos, lo que confiere al TNF α humano un PM de 17 kDa y al TNF β de 25 kDa (Aggarwal *et al.*, 1984 y 1985). Las diferencias de tamaño entre ambos factores se deben, además de al mayor número de aminoácidos (14 más) del TNF β , a la existencia de un lugar de N-glicosilación en la molécula del TNF β . En su forma nativa, ambos péptidos forman trímeros de PM 45 kDa y 65 kDa (Eck y Sprang, 1989; Jones *et al.*, 1989) cuyo modo de secreción difiere notablemente. La molécula de TNF β contiene una larga presecuencia de 34 aminoácidos muy hidrofóbica y con residuos cargados en el N terminal, típica de los péptidos de señalización de las proteínas secretorias (Nedwin *et al.*, 1985b), lo que sugiere que se procesa y libera de las células en la forma característica de este tipo de proteínas. Por el contrario, la molécula de TNF α se forma a partir de un largo precursor que contiene regiones hidrofílicas e hidrofóbicas. Existen evidencias de que esta larga presecuencia sirve para anclar a la membrana al precursor de 26 kDa del TNF α (Kriegler *et al.*, 1988; Luetig *et al.*, 1989; Pérez *et al.*, 1990). La forma liberada de 17 kDa se produciría tras una ruptura proteolítica del polipéptido precursor (Kriegler *et al.*, 1988), llevada a cabo posiblemente por una serina proteasa (Scuderi, 1989).

1.1.2 Los receptores del TNF α

Se han identificado y clonado dos tipos diferentes de receptores del TNF α de PM 55 kDa (Loetscher *et al.*, 1990; Schall *et al.*, 1990) y 75 kDa (Smith CA *et al.*, 1990; Dembic *et al.*, 1990), respectivamente, cuyas porciones extracelulares componen una familia de receptores con cuatro dominios característicos con residuos de cisteína espaciados regularmente y necesarios para la unión del péptido (Marsters *et al.*, 1992; Corcoran *et al.*, 1994). En contraste, existe poca homología entre los dominios intracelulares de ambos receptores que no tienen, tampoco, parecido con ninguna otra secuencia conocida (Dembic *et al.*, 1990), lo que sugiere que las vías de señalización de ambos han de ser diferentes.

Por analogía con el receptor de la IL-2, se supuso inicialmente que la formación de puentes cruzados entre ambos tipos de receptor sería necesaria para la producción de los efectos biológicos del TNF (Hatakeyama *et al.*, 1989). Sin embargo, dado que las células que expresan un único tipo de receptor unen y responden al TNF, se concluyó que no existía ningún tipo de colaboración entre ambos tipos de receptores. Más tarde, en estudios utilizando anticuerpos específicos para bloquear cada receptor se demostró que, en algunos tipos celulares, la presencia de p75 no es suficiente para iniciar las respuestas

Introducción

al TNF que requieren, por el contrario, la existencia de p55 activo (Thoma *et al.*, 1990; Wiegmann *et al.*, 1992).

La controversia acerca del tipo de participación de cada receptor en la transmisión de las órdenes del TNF así como del grado de cooperación necesaria entre ambos, no ha sido aún resuelta. En términos generales, se acepta que el p55 y el p75 están involucrados en la producción de efectos biológicos distintos, siendo el receptor p55 el implicado en los efectos antitumorales y citotóxicos del TNF y el receptor p75 el responsable de los efectos proinflamatorios (Barbara *et al.*, 1994; Bigda *et al.*, 1994; Paleolog *et al.*, 1994; Rusten *et al.*, 1994a y b; Sheehan *et al.*, 1995), aunque las señales generadas en ambos receptores se potencian, o deben producirse simultáneamente, para ser eficaces en algunos tipos celulares (Leeuwenberg *et al.*, 1995; Richter *et al.*, 1995; Rusten y Jacobsen, 1995; Vandenabeele *et al.*, 1995).

La síntesis de ambos tipos de receptores se regula por mecanismos independientes (Smith CA *et al.*, 1990; Thoma *et al.*, 1990), siendo la expresión y la proteína de la forma p75 activada tras la unión del TNF α al receptor p55, de la vía del CD2 o del factor estimulante de colonias (Santis *et al.*, 1992; Kalthoff *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1995). Después de incorporados a la membrana, los dominios extracelulares de ambos receptores pueden sufrir una ruptura proteolítica activada por el propio TNF α , la IL-1, el lipopolisacárido y algunas endotoxinas, en un mecanismo mediado por PKC, en el que se generan formas solubles del receptor a través de las que se modula la actividad del TNF α durante el proceso inflamatorio de defensa frente a la infección (Porteu *et al.*, 1991; Bjornberg *et al.*, 1994; Joyce *et al.*, 1994; Porteu y Hieblot, 1994; Carpenter *et al.*, 1995; Joyce y Steer, 1995; Lien *et al.*, 1995).

1.2 La hidrólisis de esfingomielina como vía de señalización intracelular

Hasta hace poco tiempo, toda la investigación realizada sobre la gran complejidad estructural de los lípidos de membrana no había producido una teoría coherente que explicara la necesidad de la existencia de una diversidad tan importante en las especies moleculares de estos lípidos. Ya que una capa bilipídica constituida por un único tipo de fosfolípido serviría, posiblemente con la misma idoneidad, a las funciones separadoras de compartimentos de las membranas, ¿cuál debe ser, entonces, el objetivo de la existencia de tantos fosfolípidos diferentes?

La respuesta, probablemente, tiene que ver más con los productos de degradación y los metabolitos de los lípidos que con los propios lípidos. Desde mediados de los 70, cuando Mitchell (Mitchell, 1975) estableció el papel de los fosfolípidos del inositol en la señalización intracelular, un número creciente de productos de la hidrólisis de diversos lípidos de membrana se ha ido incorporando a la lista de aquellos que participan en las cadenas de señalización intracelular. Moléculas como los inositol fosfatos, inositol glicanos, diacilglicerol, ácido fosfatídico, ácido araquidónico, prostaglandinas,

leucotrienos, tromboxanos y otras derivadas de la hidrólisis única o secuencial de lípidos de membrana como el PI, PIP₂, PA, ó PC, son ya consideradas mensajeros intracelulares de un amplio abanico de moléculas reguladoras que actúan en las células a través de receptores de membrana (Mitchell, 1975; Farese, 1983; Nishizuka, 1984; Hokin, 1985; Low y Saltiel, 1988; Billah y Anthes, 1990; Exton, 1990; Divecha e Irvine, 1994; Liscovitch y Cantley, 1994).

La esfingomielina, hasta hace poco objeto de interés fundamentalmente por ser el componente principal de la vaina de mielina, es el último de los lípidos en incorporarse a esta familia cada vez más extensa (Hannun y Bell, 1989; Merrill y Stevens, 1989; Spiegel *et al.*, 1996). Los productos de su hidrólisis, fundamentalmente la ceramida y la esfingosina, parecen estar implicados en múltiples formas en la señalización intracelular (Kolesnick, 1992; Hannun y Linardic, 1993; Hannun, 1994).

1.2.1 La hidrólisis de esfingomielina

La ruptura de la esfingomielina, para liberar metabolitos que actúan como segundos mensajeros es, actualmente, un hecho bien establecido (Kolesnick, 1992; Hannun y Linardic, 1993; Hannun, 1994; Spiegel *et al.*, 1996), que le otorga el *status* de autentica vía de señalización intracelular en respuesta a distintos estímulos.

La ceramida es la molécula central de la vía y es generada, fundamentalmente, por la hidrólisis de esfingomielina mediada por la acción de esfingomielinasas (SMasas), formas específicas de fosfolipasa C, que hidrolizan el enlace fosfodiéster de la esfingomielina liberando ceramida y fosfocolina (Kolesnick, 1991; Spiegel *et al.*, 1996; Merrill *et al.*, 1997)(ver **Figura 1**). Mientras que esta última es soluble y difunde rápidamente para ser hidrolizada a colina, la ceramida es muy hidrofóbica y permanece anclada en la membrana donde se puede acumular o convertir en otros metabolitos. Su fosforilación por ceramida quinasa (Bajjalieh, *et al.*, 1989; Kolesnick y Hemer, 1990), genera ceramida-1-fosfato, pero también puede ser deacilada por ceramidasa para convertirse en esfingosina, la cual puede también fosforilarse para rendir esfingosina-1-fosfato (Spiegel *et al.*, 1996). Todos estos derivados de la ceramida pueden ejercer de moléculas efectoras en distintas situaciones.

Varias isoformas de esfingomielinasas han sido caracterizadas en mamíferos en función de sus propiedades catalíticas, localización subcelular o su modo de regulación.

Una SMasa ácida (aSMasa, pH óptimo 4.5-5.0), de localización lisosomal y activable por DAG generado a partir de PC mediante una PC-PLC específica (Quintern *et al.*, 1987; Kolesnick, 1987; Schütze *et al.*, 1992), fue la primera en clonarse y caracterizarse a nivel molecular (Quintern *et al.*, 1989).

Introducción

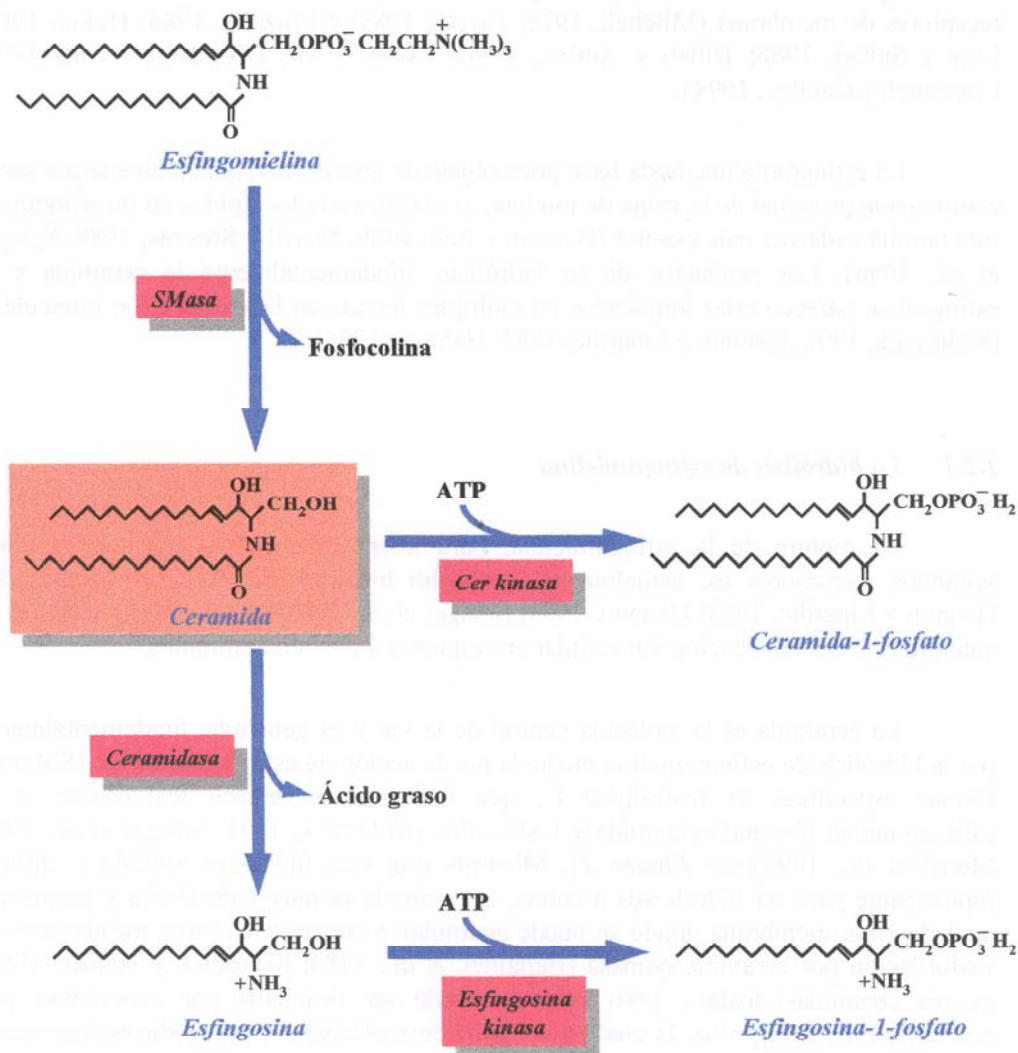


Figura 1

Esquema de la hidrólisis de esfingomielina

Otra forma de aSMasa, estimulable por Zn^{2+} , es secretada por macrófagos, fibroblastos y células endoteliales en respuesta a citoquinas (Spence *et al.*, 1989; Schissel *et al.*, 1996; Marathe *et al.*, 1998) actuando, al parecer, de forma paracrina o autocrina para hidrolizar esfingomielina de la superficie celular e iniciar la señalización (Schissel *et al.*, 1996).

También ha sido caracterizada molecularmente una esfingomielinasa neutra (nSMasa, pH óptimo 7.4), residente en la membrana plasmática y dependiente de Mg^{2+} (Spence *et al.*, 1982). Ratones deficientes en el gen (*knock-out*) de aSMasa mantienen la actividad nSMasa, lo que sugiere que ambas isoformas son el producto de distintos genes (Horinouchi *et al.*, 1995; Otterbach y Stoffel, 1995).

Por último, se ha descrito una isoforma de nSMasa citosólica y catión independiente, activable por el receptor de la vitamina D3 (Okazaki *et al.*, 1994), y una SMasa alcalina detectada en la mucosa intestinal y bilis, que parece estar involucrada en la digestión y proliferación de la mucosa (Nyberg *et al.*, 1996; Duan *et al.*, 1996).

1.2.2 La ceramida como mensajero intracelular

El papel como mensajeros intracelulares de los productos de la hidrólisis de la esfingomielina fue, inicialmente, asociado a la capacidad exhibida por algunos derivados de los esfingolípidos de membrana para inhibir la actividad de la proteína quinasa C (Hannun y Bell, 1989; Merrill y Stevens, 1989). Posteriormente, se obtuvieron pruebas en diversos tipos celulares (Kolesnick, 1992; Hannun, 1994) que asocian los productos de la hidrólisis de la esfingomielina con el papel de mensajeros intracelulares en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular (Hannun y Linardic, 1993; Hannun y Obeid, 1995).

La ceramida o su derivado fosforilado, la fosforilceramida, inhibe la proliferación y estimula la diferenciación macrofítica, en respuesta a la Vitamina D3, en células promielocíticas HL-60 (Okazaki *et al.*, 1990), pero inhibe la diferenciación inducida por la activación de PKC con ésteres de forbol (Kolesnick, 1989). Por el contrario, la ceramida, la esfingosina y su metabolito la fosforesfingosina activan la proliferación de fibroblastos Swiss 3T3, aparentemente por una estimulación de la liberación de Ca^{2+} que ocurre en ausencia de hidrólisis de PIP_2 (Olivera *et al.*, 1992; Desai *et al.*, 1992 y 1993; Mattie *et al.* 1994; Olivera *et al.*, 1994; Hauser *et al.*, 1994).

Los efectos sobre la proliferación celular estarían relacionados con la probada capacidad de la ceramida para activar algunos factores de transcripción, entre ellos el NF- κ B. La activación de éste ocurre por disociación, previa fosforilación, de la molécula reguladora del mismo I- κ B y la translocación al núcleo del heterodímero de las dos subunidades, p50 y p65, que forman el NF- κ B (Baeuerle y Baltimore, 1988a y b;

Introducción

Kawakami *et al.*, 1988; Ghosh y Baltimore, 1990; Ghosh *et al.*, 1990; Ruben *et al.*, 1991; Blank *et al.*, 1992).

La ceramida, a través de un mecanismo aún por determinar pero que implicaría a una forma poco común de PKC (PKC ζ), es capaz de activar NF- κ B en un proceso que formaría parte de la cadena de señalización iniciada con la hidrólisis de la esfingomielina (Schütze *et al.*, 1992; Dbaiho *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1993).

La apoptosis o muerte celular programada, un proceso que ha sido comparado con un suicidio celular en el curso del cual las células sintetizan proteínas que determinan su propia muerte (Williams, 1991; Williams *et al.* 1992; Collins y López-Rivas, 1993; Osborne y Schwartz, 1994), es otro de los eventos en el que la ceramida podría actuar como mensajero intracelular (Obeid *et al.*, 1993; Jarvis *et al.*, 1994a; Hannun y Obeid, 1995).

Así pues, la esfingomielina no puede ser ya considerada como un lípido cuyas funciones se reducen al mantenimiento de la arquitectura de las membranas celulares, sino como el precursor de toda una serie de mensajeros intracelulares, que en forma muy parecida a la de los derivados de los fosfolípidos del inositol, constituyen una vía de señalización para los procesos fundamentales de toda célula: proliferación, diferenciación y apoptosis.

1.2.3 La ceramida en la señalización intracelular del TNF α

La mayoría de los receptores de factores de crecimiento poseen actividad de proteína quinasa asociada a su molécula. Sin embargo, y aunque varias proteínas se fosforilan minutos después de la exposición de las células al TNF α , no existen evidencias de dicha actividad asociada al receptor del TNF α (Marino *et al.*, 1989; Robaye *et al.*, 1989; Schütze *et al.*, 1989), por lo que durante algún tiempo se mantuvo la hipótesis de que los cambios en la fosforilación observada en respuesta a TNF α serían producidos por quinasas celulares como la PKA (Zhang *et al.*, 1988) y la PKC activada por DAG, generado a partir de fosfatidilcolina, o por ácidos grasos insaturados, liberados por la PLA₂ (Brenner *et al.*, 1989; Krönke *et al.*, 1991).

Las primeras evidencias acerca de la existencia de un sistema de señalización intracelular acoplado al receptor de TNF α (ver **Figura 2**) que pudiera servir de mensajero a los variados efectos biológicos del péptido se obtuvieron al probarse que, tras la unión del TNF α a su receptor, podía medirse un aumento en los niveles intracelulares de ceramida a partir de la hidrólisis de esfingomielina en células de la leucemia promielocítica humana HL-60 (Kim *et al.*, 1991). El receptor p55 es el que se encuentra acoplado a la hidrólisis de esfingomielina (Wiegmann *et al.*, 1992) y activa de forma independiente y mediante dominios diferentes las esfingomielinasa neutra y ácida (Wiegmann *et al.*, 1994). Se determinó una región de 11 aminoácidos, denominada

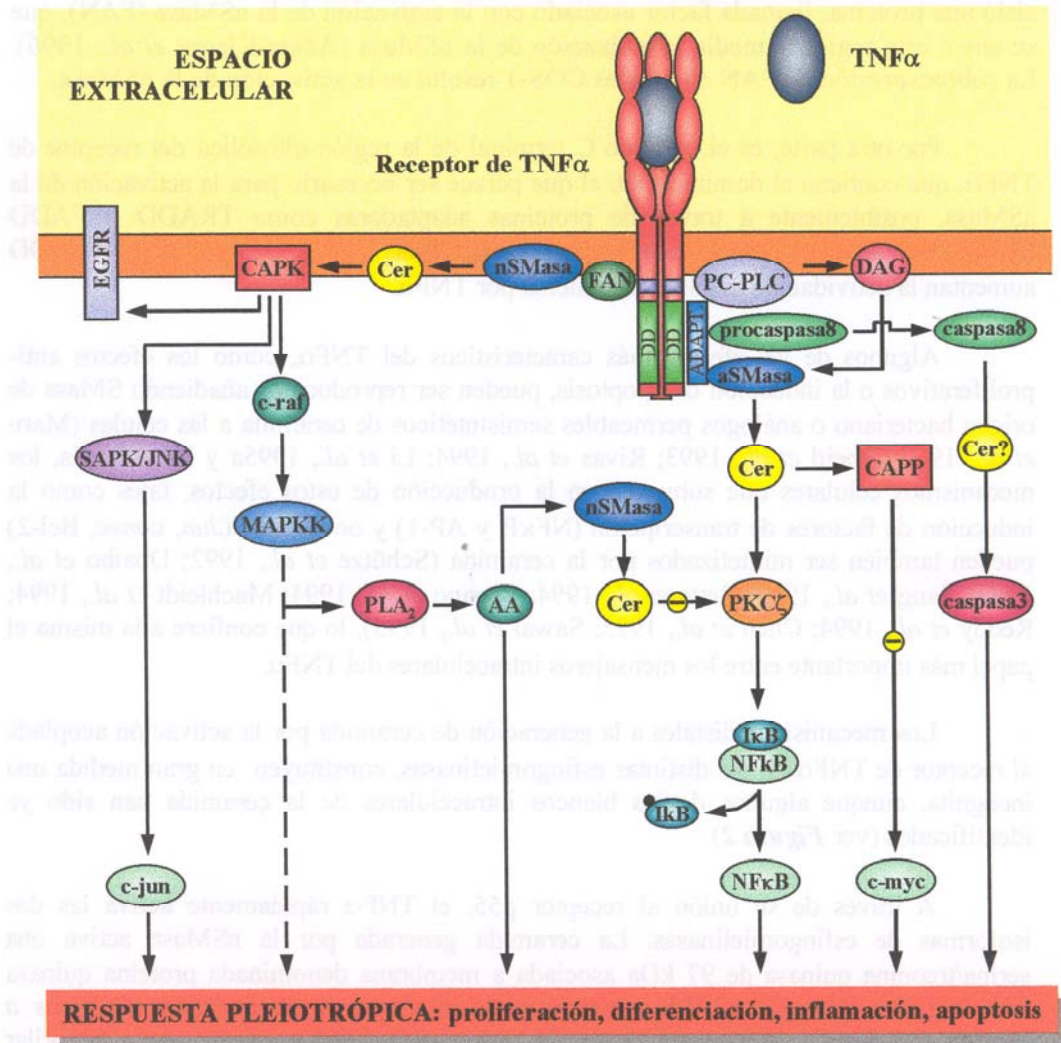


Figura 2

Esquema de las principales vías de señalización iniciadas por el TNF α

Introducción

neutral SMase domain (NSD), adyacente al *dead domain* (DD) del receptor, necesaria y suficiente para la activación de la nSMasa (Adam *et al.*, 1996). Posteriormente, se aisló una proteína, llamada factor asociado con la activación de la nSMasa (FAN), que se une a esta región y media la activación de la nSMasa (Adam-Klages *et al.*, 1996). La sobreexpresión de FAN en células COS-1 resulta en la activación de la nSMasa.

Por otra parte, es el extremo C terminal de la región citosólica del receptor de TNF α , que contiene el dominio DD, el que parece ser necesario para la activación de la aSMasa, posiblemente a través de proteínas adaptadoras como TRADD o FADD (Schwandner *et al.*, 1998). La sobreexpresión en células HEK 293 de TRADD y FADD aumentan la actividad de la aSMasa inducida por TNF α .

Algunos de los efectos más característicos del TNF α , como los efectos anti-proliferativos o la inducción de apoptosis, pueden ser reproducidos añadiendo SMasa de origen bacteriano o análogos permeables semisintéticos de ceramida a las células (Maru *et al.*, 1993; Obeid *et al.*, 1993; Rivas *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995a y b). Además, los mecanismos celulares que subyacen en la producción de estos efectos, tales como la inducción de factores de transcripción (NF κ B y AP-1) y oncogenes (*Jun*, *c-myc*, *Bcl-2*) pueden también ser mimetizados por la ceramida (Schütze *et al.*, 1992; Dbaiibo *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1993; Betts *et al.*, 1994; Lozano *et al.*, 1994; Machleidt *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Sawai *et al.*, 1995), lo que confiere a la misma el papel más importante entre los mensajeros intracelulares del TNF α .

Los mecanismos distales a la generación de ceramida por la activación acoplada al receptor de TNF α de las distintas esfingomielinasas, constituyen en gran medida una incógnita, aunque algunos de los blancos intracelulares de la ceramida han sido ya identificados (ver **Figura 2**).

A través de su unión al receptor p55, el TNF α rápidamente activa las dos isoformas de esfingomielinasas. La ceramida generada por la nSMasa activa una serina/treonina quinasa de 97 kDa asociada a membrana denominada proteína quinasa activable por ceramida (CAPK), perteneciente al grupo de las *quinasas dirigidas a prolina*, una familia en continua expansión que se caracteriza por reconocer y fosforilar sustratos que contienen la secuencia mínima X-Ser/Thr-Prol-X (Kennelly y Krebs, 1991; Joseph *et al.*, 1993; Kolesnick y Golde, 1994). La CAPK es inducida por el TNF α *in vivo* y en experimentos realizados con membranas aisladas de células A431 y HL-60 (Mathias *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1994) y por el LPS en células HL-60 y en neutrófilos humanos (Joseph *et al.*, 1994).

Entre los blancos celulares de la CAPK inducida por el TNF α se encuentran el receptor de EGF, que fosforila en la Thr 669 (Goldkorn *et al.*, 1991), y c-Raf-1, que fosforila en la Thr 269 (Yao *et al.*, 1995), iniciando la cascada de fosforilación de las MAP quinasas que conduce a la activación génica. En células HL-60 y L929, el TNF α activa, a través de ceramida/CAPK, la p⁵⁶ MAP quinasa, también denominada quinasa

activada por el stress/quinasa terminal de JUN (SAPK/JNK) (Westwick *et al.*, 1995; Verheij *et al.*, 1996), quinasa implicada en la transregulación de Jun/AP-1 por el TNF α (Sawai *et al.*, 1995).

En células HL-60, la activación por el TNF α de la CAPK induce la fosforilación de la p⁴² MAP quinasa (Raines *et al.*, 1993), activándola, lo que conduce a la fosforilación de la PLA₂ de localización citosólica (Lin *et al.*, 1992 y 1993) que genera ácido araquidónico. Este último es el precursor de los que podrían ser los coactivadores de la expresión de *c-fos* (Heller y Krönke, 1994). Además, el ácido araquidónico ha sido identificado como el activador de una nSMasa de localización citosólica (Okazaki *et al.*, 1994; Jayadev *et al.*, 1994). La ceramida producida tras la activación de la nSMasa citosólica y el propio ácido araquidónico, constituirían un sistema de modulación negativo de la PKC ζ , una de las isoformas no convencionales de PKC (Müller *et al.*, 1995).

Además de a las nSMasas, el TNF α activa una aSMasa citosólica a través de DAG generado a partir de la hidrólisis de PC por una fosfolipasa C específica de PC acoplada a su receptor p55 (Schütze *et al.*, 1991 y 1992). La activación de esta esfingomielinasa produce pequeñas cantidades de ceramida susceptibles de solubilizarse en el citoplasma celular y que activan la PKC ζ (Lozano *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 1995), modulada a su vez negativamente por el ácido araquidónico y los niveles elevados de ceramida. La PKC ζ parece ser la quinasa clave en la activación del NF- κ B (Berra *et al.*, 1993; Díaz-Meco *et al.*, 1993 y 1994), un factor de transcripción que media algunos de los efectos biológicos del TNF α .

Finalmente, la ceramida producida por la activación de la aSMasa activa, de forma no conocida, una serina/treonina fosfatasa citosólica (CAPP) sensible a ácido okadaico, que ha sido identificada como la forma heterotrimérica de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Dobrowsky y Hannun, 1992; Dobrowsky *et al.*, 1992) en el citosol de células de glioma de rata T9 (Law y Rossie, 1995), que podría estar implicada en la represión de *c-myc* por el TNF α (Wolf *et al.*, 1994).

1.3 La hidroximetilglutaril-Coenzima A reductasa y la proliferación celular

1.3.1 Los productos de la HMG-CoA reductasa

El sustrato de la HMG-CoA reductasa es la hidroximetilglutaril-coenzima A (ver **Figura 3**) que se hidroliza para producir mevalonato, el precursor en las células eucariotas de los isoprenoides y el colesterol (Goldstein y Brown, 1990). Las vías de metabolización del mevalonato fueron descritas por primera vez en el hígado y, posteriormente, comprobadas con mínimas modificaciones en otras células (Popjak *et al.*, 1961; Bloch, 1965; Olson, 1968; Gough y Hemming, 1970; Beytia y Porter, 1976).

Introducción

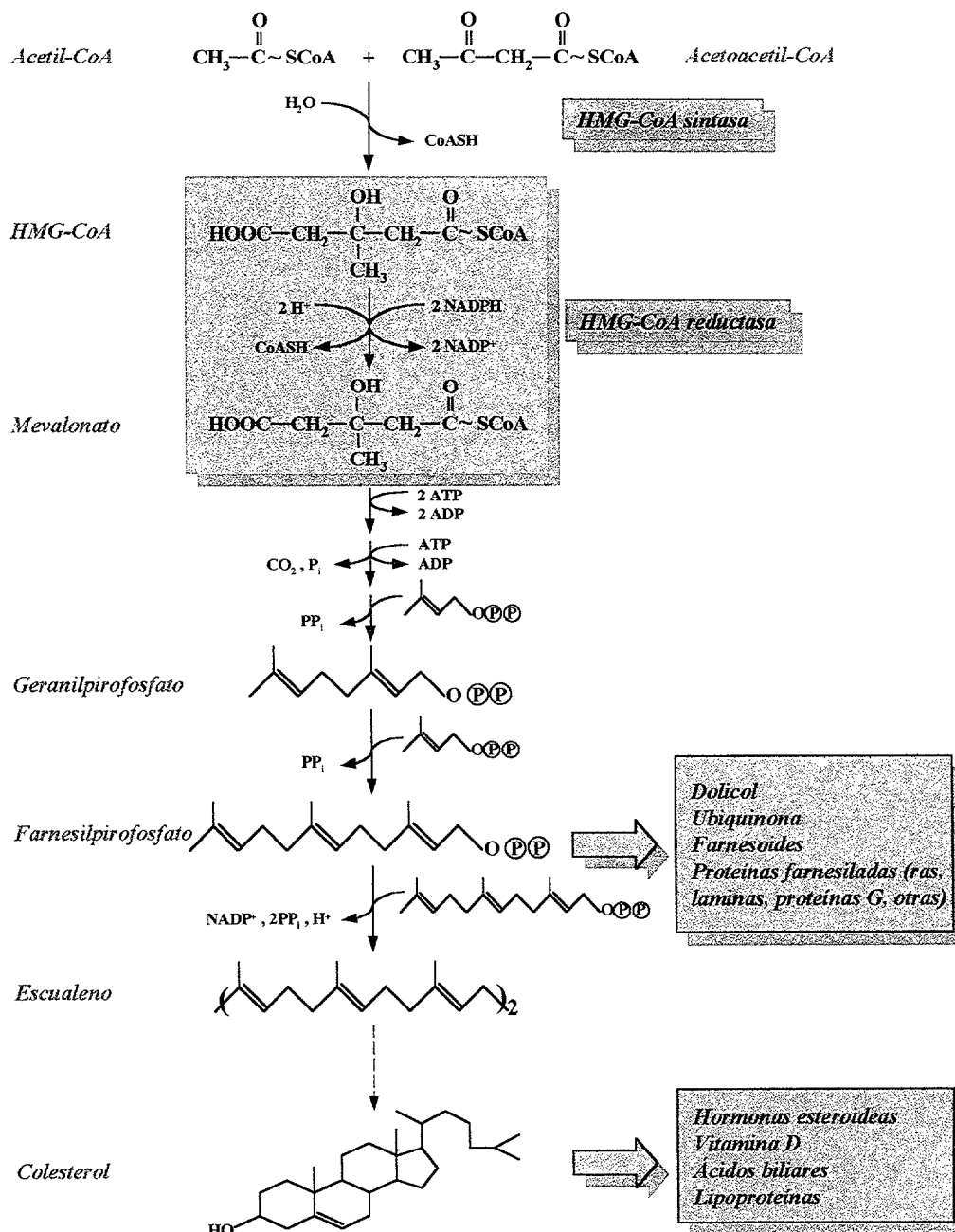


Figura 3

Esquema de la síntesis del Colesterol

En general, en la mayoría de las células de mamíferos, el mevalonato se convierte en cuatro tipos de productos finales: *i)* colesterol y sus metabolitos; *ii)* dolicol; *iii)* farnesoides; y *iv)* grupos prenilo que serán incorporados a algunas proteínas y a la cadena lateral de la ubiquinona (Mills y Adamany, 1978; Faust *et al.*, 1979; James y Kandutsch, 1979).

Para dar lugar a estos productos finales el mevalonato se fosforila, decarboxila e isomeriza para producir isopentenilo pirofosfato, la molécula básica con la que se construirán los isoprenoides. La condensación *cabeza-cola* de dos isómeros de isopentenilo pirofosfato (el 3,3-dimetilalil pirofosfato y el 3-isopentenil pirofosfato) produce el geranil pirofosfato, que después de una segunda condensación con isopentenilo pirofosfato, catalizada por una prenil transferasa citoplasmática denominada geranil transferasa o farnesil pirofosfato sintasa, da lugar al farnesil pirofosfato, la molécula a partir de la que se sintetizan los demás isoprenoides y esteroides.

La síntesis de farnesoides se inicia con la defosforilación del farnesil pirofosfato para producir farnesol (Christophe y Popjak, 1961) y la transformación de este metabolito en farnesal y ácido farnesoico por alcohol y aldehído deshidrogenasas. Posteriormente y utilizando S-adenosilmetionina como donante se forma el metil farnesoato de forma similar a la que se sintetiza la hormona juvenil de insectos y moluscos (Schooley y Baker, 1985).

Para sintetizar colesterol, un enzima microsomal, la escualeno sintasa, cataliza una reacción en la que los dos grupos pirofosfato de la molécula de farnesil pirofosfato se liberan con pérdida de un átomo de hidrógeno de la molécula del farnesil y sustitución por un hidrógeno del NADPH para producir una condensación de dos moléculas de farnesil. La biosíntesis de colesterol a partir de escualeno se completa utilizando un intermediario, el lanosterol, que contiene el sistema anular tetracíclico fusionado y una cadena lateral de ocho carbonos.

1.3.2 Los isoprenoides y la proliferación celular

La modificación postraducciona l de proteínas de mamíferos por incorporación de isoprenoides a su molécula se demostró por primera vez en fibroblastos Swiss 3T3, que incorporaron mevalonato radioactivo a moléculas no extraíbles con solventes de lípidos (Schmidt *et al.*, 1984). La isoprenilación resultó ser un mecanismo de modificación postraducciona l muy extendido que, con frecuencia aunque no siempre, es utilizado para mejorar la afinidad de las proteínas por las membranas (Schultz *et al.*, 1988; Glomset *et al.*, 1990).

Las proteínas que son isopreniladas exhiben secuencias de consenso -CAAX, -CXC o -CC en el C-terminal (Holtz *et al.*, 1989; Hancock *et al.*, 1991a; Khosravi-Far

Introducción

et al., 1991; Moores *et al.*, 1991; Schafer y Rine, 1992; Zhang y Casey, 1996) para isopreniltransferasas (Casey y Seabra, 1996), que incorporan geranilo o farnesilo al sulfuro de la cadena lateral de la cisteína (Khosravi-Far *et al.*, 1992) (ver **Figura 4**). La molécula sufre después hidrólisis proteolítica, que libera los residuos de aminoácidos terminales por proteasas citosólicas o unidas a membrana, y la modificación se completa con una metilación en el carboxi terminal utilizando la S-adenosilmetionina como donante (Clarke, 1992; Sinensky y Lutz, 1992).

Entre las proteínas que son modificadas por isoprenilación se incluyen las laminas nucleares A y B (Beck *et al.*, 1988; Wolda y Glomset, 1988; Vorburger *et al.*, 1989; Beck *et al.*, 1990), las diferentes formas de Ras y otras proteínas ligadoras de GTP (Casey *et al.*, 1989; Magee, 1989; Newman y Magee, 1993), las subunidades de las proteínas G heterotriméricas (Finegold *et al.*, 1990; Fukada *et al.*, 1990; Lai *et al.*, 1990; Maltese y Robishaw, 1990; Mumby *et al.*, 1990; Sanford *et al.*, 1991) y algunas proteína quinasas (Inglese *et al.*, 1992).

