

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
CAMPUS IZTACALA**



**Localización de las isoformas de la Proteína Cinasa C:
alfa, beta y gama, en núcleos de neuronas de hipocampo
de rata y el efecto del carbacol en sus niveles.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

AGUILERA HERNANDEZ PENELOPE



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA
JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA

Los Reyes Iztacala, a 18 de mayo

de 1995

APROBACION DE TESIS

LIC. AMERICA LANDA ROMERO
JEFE DE LA UNIDAD
DE ADMINISTRACION ESCOLAR.
P R E S E N T E .

Por medio de la presente manifestamos a Ud. que como Miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de Tesis del Pasante de Biología:

AGUILERA HERNANDEZ PENELOPE

titulado: "Localización de las isoformas de la Proteína
Cinasa C: alfa, beta y gama, en núcleos de neuronas
de hipocampo de rata y el efecto del carbacol en
sus niveles".

para obtener el grado de Licenciatura, después de haber sido cuidadosamente revisado y realizadas las correcciones que se consideraron pertinentes, declaramos nuestra aprobación del trabajo escrito, ya que reúne las características, calidad y decoro académico del título al que aspira.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

M. EN C. SERGIO GONZALEZ MORENO

BIOL. CESAR M. FLORES ORTIZ

BIOL. HECTOR BARRERA ESCORCIA

M. EN C. IGNACIO PENALOSA CASTRO

DR. VICTOR ALEMAN ALEMAN

Sergio Gonzalez Moreno
Flores Ortiz Cesar
Hector Barrera Escorcía
Ignacio Penalosa Castro
Victor Aleman Aleman

(Nombre completo)

(Firma)

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Victor Alemán Alemán y la colaboración del Dr. Arturo Ortega Soto.

Dedico mi trabajo de tesis a mi mamá y mi papá por darme su cariño e infundir mi desarrollo profesional y personal.

A mi hermano Odiseo porque lo quiero y a mi estimada prima Paty por compartir mi interés por la ciencia.

Dedico también esta tesis a mis amigas Minerva Arce y Gabriela Angeles por haber compartido el esfuerzo y la satisfacción de realizar los estudios de licenciatura en Biología.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Victor Alemán A. por el tiempo dedicado a mi formación profesional durante la realización de los trabajos de tercera etapa y servicio social y por su asesoría en la elaboración del trabajo de tesis. Al Dr. Arturo Ortega S. por sus sugerencias al trabajo experimental y observaciones aportadas durante el análisis de resultados, tanto como por la facilitación de equipo y reactivos.

A Beatriz Orozco y Manuel Sánchez del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, y a M. Eugenia Cid y Manuel Arias del departamento de Genética y Biología Molecular, por su disposición y asistencia en la resolución de problemas metodológicos durante el desarrollo de mi trabajo de tesis.

A la comisión dictaminadora: M. en C. Ignacio Peñalosa Castro, al Biólogo Héctor Barrera Escorcía, al Biólogo César M. Flores Ortiz y al M. en C. Sergio González Moreno por la revisión del trabajo y en especial a aquellos que fungieron como mis profesores.

Finalmente a mis padres por todas las facilidades concedidas durante mi formación académica.

INDICE

I.-RESUMEN.....	iii
II.-ABREVIATURAS.....	1
III-INTRODUCCION	
*RECEPTORES.....	7
*PROTEINAS CINASAS.....	10
-PROTEINA CINASA DEPENDIENTE DE AMPc	
-PROTEINA CINASA CALCIO/CALMODULINA DEPENDIENTE	
-PROTEINA CINASA ACTIVADA POR CALCIO Y DEPENDIENTE	
DE FOSFOLIPIDOS	
*CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LA PROTEINA CINASA C.....	13
*MECANISMOS DE ACTIVACION DE LA PROTEINA CINASA C.....	16
*DISTRIBUCION TISULAR E INTRACELULAR DE LAS ISOFORMAS DE LA	
PROTEINA CINASA C.....	20
*FUNCIONES DE LA PROTEINA CINASA C.....	22
*ANTECEDENTES DE LA PRESENCIA DE LA PROTEINA CINASA C EN EL	
NUCLEO CELULAR.....	24
*NEUROTRASMISORES Y REGULACION DE LA TRANSCRIPCION.....	31
VI.-OBJETIVOS.....	35
V.-MATERIALES Y METODOS	
1.-MEDIOS DE CULTIVO.....	36
2.-ANTICUERPOS.....	36
3.-CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS DE HIPOCAMPO.....	38
a)Preparación de las cajas de cultivo	
b)Preparación de las células	
c)Tratamiento	
4.-PURIFICACION Y FRACCIONAMIENTO DE NUCLEOS.....	41
5.-ELECTROFORESIS.....	43
6.-INMUNODETECCION.....	44
7.-DENSITOMETRIA.....	46

VI.-RESULTADOS

*LOCALIZACION DE LAS ISOFORMAS BETA Y GAMA DE LA PROTEINA CINASA C.....	47
*EFECTOS DEL CARBACOL EN LOS NIVELES DE LAS ISOFORMAS BETA Y GAMA DE LA PROTEINA CINASA C EN EL NUCLEO.....	51
*DITRIBUCION INTRANUCLEAR DE LAS ISOFORMAS BETA Y GAMA DE LA PROTEINA CINASA C.....	54
*EFECTO DEL CARBACOL EN LA DISTRIBUCION Y LOS NIVELES INTRANUCLEARES DE LAS ISOFORMAS BETA Y GAMA DE LA PROTEINA CINASA C.....	57
*EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CARBACOL Y ATROPINA EN LOS NIVELES DE PKC EN LAS FRACCIONES NUCLEARES.....	59

VII.-DISCUSION

*LOCALIZACION DE LA PKC EN EL NUCLEO DE NEURONAS.....	64
*NIVELES DE PKC EN NUCLEO.....	67
*PESO MOLECULAR DE LA PKC.....	70
*DISTRIBUCION INTRANUCLEAR DE LA PKC BETA Y GAMA	72
*EFECTO DEL AGONISTA COLINERGICO MUSCARINICO CARBACOL EN LOS NIVELES DE LA PKC NUCLEAR.....	75
*EFECTO DEL CARBACOL EN LA DISTRIBUCION INTRANUCLEAR DE LA PKC.....	76
*EFECTO DEL ANTAGONISTA COLINERGICO MUSCARINICO AGROPINA EN LOS NIVELES DE LA PKC GAMA EN EL NUCLEO DE CELULAS TRATADAS CON CARBACOL.....	78

VIII.-CONCLUSIONES.....	81
--------------------------------	-----------

IX.-BIBLIOGRAFIA.....	83
------------------------------	-----------

RESUMEN

La familia de la Proteína cinasa C (PKC) esta constituida por isoformas con funcionalidad y distribución celular especifica, implicadas en el fenómeno de transducción de señales. En este proceso moléculas extracelulares entre las que se incluyen los neurotransmisores, provocan cambios de dos tipos: a) a corto plazo como modificaciones postraduccionales y b) a largo plazo en el que se observan cambios en el patrón de expresión de genes particulares; en este último caso se ven involucradas enzimas que modifican la función de proteínas nucleares. En estudios previos ha sido reportado que en tipos celulares específicos, la PKC se encuentra en forma permanente en el núcleo o que puede translocarse hacia este organelo cuando es activada. En el presente trabajo se identificaron los tipos particulares de isoformas localizadas en el núcleo de neuronas de hipocampo de rata, así como el efecto del agonista colinérgico muscarínico carbacol en su distribución y niveles intranucleares. Fueron empleados cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata posnatal (8 días), los cuales se trataron con carbacol 1 mM durante 18 horas. Se utilizaron núcleos purificados obtenidos elaborando gradientes de sacarosa. Mediante ensayos tipo Western, se determinaron los niveles de las isoformas específicas de la PKC presentes en núcleos enteros y fracciones nucleares (membrana (Mb), nucleoplasma (Np) y cromatina (Cr)). En núcleos enteros se detectó una fuerte inmunoreacción con los anticuerpos anti PKC beta y gama, mientras que se obtuvo una señal débil con los anticuerpos anti PKC epsilon y no se encontró señal con anticuerpos anti PKC alfa. La PKC beta se encontró distribuida de manera relativamente homogénea en las 3 fracciones nucleares analizadas, mientras que la isoforma gama se localizó primordialmente en el Np y la Mb de las células no estimuladas. El tratamiento con carbacol provocó una disminución de la PKC beta de un 30% en las fracciones nucleares. Por otra parte la PKC gama exhibió un cambio en su distribución intranuclear: un aumento de 3.6 veces en Cr y una disminución del 93.1% y del 69.5% en Np y en Mb respectivamente. El diferente patrón de distribución de las isoformas detectadas en los núcleos de las neuronas de hipocampo, así como el efecto específico observado como resultado de la estimulación con carbacol, sugiere que estas isoformas participan en distintas funciones, y que probablemente existe un fenómeno de traslocación entre las diferentes regiones nucleares similar al observado para la PKC citoplasmática.

ABREVIATURAS

ACh	acetilcolina
AMPC	adenosin monofosfato ciclico
AP-1	proteína activadora 1. Es un factor de transcripción formado por dimeros de las proteínas jun y fos.
ATP	adenosin trifosfato
bZIP	familia de proteínas que se unen al DNA. Poseen un región de dimerización conocido como cierre de leucina y una región básica adyacente que constituye la superficie que entra en contacto con el DNA
CaM	calmodulina
CaM-KII	proteína cinasa multifuncional activada por calcio/calmodulina
CD45	receptor de leucocitos con peso molecular de 180 a 229 kDa. Tiene actividad tirosina fosfatasa.
C/EBP	proteína potenciadora de la transcripción que se une a la secuencia CCAAT
Cr	cromatina
CRE	elemento de respuesta a AMPC presente en genes activados por AMPC
CREB	proteína que se une al elemento CRE
DMEM	medio de cultivo sintético para crecimiento de células de mamífero (Dulbecco's modified Eagles medio)

DNA	ácido desoxirribonucleico
DG	diacilglicerol
fos/jun	productos proteícos asociados como dímeros para formar la proteína reguladora AP-1
FtdSer	fosfatidilserina
F12	medio de cultivo sintético para crecimiento de células de mamífero
GAP	proteína activadora de GTPasa. GAP se une a Ras y la inactiva ya que induce la hidrólisis de su molécula de GTP hacia GDP
GDP	guanosin difosfato
GTP	guanosin trifosfato
GTPasas	proteínas que hidrolizan GTP
HRb IgG	inmunoglobulinas conjugadas con peroxidasa
IMHV	parte media e intermedia en la región ventral del hiperestriado
InSP ₃	inositol 1,4,5, trifosfato
MHC-II	complejo principal de histocompatibilidad tipo II
mAChR	receptor muscarínico de la acetilcolina
MAP cinasas	proteínas cinasas activadas por mitógenos
Mb	membrana
myc	proteína reguladora de la familia de con dominios hélice-asa-hélice
nAChR	receptor nicotínico de la acetilcolina
NFkB	factor de transcripción que activa los genes k de las inmunoglobulinas en linfocitos B.

Np	nucleoplasma
N2	medio de cultivo (mezcla 1:1 de medio DMEM y F12)
PBS	solución salina de fosfatos
PC	fosfatidilcolina
PDBu	forbol 12-13 dibutirato
PKA	proteína cinasa dependiente de AMPc
PKC	proteína cinasa dependiente de calcio y fosfolípidos
PLC	fosfolipasa C
PM	peso molecular
PMA	forbol 12-miristato 13-acetato
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfato (inhibidor de proteasas)
Proteína G	proteína trimérica que une nucleótidos de guanina, participa en la transducción de señales.
PtdIns	fosfatidilinositol
PtdIns4,5P ₂	fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
Raf	proteína cinasa de serina y treonina activada por ras
Ras	proteína que une GTP, estimula la cascada de fosforilaciones de proteínas
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero
SDS	dodecil sulfato de sodio (detergente)
SH2	dominio de interacción entre 2 proteínas, media reacciones de ensamblaje de proteínas dependientes de fosforilación

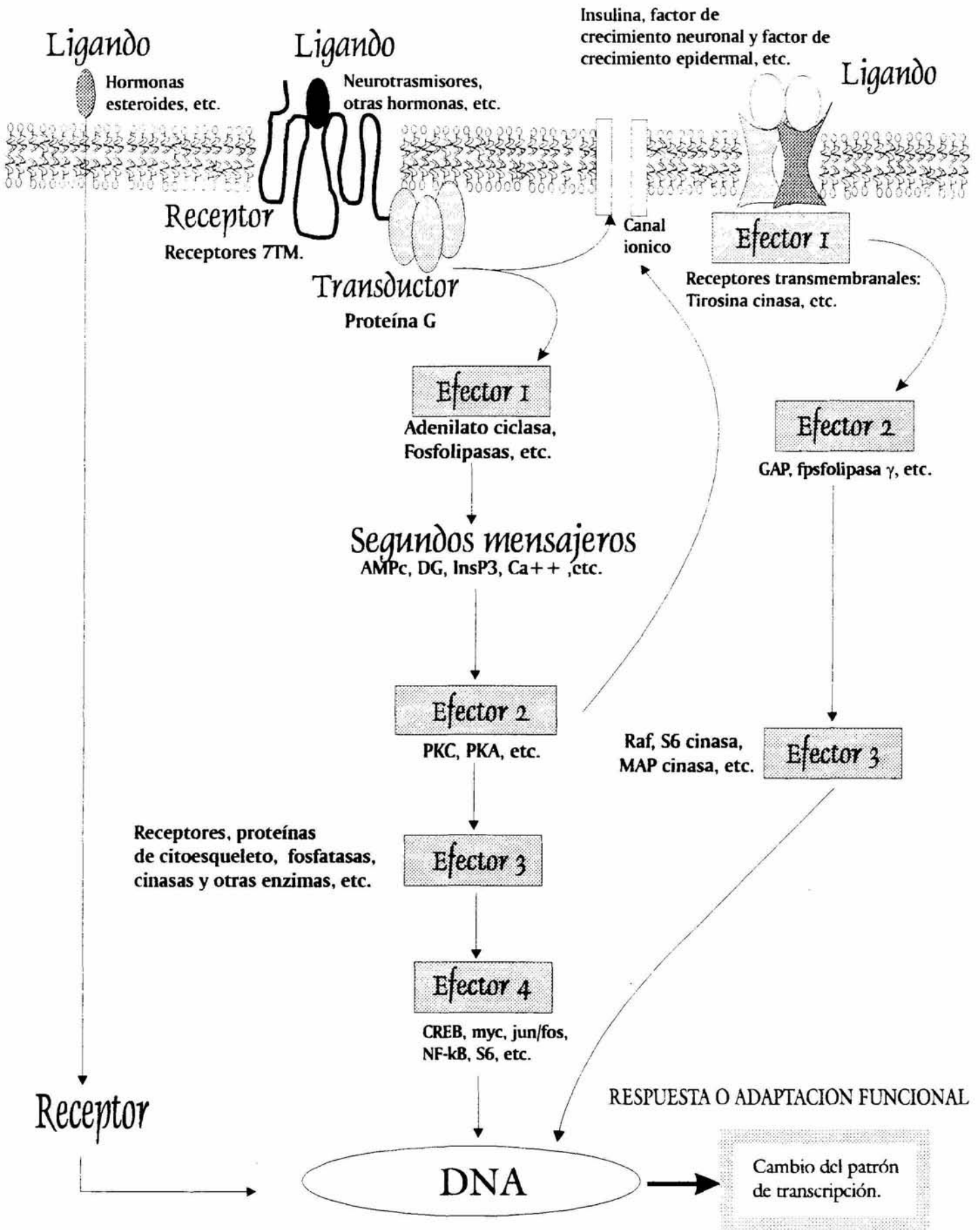
SNC	sistema nervioso central
SRE	elemento responsivo a suero
SRF	factor responsivo a suero que se une a SRE.
TCR	Receptor de linfocito T
TPA	beta-forbol- 12 tetradecanoil-13-acetil
Trombina	proteasa que induce la agregación de plaquetas.
U.D.O.	unidades de densidad óptica
7TMb-R	receptores de 7 segmentos transmembranales acoplados a proteína G

INTRODUCCION

Muchas de las respuestas celulares específicas inducidas por estímulos extracelulares como neurotransmisores, factores de crecimiento y hormonas son mediadas por un sistema de transducción de señales. En este proceso la interacción del ligando con el receptor provoca su activación o inhibición, y directamente o a través de la producción de segundos mensajeros, ocasionan la activación o desactivación de enzimas (quinasas o fosfatasa) que modifican el estado previo (activo o inactivo) de sus proteínas blanco; este cambio postraducciona, modifica diversos procesos celulares como la expresión genética, al alterar la magnitud y velocidad de transcripción de genes específicos. Estos mecanismos de regulación celular resultan de interés, ya que se hallan involucrados en la modulación de funciones neuronales dada la habilidad de estas células, para amplificar, modular e integrar múltiples señales extracelulares en el tiempo y el espacio (Girault, 1993) (Diagrama 1).

La mayoría de los ligandos de receptores de membranas plasmáticas de células de mamíferos han sido identificados como proteínas solubles, péptidos, o moléculas orgánicas pequeñas, cuya estructura y naturaleza química varía enormemente. Los receptores, por otra parte, se agrupan en pocas familias estructurales.

DIAGRAMA 1.- VIAS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES.



RECEPTORES

Con base en las funciones del receptor, Féger *et al* (1994) los clasifica en tres tipos principales:

- 1)Receptores de hormonas esteroides.
- 2)Receptores transmembranales con actividad enzimática.
- 3)Receptores acoplados a proteínas G.

1)Los receptores a esteroides presentan una localización intracelular y su función primaria es regular la transcripción. Esta familia de receptores incluye aquellos que unen hormonas esteroides como los glucocorticoides, mineralcorticoides, hormonas sexuales, etc, así como receptores que unen hormonas no-esteroides como la hormona tiroidea y el ácido retinoico. Estos ligandos son moléculas pequeñas lipofílicas que fácilmente atraviesan la membrana plasmática. Cuando los receptores son activados por el ligando forman dímeros que reconocen secuencias específicas en el DNA, de manera que su función principal es modular la transcripción de sus genes blanco.

2)Las proteínas transmembranales poseen un dominio extracelular que une el ligando, y un dominio citoplasmático que posee actividad enzimática intrínseca, mediante esta actividad el receptor efectúa la transducción de señales. Existen tres familias principales de receptores, con actividad catalítica distinta:

A) Guanilciclasas: en mamíferos han sido descrito tres receptores con esta actividad, son activados por péptidos natriuréticos (agente que estimula la excreción de iones de sodio en la orina) y enterotoxinas termoestables.

B) Tirosina fosfatasas: han sido identificado varios receptores de este tipo (como el receptor CD45 de leucocitos), pero no se conocen sus ligandos; al parecer son importantes en la regulación de la división y diferenciación celular.

C) Tirosina cinasas: incluye receptores para insulina, para el factor de crecimiento insulínico, para el factor de crecimiento epidermal y otros. Estos receptores al ser activados por el ligando, autofosforilan el dominio citoplasmático y en algunos casos forman dímeros, lo que da lugar a la unión específica con moléculas citosólicas, es decir sustratos que son fosforilados por el receptor. Los sustratos que se conocen poseen actividad enzimática (con dominios característicos SH2) como: la fosfolipasa C gamma, que hidroliza fosfoinosítidos y genera segundos mensajeros; la fosfatidilinositol-3-cinasa que produce fosfolípidos con funciones importantes en la división celular; la proteína activadora de GTPasa, etc. Esta última tiene como sustrato a p21ras, proteína que puede activar a Raf cinasa de residuos serina y treonina que fosforila y activa la cascada de las MAP cinasas. Siendo así, activada la cascada de señales iniciada por factores de crecimiento (Karin, 1992).

3) Receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores (7TMB-R) se caracterizan por su estructura única, poseen siete segmentos transmembranales con estructura de alfa hélice y con

asas hidrofílicas localizadas a ambos lados de la membrana celular. La región amino terminal generalmente es extracelular y presenta sitios de glicosilación. El sitio de unión al ligando generalmente es hidrofílico y está localizado en esta región; sin embargo, algunos péptidos y algunas aminas pequeñas tienen afinidad por las regiones transmembranales. El dominio carboxilo terminal que es intracelular, posee sitios fosforilables por cinasas; cuando el ligando está presente por períodos prolongados, se efectúan mecanismos de desensibilización del receptor, entre los que se incluyen la fosforilación y la internalización del receptor.

