

ELS RECEPTORS DE TIROSINA QUINASA *trk*: ACTIVITAT ONCOGÈNICA I NEUROTROFICA

MARIANO BARBACID

Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute, Princeton, NJ, EUA.

Text de la conferència de la sessió inaugural del curs 1992-1993, pronunciada a la Sala Prat de la Riba del IEC el dia 22 d'octubre de 1992.

Versió catalana de Jordi J. Gascón. Centre d'Investigació i Desenvolupament, CSIC. Barcelona.

Fins avui els oncogens han estat identificats a més d'un terç de totes les malalties humanes. Molts d'aquests oncogens han estat caracteritzats extensament a nivell molecular, i s'han posat en clar els seus mecanismes d'activació. Recentment, el desenvolupament de tècniques de diagnòstic molecular ha fet possible emprar aquests oncogens com a sondes per a una varietat d'aplicacions clíniques, incloent-hi la diagnòsi del càncer, prognosi i quantificació de malalties residuals a pacients en remissió. Tanmateix, el fi últim de l'oncologia molecular és emprar els oncogens com a dianes per a la teràpia del càncer generant inhibidors oncoogènics que no interfereixen amb la funció fisiològica dels seus al·lèls normals. El desenvolupament d'aquests inhibidors específics requerirà un coneixement més profund dels mecanismes pels quals els oncogens contribueixen a la neoplàsia i, encara més important, un coneixement precís del paper que els protooncogens tenen en les cèl·lules normals.

Durant la dècada passada ha estat dilucidat el paper fisiològic de diversos productes protooncogènics. Primerament, es va trobar que l'oncogèn *v-sis* era al·lèlic a la cadena B del factor de creixement plaquetari (PDGF) (Deuel *et al.*, 1983; Doolittle *et al.*, 1983). Més tard, es va trobar que els oncogens retrovirals *v-erbB* i *v-fms* derivaven dels protooncogens que codificaven els receptors EGF i CSF-1 respectivament (Donward *et al.*, 1984; Sherr *et al.*, 1985). Més recentment, la proteïna *c-ErbA* demostrà ser un receptor d'alta afinitat per a les hormones tiroidees (Sap *et al.*, 1986), el producte del protooncogèn *c-Kit* es va identificar com a receptor per als factors estimuladors de colònies (CSF) (Huang *et al.*, 1990; Zsebo *et al.*, 1990), i es va trobar que la proteïna *Met* era el receptor del factor de creixement d'hepatòcits (HGF) (Bottaro *et al.*, 1991; Naldini *et al.*, 1991). Altres exemples d'assignacions recents de funcions biològiques definides als productes dels protooncogens inclouen la identificació de

la proteïna *c-Mos* com a component del factor citostàtic responsable d'evitar l'entrada dels oècits en el cicle mitòtic (Sagata *et al.*, 1989), i la identificació de les proteïnes *c-Fos*, *c-Jun* i *c-Rel* com a membres dels factors de transcripció AP-1 (*c-Fos* i *c-Jun*) (revisat a Curran i Franza, 1988) i NF- κ B (*c-Rel*) (Ghosh *et al.*, 1990; Kieran *et al.*, 1990).

L'any passat (1991) es van dilucidar les funcions normals d'un altre protooncogèn, *trk*. El locus *trk* fou primer identificat com un gen transformant a una biòpsia de carcinoma de còlon humà (Martín-Zanca *et al.*, 1986; Pulciani *et al.*, 1982). L'anàlisi molecular de les seqüències gèniques de *trk* indicava que aquest locus codificava un nou receptor de superfície cel·lular de la família de proteïnes tirosina quinasa (Martín-Zanca *et al.*, 1989). Estudis posteriors revelaren que el producte del protooncogèn *trk* servia com a prototipus per a una subfamília de receptors de tirosina quinasa que incloïa els productes dels gens relacionats *trkB* (Klein *et al.*, 1989; Middlemas *et al.*, 1991) i *trkC* (Lamballe *et al.*, 1991). Estudis recents indiquen que la família *trk* de proteïnes tirosina quinasa són els receptors funcionals de la família de neurotrofines NGF.

La família de neurotrofines NGF

El factor de creixement nerviós (NGF) es va descobrir quaranta anys enrera com una substància difusible capaç d'induir el sobrecreixement neurític a cèl·lules extrems d'arrels dorsals i ganglis simpàtics (Levi-Montalcini, 1987). El 1982, Barde i col·laboradors informaren de l'aïllament d'un segon factor neurotròfic, designat factor neurotròfic obtingut de cervell (BDNF), capaç d'induir el sobrecreixement neurític i de facilitar la supervivència de les neurones sensorials embrioniques de pollastre (Barde *et al.*, 1982). El 1989, la clonació molecular del gen que codifica el BDNF revelà