La función de la isoprenilación se sospechó, cuando se correlacionaron la privación de mevalonato con la existencia de defectos en la isoprenilación de proteínas y una inhibición en la síntesis de DNA (Quesney-Huneeus *et al.*, 1979; Sinensky y Logel, 1985; Maltese y Sheridan, 1987). Con la utilización de inhibidores de la HMG-CoA reductasa como la Lovastatina, se generalizó el conocimiento acerca del papel de la prenilación de proteínas en la regulación del ciclo celular y la proliferación (Maltese, 1990; Jakobisiak *et al.*, 1991).

Los detalles acerca de la relación entre la isoprenilación y este efecto biológico global empezaron a conocerse cuando se observó que la mayoría de las proteínas modificadas por isoprenilación se localizan en las membranas y que la modificación es esencial para que se produzca la asociación. Este hecho fue demostrado por primera vez para el producto de *ras*, al constatarse que cuando en la proteína se substituía la cisteína del C terminal por serina o la biosíntesis de isoprenoides era inhibida, desaparecían tanto la isoprenilación como la incorporación a la membrana (Casey *et al.*, 1989; Hancock *et al.*, 1989; Schafer *et al.*, 1989; Glomset y Farnsworth, 1994). Al igual que en el caso de Ras, la asociación de proteínas G a las membranas es dependiente de isoprenilación (Simonds *et al.*, 1991; Muntz *et al.*, 1992).

La prenilación no es suficiente para promover la unión a membranas más que en una pequeña medida (Zhang y Casey, 1996), sin embargo, es imprescindible para que ocurra la proteólisis y la metilación o acilación (palmitoilización o miristoilización) subsiguientes, procesos de los que sí depende directamente la unión a membranas (Hancock *et al.*, 1989, 1990 y 1991b; Kato *et al.*, 1992; Fukada *et al.*, 1994; Parish *et al.*, 1995).

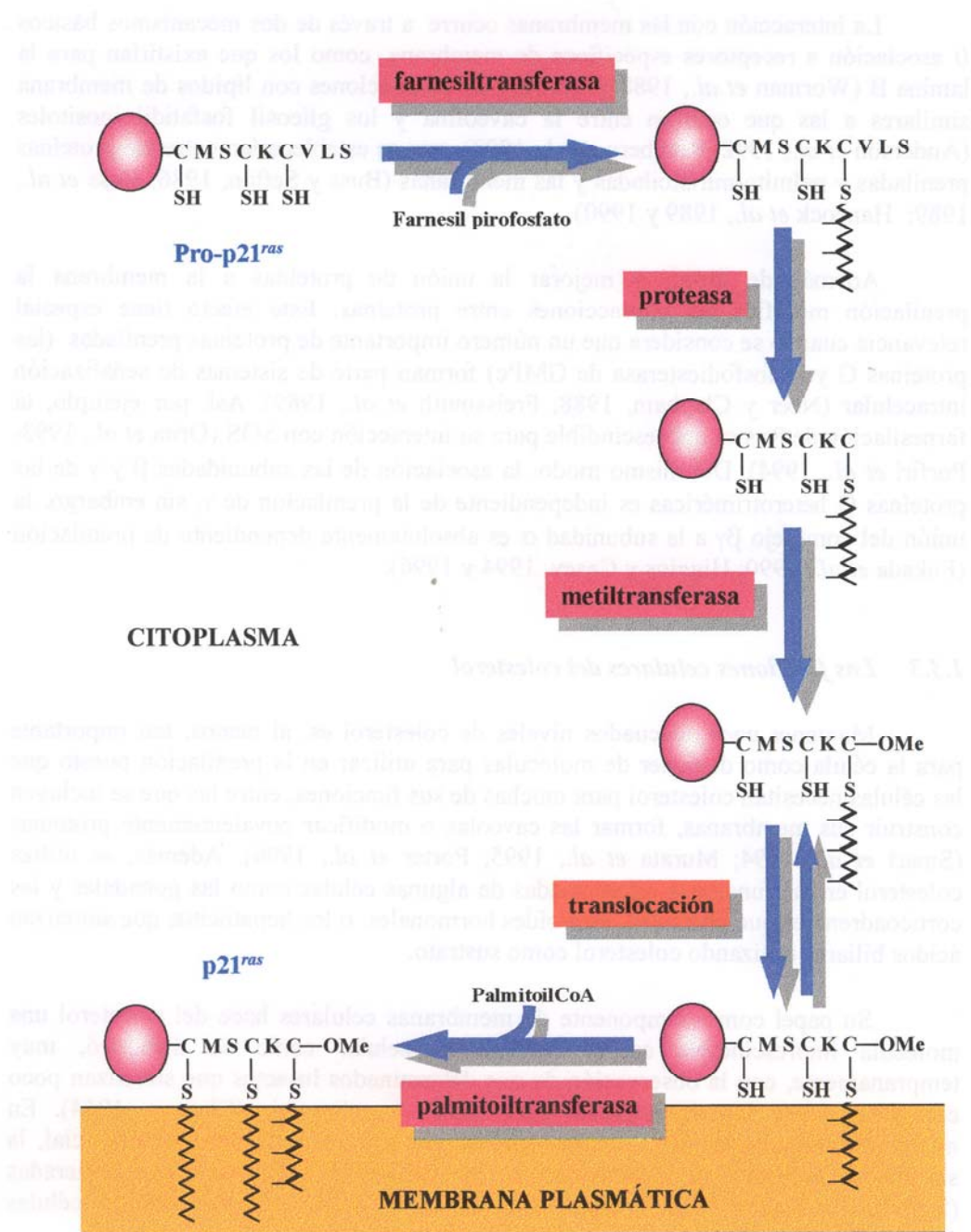


Figura 4

Esquema de la farnesilación y posterior procesamiento de p21^{ras}

Introducción

La interacción con las membranas ocurre a través de dos mecanismos básicos *i)* asociación a receptores específicos de membrana, como los que existirían para la lamina B (Worman *et al.*, 1988 y 1990); y *ii)* interacciones con lípidos de membrana similares a las que ocurren entre la caveolina y los glicosil fosfatidil inosíoles (Anderson *et al.*, 1992; Rothberg *et al.*, 1992), que se establecerían entre las proteínas preniladas y palmito/miristoiladas y las membranas (Buss y Sefton, 1986; Buss *et al.*, 1989; Hancock *et al.*, 1989 y 1990).

Además de dirigir y mejorar la unión de proteínas a la membrana la prenilación modifica las interacciones entre proteínas. Este efecto tiene especial relevancia cuando se considera que un número importante de proteínas preniladas (las proteínas G y la fosfodiesterasa de GMPc) forman parte de sistemas de señalización intracelular (Neer y Clapham, 1988; Freissmuth *et al.*, 1989). Así, por ejemplo, la farnesilación de Ras es imprescindible para su interacción con SOS (Orita *et al.*, 1993; Porfiri *et al.*, 1994). Del mismo modo, la asociación de las subunidades β y γ de las proteínas G heterotriméricas es independiente de la prenilación de γ , sin embargo, la unión del complejo $\beta\gamma$ a la subunidad α es absolutamente dependiente de prenilación (Fukada *et al.*, 1990; Higgins y Casey, 1994 y 1996).

1.3.3 Las funciones celulares del colesterol

Mantener unos adecuados niveles de colesterol es, al menos, tan importante para la célula como disponer de moléculas para utilizar en la prenilación puesto que las células necesitan colesterol para muchas de sus funciones, entre las que se incluyen construir sus membranas, formar las caveolas o modificar covalentemente proteínas (Smart *et al.*, 1994; Murata *et al.*, 1995; Porter *et al.*, 1996). Además, se utiliza colesterol en las funciones diferenciadas de algunas células como las gonadales y las corticoadrenales que producen esteroides hormonales, o los hepatocitos que sintetizan ácidos biliares utilizando colesterol como sustrato.

Su papel como componente de membranas celulares hace del colesterol una molécula imprescindible en el crecimiento celular como se demostró, muy tempranamente, con la observación de que determinados insectos que sintetizan poco colesterol deben ingerir esteroides para crecer y sobrevivir (Clayton, 1964). En mamíferos, durante la regeneración hepática que sigue a la hepatectomía parcial, la síntesis de colesterol y la actividad de la HMG-CoA reductasa están aceleradas (Siperstein y Fagan, 1964; Trentalance *et al.*, 1984) y las LDL aumentan en células que proliferan (Goldstein y Brown, 1974; Witte *et al.*, 1982).

La primera evidencia directa de que el colesterol es necesario para la proliferación se obtuvo cuando se observó un bloqueo del crecimiento y la proliferación de células L y de fibroblastos de ratón después de inhibir la HMG-CoA reductasa (Chen *et al.*, 1974; Brown y Goldstein, 1974). La reposición de colesterol

restauró el crecimiento en el mismo y otros modelos experimentales (Kandutsch y Chen, 1977; Cornell *et al.*, 1977). La correlación entre proliferación celular y síntesis acelerada de colesterol ha sido demostrada también en otros tejidos (Chen *et al.*, 1975; Huneeus *et al.*, 1979; Habenicht *et al.*, 1980).

La dependencia del colesterol constituye un arma de doble filo para las células puesto que la misma propiedad que lo convierte en una molécula útil, su casi absoluta insolubilidad, lo transforma también en un tóxico potencial. Los niveles celulares de colesterol deberán por tanto ajustarse muy exquisitamente, evitando por igual su acumulación y su carencia. Esto se consigue equilibrando la cantidad de colesterol obtenido de la dieta con el sintetizado por la célula (Brown *et al.*, 1981; Brown y Goldstein, 1986; Goldstein y Brown, 1990), es decir, a través de una estrecha regulación de la expresión del receptor para las LDL (Brown *et al.*, 1981; Brown y Goldstein, 1983 y 1986) y la expresión y/o activación postranscripcional de la HMG-CoA reductasa (Brown y Goldstein, 1980).

1.3.4 La regulación de la expresión y la actividad de la HMG-CoA reductasa

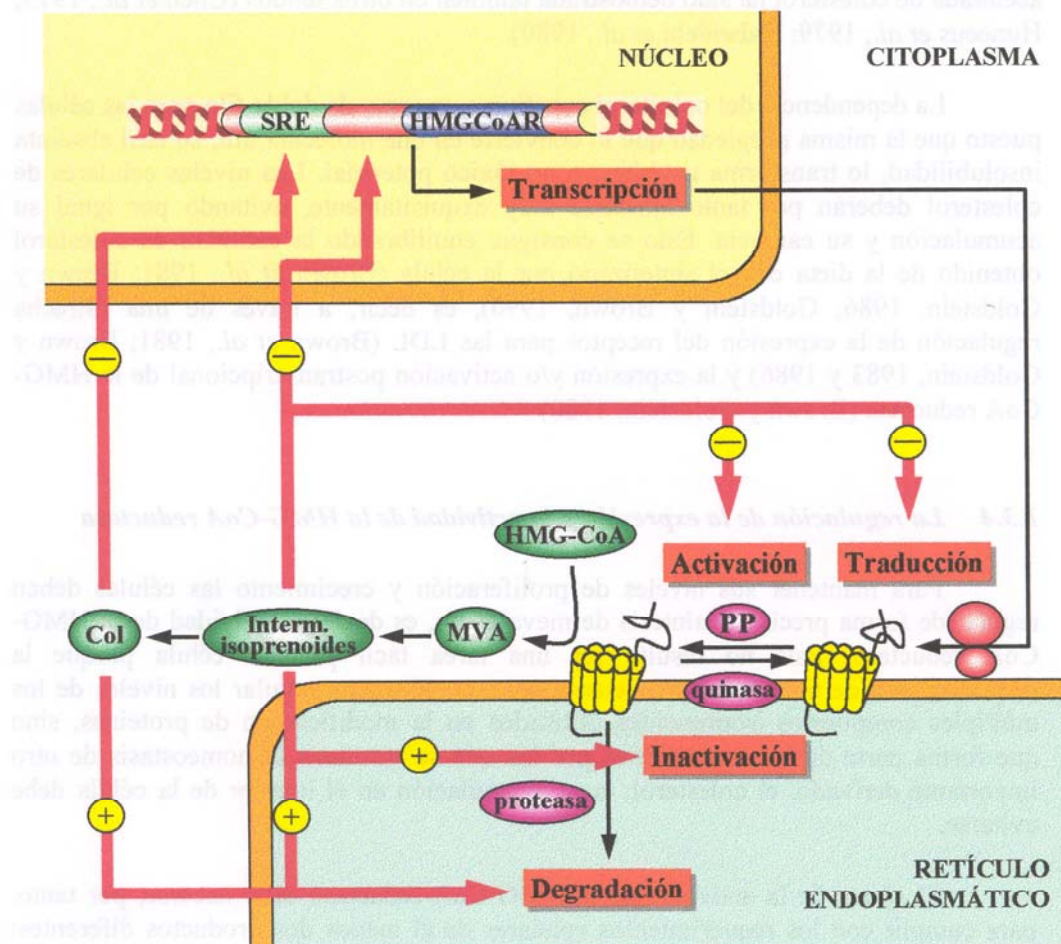
Para mantener sus niveles de proliferación y crecimiento las células deben regular de forma precisa la síntesis de mevalonato, es decir, la actividad de la HMG-CoA reductasa. Esta no resulta ser una tarea fácil para la célula porque la disponibilidad de mevalonato es determinante no sólo para regular los niveles de los múltiples compuestos isoprenoides utilizados en la modificación de proteínas, sino que forma parte de los mecanismos por los que se mantiene la homeostasis de otro importante derivado, el colesterol, cuya acumulación en el interior de la célula debe evitarse.

El ajuste de la actividad de la HMG-CoA reductasa debe hacerse, por tanto, para cumplir con los requerimientos celulares de al menos dos productos diferentes: los isoprenoides y el colesterol (Brown y Goldstein, 1980; Siperstein, 1984). Por ello, la actividad del enzima se controla por mecanismos muy complejos que interactúan a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional (ver *Figura 5*).

La transcripción de la HMG-CoA reductasa está regulada por mecanismos de retroalimentación multivalentes en los que participan, al menos, dos de los productos del mevalonato: *i*) el colesterol y sus derivados oxigenados; y *ii*) los farnesoides (Kandutsch *et al.*, 1978; Weinberger, 1996).

La síntesis de colesterol disminuye cuando aumenta el colesterol de la dieta (Schoenheimer y Breusch, 1933; Tomkins *et al.*, 1953). La disminución de la actividad de la HMG-CoA reductasa es parte del mecanismo que explica esta antigua observación y constituye una eficaz estrategia para evitar su acumulación tóxica en el interior de la célula (Siperstein y Guest, 1960).

Introducción



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003

Figura 5

Esquema de las distintas formas de regulación de la HMG-CoA reductasa

En efecto, en el interior de la célula el colesterol y especialmente sus derivados oxisteroles (fundamentalmente aquellos hidroxilados en las posiciones 7, 25 y 26) constituyen la señal más importante de entre las que regulan la expresión de la HMG-CoA reductasa (Kandutsch y Chen, 1978; Kandutsch *et al.*, 1978).

Al igual que la región 5' del gen del receptor de LDL, el promotor de la HMG-CoA reductasa contiene una región de 177 pb organizada en tandems o *repeats* (Reynolds *et al.*, 1984; Osborne *et al.*, 1985; Südhof *et al.*, 1987a) que es suficiente tanto para mantener la expresión del enzima como para reprimir la expresión de la proteína en respuesta a los esteroides.

Los *repeats* 1 y 3 unen Sp1, un factor de transcripción constitutivo, y aunque necesarios no son suficientes para mantener la transcripción del gen del receptor de LDL y la HMG-CoA reductasa, ni para reprimirla en respuesta al colesterol. Esta capacidad se localiza en el *repeat* 2, una secuencia de 42 pb dentro de la que existe otra más pequeña de 16 pb que es la que confiere al promotor la capacidad de respuesta a los esteroides (Südhof *et al.*, 1987b; Dawson *et al.*, 1988; Smith JR *et al.*, 1990; Osborne, 1991) y que se denomina por ello SRE (*sterol regulatory element*).

Una proteína capaz de activar la transcripción del gen del receptor de LDL y la HMG-CoA reductasa debería tener una estructura que *i*) permita la detección de los niveles de colesterol celulares, es decir, se una al colesterol y se encuentre en las membranas donde el colesterol se localiza mayoritariamente; *ii*) posea al mismo tiempo una señal de localización nuclear; y *iii*) contenga una secuencia de reconocimiento del SRE. Esta elusiva proteína ha resultado difícil de identificar.

Del citosol de un amplio espectro de líneas celulares se aisló originalmente una proteína con capacidad para unir colesterol y sus derivados (Kandutsch y Thompson, 1980). Aunque se pudo establecer una correlación entre la capacidad de unir oxisteroles de esta proteína denominada OSBP (*oxysterol binding protein*) y la represión de la síntesis de HMG-CoA reductasa producida por los mismos (Taylor *et al.*, 1984), el clonaje de su DNA reveló la inexistencia de secuencias de reconocimiento del SRE en la proteína codificada (Dawson *et al.*, 1989). Este hecho, unido a la observación de que la OSBP es rápidamente secuestrada al Golgi después de unirse a los esteroides (Ridgway *et al.*, 1992) sugirió que o bien la proteína debe unirse al DNA formando un complejo con otros factores o su función no está relacionada con la regulación de la transcripción de los genes implicados en la homeostasis del colesterol.

Por otra parte, al menos cuatro proteínas capaces de unirse al SRE han sido aisladas, incluyendo una proteína similar al NF-1 (Gil *et al.*, 1988); una proteína con dedos de Zn (Rajavashisth *et al.*, 1989) denominada CNBP (*cellular nucleic acid binding protein*, similar a su homóloga viral); una proteína de 45-49 kDa denominada SRE-BF y que reconoce SRE de hebra única o doble (Stark *et al.*, 1992); o la Red 25,

Introducción

una proteína capaz de unir específicamente el SRE del promotor de la HMG-CoA reductasa (Osborne *et al.*, 1992). Sin embargo, en ninguno de los casos descritos ha podido establecerse correlación entre la unión al DNA y la capacidad para inducir/reprimir la transcripción de ninguno de los genes poseedores de SRE.

La identificación de una proteína denominada SREBP (*sterol regulatory element binding protein*) capaz de unirse de forma altamente específica a una secuencia de 10 pb dentro del SRE (Briggs *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993) ha iniciado el camino hacia la comprensión de los mecanismos que regulan la expresión de los genes del receptor de LDL y la HMG-CoA reductasa en condiciones de privación de colesterol.

El DNA para dos diferentes SREBPs (1 y 2) con similares propiedades de unión al SRE ha sido clonado (Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1993), mostrando que codifica para proteínas con estructura de factores de transcripción pertenecientes a la familia de los bHLH-ZIP (*basic helix loop helix-leucine zipper*) que se unen al DNA a través de la región básica (Gasic, 1994) después de formar dímeros utilizando la cremallera de leucina y la estructura HLH (Murré y Baltimore, 1992; Pabo y Sauer, 1992; Ferré-D'Amaré *et al.*, 1993).

El DNA codifica para proteínas de 125 kDa con secuencias de localización en membranas que permiten la inserción de ambas proteínas en la membrana del retículo endoplásmico (Hua *et al.*, 1996a)(ver **Figura 6**) en donde, de forma desconocida, actúan como sensoras de los niveles de colesterol. Cuando estos niveles caen, una segunda proteína denominada SCAP (*SREBP cleavage activating protein*) con actividad de proteasa (Hua *et al.* 1996b; Sakai *et al.*, 1996) es activada y realiza el primero de los dos cortes que liberaran un fragmento de 68 kDa. Éste contiene el NH₂ terminal y la estructura básica que permite la unión al SRE y la activación de la transcripción (Wang *et al.* 1994). Aunque el papel de las SREBPs en la transcripción dependiente de esteroides fue demostrado originalmente para el gen del receptor de LDL, la SREBP es capaz de unir el SRE de la HMG-CoA reductasa utilizando para ello el dominio básico y los 22 aminoácidos adyacentes, activando, de esta forma, la transcripción del enzima (Vallett *et al.*, 1996; Brown y Goldstein, 1997).

Como hemos descrito hasta aquí, el colesterol y sus metabolitos son los principales reguladores de los niveles de la HMG-CoA reductasa. Sin embargo, existen evidencias de que, en determinadas situaciones metabólicas y/o fases del crecimiento y proliferación celular, otros metabolitos del mevalonato, en especial los isoprenoides, podrían regular la síntesis del enzima (ver **Figura 5**).

Los isoprenoides actuarían a nivel transcripcional por mecanismos no conocidos pero que implicarían la unión y activación por el farnesol a un receptor nuclear originalmente denominado OR2 y clasificado como perteneciente a la familia de los receptores huérfanos (Forman *et al.*, 1995), y que ha sido renombrado FXR

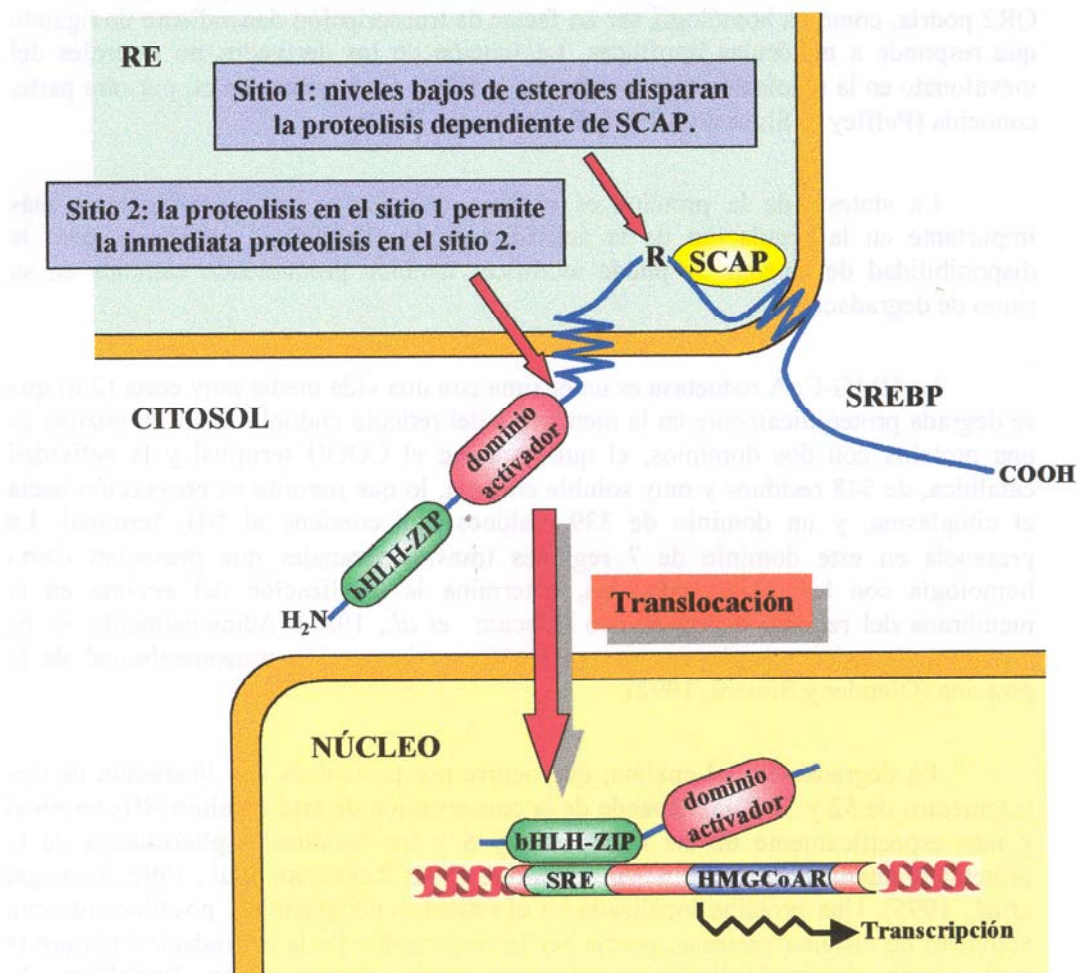


Figura 6

Esquema de la activación de SREBP y su translocación al núcleo

Introducción

(*farnesoid activated nuclear receptor*). El OR2 es el análogo del receptor de ecdisterona de los insectos, que se une a elementos de respuesta en el DNA denominados EcRE en presencia de RXR (Yao *et al.*, 1992), lo que sugiere que el OR2 podría, como su homólogo, ser un factor de transcripción dependiente de ligando que responde a moléculas lipofílicas. La función de los derivados no esteroides del mevalonato en la regulación traduccional de la HMG-CoA reductasa es, por otra parte, conocida (Peffley y Sinensky, 1985; Panini *et al.*, 1989).

La síntesis de la proteína es el paso cuantitativa y cualitativamente más importante en la regulación de la actividad de la HMG-CoA reductasa, pero la disponibilidad del enzima se puede modificar también produciendo cambios en su ritmo de degradación.

La HMG-CoA reductasa es un enzima con una vida media muy corta (2 h) que se degrada proteolíticamente en la membrana del retículo endoplásmico. El enzima es una proteína con dos dominios, el que contiene el COOH terminal y la actividad catalítica, de 548 residuos y muy soluble en agua, lo que permite su proyección hacia el citoplasma, y un dominio de 339 residuos que contiene el NH₂ terminal. La presencia en este dominio de 7 regiones transmembranales que presentan cierta homología con los de la rodopsina, determina la localización del enzima en la membrana del retículo endoplásmico (Liscum *et al.*, 1985). Adicionalmente, se ha propuesto la existencia de una octava región en la porción transmembranal de la proteína (Olender y Simoni, 1992).

La degradación del enzima, que ocurre por proteólisis con liberación de dos fragmentos de 52 y 56 kDa, depende de la conservación de este dominio NH₂ terminal y más específicamente de las regiones 4 y 5 y los residuos N-glicosilados de la proteína (Jingami *et al.*, 1987; Chun y Simoni, 1992; Roitelman *et al.*, 1992; Kumagai *et al.*, 1995). Una proteína localizada en el retículo endoplásmico, posiblemente con actividad de cisteína proteasa, podría ser la responsable de la degradación porque la vida media de la HMG-CoA reductasa puede alargarse con Brefeldina A, cicloheximida e inhibidores de las cisteína proteasas neutras (Chun *et al.*, 1990; Inoue *et al.*, 1991; Meigs y Simoni, 1992). Finalmente, el ritmo de degradación se acelera cuando la HMG-CoA reductasa es fosforilada en residuos serina localizados en la región de unión de los dos dominios de la proteína (Leonard y Chen, 1987; Parker *et al.*, 1989; Miller *et al.* 1989).

El aumento en los niveles celulares de esteroides (Faust *et al.*, 1982; Tanaka *et al.*, 1983; Luskey y Stevens, 1985; Chin *et al.*, 1985) o de mevalonato y sus derivados isoprenoides, en especial los derivados del farnesol (Roitelman y Simoni, 1992; Bradfute y Simoni, 1994; Correll y Edwards, 1994; Meigs *et al.*, 1996), induce la degradación de la HMG-CoA reductasa, en tanto que en las células depletadas de colesterol, la vida media del enzima se prolonga hasta 11 h (ver **Figura 5**).

A medio y largo plazo, la actividad de la HMG-CoA reductasa se regula controlando el balance síntesis-degradación del enzima como hemos descrito hasta aquí. Existen además mecanismos de modificación postraducciona l de la proteína que regulan a corto plazo la actividad del enzima. La multiproteína quinasa dependiente de calmodulina, la proteína quinasa A y la proteína quinasa C, fosforilan a la HMG-CoA reductasa en la serina 872 de la subunidad catalítica (Clarke y Hardie, 1990a y b).

La fosforilación es reversible y depende de la activación de una reductasa quinasa y de la inactivación de una fosfatasa producida en respuesta a la elevación de los niveles de mevalonato y sus productos (ver **Figura 5**). El estado fosforilado resulta en una rápida pérdida de actividad enzimática (Beg *et al.*, 1984a y b)

Objetivos

Objetivos

La capacidad del $\text{TNF}\alpha$ para impedir la proliferación y/o inducir la muerte, con frecuencia por apoptosis, de las células es uno de sus más prominentes efectos biológicos.

Como hemos descrito, del mantenimiento de unos adecuados niveles de expresión de la HMG-CoA reductasa depende la producción de moléculas directamente relacionadas con la maquinaria proliferativa.

La influencia del $\text{TNF}\alpha$ sobre la supervivencia celular, como para otros de sus muchos efectos biológicos, puede seguramente atribuirse a su capacidad para activar/inactivar una extensa variedad de genes entre los que podría encontrarse el de la HMG-CoA reductasa

Por ello los objetivos de este trabajo han sido:

1. Estudiar la existencia de regulación de la expresión de la HMG-CoA reductasa por el $\text{TNF}\alpha$ y su mensajero intracelular, la ceramida, en líneas celulares HL-60 y U937, que detienen su proliferación y entran en apoptosis en respuesta al $\text{TNF}\alpha$.
2. Estudiar la regulación de la expresión de la HMG-CoA reductasa en células Hep-G2 y FRTL-5, como representantes de dos tipos celulares, el hepatocito y la célula folicular del tiroides, en las que el $\text{TNF}\alpha$ no influencia o incluso induce la proliferación celular.
3. Establecer una correlación entre los cambios en la disponibilidad celular de mevalonato después del tratamiento con $\text{TNF}\alpha$ y los efectos de este sobre la supervivencia celular.

Material y Métodos

Material y Métodos



3.1 Productos y material utilizados

3.1.1 Precursores radiactivos

Los productos radiactivos [¹⁴C]hidroximetilglutaril-coenzimaA (57.5 mCi/mmol), [³H]mevalonolactona (33 Ci/mmol) y [³H]Timidina (15 Ci/mmol) se obtuvieron de Du Pont-New England Nuclear (Bad Homburg, Alemania). El producto Trans³⁵S-Label (L-metionina 70%, L-cisteína 15%, otros 15%) (1175 Ci/mmol) se adquirió de ICN Biomedicals, Inc. (Irvine, CA, USA).

3.1.2 Hormonas y tratamientos

El factor necrótico tumoral α (TNF α) se obtuvo de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania). La N-acetil esfingosina (C2-ceramida) se adquirió de Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA). La Lovastatina fue generosamente donada por Merck Sharp and Dohme Laboratories (USA). La mevalonolactona se obtuvo de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

3.1.3 Productos y material para cultivos celulares

Los medios de cultivo RPMI, HAM-F12 (modificado por COON), DMEM y DMEM libre de metionina, así como la tinción de Azul de Tripán se obtuvieron de Gibco (Grand Island, NY, USA). El suero bovino fetal (FBS) y el suero de ternera recién nacida (NCS) se adquirieron de Biowhittaker (Walkersville, USA). El HEPES (N-[2-hidroxietil] piperazino N'-[2-etanosulfanílico]), la L-glutamina y los antibióticos con los que se suplementaron los medios se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). Las placas de cultivo estériles de 100, 60 y 35x10 mm y las de 24 pocillos, así como el resto del material estéril utilizado fueron de Falcon, Becton y Dickinson (Lincoln Park, NJ, USA). Para esterilizar algunos materiales se utilizaron filtros Millex®-GS de 0.2 μ m de Millipore Ibérica (Madrid, España).

3.1.4 Productos y material para cromatografía y electroforesis

3.1.4.1 Cromatografía

En los ensayos para la medida de la actividad HMG-CoA reductasa se utilizaron columnas cromatográficas y resina Bio-Rex 5 de intercambio aniónico (200-400 mesh) obtenidas de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA).

Material y Métodos

3.1.4.2 Electroforesis

La acrilamida, bis N,N'-metilene-bis-acrilamida, persulfato amónico, N,N,N,N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED), dodecil sulfato sódico (SDS), glicerol, β -mercaptoetanol y azul de bromofenol, así como los patrones de pesos moleculares preteñidos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). La agarosa se adquirió de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). Las electroforesis se realizaron en cubetas SE 250 de Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, CA, USA).

3.1.5 Productos y material utilizados para inmunoprecipitación y Western-blot

Para la inmunoprecipitación de p21^{ras} se utilizó el anticuerpo pan-*ras* (Ab-2), monoclonal obtenido en ratón, suministrado por Oncogene Science Inc. (Cambridge, MA, USA). La proteína A-sepharose CL-4B fue de Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia).

El anticuerpo anti-lamina B, policlonal, obtenido en cabra contra el péptido 565-584 de la región carboxiterminal de la lamina B humana, el péptido generador del anticuerpo y el segundo anticuerpo contra cabra conjugado a peroxidasa se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

Se utilizó el sistema de *Western blotting* ECL (membranas de nitrocelulosa Hybond ECL, reactivos para la detección, mini-cámara) adquirido a Amersham Ibérica S.A. (Madrid, España). El Trans-Blot[®] para la transferencia de proteínas fue de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). Las películas Polaroid 667 fueron suministradas por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

3.1.6 Productos de biología molecular usados en las técnicas de RT-PCR y fragmentación de DNA (DNA ladder)

Para la extracción de RNA se utilizó el reactivo comercial TRIzol[™] adquirido a Gibco (Grand Island, NY, USA). Los pd[T]₁₂₋₁₈ y dNTPs se obtuvieron de Pharmacia Biotech (Barcelona, España). La AMV-transcriptasa inversa, RNasin[®], RNasa A, Proteinasa K, fenol, tRNA, y *Taq* DNA polimerasa fueron suministrados por Promega (Madison, WI, USA). El Digoxigenina-11-deoxiuridina trifosfato (Dig-11-dUTP), las membranas de nylon positivamente cargadas y el *kit* de detección por quimioluminiscencia (Dig Luminiscent Detection Kit n° 1363-514) se adquirieron a Boehringer Mannheim (Barcelona, España). El termociclador para la reacción en cadena de la polimerasa fue de Perkin Elmer Instrument Division (Norwalk, CT, USA). El PosiBlot[®] para la transferencia de oligonucleótidos y el Stratalinker[®] UV 1800 fueron adquiridos a Stratagene (WI, USA). El transiluminador ultravioleta

Reprostar II fue de CAMAG.

Los cebadores (*primers*) con las secuencias que se especifican en la **Tabla I** fueron sintetizados por encargo a DNA International (Muskego, OR, USA), excepto el de la G3PDH que se adquirió de Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto, CA, USA). Todos los cebadores (20-26 nucleótidos y contenido medio GC 50-60 %) se recibieron liofilizados y se disolvieron y almacenaron en H₂O/DEPC (1.000 pmol/μl) a -70°C nada más llegar, manteniendo las soluciones de trabajo (30 pmol/μl en H₂O/DEPC) a 4°C durante el período de utilización.

3.1.7 *Productos y material utilizados en la tinción con bisbencimida*

El paraformaldehído y la bisbencimida (Hoechst nº 33258) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El microscopio invertido de contraste de fases (Axiovert 135), los objetivos Plan-NEOFLUAR 20x y 63x y la lámpara de fluorescencia (HBO 50) se adquirieron a Zeiss (Alemania). Las fotos TMAX 100 pro fueron de Kodak.

3.1.8 *Otros productos de laboratorio*

El agua desionizada y bidestilada se obtuvo con un equipo Mili-Q (Water Purification System, Millipore Ibérica SA, Madrid, España).

El EDTA, EGTA, NaCl, NaOH, HCl, DTT, los detergentes Triton X-100, NP-40 y CHAPS, la sacarosa, el cloruro de magnesio, acetato sódico, DMSO, trizma base, trizma-HCl, azida sódica, gelatina (75 bloom de piel de ternera), sulfato cúprico pentahidratado, ácido bicinonínico, los inhibidores de proteasas PMSF, aprotinina, leupeptina, iodoacetamida y otros productos utilizados en la preparación de reactivos y tampones se adquirieron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El cloroformo, alcohol isoamílico, etanol y otros productos orgánicos se obtuvieron de BDH (Poole, Inglaterra). El resto de los productos usados en la presente memoria fueron de la mejor calidad analítica que ofrece el mercado (Merck, Fluka y Bio-Rad).