Las asas localizadas en el citoplasma presentan sitios de unión para las proteínas G. Los 7TMB-R, son diversos, diferentes receptores pueden unirse a un mismo neurotransmisor u hormona, pero presentan efectos diferentes debido a que están acoplados a diferentes proteínas G y estas a su vez a diferentes efectores.

Las proteínas G, son proteínas triméricas que se localizan en la cara interna de la membrana plasmática. La unión de ligando al receptor provoca un intercambio del GDP asociado a la proteína G, siendo remplazado por GTP; en consecuencia la subunidad alfa, que posee actividad de GTPasa, se disocia, dando lugar a un monómero activado que puede estimular a su sustrato efector, generalmente también asociado a la membrana. Se han reconocido más de 40 proteínas G distintas. Algunas de ellas se acoplan a canales iónicos, a adenilato ciclasa, a fosfolipasas, etc.

En el sistema nervioso los receptores asociados a canales son importantes y pueden clasificarse en dos tipos:

a)Receptores ionotrópicos: aquellos complejos proteícos que al mismo tiempo cumplen tanto la función de receptor como de canal . Están formados por múltiples subunidades, cada una con varios segmentos transmembranales. Se asocian en forma pseudosimétrica, delineando un canal ionico central (un ejemplo es el receptor nicotínico de la acetilcolina).

b)Receptores metabotrópicos: son 7TMB-R (como los receptores muscarínicos de la acetilcolina).

PROTEINAS CINASAS

En general la activación de los efectores inicia la producción de segundos mensajeros, que permiten la propagación y la amplificación de la señal a través de la activación de proteínas cinasas, como la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), la proteína cinasa activada por calcio y dependiente de fosfolípidos (PKC), la proteína cinasa multifuncional activada por calcio/calmodulina (CaM-KII), etc. (Simon *et al.*, 1991).

Las proteínas cinasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP y algunas veces del GTP hacia un aminoácido de una proteína (en eucariontes, preferentemente residuos treonina, serina y tirosina), provocando cambios conformacionales y modificando así, su funcionalidad (Hug y Sarre, 1993).

Las cinasas participan en muchas de las cascadas de transducción de señales que son importantes en la modulación de funciones neuronales como la síntesis de neurotransmisores, las conductancias de los canales iónicos, la plasticidad sináptica, etc.

PROTEINA CINASA DEPENDIENTE DE AMPc

La PKA, se encuentra casi por completo en el citoplasma como tetrámero (R_2C_2) en forma inactiva, que en respuesta a la elevación del AMPc se disocia; cada subunidad regulatoria (R) se une a 2 moléculas de AMPc, dejando libre a la subunidad catalítica (C) en forma activa. La subunidad R se localiza principalmente en el citoplasma, siendo una de sus funciones establecer la distribución diferencial de las isoformas, las cuales se encuentran asociadas a diferentes estructuras como la membrana plasmática, dendritas, citoesqueleto, etc. Mientras que la subunidad R interviene en la localización de la PKA inactiva, la subunidad C participa en la traslocación hacia compartimientos celulares específicos después de su activación (Scott y Soderling, 1992).

CREB es una proteína que en su estado fosforilado se une al DNA y activa genes inducibles por AMPc. La subunidad catalítica de la PKA al disociarse puede traslocarse hacia el núcleo donde fosforila a CREB (Nigg *et al.*, 1985).

PROTEINA CINASA CALCIO/CALMODULINA DEPENDIENTE

Las CaM-KII son una familia de holoenzimas formadas de 6 a 12 subunidades, 3 de las isoformas son específicas de neuronas: alfa (54kDa), beta (60kDa) y beta prima (59kDa); la gama (59kDa) y la delta (60kDa) se distribuyen más ampliamente (Colbran *et al.*, 1993). Un segmento de la proteína está posicionado en su sitio activo, de manera que bloquea el acceso de los sustratos. La unión de Ca^{++} /calmodulina rompe la interacción autoinhibitoria de la cinasa permitiendo la fosforilación de sustratos, así como la autofosforilación en el dominio autoinhibitorio causando la formación de una cinasa activada independiente de Ca^{++} (Smith *et al.*, 1992). La elevación del calcio intracelular regula respuestas celulares prolongadas. La mayor parte de la CaM-KII se localiza en el citoplasma, sin embargo uno de los miembros de la familia recién caracterizados (CaM-KIV) es abundante en axones y en núcleos (Scott y Soderling, 1992; Colbran *et al.*, 1993).

PROTEINA CINASA ACTIVADA POR CALCIO Y DEPENDIENTE DE FOSFOLIPIDOS

El sistema de traducción de señales que involucra a la PKC, resulta de gran interés por la variedad de procesos en los que participa y de tejidos en los que se distribuye (Nishizuka, 1988).

Se sabe que ciertas señales extracelulares interaccionan con receptores de membrana que activan a la fosfolipasa C (PLC), la cual interviene en la hidrólisis del fosfatidilinositol (PtdIns) produciendo dos segundos mensajeros: diacilglicerol (DG) e inositol 1,4,5, trifosfato (InsP₃), los cuales dirigen la activación de la PKC (Berridge e Irvine, 1984). El DG aumenta la constante de velocidad de fosforilación del sustrato (Mosior y Epan, 1993) y el InsP₃ estimula la movilización del calcio desde el retículo endoplásmico (Berridge e Irvine, 1984). El calcio es requerido para la activación de la enzima, en algunos casos promueve la unión de la PKC a la membrana plasmática (Wolf *et al.*, 1985).

CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LA PROTEINA CINASA C

La PKC es una enzima compuesta de una cadena peptídica única, con un peso molecular que varía desde los 76 a los 96 kDa según el tipo de isoenzima de que se trate (Hug y Sarre, 1993). Se han identificado doce isoenzimas (Dekker y Parker, 1994), las cuales presentan un patrón específico de distribución tanto intercelular como intracelular, así como propiedades enzimológicas diferentes, lo que sugiere que cada una desempeña una función particular en cada tipo de célula (Nishizuka, 1988).

Basándose en su patrón de elución en columnas de hidroxapatita, a las isoenzimas dependientes de calcio (PKC convencionales) se les ha designado tipo I (gama), tipo II (beta I y II) y tipo III (alfa) (Kikkawa *et al.*, 1987); por otro lado, a las PKC no dependientes de calcio

(PKC novel) se les reconoce como: delta, epsilon, eta, teta y my (homólogo de eta)(Ono *et al.*, 1988) y a las no activadas por ésteres de forbol son: zeta, iota y lamda (Dekker y Parker, 1994) (Diagrama 2).

La secuencia primaria de las isoformas de la PKC presenta varias regiones funcionales, siendo las del dominio catalítico y el sitio de unión del nucleótido, invariables en todas ellas; en contraste, el dominio regulatorio, en el que se encuentra el sitio de unión del sustrato, suele ser más específico (Parker *et al.*, 1989) (Diagrama 2).

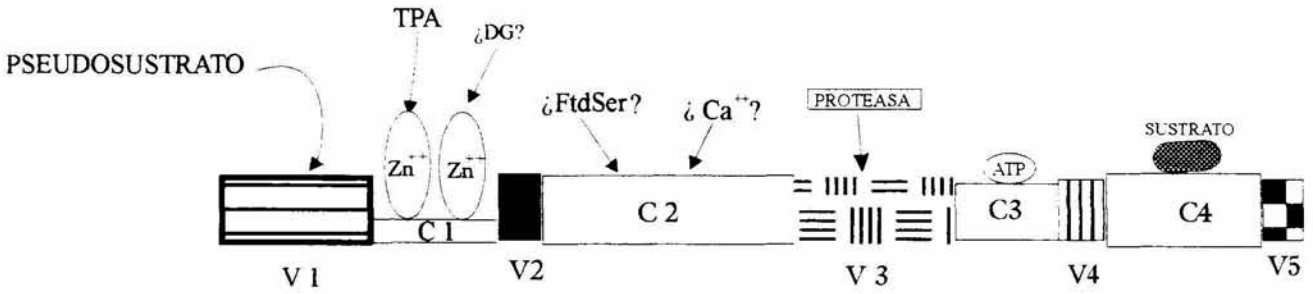
Las isoenzimas alfa, beta y gama presentan cuatro secciones conservadas (C1-C4) y cinco variables (V1-V5); el resto de las isoenzimas no tienen la sección C2. Al dominio regulatorio de la cadena pertenecen las regiones C1, C2, V1, V2 y parte de la V3 (región de unión, situada entre el dominio catalítico y el regulatorio), mientras que el resto de la cadena corresponde al dominio catalítico (Parker *et al.*, 1989) (Diagrama 2).

La región C1 contiene secuencias repetidas de cisteína que parecen ser esenciales para la unión del DG y los ésteres de forbol. Entre los residuos 13-30 existe una secuencia semejante a la región de reconocimiento del sustrato natural para la cinasa, pero que carece de los residuos fosforilables (serina o treonina), por lo que se presume como dominio autoinhibitorio, que mantiene la actividad de la cinasa en sus niveles basales (House y Kemp, 1987; Hardie, 1988). No se conocen bien los sitios de unión para cofactores como la fosfatidilserina (FtdSer) ni para

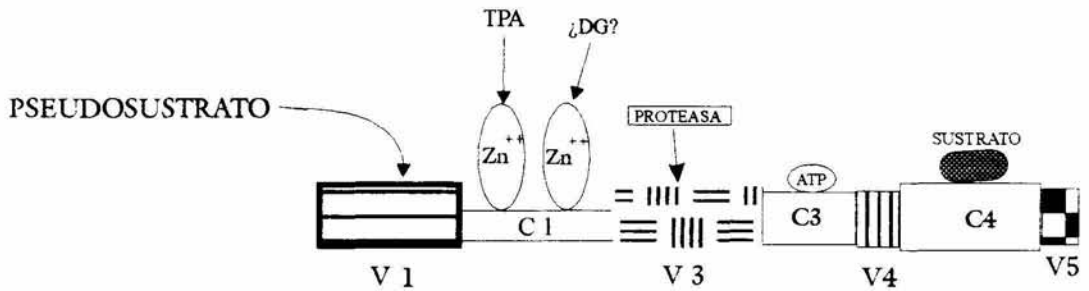
DIAGRAMA 2.- DOMINIOS ESTRUCTURALES DE LAS ISOFORMAS DE LA PROTEINA CINASA C.

DOMINIO REGULATORIO

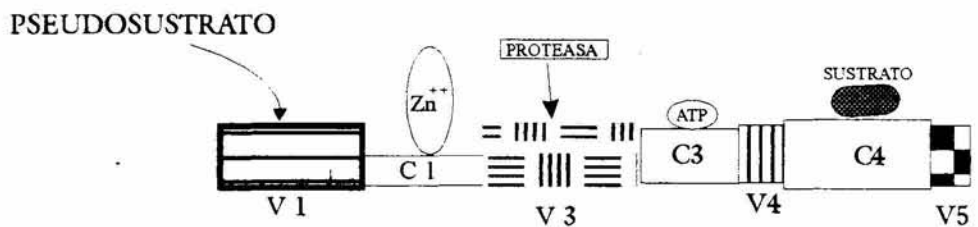
DOMINIO CATALITICO



PKC α, β, γ . (77-84 kDa)



PKC δ, ϵ, η (77-83 kDa)



PKC ζ (68 kDa)

C: Regiones constantes

V: Regiones variables

TPA: Ester de forbol

DG: Diacilglicerol

FtdSer: Fostatidilserina

el Ca^{++} , sin embargo la región C2 parece conferir a las isoenzimas alfa, beta y gama la dependencia al Ca^{++} (Ono *et al.*, 1988; Parker *et al.*, 1986). Los estudios realizados indican que la región V1 interviene en la selectividad del sustrato y sugiere que cada isoenzima tiene sustratos blanco que no pueden ser fosforilados por el resto de las isoformas. Por otra parte, la región C3 muestra un sitio de unión para ATP, su delección elimina la actividad catalítica y además presenta gran similitud con los dominios de este tipo en otras cinasas, por lo que es evidente que constituye el dominio catalítico (Azzi *et al.*, 1992; Nishizuka, 1988 ; Parker *et al.*, 1989) (Diagrama 2).

MECANISMOS DE ACTIVACION DE LA PROTEINA CINASA C.

La activación puede ser resultado de varios mecanismos: comúnmente modificaciones covalentes de esta enzima como la fosforilación y la acetilación, y no covalentes como la presencia de cofactores. Estas modificaciones ocurren generalmente en el dominio regulatorio, pero también en el catalítico (Girault, 1993). Además, se ha observado la translocación de la enzima a compartimientos celulares específicos cuando esta es activada (Kraft y Anderson, 1983).

En la activación de la PKC esta involucrado un sistema de transducción de señales activado por diversos tipos de moléculas externas, las cuales incrementan los niveles intracelulares de Ca^{++} y modifican el metabolismo de lípidos entre los que se incluyen fosfolípidos, diacilgliceroles y ácidos grasos. Los fosfolípidos como la FtdSer funcionan como

cofactores, su unión a la enzima es necesaria para su activación, pero no la induce. Se ha encontrado que las velocidades de fosforilación del sustrato y la unión de la enzima a la membrana son reguladas específicamente por las concentraciones de FtdSer (Mosior y Epan, 1993). En algunos casos ésta puede ser reemplazada por otros lípidos aniónicos (Newton y Koshland, 1989). La liberación de DG a partir de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PtdIns4,5P2) o fosfatidilcolina (PC) causa su unión a la PKC (la interacción es esteroespecífica y se efectúa con regiones hidrofóbicas e hidrofílicas del DG, lo que provoca la internalización de la enzima en la membrana) y simultáneamente provoca su activación. El DG funciona como activador incrementando la afinidad de la PKC por la membrana plasmática y aumentando su velocidad catalítica (Mosior y Epan, 1993); los ésteres de forbol la estimulan por mecanismos similares (Azzi *et al*, 1992). Se ha encontrado que las distintas isoformas poseen sensibilidades específicas al DG y se ha sugerido que esta depende también, de la composición de la membrana con la que interactúan (Parker, *et al.*, 1989) (Diagrama 3).

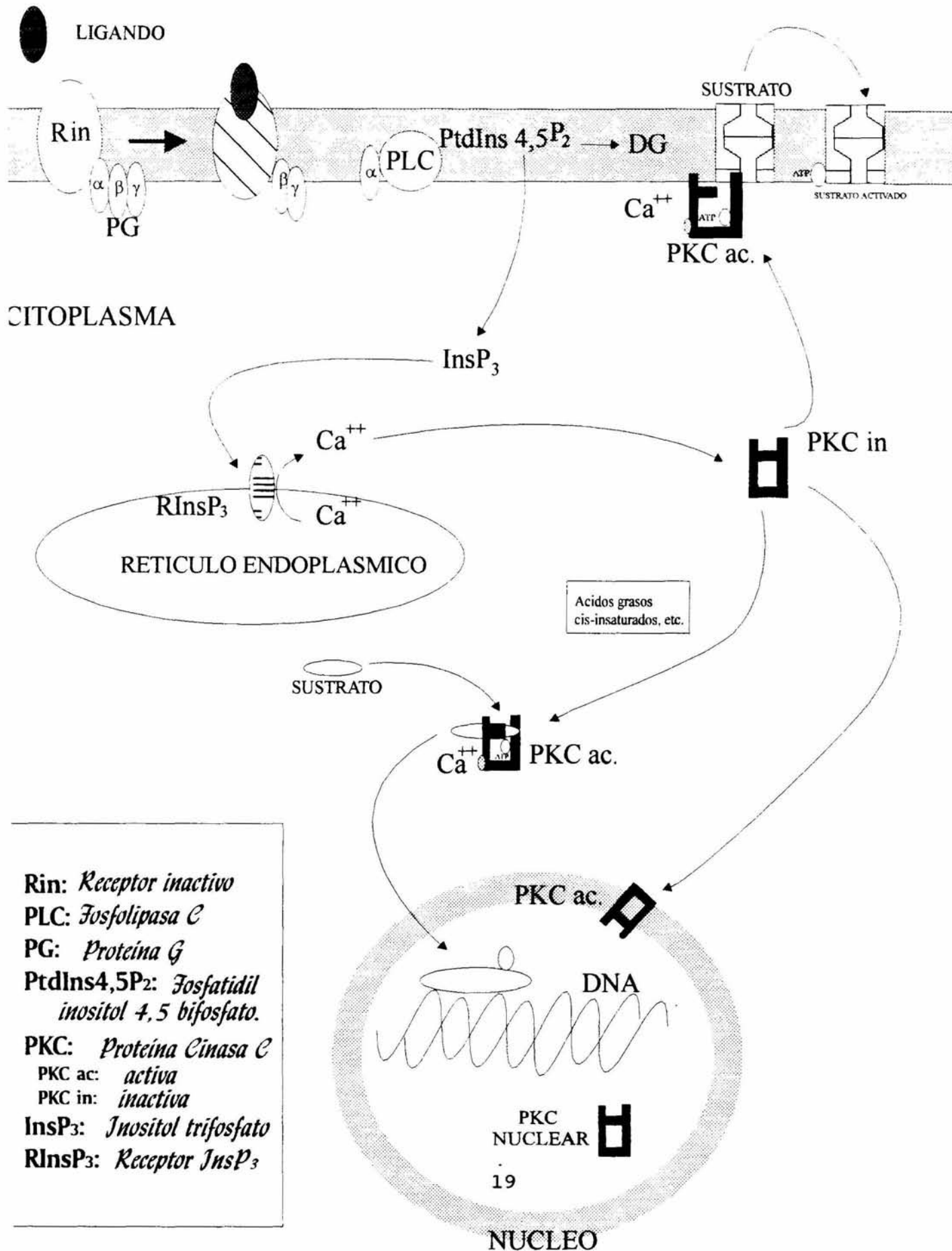
En experimentos realizados *in vitro*, se encontró que las PKC alfa y beta-I humanas pueden ser activadas por PtdIns4,5P2 y PtdIns sustituyendo al DG y la FtdSer, como activador y cofactor respectivamente (Kochs *et al.*, 1993). Por otra parte mientras que los ácidos grasos *cis*-insaturados activan a la PKC soluble, el DG activa la enzima asociada a membrana (Khan *et al.*, 1992).

Cuando la activación es mediada por ésteres de forbol, posterior a esta se observa una degradación o regulación hacia abajo de la PKC. Se sospecha que *in vivo* las proteasas I y II dependientes de calcio (calpains) las cuales son activas en el rango micromolar y milimolar de calcio respectivamente, efectúan esta reacción, dado que *in vitro* la activación de la PKC puede efectuarse por medio de la degradación por tripsina o calpaina. Estas enzimas provocan la formación de dos fragmentos diferentes, en uno se encuentra el sitio regulatorio y en el otro el sitio catalítico; este último es activo en la ausencia de activadores (Kishimoto *et al.*, 1989). Además se ha encontrado que *in vitro*, cada una de las isoformas presenta una sensibilidad específica a su degradación (Huang *et al.*, 1993).

La PKC recién sintetizada se presenta como una forma no fosforilada e inactiva de 74 kDa, que es convertida a una forma activada de 77-80 kDa mediante modificaciones postranscripcionales que consisten al menos de dos fosforilaciones (probablemente autofosforilaciones)(Borner *et al.*, 1989). Se ha mostrado que la autofosforilación altera la afinidad de los ésteres de forbol por la proteína y se ha notado que provoca un incremento en su sensibilidad hacia el Ca^{++} (Azzi *et al.*, 1992).

La activación de la PKC involucra en muchos casos una redistribución intracelular de esta enzima. Su redistribución se ha observado en diferentes tipos celulares y hacia distintos compartimientos dependiendo del estímulo. En neutrófilos, la distribución de la PKC entre el citosol y la membrana plasmática, presenta un equilibrio dinámico controlado por los niveles de calcio libre. En varias líneas celulares estudiadas, la PKC alfa parece estar localizada en el

DIAGRAMA 3. ACTIVACION DE LA PROTEINA CINASA C.



Rin: *Receptor inactivo*
PLC: *Fosfolipasa C*
PG: *Proteína G*
PtdIns4,5P₂: *Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato.*
PKC: *Proteína Cinasa C*
 PKC ac: *activa*
 PKC in: *inactiva*
InsP₃: *Inositol trifosfato*
RInsP₃: *Receptor InsP₃*

citoplasma y debido a tratamientos prolongados con PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) se observa una traslocación hacia la membrana celular, y posteriormente una regulación hacia abajo (Hug y Sarre, 1993). En fibroblastos Swiss 3T3, la PKC se asocia a la fracción nuclear después del tratamiento con el factor de crecimiento-I parecido al de la insulina, mientras que el movimiento de la enzima se efectúa hacia la membrana celular en presencia de bombesina (Divecha *et al.*, 1991).