que aquest factor neurotròfic estava altament relacionat amb l'NGF (Leibrock *et al.*, 1989). Aquestes observacions portaren a la recerca basada en tècniques de PCR de neurotrofines addicionals que hi estigueren relacionades. Fins ara, aquests esforços han portat a la identificació de dues noves neurotrofines anomenades *neurotrofina-3* (NT-3), també coneguda per *factor neurotròfic derivat de l'hipocamp* (HDNF) i *factor de creixement nerviós-2* (NGF-2) (Ernfors *et al.*, 1990; Hohn *et al.*, 1990; Jones i Reichardt, 1990; Kaisho *et al.*, 1990; Maisonpierre *et al.*, 1990; Rosenthal *et al.*, 1990) i *neurotrofina-4* (NT-4), també coneguda per *neurotrofina-5* (NT-5) (Berkemeier *et al.*, 1991; Halböök *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1992). Aquests factors tròfics són sintetitzats com a precursors polipeptídics, els quals són seguidament trencats per produir les neurotrofines madures. Aquestes molècules són homodímers de 115 a 130 aminoàcids que comparteixen almenys el 50 % de la seva seqüència i inclou sis residus conservats de cisteïna. La recent resolució de l'estructura cristal·lina de l'NGF ha mostrat que les dues subunitats s'associen a través d'una superfície horitzontal formada per tres cadenes beta antiparal·leles, mentre que els residus més variables estan agrupats en tres girs beta en forqueta localitzats a les regions exteriors de la molècula, i que presumiblement estan implicats en el reconeixement del receptor (McDonald *et al.*, 1991).

Els receptors NGF

La disponibilitat de NGF radioionitzat altament purificat a finals dels setanta portà a una sèrie d'estudis d'unió i entrecreuament que resultaren en la identificació bioquímica dels seus receptors (Sutter *et al.*, 1979; Massague *et al.*, 1981; Schechter i Bothwell, 1981). Molts d'aquests estudis primaris sostenien el concepte que l'NGF reconeix dues classes diferents de receptors de la superfície cel·lular (Bernd i

Greene, 1984; Hosang i Shooter, 1985, 1987). S'han de confirmar els informes que indiquen que l'NGF també s'uneix als receptors nuclears de cromatina (Rakowicz-Szuiczyńska *et al.*, 1986, 1988). Els dos tipus de receptors de la superfície cel·lular de l'NGF poden ser distingits per les seves diferents propietats farmacològiques (revisat per Meakin i Shooter, 1992). Una classe de receptors de l'NGF presenta una alta afinitat d'unió (K_d al baix rang picomolar), té una cinètica de dissociació lenta, és resistent al tractament amb tripsina i és capaç d'internalitzar l'NGF. Aquests receptors d'alta afinitat només es poden trobar en aquelles cèl·lules que se sap que

responen a les propietats tròfiques de l'NGF.

La segona classe de receptors s'uneix a l'NGF amb molta més baixa afinitat (K_d al rang nanomolar), té una cinètica de dissociació ràpida, és sensible al tractament amb tripsina i no internalitza l'NGF (Meakin i Shooter, 1992). Aquests receptors de baixa afinitat estan expressats a una ampla varietat de tipus cel·lulars, molts dels quals no responen a l'NGF. En aquelles cèl·lules en les quals els receptors de baixa i alta afinitat estan coexpressats, els de baixa afinitat són normalment cinc o deu vegades més abundants. Els estudis de entrecruament mostraren que mentre que els receptors d'alta

