

00581



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

112
3
2ej

**MODULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA
CINASA C POR ESTERES DE FORBOL**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
(B I O Q U Í M I C A)
PRESENTA LA M. EN C. QUÍMICAS
MARTHA ROBLES FLORES

MÉXICO, D. F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

ABREVIATURAS

AMPc	Adenosin-3',5' monofosfato cíclico
DAG	1,2-diacilglicerol
aF	a-forbol
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
PCh	Fosfatidilcolina
PCh-PLC	Fosfatidilcolina-fosfolipasa C
PDBu	Forbol 12,13-dibutirato
PI	Fosfatidilinositol
PI-PLC	Fosfatidilinositol-fosfolipasa C (fosfolinositidasa)
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKC	Proteína cinasa C
PLA2	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
TPA	12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato
4-O-Me-TPA	12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato 4-O-metil éter

INDICE

I.- RESUMEN	
II.- SUMMARY	
III.- INTRODUCCION	1
IV.- OBJETIVOS	23
V.- MATERIALES Y METODOS	24
VI.- RESULTADOS	25
VII.- RESUMEN DE RESULTADOS	26
VIII.- DISCUSION	28
IX.- BIBLIOGRAFIA	37

I. RESUMEN

Se encontraron dos formas principales de proteína cinasa C (PKC) en hepatocitos de ratas Wistar o Zucker usando cromatografía en DEAE-celulosa: PKC 1 y PKC 2. La pre-incubación de las células con $1 \mu\text{M}$ de tetradecanoll-forbol-acetato (TPA) produjo una marcada desaparición de la actividad de PKC 1 y una menor pérdida de actividad de PKC 2. El análisis de estas formas de PKC por cromatografía en hidroxilapatita, resolvió PKC 1 en tres picos distintos 1a, 1b, 1c y PKC 2 en al menos cuatro picos 2a, 2b, 2c y 2d, aunque en las ratas Zucker se encontró otro pico adicional pequeño de PKC 1 denominado aa. El análisis por inmunotransferencia con anticuerpos monoclonales isozima-específicos, identificó al pico 1a como PKC- β y al pico 1b como PKC- α ; los otros picos de actividad no se identificaron. El tratamiento con TPA de hepatocitos de rata Wistar causó una pérdida de los picos 1b y 1c, mientras que el pico 1a no fue afectado. Los picos de actividad correspondientes a PKC 2 no mostraron ningún cambio significativo, excepto el pico 2d, que disminuyó en un 50%.

El análisis de las acciones conocidas de PKC en hepatocitos de ratas normales en comparación con las de ratas genéticamente obesas, mostró que en estos animales obesos existe una sensibilidad disminuida a TPA como fenómeno generalizado y no como el resultado de un defecto en una isozima específica, lo que quedó manifiesto en los siguientes resultados: I) la propiedad del TPA para bloquear el recambio de fosfatidilinositol mediado por el agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina está atenuada en ratas obesas, II) la habilidad del TPA para disminuir la acumulación de AMPc estimulada por glucagon o por toxina del cólera es menor en hepatocitos de obesas, y III) la pérdida rápida de la actividad de PKC 1b (α) y 1c inducida por 10 nM TPA en las ratas delgadas no ocurre en las obesas.

La desaparición aparente de la actividad de PKC inducida por TPA ocurrió de manera dependiente del tiempo y de la dosis tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, los cursos temporales, el grado de disminución de la actividad, así como el orden de potencia de los ésteres de forbol para inducir la pérdida de actividad de PKC en los dos grupos de isoformas, mostraron marcadas diferencias.

Finalmente, se vio que la disminución de la actividad de PKC inducida por TPA, no se debió a un cambio en la especificidad de sustrato de la enzima, y tampoco parece ser el resultado de un cambio en el estado de fosforilación o de oxidación de la misma.

III.- INTRODUCCION

Una de las características esenciales de los seres vivos es la de poder comunicarse con su medio ambiente. En la mayoría de los organismos superiores, existen dos sistemas principales de comunicación entre las células: el sistema hormonal o endócrino y el sistema nervioso. La interrelación entre estos dos sistemas es tan estrecha, que se puede considerar como uno solo: el sistema neuroendócrino. En ambos sistemas, las células se comunican unas con las otras por medio de mensajeros químicos.

En la forma de comunicación endócrina, una glándula libera hormonas que pueden actuar sobre células u órganos localizados en cualquier parte del organismo. Las glándulas endócrinas secretan hormonas al torrente sanguíneo; cada célula blanco está equipada con receptores, los cuales son proteínas capaces de reconocer específicamente a las moléculas de hormona destinadas a actuar en ella.

Las hormonas de naturaleza hidrofóbica, como los esteroides, tienen la facultad de atravesar la membrana celular y de poder unirse a receptores que se encuentran en el citoplasma. Sin embargo, la mayoría de las hormonas o mensajeros que se producen son de naturaleza hidrofílica (como péptidos, aminas y derivados de aminoácidos) y no atraviesan la membrana celular, sino que interactúan con receptores localizados en el exterior de ella.

Los receptores de la superficie celular que se conocen hasta ahora se pueden clasificar en tres categorías distintas (1), de acuerdo con la topología que presentan en la membrana plasmática y de acuerdo con los mecanismos moleculares que emplean para transducir las señales: i) receptores acoplados a proteínas G, ii) receptores que poseen funciones catalíticas intrínsecas, ya sea de tirosina cinasa, de fosfotirosina fosfatasa, o de guanilato ciclasa, y iii) receptores que operan canales iónicos.

El análisis estructural de la familia de receptores acoplados a proteínas G revela que todos ellos son glicoproteínas integrales de membrana que poseen una estructura con 7 dominios transmembranales unidos entre sí por asas intracelulares y extracelulares. Se cree que la unión del agonista (mensaje) con el receptor produce una conformación alterada tal, que ahora el receptor activado es capaz de estimular a una proteína G. Las proteínas G que se acoplan a receptores de 7 dominios transmembranales, constituyen una familia altamente conservada de proteínas heterotríméricas compuestas por las subunidades α , β y γ (2, 3). Funcionan modulando la afinidad del agonista por su receptor, acoplando esta interacción con los sistemas efectoras. La interacción receptor-agonista induce el cambio de GDP unido a la subunidad α por GTP, provocando la disociación de GTP- α de los componentes $\beta\gamma$. Existe evidencia de que la subunidad activada GTP- α estimula entonces a la enzima efectora apropiada, aunque también hay evi-

dencia que sugiere que el complejo $\beta\gamma$ participa en ello (4,5,6), hasta que la subunidad α , por medio de su actividad intrínseca de GTPasa, hidroliza al GTP. Esto lleva a la formación de GDP- α y a su reasociación con $\beta\gamma$, quedando la proteína G lista para volver a ser estimulada por la interacción agonista-receptor, mientras que la "enzima efectora" transmitirá la señal convirtiendo a moléculas precursoras en segundos mensajeros. Por último, estos segundos mensajeros son reconocidos con una extraordinaria afinidad y especificidad por proteínas que participan en la propagación intracelular de la señal; éstas son las llamadas proteínas cinasas, las cuales fosforilan a algunas proteínas de la célula, que al ser fosforiladas, cambian en su actividad y activan o inhiben a su vez a otras proteínas cinasas y/o fosfatasa, desencadenándose así una "cascada" de cambios que amplifican la señal en el interior de la célula.

En resumen, en el maravilloso escenario de la comunicación celular, nos encontramos con los siguientes protagonistas: los mensajes, proteínas receptoras, proteínas G transductoras, proteínas efectoras del mensaje y por último, las proteínas cinasas amplificadoras, que propagan la señal para dar la respuesta final de la célula al mensaje inicial captado. En este escenario, dos son los sistemas de transducción de señales que mejor se conocen en la actualidad: el sistema de la adenilato ciclasa y el sistema de recambio de fosfolípidos con movilización de calcio. En la presente tesis doctoral me centraré en una de las proteínas amplificadoras de señales hormonales más versátiles y trascendentales para la célula: la proteína cinasa C, enzima clave en el sistema de transducción de recambio de fosfolípidos y movilización de Ca^{++} , por lo que a continuación se describirá detalladamente este sistema, después de una breve descripción del sistema de la adenilato ciclasa.

Sistema de Adenilato Ciclasa.

El segundo mensajero más conocido hoy en día es sin duda el AMP cíclico (AMPC), descubierto por el grupo del Dr. Sutherland en los años sesenta. Este compuesto es generado en fracción de segundos y en forma transitoria como resultado de la activación de la enzima adenilato ciclasa que forma al nucleótido cíclico a partir de ATP, generando también pirofosfato.

Si bien algunas hormonas como glucagon o vasopresina tienen la capacidad de estimular la actividad de la adenilato ciclasa, otras hormonas y neurotransmisores como la somatostatina y la acetilcolina, disminuyen los niveles de AMPC al inhibir a la enzima. También, algunas más como la epinefrina, son capaces de inducir ambas acciones a través de receptores diferentes. La activación o la inactivación de la adenilato ciclasa mediada por receptor, se lleva a cabo a través de proteínas transductoras Gs (estimuladora) y Gi (inhibitoria), respectivamente. Estas proteínas sirven a su vez de sustrato a toxinas bacterianas. La toxina del cólera es capaz de ADP-ribosilar a la subunidad α de Gs en un residuo de arginina, bloqueando su actividad de GTPasa, y dejándola entonces en forma permanentemente activa para estimular la producción de AMPC en las células (7,8). A su vez, la toxina pertussis ADP-ribosila a la subunidad α de Gi en un residuo de cisteína, bloqueando la actividad inhibitoria que ejerce sobre la adenilato ciclasa (9).

En cuanto al elemento efector en este sistema de transducción, la adenilato ciclasa, se tiene evidencia de que existe en múltiples formas moleculares. La enzima purificada de corazón (10) y de cerebro (11) consta de una sola cadena polipeptídica con peso molecular aproximado de 150 kDa. Por lo menos una forma de la enzima de cerebro es activada por calmodulina, probablemente de manera directa, mientras que las otras formas de la enzima pueden ser activadas también directamente, pero farmacológicamente, con el diterpeno forskolina.

Una vez formado el segundo mensajero por la adenilato ciclasa, el AMPC, es reconocido por la proteína quinasa A (PKA), enzima encargada de la propagación y amplificación de las señales acopladas a este sistema. La PKA está constituida por dos subunidades reguladoras y dos catalíticas; la unión del AMPC a las subunidades reguladoras altera su afinidad por las subunidades catalíticas, provocando la disociación en un dímero de subunidades reguladoras-AMPC y dos subunidades catalíticas libres, capaces de fosforilar a otras proteínas y de iniciar la propagación de la señal hormonal. En la figura 1 se presenta un esquema de este sistema de transducción con sus componentes.

Existen evidencias de que hay una gran interacción entre los

sistemas transductores acoplados a la adenilato ciclasa-PKA con los acoplados al recambio de fosfolípidos-activación de la proteína cinasa C (PKC). Esta interacción depende del tipo celular, y puede resultar en un sinergismo, potenciando la formación de segundos mensajeros de un sistema o del otro, o bien, en un antagonismo, disminuyéndola. Los mecanismos moleculares implicados en esta intercomunicación se han dilucidado en algunos casos. Así, se ha observado que los efectos de la PKC sobre el sistema de adenilato ciclasa son complejos y múltiples pudiendo afectarlo a nivel de cualquiera de sus componentes (ver figura 1), ya sea por la fosforilación directa de ellos por PKC (12,13) o por la inducción de una alteración aun no bien definida molecularmente de alguno de ellos, como en el caso de Gs (14).

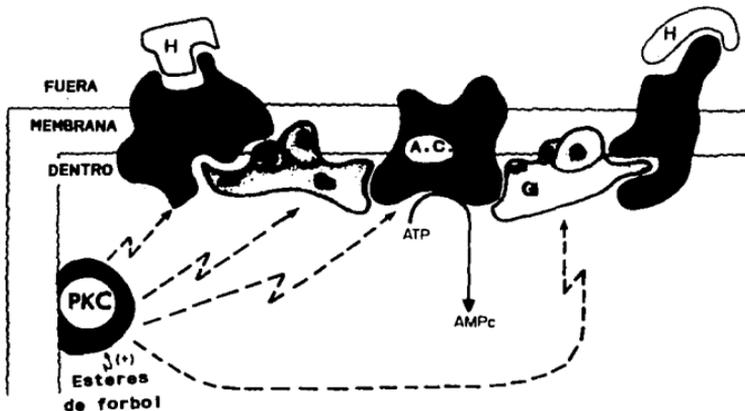


FIGURA 1. Modelo de la regulación del sistema de adenilato ciclasa por la proteína cinasa C. H, hormona o neurotransmisor; R, receptor; AC, adenilato ciclasa; Gs y Gi, proteínas G estimuladora e inhibitoria, respectivamente; PKC, proteína cinasa C.

Sistema de transducción de recambio de fosfolípidos y movilización de calcio.

La primera descripción que se hizo del calcio como mensajero intracelular fue en 1883 cuando el inglés Syney Ringer descubrió que el tejido muscular que estaba examinando no se contraía en ausencia del catión. Más tarde, Mabel y Lowell Hokin, observaron que la administración de acetilcolina a células secretoras pancreáticas aumentaba la incorporación de fosfato radiactivo a fosfatidilinositol, uno de los fosfolípidos constituyentes de la membrana celular. Sin embargo, no fue sino hasta 1975 en que Robert Michell percibió claramente una asociación estrecha entre el recambio del fosfatidilinositol (PI) y las variaciones en la concentración de Ca^{++} libre en el citoplasma de la célula, proponiendo que el mecanismo de transducción para un gran número de mensajeros involucra, como paso inicial, un aumento en el recambio de fosfolípidos, el cual, a su vez, conduce a cambios en la concentración intracelular de Ca^{++} (15). Desde 1975 hasta el día de hoy, el avance en el conocimiento sobre este tema ha sido enorme, y sigue evolucionando con gran rapidez. La visión actual que se tiene de este sistema es la siguiente:

A) Transducción de la señal.

Los agonistas movilizados de calcio incluyen a hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento que causan cambios profundos en el metabolismo celular de lípidos. Entre ellos se pueden citar: la epinefrina (vía receptores α_1 -adrenérgicos), vasopresina (receptores V_1), histamina (receptores H_1), serotonina (receptores 5HT₂), angiotensina II (receptores AT₁), α -trombina, tirotrópina (TSH), hormona liberadora de tirotrópina (TRH), α -interferón, interleucina 1, bradikina, prolactina, bombesina, y muchos más. Los cambios iniciados por estos agonistas al interactuar con su receptor, conducen a la activación de una proteína fijadora de nucleótidos de guanina, la cual se ha llamado Gp (debido a que activa a una fosfolipasa, 12), Gx (16) y, más recientemente, Gq (17).

Los primeros datos sobre la participación de una proteína G en este sistema, surgieron en la década de los ochenta, con los trabajos de Cockcroft y Gomperts (18) y de Fain (19), quienes demostraron que el GTP y sus análogos no hidrolizables son capaces de estimular al efector, la fosfolipasa C (PLC) en membranas aisladas. Otros autores demostraron posteriormente que la afinidad para agonistas de los receptores acoplados a este sistema, es modulada por nucleótidos de guanina y que, además, algunos de estos receptores son capaces de desencadenar en las membranas una actividad de GTPasa, sugiriendo todo esto la existencia de una proteína G (6).

Aunque la identidad de la proteína Gp o Gq empieza apenas a conocerse, el tratamiento con toxina pertussis ha indicado la existencia de por lo menos dos tipos de proteínas G en este

sistema: en algunos tejidos y células, la proteína G que inhibe a fosfolipasa C (una "Gpi") parece ser sensible a la toxina (20, 21), mientras que en otros, como las membranas de hígado bovino, la activación de fosfolipasa C (PLC) por dos proteínas Gq ("Gps") es insensible al tratamiento con ella (17). Existe una gran cantidad de evidencia (20-23) que sugiere que existan distintos tipos de "Gp" que pueden asociarse selectivamente tanto a diferentes receptores expresados en la misma célula, como a diferentes tipos de fosfolipasas efectoras, aunque también se ha visto que la clase de fosfatidilinositol-PLC α se puede asociar con y puede ser fosforilada por varios sistemas de receptores con actividad de tirosina cinasa en una manera aparentemente independiente de proteína G (24,25).

Una vez activada la proteína "Gp", se induce la activación de una proteína efectora, que, como se mencionó en líneas anteriores, es una fosfolipasa ya sea tipo C, D o A2, que a partir de fosfolípidos precursores producirán los segundos mensajeros de la señal hormonal. Hasta hace poco tiempo, el esquema clásico de este sistema de transducción estaba representado exclusivamente por la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) por fosfolipasa C (PLC) mediada por receptor (ver figura 2). Sin embargo, está muy claro actualmente que los agonistas movilizados de Ca⁺⁺ pueden inducir también una hidrólisis rápida de fosfatidilcolina (PCh) a través de diferentes tipos de fosfolipasas.

Los fosfoinosítidos son un pequeño grupo de fosfolípidos de membrana, únicos en cuanto a su cabeza polar de mio-inositol que puede ser fosforilada en varios sitios. Como la mayoría de los glicerolípidos, están constituidos por un esqueleto de sn-1,2-diacilglicerol, con la cabeza polar unida al átomo de carbono 3. Forman un componente menor de todas las membranas eucarióticas, pues colectivamente constituyen usualmente menos del 8% del total de lípidos de membrana (1).

La fosfatidilcolina, por el contrario, es el tipo de fosfolípido más abundante en los tejidos de mamífero y puede constituir hasta el 50% del contenido total de fosfolípido en la célula (8). Consiste de 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-0-alcil-2-alcil-sn-glicero-3-fosfocolina y 1-alcil-1'-enil-2-alcil-sn-glicero-3-fosfocolina. En la mayoría de los tejidos, la subclase dominante es el 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina (26). La PCh de tejidos de mamíferos normalmente contiene un ácido graso saturado en el carbono 1 y un ácido graso insaturado en la posición del carbono 2 del glicerol. Comparado con los fosfoinosítidos, los cuales están relativamente enriquecidos en ácido esteárico y ácido araquidónico, el 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina es relativamente deficiente en ácido araquidónico, y contiene principalmente ácido oleico o linoleico en la posición del carbono 2. Sin embargo, el 1-0-alcil-2-alcil-sn-glicero-3-fosfocolina está relativamente enriquecido en ácido araquidónico en esa posición. A continuación, se describirán los

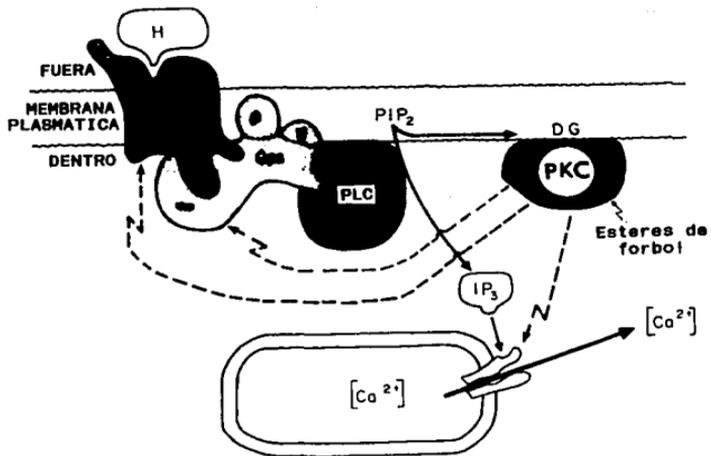


FIGURA 2. Modelo de regulación por feedback ejercido por la proteína cinasa C sobre el sistema de transducción fosfolipidos-calcio. H, hormona o neurotransmisor; R, receptor; PLC, fosfolipasa C (fosfolinositidasa); PIP₂, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; DG, diacilglicerol; IP₃, mio-inositol-1,4,5-trifosfato; Gps, proteína G estimulatoria aún no caracterizada; [Ca²⁺], concentración del ion calcio; PKC, proteína cinasa C.

segundos mensajeros que pueden producirse en este sistema de transducción, según el tipo de fosfolipasa que se active y según el sustrato que ésta emplee:

a) Fosfolipasa C.- Las fosfolipasas C son fosfodiésterasas que hidrolizan el enlace glicerofosfato de fosfolípidos intactos para generar diacilglicerol (DAG) y la cabeza polar soluble que lleva el grupo fosfato. La mayoría de las PLC que se han estudiado hasta ahora hidrolizan preferentemente al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), pero se conoce también la existencia de otras PLC que no utilizan como sustrato al PIP₂ sino a la fosfatidilcolina (37).