3.2 **Cultivos celulares**

3.2.1 *Cultivo de células leucémicas promielocíticas humanas HL-60*

La línea celular HL-60 fue donada por el Dr. Fernando Domínguez, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.

Material y Métodos

Las células se cultivaron en placas estériles en medio de cultivo RPMI suplementado con 20 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1.12 g/l NaHCO₃, 10 % FBS y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina), a una densidad que no excediera de 0.5·10⁶ células/ml y reponiendo el medio cada dos días para asegurar que la concentración de glutamina permaneciera por encima de 1mM (Jarvis *et al.*, 1996). Los cultivos se mantuvieron bajo atmósfera húmeda en un incubador Heraeus a 37 °C y a una presión parcial de CO₂ del 5 %.

3.2.2 Cultivo de células de linfoma histiocítico humano U-937

La línea celular U-937 fue donada por el Dr. Manuel Fresno, Centro de Biología Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España.

Las células se cultivaron en placas estériles en medio de cultivo RPMI suplementado de la misma forma que las anteriores, cultivándose bajo las mismas condiciones. Al igual que las HL-60, se cultivaron siempre a una densidad inferior a 0.5·10⁶ células/ml y cada dos días se repuso el medio de cultivo por otro fresco.

3.2.3 Cultivo de células de hepatoma humano Hep-G2

La línea celular Hep-G2 fue donada por el Dr. Manuel Fresno, Centro de Biología Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España.

Las células se cultivaron en placas estériles en medio de cultivo DMEM suplementado de forma idéntica a las anteriores y cultivadas bajo las mismas condiciones de presión de CO₂ y temperatura. El medio fue repuesto por otro fresco cada 3 días.

3.2.4 Cultivo de células de tiroides de rata FRTL-5

La línea celular FRTL-5 fue donada por la Dra. Pilar Santiesteban, Centro de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España.

Las células se cultivaron en placas estériles en medio de cultivo HAM F-12 (modificado por COON), suplementado con 20 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1.12 g/l NaHCO₃, 5 % NCS y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina), al cual se le añadió la siguiente mezcla de hormonas (6H): Hidrocortisona (10⁻⁹ M), Transferrina (1 µg/ml), Somatostatina (10 ng/ml), Insulina (10 µg/ml), el tripéptido Gly-His-Lys (10 ng/ml) y TSH (1 mU/ml).

En todos los casos, previo al comienzo del ensayo, las células se cultivaron durante 3 días en medio 5H (idéntico al anterior pero sin TSH) con NCS al 5% y otros dos días en medio 5H con 0.2% NCS.

3.3 Ensayo de la actividad enzimática de la HMG-CoA reductasa

El ensayo *in vitro* de la actividad enzimática de la HMG-CoA reductasa fue realizado esencialmente como describe Goldstein *et al.*, (1983). La HMG-CoA reductasa cataliza la conversión de HMG-CoA en mevalonato. El método se basa en la adición, a un extracto de proteínas celulares, de HMG-CoA marcado radiativamente ($[^{14}\text{C}]$ HMG-CoA), separando y cuantificando a continuación el producto marcado de la reacción ($[^{14}\text{C}]$ mevalonato).

Se utilizaron 5 millones de células HL-60 y U-937 o platos de 35 mm al 75 % de confluencia de Hep-G2 y FRTL-5 por tratamiento. Para eliminar la Lovastatina del interior de las células, los cultivos suplementados con este inhibidor se lavaron y reincubaron, al finalizar el experimento, durante 15 min en medio fresco. Este procedimiento elimina la mayoría, si no toda, de la droga del interior celular (Qin *et al.*, 1992). Todas las células se lavaron con PBS frío y se lisaron primero en 50 μl de tampón de lisis (50 mM Imidazol-HCl pH 7.4, 100 mM sacarosa, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 5 mM DTT, 15 mM CHAPS, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptina), se sonicaron después durante 10 segundos a 4 °C y se mantuvieron, finalmente, a 4 °C otros 30 min. Después de una centrifugación (13.000 x g, 3 min, 4 °C) se recogieron los sobrenadantes y se cuantificaron proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando BSA como estándar.

Alícuotas de 50 μg de cada muestra se preincubaron a 37 °C durante 30 min en 80 μl de tampón de reacción (0.1 mM fosfato pH 7.5, 5 mM DTT). Ésta se inició añadiendo los cofactores a una concentración final de 2.5 mM NADPH, 30 mM G6P, 3 U/ml G6PDH) y el sustrato (100.000 dpm $[^{14}\text{C}]$ HMG-CoA). Para calcular el rendimiento de la extracción posterior se añadieron, además, 4000 dpm de $[^3\text{H}]$ mevalonolactona. La reacción se realizó a 37 °C y se paró después de 30 min añadiendo HCl (concentración final: 0.5 N) y centrifugando a 13.000 x g durante 3 min.

Para separar el producto del sustrato, una alícuota de cada sobrenadante se aplicó sobre una columna cromatográfica que contenía 1 ml de Bio-Rex 5 (Edwards *et al.*, 1979) previamente equilibrada con 20 mM MVA. El $[^{14}\text{C}]$ mevalonato, así como el estándar interno, se eluyeron con 2 ml de H_2O , recogiendo en viales de centelleo a los que se añadió 10 ml de líquido de centelleo Optiscint Hi-Safe 3 (Pharmacia, Madrid, España), contándose la radiactividad asociada a cada muestra en un contador LKB Wallac. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Material y Métodos

Con objeto de determinar las condiciones de linealidad de la reacción enzimática se realizaron una serie de ensayos previos con células Hep-G2 tratadas 24 h con Lovastatina (30 μ M). Cantidades micromolares de esta droga inhiben de forma efectiva la síntesis de colesterol, al tiempo que la de los intermediarios de la vía, encargados, aquel y estos, de la regulación negativa del enzima. El resultado es, por tanto, un aumento de la expresión del enzima y por ende de la cantidad total de enzima, cuya actividad, sin embargo, sigue siendo inhibida por la droga mientras está presente en el cultivo. Para medir la actividad del enzima se hace necesario retirar la inhibición de la Lovastatina. Esto se consigue de forma eficaz incubando las células con medio fresco los últimos 15 minutos antes de la finalización del ensayo, como se describió más arriba. Como se muestra en la **Figura 7**, la linealidad se mantiene entre los valores de tiempo y cantidad de proteína estudiados. Se eligieron 30 min de reacción y 50 μ g de proteínas para los subsiguientes experimentos.

La actividad (A) del enzima se expresó como

$$A = \text{pmoles producto/ min} \cdot \text{mg proteínas totales}$$

según la ecuación

$$A = \frac{p_s}{t \cdot m} \cdot f_T$$

siendo

p_s = pmoles totales de sustrato

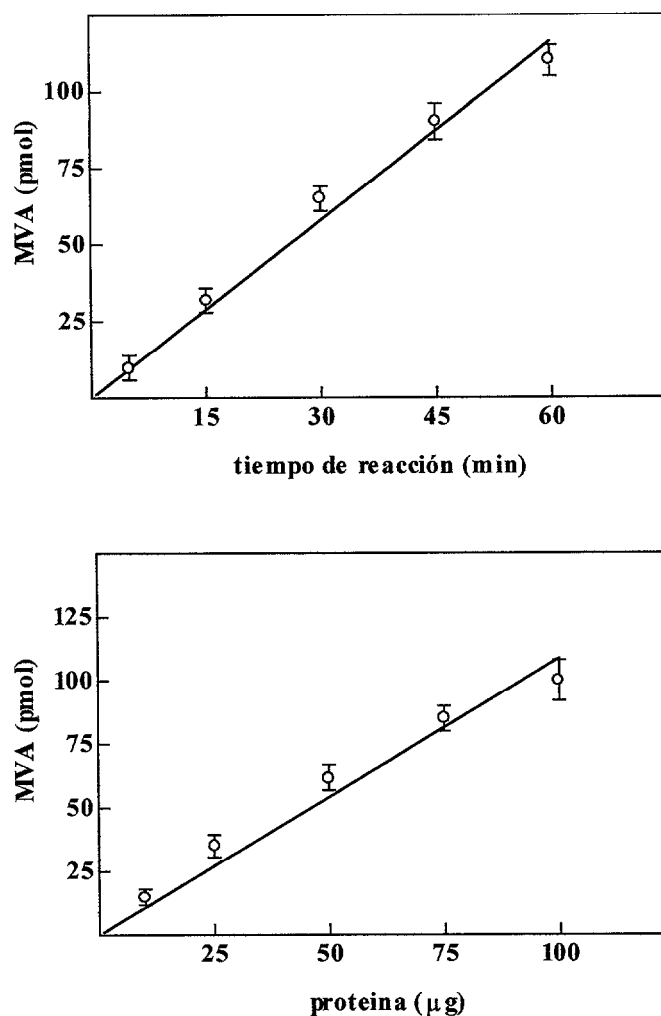
t = tiempo de reacción en minutos, ajustado de modo que $f_T \leq 0.15$

m = mg totales de sustrato

f_T = transformación de sustrato corregida por la eficacia de la extracción

es decir,

$$f_T = \frac{{}^{14}\text{C}_R}{{}^{14}\text{C}_A} \cdot \frac{{}^3\text{H}_A}{{}^3\text{H}_R} \quad \text{tal que } 0 \leq f_T \leq 1$$

**Figura 7**

Estudio de la linealidad de la reacción enzimática en el ensayo de la actividad HMG-CoA reductasa. Platos de 100 mm al 75% de confluencia de células Hep-G2 se trataron durante 24 h con Lovastatina (30 μ M), al final de las cuales se incubaron durante 15 min con medio fresco, recogiendo las células, lisándose y cuantificándose. Se realizó el ensayo de actividad HMG-CoA red. como se indica en esta misma sección utilizando 50 μ g de proteínas durante distintos tiempos de reacción (panel superior) o cantidades variables de proteína permitiendo la reacción durante 30 min (panel inferior).

Material y Métodos

donde

$f_T = 0$ corresponde a nula transformación

$f_T = 1$ corresponde a la transformación total de sustrato

$^3H_A / ^3H_R$ representa la pérdida de producto durante el proceso de extracción

siendo

3H_A : dpm de [3H]-MVA añadido

3H_R : dpm de [3H]-MVA recuperado

$^{14}C_A$: dpm de [^{14}C]-HMG-CoA añadido

$^{14}C_R$: dpm de [^{14}C]-MVA producto de la reacción

3.4 Estudio de la expresión de la HMG-CoA reductasa y el receptor de LDL mediante técnicas de RT-PCR

3.4.1 Aislamiento de RNA total

El RNA total se extrajo de $5 \cdot 10^6$ células (HL-60 y U-937) o platos de 35 mm al 75 % de confluencia (Hep-G2 y FRTL-5), añadiendo 500 μ l de TRIzol™ en las condiciones que recomienda el fabricante. A continuación, se añadieron 100 μ l de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó (12.000 x g, 20 min, 4 °C), recogiendo la fase acuosa superior a la que se le añadió un volumen igual de isopropanol (Chomczynski y Sacchi, 1987). Las muestras se incubaron a -20 °C durante toda la noche para permitir la precipitación del RNA y se centrifugaron posteriormente a 12.000 x g durante 20 min a 4 °C. Después de dos lavados con etanol al 75 %, el precipitado se resuspendió en 40 μ l de H₂O/DEPC. Una alícuota (5 μ l) se utilizó para determinar la absorbancia a 260 nm y la relación A260/A280, que fue siempre igual o superior a 1.6. En todos los experimentos el rendimiento fue de 2-6 μ g de RNA total por millón de células. El RNA extraído se almacenó a -70 °C hasta su utilización.

3.4.2 Síntesis de cDNA

Se incubó 1 μ g de RNA total con 0.5 μ g de pd[T]₁₂₋₁₈ y 3 U de AMV-RT en 20 μ l de tampón 1xPCR (10 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 0.1 % Tritón X-100), 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs, 20 U RNasin, durante 75 min a 42 °C. Finalizada la

reacción de síntesis de cDNA, las muestras se calentaron a 95 °C durante 10 min, se enfriaron rápidamente en hielo y se guardaron a -20 °C, previa dilución (1:4) con H₂O/DEPC.

3.4.3 Amplificación por Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)

Para la amplificación, se mezclaron en frío 10 µl de la solución anterior (equivalente a unos 15 ng de RNA total) con tampón 1xPCR en un volumen final de 25 µl que además contenía 15 pmol (~125 ng) de la pareja de cebadores apropiada (ver **Tabla I**), 2.5 µM Dig-11-dUTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.625 U *Taq* DNA polimerasa. A continuación, se le añadieron 50 µl de aceite mineral y, tras una desnaturalización de 4,5 min a 94 °C, se inició la amplificación de las muestras en un termociclador programado para que realizara el siguiente perfil térmico por ciclo para los tres enzimas estudiados:

I. DESNATURALIZACIÓN	1 min.	94 °C
II. HIBRIDACIÓN	1.5 min.	58 °C
III. POLIMERIZACIÓN	1.5 min.	72 °C

La amplificación se completó con un ciclo final de polimerización (7 min, 72 °C) después de lo cual se añadieron 5 µl de tampón de electroforesis (50 % glicerol, 0.1 % azul de bromofenol) a cada muestra y se extrajo el DNA que se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Los cebadores utilizados se construyeron en base a las secuencias conocidas de los genes humanos de la HMG-CoA reductasa (Powell y Kroon, 1992), el receptor de LDL (Powell y Kroon, 1992) y la G3PDH (Clontech Laboratories Inc., Palo alto, CA, USA), usado éste último como control por ser un enzima constitutivo que no varía con los tratamientos utilizados. Sus secuencias se muestran en la **Tabla I**.

Se determinó la linealidad del método en función del número de ciclos de amplificación (ver **Figura 8**) y la cantidad de RNA utilizado (ver **Figura 9**) para cada

Material y Métodos

uno de los genes estudiados, en células Hep-G2 tratadas 24 h con Lovastatina.

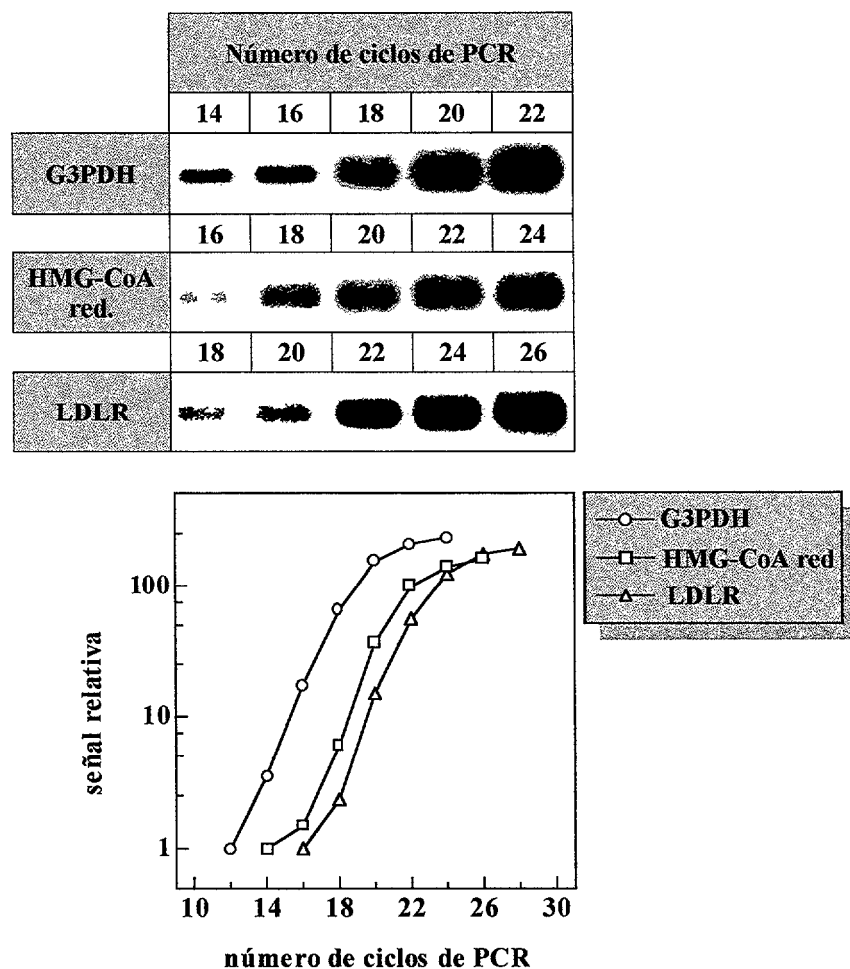
De acuerdo con los resultados obtenidos, se estableció el número de ciclos de amplificación para cada uno de los cebadores utilizados en cada una de las líneas celulares bajo estudio, tal y como se describe en la **Tabla II**.

Cebador*	Secuencia de bases de la pareja de cebadores	Frag. amplif. (pb)
HMGC α red/s HMGC α red/a	5'- TAC CAT GTC AGG GGT ACG TC - 3' 5'- CAA GCC TAG AGA CAT AAT CAT C - 3'	246
LDLR/s LDLR/a	5'- TCT GTC TCG AGG GGT AGC TG - 3' 5'- CAA TGT CTC ACC AAG CTC TG - 3'	258
G3PDH/s G3PDH/a	5'- TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC - 3' 5'- CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC - 3'	983

* s = sentido
a = antisentido

Tabla I

Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los distintos enzimas estudiados en esta memoria.



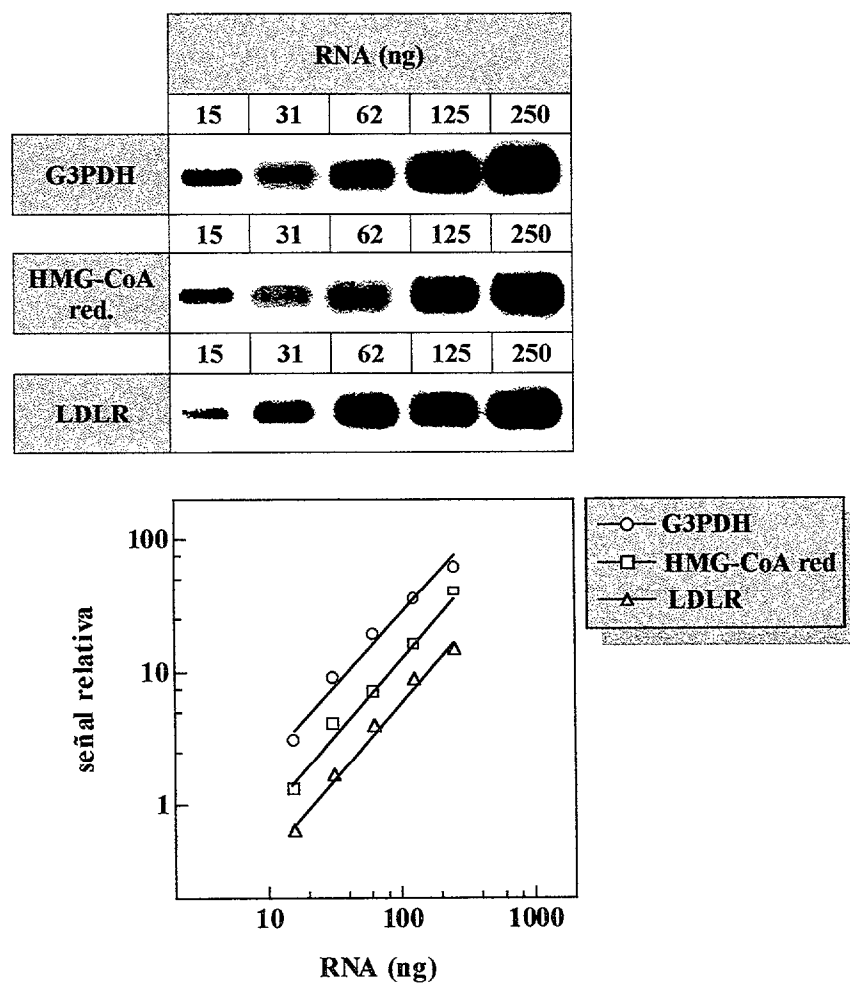


Figura 9

Estudio de la linealidad de la señal de amplificación de HMG-CoA red., LDLR y G3PDH respecto a la cantidad de RNA. Se extrajo el RNA de células Hep-G2 estimuladas con Lovastatina (30 μ M), y cantidades crecientes (15.6-250 ng) se sometieron a amplificación, utilizando los cebadores citados en la **Tabla I**, durante 18 ciclos para la G3PDH, 20 ciclos para la HMG-CoA red. y 22 ciclos para el LDLR.

	HepG2	U937	HL60	FRTL5
HMG-CoA red.	20 ciclos	22 ciclos	25 ciclos	27 ciclos
Receptor de LDL	22 ciclos	-	-	-
G3PDH	18 ciclos	18 ciclos	18 ciclos	18 ciclos

Tabla II

Número de ciclos de amplificación utilizado en la técnica de RT-PCR para cada uno de los enzimas estudiados y según el tipo celular analizado.

3.4.4 Separación y detección de los productos amplificados

Alícuotas de 10 µl de las muestras amplificadas se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (1.8 %) en tampón TAE (40 mM Tris-acético pH 8, 1 mM EDTA) a voltaje constante (100 volt). El gel se incubó en tampón de transferencia (0.4 M NaOH, 1.5 M NaCl) durante 15 min, transfiriéndose el DNA por presión positiva con un PosiBlot® a una membrana de nylon cargada positivamente. Seguidamente, la membrana se sometió a *cross-linking* en un Stratalinker®.

La detección de los fragmentos amplificados se realizó por quimioluminiscencia (Su *et al.*, 1994) usando un *kit* comercial (Dig luminiscence detection kit) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la visualización la membrana se expuso a una película Polaroid 667.

Con objeto de comprobar si los productos amplificados por los cebadores utilizados para la HMG-CoA reductasa y el receptor de LDL, coincidían con los predichos en la bibliografía, se amplificó y separó (junto a un patrón) RNA total de células Hep-G2 tratadas 24 h con Lovastatina, como se describió anteriormente. Para visualizar los fragmentos amplificados se sumergió el gel en una solución de 0.5 µg/ml de bromuro de etidio en TAE (Sharp *et al.*, 1973) durante 15 min. Tras varios lavados con TAE, los fragmentos se observaron y fotografiaron en un transiluminador

Material y Métodos

bajo luz ultravioleta (302 nm). Como se observa en la **Figura 10** (para la HMG-CoA red.) y **Figura 11** (para el LDLR) el tamaño en pares de bases de los fragmentos amplificados coincide con los descritos en la **Tabla I**.

3.5 Estudio de la farnesilación de p21^{ras} mediante marcaje metabólico e inmunoprecipitación

Para la determinación y cuantificación de las formas farnesilada-ancorada a membrana (procesada) y no farnesilada-citosólica (no procesada) de p21^{ras} se marcaron las proteínas con ³⁵S-metionina/cisteína. Una vez finalizado el experimento, las proteínas de Ras se inmunoprecipitaron con un anticuerpo específico y se separaron por electroforesis. Las proteínas se cuantificaron con el software incluido en el equipo PhosphorImager (Molecular Dynamics Inc., USA).

3.5.1 Marcaje metabólico

Se incubaron $1 \cdot 10^7$ células en tubos estériles de 15 ml durante 2 h con DMEM libre de metionina suplementado con 2 % de BSA y los tratamientos indicados en la sección de “Resultados”. A continuación se añadieron 50 μ Ci/ml de Trans³⁵S-Label durante las siguientes 22 h. Con estas condiciones de marcaje aseguramos que la incorporación sobre p21^{ras} de ³⁵S-Metionina alcanza el equilibrio isotópico (Kawata *et al.*, 1994).

3.5.2 Inmunoprecipitación

Tras lavar las células en PBS (pH 7.4), se lisaron en 500 μ l de PBSTDS (10 mM fosfato sódico pH 7.4, 5mM EDTA, 0.9 % NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 % deoxicolato sódico, 0.1 %SDS, 0.2 % NaN₃) frío, suplementado con una mezcla de inhibidores (1 mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptina, 5 μ g/ml aprotinina, 15 mM iodoacetamida, 1mM ortovanadato) durante 30 min a 4 °C con agitación. Se centrifugaron las muestras (14.000 x g, 15 min., 4 °C) y se recogieron los sobrenadantes. Alícuotas de éstos se usaron para cuantificar las proteínas de las muestras por el método del ácido bicinonínico.

La inmunoprecipitación se comenzó añadiendo 1 μ g de anticuerpo pan-ras (Ab-2) y 40 μ l de solución de proteína A-sefarosa previamente hidratada (ver “Otros métodos: Preparación de Proteína A-sefarosa” en esta misma sección) sobre alícuotas

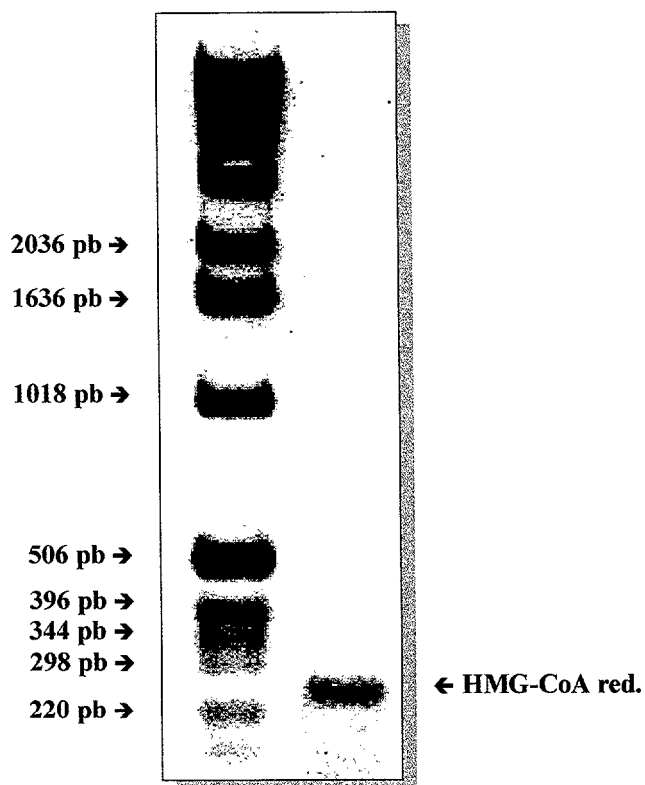


Figura 10

Caracterización por tamaño (pb) del producto de RT-PCR utilizando los cebadores de HMG-CoA reductasa. Se aisló RNA de células HepG2 tratadas 24 h con Lovastatina (30 μ M), se sintetizó cDNA y se amplificó mediante RT-PCR durante 35 ciclos. El producto amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa junto a un patrón para determinar su tamaño. El gel se visualizó mediante la tinción con bromuro de etidio.

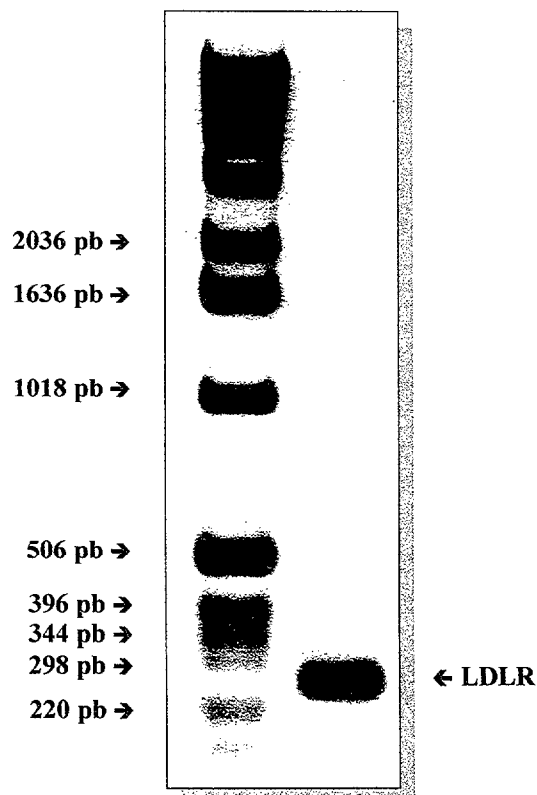


Figura 11

Caracterización por tamaño (pb) del producto de RT-PCR utilizando los cebadores de LDLR. Se aisló RNA de células HepG2 tratadas 24 h con Lovastatina (30µM), se sintetizó cDNA y se amplificó mediante RT-PCR durante 35 ciclos. El producto amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa junto a un patrón para determinar su tamaño. El gel se visualizó mediante la tinción con bromuro de etidio.

de 1 mg de proteínas totales de cada muestra. Se igualaron volúmenes con PBS, permitiéndose la unión proteína-anticuerpo-proteína A-sefarosa durante toda la noche a 4 °C con agitación rotacional vertical (Hematology/Chemistry Mixer 346; Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, USA).

3.5.3 Electroforesis y cuantificación

Las muestras se centrifugaron a 13.000 x g durante 10 min a 4 °C y se lavaron con PBS tres veces para eliminar cualquier proteína no unida a la sefarosa. Posteriormente, se añadieron 25 µl de tampón de electroforesis (6.2 mM Tris pH 6.8, 2 % SDS, 20 % glicerol, 5 mM β-mercaptoetanol, 1 % azul de bromofenol), y se hirvieron las muestras durante 5 min para conseguir la total separación del complejo proteína-anticuerpo-proteína A-sefarosa. El sobrenadante de una segunda centrifugación (13.000 x g, 1 min), se recogió y se procedió a la separación electroforética de las proteínas (Laemmli, 1970) a 4 °C en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15 % de reticulación y 15 mA de corriente constante por gel. En todos los geles se incluyeron patrones de pesos moleculares preteñidos.

Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia en semiseco (Trans-Blot) en tampón de Bjerrum y Schafer-Nielsen (48 mM Tris pH 9.4, 39 mM glicerol, 20 % metanol, 0.0375 % SDS), a 4 °C y 250 mA de corriente constante.

Las proteínas se visualizaron y cuantificaron utilizando la tecnología de acumulación de fotones (Johnson *et al.*, 1990), con un equipo automatizado PhosphorImager y el software de cuantificación de la misma casa.

3.6 Estudio de la apoptosis celular

La apoptosis celular se determinó utilizando tres métodos complementarios: uno semicuantitativo, basado en la existencia de cambios morfológicos del núcleo que pueden ser visualizados como condensación de cromatina, su compactación a lo largo de la periferia del núcleo y la segmentación del núcleo en más de tres fragmentos; otro cualitativo, en el que se detecta la fragmentación del DNA debida a endonucleasas, visualizada como una escalera discontinua (*DNA ladder*) de bandas multiméricas de 185-200 pb característica del proceso apoptótico (Arends *et al.*, 1990); y un tercero, cualitativo también, que determina la proteólisis de la lamina B, un mecanismo asociado a los procesos apoptóticos que ha sido descrito en una variedad de tipos celulares (Kaufmann, 1989; Oberhammer *et al.*, 1994; Neamati *et al.*, 1995; Mandal *et al.*, 1996; Shimizu y Pommier, 1997). Para el primero se utilizó el método de la tinción con el fluorocromo bisbencimida aprovechando su capacidad para unirse al DNA (Bose *et al.*, 1995). Para el segundo, se utilizó una técnica puesta a punto por este

Material y Métodos

laboratorio (López Blanco *et al.*, 1998) basada en el marcaje terminal, mediante *taq* DNA polimerasa, de los fragmentos de DNA con Dig-11-dUTP y su posterior visualización por reacción con un sustrato quimioluminiscente. Para el tercero se aislaron y lisaron núcleos, se extrajeron las proteínas y se sometieron a un proceso de *Western-blot*.

3.6.1 Contaje de células apoptóticas teñidas con bisbencimida

Triplicados de $0.5 \cdot 10^6$ células (U-937 y HL-60) o placas de 24 pocillos al 70 % de confluencia (Hep-G2), se lavaron con PBS y fijaron con 75 μ l de paraformaldehído al 3 %. Después de centrifugadas ($1.500 \times g$, 3 min, 4 °C), las células se resuspendieron en 15 μ l de PBS que contenía 16 μ g/ml de bisbencimida, y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, 10 μ l de cada muestra se aplicaron en portaobjetos y se visualizaron por microscopía de fluorescencia. Se contabilizaron 500 células por muestra, entre las que se estimaron aquellas que mostraron cambios apoptóticos en su cromatina según los criterios arriba expuestos.

3.6.2 Determinación de la fragmentación del DNA (DNA ladder)

3.6.2.1 Extracción y purificación del DNA de bajo peso molecular

El DNA se obtuvo de $1 \cdot 10^6$ células que, finalizados los tratamientos, se lavaron en PBS y resuspendieron e incubaron a 4 °C durante 30 min en 100 μ l de un tampón hipotónico que contenía detergente (10 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA, 0.2 % Triton X-100). Tras una centrifugación ($12.000 \times g$, 15 min., 4 °C) para eliminar los restos celulares y el DNA genómico intacto asociado con la fracción nuclear, se sometió el sobrenadante a una digestión secuencial con 400 μ g/ml de RNasa A libre de DNasas y 400 μ g/ml de proteinasa K, durante 1 h a 37 °C cada una.

Para extraer el DNA se añadió a las muestras un volumen de fenol y otro de cloroformo isoamílico (24:1). El DNA en la fase acuosa superior se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol, 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M (pH 5.2) y tRNA como *carrier*, durante 1 h a -70 °C. La muestra se resuspendió en 30 μ l de H₂O/DEPC y se conservó a -70 °C.

3.6.2.2 Marcaje del DNA

A las alícuotas de cada muestra (5 μ l) se añadieron 10 μ l de tampón 10 mM Tris-HCl pH 9.0, que contenía 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 % Triton X-100, 100 pmol Dig-11-dUTP y 1 U *Taq* DNA polimerasa. La reacción se realizó a 72 °C

durante 15 min y se finalizó extrayendo las muestras con cloroformo.

3.6.2.3 Separación y detección de los fragmentos de DNA

A cada muestra se le añadieron 5 µl de tampón de electroforesis (ver epígrafe 3.4.3 de esta misma sección). Los fragmentos de DNA se separaron y visualizaron de manera análoga a la descrita en el epígrafe 3.4.4 de esta sección.

3.6.3 Estudio de la degradación de lamina B mediante Western-blot

Se partió de 5 millones de células por tratamiento, al finalizar los cuales se lavaron con PBS y se lisaron en 100 µl de tampón de lisis (10 mM HEPES pH 7.6, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.75 mM espermidina, 0.15 mM espermina, 0.625 % NP-40, 1 mM PMSF). Las muestras se sometieron a centrifugación a 14.000 x g durante 2 min a 4 °C, descartando el sobrenadante y lisando el precipitado nuclear con 50 µl de PBSTDS seguido de sonicación. Alícuotas de estos extractos se usaron para cuantificar proteínas por el método del ácido bicinonínico.

Se separaron 75 µg de proteínas totales por muestra mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 % de reticulación y 15 mA de corriente constante por gel, incluyéndose patrones de pesos moleculares preteñidos en cada uno de los geles. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa como se describió más arriba (ver epígrafe 3.5.3)

La inmunodetección se realizó a temperatura ambiente incubando las membranas 1 h en solución de bloqueo NET+gelatina (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.05 % Triton X-100, 0.25 % gelatina), seguida de una incubación de 2 h con una dilución 1:5000 del anticuerpo policlonal anti-lamina B, y otra de 1 h con una dilución 1:5000 de un anticuerpo contra cabra conjugado a peroxidasa. Las proteínas se visualizaron usando el sistema ECL de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

En un experimento previo, y para determinar la especificidad del anticuerpo contra lamina B y su fragmento proteolítico, aquél se bloqueó con una solución de 50 µg/ml del péptido generador del anticuerpo durante 2 h a 4 °C (Quintana *et al.*, 1993). Extractos nucleares de células HL-60 tratadas 24 h con Lovastatina se sometieron al proceso arriba descrito e incubaron con el anticuerpo bloqueado y sin bloquear. Como se observa en la **Figura 12**, el bloqueo del anticuerpo conlleva una drástica disminución de la señal, tanto en la proteína completa como en su fragmento proteolítico, validando los subsiguientes ensayos.