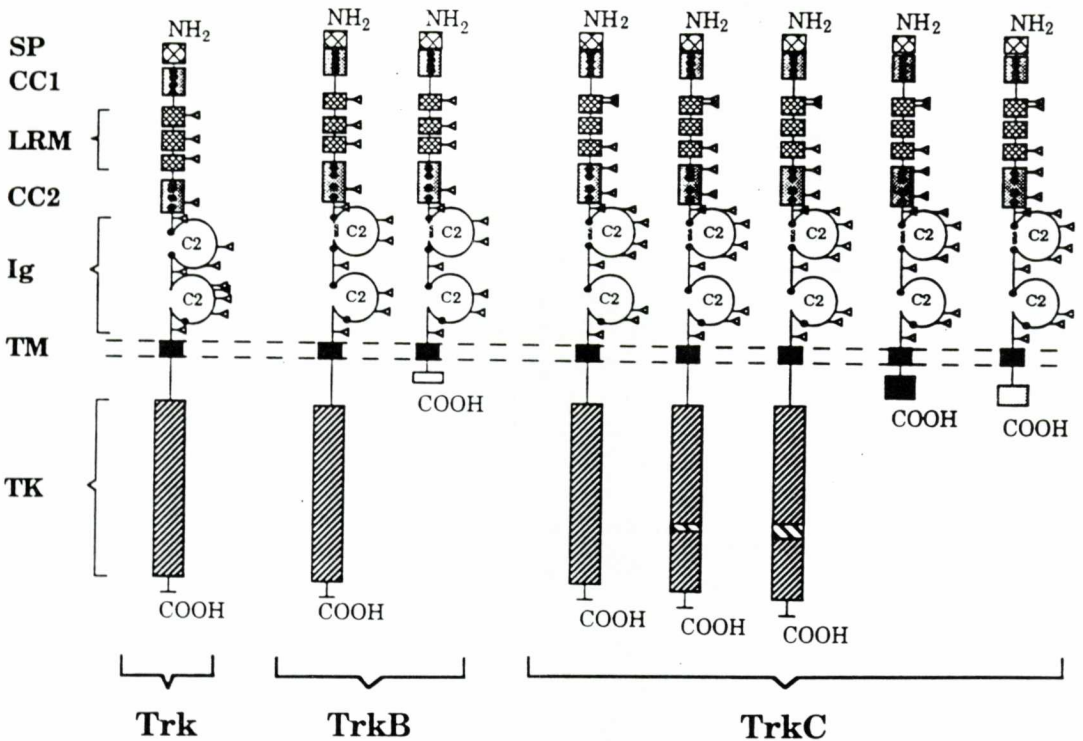


FIGURA 1. Representació esquemàtica de les estructures de diversos membres de la família *trk* de receptors de neurotrofines. Els motius estructurals extracel·lulars il·lustrats inclouen un pèptid senyal (caixa puntejada), tres motius rics en leucina (LRM), dos agrupaments de cisteïna (CC) i dos dominis similars als de les Ig (IgC2), residus conservats de cisteïna (punts negres), també s'indiquen els llocs de N-glicolització (triangles invertits). Els dominis transmembrana estan representats per caixes negres. El domini proteïna tirosina quinasa està indicat per caixes ombrejades. Seqüències úniques d'aminoàcids presents a l'extrem carboxiterminal (COOH) dels tres receptors no catalítics estan indicades per caixes obertes (*trkB*), caixes fortament ombrejades i puntejades (*trkC*). Finalment, els residus aminoàcids addicionals presents al domini de la proteïna tirosina quinasa dels receptors isoforms del gp145^{trkC} estan indicats per caixes ombrejades en direcció oposada a les del domini quinasa.

afinitat variaven en mida des de 130 a 150 kD, els de baixa afinitat eren molècules petites de 75 a 80kD (Meakin i Shooter, 1992).

Característiques estructurals de la família de receptors *trk*

El protooncogèn *trk* humà codifica una proteïna de 790 aminoàcids que té les característiques representatives dels receptors cel·lulars de superfície de proteïna tirosina quinasa (vegeu la fig. 1). Contenen un pèptid senyal de 32 aminoàcids, un suposat domini d'unió de lligands ric en llocs de N-glicolització, un únic domini transmembrana, una regió catalítica altament relacionada amb la de les conegudes proteïnes tirosina quinasa, i una curta cua carboxiterminal de quinze aminoàcids (Martin-Zanca *et al.*, 1989).

L'anàlisi de la deduïda seqüència aminoacídica del producte del protooncogèn *trk* indica que aquest gen no pertany a cap de les subfamílies ben caracteritzades dels receptors cel·lulars de superfície tirosina quinasa (Hanks *et al.*, 1988). Per exemple, el seu domini extracel·lular juntament amb els dels receptors *trkB* i *trkC*, mostra una disposició única de motius estructurals indicatius d'una diferent subfamília de receptors de proteïna tirosina quinasa (vegeu la fig. 1). La meitat aminoterminal del domini extracel·lular conté tres tàndems rics en leucines (LRM) de 24 aminoàcids flanquejats per dos agrupaments de cisteïnes (CC) que abasten vuit dels dotze residus de cisteïna conservats a tots els receptors de la família *trk* (Schneider i Schweiger, 1991). Aquesta propietat estructural és característica de la superfamília de proteïnes LRM, la qual conté proteïnes de diverses funcions com les del receptor del factor von Willebrand plaquetari humà, l'inhibidor de la ribonucleasa/angiogenina, proteïnes d'adhesió cel·lular, i components de la matriu extracel·lular (Schneider i Schweiger, 1991). Hom suposa que aquests motius estan implicats a mitjançar en interaccions íntimes i específiques proteïna-proteïna.

La meitat carboxi del domini extracel·lular

de *trk* conté dos dominis semblants als de les immunoglobulines del tipus C2 (Schneider i Schweiger, 1991) (vegeu la fig. 1). El primer domini semblant al de les Ig conté dues cisteïnes conservades presumiblement implicades a generar enllaç disulfur canònic. El segon domini semblant al de les Ig ha mantingut un dels dos residus de cisteïna, mentre que l'altra cisteïna ha estat substituïda per una leucina. Els dominis semblants als de les Ig han estat identificats prèviament en altres proteïnes tirosina quinasa de la superfície cel·lular, com els receptors per el PDGF, CSF-1, SF i FGFs. Tanmateix, el domini semblant a les Ig del *trk* sembla estar més íntimament relacionat al de les molècules d'adhesió cel·lular com l'N-CAM. És interessant destacar que l'homòleg de *Drosophila* al receptor *trk* de mamífers, *Dtrk*, també conté dos dominis semblants als de les IgC2 molt similars a aquells presents als seus equivalents mamífers. La proteïna *Dtrk* poseeix quatre motius addicionals semblants a les Ig (dos del tipus C2 i dos del tipus V) a la seva meitat aminoterminal en comptes dels LRM (Pulido *et al.*, 1992). Estudis recents han indicat que la proteïna *Dtrk* fa de mitjancera de l'agregació cel·lular *in vitro*, un procés que porta cap a l'activació del seu domini proteïna tirosina quinasa (Pulido *et al.*, 1992). La comprensió del paper biològic específic del receptor *Dtrk* a *Drosophila*, pot explicar la naturalesa de la pressió evolutiva requerida per mantenir el dos dominis carboxiterminals semblants als de les Ig de tipus C2 als receptors *trk* de mamífers, mentre que permeten l'evolució divergent de les seves corresponents meitats aminoterminals.