Existen múltiples formas de PLC específicas para fosfoinosítidos, que, según su secuencia, se han clasificado en cuatro familias de isozimas α , β , γ y δ (1) las cuales poseen distinto peso molecular y, sorpresivamente, aunque tres de ellas poseen dos estrechas regiones de secuencias homólogas, muestran muy poca homología global en su secuencia aminoácida y el tipo α es completamente diferente (27). La hidrólisis del PIP₂ por fosfolipasa C (PI-PLC) genera dos segundos mensajeros: el DAG y el inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃).

El IP₃ tiene la capacidad de interactuar con receptores intracelulares localizados a nivel del retículo endoplásmico liso (28). La activación de estos receptores por este segundo mensajero induce la apertura de un canal que libera calcio de este organelo, aumentando de 3 a 10 veces la concentración de calcio citosólico, desde un valor de 100 o 200 nM hasta 600 o 1000 nM. Este incremento en la concentración de Ca⁺⁺ es un factor de acoplamiento muy importante, pues es capaz de activar a múltiples enzimas en forma directa y a proteínas cinasas dependientes del catión o del complejo Ca⁺⁺-calmodulina. Además, el IP₃ puede ser fosforilado por una cinasa para la formación del inositol-1,3,4,5-tetrafosfato (IP₄). Se ha propuesto que tanto el IP₃ (29) como el IP₄ (30,31) pueden tener una función importante en la regulación de la entrada de calcio del exterior de la célula, necesaria para sostener respuestas por tiempo prolongado (más de 5 minutos). Se sabe que existe una interconversión rapidísima de los fosfoinosítidos, lo cual mantiene niveles más o menos constantes de ellos en la membrana plasmática de las células. Así mismo, el IP₃ es metabolizado hasta la obtención de inositol libre el cual es reciclado a fosfatidilinositol.

El otro segundo mensajero producido por la hidrólisis del PIP₂ o de la fosfatidilcolina (PCh), el diacilglicerol (DAG), es un compuesto hidrofóbico de aparición transitoria, ya que su desaparición se produce en segundos o minutos de su formación y activa a la PKC, como se describirá más adelante. Por su composición más variada, la hidrólisis de PCh por fosfolipasa C puede producir distintas especies moleculares de DAG (26), mientras que la hidrólisis de PIP₂ generalmente produce un solo tipo de DAG: el compuesto por 1-estearato y 2-aracidonato. La gran velocidad con que ocurre la degradación

del DAG obedece a que es metabolizado a ácido fosfatídico (AP) por la DAG-cinasa o a 1-*sn*-glicerol 3-fosfatídico por la DAG-lipasa, los que a su vez, pueden originar otros mensajeros. Los estudios con inhibidores y con análogos de sustrato de la DAG-cinasa han sugerido que en las células estimuladas, la ruta principal de metabolismo de DAG es catalizada por esta enzima, de la que se han reportado varias isoformas inmunológicamente distintas (32,33).

b) Fosfolipasas A₂.- Son esterasas dependientes de Ca⁺⁺ que catalizan la hidrólisis de la posición 2-éster de los 3-*sn*-fosfoglicéridos. Se conoce bastante de la estructura de las PLA₂: constituidas por una sola cadena polipeptídica, poseen cerca de su extremo amino-terminal un patrón de residuos de cisteína repetido en tandem cuya secuencia y distribución es similar a la que se encuentra en el dominio regulatorio de las PKC; además, existe homología en la secuencia aminoácida entre la PKC y el sitio activo de las PLA₂, en posiciones análogas relativas al patrón de cisteína. De estas observaciones se ha hipotetizado que las PKC y las PLA₂ comparten elementos estructurales importantes para la interacción proteína-fosfolípido (34). En cambio, la información que se tiene sobre el papel de estas fosfolipasas en la transducción de señales que activan a la PKC es escasa en comparación con la que se tiene de las PLC y su estudio constituye en la actualidad un campo de investigación muy activo.

Se ha observado en distintos tipos celulares la activación de la PLA₂ mediada por receptor (35-38), así como su activación por distintas proteínas G (39,40). También se ha demostrado que las proteínas cinasas A, C y las tirosina cinasas, regulan la actividad de la PLA₂ celular (41).

La fosfolipasa A₂ hidroliza varios fosfolípidos de membrana incluyendo a fosfoinosítidos, PCh y a la fosfatidiletanolamina (PEt). La hidrólisis de PIP₂ o de PCh por esta fosfolipasa genera, por un lado, ácidos grasos insaturados: oleico, linoleico o araquidónico, que según se ha demostrado, estimulan a la proteína cinasa C en la presencia o ausencia de calcio y de fosfolípidos, y por otro lado, el lisofosfolípido correspondiente (36).

Cuando el ácido graso que se libera es el araquidónico, éste es convertido a través de las rutas de la ciclo-oxigenasa y de la lipo-oxigenasa a eicosanoides que incluyen a prostaglandinas, tromboxanos, prostacilinas, leucotrienos y lipoxinas (42). En algunas células, como en las Kupffer, se ha encontrado que la PLA₂ se transloca rápidamente a las membranas de manera Ca⁺⁺-dependiente para actuar como la suministradora principal de ácido araquidónico en estas células, y por tanto, como la enzima limitante en la síntesis de eicosanoides, muchos de los cuales son mediadores lipídicos potentes en los procesos de inflamación (43).

c) Fosfolipasa D.- Esta enzima hidroliza a fosfolípidos en el enlace existente entre el grupo de cabeza polar y el ácido fosfatídico. Investigación muy reciente ha revelado evidencias que sugieren que existe otra forma en la célula para generar DAG a partir de PCh involucrando la actividad de una fosfolipasa D (PLD) aparentemente a través de una proteína G (45-48). Los segundos mensajeros que se forman son colina y ácido fosfatídico (AP), y a partir de éste, por acción de la fosfatidil-fosfohidrolasa, se genera el DAG (45).

Adicionalmente a la hidrólisis, la PLD cataliza una reacción única de "transfosfatidilación" por medio de la cual la porción fosfatidil del sustrato fosfolípido es transferida a alcoholes primarios para producir fosfatidilalcoholes (26). De hecho, esta reacción ha servido de apoyo adicional para demostrar que se activa PLD en experimentos en los cuales los agonistas promuevan la formación de fosfatidiletanol en la presencia de etanol (49).

Hasta el momento, se desconoce el papel que juega la colina liberada por la PLD o el de la fosfocolina producida por la PLC a partir de PCh; sin embargo, se ha propuesto que la síntesis de acetilcolina en el cerebro está acoplada a la hidrólisis de PCh (50-52). El ácido fosfatídico, cuya composición puede variar según el tipo de PCh que se hidrolice, puede constituir en sí un mensajero potencial antes de ser degradado posteriormente a DAG (26).

La hidrólisis de PCh por PLD se observa frecuentemente después de un cierto periodo largo de estimulación con hormonas o con ésteres de forbol (activadores de la PKC). Hay evidencia que indica que algunos agonistas generan DAG de manera bifásica, a través de la estimulación secuencial de PLC y de PLD/PA hidrolasa probablemente para inducir una activación sostenida de la PKC, necesaria especialmente para producir las respuestas a largo plazo de ésta (53).

Finalmente, las conclusiones respecto a la manera en la cual es regulada la PLD varían. Algunos investigadores han inferido que la activación de PLD es dependiente de proteína cinasa C. Otros han atribuido la activación de PLD al aumento en el calcio citosólico inducido por agonistas (49).

En la figura 3 se encuentra esquematizado un resumen de los segundos mensajeros que se pueden generar en este sistema de transducción de señales, indicando las enzimas efectoras que los producen y la modulación positiva o negativa que ejercen sobre la PKC. Los fenómenos que se han reseñado en este capítulo, han sido objeto de un estudio intenso en los últimos años, y aunque no se han esclarecido muchas preguntas, se está progresando en forma espectacular en este campo, por lo que seguramente en los próximos años se tendrá la respuesta a muchas de ellas.

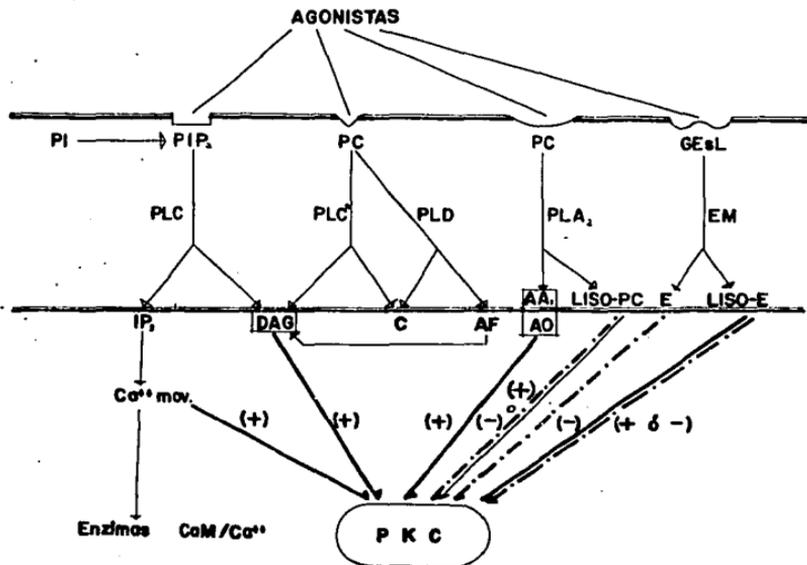


Figura # 3. Mecanismos de activación e inhibición de la proteína cinasa C. PI, fosfatidilinositol; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5 bifosfato; PC fosfatidilcolina; GEsL, glucoesfingolípidos; PLC, fosfolipasa C; PLD, fosfolipasa D; PLA₂, fosfolipasa A₂, EM, esfingomelinasa; IP₃, inositol 1,4,5 trifosfato; DAG diacilglicerol; C, colina; AF, ácido fosfatídico; AA, ácido araquidónico; AO, ácido oleico; LISO-PC, lisofosfatidil colina; E, esfingosina y LISO-E, lisoesfingosina.

B) Propagación de la señal: acción de la proteína cinasa C.

Los trabajos de Krebs, Fischer y Larner en los años 1955-70, llevaron al descubrimiento de la regulación enzimática por fosforilación reversible, cuando demostraron que el control neuro-hormonal del metabolismo del glucógeno en músculo esquelético estaba mediado por cambios en el estado de fosforilación de las enzimas glucógeno fosforilasa, fosforilasa cinasa y glucógeno sintasa. Estas 3 enzimas fueron los únicos ejemplos de este fenómeno hasta finales de 1960, cuando se descubrió a la proteína cinasa A, dependiente de AMPc (54). En los últimos 10 años, se ha visto un enorme avance en esta área, especialmente con el advenimiento de las técnicas de clonación molecular, así como con el descubrimiento de que muchos oncogenes codifican para proteínas cinasas. Actualmente asciende a más de 100 el número de proteínas cinasas descritas y seguramente se descubrirán más, ya que se ha calculado que el genoma de los mamíferos puede codificar hasta para mil diferentes proteínas cinasas (55).

Todas las proteínas cinasas caracterizadas hasta ahora, caen en una de dos grandes clases: las específicas para fosforilar residuos de serina y treonina, y las específicas para fosforilar residuos de tirosina. A pesar de esta diferencia, existe entre todas ellas una gran homología en sus dominios catalíticos, pues la comparación de las secuencias primarias de un gran número de ellas, ha revelado la existencia de tres regiones altamente conservadas que constituyen el sitio de unión para el ATP: son las secuencias Gly-X-Gly-X-X-Gly, X-Ala-Val/Ile-Lys-X, y dentro de una región de 60 aminoácidos, característicamente espaciados, los triplete Arg-Asp-Leu, Asp-Phe-Gly y Ala-Pro-Glu (55 y 56).

El proceso de fosforilación y desfosforilación de proteínas catalizada por proteínas cinasas y por proteínas fosfatasa, está reconocido como el medio principal a través del cual se regulan las funciones celulares. Entre los eventos que son regulados por este proceso, están los siguientes: a) transducción de señales hormonales, b) regulación de rutas metabólicas, c) regulación de la síntesis de proteínas, d) organización del citoesqueleto, e) regulación de la transcripción, f) neurotransmisión y g), regulación de apertura o cierre de canales iónicos.

La fosforilación múltiple es un mecanismo sencillo para ampliar grandemente el potencial regulatorio de las enzimas: la fosforilación en un sitio puede amplificar, o bien, antagonizar los efectos de la fosforilación en otros sitios, o puede alterar las velocidades a las cuales son fosforilados o desfosforilados éstos. La fosforilación en diferentes sitios por diferentes proteínas cinasas, capacita a las enzimas para responder a varios estímulos fisiológicos, ya que las interacciones entre los sitios de fosforilación pueden representar el mecanismo por el cual un estímulo influencia a otro. Los sustratos, activadores o inhibidores, pueden también

afectar la velocidad a la cual es fosforilada o desfosforilada una enzima, amplificando o suprimiendo los efectos de la modificación covalente. La fosforilación-desfosforilación por eso no debe considerarse como un mecanismo de "apagado o encendido" de una enzima, sino más bien como una forma de cambiar a esta proteína en dos o varias formas, que respondan diferencialmente a sustratos y a moléculas reguladoras, lo que ofrece posibilidades de un control finísimo para integrar la información extra e intracelular y producir la respuesta precisa.

La Proteína Cinasa C.

A) Caracteres estructurales

Desde su descubrimiento en 1977 por el grupo de Yasutomi Nishizuka, la PKC se ha convertido en el foco de atención de investigadores interesados en el estudio de los mecanismos de transducción de señales, de diferenciación celular y de tumorigénesis.

Los estudios de clonación molecular, así como los análisis bioquímicos, han revelado que la PKC existe como una familia de múltiples subespecies con estructuras estrechamente relacionadas entre sí. Hasta el día de hoy, se han identificado 8 subespecies de PKC: α , β I, β II, γ , δ , ϵ , ζ y η (57). Las subespecies β I y β II derivan de un solo gene, que se transcribe en dos RNAm distintos por procesamiento alternativo; difieren una de otra aproximadamente en 50 residuos aminoácidos localizados en la región V5 de sus extremos carboxilo.

Todas las subespecies de PKC poseen diferencias en su modo de activación, propiedades cinéticas y especificidad de sustrato (58, 59) y pueden ser subdivididas en dos grupos (57): las Ca^{++} -dependientes (α , β y γ) y las Ca^{++} -independientes (δ , ϵ , ζ , y η). Ambos grupos de proteínas consisten de una sola cadena polipeptídica con una estructura homóloga general: 3 o 4 regiones altamente conservadas y 5 regiones variables distribuidas en dos dominios, uno regulatorio y otro catalítico, separados entre sí por la región variable V3, como se muestra en la figura 4.

La mitad amino terminal contiene las regiones constantes C1 y C2 y constituye el dominio regulatorio, que interacciona con Ca^{++} , fosfolípido y DAG o ésteres de forbol. Cabe hacer notar aquí que solamente los dominios regulatorios de las isozimas α , β y γ contienen la región C2, mientras que en las demás subespecies está ausente.

En el extremo amino de la región C1 se localiza el motivo denominado "pseudosustrato", identificado por primera vez por House y Kemp en 1987 (59). Se trata de una pequeña secuencia aminoácida cuyo motivo central RKGALR posee una gran afinidad por el sitio activo de la PKC, ya que se parece al sitio de fosforilación de los sustratos de la enzima al tener una se-

cuencia Gly-Ala flanqueada por residuos básicos, determinantes para el reconocimiento del sitio a fosforilar por la PKC. De hecho, un péptido sintético que contiene la secuencia pseudosustrato actúa como potente inhibidor de PKC, mientras que la sustitución de Ala por Ser en esta secuencia, lo transforma en un excelente sustrato para la enzima (58, 59). Esto llevó a proponer a House y Kemp que el sitio pseudosustrato puede interaccionar con el sitio activo de PKC en las células para mantener inactiva a la cinasa en ausencia de activadores (59).

La región constante C1 contiene además, una repetición en tandem de la secuencia rica en cisteína Cys-X2-Cys-X13(14)-Cys-X2-Cys-X7-Cys-X7-Cys, donde X representa cualquier aminoácido (61). Esta secuencia es conservada en todos los miembros de la familia de PKC, con la excepción de que en PKC ζ no está repetida (60), y es similar a la secuencia consenso de "zinc-DNA-binding-finger" (dedos de zinc) presente en muchas metaloproteínas y en proteínas que se unen al DNA y que están relacionadas con la regulación de la transcripción de éste (62), aunque en el caso de la PKC, no hay evidencia sólida que indique que se une a DNA.

La región conservada C2, de 115 residuos aminoácidos que sigue a la región V2, es idéntica en un 67% en los tipos α , β y γ , y más del 65% de las diferencias entre ellos representan cambios conservativos. Se ha demostrado que esta región lleva el sitio de unión para calcio, el cual no posee una estructura típica "brazo EF" (hélice-asa-hélice) presente en la mayoría de las proteínas que unen Ca^{++} (58).

Inmediatamente adyacente a la región C2 se localiza la región V3, que es la más extensa y la de mayor divergencia entre todas las 5 regiones variables de PKC. Esta región posee características hidrofílicas y se cree que representa una zona expuesta de las PKC pues es muy sensible al ataque proteolítico. Parker et al han propuesto que representa una región bisagra entre los dominios catalítico y regulatorio (63, 64).

La mitad carboxilo terminal de cada isozima, que empieza después de la región hipervariable V3, contiene las regiones constantes C3 y C4 y es el dominio catalítico de PKC, pues muestra grandes grupos de secuencias homólogas a las existentes en otras proteínas cinasas. La región conservada C3 tiene un sitio de unión para ATP Gly-X-Gly-XX-Gly...Lys y es específicamente el sitio activo de la enzima (58). Aunque la región C4 contiene otra secuencia idéntica a ésta, se desconoce si representa o no un sitio de unión adicional para ATP (61). Por último, se presenta la región variable V5, en el extremo carboxilo, cuya longitud varía entre las diferentes formas de PKC.

El peso molecular de las PKC oscila entre 76 y 90 kDa. El de la subespecie ξ es menor (64kDa) debido a que solamente contiene una secuencia "dedos de zinc" en vez de dos, mientras que la de mayor peso molecular es la subespecie ϵ , de 90

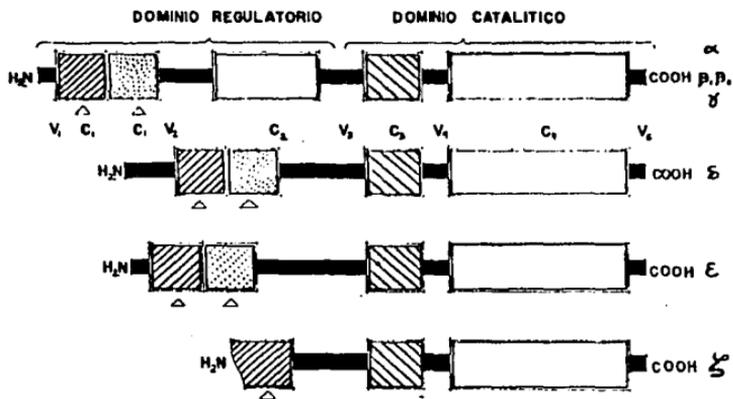


FIGURA 4. Estructura de la familia de proteínas cinasas C. C1 a C4, regiones constantes 1 a 4; V1 a V5, regiones variables 1 a 5; Δ , región donde se localizan las secuencias ricas en zinc "dedos de zinc".

kDa. (58).

B) Localización de la PKC.

La localización genética de los miembros de la familia de PKC se ha establecido solamente para las subespecies dependientes de calcio. El gene de PKC α se localiza en el cromosoma humano 17, el de PKC β en el cromosoma 16 y el de PKC γ en el cromosoma 19.

El uso de técnicas tales como la hibridación *in situ* con RNAm y el análisis "Northern" con pruebas oligonucleotídicas específicas, ha sugerido que algunas isozimas de PKC se expresan específicamente en ciertos tejidos (61). El patrón de expresión de múltiples especies de PKC se ha examinado también usando técnicas bioquímicas, citoquímicas e inmunológicas con anticuerpos específicos para cada subespecie. Mucho se conoce acerca de la distribución de α , β y γ y poco de la de δ , ϵ , ζ y η .