DISTRIBUCION TISULAR E INTRACELULAR DE LAS ISOFORMAS DE LA PROTEINA CINASA C

Las isoformas de la PKC presentan especificidad celular. Han sido mapeadas utilizando diferentes técnicas como la hibridización histoquímica *in situ* e inmunocitoquímica obteniéndose resultados similares (Tanaka y Saito, 1992).

Se ha identificado la expresión de las isoenzimas en diferentes tejidos encontrándose que la isoforma alfa presenta una distribución universal, es decir se encuentra ampliamente expresada en muchos tejidos (Nishizuka, 1988); las PKC beta I y II se distribuyen ampliamente, se localizan en varios tejidos como el cerebro, tejidos endocrinos, islotes pancreáticos, en la glándula pituitaria, el corazón, el riñón, el pulmón, etc. (Nishizuka, 1988); mientras que la gama se encuentra únicamente en el Sistema nervioso central (SNC) (Tanaka y Saito, 1992); "eta" es la única subespecie que se expresa más abundantemente en tejidos periféricos que en el

SNC, se encuentra principalmente en la piel y el pulmón (Osada *et al.*, 1990); las isoformas delta, zeta y epsilon se expresan en varios tejidos (Ogita *et al.*, 1990; Hug y Sarre, 1993).

La mayoría de las isoformas se expresan en el SNC; existen neuronas que no expresan ninguna de ellas, en algunas neuronas se expresa solo un tipo de isoforma y en otras más de un tipo (Tanaka y Saito, 1992). En el SNC la PKC alfa se expresa menos abundantemente que las isoformas beta y gama, encontrándose primordialmente en el bulbo olfatorio, el núcleo septohipocampal, las regiones CA2 Y CA3 del hipocampo y estratum radiatum del hipocampo, islotes de Calleja y la parte intermedia del núcleo septo lateral (Ito *et al.*, 1990).

La PKC beta-I se expresa fundamentalmente en el núcleo septal triangular, el núcleo pontino, la materia gris y el núcleo del coliculus de la médula espinal (Hosoda *et al.*, 1989). La PKC beta II se expresa abundantemente en la región CA1 del hipocampo, caudado y putamen, neocorteza, tubérculo olfatorio, núcleo acumbens y sustancia nigra (kose *et al.*, 1990). La PKC gama se encuentra de manera abundante en el hipocampo, la neocorteza, el tálamo, el complejo amigdalino, el cerebelo, el núcleo coclear, el bulbo olfatorio, el tubérculo olfatorio, el núcleo olfatorio anterior y en la placa molecular del cerebelo (Tanaka y Saito, 1992; Huang *et al.*, 1988). Epsilon es prominente en el bulbo olfatorio, el tubérculo olfatorio, el septo lateral y el hipocampo. (Tanaka y Saito, 1992). La isoforma delta se localiza en el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, el septo lateral, el tálamo, el núcleo coclear, el cerebelo y en las líneas superficiales de la médula espinal. (Merchenthaler *et al.*, 1993). Es importante resaltar que el hipocampo, es una región del cerebro que muestra múltiple expresión de las isoenzimas en una

misma neurona y además las PKC convencionales se expresan de forma abundante.

También, en el SNC las isoformas presentan una distribución intracelular específica. Delta se encuentra primordialmente en neuronas, siendo prominente en el pericarion, ocasionalmente se encuentra en dendritas, fibras de axones y terminales nerviosas. El análisis del núcleo posterolateral del tálamo reveló que el núcleo celular, el retículo endoplásmico y la membrana plasmática son positivas a esta isoenzima (Merchenthaler *et al.*, 1993).

FUNCIONES DE LA PROTEINA CINASA C

Las funciones de la PKC son específicas en cada tipo de tejido y para cada isoforma (Hug y Sarre, 1993). Participan en secreción y exocitosis, modulan la conductancia iónica (Shearman *et al.*, 1989), regulan la interacción de receptores con componentes del aparato de transducción de señales, la contracción de músculo liso, la velocidad de transcripción de algunos genes y la proliferación celular (Nishizuka, 1988; Ogita *et al.*, 1990), etc.

En el SNC las isoformas controlan el movimiento de ciertos iones a través de la membrana plasmática mediante bombas iónicas, intercambiadores y canales, y por lo tanto modulan la concentración de iones, el potencial de membrana, y las señales eléctricas (Nishizuka, 1991), participan en la plasticidad sináptica (Akers y Routtenberg, 1985), etc. Se conocen varios sustratos de la PKC implicados en las funciones neuronales, como la neurogranina, que se

expresa paralelamente a la PKC gama en el cuerpo celular y en las dendritas de neuronas corticales e hipocampales; y la neuromodulina, proteína que parece desempeñar una función importante en el crecimiento neuronal, la plasticidad sináptica, la liberación de neurotransmisores y el metabolismo de fosfolípidos entre otros (Huang y Huang, 1993).

La diferenciación inducida por PMA o inhibida por estaurosporina en neuroblastoma (línea celular SH-SY5Y) ha sugerido que las isoformas presentes, desempeñan una función específica en la diferenciación neuronal. Se ha encontrado que mientras las isoformas alfa y beta se expresan abundantemente, la gama y la epsilon se encuentra en menores cantidades. Además, paralelamente a la extensión de los procesos a causa de la estimulación durante 72 horas con 10 nM PMA, se observa un decremento significativo de las isoenzimas alfa y epsilon, no siendo afectada la isoforma beta (Leli *et al.*, 1993).

La función que cumple la PKC en el SNC resulta de primordial interés, por estar implicada en funciones cerebrales tales como el aprendizaje y la memoria (Bliss y Collingridge, 1993) y además porque se han encontrado evidencias que la involucran directamente en la regulación de las funciones nucleares (Ogita *et al.*, 1990; Divecha *et al.*, 1993).

ANTECEDENTES DE LA PRESENCIA DE LA PROTEINA CINASA C EN EL NUCLEO CELULAR.

Las evidencias que apoyan la participación de la PKC en las funciones nucleares pueden agruparse en 2 tipos:

1) Existencia de sustratos localizados en el citoplasma, que son fosforilados por la PKC y consecuentemente traslocados al núcleo (Leonardo y Baltimore, 1989).

2) Localización nuclear de sustratos de esta cinasa (Beckmann *et al.*, 1992; Mahoney, 1992; Hocevar *et al.*, 1993; Corbett *et al.*, 1993). En este caso puede existir una traslocación de la PKC hacia el núcleo cuando es activada (Malviya, 1992) o una localización permanente de la enzima en el núcleo (Greif *et al.*, 1992).

En el primer tipo de evidencias de la participación nuclear de la PKC se encuentran aquellas en las que ha sugerido la activación de factores de transcripción (Diagrama 3).

El factor NF- κ B es una proteína que se une a la región potenciadora κ B presente en la secuencia reguladora de algunos genes. NF- κ B se localiza en el citoplasma unido a una proteína inhibidora (I κ B), en presencia de ésteres de forbol se trasloca hacia el núcleo, donde se une al DNA. Por estudios realizados *in vitro*, se ha sugerido que la capacidad de los ésteres de forbol para activar al NF- κ B se debe a la fosforilación del I κ B por la PKC, que causa la liberación del

NF-kB (Leonardo y Baltimore, 1989).

El factor de transcripción AP-1 posee actividad de unión al DNA, es un dímero constituido por múltiples proteínas incluyendo todos los miembros de la familia de genes Fos y Jun. Estos funcionan como genes tempranos que en condiciones basales, se expresan en niveles relativamente bajos o bien están ausentes y que son inducidos trascendentalmente por un amplio rango de estímulos extracelulares. Por experimentos *in vitro* se ha sugerido que la fosforilación de la región terminal carboxilo de jun, provoca un decremento en su actividad de unión al DNA, mientras que la fosforilación de la región amino terminal la incrementa. La fosforilación de fos incrementa su habilidad para inhibir la transcripción mediada por el elemento de respuesta al suero. Sin embargo dada la variedad de proteínas cinasas que fosforilan ha estos factores *in vitro* y las condiciones requeridas, es difícil determinar que cinasa fosforila a estas proteínas en circunstancias fisiológicas (Abate *et al.*, 1993).

Se ha encontrado, que en las neuronas en general existe una conexión funcional entre la activación de la PKC gama y la expresión del gen c-fos (Ambalavanar *et al.*, 1993) y se ha visto que *in vitro* la PKC fosforila a las proteínas fos y jun (Abate *et al.*, 1993). Además se ha encontrado que los genes que contienen el elementos de respuesta a los ésteres de forbol como la collagenasa, jun/AP1, c-fos, c-myc, metaloproteínas, etc., poseen velocidades de transcripción moduladas por los ésteres de forbol y la PKC, sin embargo no se conocen los mecanismos exactos de regulación (Cantley *et al.*, 1991).

La proteína C/EBP (miembro de la familia bZIP de proteínas que se unen al DNA) y la PKC se colocan en los núcleos de hígado de rata. *In vitro*, se ha demostrado que la fosforilación selectiva de la ser²⁹⁹ por la PKC, provoca una modificación en C/EBP que atenúa su unión al DNA, y que este aminoácido no puede ser fosforilado si C/EBP está unido al DNA, de manera que puede inferirse que la fosforilación es un medio de regulación de su actividad de unión. Se encontró además, que las PKC II y III son más potentes que la I, sin embargo no se halló ninguna secuencia consenso típica para la fosforilación por la PKC (Mahoney *et al.*, 1992).

En segundo lugar, la traslocación de la PKC al núcleo ha sido verificada por estudios de diversa índole. Utilizando constructos mutantes de la PKC alfa se encontró que la región carboxilo terminal del dominio catalítico y la región V3 exhiben en su secuencia primaria, al menos dos regiones separadas que poseen alta afinidad por sitios presentes en la envoltura nuclear. Dado que la región carboxilo terminal está conservada en las diferentes isoformas, a diferencia de la región V3, se sugiere que los sitios representan secuencias de unión al núcleo, las cuales son una común y la otra específica a las diferentes isoenzimas (James y Olson, 1992; Malviya, 1992).

Empleando diferentes ligandos en distintos tipos celulares se ha encontrado que, la traslocación hacia un compartimiento celular es específica tanto para el ligando como para el tipo de isoenzima (Hug y Sarre, 1993).

En la membrana de los linfocitos B, se expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II), que actúan como ligandos para los receptores del linfocito T (TCR). Las moléculas MHC-II, están codificadas en el genoma de ratón por los genes I-A e I-E. La interacción del TCR del linfocito T con el MHC-II del linfocito B, estimula la proliferación de estos últimos, pues las moléculas MHC-II están asociadas a proteínas transmembranales transductoras de señales. Dado que los anticuerpos anti I-A y anti I-E simulan el efecto de los TCRs, es decir inducen la proliferación de linfocitos B, se emplearon estos anticuerpos, con el fin de analizar los efectos que tiene la estimulación de los receptores MHC-II en el metabolismo, los niveles intranucleares y la compartimentalización de la PKC en los linfocitos B. Se encontró que ambos anticuerpos monoclonales inducen la traslocación de la PKC al núcleo, de manera rápida, tras la estimulación de los receptores durante 2-4 minutos. Además los anticuerpos anti I-A e I-E no inducen un cambio detectable en el metabolismo de los fosfolípidos o los niveles de calcio libre, por lo que tampoco se observa una traslocación de la PKC citoplasmática hacia la membrana plasmática. Estos estudios se complementaron con trabajos de inmunofluorescencia en donde se observó que la asociación de la PKC es probablemente con la membrana nuclear, y dado que dicha asociación no se rompe por agentes no iónicos (concentraciones menores o iguales a 1% de detergente NP40) se sugiere que la PKC no se une a lípidos (Chen *et al.*, 1987).

La estimulación de los fibroblastos IIC9 con alfa trombina provoca un incremento en los niveles de DG, la asociación de la PKC a la membrana nuclear y la fosforilación de sustratos endógenos en núcleos intactos que contienen ambas membranas. En estas células se expresan las

isoformas alfa, epsilon y zeta, las cuales en condiciones basales se distribuyen principalmente en el citoplasma. El tratamiento durante 10 minutos con 200 nM PMA disminuyó las concentraciones de las PKC epsilon y alfa en el citoplasma, pero en los núcleos, los niveles de alfa se elevaron 10 veces, mientras que los niveles de epsilon permanecieron constantes. Por otro lado, la estimulación durante 1 minuto con alfa trombina (500 ng/ml) provoca un incremento de 3 veces de la PKC alfa en el núcleo, los niveles de epsilon aumentan 2.5 veces en la membrana plasmática y se mantienen en el núcleo (Leach *et al.* , 1992).

En núcleos intactos, obtenidos de cerebro de bovino se encontró, a las isoformas alfa y gama de la PKC asociadas a las membranas nucleares y se observó poca reactividad para beta. Además se demostró que la PKC exógena puede ser activada por las membranas nucleares, que la PKC asociada a núcleo no es activada por ésteres de forbol (PDBu) ni dioleina, a menos que sean tratadas con detergentes. Lo que sugiere que la interacción de la PKC es probablemente con lípidos y no con proteínas (Buchner *et al.*, 1992).

Por último, en determinados tipos de células se ha encontrado a la PKC localizada en el núcleo de forma permanente. Análisis realizados *in vitro*, en células de hígado de rata se ha reconocido la localización de una PKC nuclear con base a sus distintos requerimientos de cofactores en comparación con la PKC citoplasmática. La máxima actividad de estas enzimas se alcanza a concentraciones de 3.5 mM y de 1.75 mM de Ca^{+2} en la fracción nuclear y la citoplasmática respectivamente. La PKC nuclear requiere la concentración de calcio óptima, tanto para obtener una mayor eficiencia en la activación por ésteres de forbol como para activar al

máximo a esta enzima (Masmoudi *et al.*, 1988). Mientras que en la fracción citosólica los ésteres de forbol reducen la constante de activación aparente (concentración para obtener la estimulación media-máxima) y por tanto la PKC puede ser activada por fosfatidilserina y 12-O-tetradecanoil forbol 13-O-acetato en ausencia de calcio (Wolf *et al.*, 1985).

Empleado inmunofluorescencia e inmunodetección *in vitro* se mostró que la PKC L (homólogo de eta) de 86 kDa se encuentra de manera específica y permanente en los núcleos de las líneas celulares A431, SCL 1 Y HaCaT derivadas de piel humana. La alta afinidad por los ésteres de forbol en el núcleo, también revela la presencia de la isoforma, sin embargo la señal fue menor que la observada por la inmunodetección, debido probablemente a no tener pleno acceso el forbol a las moléculas de PKC del núcleo (Greif *et al.*, 1992).

Además la localización de la PKC en el núcleo celular esta apoyado por diferentes estudios: diversos componentes del sistema de transducción de señales que activan a la PKC en la membrana plasmática han sido detectados en el núcleo. En núcleos purificados de hígado de rata libres de contaminación microsomal, se encontraron sitios específicos para la unión de (³²P)InsP3, con una densidad de 8.9 fmol/mg de proteína y con una alta afinidad (KD = 0.11 nM). Dichos receptores median una rápida liberación del calcio hacia la matriz. La entrada de ⁴⁵Ca⁺⁺ al núcleo parece ser dependiente de ATP y las concentraciones de calcio intranucleares son independientes de las del citoplasma. Estos hallazgos resultan importantes ya que los movimientos del calcio nuclear podrían estar vinculados con la activación de la PKC asociada a las membranas nucleares y/o a la fosforilación de proteínas nucleares, incluyendo aquellas

involucradas en la transcripción (Malviya *et al.*, 1990).

Además existen evidencias que indican la presencia de todas las enzimas necesarias para sintetizar polifosfoinosítidos en el núcleo. Al incubar núcleos purificados de hígado de rata con (³²P)ATP se observa la incorporación de fósforo radioactivo en inosítidos nucleares, con un patrón diferente al observado en la membrana plasmática (Divecha *et al.*, 1993).

Por otra parte, la estimulación de fibroblastos Swiss 3T3 con el factor de crecimiento insulínico-I provoca un decremento del PtdIns4,5P₂ y un incremento del DG en el núcleo; este efecto no se presenta en la membrana plasmática y además provoca la traslocación de la PKC (80 kDa) citoplasmática hacia el núcleo antes de 1 hr., cuando se registran los niveles de DG más altos (Divecha *et al.*, 1991).

Utilizando núcleos y membranas nucleares de corteza de cerebro de bovino, a los que se añadió proteína nuclear, se encontró que existen sustratos de cinasas cuya fosforilación es susceptible a inhibición por bajas concentraciones de inhibidores de PKC y los cuales son más eficientemente catalizados por la adición de la enzima. Dos de los sustratos nucleares fueron identificados como Lamina B2 y la proteína nucleolar B23 (Beckmann *et al.*, 1992).

Todos los resultados señalados anteriormente sugieren la existencia de un sistema de traducción de señales en el núcleo, en el que se encuentra implicada la PKC, que es distinto al localizado en la membrana plasmática, y que se encuentra bajo el control de receptores

localizados en la superficie celular.

NEUROTRANSMISORES Y REGULACION DE LA TRANSCRIPCION

Esta bien caracterizado que las señales trans-sinápticas provocan respuestas rápidas en las neuronas, que ocurren de milisegundos (por ejemplo la apertura de canales) a segundos o minutos (ej. eventos mediados por segundos mensajeros). Estudios recientes han revelado que la activación trans-sináptica también respuestas de larga duración (importantes en la plasticidad sináptica) que en muchos casos va acompañada de la inducción de nuevos programas genéticos (Goelet *et al.*, 1986). Muchos de estos cambios ocurren en la densidad sináptica, la expresión de receptores y canales iónicos, la síntesis de neurotransmisores.

Así aunque la función mejor caracterizada de los neurotransmisores es la regulación de la comunicación trans-sináptica en el SNC y el sistema nervioso periférico, estos también regulan cambios de larga duración que afectan las propiedades de las neuronas y otras células post-sinápticas (Greenberg *et al.*, 1986).

Los genes que responden a la estimulación trans-sináptica se dividen en 2 tipos: 1) genes tempranos: aquellos que son activados rápidamente, en general son proteínas regulatorias de los genes del tipo 2 y 2) Genes de respuesta tardía: se requiere de la síntesis de proteínas para ser activados, su función es principalmente en la respuesta neuronal.

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor que interactúa con receptores específicos de las membranas presinápticas, postsinápticas y gliares y que participa en diversas actividades fisiológicas; por ello, existen receptores a ACh muy diversos en su estructura, vías de regulación y cascadas de transducción de señales asociadas. La transducción de señales mediada por ACh ocurre a través de dos clases de superfamilias de receptores conocidas como muscarínicos (mAChR) y nicotínicos (nAChR), debido a su afinidad por la muscarina y nicotina, respectivamente (Hosey, 1992).

Los mAChR, son receptores asociados a proteínas G. Están constituidos por una única subunidad que posee siete regiones transmembranales. Al interactuar la ACh con la región extracelular del receptor (constituida por varios dominios hidrofóbicos), este sufre un cambio conformacional en el dominio citoplasmático, el cual le permite interactuar con una proteína G. Se han identificado al menos cinco subtipos de mAChR y todos se expresan en el SNC, son designados: M1, M2, ...M5. Cada uno presenta un dominio citoplasmático característico, con la capacidad de estimular distintos tipos de proteínas G (Hosey, 1992).

Las respuestas inducidas por los agonistas varían de acuerdo al tiempo de estimulación de los receptores. Se ha observado que *in vitro*, en cultivos primarios, con líneas celulares y en porciones de tejido, la interacción prolongada del mAChR con agonistas muscarínicos induce una respuesta de desensibilización seguida de la regulación hacia abajo de los receptores.

Una respuesta de corta duración es la internalización o secuestro de los receptores, que se efectúa minutos después de la estimulación con el agonista, horas después se observa la degradación de los mismos en el interior de la célula. Los efectos regulatorios de larga duración establecen un nuevo estado estacionario de los niveles de síntesis de RNAm del receptor.

En las células PC12, se ha demostrado que la transcripción del proto-oncogen fos y la actina, que son activados por factores de crecimiento, también pueden ser inducidos por agonistas nicotínicos. La exposición con 100 uM de nicotina incrementa 10 veces la concentración de c-fos, en los primeros 5 a 15 minutos y decrece después de los 30 minutos. Se encontró que la estimulación de c-fos y la actina son específicos, ya que no se estimula la transcripción de genes como la alfa tubulina y c-raf. Además se encontró que la activación es dependiente de la dosis, la concentración mínima de nicotina que induce una respuesta es 10 uM y la máxima 100 uM (Greenberg *et al.*, 1986).