Funcions biològiques del receptor *trk*

Estudis recents han indicat que el producte del protooncogèn *trk*, gp140^{trk}, és el receptor funcional per el factor de creixement nerviós (NGF) (vegeu la fig. 2). Les proves experimentals en què es basa aquesta conclusió inclouen les següents:

a) L'NGF s'uneix a les cèl·lules que expressen el protooncogen *trk* i pot ser entrecruat químicament als receptors $gp140^{trk}$ (Hempstead *et al.*, 1991; Kaplan *et al.*, 1991b; Klein *et al.*, 1991a).

b) L'addició de l'NGF a les cèl·lules feocromocitomàtiques PC12 de rata o, a les cèl·lules NIH3T3 que expressen ectòpicament el protooncogen *trk* humà, provoca la ràpida fosforilació del $gp140^{trk}$ als residus de tirosina (Kaplan *et al.*, 1991a,b; Klein *et al.*, 1991a).

c) L'addició de l'NGF a les cèl·lules NIH3T3 que expressen ectòpicament els receptors $gp140^{trk}$ induïx l'expressió de *c-Fos*, la síntesi d'ADN i la transformació morfològica a llarg termini (Cordon-Cardo *et al.*, 1991).

d) L'NGF pot induir la maduració meiótica dels oòcits de *Xenopus* que expressen el $gp140^{trk}$ (Nebreda *et al.*, 1991).

e) La transfecció del protooncogen *trk* en cèl·lules mutants PC12 que no responen a l'NGF,

restableix tota la seva resposta a l'NGF, incloent-hi la seva capacitat per diferenciar-se a cèl·lules similars a neurones (Loeb *et al.*, 1991).

Funció biològica del receptor *trkB*

Estudis recents han indicat que la proteïna tirosina quinasa $gp145^{trkB}$ és el receptor funcional per al menys dos membres diferents de la família de neurotrofines de l'NGF, el factor neurotròfic obtingut de cervell (BDNF) i el recentment aïllat NT-4 de *Xenopus* (XNT-4) (vegeu la fig. 2). Les evidències experimentals que recolzen aquesta afirmació són:

a) Les cèl·lules NIH3T3 que expressen els receptors $gp145^{trkB}$ però no pas els $gp140^{trk}$ o els $gp145^{trkC}$ uneixen eficientment el BDNF (Klein *et al.*, 1991b; Soppet *et al.*, 1991; Squinto *et al.*, 1991) i XNT-4 (Klein *et al.*, 1992). A més, s'ha demostrat la unió del BDNF a les cèl·lules

trk Family of Neurotrophin Receptors

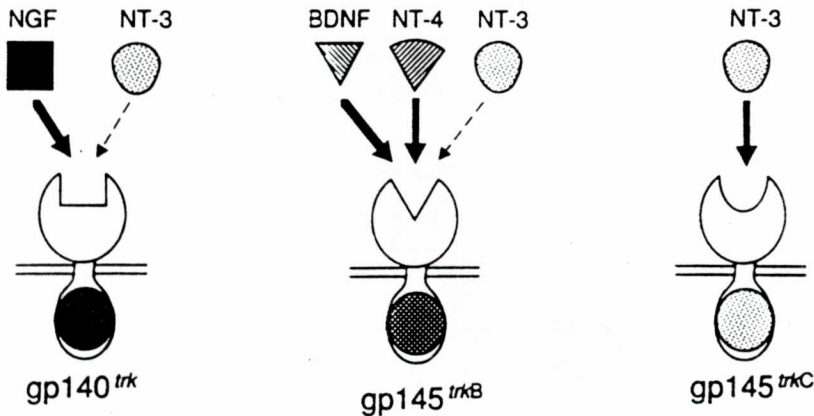


FIGURA 2. Representació esquemàtica de les interaccions conegudes entre la família de neurotrofines NGF i la família *trk* de receptors de la proteïna tirosina quinasa. Les línies puntejades indiquen activitat biològica limitada.

hipocampals de ratolí que expressaven el gp145^{trkB} (Soppet *et al.*, 1991).

b) El BDNF pot ser entrecruat químicament al gp145^{trkB} (Soppet *et al.*, 1991; Squinto *et al.*, 1991).

c) El BDNF (Klein *et al.*, 1991b; Soppet *et al.*, 1991; Squinto *et al.*, 1991) i XNT-4 (Klein *et al.*, 1992) indueixen la ràpida fosforilació del gp145^{trkB} als residus de tirosina. Aquest efecte no es pot observar als receptors gp140^{trk} i gp145^{trkC}.

d) La coexpressió del gp145^{trkB} amb el BDNF (Klein *et al.*, 1991b) o amb l'XNT-4 (Klein *et al.*, 1992) a les cèl·lules NIH3T3 porta a la seva transformació morfològica.

e) El BDNF indueix la supervivència de les cèl·lules NIH3T3 a sèrum lliure de medis només quan aquestes cèl·lules expressen el gp145^{trkB} (Glass *et al.*, 1991).

f) L'addició del BDNF o de l'XNT-4 a les cèl·lules PC12 que expressen ectòpicament el receptor gp145^{trkB} provoca la seva diferenciació a neurones semblants a les simpàtiques (Klein *et al.*, 1992; Squinto *et al.*, 1991).