La subespecie α es la que se encuentra más ampliamente distribuida. Las PKC con las secuencias β I y β II están presentes en proporción variable en muchos tejidos y tipos celulares incluyendo el cerebro. En la rata, la subespecie γ se expresa únicamente en el cerebro y en la médula espinal. En cuanto a la localización de las isoformas independientes de calcio, se ha reportado que PKC δ es la forma principal que se expresa en tejido hematopoyético de ratón (67), que PKC ϵ se expresa en células de pituitaria, cerebro y timo de rata (68), PKC ζ en cerebro, plaquetas y neutrófilos (69), y por último, que PKC η se expresa predominantemente en pulmón y en piel de ratón (70).

Algunos tejidos como corazón, pulmón, corteza adrenal y también las plaquetas, parecen contener varias subespecies aún no definidas. Además, se ha observado que la mayoría de las células contienen más de una subespecie de PKC en diferente proporción, cuya distribución intracelular varía dependiendo del estado de proliferación de las células (65, 67).

En cuanto a la localización intracelular de la PKC, el análisis de las características hidropáticas de las PKC demuestra una similitud general entre ellas y no ofrece pistas adicionales respecto a su posible localización; solamente la región repetida rica en cisteína contiene grupos pequeños de secuencias hidrofóbicas, que pueden permitir, con una conformación apropiadamente plegada, la asociación de la PKC con el lado citoplásmico de la membrana plasmática (64). Se ha reportado que la isoforma β I frecuentemente está asociada con la membrana plasmática, mientras que la β II se localiza en el aparato de Golgi (58). También se ha reportado la localización de PKC β en núcleo (65,66), así como su translocación desde el citosol hasta éste en varios sistemas humanos y en hígado de rata (71-74). Sin embargo, se desconoce en la actualidad la topografía intracelular precisa de las subespecies de la

proteína cinasa C.

C) Activación de la PKC.

Para entender el mecanismo de acción de la PKC se requiere conocer el proceso de su activación. La base molecular de este proceso dista mucho de ser clara en el presente. No obstante, se tiene conocimiento de varios aspectos de este fenómeno, que se describirán a continuación.

Los moduladores endógenos naturales positivos por excelencia de la PKC son el sn-1,2-diacilglicerol, fosfolípidos ácidos, particularmente la fosfatidilserina y, en el caso de las isoformas α , β y γ , también el calcio (75). Como ya se describió en el capítulo anterior, existen varias rutas que proveen el DAG necesario para la activación de la enzima, como se ve en la figura 3, mientras que la movilización de calcio resulta solamente de la liberación de IP₃ por la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂).

Entre varios fosfolípidos probados (76), sólo los de carácter ácido de cadena larga, además de la fosfatidilserina (P_{Ser}), tales como el fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PEt) y el ácido fosfatídico (AP), han sido efectivos para producir la activación de PKC, en diferentes grados y a concentraciones de calcio relativamente altas (10^{-4} - 10^{-3} M), pero ninguno ha sido más potente que la P_{Ser} para activar a cualquiera de las isoformas de la PKC. Sin embargo, varios fosfolípidos de membrana, que son inactivos por sí mismos, juegan un papel específico con cooperatividad positiva o negativa en la activación de PKC. Así, se ha visto que cuando P_{Ser} es suplementada con PEt, se produce mayor activación de la enzima; inversamente, la adición de fosfatidilcolina o de esfingomielina, disminuye notablemente la activación inducida por P_{Ser} (76).

Recientemente se ha visto que la lisofosfatidilcolina y otros lisofosfolípidos regulan la actividad de la PKC de una manera bifásica: La estimulan a baja concentración (<20 μ M), inhibiéndola a altas concentraciones (30 μ M,36), sugiriendo que pueden funcionar como moduladores tanto negativos como positivos de la PKC (ver figura 3).

Se ha reportado que el DAG aumenta únicamente la kcat de PKC, mientras que el Ca⁺⁺ y la P_{Ser} reducen solamente la km para el sustrato proteico (77). De este modo, el DAG actúa sobre PKC como un "activador", mientras que el Ca⁺⁺ y la P_{Ser} son "cofactores esenciales" para la actividad enzimática (77). Se sabe también que aunque tanto el DAG como la lisofosfatidilcolina requieren de calcio para sus efectos, la lisofosfatidilcolina disminuye la afinidad de la proteína cinasa C por el Ca⁺⁺, mientras que el DAG la aumenta.

Por otro lado, la dependencia in vitro de PKC por Ca⁺⁺, DAG y fosfolípido, varía marcadamente con el aceptor de fosfato

utilizado (78). Se ha observado que en ausencia de Ca^{++} , las propiedades cinéticas de la PKC son influenciadas grandemente por la basicidad de las proteínas sustrato implicadas (79), pues ciertos policationes favorecen la expresión del sitio de unión para DAG, estabilizando la conformación activa de PKC, aunque el mecanismo preciso por el cual un sustrato puede inducir actividad de PKC se desconoce (80).

Se ha sugerido que la activación de la enzima por fosfolípidos causa un cambio conformacional en la PKC que desplaza la secuencia pseudosustrato del sitio activo, permitiendo así el acceso a él de los sustratos proteicos (80), como se observa en la figura 5a. La inhibición ejercida por el pseudosustrato no tiene efecto sobre la dependencia de la PKC en cuanto a la presencia de Pser, DAG o Ca^{++} .

Por otro lado, la translocación (redistribución) de la PKC entre los compartimentos soluble y asociado a membranas parece estar involucrada en la activación de la enzima (81-88), en la "down-regulation" (degradación) de la PKC (89, 90) y en el acceso a sustratos específicos. Se tiene abundante evidencia de que el Ca^{++} aumenta la afinidad de la cinasa por las membranas promoviendo su asociación reversible con ellas, mientras que los ésteres de forbol, potentes activadores de PKC, potencian este efecto y producen la asociación no reversible de la PKC a las membranas.

La proteína cinasa C puede ser activada también por proteólisis limitada con proteasas neutras dependientes de calcio, calpaína I o calpaína II. La hidrólisis ocurre en uno o dos sitios específicos de la región V3, liberándose el fragmento catalítico, que es completamente activo en ausencia total de Ca^{++} , DAG y fosfolípido y se le denomina proteína cinasa M. Se sabe que la PKC asociada a membrana es más susceptible a este tipo de proteólisis (92) y que diferentes subespecies de PKC son hidrolizadas a distintas velocidades. Aunque el significado fisiológico de esta proteólisis limitada no ha sido establecido, es posible que esta reacción constituya una manera de activar a PKC persistentemente. Alternativamente, la proteólisis puede ser también un medio de iniciar la degradación de la molécula de PKC, denominada "down-regulation" (58).

Existen evidencias (93, 94) de que las formas α , β I, β II, γ y η de PKC pueden autofosforilarse en la presencia de calcio (o en su ausencia, en el caso de PKC η), Pser y dióleina *in vitro*; esta reacción se lleva a cabo en residuos de serina en las isoformas α y γ , mientras que en las subespecies β I y β II ocurre tanto en serina como en treonina. Esta reacción de autofosforilación se ha asociado con la activación de la enzima, aunque su significado fisiológico se desconoce.

La PKC sirve también como receptor para promotores de tumores: los ésteres de forbol. Estos compuestos diterpénicos, tal como el tetradecanoil-forbol-acetato (TPA) obtenido de la

semilla del árbol Croton tiglium, tienen una estructura similar a la del diacilglicerol (ver figura 6); se intercalan rápidamente en la membrana activando directamente a la PKC tanto in vitro como in vivo. Como el DAG, los ésteres de forbol aumentan dramáticamente la afinidad de la enzima por calcio. Sin embargo, estos diterpenos no son rápidamente metabolizados y pueden extender una fase de la respuesta celular usualmente limitada.

La respuesta celular a los ésteres de forbol es por lo general bifásica: la respuesta inicial involucra activación y redistribución de PKC. Sin embargo, la activación persistente de la enzima prolonga su asociación a la membrana y resulta en su "down-regulation" (94,95,96).

Además de los ésteres de forbol y diterpenos relacionados, se han identificado otros productos naturales estructuralmente distintos que también se unen a PKC con alta afinidad; estos comprenden a los indol-alcaloides tales como teleocidina y los poliacetatos tales como aplisiatoxina (97). También las briostatinas, que son lactonas macrocíclicas aisladas de Bugula neritica y de otros briozoarios marinos, activan farmacológicamente a la PKC (97).

La PKC se activa cuando un diglicérido se une a un sitio efector de su dominio regulatorio; esta interacción es estereoespecífica, siendo activo solamente el (S)-enantiómero. Los estudios de especificidad han mostrado un grado no usual de especificidad hacia el esqueleto del glicerol y a las mitades hidrofílicas de los diglicéridos. La especificidad estricta mostrada hacia éstos, contrasta con la conducta de PKC hacia promotores de tumores estructuralmente tan diversos.

En 1989, usando mutantes con deleciones y mutaciones en la región C1 de PKC γ , Ono et al (98) demostraron que la secuencia dedos de zinc es indispensable para la unión del éster de forbol a la enzima. Por esto, se ha pensado que es posible que el TPA, y tal vez el DAG, se unan por puentes de hidrógeno a los grupos sulfhidrilo de estas regiones ricas en cisteína. El DAG exhibe solamente dos grupos aceptores (éster carbonílico) y un grupo donador (el grupo OH libre) y entonces sólo se puede unir a PKC en una orientación, como lo indica la figura 5b. El TPA, sin embargo, contiene dos regiones con grupos aceptores y donadores disponibles. Una es la región C3, C9 y C20 y otra es la región C9, C12 y C13.

Varios autores (60, 97, 99-101) han realizado estudios de la interacción de los activadores con la PKC usando comparaciones computarizadas de las estructuras derivadas de rayos X o de las calculadas, para dilucidar los elementos críticos que constituyen el farmacóforo de los ésteres de forbol y del DAG, a fin de contestar la pregunta de que cómo el mismo sitio de unión puede ser el blanco de moléculas activadoras tan diferentes. Todos estos autores, han coincidido en proponer un modelo estereoquímico en el cual el carbonilo del C3 y los

hidroxilos del C9 y C20 del TPA, son los esenciales para la unión con la PKC (ver figura 5b) y corresponden a ciertos oxígenos y nitrógenos en otros compuestos. La estructura tipo DAG del TPA es intrigante, pero puede no ser significativa puesto que existen otros activadores de PKC que no contienen una zona tipo DAG.

Por tanto, la interacción de la PKC con las 3 zonas hidrofílicas indicadas, es vista como la "sine qua non" de la activación de la enzima, aunque adicionalmente se requiere también de zonas hidrofóbicas espacialmente correspondientes (101): se sabe que las cadenas de ácido graso esterificadas a los C13 o C12, son importantes para la actividad de los ésteres de forbol, pues los de cadenas cortas son menos potentes que el TPA, por lo que se cree que estas regiones hidrofóbicas pueden estar involucradas en la interacción con fosfolípido, que es absolutamente requerida para activar completamente a la PKC (60).

La actividad del DAG como activador de la PKC, así como su afinidad por ella, es al menos 3 órdenes de magnitud menores que la de TPA. Esto puede ser debido a que el farmacóforo C3, C9, C20 del TPA se ajusta mejor en la región rica en cisteína, que el farmacóforo C1, C2, C3 del DAG (60).

Este modelo está apoyado por evidencia experimental adicional: el residuo de asparagina presenta solamente en la segunda región dedos de zinc de la PKC, puede ser esencial para una fuerte unión del TPA, puesto que permitiría un puente de hidrógeno adicional con el grupo OH del C20 (figura 5b). Consistente con esto, el grupo de Ono (69) ha encontrado que la PKC ξ , que contiene sólo la primera región rica en cisteína (sin asparagina), no es activada por concentraciones nanomolares de TPA (60).

Finalmente, dentro de la gran variedad de compuestos exógenos y endógenos que han sido reportados como reguladores positivos de la PKC, existen dos únicos ejemplos de moduladores que, a diferencia de todos los demás, son incapaces de activar a la PKC en ausencia de cofactores in vitro. Los dos son activadores endógenos muy potentes de PKC, éter-aminofosfoglicéridos, que fueron descritos por primera vez como inhibidores de la activación glucocorticoide-receptor. Estimulan la actividad de PKC 2-4 veces por separado y 10-12 veces juntos en citosol de hígado de rata. La activación parece ser específica para PKC y ocurre solamente cuando la enzima ha sido inicialmente activada por Ca⁺⁺, P_{Ser} y DAG. Adicionalmente, parece que interaccionan directamente con el dominio regulatorio de PKC pues inhiben la unión de ésteres de forbol a la PKC (77).

D) Caracteres Individuales

Existen diferencias entre las diversas subespecies de proteína cinasa C en cuanto a su modo de activación (65,102,103).

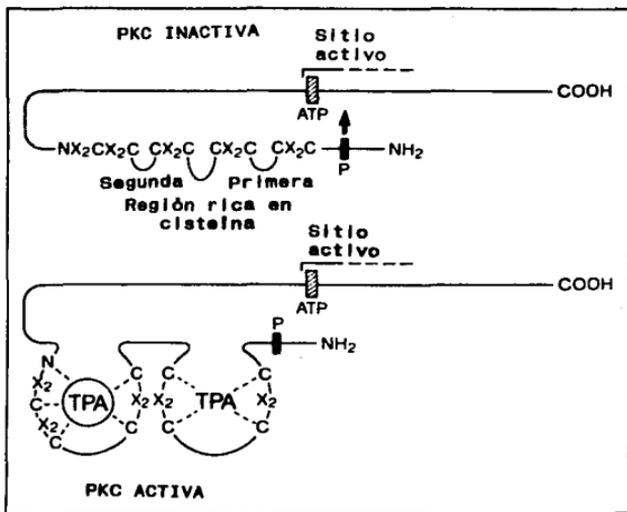


FIGURA 5a. Modelo de activación de la PKC por TPA. Se propone que la formación de asas como consecuencia de la unión del TPA, desplaza el sitio pseudosustrato (P) del sitio activo. La segunda región rica en cisteína que contiene un residuo de Asn, puede unir al TPA con mayor afinidad (simbolizada por un círculo) que la primera región. C, cisteína; N, asparagina.

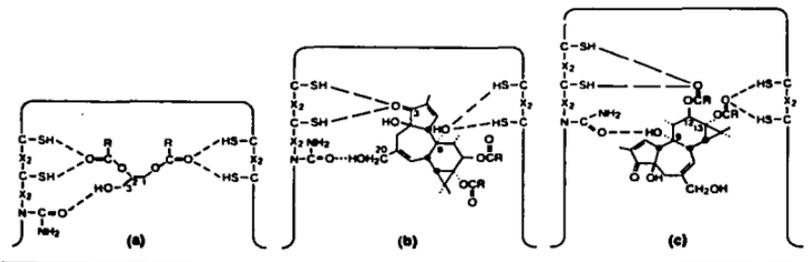


FIGURA 5b. Unión propuesta del diacilglicerol (a) y del éster de forbol TPA (b y c) a la segunda región rica en cisteína de la PKC. C-SH, cisteína; N-CO-NH₂, asparagina; R, ácido graso.

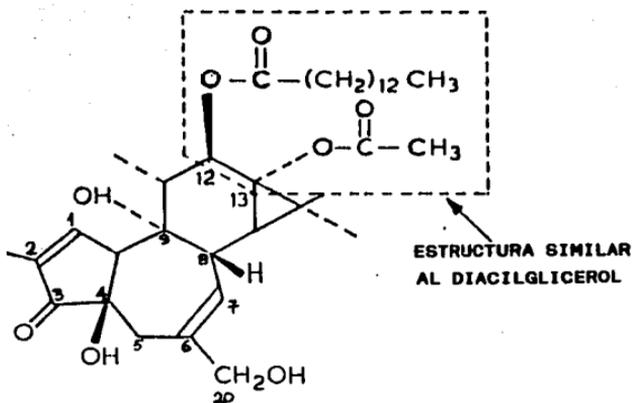


FIGURA 6. Estructura del potente promotor de tumores tetradecanoil-forbol-acetato (TPA).

Las subespecies α y γ son activadas en menor grado por diacilglicerol en la presencia de PSeR que las especies β I y β II, mientras que éstas últimas muestran además considerable actividad aún en ausencia de calcio (78).

Una de las características más sobresalientes de la isoforma γ es que puede ser activada *in vitro* por concentraciones micromolares de ácido araquidónico libre y por algunos de sus metabolitos tales como ilpoxina A; esta activación no requiere de Ca^{++} ni de fosfolípido. En contraste, las subespecies β son activadas muy pobremente por concentraciones micromolares de ácido araquidónico, mientras que las especies α responden a altas concentraciones de él, pero sólo a elevadas concentraciones de calcio (61).

Las isoformas de PKC del grupo Ca^{++} independiente muestran una estricta dependencia de la presencia de fosfolípidos (68), pero, a diferencia de α , β y γ , tienen diferente especificidad de sustrato, ya que la histona H1-IIIS, que es el sustrato común utilizado *in vitro*, es fosforilado pobremente por estas isoformas, fosforilando en cambio muy eficientemente al pseudosustrato modificado (104). Sin embargo, la subespecie δ muestra actividad significativa con histona H1 como sustrato en ausencia de cofactores; esta actividad es muy aumentada por fosfolípido, pero ni DAG ni TPA muestran efecto en ella.

Las subespecies δ , ϵ y η son activadas potentemente por TPA (69). Existe evidencia de que en plaquetas, que co-expresan los subtipos α , β y δ , el TPA en concentración micromolar transloca diferencialmente a estas isoformas (57). También, en células HL60, la brestatina y el forbol dibutirato difieren en su habilidad de activar y de translocar a las subespecies α y β II: PKC α es translocada a la membrana plasmática en respuesta a brestatina, mientras que β II se transloca a la membrana nuclear en respuesta al éster de forbol (105).

Existe evidencia de que el α -interferón selectivamente activa a PKCB a través de la hidrólisis de fosfatidilcolina (107). Como se mencionó anteriormente, la selectividad de la ruta de transducción hormonal probablemente ocurre a un nivel inicial: de proteínas G o de fosfolipasas productoras de distintos segundos mensajeros, más bien que a nivel de PKC.

Actualmente, existe muy poca información sobre las consecuencias bioquímicas y fisiológicas de la activación de más de un tipo de PKC. Tampoco se conoce con precisión la especificidad de sustrato *in vivo* de todas las isoformas de PKC. Por otro lado, como ya se dijo antes, la dependencia de PKC sobre Ca^{++} , DAG y fosfolípido varía con el aceptor de fosfato usado en las reacciones *in vitro*, lo que sólo ha hecho posible la comparación entre los miembros de la familia de PKC bajo condiciones limitadas. Es posible que las distintas subespecies de PKC respondan diferencialmente a activadores *in vivo*, pero el problema recién mencionado, junto con el hecho de que

las preferencias de sustrato y de activadores puedan ser el resultado de la distribución diferencial en varios tipos celulares así como de la compartimentalización dentro de la misma célula, deja en el presente importantes preguntas por contestar en cuanto a los mecanismos de activación in vivo de cada isoforma de PKC.

E) Sustratos de PKC

Las proteínas que son capaces de servir de sustrato a la proteína cinasa C normalmente contienen aminoácidos básicos en el lado carboxilo terminal adyacente al residuo de serina o treonina a ser fosforilado (107, 108, 109, 110).

La razón por la cual un sustrato puede influenciar el requerimiento de cofactores para PKC se desconoce, y tampoco está claro si tiene significado fisiológico. De acuerdo a esto, los sustratos se han clasificado en tres categorías: A) aquellos cuya fosforilación no requiere de cofactores, como la protamina, B) sustratos como la proteína mielina básica, poly-Lis-Ser o poly-Arg-Ser, que requieren solamente de la presencia de fosfolípido, y C), sustratos como histona, troponina y la cadena ligera de la miosina, que requieren la presencia de Ca^{++} y de fosfolípido (78).