En el caso de los mAChR, utilizando cultivos de células de corazón de embrión de pollo, los cuales fueron tratados con carbacol (agonista colinérgico muscarínico) (1uM-1mM), se encontró que se requiere de una exposición prolongada al carbacol para mantener niveles bajos de RNAm del mAChR y se necesita de al menos 12 horas después de eliminar al agonista, para regresar a los niveles basales del RNAm. Se encontró que existe un decremento en el número de los receptores dependiente de la dosis. A los primeros minutos de estimulación, el número de receptores empieza a disminuir encontrándose que a los 3 minutos de estimulación el 30% de los mAChR han desaparecido; a las 6 horas de tratamiento se llega a una fase estacionaria en

donde se mantiene constante el número de mAChR por aproximadamente 24 horas. Se ha sugerido que el agonista induce cambios en los niveles del RNAm del receptor a nivel transcripcional, debido a que la vida media de los RNAm no se ve afectada y a que la actinomicina D (inhibidor de la síntesis de RNAm) no afecta los niveles del receptor. En corazón de pollo, la activación de los mAChR provoca la inhibición de la adenilato ciclasa y la estimulación de la hidrólisis del PtdIns; ambos mensajeros se sabe que alteran la velocidad de transcripción (Habecker y Nathanson, 1992).

Estudios bioquímicos han demostrado que la estimulación de los mAChR de células de corteza cerebral con carbacol, provoca la hidrólisis de PtdIns y la consecuente activación de la PKC; además puede generar diferentes respuestas entre las que se incluyen la desensibilización de los receptores (Huizen y Tonnaer, 1993).

Por otra parte, también por estudios bioquímicos se ha demostrado que existe en el hipocampo una fuerte estimulación del sistema de PtdIns por agonistas muscarínicos, y se ha visto que aunque la PKC no media todas las acciones de estos receptores, si inhibe respuestas colinérgicas en varios tejidos. (El-Fakahany *et al.*, 1988).

Con estos antecedentes, en el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1.-Determinar cuáles de las isoenzimas de la proteína cinasa C más abundantes en el cerebro de mamíferos (alfa, beta, gama y epsilon) existen en el núcleo de las neuronas de hipocampo de rata.

2.-Determinar la distribución de cada isoenzima en diferentes fracciones nucleares de neuronas de hipocampo de rata.

3.-Determinar cuáles de estas isoformas se regulan o traslocan en las fracciones nucleares por efecto específico del agonista colinérgico carbacol.

MATERIALES Y METODOS

1.-MEDIOS DE CULTIVO

Los medios DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)(Morton, 1970) Y F12 (Ham, 1965) se obtuvieron de GIBCO BRL. Se les agregó 33 mg de penicilina G potásica, 50 mg de sulfato de estreptomicina y 1.2 g de NaHCO₃ por litro. El medio N2 se preparó haciendo una mezcla 1:1 de medio DMEM/F12 suplementandolo con 10.0 ug/ml de insulina, 100.0 ug/ml de transferrina, 6.28 ng/ml de progesterona, 16.1 ug/ml de putresina, 5.19 ng/ml de selenito de sodio y 5 mM de Hepes. Fueron esterilizados por filtración con millipore de 0.45 um y mantenidos a 4°C.

2.-ANTICUERPOS

Los anticuerpos específicos contra las isoformas alfa, beta, gama y epsilon de la proteína cinasa C se adquirieron de GIBCO BRL. Estos fueron generados en conejos utilizando péptidos con la secuencia correspondiente a la región V3 de la cinasa.

La región V3 de la isoforma alfa reconocida por los anticuerpos anti PKC alfa corresponde a los aminoácidos 313 a 326:

ala-gly-asn-lys-val-ile-ser-pro-ser-glu-asp-arg-arg-gln.

Los anticuerpos anti PKC beta reconocen la secuencia de aminoácidos del 313 al 329 de esta isoforma (no distinguen entre PKC beta I y II):

gly-prol-lys-thr-pro-glu-glu-lys-thr-ala-asn-thr-ile-ser-lys-phe y asp.

Los anticuerpos anti PKC gama reconocen los aminoácidos 306 a 318:

asn-tyr-pro-leu-glu-leu-tyr-glu-arg-val-arg-thr-gly.

y los aminoácidos de la PKC epsilon, reconocidos por los anticuerpos anti PKC epsilon (313 - 326) son los siguientes:

lys-gly-phe-ser-tyr-phe-gly-glu-asp-leu-met-pro.

Se emplearon diluciones 1:500 de los anticuerpos anti PKC. Los anticuerpos de ratón anti IgG de conejo conjugados con Peroxidasa (HRb IgG) se adquirieron de SIGMA Chem. Se empleó una dilución 1:1000. Ambos anticuerpos se diluyeron en 3 ml de PBS con albúmina sérica de bovino al 2% y Tween 20 al 0.05%.

OTROS REACTIVOS :

REACTIVO BRADFORD. El reactivo Bradford se obtuvo de Biorad. (100 mg de azul de coomassie brillante G-250 en 50 ml de etanol al 95%, 100 ml de ácido fosfórico concentrado y agua destilada para un volumen de 200 ml)

LUMINOL (Diacilhidrazido cíclico): Reactivos obtenidos de Amersham (sistema de detección ECL).

SOLUCION ROJO DE PONCEAU S. 0.1% de Rojo de Ponceau S en 5% de ácido acético. Fue adquirida de SIGMA Chem.

3.-CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS DE HIPOCAMPO.

Las neuronas de hipocampo se obtuvieron de ratas postnatales, de 7 a 8 días de edad, empleando 50 ratas por cultivo.

a)PREPARACION DE LAS CAJAS DE CULTIVO.-En cada cultivo se utilizaron 12 cajas petri de 100 x 15 mm (FALCON), las cuales fueron tratadas previamente con poli-L-lisina durante 24 horas a 52°C. Se emplearon por caja, 4 ml de poli-L-lisina al 0.2 % diluida en una solución 0.1 M de ácido bórico pH 8.4. Posterior al tratamiento, las cajas fueron esterilizadas

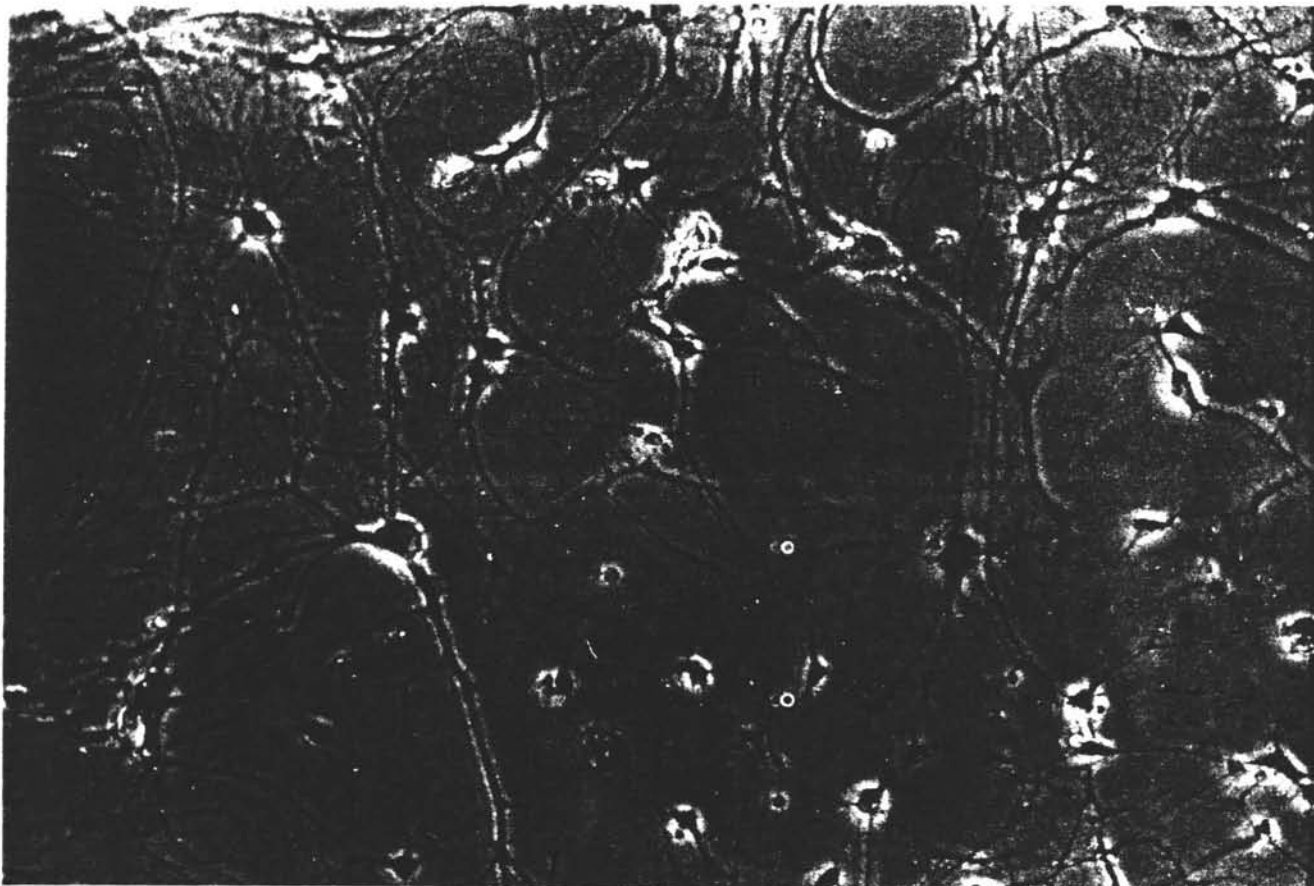
con luz ultravioleta durante 45 minutos. Finalmente fueron lavadas con 4 ml de medio DMEM, después de 30 minutos el medio fue eliminado y antes de iniciar la disección, a cada caja se agregó 4 ml de medio DMEM con suero fetal de bovino al 20% y se mantuvieron en la incubadora a 37°C (Banker y Cowan, 1977).

b)PREPARACION DE LAS CELULAS.-Las ratas sacrificadas por dislocación cervical fueron aseptizadas manteniéndolas en alcohol al 70% y en benzal, durante 3 minutos en cada solución, y en seguida decapitadas. El cerebro fue extraído y mantenido en solución salina estéril (9 gr de NaCl/ litro de agua destilada), posteriormente las meninges fueron removidas y el hipocampo fue disecado (Banker y Cowan, 1977).

La solución salina en la que se mantuvo el tejido durante la disección, fue reemplazada por 25 ml de medio DMEM con suero. Las células se aislaron mecánicamente, resuspendiendo el tejido aproximadamente 40 veces utilizando una pipeta Gilson de 5 ml; posteriormente la suspensión celular se pasó a través de filtros de 82 y 30 μ m; finalmente las células fueron sembradas en las cajas de cultivo. Se añadieron 2 ml de la suspensión (6 millones de células/caja aproximadamente), completando 6 ml de medio por caja (Banker y Cowan, 1977).

El cultivo primario se mantuvo en medio con suero durante 24 hrs., posteriormente cada 3 días se efectuaron cambios del medio N2 (utilizando 6 ml/caja).

CULTIVO DE NEURONAS DE HIPOCAMPO DE RATA



c)TRATAMIENTO.- Los cultivos de 11 días fueron tratados con carbacol 1 mM durante 18 horas y/ó atropina 100 uM, aplicada 1:30 hr. antes. Se adicionaron 50 ul de carbacol diluido en agua destilada (solución 100 mM) a las cajas de cultivo conteniendo 5 ml de medio N2 o bien 50 ul de atropina (solución 10 mM).

4.-PURIFICACION Y FRACCIONAMIENTO DE NUCLEOS

Las células de 12 días fueron empleadas para determinar la presencia de la PKC.

Todo el procedimiento de fraccionamiento se efectuó a 4°C. El medio de cultivo fue eliminado y después de dos lavados con 10 ml PBS frío (solución salina amortiguadora de fosfatos: 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 8.1 mM de Na₂HPO₃, 1.5 mM de KH₂PO₄, 0.9 mM de CaCl₂ y 0.5 mM de MgCl₂), reemplazado por 1.2 ml de la solución A (Buffer 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 2.5 mM de MgCl₂, 1.0 mM de Pirofosfato de sodio, 1.0 mM de cloruro de zinc, 1.0 mM de PMSF (fluoruro de fenil metil sulfato), 25 ug/ml de aprotinina, 25 ug/ml de leupeptina y 1.0 mM de AEBSF), conteniendo 0.32 M de sacarosa. En esta solución la monocapa de células fue despegada mediante el raspado de las cajas de cultivo, homogeneizada (empleando 20 movimientos del homogenizador) y finalmente centrifugada a 300 x g durante 10 minutos para obtener en la pastilla, la fracción nuclear cruda; el sobrenadante se centrifugó a 130,000 x g por 30 minutos para obtener en la pastilla un control positivo de membranas celulares que se utilizó en los experimentos de inmunodetección.

La fracción nuclear cruda fue purificada empleando gradientes discontinuos de sacarosa. Dicha fracción se resuspendió en 1 ml de la solución A conteniendo una concentración 2.2 M de sacarosa, encima de esta primer capa, se agregaron 3 ml de una solución 0.32 M de sacarosa para completar de esta manera el gradiente, el cual se centrifugó a 130,000 x g durante 30 minutos.

La pastilla obtenida de esta última centrifugación, con los núcleos purificados fue resuspendida en 200 ul de solución B (20 mM de Tris, 0.5 mM de EDTA, 0.5 mM de EGTA, 1.0 mM de mercaptoetanol y 25 ug/ml de aprotinina y leupeptina).

Cuando se obtuvieron fracciones nucleares, la pastilla con los núcleos fue resuspendida en 1 ml de la misma solución incluyendo tritón X-100 al 0.4 % y se mantuvo durante 10 minutos a 4°C, con el fin de solubilizar la membrana nuclear; en seguida se centrifugó a 300 x g por 10 minutos para separar las membranas nucleares (contenidas en el sobrenadante) de la cromatina y el nucleoplasma (contenidas en la pastilla).

Para concentrar las membranas nucleares, el sobrenadante se centrifugó durante 30 minutos a 130,000 x g en la solución A conteniendo 0.32 M de sacarosa, y finalmente la pastilla obtenida se resuspendió en 50 ul de la solución B. Por otra parte, la cromatina y el nucleoplasma se incubó a 4°C durante 15 minutos en 50 ul de la solución B conteniendo 2.5 mM de EDTA. En seguida la suspensión fue sonicada a 60 Hz durante 3 minutos para romper la cromatina y se centrifugó a 12,000 x g por 2 minutos, para obtener en el sobrenadante el nucleoplasma. La pastilla, conteniendo la cromatina, fue resuspendida en 100 ul la solución B con 0.2 M de NaCl y posteriormente centrifugada a 12,000 x g durante 2 minutos, siendo finalmente resuspendida en 50 ul de la solución B.

Utilizando el método de Bradford (1976) se determinó la concentración de proteína de los núcleos enteros y de cada una de las fracciones obtenidas. Se realizaron lecturas a 560 nm.

Posteriormente las muestras fueron diluidas con un volumen igual de solución amortiguadora de Laemmli 2x (4 ml de dodecil sulfato de sodio al 10%, 2 ml de glicerol y 1.2 ml de tris 1 M (pH 6.8) en 2.8 ml de agua destilada con azul de bromofenol al 0.01%), hervidas durante 7 minutos y almacenadas a -20°C.

5.-ELECTROFORESIS

Se realizaron electroforesis de núcleos enteros y de todas las fracciones nucleares en geles desnaturalizantes de acrilamida al 10% (para 10 ml de solución se agregó 3.3 ml de acrilamida al 30%, 2.5 ml de Tris básico 1.5 M (pH 8.8), 100 ul de dodecil sulfato de sodio al 10%, 100 ul de persulfato de amonio al 10%, 4 ul de Temed y 4 ml de agua bidestilada) con el fin de separar por peso molecular las proteínas de las muestras analizadas. La corrida se efectuó durante 30 minutos empleando 100 volts, en la que se utilizó solución amortiguadora de corrida de Laemmli (3 gr. de Tris, 14.4 g de glicina, SDS al 10%, para 1 litro de agua bidestilada pH 8.3).

Se emplearon los siguientes marcadores de peso molecular, obtenidos de SIGMA Chem: lisozima (14 400), inhibidor de tripsina (21 500), anhidrasa carbónica (45 000), albúmina sérica de bovino (66 200) y fosforilasa B (97 400).

6.-INMUNODETECCION

Las proteínas separadas por su peso molecular en los geles de acrilamida, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (0.45 μ m de poro), por elución electroforética (sistema semihúmedo) empleando 15 volts durante 1 hora. Para verificar la eficiencia de la transferencia, la membrana se tiñó con Rojo de Ponceau; dicho colorante se empleó para determinar la posición de los marcadores de peso molecular (estos fueron señalados en la membrana con tinta indeleble). Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa fue lavada en PBS para eliminar el colorante y enseguida fue bloqueada, utilizando 25 ml de en PBS con leche en polvo al 100% y mantenida en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.

La inmunodetección se efectuó por un método indirecto: Antes de añadir el primer anticuerpo se eliminó la solución de bloqueo y la membrana se enjuagó 2 veces con 10 ml de PBS. La membrana se incubó con los anticuerpos de conejo anti proteína cinasa C a 37°C durante 1 hora agitando a 4 rpm. Posteriormente, se efectuaron 4 lavados (cada uno con 25 ml de PBS) con agitación vigorosa, en los dos primeros lavados se utilizó leche al 10 % y Tween-20 al 0.05% y en los dos último se utilizó, únicamente leche al 10%, cada lavado fue de 10 minutos. En seguida se incubó con el segundo anticuerpo (IgG anti conejo conjugado con peroxidasa) en las condiciones empleadas anteriormente y fue seguida de los mismos 4 lavados y enseguida enjuagada con PBS (Harlow y Lane, 1988).

Finalmente, la detección de las isoformas de la proteína cinasa C inmovilizadas en la membrana y conjugadas indirectamente con los anticuerpos marcados con peroxidasa, se efectuó por quimioluminiscencia, empleando el sistema de detección con luminol de Amersham. El sistema se basa en la oxidación del luminol efectuada por la peroxidasa en condiciones alcalinas; el luminol oxidado, se encuentra en estado excitado y decae lentamente hacia su estado basal emitiendo luz. La luz producida en esta reacción alcanza su máxima emisión después de los 5 a 20 minutos y disminuye lentamente, teniendo una vida media de aproximadamente 60 minutos. La máxima emisión de luz se detecta a los 428 nm, longitud de onda que puede ser detectada en película de autorradiografía sensible a la luz azul (Amersham Life Science, 1993).

La membrana de nitrocelulosa fue colocada en un recipiente seco, donde se cubrió con luminol (0.125ml/cm²) y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente; en seguida, el exceso de reactivo se eliminó y la membrana se envolvió en plástico (megapack), para evitar el contacto del reactivo con la placa de autorradiografía. En oscuridad, la placa de autorradiografía (X-Omat de Kodak) se colocó sobre la membrana (en la cara donde se transfirieron las proteínas) y la exposición se mantuvo durante un periodo de 20 minutos. Después de este periodo la película fue revelada (Amersham Life Science, 1993).

REUTILIZACION DE LAS MEMBRANAS. La membrana fue enjuagada con PBS y guardada en la misma solución a 4 grados centígrados para su empleo posterior. Para eliminar los anticuerpos, las membranas se incubaron durante 30 minutos a 50°C con agitación ocasional

en 5 ml de solución C (62.5 mM de Tris pH 6.7, 100 mM de 2-mercaptoetanol y SDS al 2%). Posteriormente se lavó la membrana 2 veces durante 5 minutos con PBS, y se repitió el proceso desde el bloqueo, empleando un primer anticuerpo diferente.

7.-DENSITOMETRIA

Con el fin de realizar un análisis cuantitativo de las bandas detectadas, se determinó la absorbancia de las autorradiografías en el densitómetro LKB ULTRA SCAN XL de Pharmacia.