Funció biològica del receptor TrkC

Estudis recents han demostrat que la proteïna tirosina quinasa gp145^{trkC} és el receptor primari de l'NT-3 (Lamballe *et al.*, 1991) (vegeu la fig. 1). Les evidències experimentals que recolzen aquesta afirmació són:

a) L'NT-3, però no pas l'NGF, el BDNF o l'NT-4, s'uneix a les cèl·lules NIH3T3 que expressen els receptors gp145^{trkC} (Lamballe *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1992). Com s'ha observat al receptor gp140^{trk}, l'NT-3 s'uneix al gp145^{trkC} amb alta afinitat (26 pM) sense requerir la contribució dels receptors de baixa afinitat gp75^{LNGFR} (Lamballe *et al.*, 1991).

b) L'NT-3 pot ser entrecruat químicament al gp145^{trkC}.

c) L'addició de l'NT-3, però no pas de qualsevol altre dels membres coneguts de la família de neurotrofines NGF, indueix la fosforilació dels receptors gp145^{trkC} als residus de tirosina (Lamballe *et al.*, 1991).

d) L'NT-3 indueix la síntesi de DNA a les cèl·lules NIH3T3 només quan expressen els receptors gp145^{trkC}. Encara més, la coexpressió

Tumor humà	Incidència	Mecanisme d'activació
Carcinoma de còlon	Esporàdica	Substitució del domini d'unió al lligand per la tropomiosina
Tiroide carcinoma papil·lar	17 % (7/42)	Substitució del domini d'unió al lligand per seqüències heteròlogues que inclouen tropomiosina i <i>trp</i>

FIGURA 3. Implicacions dels oncogens *trk* a la neoplàsia humana

constitutiva de l'NT-3 i del gp145^{trkC} porta a la transformació morfològica eficient de les cèl·lules NIH3T3 (Lamballe *et al.*, 1991).

e) L'NT-3 pot induir la diferenciació de les cèl·lules PC12 a cèl·lules semblants a neurones darrera l'expressió ectòpica dels receptors gp145^{trkC} (Lamballe *et al.*, observacions no publicades).

Els gens *trk* i la neoplàsia humana

L'oncogen *trk* (inicialment anomenat *oncD*) va ser un dels primers gens transformants identificats a les malalties humanes (Martín-Zanca *et al.*, 1986; Pulciani *et al.*, 1982). Aquest oncogen fou detectat durant el curs d'un assaig de transferència gènica emprant ADN aïllat d'una biòpsia de carcinoma de còlon. Tanmateix, estudis recents indiquen que els oncogens *trk* són activats més freqüentment als carcinomes papil·lars de tiroïdes (Bongarzone *et al.*, 1989) (vegeu la fig. 3)

Mecanismes d'activació dels oncogens *trk*

La comparació de diverses seqüències aminoterminals del oncogen *trk* activats en els tumors humans no ha demostrat cap estructura comuna que pugui ser considerada responsable de les seves propietats transformadores. Una característica comuna a aquests oncogens *trk* és que han perdut les seves seqüències del pèptid senyal, per tant, els seus productes són preferentment localitzats al citoplasma. Tanmateix, diverses línies de resultats apunten contra la possibilitat que un canvi en la localització subcel·lular de la quinasa *trk* pugui ser responsable de les seves propietats neoplàstiques (Barbacid *et al.*, 1991).

L'anàlisi bioquímica dels diversos productes

oncogènics *trk*, mostraren que els nivells de l'activitat proteïna tirosina quinasa d'aquestes oncoproteïnes *in vitro* era similar a l'observada al receptor gp140^{trk} normal. Resultats similars han estat obtinguts *in vivo*, quan s'han examinat els nivells de fosforilació als residus de tirosina d'aquestes proteïnes mitjançant una anàlisi de Western blot emprant anticossos antifosfotirosina. Tanmateix, sota aquestes condicions la fosforilació de les tirosines del gp140^{trk} va ésser absolutament dependent de la presència del seu lligand afí, NGF. Aquestes observacions suggereixen que els oncogens *trk* deuen la seva activitat transformant a la activació constitutiva dels seus respectius dominis catalítics. Proves addicionals per a aquesta hipòtesi són proveïdes per les nostres recents observacions, segons les quals, l'expressió constitutiva de cadascun dels receptors *trk* amb els seus lligands a les cèl·lules NIH3T3, indueix la seva transformació morfològica amb una eficiència comparable a l'observada a l'oncogen *trk* de carcinoma de còlon (Cordon-Cardo *et al.*, 1991).