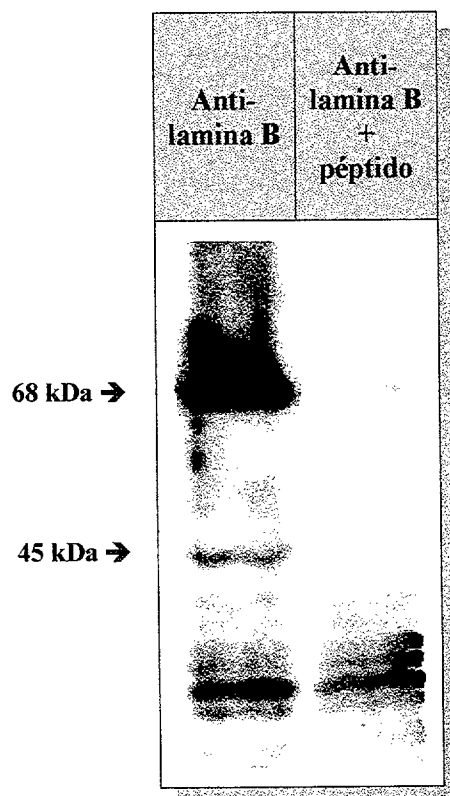


Figura 12

Determinación de la especificidad del anticuerpo contra lamina B y su fragmento proteolítico. Alícuotas de un extracto nuclear obtenido a partir de $5 \cdot 10^6$ células HL-60 tratadas 24 h con Lovastatina $10 \mu\text{M}$, fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (15 % de reticulación) y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Una de las calles fue inmunorevelada con el anticuerpo contra lamina B (dilución 1:5000), mientras la otra lo fue con el mismo anticuerpo y a la misma dilución pero incubándolo previamente con $50 \mu\text{g/ml}$ del péptido generador del anticuerpo durante 2 h a 4°C .

3.7 Estudios de proliferación y viabilidad celular

3.7.1 *Marcaje con [3 H]Timidina*

Las células se crecieron en placas de 24 pocillos hasta alcanzar un 70% de confluencia antes de aplicar los diferentes tratamientos. La [3 H]Timidina (1 μ Ci/ml) se añadió 6 h antes de finalizar el ensayo. Transcurrido este tiempo, las células se depositaron en hielo y el medio se sustituyó por 1 ml de TCA 10% frío durante 10-15 min. El lisado se recogió sobre filtros de 0.45 μ m Metrical[®] (Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, MI, USA) utilizando un colector múltiple para filtración a vacío (Millipore Ibérica, S.A., Madrid, España). Los filtros se transfirieron a viales con 3 ml de líquido de centelleo Optiscint Hi-Safe 3 (Pharmacia, Madrid, España), y la radiactividad asociada a cada muestra se cuantificó en un contador LKB Wallac. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.7.2 *Tinción de Azul de Tripán*

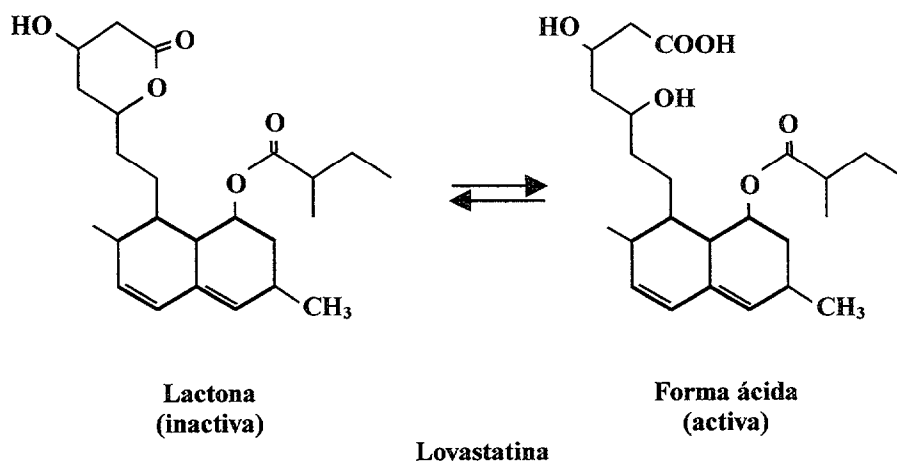
Triplicados de $0.5 \cdot 10^6$ células se trataron y, al finalizar el ensayo, se centrifugaron (1500 x g, 10 min) y resuspendieron en 50 μ l de medio fresco. Alícuotas de 25 μ l se mezclaron con un volumen igual de Azul de Tripán (0.4 %), aplicándose 25 μ l en una cámara Neubauer donde se contaron las células que excluyeron el colorante con una lupa Alphaphot-2 (Nikon, Japón).

3.8 Otros métodos

3.8.1 *Activación de la Lovastatina*

Para utilizar la Lovastatina en los tratamientos celulares, ésta hubo de ser convertida de la forma inactiva (lactona), en la que fue donada por Merck, Sharp & Dohme Co., a la forma activa (ácido), tal y como se ilustra en las fórmulas incluidas más abajo.

La deslactonización se llevó a cabo (DeClue *et al.*, 1991) disolviendo la cantidad apropiada de Lovastatina en etanol y calentando, a continuación, a 50 °C en 0.1 N de NaOH durante una hora. Finalmente, la solución se neutralizó con HCl y se almacenó sin filtrar como un *stock* de 10 mM a -70 °C.



3.8.2 Preparación de la resina Bio Rex 5

Antes de ser utilizada como resina intercambiadora aniónica en los ensayos de actividad enzimática, se hidrató al 25 % en H₂O. Después de la sedimentación, se decantaron los finos, repitiendo el proceso tantas veces como fue necesario para eliminar todos los finos de la suspensión. La resina se almacenó a 4 °C como suspensión al 50 %.

3.8.3 Preparación de la proteína A-sefarosa

Previamente a su utilización en los ensayos de inmunoprecipitación, la proteína A-sefarosa se suspendió en una solución de PBS (pH 7.4), 3 % BSA, 0.1 % NaN₃, en exceso, durante 4 h a 4 °C con agitación ocasional. Tras una centrifugación a 1500 x g durante 5 min a 4 °C, se lavó dos veces en una solución de PBS (pH 7.4), 0.1 % NaN₃, y se guardó a 4 °C como un *stock* al 50 % en la misma solución de lavado.

3.8.4 Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se midió a 595 nm en un espectrofotómetro Ceres900C (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski VT, USA) por el método Bradford (Bradford, 1976), usando un *kit* comercial (Bio-Rad Laboratories SA, Madrid, España). La determinación de proteínas en muestras diluidas o que contenían

productos que interferían con el método anterior, se realizó a 562 nm, usando el método del ácido bicinonínico (Smith *et al.*, 1985), que proporciona un rango óptimo de trabajo de 0.5-20 µg de proteínas. Los reactivos para este método se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Para la construcción de la curva estándar se utilizó BSA en ambos casos.

3.9 Métodos estadísticos

Las muestras fueron siempre triplicados o cuadruplicados y los experimentos se repitieron al menos tres veces. La comparación entre los distintos tratamientos se realizó por el método de la T de Student o análisis de varianza.

Resultados

Resultados

4.1 Estudio de la actividad HMG-CoA reductasa en respuesta a $\text{TNF}\alpha$ y ceramida en células U-937, HL-60, Hep-G2 y FRTL-5

Los primeros ensayos de esta memoria se diseñaron para evaluar los efectos del $\text{TNF}\alpha$ y su mensajero intracelular, la ceramida, sobre la actividad del enzima HMG-CoA reductasa en dos líneas de células linfoides humanas (U-937 y HL-60), otra de células hepáticas humanas (Hep-G2) y una cuarta de células del tiroides de rata (FRTL-5).

La actividad del enzima se cuantificó en términos de formación de [^{14}C]mevalonato a partir del sustrato [^{14}C]HMG-CoA (Goldstein et al., 1983) como se describe en Material y Métodos (epígrafe 3.3). Algunos ensayos se realizaron en células tratadas con Lovastatina dado que, como se ha descrito en Material y Métodos (epígrafe 3.3), la utilización de este modelo permite investigar la regulación de la expresión del enzima independientemente de colesterol/isoprenoides.

Además y puesto que las membranas celulares son impermeables a las moléculas de ceramida nativa, se utilizó, en todos los ensayos en los que se estudia la acción de este compuesto, un derivado sintético de la ceramida, la N-acetil esfingosina (C2-ceramida), en el que el ácido graso de cadena larga del grupo amino se sustituye por un grupo acetilo aumentando, de esta forma, la permeabilidad de la molécula.

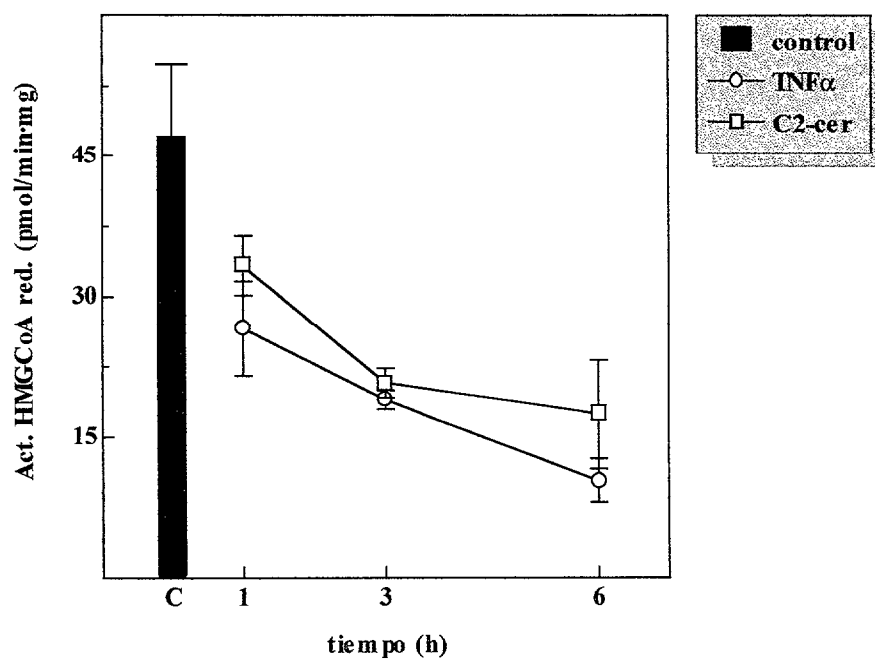
4.1.1 El $\text{TNF}\alpha$ y la ceramida inhiben la actividad HMG-CoA reductasa en células U-937 y HL-60

Se añadió $\text{TNF}\alpha$ (30 ng/ml) o C2-ceramida (20 μM) durante tiempos variables (1-6 h) a células U-937 ($5 \cdot 10^6$ células/tratamiento) previamente tratadas con Lovastatina (20 μM) durante toda la noche.

Como se observa en la **Figura 13** el $\text{TNF}\alpha$ inhibe la actividad del enzima de forma dependiente del tiempo, llegando hasta un 80 % a las 6 h de tratamiento. Como se esperaba, el mensajero intracelular del $\text{TNF}\alpha$, la ceramida, inhibe la actividad de la HMG-CoA reductasa de forma similar.

Para medir los efectos de la ceramida sobre la actividad HMG-CoA reductasa en células HL-60, éstas se serodeprimieron toda la noche y, a continuación, se tomaron alícuotas de $5 \cdot 10^6$ células que se trataron con Lovastatina (10 μM) sola o en combinación con C2-ceramida (6 μM) durante tiempos crecientes (3-24 h). Tras deprivar a las células de Lovastatina se ensayó la actividad HMG-CoA reductasa. De esta manera, esperábamos observar que el aumento de actividad en función del tiempo inducido por la Lovastatina fuera inhibido por la ceramida.

Resultados



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003

Figura 13

El TNFα y la ceramida inhiben la actividad de la HMG-CoA reductasa en células U-937. Las células ($5 \cdot 10^6$ /tratamiento) se serodeprimieron y pretrataron con Lovastatina ($20 \mu\text{M}$) toda la noche, tras lo cual se añadió TNFα (30 ng/ml) o C2-ceramida ($20 \mu\text{M}$) durante los tiempos indicados, al final de los cuales se sustituyeron los medios por DMEM durante 15 min. A continuación se realizó el ensayo de actividad enzimática según se describe en Material y Métodos (epígrafe 3.3). El ensayo se realizó por triplicado. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres

Como se observa en la **Figura 14**, la ceramida inhibe de forma dependiente del tiempo el aumento de la actividad HMG-CoA reductasa inducida por la Lovastatina. La inhibición se sitúa en torno a un 30-35 % entre las 12 y las 24 h de tratamiento.

4.1.2 El TNF α y la ceramida inducen la actividad HMG-CoA reductasa en células Hep-G2 y FRTL-5

Para medir la actividad de la HMG-CoA reductasa en células Hep-G2, éstas se cultivaron en platos de 35 mm y se llevaron al 75 % de confluencia, momento en el que se añadió al medio de cultivo TNF α (100 ng/ml) o C2-ceramida (30 μ M) durante 1, 3 y 6 horas. A continuación, se realizó el ensayo de actividad enzimática.

Como se muestra en la **Figura 15**, tanto el TNF α como la ceramida aumentan en un 60 % la actividad enzimática a las 3 h de tratamiento. La ceramida es capaz de incrementar la actividad en un 100 % después de 6 horas.

Las células FRTL-5, cultivadas como se describe en el epígrafe 3.2.4 de Material y Métodos, se mantuvieron 3 días en medio sin TSH (5H) con NCS al 5% y otros 2 días en 5H con 0.2% de NCS. Los experimentos se iniciaron siempre con células al 75 % de confluencia, y el TNF α (30 ng/ml) o la C2-ceramida (30 μ M) se añadieron durante 1, 3, 6 y 12 h, después de las cuales se ensayó la actividad de la HMG-CoA reductasa.

Como se muestra en la **Figura 16**, tanto el TNF α como la ceramida inducen en las primeras 6 h de tratamiento un aumento de la actividad HMG-CoA reductasa que triplica la actividad basal de las células. A las 12 h el aumento llega a ser de hasta un 500 %.

4.2 Estudio de la expresión de HMG-CoA reductasa en respuesta a TNF α y ceramida en células U-937, HL-60, Hep-G2 y FRTL-5

Para conocer si los efectos sobre la actividad de la HMG-CoA reductasa debidos al TNF α y la ceramida tienen lugar a nivel transcripcional o post-transcripcional investigamos, a continuación, la existencia de cambios en los niveles de mRNA en células U-937, HL-60, Hep-G2 y FRTL-5, en respuesta a la citoquina y a su mensajero intracelular.

Resultados

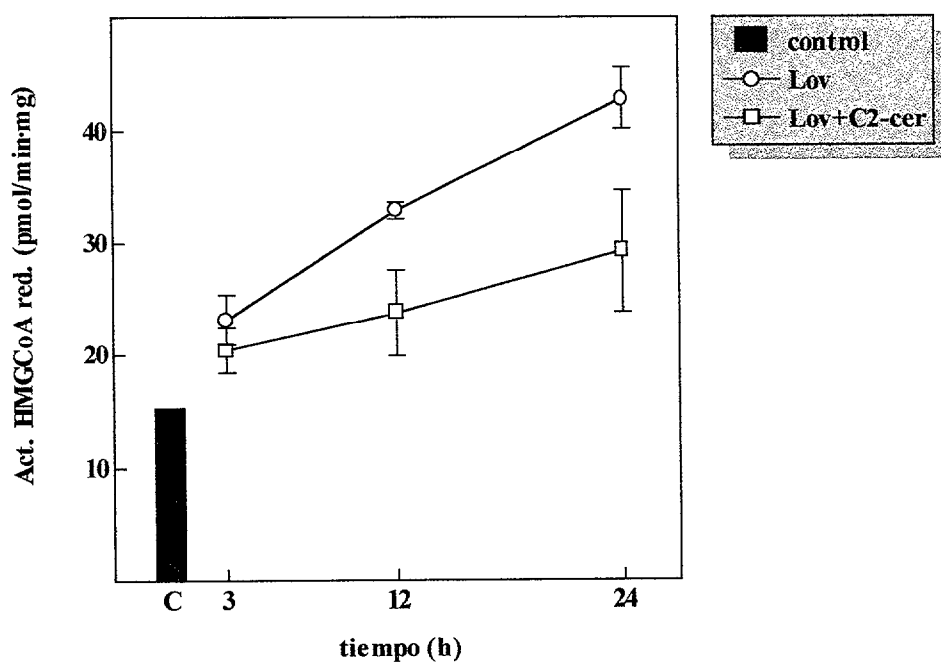


Figura 14

La ceramida inhibe la actividad de la HMG-CoA reductasa en células HL-60. Las células ($5 \cdot 10^6$ /tratamiento) se serodeprimieron toda la noche y se trataron con Lovastatina ($10 \mu\text{M}$) sola o en combinación con C2-ceramida ($6 \mu\text{M}$) durante los tiempos indicados, al final de los cuales se sustituyeron los medios por DMEM durante 15 min. A continuación se realizó el ensayo de actividad enzimática según se describe en Material y Métodos. El ensayo se realizó por triplicado. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

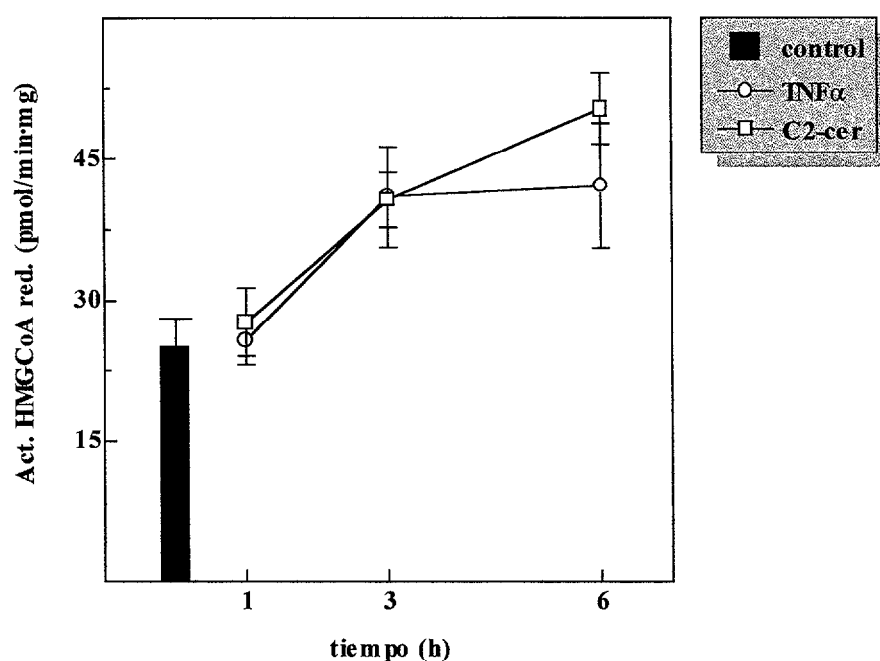
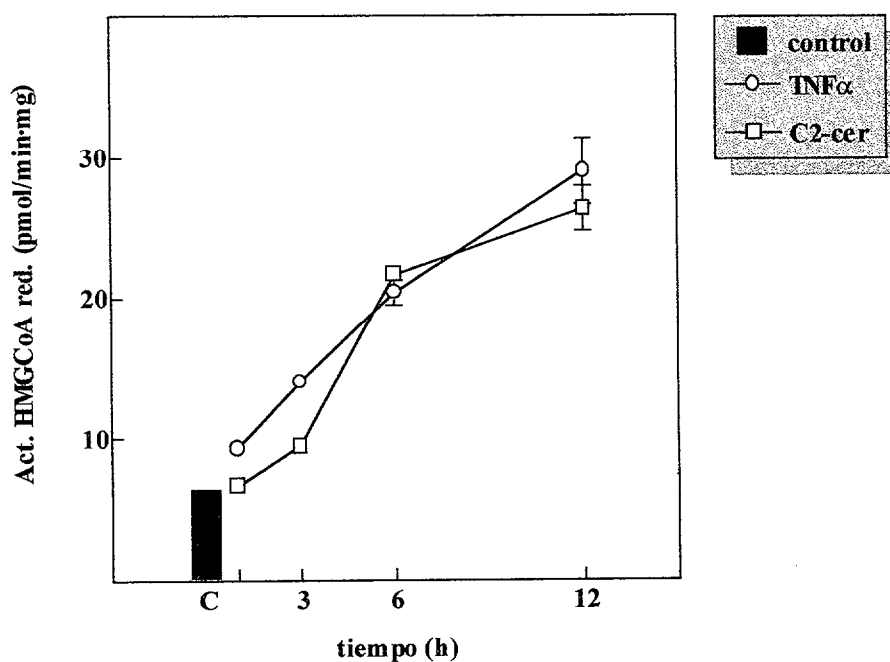


Figura 15

El TNF α y la ceramida inducen la actividad de la HMG-CoA reductasa en células Hep-G2. Las células (platos de 35 mm a subconfluencia/tratamiento) se trataron con TNF α (100 ng/ml) o C2-ceramida (30 μ M) durante los tiempos indicados. A continuación se realizó el ensayo de actividad enzimática según se describe en Material y Métodos. El ensayo se realizó por triplicado. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

Resultados



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003

Figura 16

El TNFα y la ceramida inducen la actividad de la HMG-CoA reductasa en células FRTL-5. Las células (platos de 35 mm al 75% de confluencia/tratamiento) se mantuvieron 3 días en 5H 5% NCS y otros 2 días en 5H 0.2% NCS antes de tratarlas con TNFα (30 ng/ml) o C2-ceramida (30 μM) durante los tiempos indicados. A continuación se realizó el ensayo de actividad enzimática según se describe en Material y Métodos. El ensayo se realizó por triplicado. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres

Para ello utilizamos la técnica de RT-PCR como se describe en Material y Métodos (ver epígrafe 3.4). En todos los casos se amplificó de forma paralela la G3PDH como control interno. Las bandas de DNA visualizadas por quimioluminiscencia se cuantificaron con el software ImageMaster™ de Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia). Las densidades ópticas obtenidas se normalizaron por las correspondientes a la G3PDH.

4.2.1 *El TNF α y la ceramida inhiben la expresión de HMG-CoA reductasa en células U-937 y HL-60*

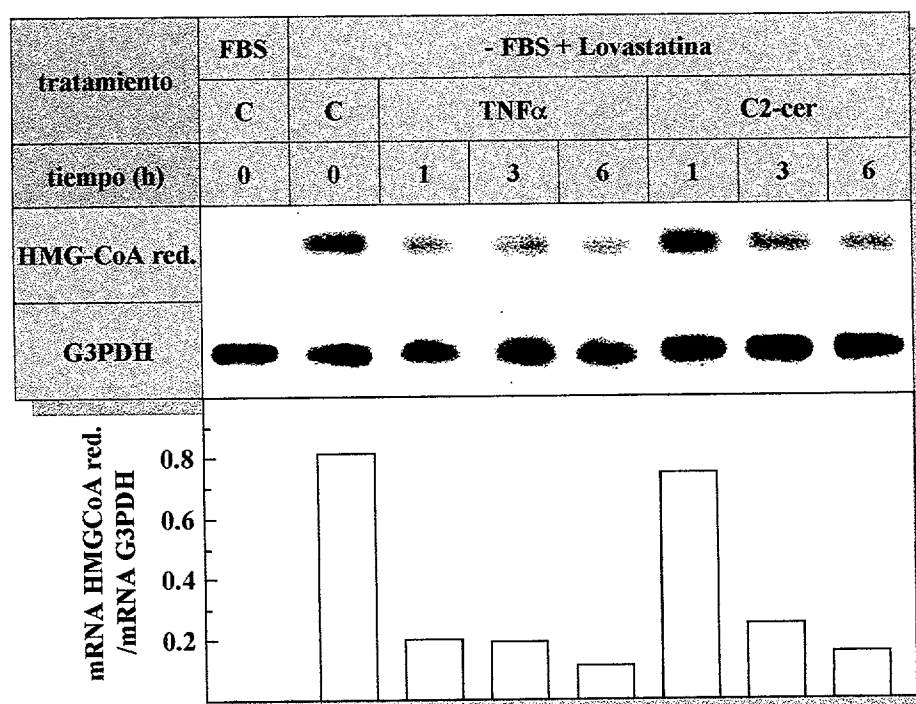
Para medir los efectos del TNF α y la ceramida sobre la expresión de la HMG-CoA reductasa en células U-937, éstas se cultivaron como se describe en Material y Métodos y se pretrataron como se indica en el epígrafe 4.1.1 de esta misma sección, con el objeto de aumentar al máximo la expresión del enzima. A continuación, se tomaron alícuotas de $3 \cdot 10^6$ células a los que se añadió TNF α (30 ng/ml) o C2-ceramida (20 μ M) durante 1, 3 y 6 h. Se extrajo el RNA y se sintetizó el cDNA como se describe en Material y Métodos (ver epígrafe 3.4) para, posteriormente, amplificar el cDNA obtenido utilizando los cebadores descritos en la **Tabla I**. El número de ciclos de amplificación fue (ver **Tabla II**) de 22 para la HMG-CoA reductasa y 18 para la G3PDH.

En la **Figura 17** se muestra como, efectivamente, la serodepresión y el pretratamiento con Lovastatina conducen a un aumento en la expresión de la HMG-CoA reductasa y como el TNF α produce, desde la primera hora de tratamiento, una drástica disminución, en torno al 75 %, del RNA mensajero, que se hace máxima a las 6 h con casi un 90 % de inhibición. Asimismo, el tratamiento con C2-ceramida inhibe los niveles de expresión del enzima de forma dependiente del tiempo, efecto que se hace patente desde las 3 h, con más de un 65 % de inhibición, llegando a ser de un 80 % a las 6 h.

Utilizando el mismo diseño experimental que el empleado en el ensayo de actividad enzimática para esta línea celular (ver epígrafe 4.1.1 de esta misma sección), $3 \cdot 10^6$ células HL-60 se trataron con Lovastatina (10 μ M) sola o en combinación con C2-ceramida (6 μ M) durante 3 y 24 h. El análisis por RT-PCR se realizó como se describió anteriormente, utilizando 25 y 18 ciclos de amplificación para la HMG-CoA reductasa y la G3PDH, respectivamente (ver **Tabla II**).

En la **Figura 18** se puede observar como la Lovastatina induce la expresión de la HMG-CoA reductasa y como el tratamiento con C2-ceramida inhibe la expresión del enzima en un 55 % en las tres primeras horas, hasta un 67 % al final del tratamiento a las 24 h.

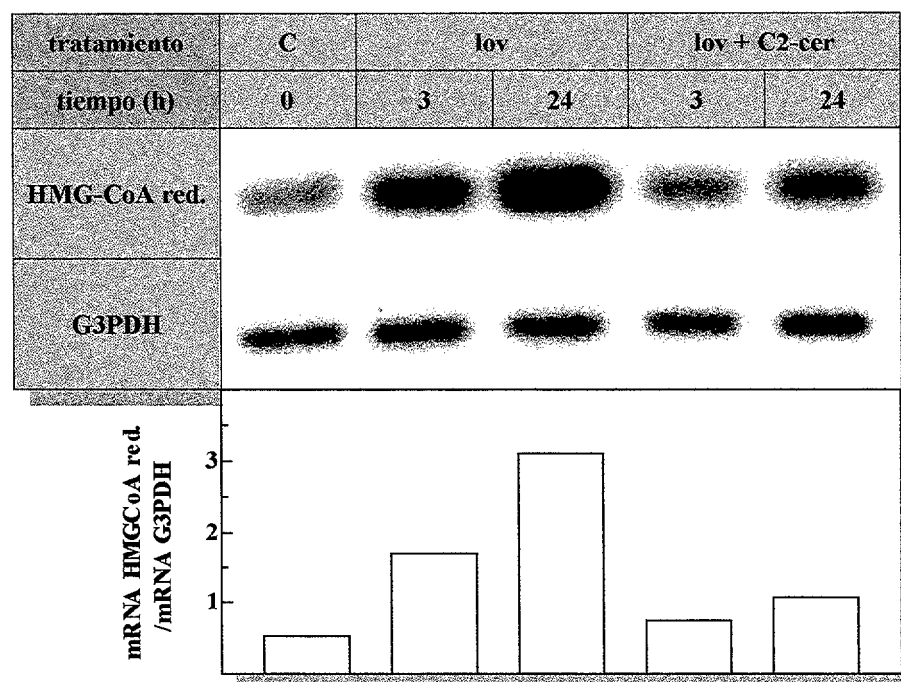
Resultados



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003

Figura 17

El TNF α y la ceramida inhiben la expresión de la HMG-CoA reductasa en células U-937. Las células ($3 \cdot 10^6$ /tratamiento) se serodeprimieron y pretrataron con Lovastatina ($20 \mu\text{M}$) durante toda la noche. A continuación, se trataron durante los tiempos indicados con TNF α (30 ng/ml) o C2-ceramida ($20 \mu\text{M}$). El análisis por RT-PCR se realizó según se describe en Material y Métodos. En el panel inferior se muestra la cuantificación de las bandas de HMG-CoA red. normalizadas por la G3PDH. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

**Figura 18**

La ceramida inhibe la expresión de la HMG-CoA reductasa en células HL60. Las células ($3 \cdot 10^6$ /tratamiento) se serodeprimieron toda la noche y se trataron con Lovastatina ($10 \mu\text{M}$) sola o en combinación con C2-ceramida ($6 \mu\text{M}$) durante los tiempos indicados. El análisis por RT-PCR se realizó según se describe en Material y Métodos. En el panel inferior se muestra la cuantificación de las bandas de HMG-CoA red. normalizadas por la G3PDH. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

Resultados

4.2.2 El TNF α y la ceramida inducen la expresión de HMG-CoA reductasa en células Hep-G2 y FRTL-5

Las células Hep-G2 se cultivaron como se describe en el epígrafe 4.1.2 y en Material y Métodos, esto es, se cultivaron en platos de 35 mm que se llevaron a subconfluencia antes de comenzar el ensayo. El TNF α (100 ng/ml) y la C2-ceramida (30 μ M) se añadieron durante 1, 3 y 6 h. Una vez finalizado el experimento se realizó el análisis por RT-PCR como se describió anteriormente. El número de ciclos de amplificación para cada una de las enzimas en estudio fue (ver *Tabla II*) de 20 ciclos para la HMG-CoA reductasa y 18 ciclos para la G3PDH.

Como puede observarse en la *Figura 19*, el tratamiento con TNF α o ceramida produce un aumento dependiente del tiempo en la expresión del enzima. En el caso de la citoquina, comienza a las 3 h con una inducción del 150 %, y se eleva, a las 6 h de tratamiento, más de 60 veces el control. La ceramida produce un aumento más moderado del 75 % a las 3 h, que llega a ser del 600 % a las 6 h.

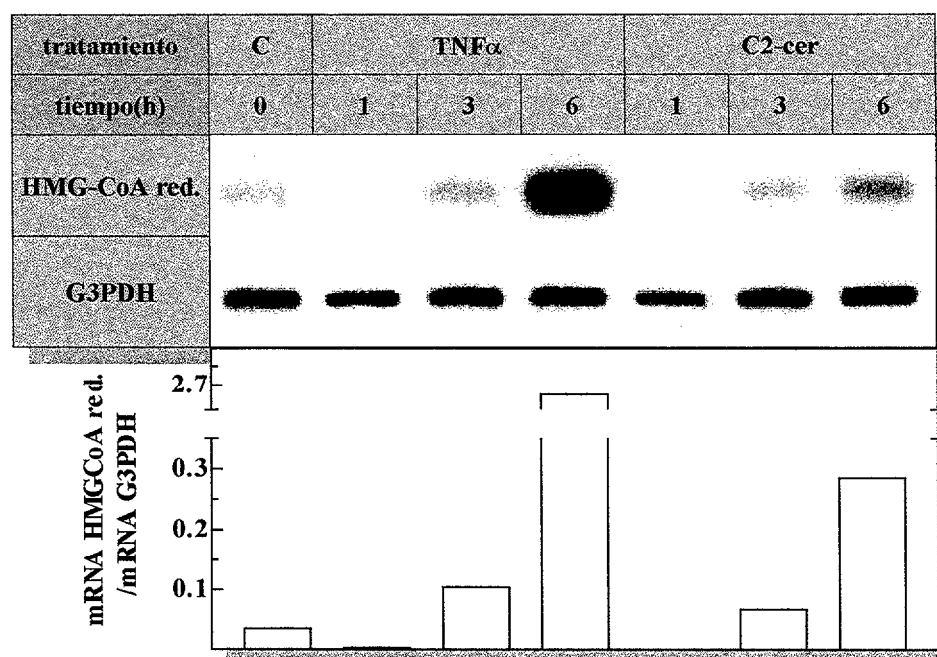
Las células FRTL-5 se cultivaron como se describe en el epígrafe 4.1.2 y en Material y Métodos. Cuando las células alcanzaron el 75 % de confluencia se inició el experimento añadiendo TNF α (30 ng/ml) o C2-ceramida (30 μ M) durante 1, 6 y 12 h. El análisis por RT-PCR se realizó como se describió anteriormente, utilizando 27 y 18 ciclos de amplificación para la HMG-CoA reductasa y la G3PDH, respectivamente (ver *Tabla II*).

En la *Figura 20* se puede observar como el tratamiento con TNF α induce un claro aumento en la expresión del enzima desde la primera hora de tratamiento (en torno a un 350 % sobre el control), efecto que llega a más del 600 % a las 6 h y comienza a disminuir a las 12 h con un aumento del 450 %. La ceramida también induce la expresión del enzima, sobre unas 15 veces el control, en la primera hora de tratamiento, inducción que va remitiendo progresivamente desde las 6 a las 12 h, con aumentos de 12 y 5 veces el control, respectivamente.

4.2.3 El TNF α y la ceramida inducen la expresión del receptor de LDL en células Hep-G2

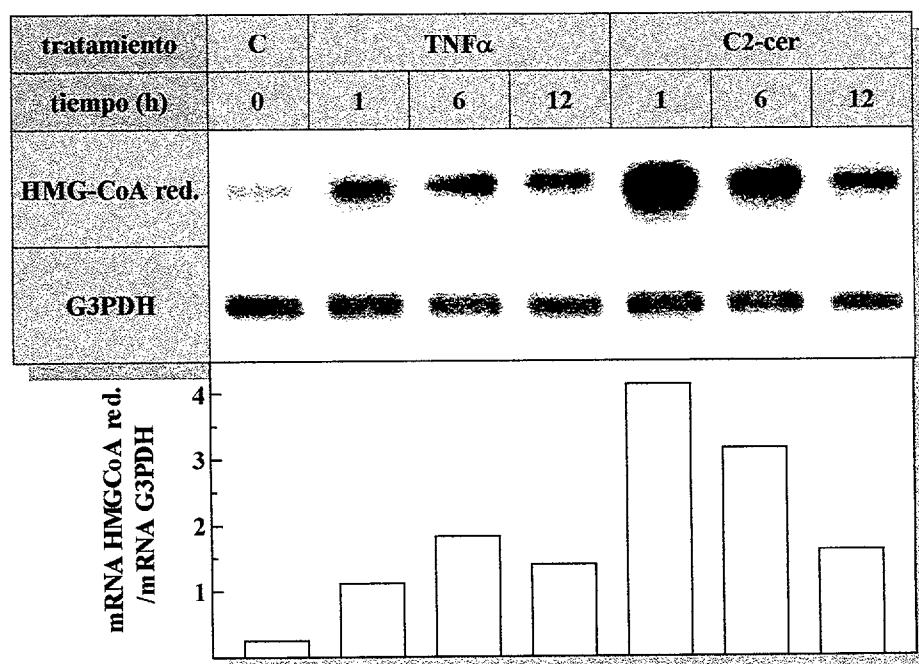
Ya que la HMG-CoA reductasa y el receptor de LDL son genes que habitualmente (y en especial en el hepatocito) son corregulados por los distintos factores implicados en el control de la vía del colesterol, quisimos estudiar si el aumento en la expresión de la HMG-CoA reductasa observado en células Hep-G2, llevaba asociado una inducción paralela de la expresión del LDLR.