RESULTADOS

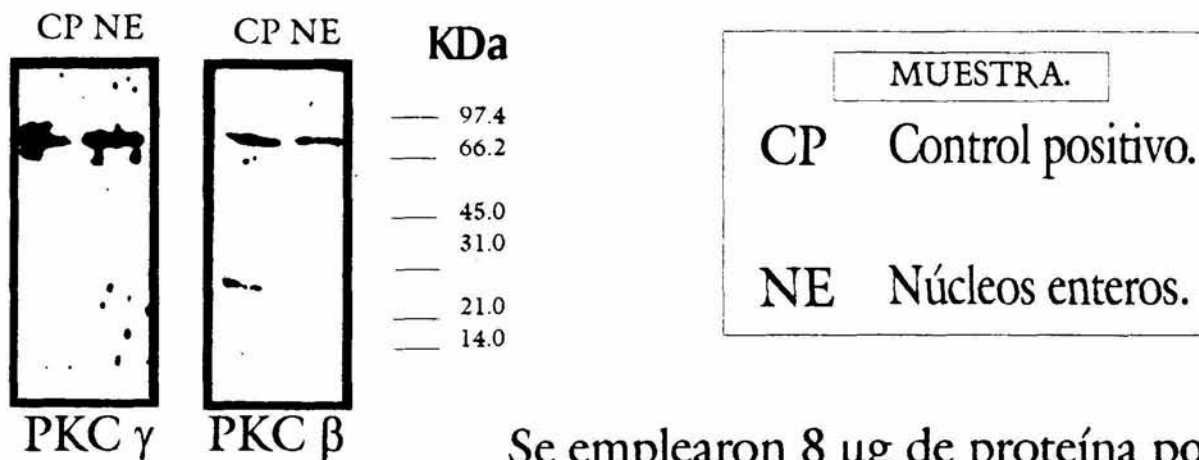
LOCALIZACION DE LAS ISOENZIMAS BETA Y GAMA DE LA PROTEINA CINASA C EN NUCLEOS DE NEURONAS.

Los primeros experimentos se realizaron con el fin de precisar cuales de las isoformas de la proteína cinasa C más abundantes en cerebro de mamíferos, se expresan en los núcleos de neuronas de hipocampo de rata crecidas *in vitro*. Para ello se efectuaron inmunodetecciones de estas isoenzimas por medio de anticuerpos policlonales anti PKC, en patrones electroforéticos de proteínas de núcleos enteros transferidas a membranas de nitrocelulosa.

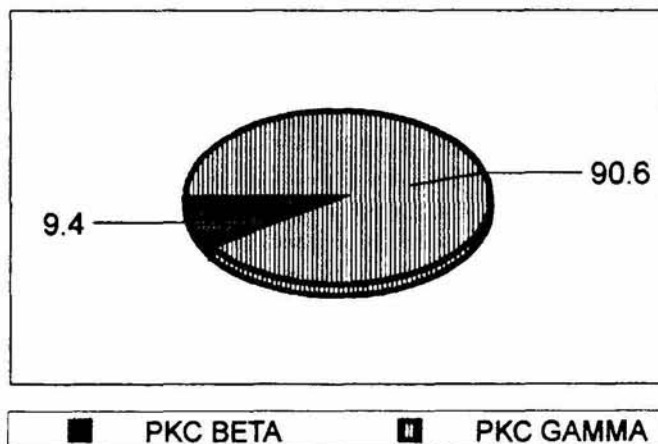
En núcleos enteros utilizando concentraciones iguales de proteína (8 ug), se probaron anticuerpos anti PKC alfa, beta, gama y epsilon. Con estos experimentos, se identificó a las isoenzimas de la PKC más abundantes en los núcleos de estas neuronas.

Se encontró únicamente clara inmunoreacción para las isoformas gama y beta (Figura 1). La inmunoreacción con los anticuerpos anti PKC epsilon fue muy débil, probablemente representa menos del 2% de la PKC nuclear, en fracciones nucleares se encontraron 0.1 Unidades de densidad óptica (U.D.O)/10 ug de proteína, sin embargo, esta isoforma no se detectó cuando fueron utilizados núcleos enteros. En estas condiciones (empleando aproximadamente 20 ug de proteína de cerebro de bovino o 20 ug de proteína de sinaptosomas obtenidos de los cultivos de neuronas de hipocampo o 10 ug de proteína nuclear) tampoco pudo

FIGURA 1.- INMUNODETECCION DE PKC γ Y β EN NUCLEO.



GRAFICA 1.-PROPORCION DE LAS ISOFORMAS BETA Y GAMA DE LA PKC EN NUCLEO.



determinarse la presencia de la isoforma alfa. En el presente trabajo, las bandas detectadas se ubicaron entre los marcadores con peso molecular (PM) de 66 y 97 kDa, es decir con un peso molecular adecuado para dichas isoformas (Figura 1). Se ha informado que la PKC beta presenta un PM de 79 a 80 kDa, mientras que la PKC gama desde 77 a 84 kDa (Hug y Sarre, 1992).

Para cuantificar los resultados, se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas en la inmunodetección. Estos valores refieren la concentración de PKC presente en la muestra y son expresadas en unidades de densidad óptica (U.D.O.).

Los porcentajes presentados, describen la distribución de la proteína cinasa C gama y beta en las neuronas. Las U.D.O. obtenidas para cada muestra y para cada isoforma fueron divididas entre la concentración de proteína empleada en el ensayo (8 ug de proteína en el caso de núcleos enteros) para tener U.D.O./ug de proteína, este valor fue multiplicado por la concentración total de proteína obtenida de cada fracción celular (homogenado, núcleo, etc), para presentar valores de las U.D.O./fracción y de esta manera obtener la concentración relativa de la PKC en cada una de estas fracciones. Por otro lado, se consideró como 100% de PKC, a la suma de los valores obtenidos para PKC beta y gama en el homogenado total de neuronas de hipocampo (Tabla 1).

A partir de estos valores, se encontró que en el núcleo existe un 3.66% de PKC (Tabla 2), este porcentaje es substancial, dado que la proteína de la fracción nuclear purificada que nosotros registramos en estas células equivale a un 5% de la concentración de proteína celular total (Tabla 1).

TABLA I. CONCENTRACIÓN DE PROTEINA OBTENIDA EN LAS FRACCIONES CELULARES Y UNIDADES DE DENSIDAD OPTICA CORRESPONDIENTES A LA PKC β Y γ .

FRACCION CELULAR (cantidad de proteína)	Porcentaje	U.D.O. totales de PKC en la fracción.	Porcentaje	PKC
660 μ g (homogenado)	100	70	24.3	β
		218	75.7	γ
38 μ g (núcleo)	5.75	0.97	9.4	β
		9.4	90.6	γ

TABLA 2. -DISTRIBUCION DE LAS ISOFORMAS BETA Y GAMA DE LA PKC EN NEURONAS DE HIPOCAMPO DE RATA

FRACCION CELULAR	PKC BETA	PKC GAMA	PKC TOTAL
HOMOGENADO TOTAL	24.31%	75.69%	100.00%
NUCLEO	0.38%	3.28%	3.66%
OTRAS FRACCIONES	23.93%	72.41%	96.34%

Del 75.69% de PKC gama y del 24.31% de PKC beta hallado en el homogenado el 3.28% y 0.38% de cada isoforma están en el núcleo respectivamente (Tabla 2). La concentración de la isoforma gama fue mayor en ambas fracciones. En el núcleo esta isoforma, esta 8 veces más concentrada que la PKC beta, y solo 3 veces más en el resto de la célula.

Como se muestra en la gráfica 1, el 90.6% de la PKC nuclear es de tipo gama y solo el 9.35% es beta. Estos resultados resaltan la importancia de la PKC gama del núcleo en las neuronas de hipocampo.

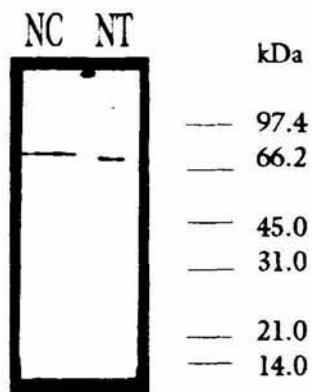
EFFECTOS DEL CARBACOL EN LOS NIVELES DE LAS ISOFORMAS BETA Y GAMA DE LA PROTEINA CINASA C EN EL NUCLEO.

Los cultivos fueron tratados con 1 mM de carbacol, con el fin de investigar su efecto en los niveles de las isoformas gama y beta de la PKC en núcleos enteros.

Cuando se utilizaron los anticuerpos anti PKC beta en general no se detectó ninguna variación significativa en sus niveles a causa del tratamiento con carbacol (Figura 2).

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos con la inmunodetección por anticuerpos anti PKC gama también en núcleos enteros. En este caso, el efecto del carbacol en los niveles de la enzima es aparentemente una regulación hacia abajo. Esto es, el tratamiento provocó una disminución del 66% (Gráfica 2).

FIGURA 2 .- INMUNODETECCION DE PKC β EN NUCLEO.



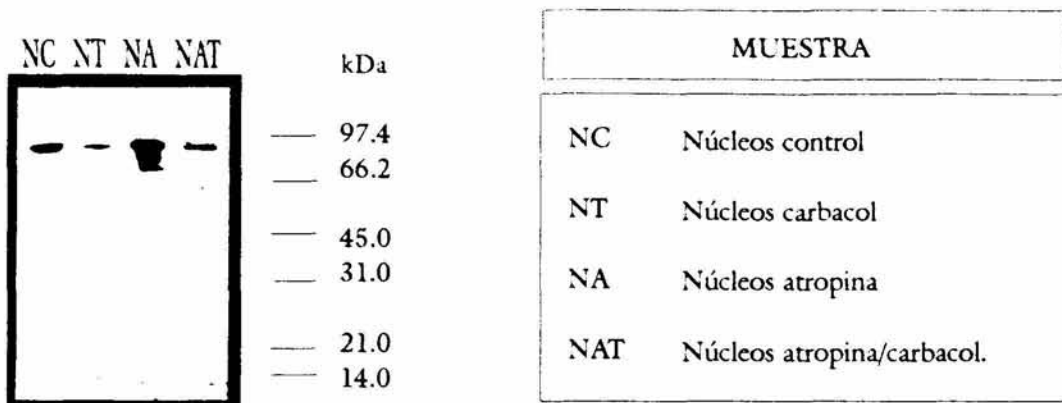
MUESTRA

NC Núcleos control

NT Núcleos carbacol

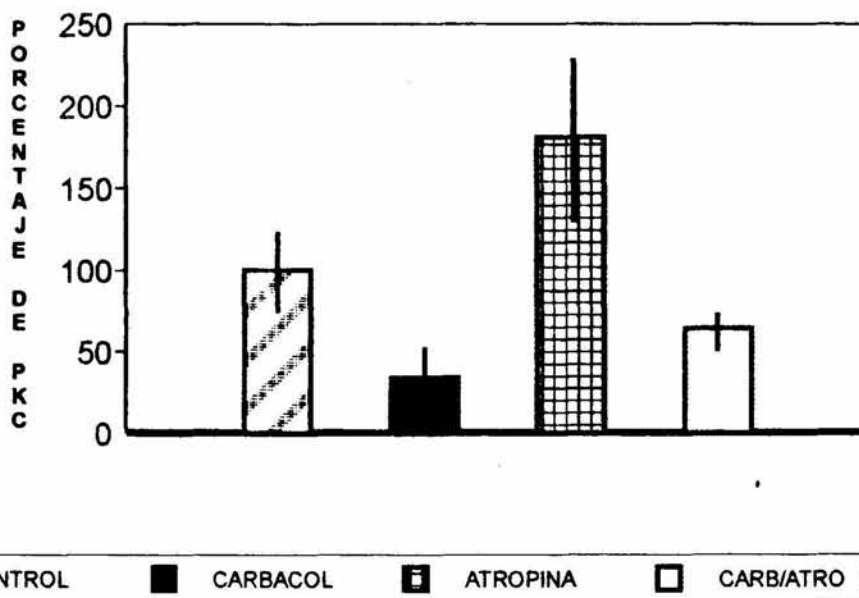
Los cultivos fueron tratados con 1 mM de carbacol.
Se emplearon 4.0 μ g de proteína/carril.

FIGURA 3.- INMUNODETECCION DE PKC γ EN NUCLEO.



Los cultivos fueron tratados con 1 mM de carbacol y/o 100 μ M de atropina. Se emplearon 4.0 μ g de proteína/carril.

GRAFICA 2.- EFECTO DE CARBACOL Y ATROPINA EN LOS NIVELES DE PKC GAMA EN NUCLEO.



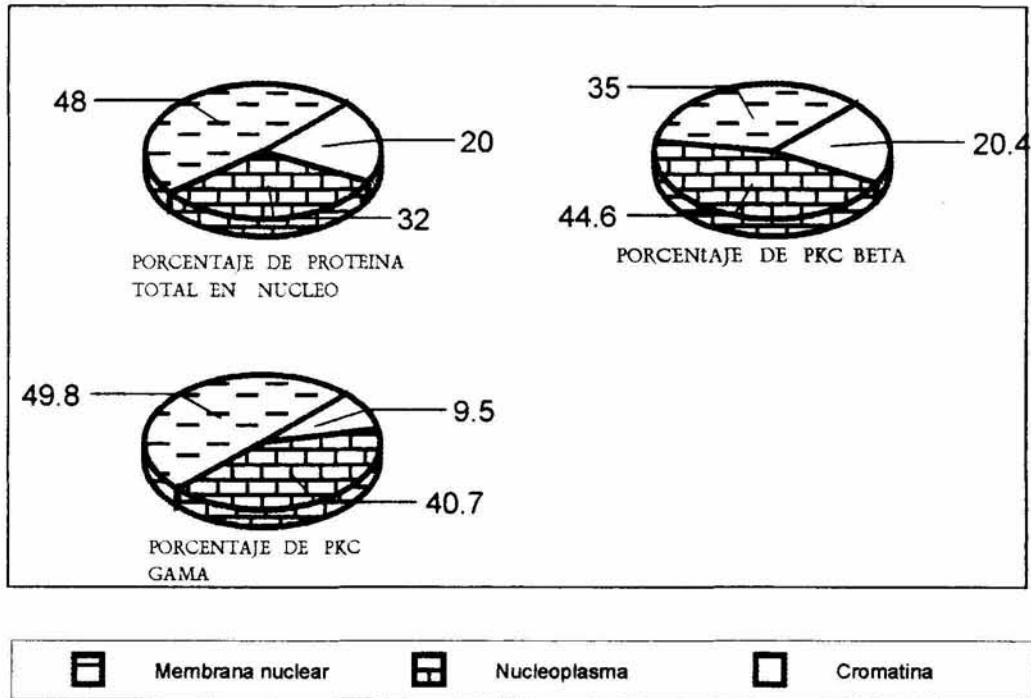
Con el propósito de verificar que la variación observada en la concentración de PKC gama, fuera un efecto específico de la activación del receptor muscarínico, los cultivos fueron tratados 90 minutos previos a la adición de carbacol, con un antagonista global de los receptores muscarínicos, atropina (100 uM).

En este caso, los resultados se expresaron como porcentajes de los valores obtenidos en condiciones basales. Se encontró que, en los núcleos de cultivos tratados con carbacol y estimulados previamente con atropina, los niveles de PKC gama se bloquean parcialmente, es decir se reducen únicamente hasta el 64%, y no hasta el 34% como se observa con el tratamiento de carbacol. Sin embargo en los núcleos de los cultivos tratados solo con atropina, los niveles de esta enzima subieron hasta el 181% (Gráfica 2).

DISTRIBUCION INTRANUCLEAR DE LAS ISOFORMAS BETA Y GAMA DE LA PROTEINA CINASA C.

Para evaluar la distribución de estas isoformas en el interior del núcleo, se efectuaron pruebas en 3 fracciones nucleares: cromatina (Cr), nucleoplasma (Np) y membrana nuclear (Mb). En estas determinaciones se emplearon de 0.5 a 1.5 ug de proteína de cada fracción por ensayo. En condiciones basales, para ambas isoenzimas se detectó una clara inmunoreacción en todas las fracciones nucleares. En la gráfica 3 se ilustra la distribución de ambas isoformas en las fracciones

GRAFICA 3.- DISTRIBUCION DE LAS ISOFORMAS BETA Y GAMA EN LAS FRACCIONES NUCLEARES.



nucleares. Dichos valores se obtuvieron como se mencionó anteriormente y son expresados como porcentajes individuales de cada isoforma.

Se encontró que la PKC beta se haya en mayor concentración en el nucleoplasma con un 44.6%, en segundo lugar esta presente en la membrana nuclear con un 35% de la enzima y en menor concentración en la cromatina con el 20.4% de la misma. Esta isoforma exhibió una distribución más homogénea en las fracciones nucleares que la isoforma gama. La PKC gama, por otra parte se localizó primordialmente en el nucleoplasma, y en la membrana nuclear, con un 40.7 y un 49.8% respectivamente, mientras que concentraciones más bajas se registraron en la cromatina con un 9.5% (Gráfica 3).

En los experimentos de inmunodetección realizados con el anticuerpo anti PKC beta se obtuvo generalmente una única banda de 80 kDa (Figura 4) y solo en algunas ocasiones se observaron dos bandas. Por el contrario, en los experimentos realizados con el anticuerpo anti PKC gama, en la mayoría de los casos la inmunoreacción se visualizó como dos bandas con pesos moleculares aproximados de 80 y 67 kDa. La abundancia de ambas bandas, es decir, una con respecto a la otra fue relativamente variable (Figura 5).

EFECTO DEL CARBACOL EN LA DISTRIBUCION Y EN
LOS NIVELES INTRANUCLEARES DE LAS ISOFORMAS BETA Y GAMA
DE LA PROTEINA CINASA C.

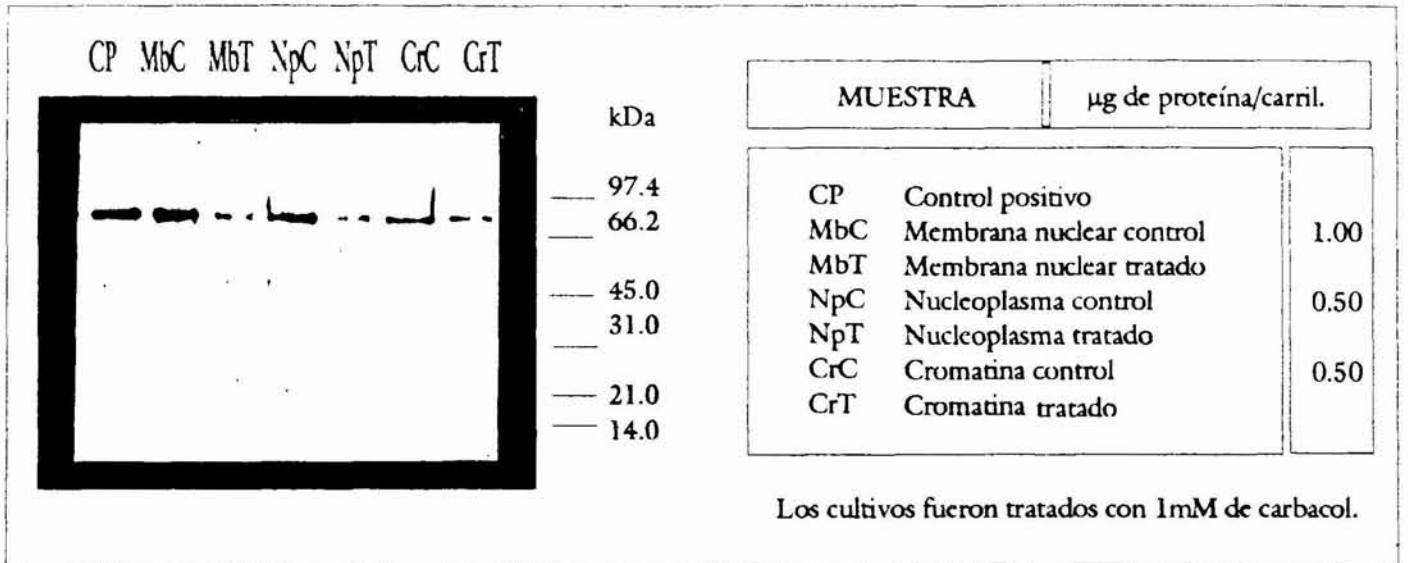
De la misma manera, a los experimentos realizados en núcleos enteros, se determinaron los cambios en las concentraciones de la isoformas beta y gama por el tratamiento con carbacol, en las fracciones nucleares . En la figura 4 y 5, se presentan los resultados para PKC beta y gama, respectivamente.