L'activació fisiològica dels receptors proteïna tirosina quinasa pels seus lligands afins està, probablement, mitjançada per un pas d'oligomerització que provoca una transfosforilació de residus específics de tirosina (Ullrich i Schlessinger, 1990). Resultats preliminars obtinguts al nostre laboratori suggereixen que els receptors gp140^{trk} també s'activen per un pas de dimerització induïda per l'NGF (Jing *et al.*, observacions no publicades). Per tant, és possible que les proteïnes *trk* poden deure les seves propietats transformadores a la formació d'estructures dimèriques estables que condueixen a la seva activació constitutiva. Per exemple, l'activació deguda a les delecions i mutacions sense sentit al domini extracel·lular de certs oncogens *trk*, pot conferir als seus productes gènics una estructura que mimetitza els canvis conformacionals induïts per l'NGF al receptor *trk* normal.

Els oncogens generats *in vitro*, *trk2* i *trk4* poden ser activats per una fosforilació recíproca

en *cis* dels seus dos dominis quinasa catalítics. Les oncoproteïnes *tpr/trk* poden també dimeritzar, ja que les seqüències Tpr derivades de *tpr* són riques en residus de leucina, els quals poden formar estructures similars a les cremalleres de leucina. Encara més, els resultats preliminars indiquen que les proteïnes *tpr* poden també dimeritzar a través de la formació de ponts disulfur (M. Park, comunicació personal). Aquestes troballes agafades totes juntes, suggereixen fortament que la dimerització del domini proteïna tirosina quinasa del *trk* juga un paper principal a l'activació maligna dels oncogenes *trk*. Tanmateix, la possibilitat que les oncoproteïnes *trk* puguin deure les seves propietats neoplàstiques a mecanismes que no impliquen la dimerització de la proteïna quinasa, no poden ser descartades actualment.

Fins avui, no hi ha evidència de la implicació dels gens *trkB* i *trkC* a la neoplàsia humana. Tanmateix, estudis portats a terme al nostre laboratori indiquen que aquests dos receptors poden adquirir propietats transformants per esdeveniments recombinacionals similars als descrits pel *locus trk*. Encara més, la demostració que la coexpressió constitutiva de cadascun dels membres de la família *trk* de receptors amb els seus lligands afins porta a la transformació morfològica de les cèl·lules NIH3T3, comporta la possibilitat que aquests receptors puguin participar a la neoplàsia humana per mecanismes que no requereixen reorganitzacions estructurals. Per exemple, l'expressió ectòpica dels receptors *trk* normals a cèl·lules, tan fisiològicament o anormalment exposades a les seves neurotrofines afins, pot alterar els seus programes de proliferació normal i/o desenvolupament i contribuir a l'aparició de certes neoplàsies humanes.

Direccions futures

Existeixen moltes qüestions fonamentals que han de ser assenyalades. Hi ha membres addicionals de la família de gens NGF i *trk*?

Quantes isoformes són codificades pels gens *trk* coneguts? Es requereix l'expressió dels receptors *trk* per al desenvolupament neuronal? Es modula la seva expressió al llarg del temps? I durant un dany neuronal? Són els receptors *trk* responsables de, o al menys implicats en, la degeneració neuronal? Poden les variants activades (oncogèniques) dels receptors de *trk* mitjançar en la supervivència neuronal amb l'absència dels seus lligands afins? Són els receptors *trk* expressats a altres cèl·lules que no siguin les neurones post-mitòtiques? Si és així, quin és el seu paper? Poden contribuir a les malalties humanes per mecanismes no mutacionals com la sobreexpressió, o com l'activació autocrina/paracrina continuada?, etc.

Una de les principals mancances en la comprensió de les bases moleculars de la diferenciació neuronal i de la supervivència, ha estat la falta d'eines moleculars i de models adequats *in vivo*, amb els quals estudiar la seva funció. La identificació de la família *trk* de proteïnes tirosina quinasa com els receptors funcionals per a la família de neurotrofines NGF, està fent possible desvetllar les vies de senyalització implicades en aquests processos. Encara més, la disponibilitat de ratolins portadors de receptors *trk* dirigits, hauria de proveir el marc experimental al qual adreçar aquestes qüestions fonamentals. Finalment, el paradigma de la família del receptor *trk* hauria de servir com a estímul per a la recerca de famílies addicionals de neurotrofines i dels seus receptors proteïna tirosina quinasa afins.

BIBLIOGRAFIA

- BARBACID, M., F. LAMBALLE, D. PULIDO, *et al.* (1991). The *trk* family of tyrosine protein kinase receptors. **BBA Rev. on Cancer** **1072**: 115-127.
- BARDE, Y. A., D. EDGAR i H. THOENEN (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **EMBO J.** **1**: 549-553.
- BERKEMEIERER, L. R., J. W. WINSLOW, D. R. KAPLAN, K.