Para ello, utilizando el mismo cDNA en el que se midió la expresión de la HMG-CoA reductasa, realizamos un ensayo paralelo de RT-PCR utilizando los

**Figura 19**

El TNF α y la ceramida inducen la expresión de la HMG-CoA reductasa en células Hep-G2. Las células (platos de 35 mm a subconfluencia/tratamiento) se trataron con TNF α (100ng/ml) o C2-ceramida (30 μ M) durante los tiempos indicados. El análisis por RT-PCR se realizó según se describe en Material y Métodos. En el panel inferior se muestra la cuantificación de las bandas de HMG-CoA red. normalizadas por la G3PDH. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

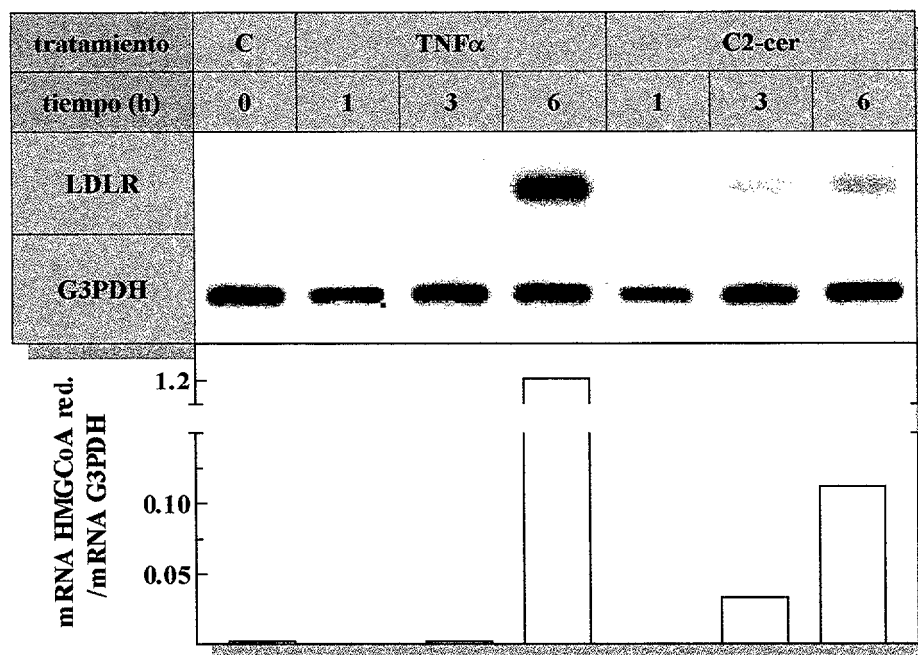
Resultados



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003

Figura 20

El TNF α y la ceramida inducen la expresión de la HMG-CoA reductasa en células FRTL5. Las células (platos de 35 mm al 75% de confluencia/tratamiento) se mantuvieron 3 días en 5H 5% NCS y otros 2 días en 5H 0.2% NCS antes de tratarlas con TNF α (30ng/ml) o C2-ceramida (30 μ M) durante los tiempos indicados. El análisis por RT-PCR se realizó según se describe en Material y Métodos. En el panel inferior se muestra la cuantificación de las bandas de HMG-CoA red. normalizadas por la G3PDH. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

**Figura 21**

El TNF α y la ceramida inducen la expresión del receptor de LDL en células Hep-G2. Las células (platos de 35 mm a subconfluencia/tratamiento) se trataron con TNF α (100 ng/ml) o C2-ceramida (30 μ M) durante los tiempos indicados. El análisis por RT-PCR se realizó según se describe en Material y Métodos. En el panel inferior se muestra la cuantificación de las bandas de LDLR normalizadas por la G3PDH. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

Resultados

cebadores para el LDLR que se detallan en la **Tabla I**, utilizando 22 ciclos de amplificación como se describe en la **Tabla II**.

Como puede observarse en la **Figura 21**, el TNF α y la ceramida inducen la expresión del receptor de LDL de forma muy similar a como lo hacen con la HMG-CoA reductasa, esto es, con un pronunciado aumento del RNA mensajero del enzima a las 6 h de tratamiento con TNF α (en torno a 400 veces el control), y una inducción moderada cuando se trata con C2-ceramida, que se sitúa entre 10 y 37 veces el control a las 3 y 6 horas de tratamiento, respectivamente.

4.3 Estudio de la farnesilación de p21^{ras} en respuesta a TNF α y ceramida en células HL-60 y Hep-G2

La farnesilación de proteínas es un proceso condicionado por la actividad de la HMG-CoA reductasa (Leonard *et al.*, 1990; Beck *et al.*, 1990). Como el TNF α y la ceramida inhiben e inducen la actividad de la reductasa en HL-60 y Hep-G2, respectivamente, decidimos estudiar si también se ve afectada la farnesilación de p21^{ras} en ambos tipos celulares.

4.3.1 El TNF α y la ceramida inhiben la maduración de p21^{ras} en células HL-60

Para el estudio de la farnesilación de p21^{ras} se utilizaron alícuotas de $10 \cdot 10^6$ células HL-60 que se trataron con Lovastatina (10 μ M), TNF α (30 ng/ml) y C2-ceramida (6 μ M) con y sin mevalonato (20 mM) en medio libre de metionina durante 24 h. Dos horas después de iniciados los tratamientos las células se marcaron con 50 μ Ci/ml de Trans³⁵S-Label. Las proteínas (1 mg) se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-*ras* (pan-*ras* Ab-2), se separaron mediante SDS-PAGE (15 % de reticulación) y se transfirieron a una membrana de NC donde las proteínas marcadas con ³⁵S-Metionina fueron visualizadas y cuantificadas con un equipo PhosphorImager.

En la **Figura 22** se muestra como, de acuerdo con lo ya descrito (Pérez-Sala y Mollinedo, 1994) la Lovastatina inhibió el procesamiento de p21^{ras}. La existencia de la inhibición del procesamiento puede deducirse de la acumulación (más de 15 veces la basal) del precursor no farnesilado de p21^{ras}. El efecto de la Lovastatina se revierte casi en su totalidad (94 %) con la adición de mevalonato, lo que prueba que la ausencia de maduración de p21^{ras} es consecuencia de la inhibición de la HMG-CoA reductasa. El TNF α y la ceramida que, como hemos demostrado previamente, inhiben la expresión de la HMG-CoA reductasa en esta línea celular, previenen, asimismo, la maduración de p21^{ras}, con una acumulación de la forma no procesada de alrededor de 10 y 6 veces la basal, respectivamente. Al igual que en el caso de la Lovastatina la adición de mevalonato revierte en un 68 y 78 %, respectivamente, los efectos del

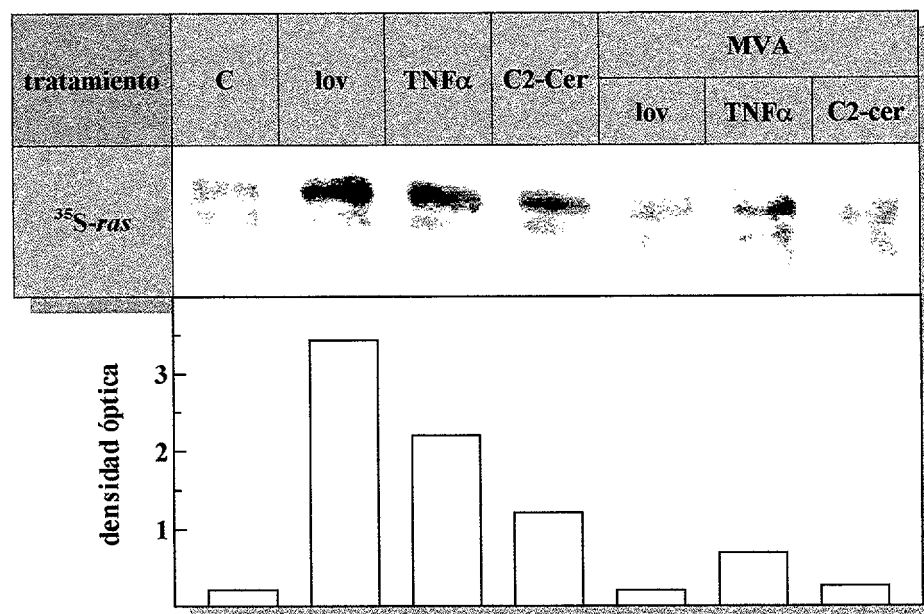


Figura 22

El TNFα y la ceramida inhiben la maduración de p21^{ras} en células HL-60. Se trataron $10 \cdot 10^6$ células HL60 durante 24 h con Lovastatina (10 μM), TNFα (30 ng/ml) y C2-cer (6 μM) con y sin MVA. Dos horas después de iniciados los tratamientos las células se marcaron con 50 μCi/ml de Trans³⁵S-Label. Se inmunoprecipitó 1 mg de proteínas totales, se separaron en gel de poliacrilamida al 15%, se transfirieron a membranas de NC y se expusieron durante 3 días a una placa de PhosphorImager. En el panel inferior se muestra la cuantificación de las proteínas visualizadas. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

Resultados

TNF α y la ceramida.

4.3.2 *El TNF α y la ceramida no afectan a la maduración de p21^{ras} en células Hep-G2*

Se trataron células Hep-G2 ($10 \cdot 10^6$ células/tratamiento) con Lovastatina (30 μ M), TNF α (100 ng/ml) y C2-cer (30 μ M) con y sin MVA (20 mM) durante 24 h en medio libre de metionina. El ensayo se realizó de forma idéntica al anterior (epígrafe 4.3.1), es decir, las células se marcaron dos horas después de iniciados los tratamientos con 50 μ Ci/ml de Trans³⁵S-Label, se inmunoprecipitó 1 mg de proteínas con un anticuerpo anti-*ras* (pan-*ras* Ab-2), éstas se separaron mediante SDS-PAGE (15 % de reticulación) y se transfirieron a una membrana de NC. Las proteínas marcadas se visualizaron y cuantificaron con un equipo PhosphorImager.

Como se muestra en la **Figura 23**, el tratamiento con Lovastatina induce la acumulación de la forma no procesada de p21^{ras} en torno a un 200 % sobre el control, mientras los tratamientos con TNF α o ceramida sitúan al precursor no farnesilado por debajo del control. El cotratamiento con mevalonato revierte en su totalidad el efecto de la Lovastatina y hace casi desaparecer la señal del precursor en los tratamientos con TNF α o ceramida.

4.4 *Estudio de la viabilidad/proliferación en respuesta a ceramida de células HL-60 y Hep-G2*

Puesto que algunas proteínas farnesiladas, como p21^{ras}, están directamente implicadas en la señalización de los procesos de proliferación celular (Barbacid, 1987), teñimos con Azul de Tripán células HL-60 tratadas con ceramida para determinar su viabilidad y marcamos con Timidina tritiada células Hep-G2 con el objeto de estudiar los efectos de la ceramida sobre su proliferación.

4.4.1 *La ceramida disminuye la viabilidad de las células HL-60*

Las células de HL-60 ($0.5 \cdot 10^6$ células/tratamiento) se trataron con C2-ceramida (6 μ M) durante tiempos crecientes (24-72 h). Alícuotas de cada muestra se tiñeron con Azul de Tripán (0.2 %) y se contabilizaron las que excluyeron el colorante.

Como se observa en la **Figura 24**, el tratamiento con ceramida produce una dramática disminución de la viabilidad en estas células, que se sitúa en torno al 50 % a las 24 h y prácticamente en el 100 % a las 72 h.

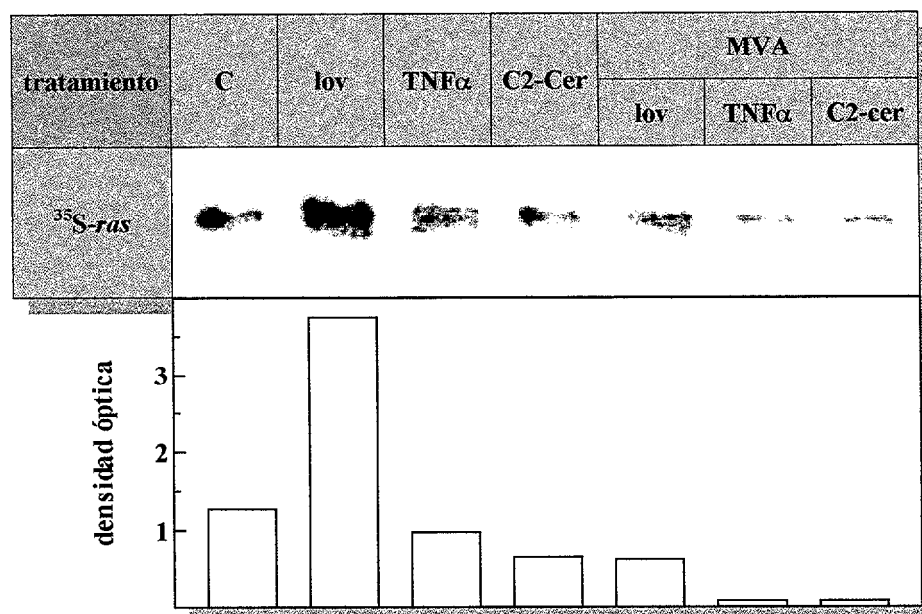
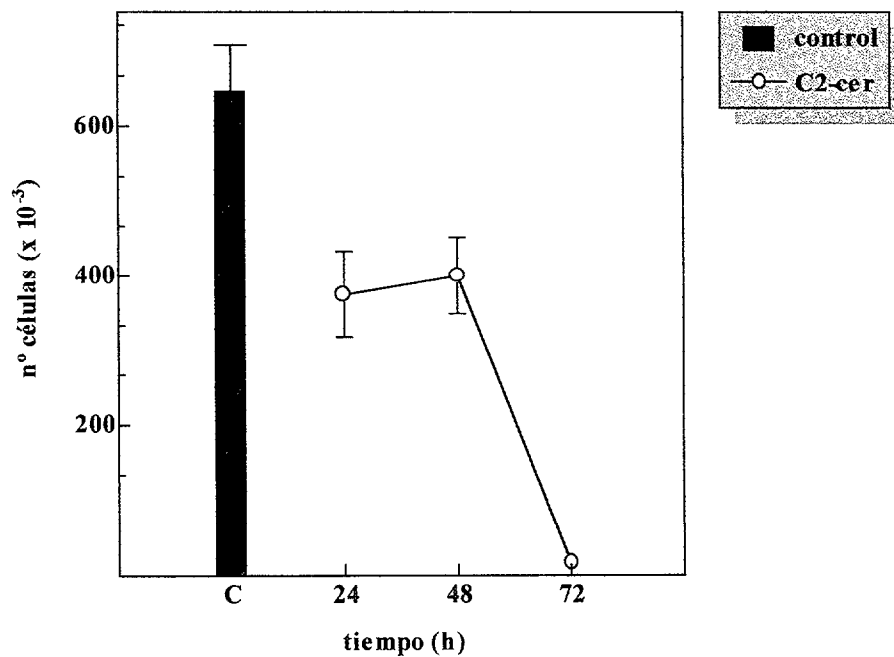


Figura 23

El TNFα y la ceramida no afectan a la maduración de p21^{ras} en células Hep-G2. Se trataron 10·10⁶ células Hep-G2 durante 24h con Lovastatina (30 μM), TNFα (100 ng/ml) y C2-cer (30 μM) con y sin MVA (20 mM). Dos horas después de iniciados los tratamientos las células se marcaron con 50 μCi/ml de Trans³⁵S-Label. Se inmunoprecipitó 1 mg de proteínas totales, se separaron en gel de poliácridamida al 15%, se transfirieron a membranas de NC y se expusieron durante 3 días a una placa de PhosphorImager. En el panel inferior se muestra la cuantificación de las proteínas visualizadas. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

Resultados



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003

Figura 24

La ceramida disminuye la viabilidad de las células HL-60. Células HL-60 ($0.5 \cdot 10^6$ células/tratamiento) se trataron con C2-ceramida ($6 \mu\text{M}$) durante los tiempos indicados. Alícuotas de cada muestra se tiñeron con Azul de Tripán (0.2 %) y se contabilizaron las que excluyeron el colorante. El ensayo se realizó por triplicado. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

4.4.2 La ceramida no afecta a la proliferación de las células Hep-G2

Se cultivaron células Hep-G2 en placas de 24 pocillos y se llevaron a un 70 % de confluencia. A continuación se trataron con dosis crecientes (3-30 μM) de C2-ceramida en presencia de FBS (10 %) durante 24 h, añadiéndose, 6 h antes de finalizar el ensayo, 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]Timidina. La radiactividad asociada a cada muestra se contó como se describe en Material y Métodos (epígrafe 3.7.1)

Como se muestra en la **Figura 25**, el tratamiento con ceramida no afecta a la proliferación celular de las Hep-G2 a ninguna de las dosis evaluadas en el ensayo.

4.5 Medida de la apoptosis en respuesta a $\text{TNF}\alpha$ y ceramida en células U-937, HL-60 y Hep-G2

Puesto que es conocido que el $\text{TNF}\alpha$ y su mensajero intracelular inducen apoptosis en células linfoides (Elias *et al.*, 1988; Elias y Berry, 1991; Greenblatt y Elias, 1992; Wright *et al.*, 1992; Obeid *et al.*, 1993; Jarvis *et al.*, 1994b) estudiamos, a continuación, si el descenso de la viabilidad observado pudiera ser consecuencia de la inducción de la muerte programada de las células. Para correlacionar la aparición de apoptosis en respuesta al $\text{TNF}\alpha$ y la ceramida con la inhibición de la expresión de la HMG-CoA reductasa observada, se intentó, además, revertir la apoptosis inducida con la adición de mevalonato.

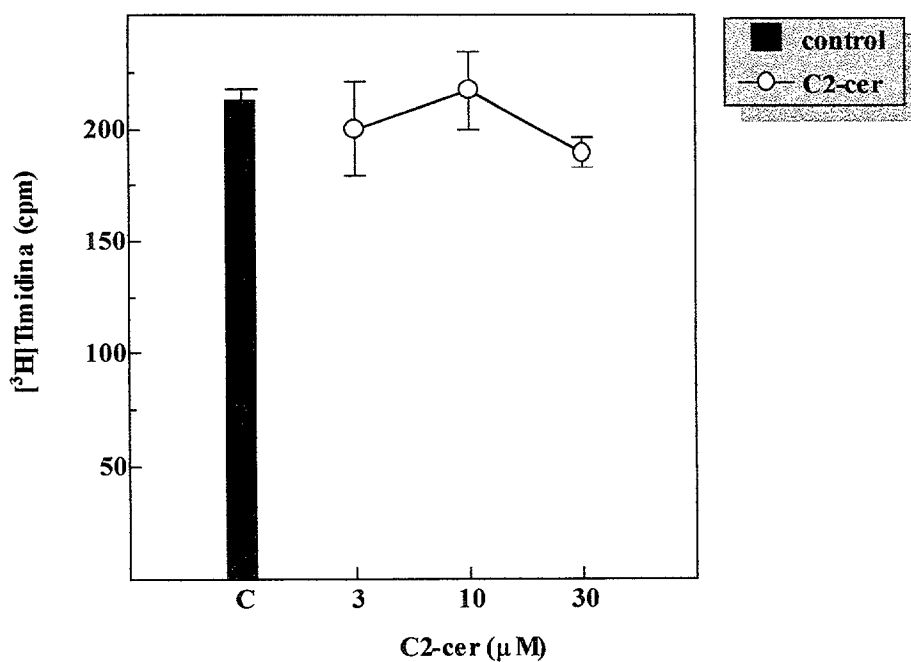
Se utilizaron los tres métodos complementarios descritos en Material y Métodos (ver epígrafe 3.6) para determinar el nivel de apoptosis de las células.

4.5.1 El $\text{TNF}\alpha$ y la ceramida inducen apoptosis, medida por incorporación de bisbencimida, en células U-937 y HL-60

Alícuotas de $0.5 \cdot 10^6$ células U-937 se trataron durante 6 h con Lovastatina (20 μM), $\text{TNF}\alpha$ (30 ng/ml) y C2-ceramida (20 μM) con o sin MVA (20 mM). Las células se fijaron y tificaron con bisbencimida. Para cuantificar el grado de apoptosis se visualizaron las muestras con microscopio de luz fluorescente y se determinó el porcentaje de células en las que los núcleos presentaron las características descritas en Material y Métodos (epígrafe 3.6).

En la **Figura 26** se muestran campos representativos de dos preparaciones de células control y tratadas con $\text{TNF}\alpha$. Señaladas por flechas rojas se indican varias células apoptóticas en las que se observa la formación de cuerpos apoptóticos inducida por el tratamiento con $\text{TNF}\alpha$.

Resultados



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003

Figura 25

La ceramida no afecta a la proliferación de las células Hep-G2. Células Hep-G2 (placas de 24 pocillos al 70% de confluencia) se trataron durante 24h con C2-ceramida a las concentraciones que se indican, en presencia de FBS (10 %). 6 h antes de finalizar el ensayo se añadió 1 μ Ci/ml de [3 H]Timidina. Se lisaron con 1 ml de TCA 10% frío para luego contar la radiactividad asociada a cada muestra como se describe en Material y Métodos. El ensayo se realizó por triplicado. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

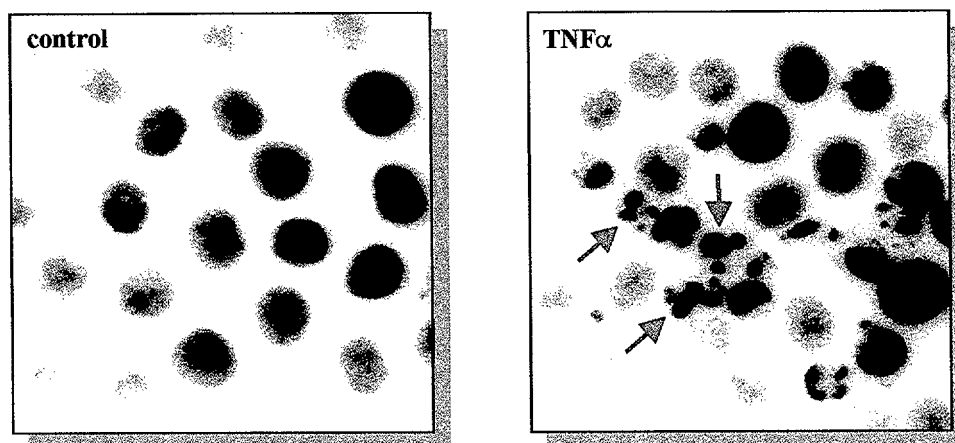


Figura 26

Microscopía de fluorescencia en células U-937 teñidas con bisbencimida. Se trataron $0.5 \cdot 10^6$ células U-937 con y sin $\text{TNF}\alpha$ (30 ng/ml) durante 6 h, se fijaron con 75 μl de paraformaldehído al 3 % y se tiñeron con bisbencimida (16 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como se describe en Material y Métodos. Las fotografías se obtuvieron con un objetivo Plan-NEOFLUAR 63x y en ambas se muestra un campo representativo.

Resultados

En la **Figura 27** se muestra la gráfica del ensayo en su conjunto. Como puede observarse y ha sido ya descrito (Pérez-Sala y Mollinedo, 1994), la Lovastatina (usada como control positivo) produce un aumento de la apoptosis que casi duplica a la basal, efecto que es revertido en su totalidad por el cotratamiento con mevalonato. El TNF α y la ceramida inducen, también, la apoptosis de las células, que se sitúa entre siete y casi tres veces más, respectivamente, de la existente en el control. El cotratamiento con mevalonato revierte el efecto apoptótico debido a la citoquina y a su mensajero hasta en un 50 %.

Alícuotas de $0.5 \cdot 10^6$ células HL-60 se trataron durante 24 h con Lovastatina (10 μ M), TNF α (30 ng/ml) y C2-ceramida (6 μ M) con o sin MVA (20 mM). Después de la fijación, las células se tiñeron con *bisbencimida*, se visualizaron con microscopía fluorescente y se contabilizaron las apoptóticas

Como se muestra en la **Figura 28**, los tres tratamientos inducen un aumento de la apoptosis a las 24 h en torno a 3 veces la basal. El cotratamiento con mevalonato, como en el caso anterior, inhibe drásticamente la apoptosis inducida por Lovastatina, mientras que revierte entre un 50 y un 30 %, la inducida por TNF α y ceramida, respectivamente.

4.5.2 El TNF α y la ceramida no inducen apoptosis, medida por incorporación de bisbencimida, en células Hep-G2

Se crecieron células Hep-G2 en placas de 24 pocillos hasta subconfluencia y entonces se trataron con TNF α (100 ng/ml) y C2-ceramida (30 μ M) durante tiempos crecientes (24-48 h). Tras fijarlas y teñirlas se observaron con microscopía de fluorescencia, contabilizándose las células apoptóticas.

Como se observa en la **Figura 29**, ninguno de los tratamientos a lo largo de los tiempos ensayados condujo a variaciones en la apoptosis celular.

4.5.3 El TNF α y la ceramida inducen apoptosis, medida como fragmentación de DNA, en células U-937

En paralelo al ensayo de *bisbencimida* en U-937 (ver esta misma sección, epígrafe 4.5.1), alícuotas de $1 \cdot 10^6$ células U-937 se trataron, durante 6 h, con Lovastatina (20 μ M), TNF α (30 ng/ml) y C2-ceramida (20 μ M) con y sin MVA (20 mM). A continuación se determinó la fragmentación del DNA como se describe en Material y Métodos (epígrafe 3.6.2).

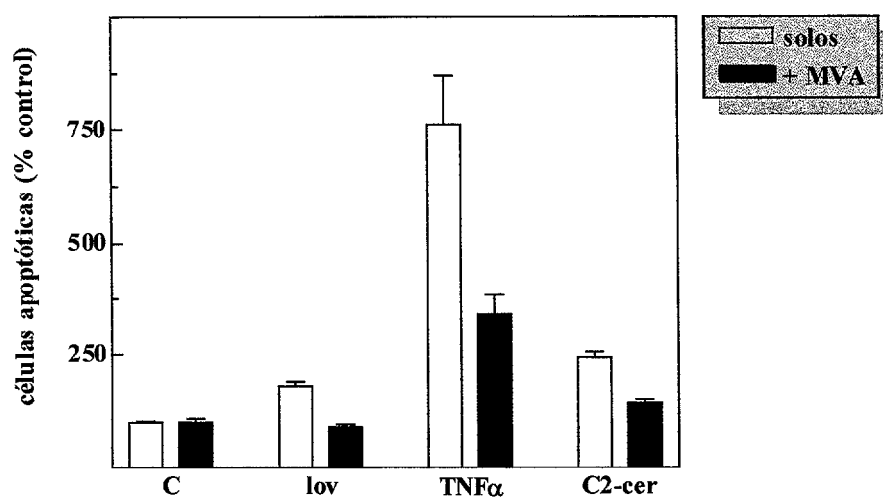


Figura 27

El TNF α y la ceramida inducen apoptosis, medida por incorporación de bisbencimida, en células U-937. Células U-937 ($0.5 \cdot 10^6$ células/tratamiento) se trataron con Lovastatina (20 μ M), TNF α (30 ng/ml) y C2-ceramida (20 μ M) con y sin MVA (20 mM) durante 6 h. Se fijaron con 75 μ l de paraformaldehído al 3 % y se tiñeron con bisbencimida (16 μ g/ml), contabilizándose como se describe en Material y Métodos. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

Resultados

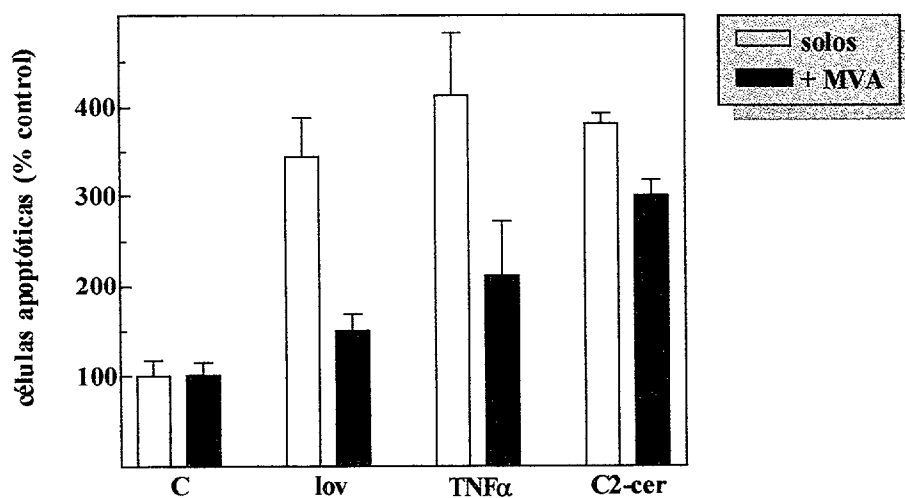


Figura 28

El TNF α y la ceramida inducen apoptosis, medida por incorporación de bisbencimida, en células HL-60. Células HL-60 ($0.5 \cdot 10^6$ células/tratamiento) se trataron con Lovastatina (10 μ M), TNF α (30 ng/ml) y C2-ceramida (6 μ M) con y sin MVA (20 mM) durante 24 h. Se fijaron con 75 μ l de paraformaldehído al 3 % y se tiñeron con bisbencimida (16 μ g/ml), contabilizándose como se describe en Material y Métodos. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

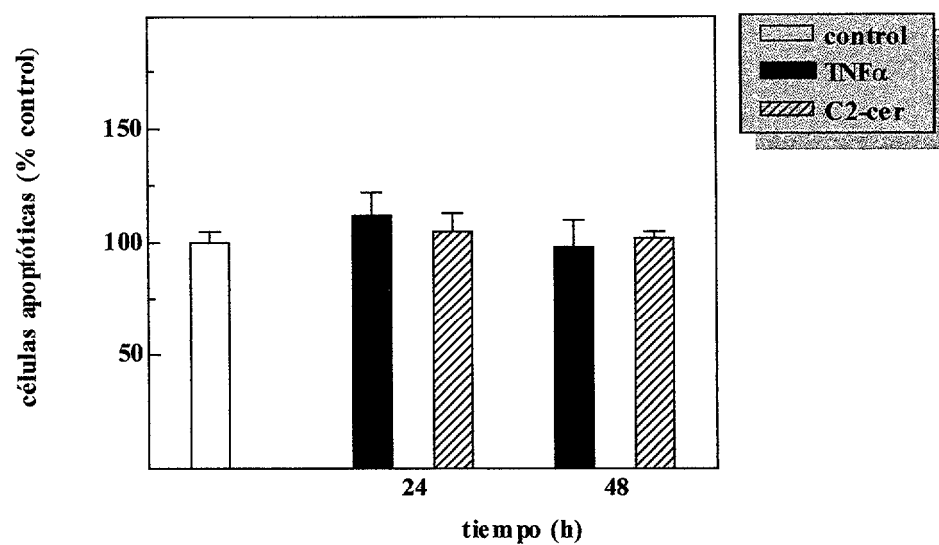


Figura 29

El TNF α y la ceramida no inducen apoptosis, medida por incorporación de bisbencimida, en células Hep-G2. Células Hep-G2 (placas de 24 pocillos a subconfluencia) se trataron con TNF α (100 ng/ml) y C2-ceramida (30 μ M) durante los tiempos indicados. Se fijaron con 75 μ l de paraformaldehído al 3 % y se tiñeron con bisbencimida (16 μ g/ml), contabilizándose como se describe en Material y Métodos. El ensayo se realizó por triplicado. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

Resultados

En la **Figura 30** puede observarse como tanto la Lovastatina como la ceramida y, de forma mucho más acusada, el $\text{TNF}\alpha$, inducen fragmentación del DNA. El cotratamiento con mevalonato revierte en todos los casos la apoptosis.

4.5.4 El $\text{TNF}\alpha$ y la ceramida inducen apoptosis, medida en función de la degradación de lamina B, en células HL-60

En paralelo al ensayo de bisbencimida en HL-60 (ver epígrafe 4.5.1), alícuotas de $5 \cdot 10^6$ células HL-60 se trataron durante 24 h con Lovastatina (10 μM), $\text{TNF}\alpha$ (30 ng/ml), C2-ceramida (6 μM) con y sin mevalonato (20 mM). Se aislaron núcleos, se separaron sus proteínas mediante SDS-PAGE al 10 % de reticulación y se transfirieron a una membrana de NC, inmunodetectándose con un anticuerpo anti-lamina B como se describe en Material y Métodos (epígrafe 3.6.3).

Como se muestra en la **Figura 31**, la Lovastatina, usada como control positivo, induce la degradación de la lamina B, visualizada por la aparición de un fragmento proteolítico de 45 kDa (0.8 unidades de D.O. frente al control no detectable). El efecto es revertido en su totalidad por el cotratamiento con mevalonato. El $\text{TNF}\alpha$ y la ceramida inducen, asimismo, la proteólisis de la lamina B, (0.4 y 2.8 unidades de D.O., respectivamente), siendo revertido el efecto por el cotratamiento con mevalonato en un 58 y 88 %, respectivamente.

4.5.5 El $\text{TNF}\alpha$ y la ceramida no inducen apoptosis, medida en función de la degradación de lamina B, en células Hep-G2

Las células Hep-G2, crecidas a subconfluencia en platos de 60 mm, se trataron durante 24h con Lovastatina (20 μM), $\text{TNF}\alpha$ (100 ng/ml), C2-ceramida (30 μM) con y sin mevalonato (20 mM). Se aislaron núcleos, se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE (10 % de reticulación) y se sometieron las muestras a un proceso de *Western-blot* con un anticuerpo anti-lamina B, como se describe en Material y Métodos (epígrafe 3.6.3).

Como se observa en la **Figura 32**, sólo la Lovastatina produjo un incremento del fragmento proteolítico de la lamina B (aproximadamente 2.5 veces el control) que fue revertido por el cotratamiento con mevalonato. Ningún otro tratamiento produjo cambios significativos en la proteólisis de la lamina B durante las 24 h que duró el ensayo.

