

Detección de interacciones proteína-proteína del producto de los proto-oncogenes c-fgr y fyn

OCTAVIO MIGUEL RIVERO
LEZCANO

INTRODUCCIÓN

El cáncer se podría describir, en líneas generales, como el crecimiento incontrolado de células. Este crecimiento, en células normales, está estrictamente regulado por numerosas proteínas, en respuesta a señales que la célula recibe del organi-

smo. Las señales pueden ser muy diversas, así como las respuestas, en las que se incluyen principalmente la multiplicación celular o la formación de células especializadas a partir de células inmaduras.

Uno de los más importantes mecanismos de regulación del crecimiento celular es a través de la fosforilación (inserción de un grupo fosfato) en el aminoácido tirosina de diversas proteínas. Esta fosforilación es llevada a cabo por las proteína-tirosina-kinasas. Una molécula fosforilada puede cambiar su forma o unirse a otras proteínas que no la reconocerían en ausencia de ese grupo fosfato. De esta forma, a través de fosforilaciones de unas proteínas a otras se forma una "ruta" de transmisión de señales desde la superficie de la célula hasta el núcleo, donde se encuentra el

ADN (ácido desoxirribonucleico), último responsable de la regulación del funcionamiento de la célula.

Se han descrito decenas de proteína-tirosina-kinasas en los últimos 15 años, pero la primera descubierta fue la proteína p60^{src} ("p" es la inicial de proteína, 60 es un número que indican su peso molecular, y src es su nombre específico). Posteriormente, y a medida que se añadían nuevas proteínas a la lista, se advirtió que algunas de ellas eran muy similares a src, mientras que otras eran radicalmente diferentes. A las que presentaban una estructura semejante a src se las incluyó en la denominada *familia src*. Hasta ahora se han descrito nueve componentes de esta familia, concretamente src, lck, blk, hck, lyn, fyn, yrk, fgr y yes. Estas proteínas, cuando son norma-

les, no suelen transformar células (convertirlas en cancerosas). Pero cuando son alteradas de alguna forma muy particular (mutadas) convierten una célula normal en transformada. Por este motivo, los genes (que se encuentran en el ADN) responsables de la producción de estas proteínas se denominan oncogenes (oncología es la rama de las ciencias médicas que estudia el cáncer). Hay descritos varias decenas de oncogenes, muchos de los cuales son proteína-tirosina-kinasas, pero otros muchos no.

Considerando la gran similitud entre los componentes de la familia src, cabe preguntarse el motivo de la necesidad de más de una proteína (posiblemente con un solo miembro de la familia bastaría). Sin embargo se ha descubierto que las pequeñísimas diferencias entre estas proteínas son cruciales, y hacen que participen en una "ruta" de señales muy determinada, o en otra completamente diferente. De esta forma, el estudio de estas diferencias es crítico para la comprensión de la funcionalidad de estas proteínas.

Como se ha apuntado, dentro de la familia src se encuentran las proteínas p55^{c-fgr} y p59^{fyn} (que denominaremos en lo sucesivo fgr y fyn, por simplificar). Estos dos miembros fueron escogidos para el estudio de esas diferencias que otorgan a cada una de ellas un papel bien diferente. Los estudios realizados se basaron específicamente en la detección de proteínas que se unen a ellas en diversas circunstancias. La identificación de moléculas (como proteínas) que interaccionan específicamente con una de ellas, pero no con la otra, podrían de-

terminar la diferencia de su funcionalidad. Las moléculas que pueden unir son principalmente de dos tipos. O proteínas que van a modificar su función, o proteínas que van a ser modificadas (en este caso por fosforilación en el aminoácido tirosina).