Hasta el día de hoy, se ha reportado una gran cantidad de sustratos para PKC. Sin embargo, no se sabe si todos ellos son sustratos fisiológicos. Se han encontrado en múltiples sistemas celulares, dos proteínas que se fosforilan por la activación de PKC *in vivo*: una es la glicoproteína ácida de 80kDa (111) y la otra es la proteína denominada "MARCKS" (sustrato de cinasa C rico en alanina, miristoilado), utilizados frecuentemente como índice de la activación de PKC (112); pero aunque estas proteínas se han caracterizado a nivel molecular, su función precisa es obscura, así como también el tipo de PKC que las fosforila. Entre los demás sustratos que se conocen para PKC están los siguientes (80, 113-119):

a) Proteínas receptoras: receptores $\alpha 1$ y β -adrenérgicos, receptor para factor de crecimiento epidérmico, receptor de insulina (la treonina 1336 de la subunidad β), receptor de transferrina, receptor de somatomedina C (IGF-I), receptor de interleucina 2, receptor para factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor colinérgico nicotínico, y receptor de IP_3 .

b) Proteínas membranales: ATPasa de calcio de la membrana plasmática, ATPasa Na^+/K^+ , canal de Na^+ , intercambiador Na^+/H^+ , transportador de glucosa y proteínas G.

c) Proteínas contráctiles y del citoesqueleto: cadena ligera y pesada de la miosina, troponinas I y T, vinculina, filamina, y proteínas asociadas a microtúbulos.

d) Enzimas: glucógeno fosforilasa cinasa, glucógeno sintasa, fosfofructocinasa, β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA reductasa, tirosina hidroxilasa, NADPH-oxidasa, citocromo P450,

guanilato ciclasa, adenilato ciclasa, fosfolipasas C, DNA-metilasa, factor de iniciación 2.

e) Otras proteínas: Topoisomerasa II, proteínas no histónicas HMG 14 y 17, histonas H1, H2B y H4, proteína ribosomal 6S, fibrinógeno, pro-trombina, GABA modulina, fosfolamban, proteína mielina básica (MBP), lamininas A y B y lipocortinas.

F) Inhibidores de PKC

Existen varios moduladores negativos endógenos de PKC. Y. Hannun y R. M. Bell (120), descubrieron que la esfingosina derivada de la hidrólisis de glucoesfingolípidos de membrana por acción de la esfingomielinasa, es un inhibidor potente y reversible de la actividad de PKC. Las características estructurales críticas de la esfingosina como inhibidor, son la amina primaria y el carácter hidrofóbico (120). También los lisoesfingolípidos inhiben reversiblemente y con gran potencia a PKC (ver figura 3). Sin embargo, los inhibidores endógenos más potentes que se han reportado hasta el momento, son proteínas que unen calcio: una de 17 kDa aislada de hígado de rata y de otros tejidos (121), y otras proteínas de 29-33 kDa que tienen similitud en la región carboxilo terminal con la familia de las lipocortinas (122).

Otros inhibidores de la proteína cinasa C que han sido reportados incluyen: dibucalina, clorpromazina, adriamicina, verapamil, amilorida, tamoxifeno, bilirrubina, palmitoilcarnitina, derivados isoquinolina-sulfonamida (H7), polimixina B, staurosporina (123), gossypol, tioésteres ácido graso-*acil*-CoA (124), sangivamicina (125), y derivados de acridina (123).

Se sabe que H7, staurosporina y sangivamicina, actúan como inhibidores competitivos con respecto al ATP y que los derivados de acridina se comportan como inhibidores no competitivos también con respecto al ATP. Los polisacáridos sulfatados tales como pentosán polisulfato (PPS) y heparina, son otros potentes inhibidores de la PKC: PPS es inhibidor competitivo con respecto al ATP y no competitivo con respecto a histona; en contraste, la heparina inhibe a la PKC competitivamente con respecto al sustrato proteico y no competitivamente con respecto al ATP (126). A excepción de estos inhibidores, existe muy poca información sobre los mecanismos de acción por los cuales los demás compuestos mencionados afectan la actividad de la PKC, lo que ha llevado a suponer que la mayoría de estas moléculas perturban la bicapa lipídica, inhibiendo como consecuencia a la PKC no específicamente (123).

G) Funciones de la PKC

La versatilidad bioquímica, así como la importancia que tiene esta cinasa para inducir gran variedad de respuestas celulares es sorprendente. La diversidad de funciones en las cuales se ha involucrado a la PKC, puede estar relacionada con la

capacidad de activar múltiples especies moleculares de ella, aunque en la actualidad, como se ha reiterado, existe muy poca información sobre este aspecto.

Una de las principales funciones de la proteína cinasa C es la de regular tanto positiva como negativamente la interacción de ciertos receptores de la membrana con componentes del aparato celular de transducción de señales. Cuando el control que ejerce es positivo, ocurre una potenciación de la respuesta que se produce al estímulo dado, pero puede ejercer también un control negativo de "feedback" sobre varios pasos en los procesos de transmisión de señales, produciendo entonces diferentes tipos de desensibilización, es decir, respuestas disminuidas a estímulos subsecuentes en el sistema bajo control. Por ejemplo, en hepatocitos de rata, la activación de PKC conduce a la inactivación de la glucógeno sintasa (127), al bloqueo de las acciones α -adrenérgicas por fosforilación del receptor α -adrenérgico (113), a la desensibilización heteróloga de adenilato ciclasa por la inhibición de las acciones de Gs (14, 128), y al bloqueo de la función de Gi a través de la fosforilación de α Gi (129).

Todas las formas de acción ejercidas por la PKC pueden operar tanto a corto como a largo plazo. Entre los diversos procesos celulares que modula la PKC produciendo respuestas rápidas, están las siguientes (130, 131, 132, 133):

- En sistemas endócrinos, secreción de aldosterona, prolactina, catecolaminas, insulina, hormona del crecimiento, calcitonina, hormona luteinizante, tirotropina, hormona paratiroidea y hormonas pituitarias.

- En sistemas exócrinos, secreción de amilasa, mucina, pepsinógenos, ácido gástrico y surfactante.

- En el sistema nervioso, liberación de acetilcolina, dopamina y de otros neurotransmisores.

- En sistemas musculares, contracción y relajación de músculo liso.

- En sistema inmune, liberación de histamina, liberación de serotonina, liberación de enzimas lisosomales, síntesis de eicosanoides, agregación plaquetaria y activación de linfocitos T y B.

- Otros sistemas y procesos metabólicos: lipogénesis en adipocitos, esteroidogénesis.

- Transporte de iones a través de la membrana: regula la acción de la ATPasa de calcio de la membrana plasmática, de la ATPasa de Na^+/K^+ , del canal de Na^+ , del intercambiador Na^+/H^+ y del transportador de glucosa.

Dentro de las respuestas a largo plazo moduladas por la activación de la proteína cinasa C están la síntesis del DNA y la regulación de la expresión de ciertos genes como el que codifica para Interferón (134), interleucina 2 (65), la ornitina Descarboxilasa (135), la histidino-carboxilasa (136),

calcitonina (137), prolactina (138) y de los proto-oncogenes c-myc, c-fos y c-jun (142, 143, 144). También, la fosforilación de proteínas catalizada por PKC ejerce profundos efectos en los procesos de proliferación celular, desarrollo y diferenciación (85, 139, 140, 141).

IV. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo general estudiar la base molecular de la desaparición de la actividad de la proteína cinasa C inducida por ésteres de forbol. Para ello, utilizando como modelo experimental al hígado de rata, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Conocer cuántos y cuáles subtipos de PKC se expresan en hepatocitos de ratas Wistar y Zucker.
- Determinar qué efecto producen los ésteres de forbol sobre la actividad de la PKC tanto de ratas normales (Wistar o delgadas Zucker) como de ratas con una supuesta acción deficiente de PKC (Zucker genéticamente obesas).
- Caracterizar cómo ocurre y a qué se debe la desaparición de la actividad inducida por ésteres de forbol.

V. MATERIALES Y METODOS

La metodología empleada en la ejecución de los presentes experimentos se halla descrita en los artículos que se prepararon como parte integral de esta tesis, y que aparecen incluidos en la sección de resultados. Se mencionarán también tres técnicas que no fueron usadas en dichos trabajos, y que por tal motivo se describirán a continuación:

Tratamiento con ésteres de forbol *in vitro*.- Los hepatocitos fueron aislados y homogenizados como se describe en los trabajos. El sobrenadante obtenido de la centrifugación de este homogenado, denominado "extracto crudo", se incubó a 4° C en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de los ésteres de forbol o de dioleína durante 5 minutos antes de ser aplicado a DEAE-celulosa, a fenil-sefariosa, o de tomar alícuotas para medir la actividad de la PKC.

Cromatografía en fenil-sefariosa.- El extracto crudo, o la PKC eluida de una columna de DEAE-celulosa, se llevó a una concentración 1.5 M de NaCl y se aplicó a una columna de fenil-sefariosa previamente equilibrada con amortiguador Tris-HCl 20 mM- 0.5 mM EDTA - 0.5 mM EGTA pH 7.5, adicionado con 0.1 mg de inhibidor de tripsina y con 50 mM 2-mercaptoetanol. Después de lavar la columna con el mismo amortiguador (8 veces el volumen de cama), se eluyó la PKC lavando con esta misma solución pero sin NaCl, o bien, con un gradiente continuo de NaCl de 1.5 a 0 M.

Efecto de antioxidantes sobre la actividad de PKC.- El extracto crudo obtenido del homogenado de hepatocitos, fue incubado durante 15 minutos *in vitro* en presencia o ausencia de 1µM TPA y de las concentraciones de antioxidantes indicadas, a 4° C y en oscuridad, antes de aplicar las muestras a DEAE-celulosa para purificar parcialmente la PKC 1. Del eluato obtenido, se tomaron alícuotas para determinar la actividad de PKC según se describe en el trabajo 1.

VI. RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis fueron dados a conocer en 1991 en:

- 1.- Robles-Flores, M., Alcántara-Hernández, R. and García-Sáinz, J.A. (1991). Differences in phorbol ester-induced decrease of activity of protein kinase C isozymes in rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1094: 77-84.
- 2.- García-Sáinz, J.A., Alcántara-Hernández, R., Robles Flores, M., Torres-Márquez, M.E., Massillon, D., Annabi, B. and Van de Werve, G. (1991). Modulation by protein kinase C of the hormonal responsiveness of hepatocytes from lean (Fa/fa?) and obese (fa/fa) Zucker rats. Sometido a publicación en *Biochimica et Biophysica Acta*.

Se incluyen además después de estos trabajos, 5 figuras con datos no publicados, que se discutirán junto con los demás resultados.

BBAMCR 12769

Differences in phorbol ester-induced decrease of the activity of protein kinase C isozymes in rat hepatocytes

Martha Robles-Flores, Rocio Alcántara-Hernández and J. Adolfo García-Sáinz

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México (Mexico)

(Received 31 January 1991)

Key words: Protein kinase C; Phorbol ester; Enzyme deactivation

Two main forms of protein kinase C (PKC) activity were found in rat hepatocytes using DEAE-cellulose chromatography: PKC I and PKC 2. Treatment of cells with 1 μ M 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) for 15 min caused a marked loss of PKC I activity and only a small loss of PKC 2 activity. Hydroxyapatite column chromatography resolved PKC I into three distinct peaks 1a, 1b and 1c, and PKC 2 into four peaks 2a, 2b, 2c and 2d. Immunoblot analysis with isozyme-specific monoclonal antibodies identified peak 1a as PKC- β and peak 1b as PKC- α ; the other peaks of activity were not identified. Treatment with TPA provoked a loss of activity of peaks 1b (PKC- α) and 1c, whereas peak 1a (PKC- β) activity was not affected. The peaks of activity corresponding to PKC 2 did not show any major change due to TPA treatment except peak 2d that decreased. The apparent disappearance of PKC histone-kinase activity induced by TPA was also observed using other substrates (protamine or vinculin). The TPA-induced decrease in activity occurs in a time-dependent and dose-dependent fashion. However, the time-courses, the extent of depletion and the potency order of phorbol esters in induction of an activity decrease in the two groups of isoforms exhibited substantial differences.

Introduction

Protein kinase C (PKC), has emerged as a major component of transmembrane signalling systems [1,2]. The enzyme is dependent on Ca^{2+} , phospholipid and diacylglycerol (DAG) for its activity and is encoded by a multigene family which comprise at least seven forms with subtle individual differences in enzymological behavior [3-6] responsiveness to Ca^{2+} and phospholipid [7] and tissue distribution [5,8]. PKC also has been defined as the major tumor-promoting phorbol esters receptor [9,10]. Phorbol esters are structural analogs of DAG that activate PKC directly both in vivo and in vitro (reviewed in Ref. 11).

Rat brain PKC can be resolved by hydroxyapatite column chromatography into three fractions, types I, II

and III which have the structures of γ , β (β I and β II) and α sequence, respectively [3,6]. In rat liver, only type II (β) and III (α) PKC isozymes have been found [8,12-14]. However, the specific pathways in which each of them function are yet poorly defined as it is the reason for the existence of so many different isozymes.

Tumor-promoting phorbol esters elicit a large variety of biological responses in tissues and cultured cells [2,11,12]. The cellular response to such agents is generally biphasic. The initial response involves activation and redistribution of PKC. However, prolonged activation of the enzyme results in its down-regulation (depletion), the membrane form of the enzyme being more susceptible to proteolytic degradation [15]. Down-regulation of PKC activity induced by prolonged treatment with the potent tumor-promoter TPA has been extensively reported in a variety of cell types [16-18]. Recent evidence has also shown that a brief treatment (2-15 min) with TPA may quickly deplete the activity of some PKC isozymes in KM3 cells [18] and in rat 1-fibroblasts, bovine adrenocortical cells and human lymphoid cells [19].

As in many other systems, it has been shown that treatment of intact hepatocytes with TPA, induces within minutes a shift in the subcellular distribution of

Abbreviations: PKC, protein kinase C; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate; 4-O-me-TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate 4-O-methyl ether; PDBu, phorbol 12,13-dibutyrate.

Correspondence: J.A. García-Sáinz, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-248, 04510 México, D.F., Mexico.

PKC towards the membrane associated form [13,20,21]. However, quantitative studies indicate that part of the total cellular PKC activity was lost during the process.

We investigated this phenomenon and found that total PKC activity from untreated and phorbol ester-treated rat hepatocytes can be separated into two groups of isozymes using DEAE-cellulose chromatography; further resolution of each of them on hydroxyapatite chromatography resulted in three and four peaks of activity, respectively. We also show here that these peaks of PKC activity exhibit substantial differences in their phorbol ester-induced decreases in activity.

Experimental procedures

4- α -Phorbol, 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA), phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu), 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate 4-*O*-methyl ether (4-*O*-me-TPA), histone H1-III (lysine rich), protamine sulfate, phosphatidylserine, Triton X-100 and 1,2-diolefin were obtained from Sigma Chemical Co. Collagenase (Type II) was from Cooper Biomedical. [γ - 32 P]ATP was purchased from ICN Radiochemicals, DEAE-cellulose (DE-52) was from Whatman and hydroxyapatite was from Calbiochem. Other reagents were of analytical grade. Vinculin was purified from chicken gizzard as described by Ferramisco and Burridge [22] up to the DEAE-cellulose step. Murine monoclonal antibodies to PKC isozymes were from Seikagaku Kogyo Co. and goat anti-mouse IgG-alkaline phosphatase conjugates were from Bio-Rad.

Female Wistar rats (200–250 g) fed ad libitum were used. Hepatocytes were isolated by the method of Berry and Friend [23]. Isolation, washing and incubation of the cells were performed in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, saturated with O_2/CO_2 (95%:5%) (pH 7.4 at 37°C). Freshly isolated hepatocytes were incubated (triplicate determinations, final volume 1.0 ml, cell concentration 150–200 mg fresh weight/ml) in the absence (vehicle) or presence of phorbol esters for 15 min or the time indicated. At the end of the incubation, cells were centrifuged and washed thoroughly three times with Krebs-Ringer bicarbonate buffer.

After washing, the cells were resuspended in 1 ml of ice-cold buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 50 mM 2-mercaptoethanol and 0.1 mg/ml trypsin inhibitor. The cells were homogenized with an ultraturax for 20 s, and the homogenate was maintained at 0–5°C for 30 min before being centrifuged at 28000 \times g for 20 min. Almost no PKC activity was observed in the pellets from control or TPA-treated cells and they were discarded. Aliquots (640 μ l) of the supernatants from this centrifugation designated "crude extracts" were diluted with 3 vols. of "column buffer" (20 mM Tris-HCl, 50

mM 2-mercaptoethanol, pH 7.5) and applied to DEAE-cellulose columns (1 ml bed volume) that had been previously equilibrated with "column buffer" at 4°C. After washing with column buffer (8 ml), the PKC activity was eluted batchwise first with 4 \times 2 ml of column buffer containing 0.08 M NaCl, 2 mM EDTA and 0.1 mg/ml trypsin inhibitor, and then with 2 \times 2 ml of column buffer containing 0.25 M NaCl, 2 mM EDTA and 0.1 mg/ml trypsin inhibitor. Using this chromatography system, two peaks of PKC were eluted, the first at 0.08 M NaCl and the second at 0.25 M NaCl (see Fig. 1). The pooled PKC (1 or 2) fractions from DEAE-cellulose were concentrated to 1 ml with an Amicon concentrating system (YM-30 membrane). The concentrated fractions were dialyzed against buffer A (0.02 M potassium phosphate (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol) before applying it to an hydroxyapatite column (1.5 \times 5 cm) equilibrated with the same buffer. The column was washed with 65 ml of buffer A and protein kinase C isozymes were eluted with a 70 ml linear concentration gradient (0.02–0.28 M potassium phosphate) at a flow rate of 10 ml/h. Fractions of 2.3 ml were collected and assayed for PKC activity.

PKC activity was assayed by measuring the incorporation of 32 P from [γ - 32 P]ATP into H1-III histone (or into protamine or vinculin as indicated). The reaction mixture (250 μ l) contained 20 mM of Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM magnesium nitrate, 50 μ g of H1 histone (or

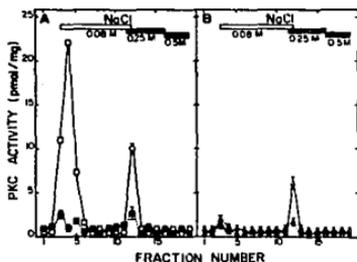


Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatography of PKC from rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated without (panel A) or with (panel B) 1 μ M TPA at 37°C for 15 min; the cells were washed and PKC was partially purified on DEAE-cellulose chromatography. PKC activity was eluted first with buffer containing 0.08 M NaCl, then with 0.25 M NaCl and finally with 0.5 M NaCl. Aliquots of the fractions were assayed for PKC activity in the presence of γ -phosphatidylserine (20 μ g/ml), 1,2-diolefin (0.8 μ g/ml) and CaCl₂ (0.5 mM (\blacktriangle , \triangle)) or in the presence of EGTA (0.5 mM (\bullet , \circ)). Vertical lines represent the 5 E.M. for four experiments using different cell preparations.

50 μg of protamine sulfate or 200 μg of vinculin). 10 μM [γ - ^{32}P]ATP (800 cpm/pmol), 5 μg phosphatidylserine, 0.2 μg 1,2-dioleoin, 0.5 mM CaCl_2 , and the appropriate amounts of enzyme. Blank incubation was performed by replacing CaCl_2 with 0.5 mM EGTA without addition of lipids. Activity was also assayed with CaCl_2 alone (without lipids) and was practically the same as that obtained from blank incubations. For the *in vitro* activation experiments, 5 μg phosphatidylserine, 10 μM CaCl_2 and the indicated concentrations of phorbol esters instead of dioleoin were used. After a 4 min incubation at 30°C, the reaction was stopped by the addition of 2 ml of 25% trichloroacetic acid and 0.1 ml of 1% albumin; the precipitates were collected and washed onto glass microfiber filters. Activity obtained from blank incubations was subtracted from the activity obtained in the presence of Ca^{2+} and phospholipid. PKC activity is expressed as pmol/mg of hepatocyte wet weight in 4 min. Under the conditions employed the activity was linear with respect to time and protein concentration.

Samples containing PKC activity of each peak were separated by 10% SDS-PAGE followed by electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes as recommended by Towbin et al. [24]. Immunoblots were performed using specific monoclonal antibodies against rabbit brain PKC isozymes and affinity-purified goat anti-mouse IgG antibodies conjugated to alkaline phosphatase.

Results

In order to examine the effects of TPA on PKC activity, freshly isolated rat hepatocytes were incubated in the absence (vehicle) or presence of 1 μM TPA for 15 min and the total PKC activity from these cells were analyzed. Fig. 1 shows the elution profile of PKC activity upon DEAE-cellulose column chromatography. Two distinct enzyme fractions were eluted from control cells (panel A): one major peak at 0.08 M NaCl and another smaller one at 0.25 M NaCl. Essentially the same result was obtained when a linear concentration gradient (0–0.5 M NaCl) was employed (not shown). Remarkably, it was found that the tumor promoter at this concentration induced the near disappearance of the first peak of PKC activity, whereas the second one was affected to a much lesser degree (Fig. 1 panel B).