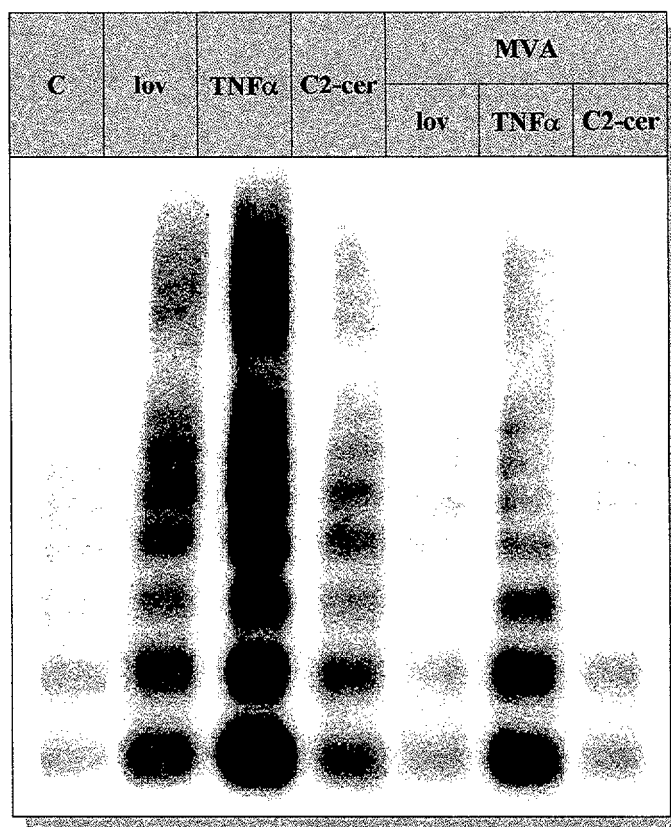
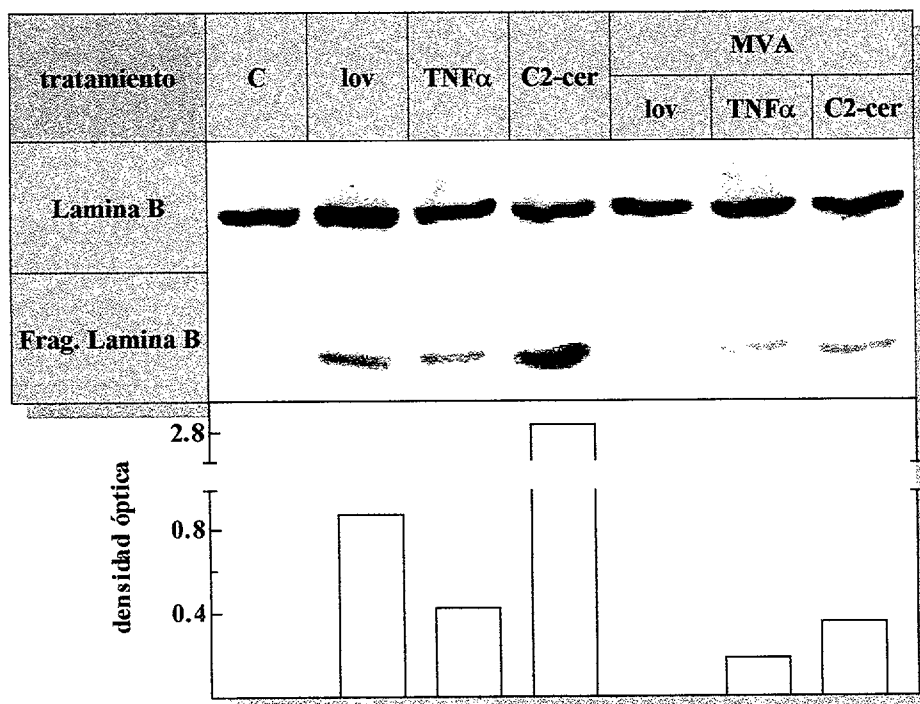


Figura 30

El TNF α y la ceramida inducen apoptosis, medida como fragmentación de DNA, en células U-937. Células U-937 ($1 \cdot 10^6$ células/tratamiento) se trataron con Lovastatina (20 μ M), TNF α (30 ng/ml) y C2-ceramida (20 μ M) con y sin MVA (20 mM) durante 6 h.. Se extrajo el DNA de bajo peso molecular que se marcó con Dig-11-dUTP, separándose los fragmentos mediante electroforesis y visualizándose como se describe en Material y Métodos. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

Resultados



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003

Figura 31

El TNFα y la ceramida inducen apoptosis, medida en función de la degradación de lamina B, en células HL60. Células HL60 ($5 \cdot 10^6$ /tratamiento) se trataron durante 24h con Lovastatina (10 μM), TNFα (30 ng/ml), C2-ceramida (6 μM) con y sin MVA (20 mM). Se aislaron núcleos, se lisaron y se separaron las proteínas en gel de poliacrilamida al 10%. Se transfirieron a membranas de NC y se inmunodetectaron como se describe en Material y Métodos. En el panel inferior se muestra la cuantificación de las bandas correspondientes al fragmento proteolítico. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

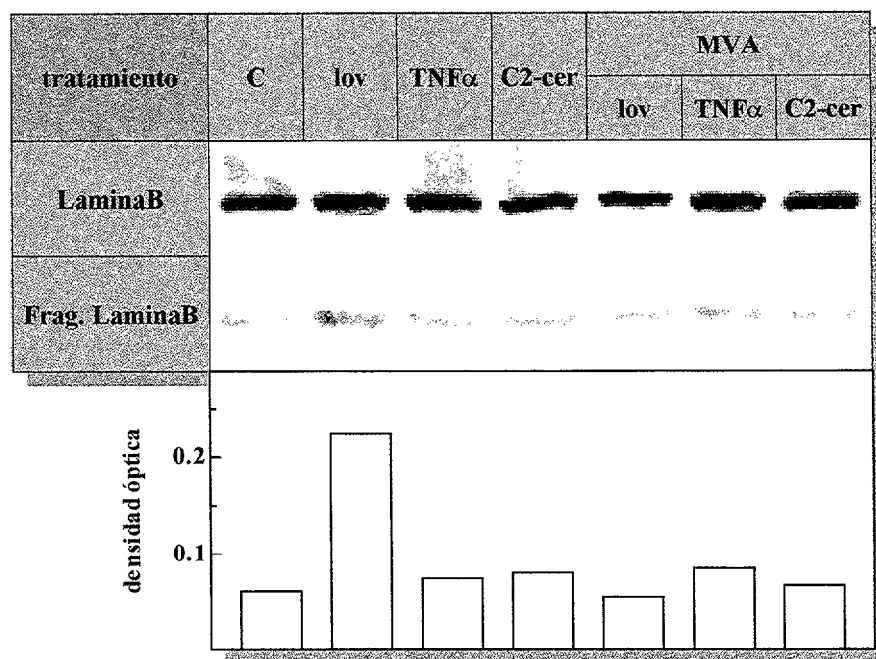


Figura 32

El TNF α y la ceramida no inducen apoptosis , medida en función de la degradación de lamina B, en células Hep-G2. Células Hep-G2 (platos de 60 mm al 75% de confluencia/tratamiento) se trataron durante 24h con Lovastatina (20 μ M), TNF α (100 ng/ml), C2-ceramida (30 μ M) con y sin MVA (20 mM). Se aislaron núcleos, se lisaron y se separaron las proteínas en gel de poliacrilamida al 10%. Se transfirieron a membranas de NC y se inmunodetectaron como se describe en Material y Métodos. En el panel inferior se muestra la cuantificación de las bandas correspondientes al fragmento proteolítico. Se muestra un experimento representativo de al menos otros tres.

Discusión

Discusión

En este trabajo hemos mostrado que el TNF α y su mensajero intracelular, la ceramida, son capaces de inhibir la actividad de la HMG-CoA reductasa, el enzima limitante de la síntesis de colesterol, en células de las líneas tumorales monocíticas HL-60 y U-937. Por el contrario, el TNF α y la ceramida aumentan la actividad de la HMG-CoA reductasa en células de hepatoma humano Hep-G2 y en células foliculares tiroideas FRTL-5.

En la cascada de eventos que sigue a la elevación de los niveles intracelulares de ceramida, se encuentra la activación de proteína quinasas como la CAPK (Mathias *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1994) y la MAP quinasa (Verheij *et al.*, 1996). Es por ello que no se puede eliminar la posibilidad de que el TNF α y la ceramida estén inhibiendo la actividad de la HMG-CoA reductasa, en células HL-60 y U-937, como resultado de un aumento en la degradación y/o inactivación del enzima además de, como hemos demostrado, inhibiendo la síntesis del mismo. Adicionalmente, la existencia de fosfatasa dependientes de ceramida (CAPP) (Dobrowsky y Hannun, 1992; Dobrowsky *et al.*, 1992) permite aventurar la posibilidad de que la ceramida (y el TNF α), disminuyendo el grado de fosforilación del enzima, varíen su nivel de activación y/o actúen disminuyendo las posibilidades de degradación de la HMG-CoA reductasa.

Sin embargo, la metodología utilizada sugiere que mayoritariamente los efectos del TNF α ocurren a nivel transcripcional. Los ensayos con células tumorales monocíticas se realizaron en ausencia de suero, es decir, con privación del suministro exógeno de colesterol, y con la síntesis endógena de colesterol bloqueada con Lovastatina, condiciones en las que la transcripción del enzima está máximamente activada y en las que, por tanto, cualquier efecto sobre la actividad observado refleja la existencia de cambios en la expresión del gen independientes de colesterol. En cuanto a los ensayos con células de hepatoma y células tiroideas, los aumentos en la actividad del enzima solo pueden atribuirse a aumentos en la expresión independientes de colesterol, puesto que los ensayos se realizaron en presencia de suero y con cambios en los niveles de expresión del receptor de las LDL paralelos a los de la HMG-CoA reductasa.

Creemos por ello que no es aventurado afirmar que los cambios en la expresión de la HMG-CoA reductasa inducidos por el TNF α y la ceramida no pueden atribuirse a modificaciones producidas por la ceramida en los niveles de captación y/o síntesis endógena de colesterol, ni en el caso de la inhibición observada en las células HL-60 y U-937, ni en el aumento de la actividad medida en las células Hep-G2 y FRTL-5.

Como hemos descrito en la introducción de este trabajo, la transcripción de la HMG-CoA reductasa se inicia al unirse el producto de la ruptura proteolítica de la SREBP, en respuesta al descenso de los niveles de colesterol libre intracelular, a secuencias SRE específicas en el promotor del gen (Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*,

Discusión

1993, 1996a y 1996b; Wang *et al.* 1994) (ver **Figura 7**). La más obvia de las hipótesis sobre el mecanismo por el que el TNF α y la ceramida inhibirían la transcripción sin modificar los niveles de colesterol, implica la posibilidad de que inhiban la proteólisis secuencial de SREBP, que libera el fragmento de 68 kDa transcripcionalmente activo (Hua *et al.*, 1996b; Wang *et al.*, 1994).

Sin embargo, en células de hepatoma HH-25, el TNF α , y la SMasa activan la maduración del SREBP (Lawler *et al.*, 1998), posiblemente a través de la activación de la CPP32 (caspasa 3), una cisteína proteasa que a su vez puede ser activada por el TNF α y la ceramida (Beyaert *et al.*, 1997; Wissing *et al.*, 1997; Jaeschke *et al.*, 1998; Juo *et al.*, 1998; Sidoti-de Fraisse *et al.*, 1998; Yamashita *et al.*, 1999) y uno de cuyos sustratos es la SREBP (Pai *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996).

Los efectos del TNF α y la ceramida en células HH-25 no son sorprendentes, a la luz del hecho ampliamente conocido del papel del TNF α como importante mediador del proceso de regeneración hepática (Michalopoulos y DeFrances, 1997; Brenner, 1998; Takehara *et al.*, 1998). La inhibición de la producción de TNF α con E3330 o la delección de su receptor, impiden la regeneración hepática después de la hepatectomía parcial (Kimura *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 1997). Por otro lado, el TNF α previene o repara el daño hepático producido por el tetracloruro de carbono o el etanol (Akerman *et al.*, 1992 y 1993; Czaja *et al.*, 1995).

Al contrario que en otros tipos celulares, el TNF α aumenta la síntesis de DNA en hepatocitos (Sato y Yamazaki, 1992 y 1993) y también la incorporación de timidina y la síntesis de DNA en células FRTL-5.

En conjunto, las anteriores observaciones apoyan nuestros resultados que muestran como el TNF α y la ceramida estimulan la expresión de la HMG-CoA reductasa en células de hepatoma Hep-G2 y de folículos tiroideos FRTL-5 y no inducen apoptosis ni cambios en la viabilidad en estas células. Sin embargo, y aunque es fácil aceptar que los mecanismos de transducción de un determinado agonista varían de acuerdo con sus efectos biológicos en cada tipo celular, la posibilidad de que el TNF α inhiba la expresión de la HMG-CoA reductasa en células HL-60 y U-937, impidiendo la maduración del SREBP, parece, a la luz de lo anteriormente descrito, muy poco probable.

Como hipótesis alternativa para descifrar el mecanismo por el que la citoquina inhibe la expresión de la HMG-CoA reductasa, propondríamos que el TNF α y la ceramida aceleran la degradación de la forma madura de la SREBP. El fragmento NH₂ terminal de la SREBP, que constituye la forma madura de la proteína, posee una vida media muy corta, lo que se atribuye a la existencia de degradación por una cisteína proteasa neutral semejante a la calpaína-I (Hiwasa *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1994). Esta posibilidad constituye sin duda una hipótesis que merece ser explorada en el futuro.

La disminución de la disponibilidad de mevalonato se traduce para la célula en un déficit de dos productos, el colesterol y los isoprenoides, imprescindibles para el crecimiento y la proliferación celular (Chen *et al.*, 1974; Brown y Goldstein, 1974; Maltese, 1990; Jakobisiak *et al.*, 1991). Además de producir defectos en el ritmo de crecimiento y proliferación, la inhibición de la síntesis de mevalonato es suficiente para iniciar el proceso apoptótico (Jones *et al.*, 1994; Reedquist *et al.*, 1995; Srikant, 1995; Iimura *et al.*, 1997; Padayatty *et al.*, 1997; Guijarro *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1998; Stark *et al.*, 1998). En células HL-60, la caída de los niveles de isoprenoides que se produce al inhibir la HMG-CoA reductasa con Lovastatina también induce apoptosis, que puede revertirse parcialmente con mevalonato (Pérez-Sala y Mollinedo, 1994).

La inhibición de la proliferación celular es uno de los efectos biológicos más característicos del TNF α (Beutler *et al.*, 1985c). A pesar de que este efecto fue inicialmente atribuido a la capacidad del TNF α para producir necrosis celular (y sirvió para nominar a la citoquina (Carswell *et al.*, 1975; Helson *et al.*, 1975; Aggarwal *et al.*, 1985)), como se ha probado posteriormente, el TNF α induce apoptosis y no necrosis en la mayoría de los tipos celulares (Larrick y Wright, 1990; Goldstein *et al.*, 1991; Baker y Reddy, 1996; Pfizenmaier *et al.*, 1996; Ware *et al.*, 1996; Pan *et al.*, 1997; Yuan, 1997; Wallach *et al.*, 1997; Wyllie, 1997; Meldrum, 1998; Natoli *et al.*, 1998). La ceramida tiene la misma capacidad inductora de apoptosis que el TNF α , por lo que se asume que éste sería uno de los efectos del péptido que es mediado parcial o totalmente por la vía de la esfingomielina (Obeid *et al.*, 1993; Jarvis *et al.*, 1994b; Hannun y Obeid 1995).

Nuestros resultados muestran que la apoptosis inducida por el TNF α y la ceramida en las células HL-60 y U-937 puede prevenirse parcialmente con la reposición de mevalonato, lo que sugiere que la inhibición de la actividad de la HMG-CoA reductasa es parte del mecanismo por el que la citoquina y su mensajero intracelular inducen el proceso apoptótico.

Acerca de la naturaleza de los mecanismos por los que la inhibición de la HMG-CoA reductasa resulta en la muerte de la célula por apoptosis podemos únicamente establecer hipótesis.

La apoptosis es un proceso biológico fundamental para el mantenimiento de la integridad y la homeostasis de los organismos multicelulares (Raff, 1992; Williams *et al.*, 1992; Collins y López Rivas, 1993). La desactivación de procesos homeostáticos y de reparación, críticos para la supervivencia de las células, unida a la desorganización de componentes estructurales fundamentales, produce el desensamblaje sistemático y ordenado de la célula y da lugar a la aparición de los cambios funcionales y morfológicos que caracterizan la muerte celular por apoptosis (Martin *et al.*, 1994; Stewart, 1994; Cotter y Al-Rubeai, 1995) (ver **Figura 33**).

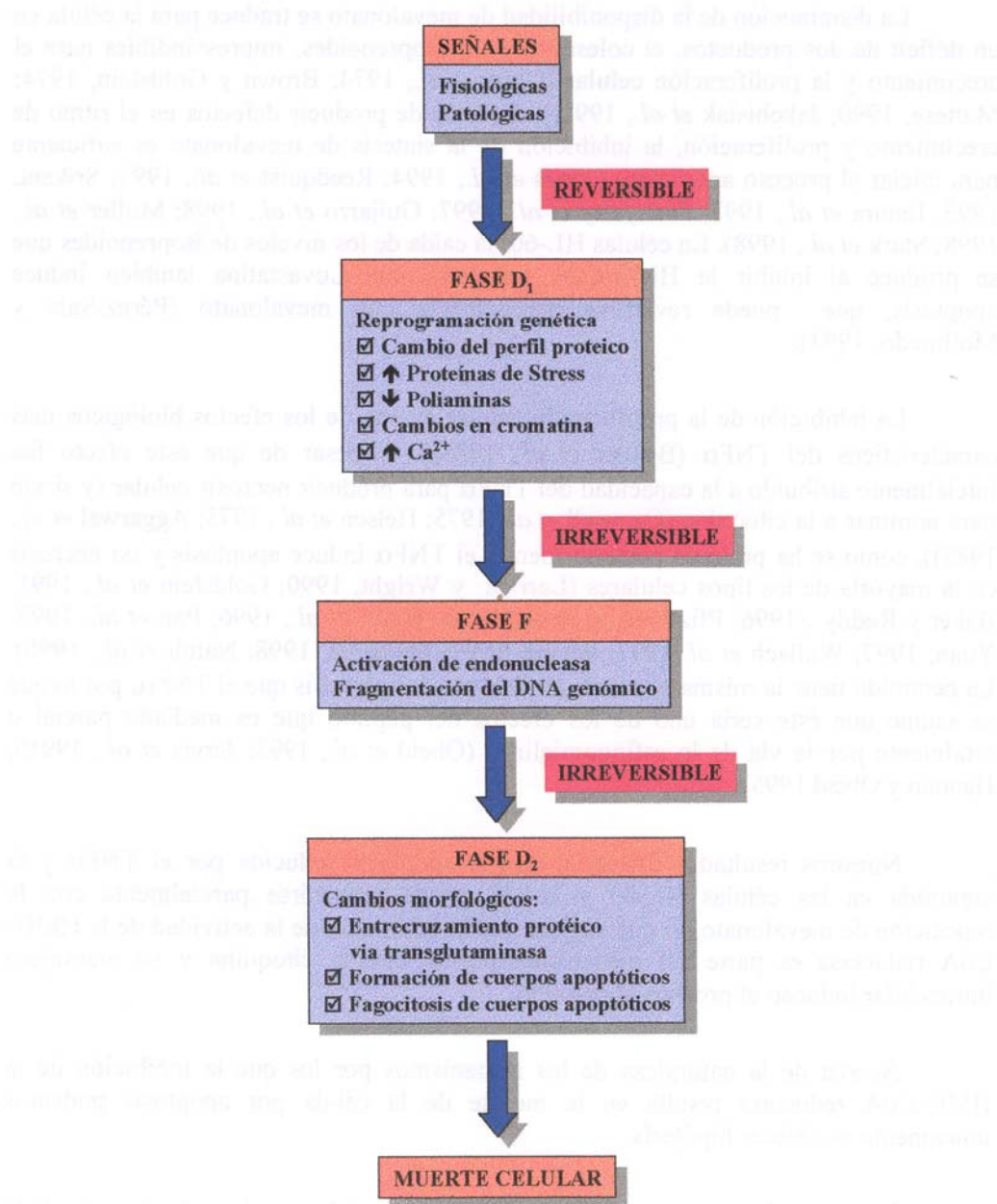


Figura 33

Esquema de las distintas fases de la apoptosis celular

Se asume que el déficit en los niveles normales de apoptosis resulta en la aparición de cáncer o enfermedades autoinmunes y, por el contrario, una aceleración del ritmo al que la apoptosis ocurre podría dar lugar a enfermedades degenerativas (Williams, 1991; Raff *et al.*, 1993; Cotter y McCarthy, 1994; Abbas, 1996). Por estas razones, el interés y los recursos dedicados al estudio de los mecanismos moleculares de la apoptosis ha aumentado de forma considerable en los pasados años. Sin embargo, se conocen aún de forma imperfecta tanto los protagonistas como las interacciones entre los mismos que dan lugar a las complejas redes de señalización que concluyen con la activación, en respuesta a estímulos apoptóticos, de las caspasas, las moléculas ejecutoras de la apoptosis (Thornberry y Lazebnik, 1998).

Las caspasas (*caspases: cysteinyl aspartate-specific proteinases*), una familia de proteasas de mamíferos cuyos genes son homólogos del CED-3 (*cell death abnormal*) del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Osborne y Schwartz, 1994), tienen una actividad proteolítica de alta afinidad y muy específica para un grupo discreto de proteínas que exhiben la secuencia de reconocimiento mínima AspXXAsp, y de cuya inactivación se deriva la ejecución de la muerte por apoptosis (Martin y Green, 1995). La especificidad de las caspasas está muy conservada en todos los organismos eucariotas, lo que es sugerente del papel principal que desempeñan en el proceso apoptótico (Thornberry y Lazebnik, 1998).

Las diez caspasas identificadas en el hombre hasta el momento han sido recientemente clasificadas, en función de sus relaciones estructurales, en dos subfamilias: *i*) las caspasas relacionadas con ICE (*Interleukin-1 β converting enzyme*) o ICErel, que incluyen las caspasas 1, 4 y 5 (ICE, ICErel-II e ICErel-III); y *ii*) las caspasas homólogas de CED-3, que comprenden las caspasas 2-3 y 6-10, (Alnemri *et al.*, 1996).

Atendiendo a su función, las caspasas pueden también distribuirse en tres grupos: *i*) caspasas no relacionadas con la apoptosis, con funciones estrictamente inflamatorias, que incluye a las relacionadas con ICE; *ii*) las caspasas efectoras, entre las que se encuentran las caspasas 3, 6, 7 y posiblemente la 2; y *iii*) las denominadas caspasas iniciadoras, entre las que se encuentran las caspasas 8, 9 y 10, que funcionan como acopladoras entre las señales proapoptóticas y la activación de las caspasas efectoras.

La decisión de entrar en apoptosis es la más irreversible de cuantas puede tomar una célula, y en correlación con el carácter de la función que deben realizar las caspasas inactivan a sus sustratos por proteólisis, el mecanismo de modificación postraducciona l más irreversible de cuantos se conocen. Entre los más de 40 sustratos identificados hasta el momento que son definitiva y terminalmente inactivados por las caspasas, se encuentran proteínas citoplasmáticas como la fosfolipasa A₂, la PAK₂ (*p21-activated kinase*), la PKC δ o la actina; y nucleares como la PARP (*poly(ADP-ribose) polymerase*), la proteína del retinoblastoma, las SREBPs o las laminas, todas

Discusión

ellas fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis, la estructura o los procesos de reparación celular (Nicholson y Thornberry, 1997).

La gran especificidad que, como proteasas, exhiben las caspasas depende de la existencia de secuencias de reconocimiento muy características en la proteína sustrato. La molécula de las caspasas contiene al menos dos de estas secuencias, una en el N y otra en el C terminal, lo que confiere a las caspasas el carácter de sustrato para otras caspasas y/o para ser autocatalizadas. La ruptura proteolítica de las caspasas produce un fragmento N terminal libre y dos fragmentos de tamaño diferente que se asocian formando heterodímeros que contienen el centro activo y tienen actividad catalítica, es decir, son las formas activas del enzima (Villa *et al.*, 1997) (ver **Figura 34**).

Las caspasas ejecutoras (3, 6 y 7) se activan en cascada por otras caspasas (las caspasas iniciadoras 2 y 8), a su vez activadas por proteólisis que sigue a su asociación al receptor de TNF α a través de las proteínas acopladas a su *death domain* (Cleveland e Ihle, 1995; Hsu *et al.*, 1995; Muzio *et al.*, 1996)

La ceramida activa las caspasas 3 (CCP32/apopafina) y 6 (Mch2) (Miszushima *et al.*, 1996; Smyth *et al.*, 1996; Tepper *et al.*, 1997; Cuvillier *et al.*, 1998), entre cuyos sustratos se encuentran la PARP, implicada en la reparación del DNA (Tewari *et al.*, 1995) y las laminas nucleares (Lazebnik *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1996; Orth *et al.*, 1996), cuya ruptura provoca la desorganización de la membrana nuclear, uno de los acontecimientos característicos de la apoptosis (Oberhammer *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 1996).

Entre los mecanismos por los que la ceramida (y el TNF α) induce apoptosis se encontraría, por tanto, la destrucción de la membrana del núcleo como consecuencia de la proteólisis de las moléculas de las laminas nucleares (Cuvillier *et al.*, 1998). La pérdida de compartimentalización de una DNasa similar a la DNasa tipo I, que alcanzaría el núcleo al desorganizarse la membrana, se ha propuesto como mecanismo responsable de la fragmentación del DNA característica de la muerte por apoptosis (Gerschenson y Rotello, 1992; Peitsch *et al.*, 1993).

Además de por la proteólisis de las moléculas de lamina que la forman, y que hemos demostrado que ocurre para la lamina B en células HL-60, la membrana nuclear podría resultar dañada como consecuencia de defectos en la maduración de las laminas, proceso en el que la isoprenilación constituye un paso capital (Beck *et al.*, 1988; Wolda y Glomset, 1988; Vorbürger *et al.*, 1989; Beck *et al.*, 1990; Kitten y Nigg, 1991). En consecuencia, la perturbación en la maduración de las laminas A y B, conduciría a la aparición de fragmentación del DNA y apoptosis. En efecto, la inhibición de la HMG-CoA reductasa con Lovastatina produce maduración incompleta de las laminas, fragmentación intranucleosomal del DNA y apoptosis en células HL-60 (Pérez-Sala y Mollinedo, 1994). Por ello, y teniendo en cuenta que, como hemos

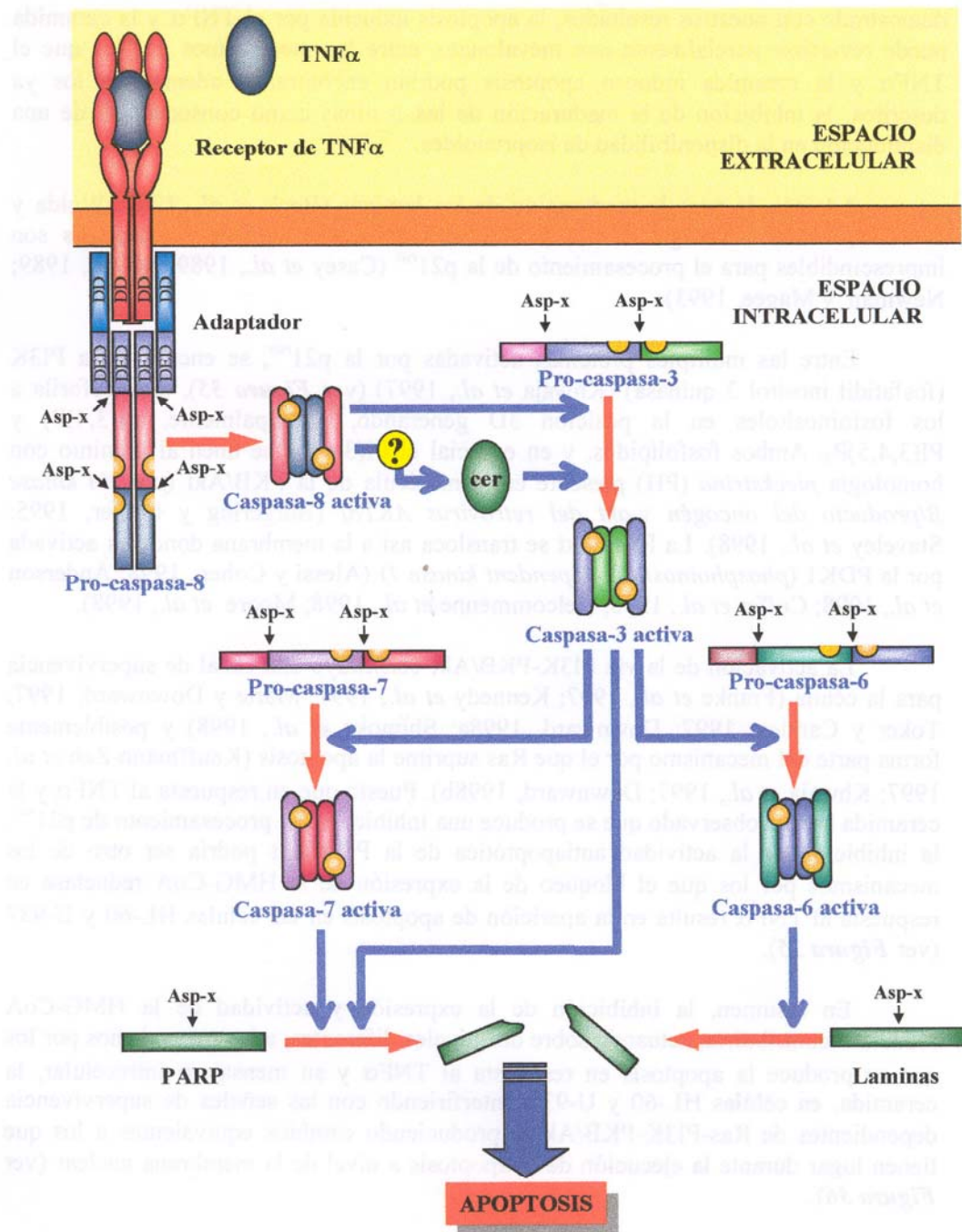


Figura 34

Esquema de la activación de las caspasas que sigue a la unión del $\text{TNF}\alpha$ a su receptor

Discusión

demostrado con nuestros resultados, la apoptosis inducida por el TNF α y la ceramida puede revertirse parcialmente con mevalonato, entre los mecanismos por los que el TNF α y la ceramida inducen apoptosis podrían encontrarse, además de los ya descritos, la inhibición de la maduración de las laminas como consecuencia de una disminución en la disponibilidad de isoprenoides.

Además de para la maduración de las laminas (Beck *et al.*, 1988; Wolda y Glomset, 1988; Vorburger *et al.*, 1989; Beck *et al.*, 1990), los isoprenoides son imprescindibles para el procesamiento de la p21^{ras} (Casey *et al.*, 1989; Magee, 1989; Newman y Magee, 1993).

Entre las múltiples proteínas activadas por la p21^{ras}, se encuentra la PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa) (Khwaja *et al.*, 1997) (ver **Figura 35**), que fosforila a los fosfoinosítoles en la posición 3D generando, principalmente, PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃. Ambos fosfolípidos, y en especial el PI(3,4)P₂, se unen al dominio con homología *pleckstrina* (PH) presente en la molécula de la PKB/Akt (*protein kinase B/producto del oncogén v-akt del retrovirus AKT8*) (Burgering y Coffey, 1995; Staveley *et al.*, 1998). La PKB/Akt se transloca así a la membrana donde es activada por la PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) (Alessi y Cohen, 1998; Anderson *et al.*, 1998; Coffey *et al.*, 1998; Delcommenne *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1998).

La activación de la vía PI3K-PKB/Akt constituye una señal de supervivencia para la célula (Franke *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 1997; Marte y Downward, 1997; Toker y Cantley, 1997; Downward, 1998a; Shimoke *et al.*, 1998) y posiblemente forma parte del mecanismo por el que Ras suprime la apoptosis (Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997; Khwaja *et al.*, 1997; Downward, 1998b). Puesto que en respuesta al TNF α y la ceramida hemos observado que se produce una inhibición del procesamiento de p21^{ras}, la inhibición de la actividad antiapoptótica de la PKB/Akt podría ser otro de los mecanismos por los que el bloqueo de la expresión de la HMG-CoA reductasa en respuesta al TNF α resulta en la aparición de apoptosis en las células HL-60 y U-937 (ver **Figura 35**).

En resumen, la inhibición de la expresión y actividad de la HMG-CoA reductasa contribuiría, actuando sobre dos niveles diferentes, a los mecanismos por los que se produce la apoptosis en respuesta al TNF α y su mensajero intracelular, la ceramida, en células HL-60 y U-937: interfiriendo con las señales de supervivencia dependientes de Ras-PI3K-PKB/Akt y produciendo cambios equivalentes a los que tienen lugar durante la ejecución de la apoptosis a nivel de la membrana nuclear (ver **Figura 36**).

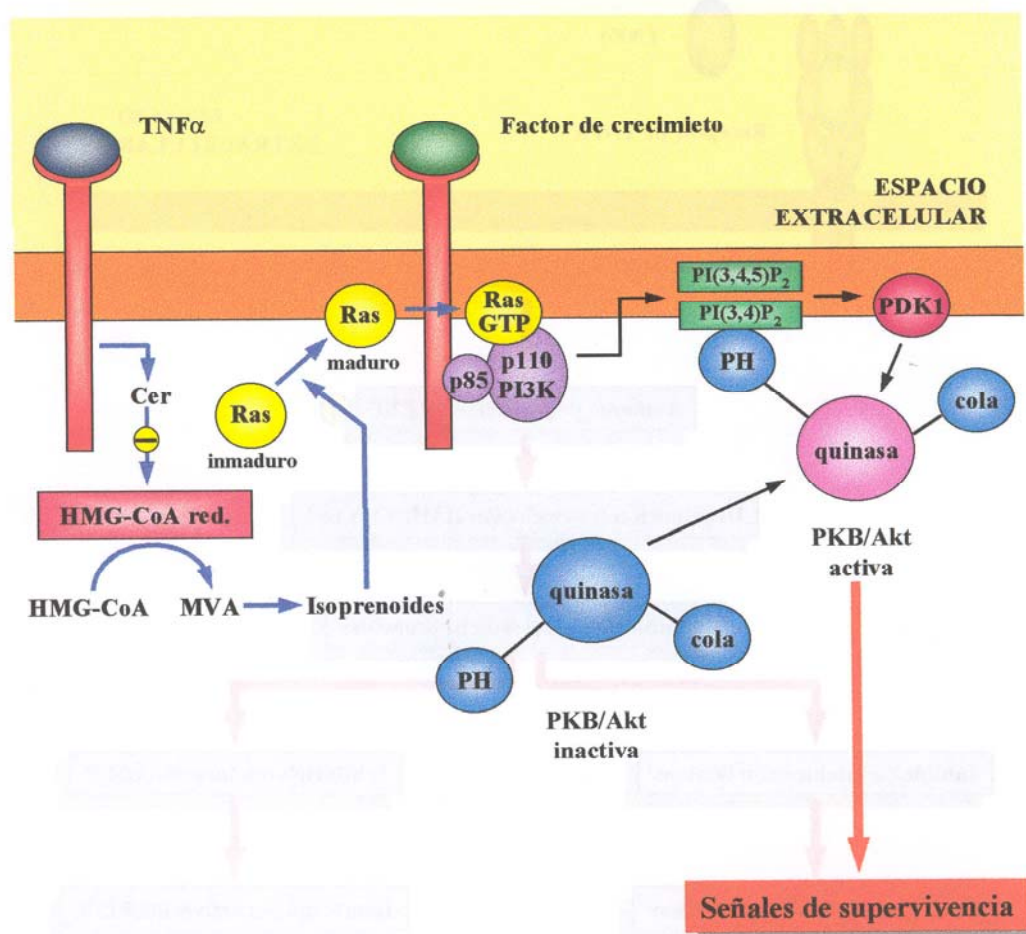


Figura 35

Esquema de la activación de PKB/Akt y su hipotética relación con la HMG-CoA reductasa

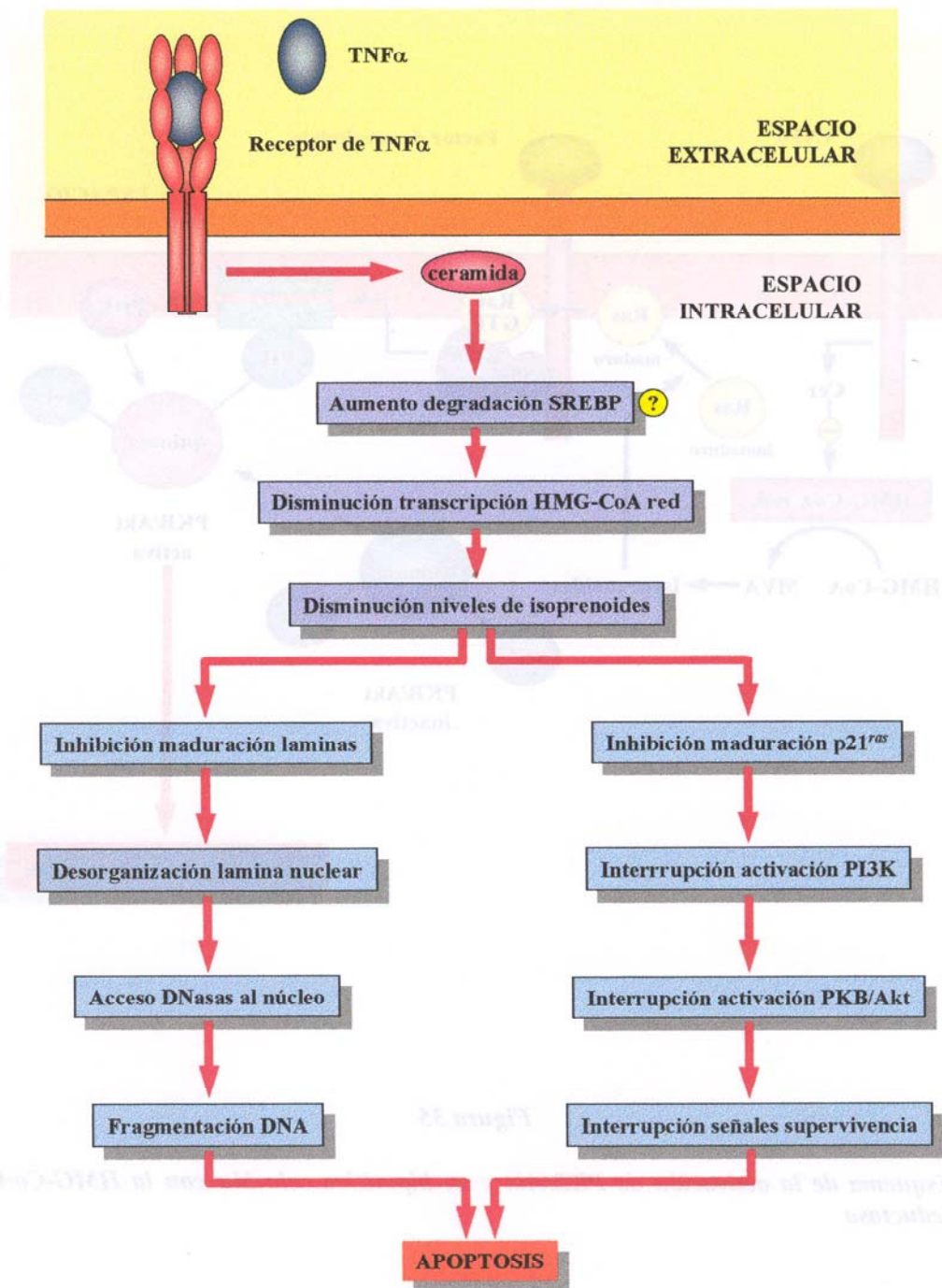


Figura 36
Papel de la HMG-CoA reductasa en los mecanismos de la apoptosis inducidos por el TNFα

Conclusiones

Conclusiones

1. El $\text{TNF}\alpha$ y su mensajero intracelular, la ceramida, inhiben la expresión y la actividad de la HMG-CoA reductasa en células U-937 y HL-60.
2. El $\text{TNF}\alpha$ y su mensajero intracelular, la ceramida, inducen la expresión y la actividad de la HMG-CoA reductasa en células Hep-G2 y FRTL-5.
3. El mevalonato revierte la inhibición de la maduración de p21^{ras} inducida por el $\text{TNF}\alpha$ y la ceramida en células HL-60.
4. El mevalonato revierte parcialmente la apoptosis inducida por el $\text{TNF}\alpha$ y la ceramida en células U-937 y HL-60.