MÉTODOS

La metodología empleada es principalmente de biología molecular. Los miembros de la familia src tienen una estructura muy semejante, que puede ser dividida en varias partes. Dos de estas partes (que se encuentran aproximadamente en el medio de las proteínas) se han denominado dominios SH2 y SH3, a los cuales se les asigna el papel de establecer las interacciones proteína-proteína antes descritas. Mediante técnicas de ADN recombinante se consiguió expresar los dominios SH2 y SH3 de las proteínas fyn y fgr como proteínas fusionadas, en bacterias. Esta técnica permite la expresión de grandes cantidades de estos dominios en microorganismo cuyo crecimiento es muy sencillo y fácil de controlar. Con posterioridad, se rompen estas bacterias, con lo cual se liberan las proteínas fusionadas que se encontraban en su interior, y se purifican. De esta forma podemos obtener miligramos de una proteína (en este caso los dominios SH2 y SH3 de fyn y fgr) que se encuentran en el interior de las células en cantidades inferiores a microgramos, y extremadamente difícil de purificar. Estas proteínas fusionadas, de origen bacteriano (pero idénticas a las de las células

humanas, por ejemplo) se pueden unir a unas perlas microscópicas (concretamente de un material denominado agarosa), que constituyen un soporte rígido, más sencillo de manejar que si se encuentran en líquido.

Otra técnica empleada es la electroforesis, que se basa en la separación de proteínas según el peso molecular, en nuestras condiciones. Una vez separadas, se transfieren a un papel donde quedan permanentemente unidas en forma de pequeñas bandas. Resumiendo, se coge una muestra de proteínas, se someten a electroforesis, y las más pequeñas correrán más rápido, con lo cual formarán bandas más abajo, quedando las más grandes arriba. Una vez transferidas e inmovilizadas en el papel, pueden ser detectadas de distintas maneras, en nuestro caso empleando la tecnología de la biotina-avidina. Esta tecnología se basa en la unión de moléculas de biotina de forma irreversible a proteínas. La avidina es una molécula que se une de forma específica y muy fuerte a la biotina. De esta forma sólo las proteínas que tienen unida la biotina (biotiniladas) serán reconocidas por la avidina. Las otras proteínas no biotiniladas no serán reconocidas aunque se encuentre presentes. La detección de la avidina se consigue porque está unida a una peroxidasa, una proteína que en presencia del sustrato apropiado produce la emisión de luz, que puede impresionar una película como las que se usan para radiografías.

Las técnicas aquí descritas y adaptadas por nosotros a nuestras necesidades se esquematizan en la figura 1. En primer lugar, se aíslan proteínas de la