To analyze further the PKC 1 and PKC 2 isoforms eluted from DEAE-cellulose, and to evaluate the possibility that the short TPA treatment may selectively deplete the activity of only certain PKC isozymes, DEAE-cellulose column effluents were resolved on hydroxyapatite column chromatography. As can be seen (Fig. 2A), this procedure separated PKC 1 from untreated control hepatocytes into three distinct peaks (as shown previously by Azhar et al. [25]) designated

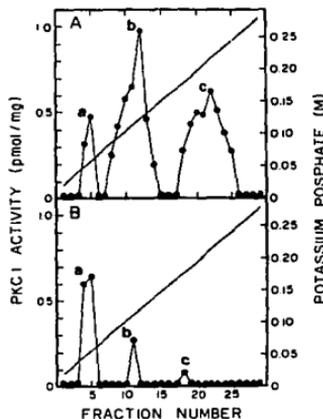


Fig. 2. Separation of three isozymic forms of protein kinase C from PKC 1 by hydroxyapatite column chromatography. PKC activity was eluted with a linear concentration gradient of potassium phosphate (0.02–0.28 M). Aliquots of the fractions were assayed for PKC activity under standard conditions. Activity plotted represents the difference between the activity obtained in the presence of cofactors minus that obtained in their absence, but containing EGTA. Panel A represents the elution profile obtained from control untreated cells, and panel B that obtained from hepatocytes incubated with 1 μM TPA for 15 min. Data from the two panels were obtained from the same cell preparation and running the column in parallel. The data are representative of five experiments obtaining similar data.

1a, 1b and 1c. The peak activities, eluted from hydroxyapatite column at approx. 0.07 M (1a), 0.13 M (1b) and 0.20 M (1c) potassium phosphate.

Comparison of this elution profile with that obtained from hepatocytes treated with 1 μM TPA for 15 min (Fig. 2B), by estimating the change in each peak area, indicated that phorbol ester treatment produced a drastic loss of activity of isozymes 1b (93%, $n=5$) and 1c (98%, $n=5$), whereas isoform 1a remained unaffected. The recovery of total activity after the hydroxyapatite column varied from experiment to experiment. However, the elution profiles and the effect of the phorbol ester were consistently observed. The elution position from the hydroxyapatite column of peaks 1a and 1b corresponds, respectively, to type II (PKC- β) and type III (PKC- α) described before for rat liver [8,13]. In order to confirm this we performed immunoblot analysis of the fractions with higher PKC

activity using type-specific monoclonal antibodies. As can be seen in Fig. 3, the monoclonal antibody against PKC- α detected a peptide of approx. 82 kDa in the line corresponding to peak 1b. Similarly, the antibody against PKC- β identified a major band of 82 kDa in the line corresponding to peak 1a. When the whole peaks (rather than the fractions with higher activity) were employed some cross contamination was observed. Peak 1c was not identified by these antibodies.

Resolution of PKC 2 from control cells on hydroxyapatite (Fig. 4A), showed at least four peaks of activity, eluting approx. at 0.09 M (2a), 0.12 M (2b), 0.17 M (2c) and 0.23 M (2d) potassium phosphate. In some experiments another small peak was apparent at 0.04 M potassium phosphate, but it was not consistently observed. In cells treated with 1 μ M TPA for 15 min (Fig. 4B), there was no significant loss of activity in peaks 2a, 2b and 2c, and only in peak 2d a decrease in activity of 50% was observed on the basis of quantitative estimation of the changes in peak areas for each one. However, it was very difficult to analyze quantitatively the loss in activity with respect to control PKC 2 isoforms from untreated cells, because although the recovery of activity was usually good from the hydroxyapatite column chromatography step (40–50%), it was

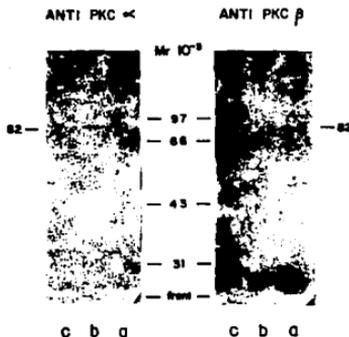


Fig. 3. Identification of protein kinase C isoforms by immunoblotting. Fractions from hydroxyapatite column chromatography were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Immunoblot analysis was done with monoclonal antibodies against type α enzyme or type β enzyme and developed with alkaline phosphatase-conjugated second antibody. Lanes corresponding in each peak 1a, 1b or 1c from control cells and the positions of molecular weight standards are indicated. The amount of protein was 15 μ g for each lane; the result shown is representative of three independent experiments.

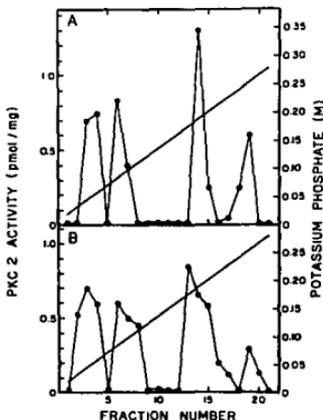


Fig. 4. Separation of isoforms of protein kinase C from PKC 2 by hydroxyapatite column chromatography. PKC activity was eluted with a linear concentration gradient of potassium phosphate (0.02 to 0.28 M). Aliquots of the fractions were assayed for PKC activity under standard conditions. Activity plotted represents the difference between the activity obtained in the presence of cofactors minus that obtained in their absence but containing EGTA. Panel A represents the elution profile obtained from control untreated cells, and panel B that obtained from hepatocytes incubated with 1 μ M TPA for 15 min. Data from the two panels were obtained from the same cell preparation and running the columns in parallel. The data are representative of five experiments obtaining similar data.

not always exactly the same for each column even when running in parallel. Moreover, the TPA-induced loss in activity of PKC 2 as a whole is not as all as dramatic as it is for isoforms of PKC 1, in which two of the peaks of activity are practically 'erased'. Thus, in order to overcome this problem, we decided to work henceforth with the PKC 1 and PKC 2 obtained from DEAE-cellulose step.

It has been reported that exposure of rat 1-fibroblast [19] or BC3H-1 myocytes [26] to TPA, results in loss of phosphorylating activity of PKC when it is assayed with histone as substrate but not when another substrate such as vinculin or cytochrome *P*-450 is used. These data suggest, therefore, that the loss in activity may not reflect a true depletion of PKC activity but, instead, a TPA-induced change in the catalytic properties of the enzyme. To investigate this possibility, PKC 1, which is more sensitive to treatment with TPA, was

assayed under standard conditions using a set of different protein substrates. The data, listed in Table I, show that the enzyme from TPA-treated cells had decreased its ability to phosphorylate all substrates used: i.e., 15 min of exposure to 1 μ M TPA induced a decrease of 88% in histone kinase activity, 77% in protamine-kinase activity and a 68% of vinculin-kinase activity, thus ruling out that the depletion of PKC activity could be the result of a TPA-induced change in the enzyme substrate specificity.

We next examined whether the phorbol ester-induced decreases in activity were dose dependent and their pharmacological specificity. We decided to test two well-known active phorbol esters, TPA and PDBu, and compare their effects with those produced by α -phorbol and 4-O-me-TPA, reported as biologically inactive [27]. As shown in Fig. 5, when hepatocytes were treated with different concentrations of phorbol esters for 15 min, a dose dependent loss of PKC activity was observed with TPA and PDBu for both groups of isozymes (PKC 1 and PKC 2), but surprisingly and in marked contrast, 4-O-me-TPA induced depletion of PKC 1 activity, but did not produced any effect on PKC 2 activity in the same cells. Strikingly, 4-O-me-TPA, reported as unable to activate PKC, was even more potent than PDBu in inducing down-regulation of PKC 1. With this isozyme, the half maximal effect was obtained with $2 \cdot 10^{-8}$ M TPA; it is also shown that the concentration of 4-O-me-TPA necessary to deplete 90% of PKC 1 activity was 100-times greater than that required of TPA, whereas with the maximal concentration of PDBu tested ($1 \cdot 10^{-6}$ M) a loss of activity of only 57% was attained (Fig. 5.1). Thus, for PKC 1, the potency order observed with the phorbol derivatives used was TPA > 4-O-me-TPA > PDBu; α -phorbol was inactive. In the case of the PKC 2 isozyme (Fig. 5.2), it is noteworthy that the potency order observed was changed: TPA > PDBu; 4-O-me-TPA and α -phorbol were unable to diminish PKC 2 activity at the concentrations tested. Moreover, the

TABLE I

Substrate specificity of PKC obtained from rat hepatocytes incubated in the absence (vehicle) or presence of 1 μ M TPA for 15 min

PKC 1 was partially purified on DEAE-cellulose chromatography as described, and activity was assayed under the standard conditions using 0.2 mg/ml of histone H1-H15 or protamine sulfate or using 0.8 mg/ml of vinculin. Mean values are indicated with the S.E. of three experiments using different cell preparations.

Substrates	Activity (pmol/mg)	
	control	TPA-treated cells
Histone H1-H15	21.9 \pm 2 (100%)	2.62 \pm 0.4 (12 \pm 2%)
Protamine	22.5 \pm 0.48 (100%)	5.17 \pm 0.4 (23 \pm 2%)
Vinculin	20.8 \pm 1.4 (100%)	6.65 \pm 1.4 (32 \pm 7%)

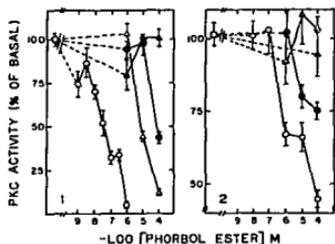


Fig. 5. Down-regulation of PKC isoforms as a function of phorbol ester concentration during incubation *in vivo*. Hepatocytes were incubated for 15 min with the concentrations of phorbol ester indicated. PKC was partially purified on DEAE-cellulose chromatography and PKC was assayed as described in Materials and Methods. Basal activities (squares) were: PKC 1 19.6 ± 0.7 pmol/mg, and PKC 2 9.2 ± 0.6 pmol/mg. Lines represent the S.E.M. of four to six experiments using different cell preparations. \square , control; \circ , TPA; \bullet , PDBu; \triangle , 4-O-Me-TPA; \blacktriangle , α -phorbol. In the left panel (1) the activity of PKC 1 is presented and in the right panel (2) that of PKC 2.

phorbol derivatives were able to deplete only 55% (TPA) or 25% (PDBu) of the PKC 2 isozymes at relatively high concentrations. Taken together, these data indicate that PKC 1 is much more sensitive to TPA than PKC 2, and that there are clear pharmacological differences between them.

We next studied the time-course of disappearance of activity for both group of isoforms induced by a maximal dose of TPA (1 μ M). The results in Fig. 6 show that the TPA-induced disappearance of activity was much faster and larger for isoform 1 than for isoform 2: whereas the activity of PKC 1 dramatically decreased in only 1 min and continued to disappear up to 90% with respect to the control, PKC 2 activity decreased much more slowly and only up to 50% of the control. Also, it can be seen that removal of TPA from the medium by thorough washing (dotted line in Fig. 6), did not revert the loss of activity for either of the two isozymes, indicating, therefore, that the TPA-induced down regulation of PKC is not reversible, at least during the 30 min studied.

Activation of PKC seems to lead to decreases in activity in several models [28-31]. Dose-response curves for activation *in vitro* of the PKC isoforms by phorbol esters are presented in Fig. 7. TPA and PDBu increase the reaction velocity. PKC 1 was activated at lower TPA and PDBu concentrations than PKC 2, and reached maximal activity with concentrations of 10 μ M and 100 μ M, respectively. On the other hand, PKC 2 activity never reached a real plateau of maximal activ-

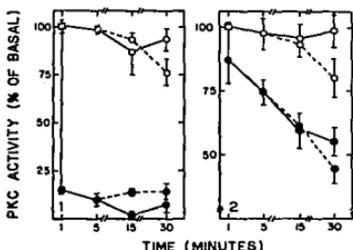


Fig. 6. Time-course of the TPA-induced down-regulation in rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated without (○) or with (●) 1 μ M TPA for the times indicated (solid lines) or for 5 min and were then washed and re-incubated in the absence of any agent (dotted lines). The squares represent the activities (100% basal activities) observed in the controls and were: PKC 1, 18.9 ± 3 pmol/mg and PKC 2, 8.7 ± 0.4 pmol/mg (mean \pm S.E., $n = 15$). Mean values are plotted and vertical lines represent the S.E. of five experiments using different cell preparations. In the left panel (1) the activity of PKC 1 is presented and in the right panel (2) that of PKC 2.

ity with the concentrations tested (Fig. 7). In addition, it was observed that 4-*O*-me-TPA produced a very weak activation only of PKC 1 which is more sensitive

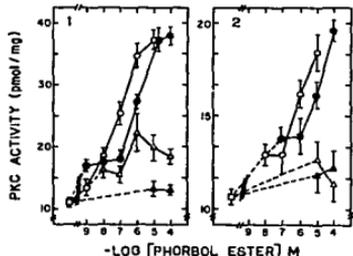


Fig. 7. Activation of protein kinase C isoforms by different concentrations of phorbol esters. PKC isoforms from rat hepatocytes were partially purified by DEAE-cellulose column chromatography and assayed *in vitro* in the presence of 10 μ M CaCl_2 , 20 μ M/ml phosphatidylserine and the indicated concentrations of phorbol ester. Controls were assayed under the same conditions except that no phorbol ester was added but vehicle (DMSO) instead. □, control; ○, TPA; ●, PDBu; ▲, 4-*O*-me-TPA and △, α -phorbol. Mean values are plotted and vertical lines represent the S.E. for six experiments using different cell preparations. In the left panel (1) the activity of PKC 1 is presented and in the right panel (2) that of PKC 2.

to phorbol esters. Both isozymes showed the same potency order of phorbol esters for its activation (TPA > PDBu) TPA being one order of magnitude more potent than PDBu for both forms of the enzyme; this coincident with the potency order reported for tumor promotion [9,10,32].

Discussion

As reported earlier for rat liver, partial purification of PKC by DEAE-cellulose column chromatography resolves PKC into two peaks of activity [13,25]. We resolved these fractions further on hydroxyapatite column chromatography and found that PKC 1 could be separated into three peaks of activity and PKC 2 in at least four. Our data of resolution of PKC 1 are in agreement with those reported by Azhar et al. [25] who resolved the major peak eluted from DEAE-cellulose into three isoforms upon hydroxyapatite chromatography. Kosaka et al. [8] and Houweling et al. [13] on the other hand, found two isozymes of PKC from these cells, corresponding to the type II (β -sequence) and III (γ -sequence) subspecies described for rat brain [3,5]. We observed that avoiding to overload the hydroxyapatite column with the sample, was probably the main factor to obtain a good separation of peaks 1b and 1c, because if this precaution is not taken they overlap.

The peak corresponding to PKC 2 has not yet been further characterized. Here we have provided evidence for the existence of at least four peaks of activity in this fraction when resolved using hydroxyapatite column chromatography. The possibility that this second peak could be protein kinase M (a proteolytic fragment of PKC) was considered, since other authors have observed that in a peak that elutes at a similar NaCl concentration the activity is not dependent on Ca^{2+} phosphatidylserine or diolien [13,25]. However, in our hands, the protein components of PKC 2 appear to be native forms of PKC for the following reasons: (i) this activity was dependent on the presence of diolien or active phorbol esters; (ii) it has the characteristic order of potency for activation of PKC by these tumor promoters (TPA > PDBu); and (iii) we could not detect any increase in phospholipid- and Ca^{2+} -independent histone-kinase activity in the purification steps. These data clearly indicate that this PKC 2 peak is not protein kinase M, which lacks the regulatory domain and, therefore, is fully active in the absence of diacylglycerol or active phorbol esters, and further indicates that it must contain at least one of the two cysteine-rich zinc-finger-like sequences of the C-1 region of the regulatory domain of PKC which are absolutely required for the binding of the tumor promoter [33].

PKC 2 could be composed with the new members of the PKC family (δ , ϵ and ζ) subspecies whose structure are common to that of the previously known

members, but have different regulatory domains [12,34]. Biochemical, immunological and cytochemical procedures with subspecies-specific antibodies, and northern blot analysis with specific oligonucleotide probes, have shown the presence of forms δ and ϵ in rat liver [34,35]. Moreover, there is evidence suggesting a key role of the regulatory domain in determining the chromatographic behavior of the enzyme [36].

With respect to the decreases of activity induced by TPA treatment, we found in this study that this phorbol ester selectively deplete the activity of some, but not all, PKC isozymes during the 15 min studied. The two main peaks of PKC activity obtained from DEAE-cellulose in our system can be distinguished by their different pharmacology in the decrease in activity induced by phorbol esters, and by their rate and extent of disappearance due to the tumor promoter treatment. Furthermore, they have a significant difference in sensitivity to TPA and PDBu for activation *in vitro*. Our data are in agreement with those reported by Ase et al. [18] in KM3 cells and by Cochet et al. [19] in rat 1-fibroblasts, bovine adrenocortical cells and human lymphoid cells with respect to several facts: (i) subspecies of PKC co-expressed in a single cell type disappear at different rates upon exposure to TPA; (ii) decreases in activity of some PKC isoforms, can be induced very quickly (1-15 min); (iii) this rapid depletion of activity does not seem to be associated to an increase in PKM.

It is generally accepted that down-regulation is due to activation with subsequent depletion by proteolytic degradation [17,37,38]. A salient feature of the results presented here, is that 4-O-me-TPA, which was able to deplete the activity of PKC 1, was hardly able to activate it. It is also interesting that one of the forms whose activity is markedly decreased by treatment with TPA is peak 1b (α -sequence) which is particularly resistant to calpain action [15].

Regarding the loss in activity of PKC 2; it may well be secondary to its activation, since this form of PKC exhibited the same order of potency of phorbol esters of activation *in vitro* or depletion *in vivo*. Furthermore, the comparatively slow time-course could be reasonably explained by such a process.

It is noteworthy that Cooper et al. [26] reported that a type II (β -sequence) activity persists after TPA treatment and that there appears to be preferential loss of type III (α) isozyme activity. In our system, peak 1a, identified as type II (β -sequence) isozyme, was also unaffected by TPA, whereas peak 1b, identified as PKC III (α -sequence), also disappears preferentially.

In summary, our data show marked differences in the effect of phorbol ester treatment on the activity of PKC isoforms. It is clear that in hepatocytes the decrease of PKC activity is a very complex phenomenon that may involve several processes. The elucidation of

them is of importance considering the key role that PKC plays in modulating metabolism and the hormonal responsiveness of these cells.

Acknowledgements

This research was partially supported by Grants from CONACYT (P228CCOX 891590) and DGAPA (IN-021869). The authors thank Ms. Guadalupe Ramirez for skillfully typing the manuscript and Dr. Diego González for letting us use his equipment and for his advice with the immunoblots. M. R.-F. is a Fellow from CONACYT (54397). J.A.G.-S. dedicates this paper to his former advisor John N. Fain on the 30th Anniversary of the obtention of his PhD degree.

References

- 1 Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. and Nishizuka, Y. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7601-7609.
- 2 Nishizuka, Y. (1980) *Science* 208, 305-311.
- 3 Huang, K.P., Nakabayashi, H. and Huang, F.L. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8535-8539.
- 4 Huang, F.L., Yoshida, Y., Nakabayashi, H., Kropf, J.L., Young III, W.S. and Huang, K.P. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 15714-15720.
- 5 Ono, Y., Kikkawa, U., Ogita, K., Fujii, T., Kunikida, T., Asaka, Y., Sekiguchi, K., Ase, K., Igarashi, K. and Nishizuka, Y. (1987) *Science* 236, 1116-1120.
- 6 Sekiguchi, K., Tsukuda, M., Ase, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1988) *J. Biochem.* 103, 759-765.
- 7 Ohno, S., Akita, Y., Konno, Y., Imajoh, S. and Suzuki, K. (1988) *Cell* 53, 731-741.
- 8 Kosaka, Y., Ogita, K., Ase, K., Nomura, H., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 973-981.
- 9 Nield, J.E., Kuhn, L.J. and Vanderbark, G.R. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 36-40.
- 10 Ashendel, C.L., Staffer, J.M. and Bourwell, R.K. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111, 340-345.
- 11 Kikkawa, U., Kishimoto, A. and Nishizuka, Y. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58, 31-44.
- 12 Nishizuka, Y. (1988) *Nature* 334, 661-665.
- 13 Houweling, M., Vazirjee, W.J. and Van Golde, L.M.G. (1989) *FEBS Lett.* 247, 487-491.
- 14 Huang, K.P., Zwiler, J., Vincendon, G., Mahiya, A., Rogue, P., Labatutette, G., Masmoudi, A., Yoshida, Y. and Huang, F.L. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 4161-4165.
- 15 Kishimoto, A., Mikawa, K., Hashimoto, K., Yoshida, I., Tanaka, S., Tomiyagi, M., Kusuda, T. and Nishizuka, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 4068-4092.
- 16 Kraft, A.S. and Anderson, W.B. (1983) *Nature* 301, 621-623.
- 17 Rodríguez Peña, A. and Ruvignani, E. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 1053-1059.
- 18 Ase, K., Berry, M., Kikkawa, U., Kishimoto, A. and Nishizuka, Y. (1986) *FEBS Lett.* 206, 396-400.
- 19 Cochet, C., Souvignat, C., Keramidas, M. and Chambay, E.M. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134, 1031-1037.
- 20 Vazirjee, W.J., De Haas, C.G.M. and Van der Berg, S.G. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136, 1328-1333.
- 21 Herráiz-Sotomayor, S.M.T. and García-Sainz, J.A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 968, 138-141.
- 22 Feramisco, J.R. and Burridge, K. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1194-1199.