Bibliografía

Bibliografía

Abbas AK (1996) Die and let live: eliminating dangerous lymphocytes *Cell* **84**: 655-657.

Adam D, Wiegmann K, Adam-Klages S, Ruff A, Krönke M (1996) A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *J Biol Chem* **271**: 14617-14622.

Adam-Klages S, Adam D, Wiegmann K, Struve S, Kolanus W, Schneider-Mergener J, Krönke M (1996) FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* **86**: 937-947.

Aderka D, Holtmann H, Toker L, Hahn T, Wallach D (1986) Tumor necrosis factor induction by Sendai virus. *J Immunol* **136**: 2938-2942.

Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN (1985) Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization. *J Biol Chem* **260**: 2345-2354

Aggarwal BB, Moffat B, Harkins RN (1984) Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J Biol Chem* **259**: 686-691.

Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, Diehl AM (1993) Long-term ethanol consumption alters the hepatic response to the regenerative effects of tumor necrosis factor- α . *Hepatology* **17**: 1066-1073.

Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, Diehl AM (1992) Antibodies to tumor necrosis factor- α inhibit liver regeneration after partial hepatectomy *Am J Physiol* **263** (4 Pt 1): G579-585.

Alessi DR, Cohen P (1998) Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 55-62.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**: 171, letter to the Editor.

Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR, Hawkins PT (1998) Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol* **8**: 684-691.

Anderson RGW, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW (1992) Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* **255**: 410-411.

Bibliografía

- Arends MJ, Morris RG, Willy AH** (1990) Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol* **136**: 593-608.
- Baeuerle PA, Baltimore D** (1988a) Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmatic precursor of the NF- κ B transcription factor. *Cell* **53**: 211-217.
- Baeuerle PA, Baltimore D** (1988b) I- κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* **242**: 540-546.
- Bajjalieh SM, Martin TFJ, Floor E** (1989) Synaptic vesicle ceramide kinase. *J Biol Chem* **264**: 14354-14360.
- Baker SJ, Reddy EP** (1996) Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* **12**: 1-9.
- Barbacid M** (1987) ras genes. *Annu Rev Biochem* **56**: 779-827.
- Barbara JA, Smith WB, Gamble JR, Van Ostade X, Vandenabeele P, Tavernier J, Fiers W, Vadas MA, Lopez AF** (1994) Dissociation of TNF- α cytotoxic and proinflammatory activities by p55 receptor and p75 receptor-selective TNF- α mutants. *Embo J* **13**: 843-50.
- Beck LA, Hosick TJ, Sinensky M** (1988) Incorporation of a product of mevalonic acid metabolism into proteins of Chinese hamster ovary cell nuclei. *J Cell Biol* **107**: 1307-1316.
- Beck LA, Hosick TJ, Sinensky M** (1990) Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor. *J Cell Biol* **110**: 1489-1499.
- Beg ZH, Stonick JA, Brewer HB Jr** (1984a) Human hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: evidence for the regulation of enzymic activity by a bycyclic phosphorylation cascade. *Biochem Biophys Res Commun* **119**: 488-498.
- Beg ZH, Stonick JA, Brewer HB Jr** (1984b) In vivo modulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, reductase kinase, and reductase kinase kinase by mevalonolactone. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7293-7297.
- Berra E, Diaz-Meco MT, Dominguez I, Municio MM, Sanz L, Lozano J, Chapkin RS, Moscat J** (1993) Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell* **74**: 555-563.
- Betts J, Agranoff AB, Nabel GJ, Shayman JA** (1994) Dissociation of endogenous cellular ceramide from NF- κ B activation. *J Biol Chem* **269**: 8455-8458.

- Beutler B, Cerami A** (1988) Tumor necrosis factor, cachexia, shock and inflammation: a common mediator. *Ann Rev Biochem* **57**: 505-518.
- Beutler B, Greenwald D, Hulmes JL, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch, Cerami A** (1985b) Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* **316**: 552-554.
- Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A** (1985a) Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* **161**: 984-995.
- Beutler B, Milsark I W, Cerami A** (1985c) Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution and metabolic fate in vivo. *J Immunol* **135**: 3972-3977.
- Beutler B, Tkacenko V, Milsark I, Kronchi N, Cerami A** (1986) Effect of gamma interferon on cachectin expression by mononuclear phagocytes. Reversal of the Ipsi (endotoxin resistance) phenotype. *J Exp Med* **164**: 1791- 1796.
- Beyaert R, Kidd VJ, Cornelis S, Van de Craen M, Denecker G, Lahti JM, Gururajan R, Vandenabeele P, Fiers W** (1997) Cleavage of PISTLRE kinases by ICE/CASP-1 and CPP32/CASP-3 during apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* **272**: 11694-11697.
- Beytia ED, Porter JW** (1976) Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis. *Ann Rev Biochem* **45**: 113-142.
- Bigda J, Beletsky I, Brakebusch C, Varfolomeev Y, Engelmann H, Bigda J, Holtmann H, Wallach D** (1994) Dual role of the p75 tumor necrosis factor (TNF) receptor in TNF cytotoxicity. *J Exp Med* **180**: 445- 460.
- Billah MM, Anthes JC** (1990) The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem J* **269**: 281-291.
- Bjornberg F, Lantz M, Olsson I, Gullberg U** (1994) Mechanisms involved in the processing of the p55 and the p75 tumor necrosis factor (TNF) receptors to soluble receptor form. *Lymphokine Cytokine Res* **13**: 203-211.
- Blank V, Kourilsky P, Israël A** (1992) NF- κ B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem Sci* **242**: 135-140.
- Bloch K** (1965) The biological synthesis of cholesterol. *Science* **150**: 19-28.

Bibliografía

Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto A, Fuks Z, Kolesnick RN (1995) Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* **82**: 405-414.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254 .

Bradfute DL, Simoni RD (1994) Non-sterol compounds that regulate cholesterologenesis. Analogues of farnesyl pyrophosphate reduce 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase levels. *J Biol Chem* **269**: 6645-6650.

Brenner DA (1998) Signal transduction during liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* **13** Suppl: S93-95.

Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M (1989) Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* **337**: 661-663.

Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL (1993) Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem* **268**: 14490-14496.

Brown MS, Goldstein JL (1974) Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J Biol Chem* **249**: 7306-7314.

Brown MS, Goldstein JL (1980) Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res* **21**: 505-517.

Brown MS, Goldstein JL (1983) Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Review Biochem* **52**: 223-261.

Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**: 34-47.

Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**: 331-340.

Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL (1981) Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* **212**: 628-635.

Burgering BMTh, Coffe PJ (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* **376**: 599-602.

Buss JE, Sefton BW (1986) Direct identification of palmitic acid as the lipid attached to p21ras. *Mol Cell Biol* **6**: 116-122.

Buss JE, Solski PA, Schaeffer JR, MacDonald MJ, Der CJ (1989) Activation of the cellular protooncogene product p21 ras by addition of a myristylation signal. *Science* **243**: 1600-1603.

Cannistra SA, Rambaldi A, Spriggs DR, Herrmann F, Kufe D AND Griffin JD (1987) Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces expression of the tumor necrosis factor gene by the U937 cell line and by normal human monocytes. *J Clin Invest* **79**: 1720-1728.

Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer AND Cerami A (1986) Identification of common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:1670-1674.

Carpenter A, Evans TJ, Buurman WA, Bemelmans MH, Moyes D, Cohen J (1995) Differences in the shedding of soluble TNF receptors between endotoxin-sensitive and endotoxin-resistant mice in response to lipopolysaccharide or live bacterial challenge. *J Immunol* **155**: 2005-2012.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 3666-3670.

Casey PJ, Seabra MC (1996) Protein Prenyltransferases *J Biol Chem* **271**: 5289-5292.

Casey PJ, Solski PA, Der CJ, Buss JE (1989) p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8323-8327.

Clarke PR, Hardie DG (1990a) Calmodulin-dependent multiprotein kinase and protein kinase C phosphorylate the same site on HMG-CoA reductase as the AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett* **269**: 213-217.

Bibliografía

Clarke PR, Hardie DG (1990b) Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO J* **9** (8): 2439-2446.

Clarke S (1992) Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem* **61**: 355-386.

Clayton RB (1964) The utilization of sterols by insects. *J Lipid Res* **5**: 3-19.

Cleveland JL, Ihle JN (1995) Contenders in FasL/TNF death signaling. *Cell* **81**: 479-482.

Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* **335** (Pt 1): 1-13.

Coley WB (1893) *Am J Med Sci* **105**: 487-511.

Coley WB (1894) *Trans Am Surg Assoc* **12**: 183-212.

Coley WB (1896) *Am J Med Sci* **112**: 251-281.

Coley WB (1906) *Am J Med Sci* **131**: 375-430.

Collart MA, Belin D, Vassalli JD, De Kossodo, Vassalli P (1986) Gamma interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, interleukin 1 and urokinase genes, which are controlled by short-lived repressors. *J Exp Med* **164**: 2113-2118.

Collins MKL, Lopez Rivas A (1993) The control of apoptosis in mammalian cells. *Trends in Biochem Sci* **18**: 307-309.

Corcoran AE, Barret K, Turner M, Brown A, Kissonerghis AM, Gadnell M, Gray PW, Chernajovsky Y, Feldmann M (1994) Characterization of ligand binding by the tumour-necrosis-factor receptor. Involvement of individual cysteine-rich repeats. *Eur J Biochem* **223**: 831-840.

Cornell R, Grove GL, Rothblat GH, Horwitz AF (1977) Lipid requirement for cell cycling. *Exp Cell Res* **109**: 299-307.

Correl CC, Edwards PA (1994) Mevalonic acid-dependent degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **269**: 633-638.

Cotter TG, Al-Rubeai M (1995) Cell death (apoptosis) in cell culture systems. *Trends Biotechnol* **13**: 150-155.

Cotter TG, McCarthy J (1994). Genes and Apoptosis. *Biochem Soc Trans* **22**: 591-597.

Cuvillier O, Rosenthal DS, Smulson ME, Spiegel S (1998) Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J Biol Chem* **273**: 2910-2916.

Czaja MJ, Xu J, Alt E (1995) Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. *Gastroenterology* **108**: 1849-1854.

Chen HW, Heninger HJ, Kandutsch AA (1975) Relationship between sterol synthesis and DNA synthesis in phytohemagglutinin-stimulated mouse lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 1950-1954.

Chen HW, Kandutsch AA, Waymouth C (1974) Inhibition of cell growth by oxygenated derivatives of cholesterol. *Nature* **251**: 419-421.

Chen M, Quintans J, Fuks Z, Thompson C, Kufe DW, Weichselbaum RR (1995) Suppression of Bcl-2 messenger RNA production may mediate apoptosis after ionizing radiation, tumor necrosis factor α and ceramide. *Cancer Res* **55**: 991-994.

Chin DJ, Gil G, Faust JR, Goldstein JL, Brown MS, Luskey KL (1985) Sterols accelerate degradation of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase encoded by constitutively expressed cDNA. *Mol Cell Biol* **5**: 634-641.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.

Christophe J, Popjak G (1961) Studies on the biosynthesis of cholesterol: xiv. The origin of prenoic acids from allyl pyrophosphates in liver enzyme systems. *J Lipid Res* **2**: 244-257.

Chun KT, Bar-Nun S, Simoni RD (1990) The regulated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase requires a short-lived protein and occurs in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **265**: 22004-22010.

Chun KT, Simoni RD (1992) The role of the membrane domain in the regulated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem* **267**: 4236-4246.

Bibliografía

Dawson PA, Hofmann SL, van der Westhuyzen DR, Sudhof TC, Brown MS, Goldstein JL (1988) Sterol-dependent repression of low density lipoprotein receptor promoter mediated by 16-base pair sequence adjacent to binding site for transcription factor Sp1. *J Biol Chem* **263**: 3372-3379.

Dawson PA, Ridgway ND, Slaughter CA, Brown MS, Goldstein JL (1989) cDNA cloning and expression of oxysterol-binding protein, an oligomer with a potential leucine zipper. *J Biol Chem* **264**: 16798-16803.

Dbaiibo GS, Obeid LM, Hannun YA (1993) Tumor necrosis factor- α (TNF α) signal transduction through ceramide. *J Biol Chem* **268**: 17762-17766.

Decker T, Lohmann-Matthes ML, Gifford GE (1987) Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J Immunol* **138**: 957-962.

Declue JE, Vass WC, Papageorge AG, Lowy DR, Willumsen BM (1991) Inhibition of cell growth by lovastatin is independent of ras function. *Cancer Res* **51**: 712-717.

Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S (1998) Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11211-11216.

Dembic Z, Loetscher H, Gubler U, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W (1990) Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine* **2**:231- 237.

Desai NN, Carlson RO, Mattie ME, Olivera A, Buckley NE, Seki T, Brooken GD, Spiegel S (1993) Signaling pathways for sphingosylphosphoryl choline-mediated mitogenesis in Swiss 3T3 fibroblasts. *J cell Biol* **121**: 1385-1395.

Desai NN, Zhang H, Olivera A, Mattie ME, Spiegel S (1992) Sphingo-sine-1-phosphate, a metabolite of sphingosine, increases phosphatidic acid levels by phospholipase D activation. *J Biol Chem* **267**: 23122-23128.

Diaz-Meco MT, Berra E, Municio MM, Sanz L, Lozano J, Dominguez I, Diaz-Golpe V, Lain de Lera MT, Alcami J, Paya CV, et al. (1993) A dominant negative protein kinase C zeta subspecies blocks NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* **13**: 4770- 4775.

- Diaz-Meco MT, Dominguez I, Sanz L, Dent P, Lozano J, Municio MM, Berra E, Hay RT, Sturgill TW, Moscat J** (1994) Zeta PKC induces phosphorylation and inactivation of I kappa B-alpha in vitro. *Embo J* **13**: 2842-2848.
- Divecha N, Irvine REF** (1994) Phospholipid signaling. *Cell* **77**: 269-278.
- Dobrowsky RT, Hannun YA** (1992) Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J Biol Chem* **267**: 5048-5051.
- Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MA, Hannun YA** (1992) Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **268**: 15523-15530.
- Downward J** (1998a) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 262-267.
- Downward J** (1998b) Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 49-54.
- Duan RD, Hertervig E, Nyberg L, Hauge T, Sternby B, Lillienau J, Farooqi A, Nilsson A** (1996) Distribution of alkaline sphingomyelinase activity in human beings and animals. Tissue and species differences. *Digest Dis Sci* **41**: 1801-1806.
- Eck MJ, Sprang SR** (1989) The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implication for receptor binding. *J Biol Chem* **264**: 17595-17605.
- Edwards PA, Lemongello D, Fogelman AM** (1979) Improved methods for the solubilization and assay of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Lipid Res* **20**: 40-46.
- Elias L, Berry CO** (1991) Induction of differentiation by tumor necrosis factor in HL-60 cells is associated with the formation of large DNA fragments. *Leukemia* **5**: 879-885.
- Elias L, Moore PB, Rose SM** (1988) Tumor necrosis factor induced DNA fragmentation of HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **157**: 963-969.
- Exton JH** (1990) Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J Biol Chem* **265**: 1-4.
- Farese RV** (1983) Phosphoinositide metabolism and hormone action. *Endocr Rev* **4**: 78-95.
- Faust JR, Goldstein JL, Brown MS** (1979) Synthesis of ubiquinone and cholesterol in human fibroblasts: regulation of a branched pathway. *Arch Biochem Biophys* **192**: 86-99.

Bibliografía

- Faust JR, Luskey KL, Chin DJ, Goldstein JL, Brown MS** (1982) Regulation of synthesis and degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by low density lipoprotein and 25-hydroxycholesterol in UT-1 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 5205-5209.
- Ferré-D'Amaré AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK** (1993) Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/hlh/z domain. *Nature* **363**: 38-45.
- Finegold AA, Schafer WR, Rine J, Whiteway M, Tamanoi F** (1990) Common modifications of trimeric G proteins and ras proteins: involvement of polyisoprenylation. *Science* **249**: 165-168.
- Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, et al.** (1995) Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* **81**: 687-693.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC** (1997) PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88**: 435-437.
- Fransen L, Muller R, Marmenout A, Tavernier J, Van Der Heyden J, Kawashima E, Chollet A, Tizard R, Van Heuverswyn et al.** (1985) Molecular cloning of mouse tumour necrosis factor cDNA and its eukaryotic expression. *Nucleic Acids Res* **13**: 4417-4429.
- Freissmuth M, Casey PJ, Gilman AG.** (1989) G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB J* **3**: 2125-2131.
- Fukada Y, Matsuda T, Kokame K, Takao T, Shimonishi Y, Akino T, Yoshizawa TJ** (1994) Effects of carboxyl methylation of photoreceptor G protein gamma-subunit in visual transduction. *Biol Chem* **269**: 5163-5170.
- Fukada Y, Takao T, Ohguro H, Yoshizawa T, Akino T, Shimonishi Y** (1990) Farnesylated gamma-subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. *Nature* **346**: 658-660.
- Gasic GP** (1994) Basic-helix-loop-helix transcription factor and sterol sensor in a single membrane-bound molecule. *Cell* **77**: 17-19.
- Gerschenson LE, Rotello RJ** (1992) Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J* **6**: 2450-2455.
- Ghosh S, Baltimore D** (1990) Activation in vitro of NF- κ B by phosphorylation of its inhibitor. *Nature* **344**: 678-682.

Ghosh S, Gifford AM, Riviere LR, Tempst P, Nolan GP, Baltimore D (1990) Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF- κ B: homology to rel and dorsal. *Cell* **62**: 1019-1029.

Gil G, Smith JR, Goldstein JL, Slaughter CA, Orth K, Brown MS, Osborne TF (1988) Multiple genes encode nuclear factor 1-like proteins that bind to the promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8963-8967.

Glomset JA, Farnsworth CC (1994) Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**: 181-205

Glomset JA, Gelb MH, Farnsworth CC (1990) Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *TIBS* **15**: 139-142.

Goldkorn T, Dressler KA, Muindi J, Radin NS, Mendelsohn J, Menaldino D, Liotta D, Kolesnick RN (1991) Ceramide stimulates epidermal growth factor receptor phosphorylation in A431 human epidermoid carcinoma cells: evidence that ceramide mediates sphingosine action. *J Biol Chem* **266**: 16092-16097.

Goldstein JL, Basu SK, Brown MS (1983) Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol* **98**: 241-260.

Goldstein JL, Brown MS (1974) Binding and degradation of low-density lipoproteins by cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* **249**: 5153-5162.

Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**: 425-430.

Golstein P, Ojcius DM, Young JD (1991) Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* **121**: 29-65.

Gough DP, Hemming FW (1970) The characterization and stereochemistry of biosynthesis of dolichols in rat liver. *Biochem J* **118**: 163-166.

Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarrett JA, Leung DW, Moffat B, Ng P, Svedersky LP, *et.al* (1984) Cloning and expression of cDNA for human limphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* **312**: 721-724.

Greenblatt MS, Elias L (1992) The type B receptor for tumor necrosis factor- α mediates DNA fragmentation in HL-60 and U-937 cells and differentiation in HL-60 cells. *Blood* **80**: 1339-1346.

Bibliografía

Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Edigo J (1998) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* **85**: 490-500.

Habenicht AJR, Glomset JA, Ross R (1980) Relation of cholesterol and mevalonic acid to the cell cycle in smooth muscle and swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* **255**: 5134-5140.

Hancock JF, Cadwallader K, Marshall CJ (1991b) Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21 K-ras(B) *EMBO J* **10**: 641-646.

Hancock JF, Cadwallader K, Paterson H, Marshall CJ (1991a) A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *EMBO J* **10**: 4033-4039.

Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ (1989) All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* **57**: 1167-1177.

Hancock JF, Paterson H, Marshall CJ (1990) A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* **63**: 133-139.

Hannun YA (1994) The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* **269**: 3125-3128.

Hannun YA, Bell RB (1989) Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science* **234**: 500-507.

Hannun YA, Linardic CM (1993) Sphingolipid breakdown products: antiproliferative and tumor suppressor lipids. *Biochem Biophys Acta* **1154**: 223-236.

Hannun YA, Obeid LM (1995) Ceramide, an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci* **20**: 73-77.

Hatakeyama M, Tsudo M, Minamoto S, Kono T, Doi T, Miyata T, Miyasaka M, Taniguchi T (1989) Interleukin-2 receptor beta chain gene: generation of three receptor forms by cloned human alpha and beta chain cDNA's. *Science* **244**: 551-556.

Hauser JML, Buehrer BM, Bell RM (1994) Role of ceramide in mitogenesis induced by exogenous sphingoid bases. *J Biol Chem* **269**: 6803-6809.

Havell EA (1987) Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis. *J Immunol* **139**: 4225-4231.

Helson L, Green S, Carswell E, Old LJ (1975) Effect of tumour necrosis factor on culture human melanoma cells *Nature* **258**: 731-732.

Heller RA, Krönke M (1994) Tumor necrosis factor-mediated signaling pathways. *J Cell Biol* **126**: 5-9.

Higgins JB, Casey PJ (1994) In vitro processing of recombinant G protein gamma subunits. Requirements for assembly of an active beta gamma complex. *J Biol Chem* **269**: 9067-9073.

Higgins JB, Casey PJ (1996) The role of prenylation in G-protein assembly and function. *Cell Signal* **8**: 433-437.

Hiwasa T, Sawada T, Sakiyama S (1990) Cytochrome proteinase inhibitors and ras gene products share the same biological activities including transforming activity toward NIH3T3 mouse fibroblasts and the differentiation-inducing activity toward PC12 rat pheochromocytoma cells. *Carcinogenesis* **11**: 75-80.

Hokin LE (1985) Receptors and phosphoinositide generated second messengers. *Ann Rev Biochem* **54**: 205-235.

Holtz D, Araki Tanaka R, Hartwig J, McKeon F (1989) The CaaX motif of lamin A functions in conjugation with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell* **59**: 969-977.

Horinouchi K, Erlich S, Perl DP, Ferlinz K, Bisgaier CL, Sandhoff K, Desnick RJ, Stewart CL, Schuchman EH (1995) Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nature Genet* **10**: 288-293.

Hsu H, Xiong J, Goeddel DV (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell* **81**: 495-504.

Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS (1996b) Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell* **87**: 415-426.

Hua X, Sakai J, Brown MS, Goldstein JL (1996a) Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins requires sequences on both sides of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **271**: 10379-10384.

Bibliografía

Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X (1993) SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11603-11607.

Huneus VQ, Wiley MH, Siperstein MD (1979) Essential role for mevalonate synthesis in DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 5056-5060.

Iimura O, Vrtovnik F, Terzi F, Friedlander G (1997) HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in mouse proximal tubular cells in primary culture. *Kidney Int* **52**: 962-972.

Inglese J, Glickman JF, Lorenz W, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Isoprenylation of a protein kinase. *J Biol Chem* **267**: 1422-1425.

Inoue S, Bar-Nun S, Roitelman J, Simoni RD (1991) Inhibition of degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vivo by cysteine protease inhibitors. *J Biol Chem* **266**: 13311-13317.

Jaeschke H, Fisher MA, Lawson JA, Simmons CA, Farhood A, Jones DA (1998) Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF- α -induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J Immunol* **160**: 3480-3486.

Jakobisiak M, Bruno S, Skierski JS, Darzynkiewicz Z (1991) Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 3628-3632.

James MJ, Kandutsch AA (1979) Inter-relationships between dolichol and sterol synthesis in mammalian cell cultures. *J Biochem* **254**: 8442-8446.

Jarvis WD, Fornari FA, Browning JL, Gewirtz DA, Kolesnick RN, Grant S (1994a) Attenuation of ceramide-induced apoptosis by diglyceride in human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* **269**: 31685-31692.

Jarvis WD, Fornari FA, Traylor RS, Martin HA, Kramer LB, Erukulla RK, Bittman R, Grant S (1996) Induction of apoptosis and potentiation of ceramide-mediated cytotoxicity by sphingoid bases in human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* **271**: 8275-8284

Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gerwartz DA, Grant S (1994b) Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 73-77.

Jayadev J, Linardic CM, Hannun YA (1994) Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor. *J Biol Chem* **269**: 5757-5763.

Jingami H, Brown MS, Goldstein JL, Anderson RG, Luskey KL (1987) Partial deletion of membrane-bound domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase eliminates sterol-enhanced degradation and prevents formation of crystalloid endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **104**: 1693-1704.

Johnson F, Pickett SC, Barker DL (1990) Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis* **11**: 355-360.

Jones EY, Stuart DI, Walker NP (1989) Structure of tumour necrosis factor. *Nature* **338**: 225-228.

Jones KD, Couldwell WT, Hinton DR, Su Y, He S, Anker L, Law RE (1994) Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **205**: 1681-1687.

Joseph CK, Byun HS, Bittman R, Kolesnick RN (1993) Substrate recognition by ceramide-activated protein kinase: evidence that kinase activity is proline-directed. *J Biol Chem* **268**: 20002-20006.

Joseph CK, Wright SD, Bornmann WG, Randolph JT, Kumar ER, Bittman R, Liu J, Kolesnick RN (1994) Bacterial lipopolysaccharide has structural similarity to ceramide and stimulates ceramide-activated protein kinase in myeloid cells. *J Biol Chem* **269**: 17606-17610.

Joyce DA, Gibbons DP, Green P, Steer JH, Feldmann M, Brennan FM (1994) Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur J Immunol* **24**: 2699-2705.

Joyce DA, Steer JH (1995) Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha stimulate late shedding of p75 TNF receptors but not p55 TNF receptors from human monocytes. *J Interferon Cytokine Res* **15**: 947-954.

Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* **8**: 1001-1008.

Bibliografía

Kalthoff H, Roeder C, Brockhaus M, Thiele HG, Schmiegel W (1993) Tumor necrosis factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA. *J Biol Chem* **268**: 2762-2766.

Kandutsch AA, Chen HW (1977) Consequences of blocked sterol synthesis in cultured cells. *J Biol Chem* **252**: 409-415.

Kandutsch AA, Chen HW (1978) Inhibition of cholesterol synthesis by oxygenated sterols. *Lipids* **13**: 704-707.

Kandutsch AA, Chen HW, Heiniger HJ (1978) Biological activity of some oxygenated sterols. *Science* **201**: 498-501.

Kandutsch AA, Thompson EB (1980) Cytosolic proteins that bind oxygenated sterols. Cellular distribution, specificity, and some properties. *J Biol Chem* **255**: 10813-10821.

Kato K, Cox AD, Hisaka MM, Graham SM, Buss JE, Der CJ (1992) Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6403-6407.

Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E, Gilbert C, Coffey P, Downward J, Evan G (1997) Suppression of c-myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* **385**: 544-548.

Kaufmann SH (1989) Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res* **49**: 5870-8.

Kawakami K, Schedereit C, Roeder RG (1988) Identification and purification of the human immunoglobulin-enhancer binding protein (NF-kappa B) that activates the transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 4700-4705.

Kawakami M, Cerami A (1981) Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. *J Exp Med* **154**: 631-639.

Kawata S, Nagase T, Yamasaki E, Ishiguro H, Matsuzawa Y (1994) Modulation of the mevalonate pathway and cell growth by pravastatin and *d*-limonene in a human hepatoma cell line (Hep G2). *Br J Cancer* **69**: 1015-1020.

Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN, Hay N (1997) The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev* **11**: 701-713.

Kennelly PJ, Krebs EG (1991) Consensus sequences and substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* **266**: 1555-1558.

Khosravi-Far R, Clark GJ, Abe K, Cox AD, McLain T, Lutz RJ, Sinensky M, Der CJ (1992) Ras (CXXX) and Rab (CC/CXC) prenylation signal sequences are unique and functionally distinct. *J Biol Chem* **267**: 24363-24368.

Khosravi-Far R, Lutz RJ, Cox AD, Conroy L, Bourne JR, Sinensky M, Balch WE, Buss JE, Der CJ (1991) Isoprenoid modification of rab proteins terminating in CC or CXC motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6264-6268.

Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J (1997) Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J* **16**: 2783-2793.

Kim MY, Linardic CM, Obeid LA, Hannun YA (1991) Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor α and γ -interferon: Specific role in cell differentiation. *J Biol Chem* **266**: 484-489.

Kimura T, Sakaida I, Terai S, Marsumura Y, Uchida K, Okita K. (1997) Inhibition of tumor necrosis factor- α production retards liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **231**: 557-560.

Kitten GT, Nigg EA (1991) The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B2. *J Cell Biol* **113**: 13-23.

Kolesnick RN (1987) 1,2-Diacylglycerols but not phorbol esters stimulate sphingomyelin hydrolysis in GH3 pituitary cells. *J Biol Chem* **262**: 16759-16762.

Kolesnick RN (1989) The sphingomyelinase action inhibits phorbol ester-induced differentiation of human promyelocytic leukemia (HL-69) cells. *J Biol Chem* **264**: 7617-7623.

Kolesnick RN (1991) Sphingomyelin and derivatives as cellular signals. *Prog Lipid Res* **30**: 1-38.

Kolesnick RN (1992) Ceramide: A novel second messenger. *Trends Cell Biol* **2**: 232-236.

Bibliografía

Kolesnick RN, Clegg S (1988) 1,2-diacylglycerols but not phorbol esters, activate a potential inhibitory pathway in GH3 pituitary cells. *J Biol Chem* **263**: 6334-6337.

Kolesnick RN, Golde DW (1994) The sphingomyelin pathway in tumornecrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* **77**: 325-328.

Kolesnick RN, Hemer MR (1990) Characterization of a ceramide kinase activity from human leukemia (HL-60) cells. *J Biol Chem* **265**: 18803-18808.

Kriegler M, Perez C, Defay K, Albert I, Lu SD (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* **53**: 45-53.

Krönke M, Schutze S, Scheurich P, Pfizenmaier K (1991) Tumor Necrosis Factor: Structure, Function and Mechanism of Action (Aggarwal BB and Vilcek J, eds) pp 189-216, Marcel Dekker, Inc.

Kumagai H, Chun KT, Simoni RD (1995) Molecular dissection of the role of the membrane domain in the regulated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem* **270**: 19107-19113.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lai RK, Perez-Sala D, Canada FJ, Rando RR (1990) The γ subunit of transducin is farnesylated. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7673-7677.

Larrick JW, Wright SC (1990) Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor- α . *FASEB J* **4**: 3215-3223.

Law B, Rossie S (1995) The dimeric and catalytic subunit forms of protein phosphatase 2A from rat brain are stimulated by C2-ceramide. *J Biol Chem* **269**: 19605-19609.

Lawler JF Jr, Yin M, Diehl AM, Roberts E, Chatterjee S (1998) Tumor necrosis factor- α stimulates the maturation of sterol regulatory element binding protein-1 in human hepatocytes through the action of neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* **273**: 5053-5059.

Lazebnick YA, Takahashi A, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1995) Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9042-9046.

Leeuwenberg JF, Van Tits LJ, Jeunhomme TM, Buurman WA (1995) Evidence for exclusive role in signalling of tumour necrosis factor p55 receptor and a potentiating function of p75 receptor on human endothelial cells. *Cytokine* **7**: 457-462.

Leonard DA, Chen HW (1987) ATP-dependent degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in permeabilized cells. *J Biol Chem* **262**: 7914-7919.

Leonard S, Beck L, Sinensky M (1990) Inhibition of isoprenoid biosynthesis and the post-translational modification of pro-p21. *J Biol Chem* **265**: 5157-5160.

Li J, Zhang G, Hirabayashi Y (1995a) Inhibition of tumor necrosis factor α and ceramide-induced internucleosomal DNA fragmentation by herbimycin A in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **212**: 640-647.

Li J, Zhang G, Uematsu S, Akahori Y, Hirabayashi Y (1995b) Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death by natural ceramide. *FEBS Letters* **358**: 211-214.

Lien E, Liabakk NB, Johnsen AC, Nonstad U, Sundan A, Espevick OT (1995) Polymorphonuclear granulocytes enhance lipopolysaccharide-induced soluble p75 tumor necrosis factor receptor release from mononuclear cells. *Eur J Immunol* **25**: 2714-17.

Lin LL, Lin AY AND Knopf JL (1992) Cytosolic phospholipase A2 is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6147-6151.

Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A Anddavis RJ (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**: 269-278.

Liscovitch M, Cantley LC (1994) Lipid second messengers. *Cell* **77**: 329-334.

Liscum L, Finer-Moore J, Stroud RM, Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL (1985) Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **260**: 522-530.