En condiciones basales estos resultados también se expresaron como porcentajes, considerando el 100% a la suma de las U.D.O./ug de proteína de cada una de las fracciones. Para ambas isoformas, se consideró únicamente la contribución de la banda de 80 kDa.

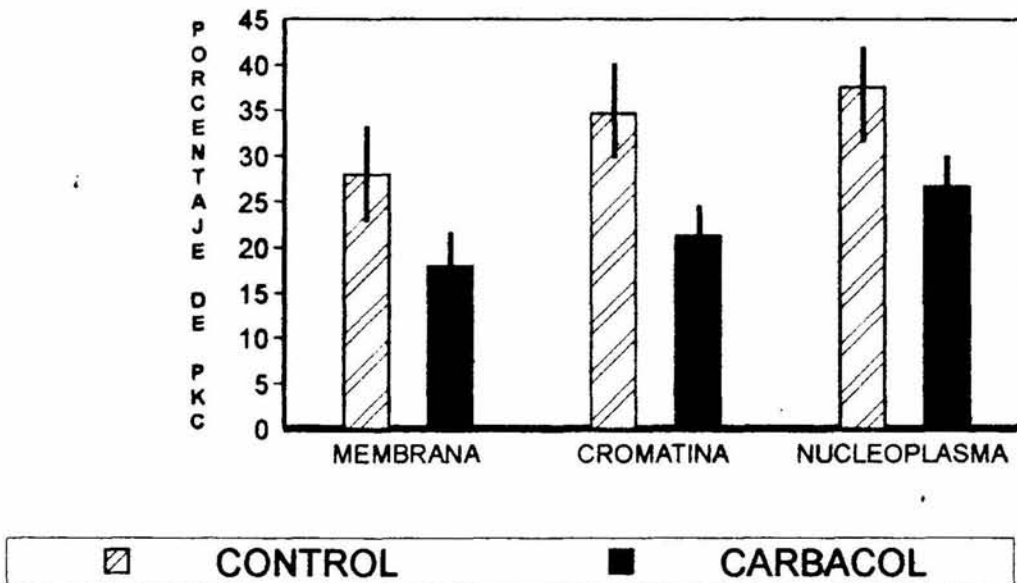
En estas condiciones el 27.9% de la PKC beta se encontró en la membrana nuclear, el 34.6% en la cromatina y un 37.5% en el nucleoplasma (Gráfica 4)

En las células tratadas con carbacol se detectó un 18% de PKC beta en la membrana nuclear, lo que representa una disminución en la concentración de esta isoforma del 36%; en la cromatina se detectó un 21.3% que significa un cambio hacia abajo del 38.4% y en el nucleoplasma un 26.7% que es equivalente a una disminución del 23.7% (Gráfica 4).

FIGURA 4.- INMUNODETECCION DE PKC β EN FRACCIONES NUCLEARES.



GRAFICA 4.- EFECTO DEL CARBACOLEN LOS NIVELES DE LA PKC BETA EN FRACCIONES NUCLEARES.



Por otra parte, también en condiciones basales, en la membrana nuclear se encontró un 28.5% de la isoforma gama, en la cromatina un 20.5% y la mayor concentración de esta isoforma se ubicó en el nucleoplasma con un 51% (Gráfica 5).

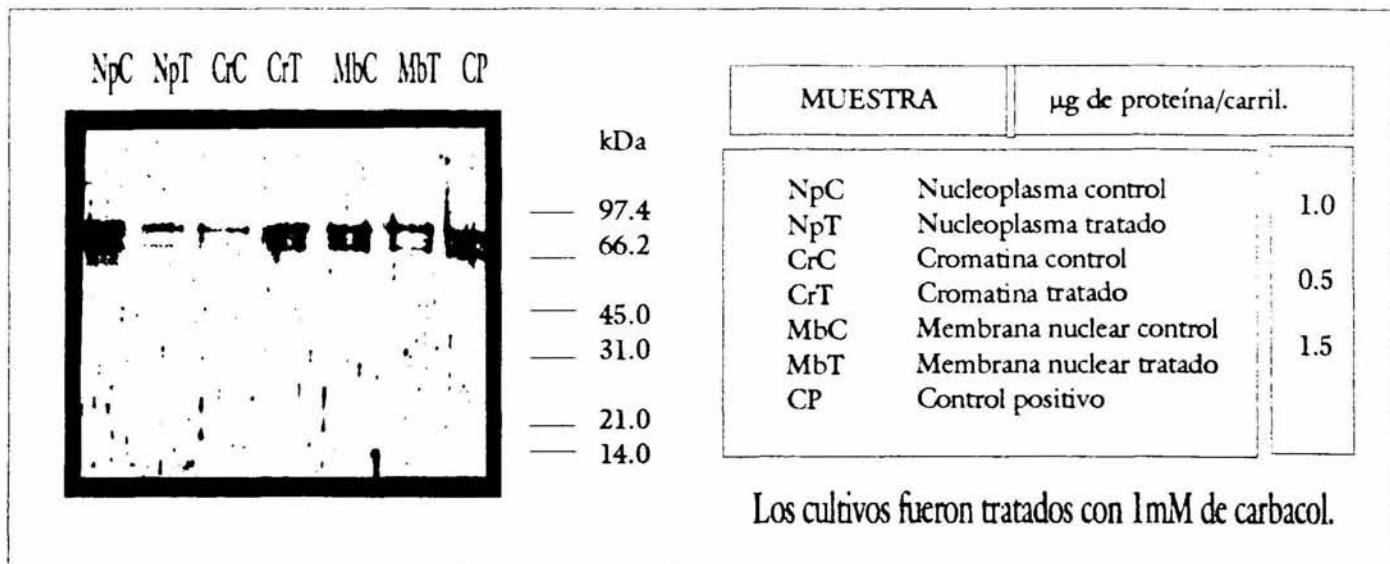
El tratamiento con carbacol, provocó en el nucleoplasma una disminución de la PKC gama a partir de un 51% en el control hasta un 3.5% en el tratado, lo que equivale a una disminución del 93.1%. Por otra parte, en la cromatina se observó el efecto contrario, su concentración pasó del 20.5% al 73.5% (es decir un incremento de 3.6 veces), y finalmente en la membrana nuclear se registró el 8.7% de la enzima, esto es, una disminución de un 69.5% (Gráfica 5).

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON CARBACOL Y ATROPINA EN LOS NIVELES DE PKC GAMA EN LAS FRACCIONES NUCLEARES.

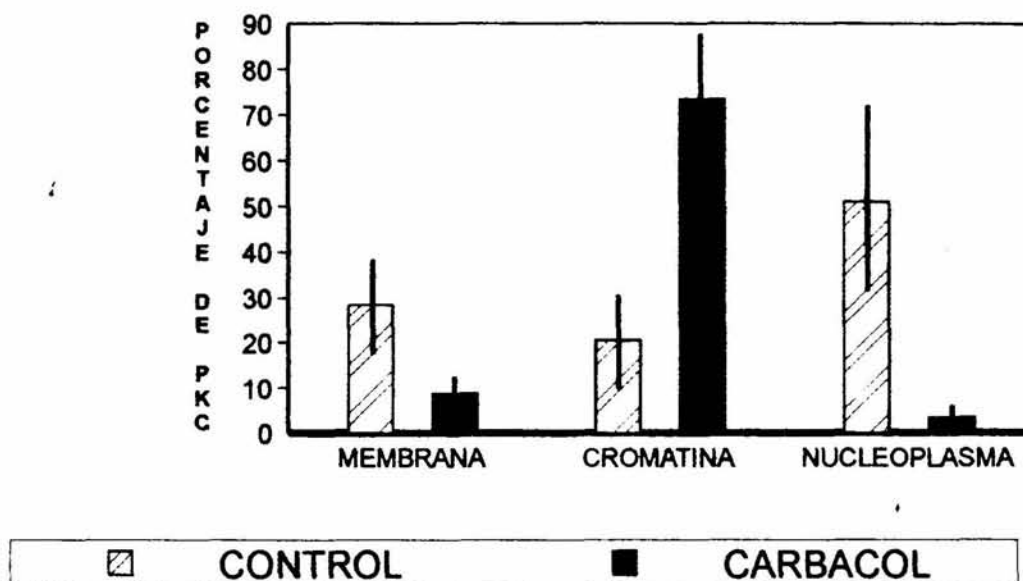
Se determinaron los cambios de los niveles de PKC gama en las fracciones nucleares cuando se adicionó atropina a los cultivos 90 minutos antes del tratamientos con carbacol.

Las U.D.O. registradas en cada fracción nuclear en condiciones basales, fueron consideradas como el 100% y las variaciones observadas con los tratamientos se expresan en cambios de porcentaje en relación a los valores basales.

FIGURA 5.- INMUNODETECCION DE PKC γ EN FRACCIONES NUCLEARES.



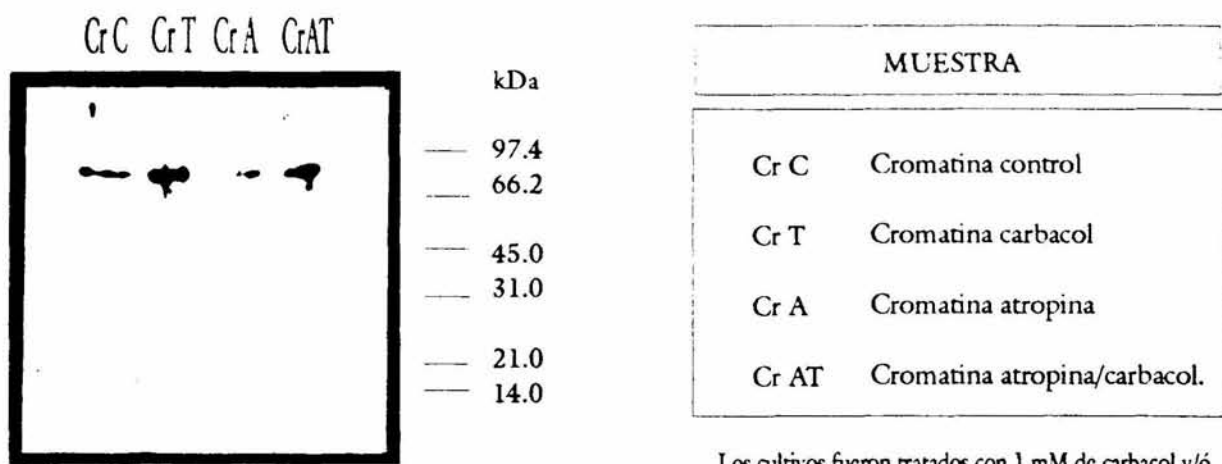
GRAFICA 5.- EFECTO DEL CARBACOL EN LOS NIVELES DE LA PKC GAMA EN FRACCIONES NUCLEARES.



En cromatina el tratamiento con carbacol causó un aumento en los niveles de la isoforma gama, hasta un 300%. En estas condiciones, la atropina disminuyó el efecto del carbacol en forma significativa, aunque no lo bloqueó completamente, pues se observó un valor de 185%. Por otra parte, el tratamiento con atropina sin carbacol provocó un aumento de los niveles de la enzima en un 51%, es decir se registraron valores del 151% (Figura 6).

En nucleoplasma, el carbacol disminuyó un 90% los niveles de esta isoforma, pues solo se observó el 10% de la enzima; y la atropina bloqueó casi totalmente el efecto del carbacol, pues se detectó el 67.2% de la concentración de la enzima. Además se observó que en esta fracción, la atropina disminuyó un 29% los niveles de la PKC, efecto que no se observó en ninguna otra fracción, el porcentaje de la PKC gama en estas condiciones fue del 71% (Gráfica 7).

FIGURA 6.- INMUNODETECCION DE PKC γ EN CROMATINA.



Los cultivos fueron tratados con 1 mM de carbacol y/o 100 μ M de atropina. Se emplearon 0.5 μ g de protefna/carril.

GRAFICA 6.- EFECTO DE CARBACOL Y ATROPINA EN LOS NIVELES DE PKC GAMA EN CROMATINA

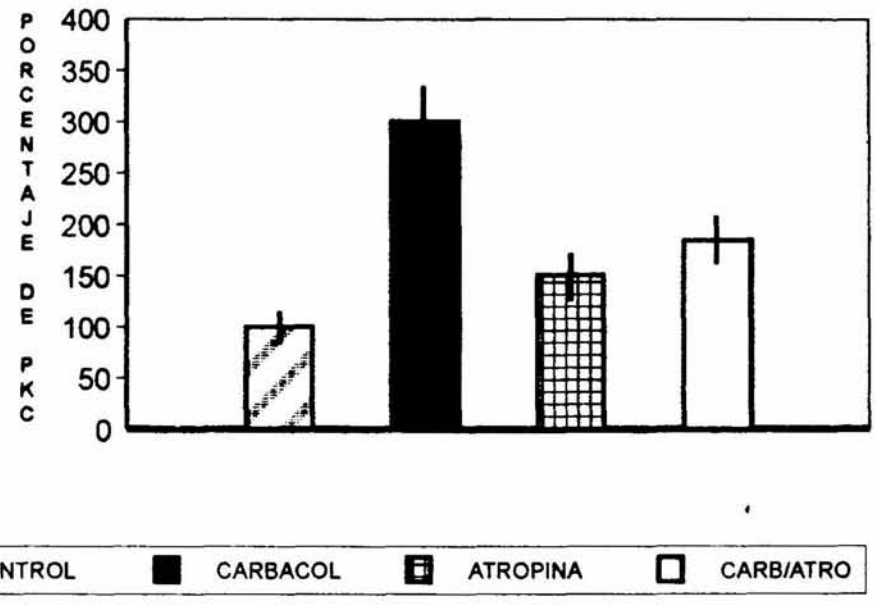


FIGURA 7.- INMUNODETECCION DE PKC γ EN NUCLEOPLASMA.

NpC NpT NpA NpAT



kDa

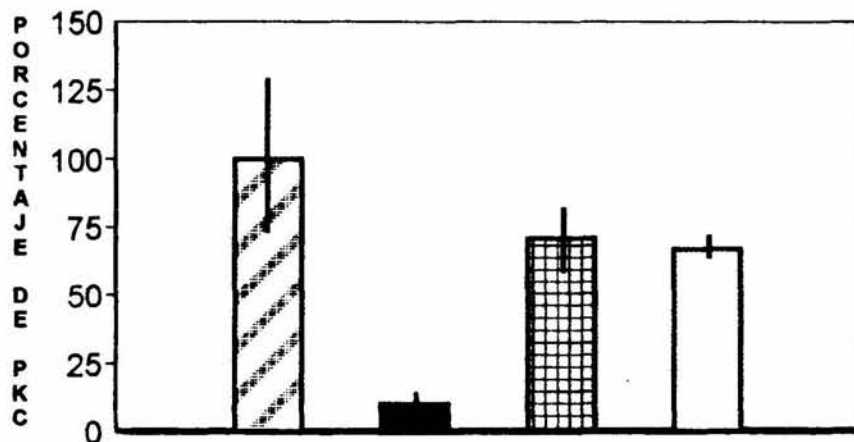
— 97.4
— 66.2
— 45.0
— 31.0
— 21.0
— 14.0

MUESTRA

Np C	Nucleoplasma control
Np T	Nucleoplasma carbacol
Np A	Nucleoplasma atropina
Np AT	Nucleoplasma atropina/carbacol.

Los cultivos fueron tratados con 1 mM de carbacol y/o 100 μ M de atropina. Se emplearon 1.0 μ g de proteína/carril.

GRAFICA 7.- EFECTO DE CARBACOL Y ATROPINA EN LOS NIVELES DE PKC GAMA EN NUCLEOPLASMA.



CONTROL
 CARBACOL
 ATROPINA
 CARB/ATRO

DISCUSION

LOCALIZACION DE LA PKC EN EL NUCLEO DE NEURONAS.

En cerebro de rata y particularmente en el hipocampo se expresan de manera abundante las isoformas alfa, beta, gama y epsilon de la PKC (Tanaka y Saito, 1992; Saito *et al.*, 1993). En el presente estudio se determinó cual de estas isoformas se localiza en los núcleos de las neuronas de esta región cerebral, ya que las isoformas de esta enzima, tienen una especificidad muy marcada respecto a su distribución en los diferentes tejidos, áreas cerebrales y compartimientos celulares (Azzi *et al.*, 1992).

Las pruebas de inmunodetección realizadas en el presente trabajo indicaron, que las isoenzimas beta y gama se expresan en los núcleos de neuronas de hipocampo de rata crecidas *in vitro*, en condiciones basales. Estos resultados demuestran por primera vez la localización de la isoforma beta en los núcleos de estas células y por otra parte señalan que se encuentra al igual que la isoforma gama, en forma permanente en estos núcleos.

Ambas isoformas han sido previamente identificadas en núcleos de distintos tipos celulares. Así, la PKC beta se ha encontrado en núcleos de células epiteliales humanas (Knox *et al.*, 1993), en núcleos de hígado de rata (Rogue *et al.*, 1990) y de neutrófilos (Perletti *et al.*, 1991). La PKC gama se ha detectado en núcleos de neuronas de la corteza cerebral de bovino, por ensayos tipo Western (Buchner *et al.*, 1992) y en núcleos de neuronas de hipocampo

de rata mediante inmunocitoquímica (Kose *et al.*, 1990), en todos estos casos se detectaron, en condiciones celulares basales.

Por otra parte, en el presente estudio obtuvimos señales de inmunoreacción muy débiles con los anticuerpos anti PKC epsilon, este resultado concuerda con estudios de inmunocitoquímica realizados en neuronas de hipocampo de cerebro de rata, en los cuales esta isoforma fue detectada principalmente en el citoplasma de los axones y las terminales nerviosas, en menor concentración asociada a la membrana mitocondrial y vesículas, pero solo con una muy débil reacción en el núcleo (Saito *et al.*, 1993).

En las condiciones empleadas en nuestro estudio, no pudo determinarse la presencia de la PKC alfa, puede inferirse que se encuentra en concentraciones menores a las otras isoformas, pero no puede concluirse su ausencia, en base a la falta de reacción de los anticuerpos anti PKC alfa con el control positivo (homogenado de cerebro de rata o sinaptosomas de neuronas de hipocampo crecidas *in vitro*). Será pues, necesario el empleo de otro tipo de tejido como control positivo, en el que se tenga una mayor concentración de la PKC alfa, o realizar la preparación de las fracciones utilizando otro método para disminuir la degradación de la enzima y además determinar la funcionalidad de los anticuerpos.

Todas las proteínas son sintetizadas en el citoplasma y su subsecuente distribución, depende de secuencias específicas de aminoácidos que las dirigen fuera del citoplasma. Existen dos tipos principales de señal de transporte: 1) Secuencia de 15 a 60 aminoácidos presente en el

extremo amino terminal de la proteína y que es eliminada cuando el proceso de distribución ha concluido y 2) Constituida por aminoácidos distribuidos en diferentes regiones de la proteína, que con el arreglo tridimensional de la misma, conforman la señal que determina su distribución (Alberts *et al.*, 1994). La señal de localización nuclear de este último tipo, se encuentra en cualquier secuencia de 4 a 8 aminoácidos de las proteínas nucleares, y se caracteriza por ser rica en aminoácidos cargados positivamente como lisina y arginina y usualmente también contiene prolina (Dingwall y Laskey, 1994).

No se conocen los mecanismos que participan en el transporte de la PKC a través de la membrana nuclear hacia el interior de este organelo, pero a este respecto ha sido identificada en la región C1 de las isoformas beta y gama, una secuencia de aminoácidos semejante a las implicadas en el transporte de proteínas al interior del núcleo (Malviya, 1992). Esta secuencia se encuentra modificada en la PKC alfa (Malviya, 1992), lo cual respaldaría nuestros resultados; es decir, la presencia de las PKC's beta y gama y la ausencia de la alfa. Sin embargo dado que la distribución de una misma isoforma en los compartimientos intracelulares de los diferentes tipos celulares es muy variable, podemos suponer que otros mecanismos deban estar implicados en el transporte de esta enzima al núcleo. Por tanto, es factible suponer la presencia de la isoforma alfa en los núcleos de neuronas en estado basal, dado que ha sido detectada en núcleos celulares de múltiples líneas de glioblastoma (Misra-Press, *et al.*, 1992) y en corteza cerebral de bovino (Buchner *et al.*, 1992), en estas condiciones.