- 23 Berry, M.N. and Friend, D.A. (1969) *J. Cell. Biol.* 43, 506-520.
- 24 Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- 25 Azhar, S., Butte, J. and Reaven, E. (1987) *Biochemistry* 26, 7047-7057.
- 26 Cooper, D.R., Watson, J.E., Acevedo-Duncan, M., Pollet, R.J., Standaert, M.L. and Farese, R.V. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 327-334.
- 27 Erustalimsky, J.D., Friberg, I. and Rozengurt, E. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 19188-19194.
- 28 Stabel, S., Rodriguez-Pena, A., Young, S., Rozengurt, E. and Parker, P.J. (1987) *J. Cell Physiol.* 130, 111-117.
- 29 Young, S., Rothbard, J. and Parker, P.J. (1988) *Eur. J. Biochem.* 173, 247-252.
- 30 Borner, C., Eppenberger, U., Wyns, R. and Fabbro, D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2110-2114.
- 31 Helper, J.R., Earp, H.S. and Harden, T.K. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 7610-7619.
- 32 Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7847-7851.
- 33 Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4868-4871.
- 34 Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. and Nishizuka, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 6927-6932.
- 35 Housey, G.M., O'Brian, C.A., Johnson, M.D., Kirschmeier, P. and Weinstein, I.B. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1065-1069.
- 36 Kaibuchi, K., Fukumoto, Y., Oka, N., Takai, Y., Arai, K. and Maramatsu, M. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 13489-13496.
- 37 Kishimoto, A., Kajikawa, N., Shiota, M. and Nishizuka, Y. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 1150-1164.
- 38 Von Ruecker, A.A., Rao, G. and Bidlingmaier, F. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 997-1003.

RATAS WISTAR, DATOS NO PUBLICADOS

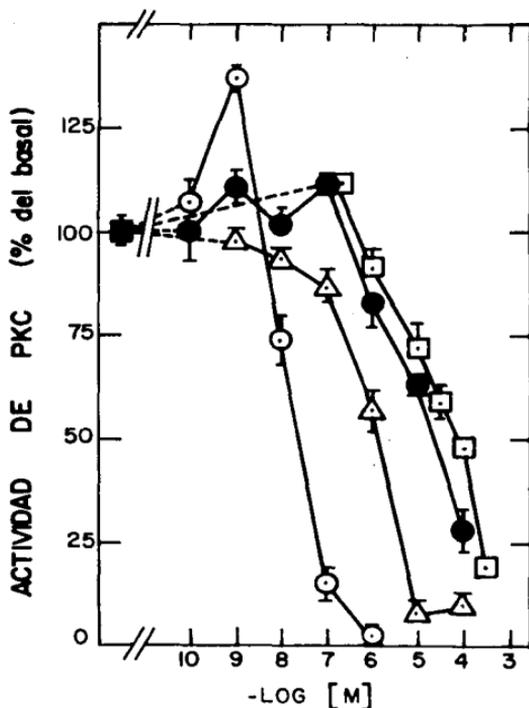


FIGURA 1. Desaparición de la actividad de PKC 1 en función de la concentración de éster de forbol o de dioleína durante la incubación *in vitro*. El extracto crudo de hepatocitos de ratas Wistar se incubó a 4°C durante 15 minutos en presencia o ausencia de las concentraciones indicadas de los diferentes agentes. Posteriormente se purificó parcialmente la PKC 1 por cromatografía en DEAE-celulosa y se determinó la actividad de la enzima. Las líneas representan el error estándar de la muestra de siete experimentos usando diferentes preparaciones celulares. ■, control; ○, TPA; ●, PDBu; △, 4-O-Me-TPA y □ dioleína.

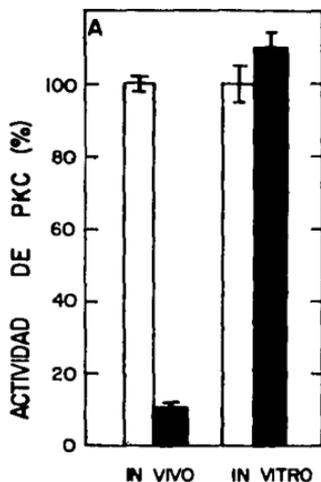


FIGURA 2. Pérdida de actividad de PKC en extractos crudos obtenidos de hepatocitos incubados con $1\mu\text{M}$ TPA *in vivo* o *in vitro*. En los experimentos *in vivo*, se incubó con (■) o sin TPA (□) a los hepatocitos recién aislados, por 15 min. a 37°C con agitación; posteriormente se lavaron y homogenizaron para obtener el extracto crudo, del que se tomaron alícuotas para determinar la actividad de PKC. En los experimentos *in vitro*, se homogenizó primero a los hepatocitos para obtener el extracto crudo, y a éste se le incubó en presencia (■) o ausencia (□) de $1\mu\text{M}$ TPA por 15 minutos, después de los cuales se tomaron alícuotas para determinar la actividad de la PKC.

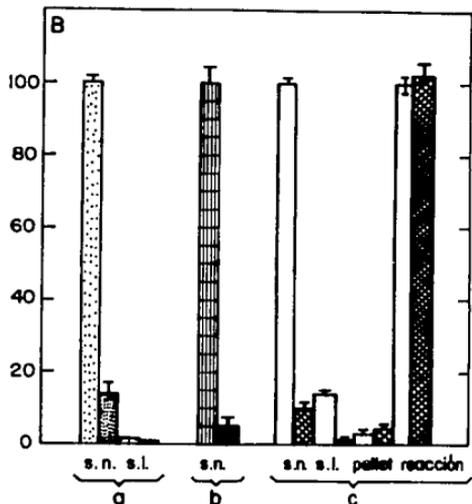
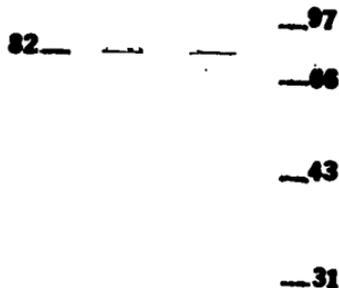


FIGURA 3. Pérdida de actividad inducida por incubación *in vitro* con $1\mu\text{M}$ TPA. El éster de forbol fue agregado en diferentes pasos de la purificación parcial de PKC usando tres sistemas cromatográficos distintos: fenilsulfonata (a), hidroxilapatita (b) y DEAE-celulosa (c). S.n. indica que el TPA se agregó (barras oscuras) o no (barras blancas) *in vitro* al sobrenadante obtenido por centrifugación del homogenado de hepatocitos. S.l. indica que se tomó alícuota (dilución 1:1 con buffer) de la resina que quedó en las columnas cargadas con extracto crudo incubado (barras oscuras) o no (barras blancas) con TPA. Pellet indica que se tomó alícuota del pellet resuspendido en buffer, obtenido de centrifugar el homogenado de hepatocitos control (barra blanca) o tratados con TPA (barra oscura). S.l. indica que el TPA se agregó (barra oscura) o no (barra blanca) hasta el momento de determinar la actividad de PKC.



TPA C

FIGURA 4. Identificación por Inmunotransferencia de la proteína cinasa C de hepatocitos tratados con o sin $1\mu\text{M}$ TPA. La PKC de los hepatocitos incubados in vivo con o sin TPA se obtuvo por purificación parcial en cromatografía en DEAE-celulosa y en hidroxilapatita. Alícuotas de la fracción correspondiente a PKC a se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa. La detección de PKC a se realizó utilizando anticuerpo monoclonal anti-PKC α y anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina. Se indica la posición de los estándares de peso molecular y de la PKC. La cantidad de proteína en cada carril fue de 25 μg y el resultado es representativo de cinco experimentos independientes.

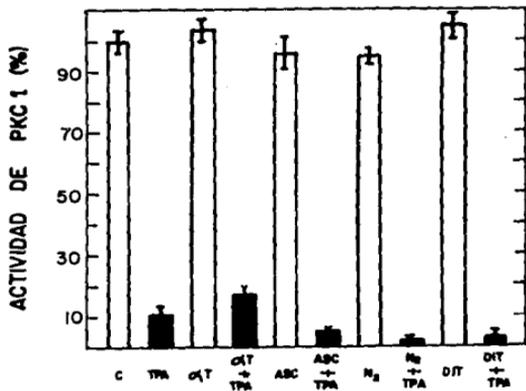


FIGURA 5. Efecto de varios agentes antioxidantes sobre la actividad de PKC. Se incubó el extracto crudo de hepatocitos durante 15 minutos *in vitro* con o sin los agentes antioxidantes en presencia o ausencia de 1 μ M TPA. Posteriormente se purificó parcialmente a la PKC por cromatografía en DEAE-celulosa, y se determinó la actividad de la enzima. C, control; TPA, tetradecanoil-forbol-acetato; α T, α -tocoferol; Asc, ascorbato de sodio; N₂, nitrógeno; DIT, ditionita.

**"MODULATION BY PROTEIN KINASE C OF THE HORMONAL RESPONSIVENESS
OF HEPATOCYTES FROM LEAN (Fa/fa?) AND OBESE (fa/fa) ZUCKER RATS".**

J. Adolfo García-Sáinz^a, Rocío Alcántara-Hernández^a, Martha Robles-Flores^a, Ma. Eugenia Torres-Márquez^{a,b}, Duna Massillon^c, Borhane Annabi^c and Gérald van de Werve^{c,d}.

^a Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México; Apartado Postal 70-248, 04510 México D. F.

^b Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano 1, México D. F.

^c Department of Biochemistry and

^d Department of Nutrition, Laboratoire d'Endocrinologie Métabolique, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

Key words: Obese zucker rats.

α_1 -adrenergic.

Protein kinase C.

Cyclic AMP accumulation.

Correspondence should be sent to:

J. Adolfo García-Sáinz,
Inst. Fisiol. Celular, UNAM
Ap. Postal 70-248
04510 México D. F.
Tel: (525) 550 5894
FAX: (525) 548 0387

SUMMARY

The effect of phorbol myristate acetate (PMA) on the hormonal responsiveness of hepatocytes from lean and obese Zucker rats was studied. Phenylephrine-stimulated phosphatidylinositol labeling and phosphorylase activation were antagonized by PMA in cells from obese and lean animals; bigger residual effects were observed in cells from obese animals even at high PMA concentrations. Cyclic AMP accumulation induced by isoproterenol, glucagon, forskolin and cholera toxin was higher in cells from lean animals than in those from obese rats. PMA diminished glucagon- and cholera toxin-induced cyclic AMP accumulation; cells from lean animals were more sensitive to PMA. Two groups of isoforms of protein kinase C (PKC) were observed in hepatocytes from Zucker rats using DEAE-cellulose column chromatography: PKC 1 and PKC 2. The PKC 1 isozymes were separated into four peaks using hydroxylapatite: aa, la (PKC-B), lb (PKC- α) and lc. Short treatment with PMA decreased the activity of PKC 1 (peaks lb (PKC- α) and lc) and to a lesser extent of PKC 2; cells from lean animals were more sensitive to PMA than those obtained from obese rats.

Our results indicate that cells from genetically obese Zucker rats are in general less sensitive to this activator of protein kinase C than those from their lean littermates. The possibility that alterations in the phosphorylation dephosphorylation cycles, that control metabolism and hormonal responsiveness, may contribute to this obese state is suggested.

INTRODUCTION

Protein kinase C (PKC) modulates the cellular responsiveness to hormones by participating in regulatory feedback loops and in the cross-talk between different signal transduction systems [1-3]. Among its substrates are receptors, G-proteins and membrane effectors [1-3]. PKC is activated physiologically by the second messenger diacylglycerol and pharmacologically by active phorbol esters such as phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) [1].

In rat liver cells, activation of PKC by PMA leads, among other effects, to inactivation of glycogen synthase [4], blockade of alpha₁-adrenergic actions [5-7], heterologous desensitization of adenylate cyclase via inhibition of G_s activity [8,9], blockade of G_i function (inhibition of adenylate cyclase by low concentrations of Gpp(NH)p) via phosphorylation of α G_i-2 [10] and a rapid loss of PKC activity [11].

Mature genetically obese (fa/fa) Zucker rats exhibit insulin resistance which is expressed in several tissues such as muscle, adipose tissue and liver [12] and it is associated to a deficient action of PKC [13,14]. In liver cells from obese animals the properties of PMA to counteract phenylephrine-mediated activation of phosphorylase and to inactivate glycogen synthase are attenuated [14]. We further characterized this phenomenon by studying several of the known actions of PKC in hepatocytes; our results show a decreased sensitivity to PMA in liver cells from obese (fa/fa) animals.

MATERIALS AND METHODS

Lean (Fa/fa?) and obese (fa/fa) Zucker rats were purchased from Charles River. Animals were 10-20 weeks old at the time of the experiment. Hepatocytes were isolated and incubated as previously described [6,14]. Glycogen phosphorylase activity was assayed at 30°C in homogenates of thawed cell suspensions as described by Hue et al [15]. Labelling of phosphatidylinositol (PI) with [³²P]Pi was carried out as described previously [6]. Cyclic AMP was determined in cells plus medium by the method of Brown et al [16]; in these experiments the cells were incubated for 2 min with the agents and in the presence of 0.1 mM methyl isobutyl xanthine (MIX) to inhibit phosphodiesterase activity.

PKC activity was assayed by measuring the incorporation of ³²P from [γ -³²P]ATP into HI-IIIS histone [11]; the procedures for homogenization, DEAE-cellulose and hydroxyapatite column chromatography, SDS-PAGE and immunoblotting were performed as previously described in detail [11].

RESULTS

One of our groups previously showed that in hepatocytes from obese animals the activation of phosphorylase by phenylephrine was only partially blocked by PMA, in contrast to the almost complete blockade that this active phorbol ester induces in cells from lean animals [14]. This was also found performing the experiments in the presence of 10 μ M propranolol (data not shown). Phenylephrine

(10 μ M) in the presence of 10 μ M propranolol increased the labeling of PI both in cells from lean or obese animals; (180 ± 30 and $220 \pm 10\%$ of basal labeling, respectively; means \pm S.E.M., n = 5 and 6 respectively). PMA antagonized the effect of phenylephrine in cells from obese or lean animals; the dose-response curves were not very different although at 1 μ M PMA a consistently higher residual effect of the agonist was observed in cells from obese rats than in those from lean animals ($27 \pm 5\%$ and $6 \pm 5\%$ of the effect of 10 μ M phenylephrine; means \pm S.E.M. n=6 and 5, respectively).

Isoproterenol increased cyclic AMP accumulation in cells from lean rats but no clear increase in cyclic AMP accumulation was observed in cells from obese animals (Fig. 1). The beta-adrenergic agonist activated glycogen phosphorylase a activity similarly both in cells from lean or obese rats (data not shown).

The accumulation of cyclic AMP induced by glucagon was consistently decreased in hepatocytes from obese rats as compared to cells from lean animals (Fig. 2). Again the activation of phosphorylase by glucagon was not different between the two groups (data not shown) Similarly, the effects of forskolin and cholera toxin on cyclic AMP accumulation were decreased in cells from obese rats (see legend of Fig. 3). PMA decreased the accumulation of cyclic AMP induced by cholera toxin or glucagon more and at lower concentrations in cells from lean animals than in those from obese ones (Fig. 3). The effect of forskolin was not altered by PMA in agreement with our previous findings [9].

Two main groups of PKC isozymes have been detected in Wistar rat hepatocytes using DEAE-cellulose: PKC 1 and PKC 2 [11]. In whole cell extracts obtained from hepatocytes from Zucker rats, these two groups of PKC isozymes were also present (results not shown); the absolute values of PKC 1 and PKC 2 activity were somewhat variable from animal to animal but in general were similar in cells from obese or lean rats for PKC 1 and slightly higher (approx. 2-fold) in the cells from obese rats for PKC 2 (Fig. 4, figure legend).

In hepatocytes from Wistar rats, PMA induces a rapid loss of activity of PKC 1 and a smaller loss of PKC 2 [11]. We confirmed this finding using liver cells from Zucker rats and further observed that cells from lean rats were more sensitive to PMA than hepatocytes from obese animals (Fig. 4).

In cells from Wistar rats the isozymes in the PKC 1 peak can be resolved using hydroxyapatite column chromatography into three peaks 1a, 1b and 1c; we identified peak 1a as PKC- β and peak 1b as PKC- α [11]. Treatment with PMA provoked a loss of activity of peaks 1b (PKC- α) and 1c whereas peak 1a (PKC- β) activity was not affected [11]. PKC 1 of hepatocytes obtained from Zucker rats can be separated into four peaks using hydroxyapatite column chromatography: peaks 1a, 1b and 1c (those previously observed in cells from Wistar rats [11]) and another small peak that we have named 1a (Fig. 5). This pattern was very similar in cells obtained from obese and lean rats (Fig. 5). We attempted to determine if the decrease in PKC 1 sensitivity could be associated to specific

isoforms. For this purpose cells were incubated in the absence or presence of 10 nM PMA (a concentration at which the difference in sensitivity between cells from obese and lean animals is marked; see Fig. 5). In cells from lean rats PMA induced marked decreases in the activity of peaks 1b (44 ± 4 % of the activity in the absence of PMA) and 1c (48 ± 4 % of the activity in the absence of PMA) but no change was observed in peaks 1aa or 1a (105 ± 10 and 126 ± 11 % of the activities in the absence of PMA, respectively) (Fig. 5). In cells from obese rats 10 nM PMA failed to significantly decrease the activity of any of the PKC 1 peaks (aa, 105 ± 11 ; 1a, 109 ± 20 ; 1b, 90 ± 2 and 1c, 95 ± 2 % of the activities observed in the absence of PMA; results are the means + S.E.M. of three experiments in triplicate using different cell preparations) (Fig. 5). Using isoform-specific monoclonal antibodies we performed immunoblots of the isoforms; peak 1a was identified as PKC- β and peak 1b as PKC- α (Fig. 6), in agreement with our previous data [11]; peaks aa and 1c were not recognized by these antibodies (Fig. 6) [11].

DISCUSSION

In the present study we examined obese (fa/fa) Zucker rats in comparison with lean (Fa/fa?) animals. The genetic lesion responsible for the obese condition is unknown, but in association with insulin resistance, a defect in PKC activation has been suggested [13,14].

Van de Werve and Massillon [14] observed previously that PMA

blocked the activation of phosphorylase by phenylephrine in cells from lean animals, but only partially did it so, in hepatocytes from obese rats. In the studies on alpha₁-adrenergic stimulation of PI labeling we observed a residual adrenergic action in cells from obese rats, in spite of the presence of relatively large concentrations of PMA. However, this residual effect was not as dramatic as in the metabolic studies. It is well known that only a small increase in IP₃ is required to maximally increase cytosol Ca²⁺ [20]. Therefore, it is possible that a small residual second messenger generation could be sufficient to elicit a large metabolic response. A similar situation may explain the paradoxical lack of correlation between cyclic AMP accumulation and phosphorylase activation by isoproterenol and glucagon.

The possibility that beta-adrenoceptors could be responsible for the only partial blockade of phenylephrine action by PMA in cells from obese rats was considered. This was specially important since it is known that the obese Zucker rats suffer from hypothyroidism [17] and hepatocytes from hypothyroid rats usually have an increased beta-adrenergic responsiveness [18,19]. However, the results ruled out this possibility.

The decreased cyclic AMP accumulation in response to agents that activate adenylate cyclase (such as isoproterenol, glucagon, forskolin and cholera toxin) in cells from obese animals, indicate a general post-receptor defect but do not allow us to distinguish if it involves G_s, the catalytic subunit or both. Previously, Houslay and coworkers [21] have studied this matter and suggested

that abnormalities in the level of expression of the 52 KDa forms of the alpha subunit of Gs give rise to an altered coupling between receptors and adenylate cyclase in liver membranes from obese Zucker rats.