FIGURA 1

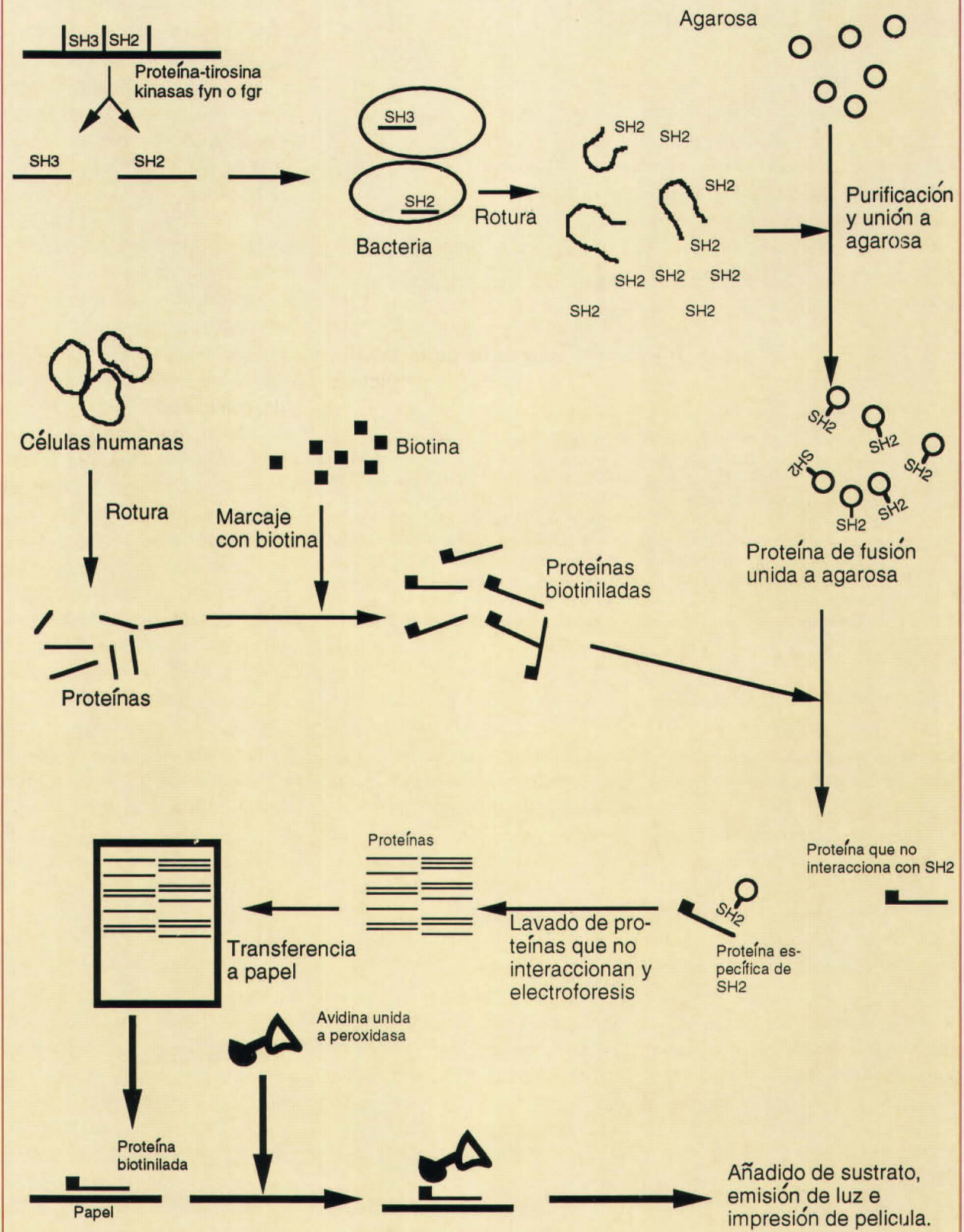


Figura 1. Esquema de los métodos utilizados en el aislamiento y detección de proteínas que se asocian específicamente a los dominios SH2 y SH3 de fyn y fgr.

FIGURA 2

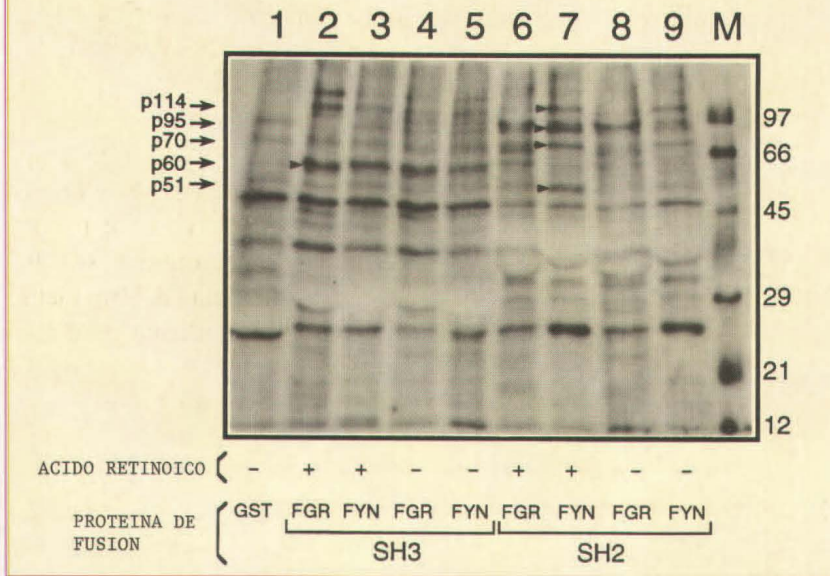


Figura 2. Identificación de proteínas celulares (línea celular HL60) que se unen específicamente a los dominios SH2 y SH3 de fyn y fgr. Los extractos de proteínas de células no tratadas (-) o tratadas (+) con ácido retinoico se biotinilaron y se incubaron con la proteína de fusión indicada. Las proteínas unidas se eluyeron mediante hervido en tampón de carga, sometidos a electroforesis y transferidos a papel. Las bandas se visualizaron empleando avidina acoplada a un enzima que emite luz en presencia del sustrato apropiado. Los pesos moleculares de los estándares se muestran en kilodalton a la derecha. Las flechas indican las proteínas que se unen a los dominios SH más significativamente, y se indican a la izquierda con sus correspondientes pesos moleculares.