Liu J, Mathias S, Yang Z, Kolesnick RN (1994) Renaturation and tumor necrosis factor- α stimulation of a 97-kDa ceramide-activated protein kinase. *J Biol Chem* **269**: 3047-3052.

Bibliografía

Loetscher H, Pan YCE, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, Lesslauer W (1990) Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* **61**: 351-359.

López Blanco F, González-Reyes J, Fanjul LF, Ruiz de Galarreta CM, Quintana Aguiar J (1998) Chemiluminescence-based detection of minute amounts of apoptotic DNA. *BioTechniques* **24**: 354-358.

Low MJ, Saltiel AR (1988) Structural and functional roles of glycosylphosphatidylinositol in membranes. *Nature* **239**: 268-275.

Lozano J, Berra E, Municio MM, Diaz-Meco MT, Dominguez I, Sanz L, Moscat J (1994) Protein kinase C ξ isoform is critical for κ B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem* **269**: 19200-19202.

Luettig B, Decker T, Lohmann-Matthes ML (1989) Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor. *J Immunol* **143**: 4034-4038.

Luskey KL, Stevens B (1985) Human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Conserved domains responsible for catalytic activity and sterol-regulated degradation. *J Biol Chem* **260**: 10271-10277.

Machleidt T, Wiegmann K, Henkel T, Schütze S, Baeuerle P, Krönke M (1994) Sphingomyelinase activates proteolytic κ B- α degradation in a cell-free system. *J Biol Chem* **269**: 13760-13765.

Magee AI (1989) Post-translational processing of *ras* proteins. *Biochem Soc Trans* **17**: 875-876.

Maltese WA (1990) Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J* **4**: 3319-3328.

Maltese WA, Robishaw JD (1990) isoprenylation of C-terminal cysteine in a G-protein γ subunit. *J Biol Chem* **265**: 18071-18074.

Maltese WA, Sheridan KM (1987) Isoprenylated proteins in cultured cells: subcellular distribution and changes related to altered morphology and growth arrest induced by mevalonate deprivation. *J Cell Physiol* **133**: 471-481.

Mandal M, Maggirwar SB, Sharma N, Kaufmann SH, Sun SC, Kumar R (1996) Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF-kappaB signaling pathway. *J Biol Chem* **271**: 30354-9.

Marathe S, Schissel S, Yellin M, Beatini N, Mintzer R, Williams K, Tabas I (1998) Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. *J Biol Chem* **273**: 4081-4088.

Marino MW, Pfeffer LM, Guidon PT, Donner DB (1989) Tumor necrosis factor induces phosphorylation of a 28-kDa mRNA cap-binding protein in human cervical carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8417-8421.

Marsters SA, Frutkin AD, Simpson NJ, Fendly BM, Ashkenazi A (1992) Identification of cysteine-rich domains of the type 1 tumor necrosis factor receptor involved in ligand binding. *J Biol Chem* **267**: 5747-5750.

Marte BM, Downward J (1997) PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* **22**: 355-358.

Martin SJ, Green DR (1995) Protease activation during apoptosis: death by thousand cuts? *Cell* **82**: 349-352.

Martin SJ, Green DR, Cotter TG (1994) Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends in Biochem Sci* **19**: 26-30.

Maru M, Haraguchy M, Higashi H, Kato S, Kurimura T, Naiki M, Wakamiya N (1993) Anti-tumor activity of ceramides and glycosphingolipids in a murine tumor system. *Int J Cancer* **53**: 645-650.

Mathias S, Dressler KA, Kolesnick RN (1991) Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10009-10013.

Mattie M, Brooker G, Spigel S (1994) Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *J Biol Chem* **269**: 3181-3188.

Meigs TE, Roseman DS, Simoni RD (1996) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase degradation by the nonsterol mevalonate metabolite farnesol in vivo. *J Biol Chem* **271**: 7916-7922.

Meigs TE, Simoni RD (1992) Regulated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in permeabilized cells. *J Biol Chem* **267**: 13547-13552.

Meldrum DR (1998) Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* **274** (3 Pt 2): R577-595.

Bibliografia

Merril AH Jr, Schmelz EM, Dillehay DL, Spiegel S, Shayman JA, Schroeder JJ, Riley RT, Voss K, Wang E (1997) Sphingolipids- the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology and pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol* **142**: 208-225.

Merril AH Jr, Stevens VL (1989) Modulation of protein kinase C and diverse cell functions by sphingosine- a pharmacologically interesting compound linking sphingolipids and signal transduction. *Biochem Biophys Acta* **1010**: 131-139.

Michalopoulos GK, DeFrances MC (1997) Liver regeneration. *Science* **276**: 60-66.

Miller SJ, Parker RA, Gibson DM (1989) Phosphorylation and degradation of HMG CoA reductase. *Adv Enzyme Regul* **28**: 65-77.

Mills JT, Adamany AM (1978) Impairment of dolichyl saccharide synthesis and dolichol-mediated glycoprotein assembly in the aortic smooth muscle cell in culture by inhibitors of cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* **253**: 5270-5273.

Mitchell RH (1975) Inositolphospholipids and cell surface receptor function. *Biochem Biophys Acta* **415**: 81-147.

Mizushima N, Koike R, Kohsaka H, Kushi Y, Handa S, Yagita H, Miyasaka N (1996) Ceramide induces apoptosis via CPP32 activation. *FEBS Lett* **395**: 267-271.

Moore SM, Rintoul RC, Walker TR, Chilvers ER, Haslett C, Sethi T (1998) The presence of a constitutively active phosphoinositide 3-kinase in small cell lung cancer cells mediates anchorage-independent proliferation via a protein kinase B and p70s6k-dependent pathway. *Cancer Res* **58**: 5239-5247.

Moores SL, Schaber MD, Mosser SD, Rands E, O'Hara MB, Garsky VM, Marshall MS, Pompliano DL, Gibbs JB (1991) Sequence dependence of protein isoprenylation. *J Biol Chem* **266**: 14603-14610.

Muller C, Bockhorn AG, Klusmeier S, Kiehl M, Roeder C, Kalthoff H, Koch OM (1998) Lovastatin inhibits proliferation of pancreatic cancer cell lines with mutant as well as with wild-type K-ras oncogene but has different effects on protein phosphorylation and induction of apoptosis. *Int J Oncol* **12**: 717-723.

Müller G, Ayoud M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K (1995) PKC ζ is a molecular switch in signal transduction of TNF- α , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J* **14**: 1961-1969.

- Muller U, Jongeneel CV, Nedospasov SA, Lindahl KF, Steinmetz M** (1987) Tumour necrosis factor and limphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. *Nature* **325**: 265-267.
- Mumby SM, Casey PJ, Gilman AG, Gutowski S, Sternweiss PC** (1990) G protein γ subunits contain a 20-carbon isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5873-5877.
- Muntz KH, Sternweis PC, Gilman AG, Mumby SM** (1992) Influence of gamma subunit prenylation on association of guanine nucleotide-binding regulatory proteins with membranes. *Mol Biol Cell* **3**: 49-61.
- Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia T, Simons K** (1995) VIP21-caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10339-10343.
- Murré C, Baltimore D** (1992) The helix-loop-helix motif: structure and function. In the transcriptional regulation, *SL McKnight and KR Yamamoto, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)*, pp 861-879.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM** (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signalig complex. *Cell* **85**: 817-827.
- Natoli G, Costanzo A, Guido F, Moretti F, Levrero M** (1998) Apoptotic, non-apoptotic, and anti-apoptotic pathways of tumor necrosis factor signaling. *Biochem Pharmacol* **56**: 915-920.
- Neamati N, Fernandez A, Wright S, Kiefer J, McConkey DJ** (1995) Degradation of lamin B1 precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei. *J Immunol* **154**: 3788-95.
- Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW** (1985b) Human limphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic acids Res* **13**: 6361-6373.
- Nedwin GE, Svedersky LP, Bringmam TS, Palldino MA, Goeddel DV** (1985a) Effect of interleukin 2, interferon-gamma and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta. *J Immunol* **135**: 2492-2497.
- Neer EJ, Clapham DE** (1988) Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* **333**: 129-134.

Bibliografía

Newman CMH, Magee AI (1993) Posttranslational processing of the ras superfamily of small GTP-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1155**: 79-96.

Nicholson DW, Thornberry NA (1997) Caspases: killer proteases *Trends Biochem Sci* **22**: 299-306.

Nishizuka Y (1984) Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* **225**: 1365-1370.

Nyberg L, Duan RD, Axelsson J, Nilsson A (1996) Identification of an alkaline sphingomyelinase activity in human bile. *Biochim Biophys Acta* **1300**: 42-48.

Obeid LM, Linardic CM, Karolac LA, Hannun YA (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**: 1769-1771.

Oberhammer FA, Hochegger K, Froschl G, Tiefenbacher R, Pavelka M (1994) Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J Cell Biol* **126**: 827-37.

Okazaki T, Bielawska A, Bell RM, Hannun YA (1990) Role of ceramide as a lipid mediator of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *J Biol Chem* **265**: 15823-15831.

Okazaki T, Bielawska A, Domae N, Bell RM, Hannun YA (1994) Characteristics and partial purification of a novel cytosolic magnesium-independent neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *J Biol Chem* **269**: 4070-4077.

Old LP (1985) Tumor necrosis factor. *Science* **230**: 630-632.

Olender EH, Simoni RD (1992) The intracellular targeting and membrane topology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem* **267**: 4223-4235.

Olivera A, Buckley NE, Spiegel S (1992) Sphingomyelinase and cell-permeable ceramide analogs stimulate cellular proliferation in quiescent Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* **267**: 26121-26127.

Olivera A, Zhang H, Carlson RO, Mattie ME, Schmidt RR, Spiegel S (1994) Stereospecificity of sphingosine-induced intracellular calcium mobilization and cellular proliferation. *J Biol Chem* **269**: 17924-17990.

Olson RE (1968) Biosynthesis of ubiquinones in animals. In Vitamins and Hormones. RS Harris, IG Wool, JA Loraine, editors. *Academic Press, New York* **24**: 551-574.

Orita S, Kaibuchi K, Kuroda S, Shimizu K, Nakanishi H, Takai Y (1993) Comparison of kinetic properties between two mammalian ras p21 GDP/GTP exchange proteins, ras guanine nucleotide-releasing factor and smg GDP dissociation stimulation. *J Biol Chem* **268**: 25542-25546.

Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM (1996) The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem* **271**: 16443-16446.

Osborne BA, Schwartz LM (1994) Essential genes that regulate apoptosis. *Trends Cell Biol* **4**: 394-398.

Osborne TF (1991) Single nucleotide resolution of sterol regulatory region in promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase. *J Biol Chem* **266**: 13947-13951.

Osborne TF, Bennett M, Rhee K (1992) Red 25, a protein that binds specifically to the sterol regulatory region in the promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem* **267**: 18973-18982.

Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS (1985) 5' end of HMG CoA reductase gene contains sequences responsible for cholesterol-mediated inhibition of transcription. *Cell* **42**: 203-212.

Otterbach B, Stoffel W (1995) Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease) *Cell* **81**: 1053-1061.

Pabo CO, Sauer RT (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* **61**: 1053-1095.

Padayatty SJ, Marcelli M, Shao TC, Cunningham GR (1997) Lovastatin-induced apoptosis in prostate stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 1434-1439.

Pai JT, Brown MS, Goldstein JL (1996) Purification and cDNA cloning of a second apoptosis-related cysteine protease that cleaves and activates sterol regulatory element binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5437-5442.

Bibliografía

- Paleolog EM, Delasalle SA, Buurman WA, Feldmann M** (1994) Functional activities of receptors for tumor necrosis factor-alpha on human vascular endothelial cells. *Bood* **84**: 2578-2590.
- Pan W, Zadina JE, Harlan RE, Weber JT, Banks WA, Kastin AJ** (1997) Tumor necrosis factor-alpha: a neuromodulator in the CNS. *Neurosci Biobehav Rev* **21**: 603-613.
- Panini SR, Schnitzer-Polokoff R, Spencer TA, Sinensky M** (1989) Sterol-independent regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by mevalonate in Chinese Hamster ovary cells. *J Biol Chem* **264**: 11044-11052.
- Parish CA, Smrcka AV, Rando RR** (1995) Functional significance of beta gamma-subunit carboxymethylation for the activation of phospholipase C and phosphoinositide 3-kinase. *Biochemistry* **34**: 7722-7727.
- Parker RA, Miller SJ, Gibson DM** (1989) Phosphorylation of native 97-kDa 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from rat liver. Impact on activity and degradation of the enzyme. *J Biol Chem* **264**: 4877-4887.
- Peffley D, Sinensky M** (1985) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase synthesis by a non-sterol mevalonate-derived product in Mev-1 cells. *J Biol Chem* **260**: 9949-9952.
- Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG, Tschopp J** (1993) Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death) *EMBO J* **12**: 371-377.
- Pennica D, Hayflick JS, Bringman M, Palladino MA, Goeddel DV** (1985) Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6060-6064.
- Perez C, Albert I, Defay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M** (1990) A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* **63**: 251-258.
- Perez-Sala D, Mollinedo F** (1994) Inhibition of isoprenoid biosynthesis induces apoptosis in human promyelocytic HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **199**: 1209-1215.
- Pfizenmaier K, Wajant H, Grell M** (1996) Tumor necrosis factors in 1996. *Cytokine Growth Factor Rev* **7**: 271-277.

Piguet PF, Grau GE, Allet B, Vassalli P (1987) Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft- vs.-host disease. *J Exp Med* **166**: 1280-1289.

Popjak G, Goodman DeWS, Cornforth JW, Cornforth RH, Ryhage R (1961) Studies on the biosynthesis of cholesterol. XV. Mechanism of squalene biosynthesis from farnesyl pyrophosphate and from mevalonate. *J Biol Chem* **236**: 1934-1947.

Porfiri E, Evans T, Chardin P, Hancock JF (1994) Prenylation of Ras proteins is required for efficient hSOS1-promoted guanine nucleotide exchange. *J Biol Chem* **269**: 22672-22677.

Porter JA, Young KE, Beachy PA (1996) Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* **274**: 255-259.

Porteu F, Brockhaus M, Wallach D, Engelmann H, Nathan CF (1991) Human neutrophil elastase releases a ligand-binding fragment from the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Comparison with the proteolytic activity responsible for shedding of TNF receptors from stimulated neutrophils. *J Biol Chem* **266**: 18846-18853.

Porteu F, Hieblot C (1994) Tumor necrosis factor induces a selective shedding of its p75 receptor from human neutrophils. *J Biol Chem* **269**: 2834-40.

Powell EE, Kroon PA (1992) Measurement of mRNA by quantitative PCR with a nonradioactive label. *J Lipid Res* **33**: 609-614.

Pujol-Borrel R, Todd I, Doshi M, Bottazzo GF, Sutton R, Gray D, Adolf GR, Feldmann M (1987) HLA class II induction in human islet cell by interferon-gamma plus tumour necrosis factor or limphotoxin. *Nature* **326**: 304-306.

Qin W, Infante J, Wang SR, Infante R (1992) Regulation of HMG-CoA reductase, apoprotein-B and LDL receptor gene expression by the hypocholesterolemic drugs simvastatin and ciprofibrate in Hep G2, human and rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* **1127**: 57-66.

Quesney-Huneus V, Wiley MH, Siperstein MD (1979) Essential role for mevalonate synthesis in DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**: 5056-5060.

Quintana J, Hipkin RW y Ascoli M (1993). A polyclonal antibody to a synthetic peptide derived from the rat follicle-stimulating hormone receptor reveals the recombinant receptor as a 74-kilodalton protein. *Endocrinology* **133**: 2098-2104.

Bibliografía

Quintern LE, Schuchman EH, Levran O, Suchi M, Ferlinz K, Reinke H, Sandhoff K, Desnick RJ (1989) Isolation of cDNA clones encoding human acid sphingomyelinase: occurrence of alternatively processed transcripts. *EMBO J* **8**: 2469-2473.

Quintern LE, Weitz G, Nehrkorn H, Tager JM, Schram AW, Sandhoff K (1987) Acid sphingomyelinase from human urine: purification and charecterization. *Biochim Biophys Acta* **922**: 323-336.

Raff MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**: 397-400.

Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from nervous system. *Science* **262**: 695-700.

Raines MA, Kolesnick RN, Golde DW (1993) Sphingomyelinase and ceramide activate mitogen-activated protein kinase in myeloid HL-60 cells. *J Biol Chem* **268**: 14572-14575.

Rajavashisth TB, Taylor AK, Andalibi A, Svenson KL, Lysis AJ (1989) Identification of a zinc finger protein that binds to the sterol regulatory element *Science* **245**: 640-643.

Rao L, Perez D, White E (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events durin apoptosis. *J Cell Biol* **135** (6 Pt 1): 1441-1455.

Reddy SAG, Chaturvedi MM, Darnay BG, Chan H, Higuchi M, Aggarwal BB (1994) Reconstitution of nuclear factor κ B activation induced by tumor necrosis factor requires membrane-associated components. *J Biol Chem* **269**: 25369-25372.

Reedquist KA, Pope TK, Roess DA (1995) Lovastatin inhibits proliferation and differentiation and causes apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated murine B cells. *Biochem Biophys Res Commun* **211**: 665-670.

Reynolds GA, Basu SK, Osborne TF, Chin DJ, Gil G, Brown MS, Goldstein JL, Luskey KL (1984) HMG CoA reductase: a negatively regulated gene with unusual promoter and 5' untranslated regions. *Cell* **38**: 275-285.

Richter J, Gullberg U, Lantz M (1995) TNF-induced superoxide anion production in adherent human neutrophils involves both the p55 and p75 TNF receptor. *J Immunol* **154**: 4142-4149.

Ridgway ND, Dawson PA, Ho YK, Brown MS, Goldstein JL (1992) Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding. *J Cell Biol* **116**: 307-319.

Rivas CI, Golde DW, Vera JC, Kolesnick RN (1994) Involvement of the sphingomyelin pathway in autocrine tumor necrosis factor signaling for human immunodeficiency virus production in chronically infected HL-60 cells. *Blood* **83**: 2191-2197.

Robaye B, Hepburn A, Lecocq R, Fiers W, Boeynaems JM, Dumont JE (1989) Tumor necrosis factor- α induces the phosphorylation of 28kDa stress proteins in endothelial cells: possible role in protection against cytotoxicity?. *Biochem Biophys Res Commun* **163**: 301-308.

Roitelman J, Olender EH, Bar-Nun S, Dunn WA Jr, Simoni RD (1992) Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **117**: 959-973.

Roitelman J, Simoni RD (1992) Distinct sterol and nonsterol signal for the regulated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem* **267**: 25264-25273.

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying Y-S, Glenney JR, Anderson RG (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**: 673-682.

Rouzer CA, Cerami A (1980) Hipertrigliceridemia associated with Trypanosoma brucei infection in rabbits: role of defective triglyceride removal. *Mol Biochem Parasitol* **2**: 31-38.

Ruben SM, Dillon PJ, Schreck R, Henckel T, Chen CH, Maaher M, Baeuerle PA, Rosen CA (1991) Isolation of a rel-related human cDNA that potentially encodes the 65-kd subunit of NK- κ B-. *Science* **251**: 1490-1493.

Ruddle NH, Waksman BH (1968) Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity. 3. Analysis of mechanism. *J Exp Med* **128**: 1267-1279.

Rusten LS, Jacobsen FW, Lesslauer W, Loetscher H, Smeland EB, Jacobsen SE (1994a) Bifunctional effects tumor necrosis factor α (TNF α) on the growth of mature and primitive human hematopoietic progenitor cells: involvement of p55 and p75 TNF receptors. *Blood* **83**: 3152-3159.

Bibliografía

Rusten LS, Jacobsen SE (1995) Tumor necrosis factor (TNF)-alpha directly inhibits human erythropoiesis in vitro: role of p55 and p75 TNF receptors. *Blood* **85**: 989-996.

Rusten LS, Smeland EB, Jacobsen FW, Lien E, Lesslauer W, Loetscher H, Dubois CM, Jacobsen SE (1994b) Tumor necrosis factor-alpha inhibits stem cell factor-induced proliferation of human bone marrow progenitor cells in vitro. Role of p55 and p75 tumor necrosis factor receptors. *J Clin Invest* **94**: 165-172.

Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL (1996) Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell* **85**: 1037-1046.

Sanford J, Codina J, Birnbaumer L (1991) γ -subunits of G-proteins, but not their α - or β -subunits, are polyisoprenylated. *J Biol Chem* **266**: 9570-9579.

Santis AG, Campanero MR, Alonso JL, Sanchez-Madrid F (1992) Regulation of tumor necrosis factor (TNF)-alpha synthesis and TNF receptors expression in T lymphocytes through the CD2 activation pathway. *Eur J Immunol* **22**: 3155-3160.

Satoh M y Yamazaki M. (1993) In vitro DNA synthesis of mouse hepatocytes stimulated by tumor necrosis factor is inhibited by glucocorticoids and prostaglandin D2 but enhanced by retinoic acid. *J Cell Physiol* **157**: 104-109.

Satoh M, Yamazaki M (1992) Tumor necrosis factor stimulates DNA synthesis of mouse hepatocytes in primary culture and is suppressed by transforming growth factor β and interleukin 6. *J Cell Physiol* **150**: 134-139.

Sawai H, Okazaki T, Yamamoto H, Okano H, Takeda Y, Tashima M, Sawada H, Okuma M, Ishikura H, Umehara H, Domae N (1995) Requirement of Ap-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* **270**: 27326-27331.

Scuderi P (1989) Suppression of human leukocyte tumor necrosis factor secretion by the serine protease inhibitor p-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME). *J Immunol* **143**: 168-173.

Schafer WR, Kim R, Sterne R, Thorner J, Kim SH, Rine J (1989) Genetic and pharmacological suppression of oncogenic mutations in ras genes of yeast and humans. *Science* **245**: 379-385.

Schafer WR, Rine J (1992) Protein prenylation: genes, enzymes, targets, and functions. *Annu Rev Genet* **30**: 209-237.

Schall TJ, Lewis M, Koller K, Lee A, Rice GC, Wong GHW, Gatanaga T, Granger GA, Lentz R, Raab H, Kohr WJ, Goeddel DV (1990) Molecular cloning and expression of a receptor for tumor necrosis factor. *Cell* **61**: 361-370.

Schissel S, Schuchman E, Williams K, Tabas I (1996) Zn^{2+} -stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene *J Biol Chem* **271**: 18431-18436.

Schmidt RA, Schneider CJ, Glomset JA (1984) Evidence for post-translational incorporation of a product of mevalonic acid into Swiss 3T3 cell proteins. *J Biol Chem* **259**: 10175-10180.

Schoenheimer R, Breusch F (1933) Synthesis and destruction of cholesterol in the organism. *J Biol Chem* **103**: 439-448.

Schooley DA, Baker FC (1985) Juvenile hormone biosynthesis. In Kerkut GA, Gilbert LI, eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. Oxford, Pergamon, vol 7, pp 363-389.

Schultz AM, Henderson LE, Oroszlan S (1988) Fatty acylation of proteins. *Annu Rev Cell Biol.* **4**: 611-647.

Schütze S, Berkovic D, Tomsing O, Unger C, Krönke M (1991) Tumor necrosis factor induces rapid production of 1'2'dyacylglycerol by a phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *J Exp Med* **174**: 975-988.

Schütze S, Potthoff K, Machleidt T, Berkovic D, Wiegmann K, Krönke M (1992) TNF activates NF- κ B by phosphatidylcholine specific phospholipase C-induced acidic sphingomyelinase breakdown. *Cell* **71**: 765-776.

Schütze S, Scheurich P, Pfizenmaier K, Kronke M (1989) Tumor necrosis factor signal transduction. Tissue-specific serine phosphorylation of a 26-kDa cytosolic protein. *J Biol Chem* **264**: 3562-3567.

Schwandner R, Wiegmann K, Bernardo K, Kreder D, Krönke M (1998) TNF receptor death domain-associated proteins TRADD and FADD signal activation of acid sphingomyelinase. *J Biol Chem* **273**: 5916-5922.

Shakhov NA, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV (1990) Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* **171**: 35-47.

Bibliografía

Sharp PA, Sugden B, Sambrook J (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**: 3055-3063.

Shear MJ, Andervont HB (1936) *Proc Soc Exp Biol Med* **34**: 323-325.

Sheehan KC, Pinckard JK, Arthur CD, Dehner LP, Goeddel DV, Schreiber RD (1995) Monoclonal antibodies specific for murine p55 and p75 tumor necrosis factor receptors: identification of a novel in vivo role for p75. *J Exp Med* **181**: 607- 617.

Shimizu T, Pommier Y (1997) Camptothecin-induced apoptosis in p53-null human leukemia HL60 cells and their isolated nuclei: effects of the protease inhibitors Z-VAD-fmk and dichloroisocoumarin suggest an involvement of both caspases and serine proteases. *Leukemia* **11**: 1238-44.

Shimoke K, Yamada M, Ikeuchi T, Hatanaka H (1998) Synthetic lipid products of PI3-kinase which are added to culture medium prevent low K⁺-induced apoptosis of cerebellar granule neurons via Akt kinase activation. *FEBS Lett* **437**: 221-224.

Shirai T, Yamaguchi H, Ito H, Todd CW, Wallace RB (1985) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor. *Nature* **313**: 803-806.

Sidoti-de Fraisse C, Rincheval V, Risler Y, Mignotte B, Vayssiere JL (1998) TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene* **17**: 1639-1651.

Simonds WF, Butrynski JE, Gautam N, Unson CG, Spiegel AM (1991) G-protein beta gamma dimers. Membrane targeting requires subunit coexpression and intact gamma C-A-A-X domain. *J Biol Chem* **266**: 5363-5366.

Sinensky M, Logel J (1985) Defective macromolecule biosynthesis and cell-cycle progression in a mammalian cell starved for mevalonate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **82**: 3257-3261.

Sinensky M, Lutz RJ (1992) The prenylation of proteins. *Bioessays* **14**: 25-31.

Siperstein MD (1984) Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. *J Lipid Res* **25**: 1462-1468.

Siperstein MD, Fagan VM (1964) Deletion of the cholesterol negative feedback system in liver tumors. *Cancer Res* **24**: 1108-1115.

Siperstein MD, Guest MJ (1960) Studies on the site of the feedback control of cholesterol synthesis. *J Clin Invest* **39**: 642-652.

Smart EJ, Ying Y-S, Conrad PA, Anderson RGW (1994) Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J Cell Biol* **127**: 1185-1197.

Smith CA, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann MP, Jerzy R, Dower SK, Cosman D, Goowin RG (1990) A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* **248**: 1019-1023.

Smith JR, Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS (1990) Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* **265**: 2306-2310.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.

Smyth MJ, Perry DK, Zhang J, Poirier GG, Hannun YA, Obeid LM (1996) prICE: a downstream target for ceramide-induced apoptosis and for the inhibitory action of Bcl-2. *Biochem J* **316**: 25-28.

Spence MW, Byers DM, Palmer FBSC, Cook HW (1989) A new Zn^{2+} -stimulated sphingomyelinase in fetal bovine serum. *J Biol Chem* **264**: 5358-5363.

Spence MW, Wakkary J, Clarke JTR, Cook HW (1982) Localization of neutral magnesium-stimulated sphingomyelinase in plasma membrane of cultured neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* **719**: 162-164.

Spiegel S, Foster D AND Kolesnick R (1996) Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 159-167.

Spies T, Blank G, Bresnahan M, Sands J, Strominger JL (1989) A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* **243**: 214-217.

Srikant CB (1995) Cell cycle dependent induction of apoptosis by somatostatin analog SMS 201-995 in AtT-20 mouse pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* **209**: 400-406.

Stark HC, Weinberger O, Weinberger J (1992) Common double- and single-stranded DNA binding factor for a sterol regularory element. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2180-2184.

Bibliografía

Stark WW Jr, Blaskovich MA, Johnson BA, Quian Y, Vasudenvan A, Pitt B, Hamilton AD, Sehti SM, Davies P (1998) Inhibiting geranylgeranylation blocks growth and promotes apoptosis in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **275** (1 Pt 1): L55-63.

Staveley BE, Ruel L, Jin J, Stambolic V, Mastronardi FG, Heitzler P, Woodgett JR, Manoukian AS (1998) Genetic analysis of protein kinase B (AKT) in *Drosophila*. *Curr Biol* **8**: 599-602.

Stewart BW (1994) Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* **86**: 1286-1296.

Su X, Sullivan TF, Burstjan S, Berman SA (1994) Optimized chemiluminiscent detection of DNA amplified in the exponential phase of PCR. *Biotechniques* **17**: 734-736.

Südhof TC, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL (1987b) 42 bp element from LDL receptor gene confers end-product repression by sterols when inserted into viral TK promoter. *Cell* **48**: 1061-1069.

Südhof TC, Van der Westhuyzen DR, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW (1987a) Three direct repeats and a TATA-like sequence are required for regulated expression of the human low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* **262**: 10773-10779.

Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernandez-Alnemri T, Litwack G, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1996) Cleavage of lamin A by Mch2 α but not CPP32: multiple interleukin 1 β -converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 8395-8400.

Takehara T, Hayashi N, Mita E, Kanto T, Tatsumi T, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M (1998) Delayed Fas-mediated hepatocyte apoptosis during liver regeneration in mice: hepatoprotective role of TNF alpha. *Hepatology* **27**: 1643-1651.

Tanaka RD, Edwards PA, Lan SF, Fogelman AM (1983) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in avian myeloblasts. Mode of action of 25-hydroxycholesterol. *J Biol Chem* **258**: 13331-13339.

Taylor FR, Saudier SE, Shown EP, Parish EJ, Kandutsch AA (1984) Correlation between oxysterol binding to a cytosolic binding protein and potency in the repression of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem* **259**: 12382-12387.

Tepper AD, Boesen-De Cock JRD, De Vries E, Borst J, Van Blitterswijk WJ (1997) CD95/Fas-induced ceramide formation proceeds with slow kinetics and is not blocked by caspase-3/CPP32 inhibition. *J Biol Chem* **272**: 24308-24312.

Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM (1995) Yama/CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81**: 801-809.

Thoma B, Grell M, Pfizenmaier K, Scheurich P (1990) Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses. *J Exp Med* **172**: 1019-1023.

Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**: 1312-1316.

Toker A, Cantley LC (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* **387**: 673-676.

Tomkins G, Sheppard H, Chaikoff IL (1953) Cholesterol synthesis by liver. III. Its regulation by ingested cholesterol. *J Biol Chem* **201**: 137-141.

Torti FM, Dieckmann B, Beutler B, Cerami A, Ringold GM (1985) A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia. *Science* **229**: 867-869.

Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry, Cerami A (1987) Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* **330**: 662-664.

Trentalance A, Leoni S, Mangiantini MT, Spagnuolo S, Feingold K, Hughes-Fulford M, Siperstein M, Cooper AD, Erickson SK (1984) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and cholesterol synthesis and esterification during the first cell cycle of liver regeneration. *Biochem Biophys Acta* **794**: 142-151.

Vallet SM, Sanchez HB, Rosenfeld JM, Osborne TF (1996) A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *J Biol Chem* **271**: 12247-12253.

Vandenabeele P, Declercq W, Vanhaesebroek B, Grooten J, Fiers W (1995) Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. *J Immunol* **154**: 2904-13.

Bibliografía

Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fucks Z, Kolesnick R (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* **380**: 75-79.

Vilcek J, Lee TH (1991) Tumor necrosis factor, new insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* **266**: 7313-7316.

Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1997) Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* **22**: 388-393.

Vorburger K, Kitten GT, Nigg EA (1989) Modification of nuclear lamin proteins by mevalonic acid occurs in reticulocyte lysates and requires the cysteine residue of the C-terminal CXXM motif. *EMBO J* **8**: 4007-4013.

Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E, Beyaert R, Vandenabeele P, Fiers W (1997) Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding. *FEBS Lett* **410**: 96-106.

Wang MA, Creasey A, Ladner MB, Lin LS, Strickler J, Van Arsdel JN, Yamamoto R, Mark DF (1985) Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* **228**: 149-154.

Wang X, Briggs MR, Hua X, Yokoyama C, Goldstein JL, Brown MS (1993) Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *J Biol Chem* **268**: 14497-14504.

Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL (1994) SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* **77**: 53-62.

Wang X, Zelenski NG, Yang J, Sakai J, Brown MS, Goldstein JL (1996) Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. *EMBO J* **15**: 1012-1020.

Ware CF, Vanarsdale S, Vanarsdale TL (1996) Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families. *J Cell Biochem* **60**: 47-55.

Weinberger C (1996) A model for farnesoid feedback control in the mevalonate pathway. *Trends Endocrinol Metab* **7**: 1-6.

Westwick JK, Bielawska AE, Dbabibos G, Hannun A, Brenner DA (1995) Ceramide activates the stress-activated protein kinases. *J Biol Chem* **270**: 22689-22692.

- Wiegmann K, Schülze S, Machleidt T, Witte D, Krönke M** (1994) Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* **78**: 1005-1015.
- Wiegmann TH, Schütze S, Kampen E, Himmler A, Machleidt T, Krönke M** (1992) Human 55-kDa receptor for tumor necrosis factor coupled to signal transduction cascades. *J Biol Chem* **267**: 17997-18001.
- Williams GT** (1991) Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. *Cell* **65**: 1097-1098.
- Williams GT, Smith CA, McCarthy NJ, Grimes EA** (1992) Apoptosis: final control point in cell biology. *Trends Cell Biol* **2**: 263-267.
- Williams MA, Kouroumoussis I, Syndercombe-Court D, Hendry L, Newland AC, Kelsey SM** (1995) Administration of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after chemotherapy regulates the expression and secretion of monocyte tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptors p55 and p75. *Blood* **86**: 4234-4242.
- Williams TW, Granger GA** (1968) Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species. *Nature* **219**: 1076-1077.
- Wissing D, Mouritzen H, Egeblad M, Poirier GG, Jaattela M** (1997) Involvement of caspase-dependent activation of cytosolic phospholipase A2 in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5073-5077.
- Witte LD, Cornicelli JA, Miller RW, Goodman DS** (1982) Effects of platelet-derived and endothelial cell-derived growth factors on the low-density lipoprotein receptor pathway in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* **257**: 5392-5401.
- Wolda SL, Glomset JA** (1988) Evidence for modification of lamin B by a product of mevalonic acid. *J Biol Chem* **263**: 5997-6000.
- Wolf RA, Dobrowsky RT, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA** (1994) Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *J Biol Chem* **269**: 19605-19606.
- Worman HJ, Evans CD, Blobel G** (1990) The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *J Cell Biol* **111**: 1535-1542.
- Worman HJ, Yuan J, Blobel G, Georgatos SD** (1988) A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8531-8534.

Bibliografía

Wright SC, Kumar P, Tam AW, Shen N, Varma M, Larrick JW (1992) Apoptosis and DNA fragmentation precede TNF-induced cytolysis in U937 cells. *J Cell Biochem* **48**: 344-355.

Wyllie AH (1997) Apoptosis and carcinogenesis. *Eur J Cell Biol* **73**: 189-197.

Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ y Fausto N (1997) Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 1441-1446.

Yamashita K, Takahashi A, Kobayashi S, Hirata H, Mesner PW, Kaufmann SH, Yonehara S, Yamamoto K, Uchiyama T, Sasada M (1999) Caspases mediate tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood* **93**: 674-685.

Yang Z, Constanzo M, Golde DW, Kolesnick RN (1993) Tumor necrosis factor activation of the sphingomyelin pathway signals nuclear factor κ B translocation in intact HL-60 cells. *J Biol Chem* **268**: 20520-20523.

Yao B, Zhang Y, Delikat S, Mathias S, Basu S, Kolesnick R (1995) Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature* **378**: 307-310.

Yao TP, Segraves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM (1992) Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* **71**: 63-72.

Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* **75**: 187-197.

Yuan J (1997) Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 247-251.

Zhang FL, Casey PJ (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* **65**: 241-269.

Zhang YH, Lin JX, Vilcek J (1988) Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts: role in the induction of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6802-6805.