Por otra parte, recientemente James y Olson (1992), sugirieron que la activación de la PKC provoca que exponga zonas de la región V₃ y dominios responsables de la localización nuclear de la enzima. Estos datos manifiestan la posibilidad de que las proteínas que no se expresan constitutivamente (permanentemente) en el núcleo, requieran de su activación para poder ser trasladadas hacia este organelo, fenómeno observado en diferentes tipos celulares ante estímulos externos (Chen *et al.*, 1987; Leach *et al.*, 1992) .

En el presente estudio, como se mencionó anteriormente, las isoformas beta y gama fueron encontradas en los núcleos de las neuronas de hipocampo no estimuladas, lo que revela la localización constitutiva de ambas isoenzimas en este organelo. Este hecho no excluye la posibilidad de que estímulos extracelulares específicos, induzcan la traslocación de las isoformas citoplásmicas de la PKC (incluyendo la beta y la gama) hacia el interior del núcleo (Misra-Press *et al.*, 1992).

NIVELES DE PKC EN NUCLEO

La concentración de proteína nuclear hallada en este estudio en las neuronas de hipocampo, representa el 5% de la proteína del homogenado; este resultado es similar al reportado por Masmoudi *et al* (1989) y Malviya *et al* (1990) para hígado de rata: 6% y 6.1% de proteína nuclear respectivamente, y Leach *et al* (1992) en células IIC9 con un 10.8% de proteína nuclear.

En nuestro caso, aún considerando la pérdida de proteína nuclear, es evidente que la concentración de las dos isoformas de la PKC (beta y gama) nuclear hallada en neuronas de hipocampo (3.66% de la PKC celular) es substancial, pero significativamente menor a la reportada en otros estudios. Azhar *et al* (1987) detectaron un 12.5% de la PKC en el núcleo de células de hígado de rata. Podría sospecharse que esta diferencia, fuese causa del método de detección empleado. Azhar *et al* (1987) purificaron la PKC nuclear mediante cromatografía por filtración en gel y posteriormente, la enzima fue cuantificada midiendo la densidad de una banda detectada con azul de commassie en geles de acrilamida.

Leach *et al* (1992) encontraron el 5.6% de la PKC en núcleos de células IIC9, valor que se encuentra en el mismo rango al obtenido en el presente trabajo, lo que coincide además con la metodología empleada. Leach *et al* (1992) utilizaron 100 ug de núcleos intactos (con membrana externa e interna), los cuales fueron probados con anticuerpos específicos anti alfa, epsilon o zeta, en ensayos Western. El empleo de una mayor concentración de proteína puede ser justificado, dado que el método de revelado utilizado fue colorimétrico, (fosfatasa alcalina) aproximadamente 10 veces menos sensible que la quimioluminiscencia. Además determinaron por ensayos de actividad enzimática, que el 4.76% de la actividad de la PKC corresponde al núcleo.

En las células IIC9, se encontraron 3 distintas isoformas en el núcleo: 3.2% de PKC alfa, 11% de PKC epsilon y 3.2% de PKC zeta, para obtener estos valores se consideró el 100%

a la concentración de la isoforma específica respectiva en el homogenado, en cada caso (Leach *et al*, 1992). Si ahora se considera a la suma de las PKC's alfa, epsilon y zeta nucleares como el 100%, la proporción de las isoformas en el núcleo sería la siguiente: la alfa (18%), epsilon (64%) y zeta (18%). En las neuronas de hipocampo, nosotros encontramos diez veces más concentrada a la PKC gama que la PKC beta, es decir un 90.6% y 9.4% respectivamente, proporciones diferentes a las encontradas en el homogenado (24.3% de beta y 75.7% de gama). Por una parte, estos resultados nos muestran la especificidad de la distribución de las isoformas tanto en los distintos tipos celulares como en los distintos comportamientos, y por otra parte sugieren que la isoforma gama detectada en las neuronas de hipocampo de rata, desempeña una función fundamental en el núcleo de estas células, además resulta compatible y de interés por el hecho de ser una isoforma exclusiva de sistema nervioso.

Kose *et al* (1991) mediante inmunocitoquímica y microscopía electrónica (10,000x) encontraron que la PKC gama y la beta en el hipocampo de rata, presentan un patrón de tinción claramente distinto. La PKC gama, se encontró presente básicamente en el citoplasma, ya que el cuerpo celular fue densamente teñido, mientras que se en las dendritas y el núcleo se observaron solo señales difusas y débiles. La PKC beta, por otra parte se halló concentrada en el area del golgi, el pericarion y las dendritas apicales proximales; observándose una reacción negativa en la membrana plasmática, citoplasma y núcleo. Asumiendo que mediante métodos de inmunocitoquímica no se detectan antígenos que existen en bajas concentraciones, la alta concentración de PKC gama encontrada en comparación de la isoforma beta en nuestro estudio queda apoyada por los resultados de Kose *et al* (1991).

PESO MOLECULAR DE LA PKC

En este trabajo con frecuencia se detectaron 2 bandas reactivas a los anticuerpos anti PKC gama y beta, a dichas bandas les corresponde un PM de 80 y 67 kDa aproximadamente.

El peso molecular (PM) calculado para la PKC beta nativa es de 76.8 kDa y de 78.4 kDa para la gama y un PM aparente de 79 a 80 kDa para beta y de 77, 79, 82 y 84 kDa para gama (Hug y Sarre, 1993). Se han reportado variaciones en el PM de estas isoformas desde 77 a 84 kDa, que se han interpretado como diferentes estados de fosforilación de la enzima (Buchner *et al.*, 1992; Kochs *et al.*, 1993; Leach *et al.*, 1992; Rogue *et al.*, 1990). Sin embargo son varios los reportes donde las variaciones son tan amplias, que dichas diferencias en el peso molecular no puede ser atribuido exclusivamente a dicho mecanismo.

Una posible explicación es expuesta por Rogue *et al* (1990), quienes trabajando con células de hígado de rata purificaron por cromatografía una PKC nuclear de 80 kDa encontrando a una proteína de 64 kDa como principal contaminante. Sin embargo, esta proteína no fue reconocida por los anticuerpos monoclonales anti PKC empleados. La banda de 67 kDa obtenida en los núcleos de neuronas en el presente estudio es reconocida por los anticuerpos policlonales anti PKC.

Adicionalmente cabe la posibilidad de que exista una reacción cruzada de los anticuerpos, con alguna isoforma de la enzima. Buchner *et al* (1992) detectaron en núcleos de corteza de cerebro de bovino, a las isoformas alfa y gama de la PKC, cada una con una doble banda reactiva (80 y 64 kDa), estos autores sugieren que la presencia de la banda de 64 kDa puede ser causa de una reacción cruzada con la PKC zeta dado que anticuerpos contra esta isoforma, en un trabajo previo habían detectado en núcleos de cerebro de conejo bandas de 80 kDa, siendo el peso de la PKC zeta de 64 kDa.

Como otra posibilidad, se sugiere que las bandas de menor peso molecular al asignado a la PKC reconocidas por los anticuerpos, correspondan a fragmentos de la enzima. Girard *et al* (1986) empleando cerebro de rata y de pollo encontraron que los anticuerpos anti PKC detectan a la PKC nativa (80 kDa), así como a diferentes fragmentos de la enzima; estos presentan PM de 67, 50 y 40 kDa, siendo los de 67 y 50 kDa catalíticamente activos. Azhar *et al* (1987) detectaron con anticuerpos anti PKC en hígado de rata, únicamente una banda de 64 kDa correspondiente a una enzima catalíticamente activa, independiente de calcio y fosfolípidos, probablemente la enzima sin la región regulatoria.

De acuerdo a los datos reportados, en nuestros resultados obtenidos, la banda de 80 kDa corresponde a la enzima nativa y la de 67 kDa probablemente a un fragmento catalítico de la misma, pero no puede descartarse la posibilidad de una reacción cruzada con alguna otra isoenzima.

DISTRIBUCION INTRANUCLEAR DE LA PKC BETA Y GAMA.

Diferente distribución intracelular de la PKC en la mayoría de los tipos celulares estudiados (en linfocitos B y T, en células de neuroblastoma, en células renales, en fibroblastos, etc.) también ha sido reportada, y tal compartimentalización es un fenómeno dinámico y cambiante de acuerdo al estado funcional de la célula o de las condiciones ambientales a las que esta sometida (Hug y Sarre, 1993).

Buchner *et al* (1992) encontraron a las isoformas alfa y gama de la PKC asociadas a la membrana de núcleos de neuronas de corteza cerebral de bovino, pero no descartaron la posibilidad de la localización de las enzimas en la matriz nuclear. Por otra parte en núcleos de hígado de rata utilizando anticuerpos no específicos a isoformas, se encontró que la PKC nuclear es primordialmente soluble, y que la mayor fracción se localiza en la matriz nuclear (Capitani *et al.*, 1987). En el presente estudio y en condiciones basales, la PKC beta se encontró asociada a las 3 fracciones nucleares analizadas (membrana nuclear, cromatina y nucleoplasma) en proporciones similares. Mientras que la PKC gama se ubicó principalmente en el nucleoplasma, una porción considerable de la enzima se encontró en la membrana nuclear, y la menor concentración se halló en la cromatina.

No es posible establecer un patrón de distribución estático de la enzima, pues probablemente como ocurre en la célula entera, cada isoforma presenta una localización específica que indudablemente está relacionado con su función así, como la ubicación de su sustrato.

Reportes de fraccionamiento celular revelaron que en tejido cerebral, la PKC existe al menos en tres estados: 1) Proteína citosólica, 2) Formando un complejo con la membrana, que puede ser disociado por quelación con calcio y 3) Proteína integral de membrana, activa sin cofactores, que solo puede ser aislada solubilizando la membrana (Nelsestuen y Bazzi, 1991).

La PKC citosólica representa primordialmente a una proteína no estimulada, y en general su traslocación hacia la membrana es considerado equivalente a su activación (Kraft y Anderson, 1983). Por lo tanto, puede sugerirse que la PKC encontrada presente en el nucleoplasma de los núcleos de las neuronas de hipocampo es enzima que permanece inactiva, con la posibilidad de trasladarse hacia la membrana nuclear y quizás a la cromatina ante estímulos extracelulares. Es conveniente por lo tanto realizar ensayos para medir la actividad de la PKC en cada una de las fracciones.

En núcleos de corteza cerebral de bovino, Buchner *et al.*, (1992) encontraron PKC endógena inserta en la membrana (enzima permanentemente activa). Además se han encontrado proteínas nucleares sustrato de la PKC que están asociadas a la membrana, como la lamina B (la fosforilación de proteínas de la lamina nuclear causan su desensamblaje durante la replicación celular) y la proteína B53 (proteína nucleolar probablemente relacionada en el transporte de proteínas ribosomales) (Beckmann *et al.*, 1992). Los resultados aquí presentados sugieren que las isoformas beta y gama quizás se encuentran insertas en la membrana nuclear y probablemente se hallen en forma activada.

Por último, la existencia de la PKC en la cromatina podría vincularse también con la activación de esta enzima, hecho que resulta trascendental dada la posible participación de la PKC en la regulación de la transcripción (Corbett *et al.*, 1993; Roth y Allis, 1992; Chiarugi *et al.*, 1989). Se ha sugerido que la PKC participa regulando la actividad de proteínas como la topoisomerasa II, las histonas y factores de transcripción. La topoisomerasa II, es una enzima que participa en varias funciones celulares que requieren de superenrollamiento negativo o positivo del DNA, como sucede en la transcripción y la replicación. Esta enzima incrementa su actividad aproximadamente 2-3 veces con la fosforilación por la PKC (Corbett *et al.*, 1993). Además, la transcripción, así como la replicación son procesos en los que se observa la descondensación de la cromatina y se ha demostrado que este fenómeno está relacionado con los cambios en el nivel de fosforilación de la histona H1 (sustrato de PKC). También se ha encontrado que, paralelamente a la activación de la PKC se observa un incremento en la accesibilidad del DNA hacia las nucleasas (Cocco *et al.*, 1985) apoyando de esta manera la participación de la fosforilación, en la regulación transcripcional (Roth y Allis, 1992). Finalmente, se ha sugerido que la fosforilación dependiente de PKC es necesaria para la activación de genes tempranos como c-fos (Chiarugi *et al.*, 1989). Todas estas observaciones apoyan la idea de la participación de la PKC en la modulación de la transcripción.

EFECTO DEL AGONISTA COLINERGICO MUSCARINICO CARBACOL EN LOS NIVELES DE LA PKC NUCLEAR

La mayoría de las sinápsis colinérgicas en el SNC son muscarínicas y se cree que la ACh desempeña una función clave en los mecanismos que delinean la memoria, el aprendizaje, el control del movimiento, entre otros procesos (Nathanson, 1987).

En el presente estudio, los cultivos de neuronas de hipocampo fueron estimulados durante 18 horas con el agonista colinérgico muscarínico carbacol, con el fin de determinar su efecto en los niveles de la PKC nuclear. Encontramos que en núcleos enteros, el tratamiento con carbacol provoca un decremento en la concentración de las dos isoenzimas de la PKC detectadas, este efecto no parece haber sido reportado previamente, esto es, se produce una "regulación hacia abajo" de estas isoformas, a causa de la estimulación crónica con carbacol. Estos resultados eran esperados dado que, en estudios previos en nuestro laboratorio, se ha encontrado que la exposición prolongada (varias horas) con el agonista, provoca por una parte la reducción del número de receptores muscarínicos, lo que puede ir acompañada de un decremento fisiológico de la sensibilidad en la estimulación colinérgica (Siman y Klein, 1979), y por otra parte causa la "regulación hacia abajo" de la PKC, debido a un aumento de su sensibilidad a la degradación (Nathanson, 1987).

EFEECTO DEL CARBACOL EN LA DISTRIBUCION INTRANUCLEAR DE LA PKC.

Con el análisis dirigido a determinar el efecto que ejerce la estimulación por carbacol, en la distribución intranuclear de las isoformas de la PKC, se advirtió que la PKC gama desempeña una función dinámica.

El tratamiento con carbacol ocasionó una disminución de esta isoforma en el nucleoplasma y membrana nuclear en un 93.1% y de un 69.5% respectivamente, mientras que los niveles de la enzima asociada a cromatina aumentaron un 258.5%. Además se puede mencionar que, en condiciones basales la mayor densidad de esta isoenzima se detectó en el nucleoplasma y con el tratamiento se le encontró fundamentalmente en la cromatina. Esta es la primera vez que se describe una probable traslocación de la PKC gama intranuclear, con un estímulo específico. Es decir, dado que el cambio neto en los niveles de la enzima en el núcleo entero provocado por el tratamiento con carbacol fue una "regulación hacia abajo", por otra parte, el aumento observado de la PKC gama en cromatina a causa del mismo tratamiento, puede más bien estar vinculada con una traslocación de esta isoforma desde otra zona del núcleo hacia la cromatina. El aumento de la PKC gama en cromatina puede entonces atribuirse a una redistribución de la enzima con motivo de su activación, fenómeno semejante a la traslocación que sufre la PKC citoplasmática hacia la membrana plasmática o al núcleo, cuando esta enzima es activada.

No se conocen los mecanismos mediante los cuales, los ligandos inicialmente actuando en la membrana plasmática pueden estar modificando la función de la PKC nuclear. Sin embargo

se han ido incrementando las evidencias de que segundos mensajeros o más bien terceros mensajeros son generados en el núcleo. Malviya *et al.*, (1990) reportaron la existencia de receptores alInsP₃ en la membrana nuclear de hígado de rata, además se sugirió que estos receptores tienen la función de regular los movimientos de calcio en el núcleo. Se piensa que los núcleos no almacenan calcio, sin embargo se ha demostrado que los núcleos de hígado de rata poseen un sistema de captura de este ion, estimulable por ATP, que puede ser el responsable de mantener elevados sus niveles dentro de este organelo (Malviya *et al.*, 1990). Los núcleos cargados con calcio pueden entonces liberarlo debido a la estimulación por inositol trifosfato.

Además, se han determinado cambios en el nivel de diacilglicerol nuclear ante estímulos extracelulares (Divecha *et al.*, 1993); y adicionalmente se ha encontrado un incremento paralelo de otros factores de activación de la PKC en el núcleo, como la fosfatidilcolina, y un incremento paralelo en la actividad de la RNA polimerasa asociado a este cambio (Cocco *et al.*, 1985). Estas evidencias apoyan la existencia de un ciclo de fosfoinosítidos en el núcleo, semejante al presente en la membrana plasmática. Creemos que son los cambios de estos segundos mensajeros y las concentraciones de calcio los que inducen la redistribución o traslocación de la PKC gama intranuclear, observada con la estimulación con carbacol.

EFFECTO DEL ANTAGONISTA COLINERGICO MUSCARINICO
ATROPINA EN LOS NIVELES DE LA PKC GAMA EN EL NUCLEO
DE CELULAS TRATADAS CON CARBACOL.

Ha sido demostrado que los efectos agudos de agentes colinérgicos (acetilcolina, carbacol, etc.) en el metabolismo de fosfoinosítidos pueden ser abolidos por concentraciones bajas del antagonista colinérgico atropina (Hokin y Redman, 1964).

En el presente estudio se probó el efecto de atropina en los niveles de la PKC gama de núcleos enteros, nucleoplasma y cromatina de células estimuladas previamente con carbacol, con el fin de determinar la especificidad de los cambios observados a causa del agonista.

Hokin y Redman (1964) encontraron que la estimulación aguda de los receptores muscarínicos con atropina inhiben la hidrólisis de fosfoinosítidos inducida por carbacol. En el presente trabajo, encontramos que los núcleos enteros de células tratadas con atropina contienen niveles de PKC gama mayores a los basales. Para la interpretación de estos resultados es importante considerar que el tratamiento con atropina en el presente trabajo fue crónico, de manera que el incremento en los niveles de la PKC gama observados con el tratamiento con atropina es un efecto contrario al del carbacol, es decir una "regulación hacia arriba" de la enzima, que podría atribuirse a la estimulación prolongada con el antagonista. En el nucleoplasma, no se observó la regulación hacia arriba de la PKC gama causada por la atropina en núcleos enteros, efecto que quizás sea más evidente en la cromatina y en la membrana

nuclear.

Por otra parte, en núcleos enteros atropina bloquea parcialmente la "regulación hacia abajo" de la PKC gama inducida por carbacol. En las fracciones nucleares, se encontró que la dosis de atropina empleada, bloquea parcialmente el cambio inducido por el carbacol en los niveles de la PKC gama. Esto es, los niveles de la PKC gama en nucleoplasma de los núcleos de células tratadas con carbacol y atropina fueron mayores a los observados en el nucleoplasma de células tratadas únicamente con carbacol, sin embargo no se alcanzaron los niveles basales. De la misma manera en cromatina se encontró que aparentemente la atropina bloquea parcialmente el efecto inducido por el carbacol. Estos resultados se pueden explicar por el empleo de dosis no equipotenciales de ambas drogas, en dichos tratamientos y demuestran que los cambios de la PKC gama del núcleo inducido por carbacol son mediados en forma específica por el receptor muscarínico.

Es claro, que la activación de los AChR provoca una o más respuestas bioquímicas detectables, entre las que se encuentran la hidrólisis de ciertos fosfoinosítidos de membrana, pero no es solo este cambio, el que media las respuestas fisiológicas de larga duración (Nathanson, 1987). La liberación de neurotransmisores inicia una cascada de eventos, que culmina con cambios postsinápticos en la expresión transcripcional. La estimulación de receptores postsinápticos induce primero, cambios citoplasmáticos específicos en las vías de segundos mensajeros y luego, terceros mensajeros en el núcleo, que provocan la rápida inducción de genes tempranos, que finalmente activan programas genéticos importantes de la función neuronal (Armstrong y Montminy, 1993).

Utilizando ésteres de forbol (substitutos del DG) han sido identificado genes regulados por la PKC (Nelsestuen y Mohammad, 1991). El mapeo de promotores ha revelado que el TPA estimula la transcripción de genes como c-fos, a través de una secuencia en el DNA, previamente caracterizada como elemento responsivo a suero (SRE). Este elemento induce respuestas mediante la fosfoproteína celular SRF (factor responsivo a suero), que actúa como factor de transcripción (Lewin, 1994). Así mismo han sido detectadas otras proteínas como p62 que se unen al elemento SRE activando la transcripción de diversos genes (Armstrong y Montminy, 1993).

Como un fenómeno general, en el hipocampo y en el IMHV (parte media e intermedia en la región ventral del hipocampo) del cerebro anterior se ha detectado, la colocalización de la PKC gamma y la expresión del gen fos. En el IMHV, fos es inmunoreactivo en el núcleo (cubre todo el núcleo o fragmentos y regiones cercanas a la membrana nuclear), mientras que la PKC gamma se encuentra además del citoplasma y dendritas, en el núcleo de algunas células (Ambalavanar *et al.*, 1993; Van der Zee *et al.*, 1992).