In our present study and in that of Houslay et al [21] a decreased production of cyclic AMP in response to glucagon was shown in obese rats. However, while we recognized a decrease in maximal effect, these authors observed a decrease in the K_a in basal conditions [21]. Interestingly, they [21] also reported that treatment with pertussis toxin magnified the effect of glucagon in membranes from lean animals but not in those from obese ones; data similar to ours. Later studies by this group [10] elegantly showed that this difference is due to the activities and basal states of phosphorylation of alpha-Gi-2 in liver membranes from obese and lean rats. It should be mentioned that in our studies we measured cyclic AMP accumulation in whole cells whereas Houslay et al [21] assayed adenylate cyclase activity in isolated membranes. Therefore, it is possible that a different participation of Gi under these conditions could explain the difference observed.

In the present study, using hepatocytes from Zucker rats, we confirmed: a) the ability of PMA to decrease glucagon- and cholera toxin-stimulated cyclic AMP accumulation [8,9]; b) the rapid PMA-induced decrease in PKC 1 activity due to diminution in activity of some PKC isozymes, i.e., peaks 1b (PKC- α) and 1c, [11].

It is important to mention here that in hepatocytes from

obese Zucker rats there is evidence for changes in the activity of a protein phosphatase (glycogen synthase phosphatase) [22,23]. Phosphorylation/dephosphorylation cycles are among the most powerful biochemical mechanisms that control cellular functions [24] and the state of phosphorylation of a given protein depends on the balance of the two activities (kinases/phosphatases) both of which could be affected in obese rat liver cells.

Secondary action(s) on various factors, including among others, covalent modification of PKC, presence of inhibitors, differences in the PKC substrates, in permeability to PMA and in the availability of cofactors could also participate in the decreased sensitivity to this tumor promoter found in hepatocytes obtained from obese animals.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ms. Guadalupe Ramirez for typing the manuscript. This research was partially supported by Grants from DGAPA (IN201889) and CONACYT (0310-N9107) to J.A.G.-S. and by Grant MT 10804 from the Medical Research Council of Canada to G. v.d.W.

REFERENCES

- 1 Nishizuka, Y. (1986) *Science* 233, 305-312
- 2 Houslay, M.D. (1991) *Eur. J. Biochem.* 195, 9-27
- 3 García-Sáinz, J.A. (1991) *News Physiol. Sci.* 6, 169-173
- 4 Roach, P.J. and Goldman, M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7170-7172
- 5 Corvera, S. and García-Sáinz, J.A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1128-1133
- 6 Corvera, S., Schwarz, K.R., Graham, R.M. and García-Sáinz, J.A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 520-526
- 7 Van de Werve, G., Proietto, J. and Jeanrenaud, B. (1985) *Biochem. J.* 231, 511-516
- 8 Heyworth, C.M., Whetton, A.D., Kinsella, A.R. and Houslay, M.D. (1984) *FEBS Lett.* 170, 38-42
- 9 Hernández-Sotomayor, S.M.T. Macías-Silva, M., Malbon, C.C. and García-Sáinz, J.A. (1991) *Am. J. Physiol.* 260, C259-C265
- 10 Bushfield, M., Pyne, N.J. and Houslay, M.D. (1990) *Eur. J. Biochem.* 192, 537-542
- 11 Robles-Flores, M., Alcántara-Hernández, R. and García-Sáinz, J.A. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1094, 77-84
- 12 Jeanrenaud, B., Halimi, S. and van de Werve, G. (1985) *Diabetes Metab. Rev.* 1, 261-291
- 13 Van de Werve, G., Zaninetti, D., Lang, U., Vallotton, M.B. and Jeanrenaud, B. (1987) *Diabetes* 36, 310-314
- 14 Van de Werve, G., and Massillon, D. (1990) *Biochem. J.* 269, 795-799
- 15 Hue, L., Bontemps, F. and Hers, H.G. (1975) *Biochem. J.* 152, 105-114
- 16 Brown, B.L., Albano, J.D.M., Ekins, P. and Sgherzi, A.M. (1971) *Biochem. J.* 121, 561-562
- 17 Bray, G.A. and York, D.A. (1971) *Endocrinol.* 88, 1095-1099
- 18 Malbon, C.C., Lis, S.-Y. and Fain, J.N. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 671-678

- 19 García-Sáinz, J.A., Huerta-Bahena, M.E. and Malbon, C.C. (1989)
Am. J. Physiol. 256, C384-C389
- 20 Charest, R., Prpic, V., Exton, J.H. and Blackmore, P.F. (1985)
Biochem. J. 227, 79-90
- 21 Houslay, M.D., Gawler, D.J. Milligan, G. and Wilson, A. (1989)
Cell. Signal. 1, 9-22
- 22 Margolis, R.N. (1987) Life Sci. 41, 2615-2622
- 23 Lavoie, L., Bollen, M., Stalmans, W. and van de Werve, G. (1991)
Endocrinology 129, 2674-2678.
- 24 Cohen, P. (1985) Nature 296, 613-620

FIGURE 1

EFFECT OF ISOPROTERENOL ON CYCLIC AMP ACCUMULATION. Hepatocytes from lean (open triangles) or obese (closed circles) rats were incubated in the presence of 0.1 mM MIX and different concentrations of isoproterenol for 2 min. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 5-7 experiments in duplicate using different cell preparations. Basal cyclic AMP accumulations were 1.10 ± 0.10 and 1.25 ± 0.10 pmol/mg cells wet weigh for hepatocytes from lean and obese animals, respectively (mean \pm S.E.M., n=7 in each case)

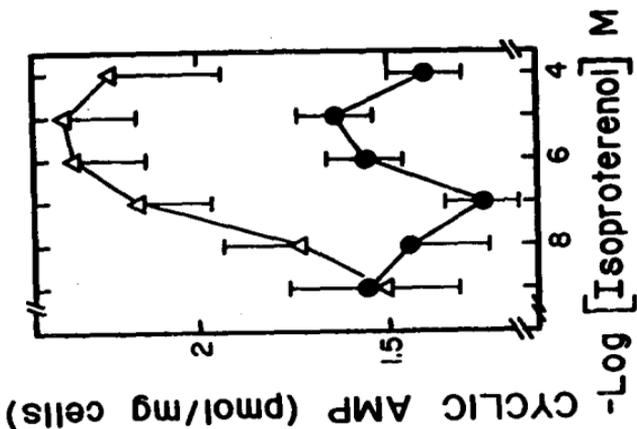


FIGURE 2

EFFECT OF GLUCAGON ON CYCLIC AMP ACCUMULATION. Hepatocytes from lean (open triangles) or obese (closed circles) rats were incubated in the presence of 0.1 mM MIX and different concentrations of glucagon for 2 min. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 5-7 experiments in duplicate using different cell preparations. Basal values as in Fig. 1.

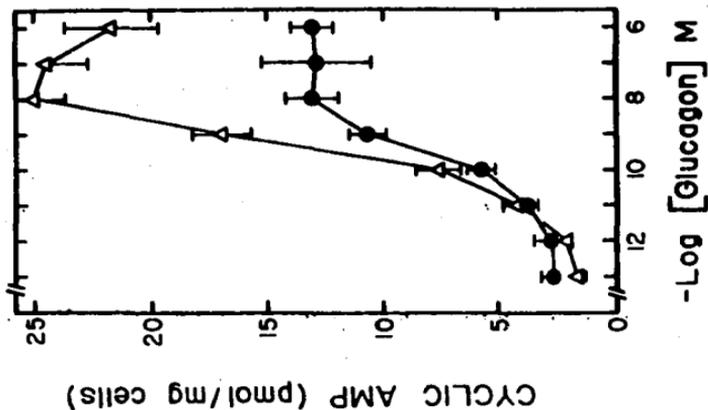


FIGURE 3

EFFECT OF PMA ON THE CYCLIC AMP ACCUMULATION INDUCED BY CHOLERA TOXIN OR GLUCAGON. Hepatocytes from lean (open triangles) or obese (closed circles) rats were incubated in the presence of 0.1 mM MIX and with either 1 μ g/ml cholera toxin and different concentrations of PMA for 30 min or with PMA for 30 min and 10 nM glucagon for the last 2 min of the 30 min incubation. Cyclic AMP accumulations were in the absence of PMA: cholera toxin 16.00 ± 0.90 (lean and 11.40 ± 0.80 (obese); glucagon 18.10 ± 0.70 (lean) and 13.20 ± 1.30 (obese). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 5-6 experiments in duplicate using different cell preparations.

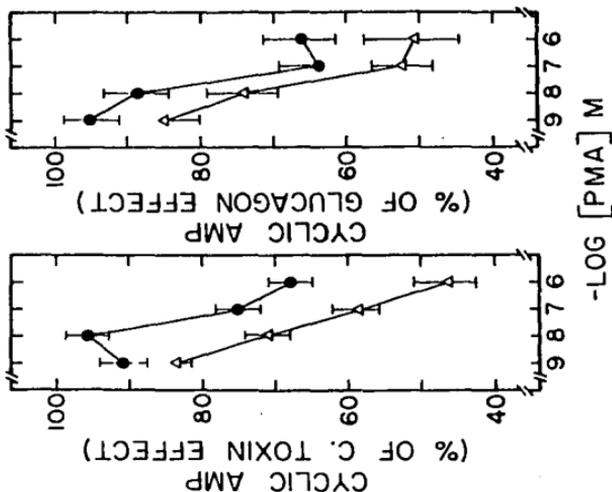


FIGURE 4

EFFECT OF IN VIVO TREATMENT WITH PMA ON PROTEIN KINASE C ACTIVITY. Hepatocytes from lean (open triangles) or obese (closed circles) rats were incubated for 15 min with the concentration of PMA indicated. PKC 1 (left panel) and PKC 2 were separated using DEAE-cellulose column chromatography and activity was assayed as indicated in Materials and Methods. Basal activities were as follows: lean PKC 1, 4.7 ± 0.6 ; lean PKC 2, 1.3 ± 0.2 ; obese PKC 1, 3.9 ± 0.4 ; obese PKC 2, 2.8 ± 0.7 pmol/mg cells wet weight. Results are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 7 experiments performed in triplicate using different cell preparations.

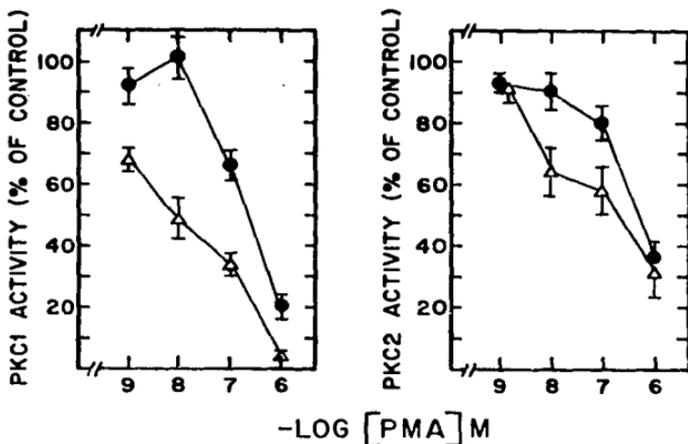


FIGURE 5

SEPARATION OF ISOZYMIC FORMS OF PKC ζ 1 BY HYDROXYAPATITE COLUMN CHROMATOGRAPHY. Cells from lean (panels A and B) or obese (panels C and D) rats were incubated in the absence (panels A and C) or presence of 10 nM PMA (panels B and D), PKC ζ 1 was obtained and subjected to hydroxyapatite column chromatography. The data is representative of 6-7 experiments obtaining similar results.

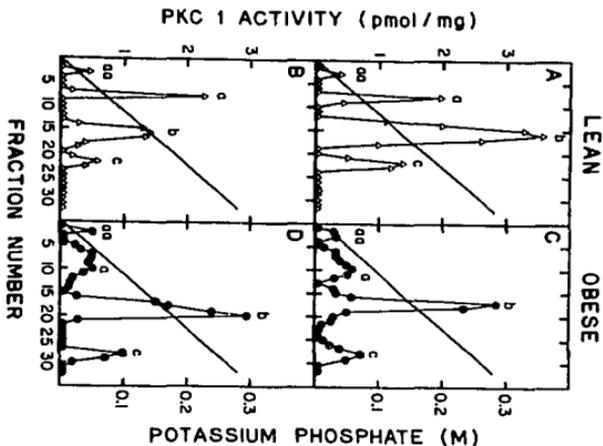
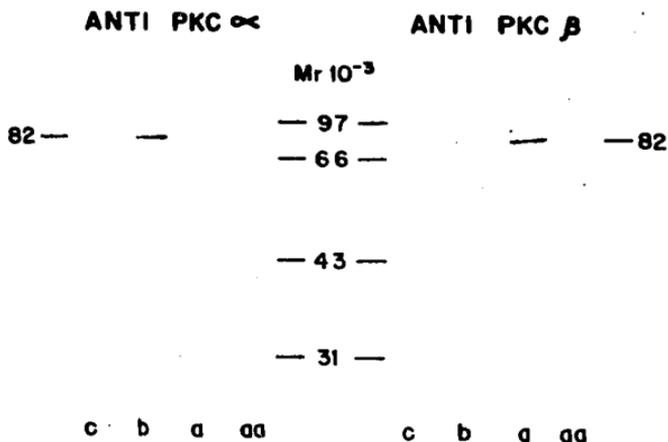


FIGURE 6

IDENTIFICATION OF PKC ISOENZYMES BY IMMUNOBLOTTING. Fractions obtained from the hydroxyapatite column chromatography were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Immunoblot was done with monoclonal antibodies against type α or type β enzyme and developed with alkaline phosphatase-conjugated second antibody. The result shown is representative of three experiments.



VII. RESUMEN DE RESULTADOS

De acuerdo a los objetivos planteados, los resultados obtenidos pueden sintetizarse de la siguiente manera:

Se encontraron dos formas de proteína cinasa C en hepatocitos de ratas Wistar o Zucker, usando cromatografía en DEAE-celulosa: un gran pico de actividad, denominado PKC 1, que eluye a 0.08 M NaCl, y otro más pequeño, PKC 2, que eluye a 0.25 M NaCl (trabajo 1). La pre-incubación de las células durante 15 minutos con $1\mu\text{M}$ de tetradecaniloí-forbol-acetato (TPA), produjo una gran pérdida de actividad del pico 1 (90%), mientras que el pico 2 disminuyó solamente en un 40% (trabajo 1).

La resolución por separado de estas dos formas de PKC en cromatografía en hidroxapatita, mostró que la PKC 1 de ratas tanto Wistar como Zucker está compuesta por 3 picos distintos 1a, 1b y 1c, aunque en las ratas Zucker se resolvió además otro pico adicional pequeño denominado aa (trabajos 1 y 2). PKC 2, a su vez, se resolvió en 4 formas distintas 2a, 2b, 2c y 2d (trabajo 1). El análisis por inmunotransferencia con anticuerpos monoclonales isozima-específicos, identificó al pico 1a como PKC- β y al pico 1b como PKC- α ; los otros picos de actividad no se identificaron (trabajos 1 y 2).

El perfil de elución obtenido en hidroxapatita de las células tratadas con $1\mu\text{M}$ TPA indicó que éste disminuyó selectivamente la actividad de los picos 1b (PKC- α) en un 93%, 1c en un 98%, y 2d, en 50%, pues todas las demás isoformas no fueron afectadas (trabajo 1). La pérdida selectiva de la actividad de estas isozimas se comprobó también en los hepatocitos de ratas Zucker delgadas tratadas con 10 nM TPA, pero a esta concentración, no ocurrió desaparición de actividad de ninguna de las isozimas de PKC 1 de las ratas obesas (trabajo 2).

El análisis de las acciones conocidas de PKC en hepatocitos de ratas normales, en comparación con las de ratas genéticamente obesas con una supuesta acción deficiente de PKC, mostró que en estos animales obesos existe una sensibilidad disminuida a TPA como fenómeno generalizado y no como el resultado de un defecto en una isozima específica, lo que quedó manifiesto en los siguientes resultados: I) la habilidad del TPA para antagonizar el recambio de fosfatidilinositol mediado por fenilefrina, está atenuada, II) la acumulación de AMPc inducida por isoproterenol, glucagon, forskolina y toxina del cólera es mayor en células de animales delgados que en obesos, y la capacidad del TPA para disminuir estos niveles de AMPc estimulados por glucagon y toxina del cólera, es también menor en hepatocitos de ratas obesas, III) la pérdida rápida de la actividad de PKC 1 y de PKC 2 inducida por TPA fue siempre menor en los animales obesos, aun con las concentra-

ciones más altas utilizadas (trabajo 2).

En cuanto al objetivo de investigar cómo ocurre el efecto de desaparición de la actividad de PKC que producen los ésteres de forbol, se obtuvieron los siguientes resultados:

El proceso ocurrió de manera tiempo y dosis dependiente (trabajos 1 y 2). Sin embargo, los dos grupos de isoformas, PKC 1 y PKC 2, exhibieron marcadas diferencias en su modo de "down-regulation", pues los cursos temporales, el grado de disminución de la actividad, así como el orden de potencia de los diferentes ésteres de forbol para inducir la pérdida de actividad, fue diferente para cada grupo (trabajo 1).

También se encontró que, mientras que PKC 2 muestra exactamente el mismo orden de potencia de ésteres de forbol tanto para su activación como para su desaparición, PKC 1 en cambio, muestra órdenes de potencia distintos, sugiriendo que los fenómenos de activación y de desaparición de PKC 1 pueden no estar causalmente relacionados.

Finalmente, con respecto al objetivo de conocer por qué ocurre el efecto de los ésteres de forbol sobre la actividad de PKC, se observó que:

- La pérdida de actividad inducida por TPA no es un artefacto de la purificación de PKC en DEAE-celulosa, pues ocurre con otros sistemas cromatográficos, y también *in vitro*, de manera dosis-dependiente y con el mismo orden de potencia de los ésteres de forbol que se obtuvo *in vivo* (figuras 1, 2 y 3 de datos no publicados). Sin embargo, la pérdida de actividad inducida por TPA *in vitro*, no se produce si se adiciona el éster de forbol al extracto crudo (figura 2 de datos no publicados), ni tampoco si se agrega directamente en la reacción de determinación de actividad de PKC (figura 3 de datos no publicados).

- La desaparición aparente de la actividad de PKC (histona-cinasa) inducida por TPA se observó también usando otros sustratos tales como protamina o vinculina (tabla I del trabajo 1), pero no parece ocurrir por un cambio en el estado de fosforilación o de oxidación de la enzima (figuras 4 y 5 de datos no publicados, respectivamente).

VIII. DISCUSION

El objetivo central de la realización de esta tesis fue el de investigar la base molecular de la desaparición de la actividad de la proteína cinasa C inducida por ésteres de forbol, usando como modelo experimental al hígado de rata.

Para poder caracterizar los efectos que ocurren sobre la PKC, fue necesario inicialmente establecer la identidad y la cantidad de las isozimas expresadas en el hepatocito de rata. Como se mencionó en la discusión del trabajo 1, nuestros datos concuerdan con los reportados por otros autores (145-147) en estas células, en cuanto a la resolución de PKC en dos picos de actividad utilizando cromatografía en DEAE-celulosa, y en cuanto a que el primero de ellos, se resuelve en hidroxipatita en las isozimas α y β . Sin embargo, existen algunos aspectos sobresalientes de nuestros resultados distintos a los reportados por esos autores:

1. Al resolver PKC 1 en hidroxipatita, encontramos además de β y α , un tercer pico de actividad que eluye a mayor concentración de fosfato de potasio, de identidad desconocida, como habían encontrado antes Salman Azhar et al (147).

2. Encontramos que a 0.25M NaCl eluye de una columna de DEAE-celulosa actividad de proteína cinasa dependiente de Ca^{++} y de fosfolípido, que denominamos PKC 2. Esta fracción, ha sido reportada por varios investigadores (146-149). Sin embargo, la observación de que PKM (el fragmento catalítico de PKC derivado de su proteólisis) eluye en la misma posición, pues la actividad basal independiente de cofactores está frecuentemente aumentada en esta fracción, constituyó probablemente la causa por la cual estos autores no evaluaron la posibilidad de que en este pico co-eluyeran otras formas de PKC, dependientes de calcio y fosfolípido.

En nuestras manos, PKC 2 se resuelve en hidroxipatita en al menos 4 formas de PKC distintas, que parecen ser formas nativas de PKC, principalmente por las siguientes razones: I) Su actividad fue dependiente de la presencia de fosfatidilserina, dioleína o ésteres de forbol activos; II) Muestra el orden de potencia característico de los promotores de tumores para activar a PKC (TPA>PDBu). Esto indica con toda claridad que PKC 2 no puede ser PKM, pues ésta última carece del dominio regulatorio, el cual, como se ha demostrado, contiene las secuencias dedos de zinc, que son absolutamente indispensables para la unión de los ésteres de forbol y del DAG (98).