línea celular HL60 (líneas celulares son células que pueden crecer indefinidamente en un laboratorio), que procede de una leucemia humana, y se las biotinila. En presencia de la proteína de fusión de los dominios SH2 o SH3 de las proteínas fyn o fgr, sólo aquellas proteínas que reaccionan específicamente quedarán unidas a las perlas de agarosa a través de los dominios SH. El resto de las proteínas, que no están unidas, se pueden lavar fácilmente y eliminar de la muestra. Todas estas proteínas específicas de los dominios SH se someten a electroforesis, y se las separa en forma de bandas, que se transfieren a un papel especial donde quedan inmovilizadas. Como estas proteínas tienen unida

biotina (se dice que están marcadas con biotina), podrán acoplar avidina, que puede luego ser detectada al exponerse a una película de radiografía.

RESULTADOS

Empleando las técnicas puestas a punto por nosotros y descritas en Métodos, creamos células HL60 en presencia de ácido retinoico o en su ausencia. El ácido retinoico es una sustancia que puede hacer que estas células inmaduras (leucémicas) se especialicen a granulocitos (una de las células que componen los glóbulos blancos de la sangre).

Una particularidad de estas células es que en el estado inmaduro poseen la proteína fyn sólo, pero cuando maduran a granulocitos expresan tanto fyn como fgr. Este hecho las convierte en un buen modelo para estudiar la presencia de proteínas específicas de los dominios SH de fgr que puedan aparecer o desaparecer durante la maduración.

Empleando esta adaptación de la tecnología de la biotina-avidina a nuestras necesidades hemos sido capaces de identificar proteínas que se unen específicamente al dominio SH2 de fyn, pero no de fgr. En la figura 2 podemos observar los resultados de estos experimentos. El control negativo lo establece la línea GST (nombre de la proteína de fusión bacteriana adyacente a los dominios SH2 y SH3 de fyn y fgr) en la figura. Cualquier banda que aparezca en esta línea es inespecífica, resultado de proteínas bacterianas contaminantes, o celulares que se han unido a la agarosa. En el resto de las líneas aparecerán estas mismas bandas, en adición a las que específicamente se unen a los dominios SH de fyn o fgr.

El primer aspecto a señalar son las grandes diferencias en el patrón de bandas de los dominios SH2 y SH3. Esto demuestra claramente que ambos dominios detectan un rango de proteínas bien diferente, y que cada uno de ellos, de acuerdo con este hecho, debe realizar una función diferente. Sin embargo, son pocas las diferencias observadas en las proteínas que se unen a los dominios SH3 tanto de los genes fyn como fgr, y en células HL60 maduras o inmaduras. La proteína de mayor relevancia que se une

a este dominio parece ser la p60. De este detalle podemos deducir que este dominio parece cumplir la misma función en ambos genes.

El caso del dominio SH2 es más complejo. Si bien podemos apreciar que todas las proteínas reconocidas por fgr (principalmente la proteína p95), lo son también por fyn, hay algunas que se unen a fyn específicamente y no a fgr (concretamente las proteínas p51, p70 y p114), aunque como hemos señalado son todas diferentes de las que se unen a cualquiera de los dominios SH3. Así pues, este hecho puede justificar en parte la existencia de varios miembros de la familia src, aunque sean todos muy similares. Aunque estas dos proteínas son las dos tirosina-kinasas, de estos datos podemos deducir que no se unen a las mismas proteínas. Aunque su función sea la misma (fosforilar el aminoácido tirosina de ciertas proteínas, posiblemente las detectadas en este trabajo), parece que su lugar de actuación es diferente.

Por otro lado, y en contra de lo esperado, ninguna nueva proteína se une a ninguna de las proteínas de fusión después de la maduración. La única diferencia con respecto a este factor es la mayor intensidad de la banda que corresponde a la proteína p51, específica del dominio SH2 de fyn. Este hecho se puede deber o bien a que la proteína es más expresada en células maduras que inmaduras (con lo cual se encuentra disponible en mayor cantidad) o, por otro lado, que es modificada de alguna forma desconocida de forma que, siendo igual el número total de moléculas presentes, un porcentaje mayor