- NIKOLICS, D. V. GOEDEL i A. ROSENTHAL (1991). Neutrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates Trk and TrkB. **Neuron** 7: 857-866.
- BERND, P. i L. A. GREENE (1984). Association of 125I-nerve growth factor with PC12 pheochromocytoma cells. Evidence for internalization via high-affinity receptors only and for long-term regulation by nerve growth factor of both high- and low affinity receptors. **J. Biol. Chem.** 259: 15509-15516.
- BONGARZONE, I., M. A. PIEROTTI, N. MANZINI, *et al.* (1989). High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. **Oncogene** 4: 1457-1462.
- BOTTARO, D. P., J. S. RUBIN, D. L. FALETTI, *et al.* (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the *c-met* proto-oncogene product. **Science** 251: 802-804.
- CORDON-CARDO, C., P. TAPLEY, S. Q. JING, *et al.* (1991) The *trk* tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. **Cell** 66: 173-183.
- CURRAN, T. i B. R. FRANZA, JR. (1988). *Fos* and *Jun*: The Ap-1 connection. **Cell** 55: 395-397.
- DEUEL, T. F., J. S. HUANG, S. S. HUANG, *et al.* (1983). Expression of a platelet-derived growth factor-like protein in simian sarcoma virus transformed Cell. **Science** 221: 1348-1350.
- DOOLITTLE, R. F., M. W. HUNKAPILLER, L. E. HOOD, *et al.* (1983). Simian sarcoma virus *onc* gene, *v-sis*, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. **Science** 221: 275-277.
- DOWNWARD, J., Y. YARDEN, E. MAYES, *et al.* (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and *v-erb-B* oncogene protein sequences. **Nature** 307: 521-527.
- ERNFORS, P., C. F. IBAÑEZ, T. EBENTAL, L. OLSON i H. PERSSON (1990). Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with topographical expression in the brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 87: 5454-5458.
- GHOSH, S., A. M. GIFFORD, L. R. RIVIERE, *et al.* (1990). Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: Homology to rel and dorsal. **Cell** 62: 1019-1029.
- GLASS, D. J., S. H. NYE, P. HANTZPOULOS, *et al.* (1991). *TrkB* mediates BDNF/NT-3- dependent survival and proliferation in fibroblast lacking the low affinity NGF receptor. **Cell** 66: 405-413.
- HALLBÖÖK, F., C. F. IBAÑEZ i H. PERSSON (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. **Neuron** 6: 845-858.
- HANKS, S. K., A. M. QUINN i T. HUNTER (1988). The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. **Science** 241: 42-52.
- HEMPSTEAD, B. L., D. MARTIN-ZANCA, D. R. KAPLAN, *et al.* (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the *trk* proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. **Nature** 350: 678-683.
- HOHN, A., J. LEIBROCK, K. BAILEY i Y. A. BARDE (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. **Nature** 334: 339-341.
- HOSANG, M. i E. M. SHOOTER (1985). Molecular characteristics of nerve growth factor receptors on PC12 cells. **J. Biol. Chem.** 260: 655-662.
- HOSANG, M. i E. M. SHOOTER (1987). The internalization of nerve growth factor by high-affinity receptors on pheochromocytoma PC12 cells. **EMBO J.** 6: 1197-1202.
- HUANG, E., K. NOCKA, D. R. BEIER, *et al.* (1990). The hematopoietic growth factor KL is encoded by the *Sl locus* and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the *W locus*. **Cell** 63: 225-233.
- IP, N. Y., C. F. IBAÑEZ, S. H. NYE, J. McCLAIN, P. F. JONES, D. R. GIES, L. BELLUSCIO, M. M. LE BEAU, R. III ESPINOSA, S. P. SQUINTO, H. PERSSON i G. D. YANCOPOULOS (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution and receptor specificity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 89: 3060-3064.
- JONES, K. R. i L. F. REICHARDT (1990). Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 87: 8060-8064.
- KAISHO, Y., K. YOSHIMURA i K. NAKAHAMA (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding a novel human neurotrophic factor. **FEBS Lett.** 266: 187-191.
- KAPLAN, D. R., B. L. HEMPSTEAD, D. MARTIN-ZANCA, *et al.* (1991b). The *trk* proto-oncogene product: A signal transducing receptor for nerve growth factor. **Science** 252: 554-558.
- KAPLAN, D. R., D. MARTIN-ZANCA i L. F. PARADA (1991a). Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the *trk* proto-oncogene product induced by NGF. **Nature** 350: 158-160.
- KIERNAN, M., V. BLANK, F. LOGEAT, *et al.* (1990). The DNA binding subunit of NF-kappa B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. **Cell** 62: 1007-1018.
- KLEIN, R. F. LAMBALLE, S. BRYANT i M. BARBACID (1992). The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. **Neuron** 8: 947-956.
- KLEIN, R., L. F. PARADA, F. COULIER, *et al.* (1989). *TrkB*, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. **EMBO J.** 8: 3701-3709.
- KLEIN, R., S. Q. JING, V. NANDURI, *et al.* (1991a). The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. **Cell** 65: 189-197.
- KLEIN, R., V. NANDURI, S. A. JING, *et al.* (1991b). The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. **Cell** 66: 395-403.
- LAMBALLE, F., R. KLEIN i M. BARBACID (1991). *trkC*, a new member of the *trk* family tyrosine protein kinases, is a