Estos datos, así como los encontrados en el presente trabajo apoyan la importancia de la isoforma gamma en el núcleo, y la participación de esta isoforma en la modulación de la transcripción neuronal.

CONCLUSIONES

-En el núcleo de neuronas de hipocampo de rata, se localizan de forma permanente las isoformas beta y gama de la proteína cinasa C.

-Las isoformas beta y gama de la proteína cinasa C, presentes en estos núcleos, tienen un peso molecular aproximado de 80 kDa; además existen fragmentos de la enzima con un peso molecular de 67 kDa.

-La concentración de la isoforma gama en el núcleo de estas células es diez veces superior a la concentración de la isoforma beta, aspecto que destaca su importancia en las funciones de las neuronas.

-En condiciones basales, ambas isoformas presentan una distribución intranuclear específica: la isoforma gama se ubica principalmente en el nucleoplasma y la membrana, mientras que la isoforma beta se encuentra en el nucleoplasma, la membrana y la cromatina en proporciones similares.

-La estimulación prolongada de los receptores muscarínicos colinérgicos de las neuronas de hipocampo de rata crecidas *in vitro* con el agonista carbacol, provoca una "regulación hacia abajo" de ambas isoformas de la proteína cinasa C nuclear.

-Además el tratamiento con carbacol provoca una probable traslocación de la isoforma gama nuclear, desde un compartimiento nuclear (por ejemplo nucleoplasma) hacia la cromatina.

-La "regulación hacia abajo" y la traslocación de la enzima, son cambios regulados específicamente por el receptor muscarínico, estos cambios son antagonizados por atropina.

-Los resultados sugieren que la proteína cinasa C desempeña funciones importantes en la regulación de procesos neuronales, en el núcleo.

BIBLIOGRAFIA

Abate, C., Baker, S., Lees-Miller, S., Anderson, C., Marshak, D. y Curran, T. (1993) Dimerization and DNA binding alter phosphorylation of Fos and Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 6766 -6770.

Akers, R. y Routtenberg, A. (1985) Protein kinase C phosphorylates a 47 Mr protein (F1) directly related to synaptic plasticity. *Brain Res.* 334: 147 - 151.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. (1994) *Molecular Biology of the Cell* (3ª edición) Garland Publishing, Inc. Nueva York, U.S.A. Pág. 1294.

Ambalavanar, R., Van-der-Zee, E., Bolhuis, J. McCabe, B., y Horn, G. (1993) Co-expression of Fos immunoreactivity in protein kinase (PKC gamma)- positive neurones: quantitative analysis of a brain region involved in learning. *Brain. Res.* 606(2):315 - 318.

Amersham Life Science (1993) *ECL wester blotting protocols.* England. Pág. 46.

Armstrong, R. y Montminy, M., (1993) Transsynaptic control of gene expression. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 17 - 29.

Azhar, S., Butte, J. y Reaven, E. (1987) Calcium-activated-phospholipid protein kinases from rat liver: subcellular distribution, purification and characterization of multiple forms. *Biochemistry* 26(22):7047-7057.

Azzi, A., Boscoboinik, F. y Hensey, C (1992) The protein kinase C family. *Eur. J. Biochem.* 208: 547 - 557.

Baker, G. y Cowan, M. (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Research.* 126: 397 - 425.

Beckmann, R., Buchner, K., Jungblut, P., Eckeskorn, C., Weise, C., Hilbert, R. y Hucho, F. (1992) Nuclear substrates of protein kinase C. *Eur. J. Biochem.* 210: 45 - 51.

Berridge, M e Irvine, R. (1984) Inositol triphosphate a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.* 312: 315 - 321.

Bliss, T. y Collingridge, G. (1993) A synaptic model of memory: long - term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361 (7): 31 - 39.

Borner, C., Filipuzzi, J., Wartmann, M., Eppenberger, U. y Fabbro, D. (1989) Biosynthesis and posttranslational modifications of protein kinase c in human breast cancer cells. *J. Biol Chem.* 264: 13902 - 13909.

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

Buchner, K., Otto, H., Hilbert, R., Lindschau, C., Haller, H. y Hucho, F. (1992) Properties of PKC associated with nuclear membranes. *Biochem. J.* 286: 369 - 375.

Cantley, L., Auger, K., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., Soltoff, S. (1991) Oncogenes and signal transduction. *Cell.* 64: 281 - 302.

Capitani, S., Girard, P., Mazzei, G., Kuo, J., Berezney, R. y Manzoli, F. (1987) Immunochemical characterization of protein kinase C in rat liver nuclei and subnuclear fractions. *Biochem, Biophys. Res. Comm.* 142(2): 367 - 375.

Chen, Z., McGuire, Leach, K. y Cambier, J. (1987) Transmembrane signaling through B cell MHC class II molecules: anti- Ia antibodies induce protein kinase C traslocation to the nuclear fraction. *J. Immunol.* 138: 2345 - 3252.

Chiarugi, V., Ruggiero, M. y Corradetti, R. (1989) Oncogenes, protein kinase C, neuronal differentiation and memory. *Neurochem. Int.* 14: 1 - 9.

Colbran, R., Brickey, D., Soderling, T. y Schulman, H. (1993) The multifunctional Ca^{2++} /calmodulin-dependent protein kinases. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5: 247 - 253.

Cocco, L., Gilmour, R., Maraldi, N., Martell, A., Papa, S. y Manzoli, F. (1985) Increase of globin RNA synthesis induced by phosphatidylserine liposomes in isolated erythroleukemic cell nuclei. Morphological and functional features. *Biol. Cell.* 54: 49 - 56.

Corbett, A., Fernald, A. y Osheroff, N. (1993) Protein kinase C modules the catalytic activity of topoisomerase II by enhancing the rate of ATP hydrolysis: evidence for a common mechanism of regulation by phosphorylation. *Biochem.* 32(8): 2090 - 2097.

Dekker, L. y Parker, P. (1994) Protein kinase C a question of specificity. *TIBS* 19: 73 - 77.

Dingwall, C. y Laskey, R. (1991) Nuclear targeting sequences-a consensus? *Trend Biochem.* 16: 478 - 481.

Divecha, N., Banfic, H e Irvine, R. (1991) The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF - 1) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *Embo. J.* 3207 - 3214.

Divecha, N., Banfic, H e Irvine, R. (1993) Inositides and the nucleus and inositides in the nucleus. *Cell*. 74: 405 - 407.

El-Fakahany, E., Alger, B., Lai, WI., Pitler, T., Worley, P. y Baraban, J. (1988) Neuronal muscarinic responses: role of PKC. *FASEB. J.* 2: 2575 - 2583.

Féger, J., Gil-Falgon, S. y Lamaze, C. (1994) Cell receptors: definition, mechanisms and regulation of receptor-mediated endocytosis. *Cell. Mol. Biol.* 40(8): 1039-1061.

Girard, P., Mazzei, G. y Kuo, J. (1986) Immunological quantitation of phospholipid/ Ca^{2+} - dependent protein kinase and its fragments. *J. Biol. Chem.* 261(1): 370 - 375.

Girault, J. (1993) Protein phosphorylation and dephosphorylation in mammalian central nervous system. *Neurochem. Int.* 23(1): 1 - 25.

Goelet, R., Castellucci, V., Schacher, S. y Kandel, E. (1986) The long and the short of long-term memory-a molecular framework. *Nature*. 322: 419 - 422.

Greenberg, M., Ziffe, E. y Greene, L. (1986) Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science*. 234: 80 - 83.

Greif, K., Ben-Chaim, J., Shimon, T., Bechor, E., Eldar, H. y Livneh, E. (1992) The protein kinase C-related PKC- L (eta) gene product is localized in the cell nucleus. *Cell. mol. Biol.* 12(3): 1304 - 1311.

Habecker, B. y Nathanson, N. (1992) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor mRNA expression by activation of homologous and heterologous receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 5035 - 5038.

Habecker, B., Wang, H. y Nathanson, N. (1993) Multiple second-messenger pathways mediate agonist regulation of muscarinic receptor mRNA expression. *Biochemistry* 32: 4986 - 4990.

Ham, R. (1965) Clonal growth of mammalian cell in a chemicaly defined, synthetic medium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 53: 288 - 293.

Hardie, G. (1988) Pseudosubstrates turn off protein kinases. *Nature.* 335: 592 - 593.

Harlow, E. y Lane, D. (1988) *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor laboratory. Pág. 726.

Hocevar, B., Burns, D. y Fields, A. (1993) Identification of protein kinase C (PKC) phosphorylation sites on human lamin B. Potential role of PKC in nuclear lamina structural dynamics. *J. Biol. Chem.* 268(10): 7545 - 7552.

Hokin, L. y Redman C. (1964) Stimulation of the metabolism of phosphatidylinositol and phosphatidic acid in brain cytoplasmic fractions by low concentrations of cholinergic agents. *J. Neurochem.* 11: 155 - 163

Hosey, M. (1992) Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *The FASEB journal.* 6(3): 845- 852.

Hosoda, k., Sait, N., Kose, A., Ito, A., Tsujino, T., Ogita, K., Kikkawa, O., Oho, Y., Igarash., Nishizuka, Y. y Tanaka, C (1989) Immunocytochemical localization of beta I subspecies of protein kinase C in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 1393 - 1397.

House, C. y Kemp, B. (1987) Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science.* 238: 1726 - 1728.

Huang, F., Yoshida, Y., Nakabayashi, H., Young, W. SIII. y Huang, K. (1988) Immunocytochemical localization of protein kinase C isozymes in rat brain. *J. Neurosci.* 8: 4734 - 4744.

Huang, K. y Huang, F. (1993) How is protein kinase C activated in CNS. *Neurochem. Int.* 22(5): 417 - 433.

Hug, H. y Sarre, T. (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?. *Biochem. J.* 291: 329 - 343.

Huizen, F. y Tonnaer, J. (1993) Muscarinic receptor regulation and 2nd messenger responses in rat neocortex cultures. *Journal of receptor research.* 13(1-4): 437 - 451.

Ito, A., Saito, N., Hirata, M., Kose, A., Tsujino, T., Yoshihara, C., Ogita, K., Kishimoto, A., Nishizuka, Y. y Tanaka, C. (1990) Immunocytochemical localization of the alfa subspecies of protein kinase C in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 3195 - 3199.

James, G. y Olson, E. (1992) Deletion of the regulatory domain of protein kinase C alfa exposes regions in the hinge and catalytic domains that mediate nuclear targeting. *The Journal of Cell Biology.* 116(4): 863 - 874.

Karin, M. (1992) Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease. *FASEB J.* 6: 2581 - 2590.

Khan, W., Blobe, G., Hannun, Y., (1992) Activation of protein kinase C by oleic acid. *J. Biol. Chem.* 267: 3605 - 3612.

Kikkawa, U., Ono, Y., Ogita, K., Fujii, T., Asaoka, Y., Sekiguchi, K., Kosaka, K., Igarashi, K. y Nishizuka, Y. (1987) Identification of the structures of multiple subspecies of protein kinase C expressed in rat brain. FEBS lett 217: 227 - 231.

Kishimoto, A., Mikawa, K., Hashimoto, K., Yasuda, I., Tanaka, S., Tominaga, M., Kuroda, T. y Nishizuka, Y. (1989) Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium - dependent neutral protease (calpain). J. Biol. Chem. 264(7): 4088 - 4092.

Knox, K., Johnson, G. y Gordon, J. (1993) A study of protein kinase C isozyme distribution in relation to Bcl-2 expression during apoptosis of epithelial cell *in vivo*. Exp Cell. Res. 207(1): 68 - 73.

Kochs, G., Hummels, R., Fiebich, B., Sarre, T., Marmé, D. y Hug, H. (1993) Activation of purified human protein kinase C alfa and beta I isoenzymes *in vitro* by Calcio, phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate. Biochem. J. 291: 627 - 633.

Kose, A., Saito, N., Ito, A. y Tanaka, C. (1990) Electron microscopic localization of gama and beta II subspecies of protein kinase C in rat hippocampus. Brain Res. 518: 209 - 217.

Kraft, A. y Anderson, W. (1983) Phobol esters increase the amount of Ca⁺⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. Nature. 301: 621 - 623.

Leach, K., Ruff, V., Jarpe, M., Adams, L., Fabro, D. y Raben, D. (1992) Alfa-Thrombin stimulates nuclear diglyceride levels and differential nuclear localization of protein kinase C isozymes in IIC9 cells. *J. Biol. Chem.* 267(30): 21816 - 21822.

Leli, U., Shea, T., Cataldo, A., Hauser, G., Grynspan, F., Beermann, M., Liepkalns, V., Nixon, R. y Parker, P. (1993) Differential expression and subcellular localization of protein kinase C alfa, beta, gama, delta and epsilon isoforms in SH- SY5Y neuroblastoma cells: modifications during differentiation. *J. Neurochem.* 60(1): 289 - 298.

Leonardo, M. y Baltimore, D. (1989) NF- κ B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell.* 58: 227 - 229.

Lewin, B. (1994) *Genes V.* Oxford University Press. Nueva York, U.S.A. Pág. 1272.

Malviya, A., Rogue, P. Masmoudi, A., Labourdette, G. y Vincendon, G. (1990) Gene transcription: a role for nuclear protein kinase C. *Int. J. Cancer* 45: 580 - 582.

Malviya, A., Rogue, P. y Vincendon, G. (1990) Sterospecific inositol 1,4,5,- (32 P) trisphosphate binding to isolate rat liver nuclei: evidence for inositol triphosphate receptor mediated calcium release from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 9270 - 9274.

Malviya, A. (1992) A bipartite nuclear targeting motif in protein kinase C? *TIBS* 17:176.

Mahoney, C., Shuman, J., McKnight, S., Chen, H-C. y Huang, K-P. (1992) Phosphorylation of CCAAT-enhancer binding protein by protein kinase C attenuates site-selective DNA binding. *J. Biol. Chem.* 267(27): 19396 - 19403.

Masmoudi, A., Labourdette, G., Mersel, M. Huang, F., Huang, K., Vincendon, G. y Malviya, A. (1989) PKC located in rat liver nuclei. *J. Biol. Chem.* 264: 1172 - 1179.

Merchenthaler, I., Lipasits, Z., Reid, J., y Wetsel, W., (1993) Light and electron microscopic immunocytochemical localization of protein kinase C delta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 336(3): 378 - 399.

Misra-Press, A. y Fields, A., Samols, D. y Goldthwait, D. (1992) Protein kinase C isoforms in human glioblastoma cells. *Glia.* 6: 188 - 197.

Morton, H. (1970) A survey of commercially available tissue culture media. *In vitro.* 6: 89 - 109.

Mosior, M. y Epand, R. (1993) Mechanism of activation of protein kinase C: Roles of dioleoin and phosphatidylserine. *Biochemistry* 32: 66 - 75.

Nathanson, N. (1987) Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu. Rev. Neurosci.* 10: 195 - 236.

Nelsestuen, G. y Bazzi, M. (1991) Activation and regulation of protein kinase C enzymes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 23(1): 43 -61.

Newton, A. y Koshland, D. (1989) High cooperativity, specificity and multiplicity in the protein kinase C-lipid interaction. *J. Biol. Chem.* 264: 14909 - 14915.

Nigg, E., Hilz, H., Eppenberger, H. y Dutly, F. (1985) Rapid and reversible translocation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase type II from the Golgi complex to the nucleus. *EMBO. J.* 4: 2801 - 2806.

Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature.* 334(25): 661 - 665.

Nishizuka, Y., Shearman, M., Oda, T., Berry, N., Shimomura, T., Asaok, Y., Ogita, K., Kikkawa, U., kishimoto, A., Kose, A., Sato, N. y Tanaka, C. (1991) Protein kinase C family and nervous function . *Prog Brain Res.*

Ogita, K., Koide, H., Kikkawa, U., Kishimoto, A. y Nishizuka, A. (1990) The heterogeneity of proteina kinase C in signal transduction cascade. Ed. Nishizuka, Y. *The Biology and Medicine of signal transduction* . Raven Press, New York.

Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, Y., Igarashi, K. y Nishizuka, Y. (1988) The structure, expression and properties of additional members of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* 263: 6927 - 6932.

Osada, S., Mizuno, K., Saito, T., Akita, Y., Suzuki, K., Kuroki, T. y Ohno, S. (1990) A phorbol ester receptor/protein kinase C nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J. Biol. Chem.* 265: 22434 - 22440.

Palezewski, K. y Benovic, J. (1991) G-protein-coupled receptor kinases. *TIBS.* 16:387 - 391.

Parker, P., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M., y Ullrich (1986) The complete structure of protein kinase C- the mayor phorbol ester receptor. *Science.* 233: 853 - 858.

Parker, P., Kour, G., Marais, R., Mitchell, R., Pears, C., Schaap, D., Stabel, S. y Webster, C. (1989) Protein kinase C- a family affair. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 65: 1 - 11.

Perletti, G., Ghessi, A., Raffaldoni, E. y Piccinini, F. (1991) The activity of a beta subtype of protein kinase C purified from nuclei of human neutrophils is enhanced by treatment with phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochem. Biophys. Res. Commm.* 181(1): 348 - 352.

Rogue, P., Labourdette, G., Masmoudi, A., Yoshida, Y., Huang, F., Huang, K., Zwiller, J., Vincendon, G. y Malviya, A. (1990) Rat liver nuclei PKC is the isozyme type II. *J. Biol. Chem.* 265(7): 4161 - 4165.

Roth, S. y Allis, D. (1992) Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? *TIBS.* 17: 93 - 98.

Sahyoun, N. Wolf, M. Bestermann, J., Hsieh, T., Sander, M., Levine, H., Chang, K. y Cuatrecasas, P. (1986) Protein kinase C phosphorylates topoisomerase II: topoisomerase activation and its possible role in phorbol ester induced differentiation of HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA:* 83: 1603 - 1607.

Saito, N., Itouji, A., Totani, Y., Osawa, I., Koide, H., Fujisawa, N., Ogita, K. y Tanaka, C. (1993) Cellular an intracellular localization of epsilon-subspecies of protein kinase C in the rat brain; presynaptic localization of the epsilon-subspecies. *Brain Research.* 607: 241 - 248.

Samuels, D. Shimizu, Y. y Shimizu, N. (1989) Protein kinase C phosphorylates DNA topoisomerase I. *FEBS lett.* 259: 57 - 60.

Scott, J. y Soderling, T. (1992) Serine/Threonine protein kinases. *Current opinion in Neurobiology.* 2: 289 - 295.

Shearman, M., Sekiguchi, K. y Nishizuka, Y. (1989) Modulation of ion channel activity: a key function of the protein kinase C enzyme family. *Pharmac. Rev.* 41: 211 - 237.

Siman, R. y Klein, W. (1979) Cholinergic activity regulates muscarinic receptors in central nervous system cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4141- 4145.

Simon, M., Strathman, M., y Gautman, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science.* 252: 802 - 808.

Smith, M., Colbran, R., Brickey, D. y Soderling, T. (1992) Functional determinants in the autoinhibitory domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Role of His 282 and multiple basic residues. *J. Biol. Chem.* 267: 1761 - 1768.

Tanaka, C. y Saito, N. (1992) Localization of subspecies of protein kinase C in the mammalian central nervous system. *Neurochem. Int.* 21(4): 499 - 512.

Van der Zee, E., Compaan, J., De Boer, M. y Luiten, P., (1992) Changes in PKC gamma-immunoreactivity in mouse hippocampus induced by spatial discrimination learning. *J. Neurosci.* 12: 4808 - 4815.

Wolf, M., Cuatrecasas, P. y Sahioun, N. (1985) Interaction of PKC with membranes is regulated by Ca^{++} , phorbol esters and ATP. *J. Biol. Chem.* 260(29): 15718 - 15722.

APENDICE

FIGURA 1.-INMUNODETECCION DE PKC GAMA Y BETA EN NUCLEO

FIGURA 2.-INMUNODETECCION DE PKC BETA EN NUCLEO

FIGURA 3.- INMUNODETECCION DE PKC GAMA EN NUCLEO

FIGURA 4.-INMUNODETECCION DE PKC BETA EN FRACCIONES NUCLEARES

FIGURA 5.-INMUNODETECCION DE PKC GAMA EN FRACCIONES NUCLEARES

FIGURA 6.-INMUNODETECCION DE PKC GAMA EN CROMATINA

FIGURA 7.-INMUNODETECCION DE PKC GAMA EN NUCLEOPLASMA