del total se une más a este dominio en células maduras.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos expuesto el desarrollo de una nueva adaptación de la tecnología avidina-biotina para el marcaje de proteínas. El método más habitualmente empleado para el marcaje de proteínas es la radioactividad. La detección de las proteínas, en este caso, no se realiza por la emisión de luz, sino de otro tipo de radiaciones que también impresionan películas de radiografía, obteniéndose el mismo tipo de resultados. Sin embargo, son varios los inconvenientes de estas técnicas. Mientras que para marcar radioactivamente se necesita como mínimo una noche (y a menudo más), el marcaje con biotina se efectúa en treinta minutos. Otro problema lo representa la seguridad en el laboratorio, dado el peligro que supone el uso de materiales radioactivos, mientras que la biotina es completamente segura. Finalmente, la exposición a las películas suelen ser de varias horas para la radioactividad, pero de minutos para la emisión de luz por parte de la peroxidasa que se utiliza en las técnicas de avidina-biotina.

Empleando esta tecnología, por lo tanto, hemos sido capaces de detectar proteínas que específicamente se unen a cada uno de los dominios SH, bien de fyn o de fgr. Estos resultados muestran fuertes evidencias de la necesidad de más de un miembro de la familia src, atendiendo al hecho de que cada

uno de ellos reconoce un panel diferente de proteínas, a las que modifican (por fosforilación) o por las que son modificadas (de alguna forma desconocida).

Una vez detectadas estas proteínas, se abre el camino de su estudio, identificación y caracterización. El siguiente paso a tomar lo representaría su clonación (aislamiento del fragmento de ADN que codifica para esta proteína del total del ADN de la célula), y expresión en diferentes líneas celulares y bajo distintas condiciones para conocer la función que realizan en la célula, y que puede ser regulada por las proteína-tirosina-kinasas, en nuestro caso particular fyn o fgr.

El conocimiento de estos componentes pueden llegar a definir la "ruta" de señalización de la que participan estas moléculas, y detectar que tipo de anomalías dan lugar a su desregulación. Son numerosos los casos de cáncer a los que actualmente se puede atribuir la actividad defectuosa de distintas proteínas, entre las cuales se incluyen de forma importante las proteína-tirosina-kinasas. Descubrir las causas moleculares del cáncer se vislumbra como la única alternativa segura y a largo plazo que permite el desarrollo de métodos de curación que actúan sobre la base última de la aparición del cáncer, el crecimiento incontrolado de las células.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Fundación Universitaria de Las Palmas la oportunidad que me ha ofrecido para realizar estos estudios que me han permitido iniciar la línea de investigación sobre el cáncer que actualmente me encuentro desarrollando. Y muy en particular a los patrocinadores, de AHEMON, por su generosa ayuda.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Aaronson, S. (1991):** «*Growth factors and cancer*». Science, 254: 1146-1153
2. **Bolen, J. B. (1993):** «*Nonreceptor tyrosine kinase*». Oncogene, 8: 2025-2031
3. **Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C. and Pawson, T. (1991):** «*SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins*». Science, 252: 668-674
4. **Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988):** «*Single step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione-S-transferase*». Gene, 67: 31-40
5. **Wilchek, M. and Bayer, E. (1990):** «*Avidin-biotin technology*». Methods in enzymology, 184. Editado por Academic Press, Inc.

BIOGRAFÍA

Octavio Miguel Rivero Lezcano

El autor nació en Las Palmas de Gran Canaria el 17 de julio de 1965. En esta ciudad cursó sus estudios de bachillerato. Posteriormente se trasladó a Córdoba para iniciar los estudios de veterinaria, que acabaría en León, donde realizó su tesis doctoral, basada en el estudio de microorganismos patógenos para peces. Una vez acabada emprendió los estudios postdoctorales en el National Institute of Dental Research, en Maryland (Estados Unidos) sobre las bases moleculares del cáncer, y donde

se encuentra ahora en calidad de investigador invitado.

Dirección:

National Institute of Health.
National Institute of Dental Research
Bd. 30. Rm. 213
9000 Rockville Park
Bethesda, Maryland 20892
U.S.A.
Tfno.: (301) 49 66 569 - Fax: (301) 40 20 823

Este trabajo ha sido patrocinado por la firma comercial

ESTABLECIMIENTOS INDUSTRIALES AHEMON, S.A. (PEPSI-COLA)