- receptor for neurotrophin-3. **Cell** **69**: 961-966.
- LEIBROCK, J., F. LOTTSPEICH, A. HOHN, M. HOFER, B. HENGERER, P. MASIAKOWSKI, H. THOENEN i Y. A. BARDE (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. **Nature** **341**: 149-152.
- LEVI-MONTALCINI, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. **Science** **237**: 1154-1162.
- LOEB, D. M., J. MARAGOS, D. MARTÍN-ZANCA, *et al.* (1991). The *trk* proto-oncogene rescues NGF responsiveness in mutant NGF-nonresponsive PC12 cell lines. **Cell** **66**: 961-966.
- MAINSONPIERRE, P. C., L. BELLUSCIO, S. SQUINTO, N. Y. IP, M. E. FURTH, R. M. LINDSAY i G. D. YANCOPOULOS (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. **Science** **247**: 1446-1451.
- MARTÍN-ZANCA, D., R. OSKAM, G. MITRA, *et al.* (1989). Molecular and biochemical characterization of the human *trk* proto-oncogene. **Mol. Cell. Biol.** **9**: 24-33.
- MARTÍN-ZANCA, D., S. H. HUGHES i M. BARBACID (1986). A human oncogen formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. **Nature** **319**: 743-748.
- MASSAGUÉ, J., B. J. GUILLETTE, M. P. CZECH, C. J. MORGAN i R. A. BRADSHAW (1981). Identification of a nerve growth factor protein in sympathetic ganglia membranes by affinity labeling. **J. Biol. Chem.** **256**: 9419-9424.
- MCDONALD, N. Q., R. LAPATTO, J. MURRAY-RUST, J. GUNNING, A. WLODAWER i T. L. BLUNDELL (1991). New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. **Nature** **354**: 411-414.
- MEAKIN, S. O. i E. M. SHOOTER (1992). The nerve growth factor family of receptors. **Trends Neurosci.** **15**: 323-33.
- MIDDLEMAS, D. S., R. A. LINDBERG i T. HUNTER (1991). *TrkB*, a neural receptor protein-tyrosine kinase: Evidence for a full-length and two truncated receptors. **Mol. Cell. Biol.** **11**: 143-153.
- NALDINI, L., E. VIGNA, R. P. NARSIMHAN, *et al.* (1991). Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine activity of the receptor encoded by the proto-oncogene *c-met*. **Oncogene** **6**: 501-504.
- NEBREA, A. R., D. MARTÍN-ZANCA, D. R. KAPLAN, *et al.* (1991). Induction by NGF of meiotic maturation of *Xenopus* oocytes expressing the *trk* proto-oncogene product. **Science** **252**: 558-561.
- PULCIANI, S., E. SANTOS, A. V. LAUER, *et al.* (1982). Oncogenes in solid human tumours. **Nature** **300**: 539-542.
- PULIDO, D., S. CAMPUZANO, T. KODA, *et al.* (1992). *Dtrk*, a *Drosophila* gene related to the *trk* family of neurotrophin receptors, encodes a novel class of neural cell adhesion molecule. **EMBO J.** **11**: 391-404.
- RAKOWICZ-SZULCZYNSKA, E. M., M. HERLYN i H. KOPROWSKI (1988). Nerve growth factor receptors in chromatin of melanoma cells, proliferating melanocytes, and colorectal carcinoma cells in vitro. **Cancer Res.** **48**: 7200-7206.
- RAKOWICZ-SZULCZYNSKA, E. M., U. RODECK, M. HERLYN i H. KOPROWSKI (1986). Chromatin binding of epidermal growth factor, nerve growth factor, and platelet-derived growth factor in cells bearing the appropriate surface receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **83**: 3728-3732.
- ROSENTHAL, A., D. V. GOEDEL, T. NGUYEN, M. LEWIS, A. SHIH, G. R. LARAMEE, K. NIKOLICS i J. W. WINSLOW (1990). Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. **Neuron** **4**: 767-773.
- SAGATA, N., N. WATANABE, G. F. VANDE WOUDE, *et al.* (1989). The *c-mos* proto-oncogene product is a cytoskeletal factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. **Nature** **342**: 512-518.
- SCHECHTER, A. L. i M. A. BOTHWELL (1981). Nerve growth factor receptors on PC12 cells: evidence for two receptor classes with differing cytoskeletal association. **Cell** **24**: 867-874.
- SCHNEIDER, R. i M. SCHWEIGER (1991). A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic *trk* and *trkB* tyrosine kinase receptors. **Oncogene** **6**: 1807-1811.
- SHEER, C. J., C. W. RETTENMIER, R. SACCA, *et al.* (1985). The *c-fms* proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. **Cell** **41**: 665-676.
- SOPPET, D., E. ESCANDON, J. MARAGOS, *et al.* (1991). The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the *trkB* tyrosine kinase receptor. **Cell** **65**: 895-903.
- SQUINTO, S. P., T. N. STITT, T. H. ALDRICH, *et al.* (1991). *trkB* encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. **Cell** **65**: 886-893.
- SUTTER, A., R. J. RIOPELLE, R. M. HARRIS-WARRICK i E. M. SHOOTER (1979). **J. Biol. Chem.** **254**: 5972-5982.
- ULLRICH, A. i J. SCHLESSINGER (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. **Cell** **61**: 203-212.
- ZSEBO, K. M., D. A. WILLIAMS, E. N. GEISSLER, *et al.* (1990). Stem cell factor is encoded at the S1 locus of the mouse and is the ligand for the *c-kit* tyrosine kinase receptor. **Cell** **63**: 213-224.