Los efectos que produce el tratamiento de las células con promotores de tumores sobre la proteína cinasa C, se estudiaron tanto de manera directa, evaluando los efectos a nivel de

la actividad de la enzima, como de manera indirecta, observando los efectos producidos en la respuesta hormonal mediada por la participación de PKC, en los hepatocitos de ratas Zucker.

Con respecto a la actividad de la PKC, se encontró que el TPA disminuye selectivamente la actividad de algunas de las isoformas de la cinasa en un lapso de tiempo muy corto: 15 minutos. Las actividades de PKC 1b, identificada como PKC- α , y de PKC 1c, prácticamente desaparecen, mientras que la actividad de PKC 1a, identificada como PKC- β , no se afecta. La rapidez con que ocurre el efecto producido en PKC contrasta con el tiempo normal reportado para la "down-regulation" (como desaparición total de la proteína inmunorreactiva) que es por lo general de varias horas. Sin embargo, estos resultados concuerdan con los reportados por Ase *et al* (96) en células KM3 y por Cochet *et al* (150) en fibroblastos de rata y células linfoides humanas, en cuanto a que varias especies de PKC co-expresadas en un mismo tipo celular desaparecen a diferente velocidad por tratamiento con TPA, y también en cuanto a que la pérdida de actividad inducida por el éster de forbol puede ser muy rápida (1 a 15 min).

Los dos picos de actividad de PKC obtenidos de DEAE-celulosa mostraron una farmacología diferente en la disminución de actividad inducida por ésteres de forbol, así como distintas velocidades de desaparición debido al tratamiento con ellos. Además, exhibieron diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad a los promotores de tumores, no sólo con respecto al grado de desaparición inducida por éstos, sino también, con respecto a la activación que los ésteres de forbol producen en las formas de PKC *in vitro*. En este sentido, es muy notable que el orden de potencia de los ésteres de forbol para inducir la pérdida de actividad de PKC 1 (TPA>O-Me-TPA>PDBu) no es el mismo que el de su activación *in vitro* (TPA>PDBu>O-Me-TPA y α -F), pues el derivado metilado del TPA, que produce una activación muy débil de PKC 1, es muy potente para inducir la desaparición de su actividad. Esto sugiere que en el caso de este grupo de isoformas de PKC, la activación y la pérdida de actividad no están causalmente relacionadas, en contraposición con la idea general de que la "down-regulation" se debe a la activación de PKC, con subsecuente desaparición de la actividad por degradación proteolítica.

La pérdida de actividad de PKC 2, por el contrario, podría ser secundaria a su activación, puesto que exhibe los mismos órdenes de potencia tanto para su disminución como para su activación *in vitro*. Además, el curso temporal de su desaparición, bastante más lento que el de PKC 1, podría ser explicado razonablemente por tal proceso.

En este trabajo se evaluó también el efecto del TPA sobre la respuesta hormonal mediada por la participación de la PKC, usando ratas Zucker, tanto delgadas (Fa/fa?) como obesas (fa/fa). Aunque no se conoce la lesión genética de la condi-

ción obesa, se ha sugerido, en asociación con resistencia a insulina, un defecto en la activación de la PKC (151). Además, se han reportado en estos animales alteraciones en el nivel de expresión de la proteína Gs (152) y en el estado de fosforilación de α GI-2 (129). Nuestros datos apoyan la existencia de un defecto post-receptor en el sistema acoplado a adenilato ciclasa, pues la acumulación de AMPc estimulada por isoproterenol, glucagon, toxina del cólera o forskolina, es menor en las células de ratas obesas que en las de delgadas. Sin embargo, nuestros resultados no nos permitieron distinguir si el defecto involucra a Gs, a la subunidad catalítica de adenilato ciclasa, o a ambas.

Adicionalmente, los resultados mostraron claramente que existe una menor sensibilidad a TPA en los hepatocitos de ratas obesas que no puede ser atribuida a un defecto en una isozima específica, sino que más bien se presenta como un fenómeno generalizado. Acciones secundarias sobre varios factores tales como la modificación covalente de PKC, la presencia de inhibidores, diferencias en permeabilidad al TPA, en la disponibilidad de cofactores, o en la actividad de fosfatasa, podrían explicar la disminución en sensibilidad al TPA mostrada por las ratas genéticamente obesas.

Como se mencionó en líneas anteriores, se conoce como "down-regulation" de PKC al proceso de desaparición que sufre la enzima como consecuencia de su activación y redistribución (82, 84, 86, 90, 95). La "down-regulation" de PKC mediada por éster de forbol ha sido detectada como: desaparición de actividad de unión a forbol dibutirato (153), desaparición de la banda proteica de 80 KDa inmunorreactiva (154), y desaparición de la actividad de PKC (96,150).

La idea general aceptada de este fenómeno es que los incrementos de Ca^{++} citoplásmico estimulados por hormonas promueven la asociación de PKC soluble con la membrana celular, donde la enzima encuentra a sus cofactores fosfolípidicos como fosfatidilserina (PSer). En este estado, se piensa que PKC está inactiva pero "cebada" para su activación, la que probablemente ocurre al unir DAG; la enzima activa es entonces más susceptible a proteólisis por las proteasas Ca^{++} -dependientes calpaína I y calpaína II, lo que lleva gradualmente a su desaparición.

Inherente a este modelo está la idea de que la redistribución de PKC a la membrana es un pre-requisito para la activación de la enzima. Sin embargo, se desconocen totalmente muchos aspectos de este proceso, tales como la relación precisa entre los eventos de activación y translocación, así como la naturaleza de la asociación enzima-membrana.

Existen evidencias que desafían el modelo expuesto: por ejemplo, en neuronas fetales de pollo, la insulina aumenta la actividad de PKC-e tanto en citosol como en membrana por un mecanismo que no involucra translocación de la enzima (155).

También, Trillivas et al (156) determinaron que la redistribución de PKC no es una buena medida de su activación al examinar la relación temporal y cuantitativa entre la redistribución y la fosforilación de sustratos de PKC específicos, pues observan que en células 1321N1 que expresan PKC- α , la redistribución de ésta inducida por activación de receptor es muy rápida (2-5 min), mientras que la fosforilación de sustratos es mucho más lenta y sostenida por 30 min.

Nuestros resultados son consistentes con la evidencia reportada de que los ésteres de forbol son selectivos para producir sus efectos. Llama la atención, que al igual que en nuestro sistema, en el que persiste la actividad de PKC- β (con puesta localización nuclear) y se pierde preferencialmente la actividad de PKC α , otros investigadores reporten en sistemas distintos una situación similar:

- En linfocitos T humanos, que expresan PKC α y β , Berry et al (157) muestran que la presencia prolongada de TPA resulta en la localización nuclear de PKC- β sin que ocurra su down-regulation, a diferencia de la que ocurre en PKC- α .
- En células HL60, PKC- α responde a PDBu translocándose y sufriendo down-regulation, mientras que PKC- β II responde mucho menos al éster de forbol en cuanto a estos efectos (105).
- En fibroblastos de rata y en células adrenocorticales y linfoides humanas, Cooper y su grupo (158) muestran que el tratamiento con TPA hace desaparecer la actividad de PKC- α pero no la de PKC- β .

En relación al fenómeno de "down-regulation", observado en nuestro sistema como pérdida de actividad de la PKC, existen varias posibilidades para explicar el por qué ocurre esto, las cuales fueron sujetos de experimentación en la realización de esta tesis:

1. El TPA induce una degradación de la PKC.

Existen varios reportes de que la proteína cinasa C, en presencia de sus activadores, o asociada a membrana, es más susceptible a proteólisis por las proteasas Ca⁺⁺ dependientes calpaina I y calpaina II (85, 130, 159-162).

Aunque nuestros resultados en los análisis por inmunotransferencia con anticuerpos monoclonales isoforma-específicos no permitieron la determinación de la cantidad relativa de PKC- α o de PKC- β , debido a que la disponibilidad de anticuerpo era limitada y desconocíamos entonces si la concentración utilizada saturaba o no los sitios de unión, o si estos anticuerpos se unían con el mismo nivel de afinidad, observamos consistentemente la presencia de una banda inmunoreactiva de 80 kDa correspondiente a PKC- α y no un fragmento de menor tamaño, derivado de su hidrólisis. Por otro lado, el curso temporal de desaparición de la actividad de PKC 1 es muy rápido, pues en un minuto ya se ha perdido más del 80% de la actividad (ver figura 6 del trabajo 1), haciendo muy poco probable que en tan corto tiempo se haya degradado el 80% de

la proteína. Existen varias evidencias que apoyan nuestros datos:

- En fibroblastos 3T3, Diaz-Lavilada et al (163), encontraron que el tratamiento crónico con TPA o con fosfolipasas C para fosfatidilinositol o para fosfatidilcolina (PCh), produce translocación de PKC a la membrana plasmática, pero que únicamente la enzima translocada por PCh-PLC es la que no sufre "down-regulation".

- Ohno et al (58) mostraron que una PKC- α mutante en el sitio de unión para ATP se transloca en respuesta a TPA desde el citosol hasta la fracción particulada, pero no sufre degradación subsecuente, a diferencia de la PKC- α silvestre.

- Los grupos de Ways et al (164) con células humanas de una línea monoblastoide, y de Parant (165) con una línea mielóide humana, han mostrado que a pesar de la exposición de las células a TPA bajo condiciones que abolen totalmente la actividad de cinasa de la enzima, los "Western blots" siguen mostrando sin embargo a una PKC inmunorreactiva de 80 KDa, tanto en las células control como en las tratadas con el éster de forbol.

2. El tratamiento con TPA produce un cambio en la especificidad de sustrato de la PKC.

Se ha reportado que la exposición de fibroblastos de rata (150) o de miocitos BC3H-1 (158) al TPA, produce una pérdida de la capacidad de la PKC para fosforilar a histona, pero no para fosforilar a otros sustratos tales como vinculina o citocromo P-450. Estos datos sugieren entonces que la pérdida de actividad puede no reflejar una verdadera disminución de actividad de PKC, sino solamente un cambio inducido por TPA en las propiedades catalíticas de la enzima.

Para investigar esto, usamos PKC 1, que es muy sensible al tratamiento con TPA, y se determinó su actividad en condiciones standard utilizando diferentes sustratos. En todos los casos, el TPA produjo considerables pérdidas de actividad (ver tabla I del trabajo 1), descartando esta posibilidad.

3. El TPA produce un cambio en el estado de fosforilación de la PKC.

Pelech et al (166) han sugerido que la fosforilación de PKC puede estar implicada en la interconversión de varias formas de PKC, pues el tratar con fosfatasa alcalina a formas que eluyen a mayor concentración de NaCl de una columna de Mono Q produce picos que eluyen a menor concentración de sal.

Según Borner (167), la forma de 80 KDa de PKC representa una forma altamente fosforilada de la de 77 KDa. Huang et al (168) han demostrado también un cambio en el tamaño de PKC según la movilidad relativa en SDS-PAGE, debido a autofosforilación. Por otro lado, Ohno y su grupo (56) han sugerido que la autofosforilación de PKC- α es un pre-requisito para la

degradación proteolítica asociada con la down-regulation de PKC- α silvestre, debido a que una mutante de PKC- α que carece de actividad de cinasa, y con actividad de unión aumentada a ésteres de forbol, se transloca a la membrana sin sufrir "down-regulation".

En contraposición directa a la sugerencia del grupo de Ohno, Pears y Parker (169) por un lado, y Lindner *et al* (170) por otro, demostraron que una mutante de PKC- α defectuosa en la actividad de cinasa sufre down-regulation en respuesta a ésteres de forbol tan efectivamente como la silvestre, demostrando que la autofosforilación intramolecular no es un pre-requisito para la "down-regulation".

Nuestros resultados apoyan la evidencia de que el estado de fosforilación de la enzima no tiene que ver con su capacidad para ser afectada por el TPA, pues nosotros no observamos ningún cambio en la movilidad relativa de PKC en SDS-PAGE debida al tratamiento con el éster de forbol (ver figura 4 de datos no publicados), ni tampoco se observó consistentemente algún cambio en la posición de cada pico en el perfil de elución de las fracciones tratadas con TPA respecto al de las células control.

4. El TPA produce inactivación de PKC por oxidación.

Se sabía desde antes de conocer la importancia de las secuencias ricas en cisteína de la PKC, que ésta se inactivaba por oxidación, y que con ello perdía no solamente su actividad de cinasa sino también la capacidad de unir ésteres de forbol (148, 171). Adicionalmente, había evidencia de que los promotores de tumores generaban radicales libres (O^{\cdot} y OH^{\cdot}) y se conocían ejemplos de proteínas como la glutamino sintetasa, cuya degradación involucra como paso inicial la modificación por oxidación de la proteína.

En el caso de la PKC, Gopalakrishna y Anderson (148), basándose en la observación de que la forma activada de PKC es más susceptible a oxidación por H_2O_2 , propusieron que los ésteres de forbol no sólo inducen asociación de ésta a la membrana, sino que promueven la generación de radicales libres, provocando un aumento en la inactivación oxidativa de PKC que la hace más susceptible a hidrólisis. También, el grupo de Boscobolnik (172) reportó que el α -tocoferol, conocido por sus propiedades antioxidantes, es capaz de prevenir la down-regulation inducida por TPA en la PKC de células vasculares de músculo liso.

Se ha reportado que en granulocitos el TPA produce inicialmente en ellos una depolarización, y posteriormente, induce la activación del sistema NADPH-oxidasa generador de superóxido; en cambio, el derivado metilado del TPA (O-Me-TPA), que carece de la habilidad para activar la producción normal de superóxido por los granulocitos, no produce depolarización (173, 174). Esto es muy interesante y concuerda con los re-

sultados obtenidos por nosotros con el O-Me-TPA, pues este compuesto, que no produce radicales libres, es sin embargo muy potente para inducir pérdida de actividad de PKC 1. Además, los experimentos que realizamos con distintos antioxidantes, mostraron claramente que son incapaces de prevenir o impedir el efecto inducido por el TPA (figura 5 de datos no publicados), lo que, junto con la evidencia anterior, apoya la idea de que los efectos que produce el TPA no se deben probablemente a la inducción de la inactivación de PKC por oxidación.

5. El TPA induce la Interacción de la PKC con un inhibidor endógeno.

Inicialmente, esta posibilidad nos pareció poco probable por la consideración de que si existiera un inhibidor no unido covalentemente, éste se separaría en la purificación de la PKC, ya fuera por la dilución en la homogenización, en la purificación parcial con DEAE-celulosa o bien, en pasos de purificación posteriores.

Ways et al (164), al igual que nosotros (datos no mostrados), realizaron "experimentos de mezclado": las fracciones obtenidas de la DEAE-celulosa procedentes de células tratadas con TPA, sin actividad de PKC, se mezclaron con las fracciones control, a fin de ver si había algún inhibidor en las primeras que afectara la actividad de PKC de las segundas, pero no se encontró que disminuyera la actividad control de PKC existente inicialmente. Sin embargo en el extracto crudo (sin pasar por DEAE-celulosa) de células no tratadas, si observamos la presencia probable de un inhibidor, pues solamente es posible detectar actividad de PKC si se diluye por lo menos 10 veces la muestra.

Se conoce muy poco acerca de la inhibición fisiológica de PKC. Debe existir un mecanismo que module su actividad transitoria *in vivo*, ya sea por la eliminación efectiva de segundos mensajeros, por competencia por sitios de unión de sustrato-cofactores-ATP, por proteólisis, o por inactivación directa de la enzima. La interacción con un inhibidor, por un mecanismo todavía sin definir, podría equipar a la célula con un mecanismo efectivo para inactivar a PKC; así: 1) suprimiría las respuestas fisiológicas asociadas a la activación de PKC, 2) suprimiría el control de retroalimentación negativa sobre los sistemas de transducción en que los ejerce y 3), evitaría la necesidad de eliminar a los segundos mensajeros Ca^{++} y DAG, y así permitiría proceder a otras rutas bioquímicas dependientes de ellos como la activación de cinasas Ca^{++} -calmodulina dependientes o la síntesis de prostaglandinas (121).

Hasta ahora, se han descrito numerosos y potentes inhibidores de PKC, la mayoría sintéticos, pero como se mencionó en la introducción, hay muy pocos reportes de factores endógenos que afecten negativamente su actividad. McDonald y Walsh

(121) han aislado una proteína de 17 KDa que une Ca^{++} , y también Tokar et al (122), otras de 29-33 KDa dependientes de Ca^{++} y de fosfolípido, que tienen homología con las lipocortinas en su extremo carboxilo, pero el mecanismo por el cual inhiben a PKC permanece sin resolverse.

Gopalakrishna y Anderson, en 1986 (175), hablan reportado que la unión del complejo PKC-TPA a las membranas es dependiente de temperatura, saturable y que requiere de la presencia de tanto proteínas de membrana como de fosfolípidos. Muy recientemente, Mochly-Rosen et al (176, 177) han empezado a re-examinar esa evidencia: encontraron dos proteínas intracelulares en la fracción insoluble en detergente de la fracción particulada de células de corazón de rata, que sólo se unen a PKC en presencia de P_{Ser} y Ca^{++} de manera dosis-dependiente, saturable y específica, sugiriendo que son "RACK's" ("receptor for activated C-kinase"). Además, estas proteínas tienen una secuencia que parece corresponder al sitio de unión entre RACK y PKC, que se encuentra en la proteína de 29-33 KDa de Tokar et al, y es homóloga al extremo carboxilo de la lipocortina 1 (177).

Todos nuestros resultados, especialmente de los experimentos realizados *in vitro*, podrían ser explicados a la luz de la posible interacción con un modulador negativo endógeno por las siguientes razones:

i) La pérdida de actividad de PKC detectada en los extractos crudos provenientes de células incubadas 15 minutos a 37° C *in vivo* en presencia o ausencia del TPA, es muy alta, mientras que, en los extractos crudos incubados directamente *in vitro* con o sin TPA, no se observó pérdida de actividad (figura 2 de datos no publicados). Esto podría deberse a que *in vivo*, la translocación de PKC inducida por TPA a la fracción membranar (en donde supuestamente sería posteriormente inhibida) puede llevarse a cabo, mientras que en los extractos crudos se vería impedida por la presencia de grandes concentraciones de agentes quelantes y de Tritón X-100 en la solución amortiguadora.

ii) El hecho de que solamente se observe pérdida de actividad *in vitro* si se utiliza DEAE-celulosa, fenil-sefarosa o hidroxipatita como sistema cromatográfico para purificar a PKC (figura 3 de datos no publicados), mostró que los efectos observados no son algo artefactual del sistema de purificación empleado y podrían ser explicados por la razón de que, como se mencionó en la introducción, los policationes (DEAE-celulosa), las sales de fosfato de calcio (hidroxipatita) o la interacción con resinas hidrofóbicas (fenil-sefarosa), junto con el TPA presente en la muestra, favorecen la expresión del sitio de unión para DAG, estabilizando la conformación activa de la PKC (80), lo que podría permitir la asociación inhibidor-PKC.

iii) A pesar de que no son cuantitativos, nuestros Western blots mostraron consistentemente la presencia de la proteína de 80 KDa inmunoreactiva correspondiente a PKC- α , cuya actividad de cinasa habla desaparecido.

Finalmente, llama la atención también que todas las proteínas amfitrópicas que interaccionan con fosfolípidos de membrana de una manera dependiente de calcio, sean translocadas desde el citosol a la membrana, y que entre ellas se incluya, además de la PKC, a proteínas que tienen alguna relación con el sistema de transducción de señales acoplado al recambio de fosfolípidos con movilización de calcio: PLA2 (178, 179), lipocortinas (inhibidores de la PLA2, 180), diacilglicerol-cinasa (33), calpaina (181) y citidiltransferasa (182). Además, la gran homología de secuencias existente entre PKC y PLA2 en sus mitades amino, es también intrigante (34). En fin, aun que la hipótesis de la existencia de un inhibidor endógeno de PKC es muy atractiva, solamente es una especulación, y la experimentación que se realice para comprobarla, dará la respuesta.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Meldrum, E., Parker, P. J. and Carozzi, A. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1092: 49
2. Birnbaumer, L., Abramowitz, J. and Brown, A.M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1031: 163.
3. Neer, E.J. and Clapham, D.E. (1988) *Nature* 333: 129.
4. Berridge, M.J., and Irvine, R.F. (1984) *Nature* 312: 315.
5. Casey, P.J., and Gilman, A.G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 2577.
6. Boyer, J.L., Waldo, G.L., Evans, T., Northup, J.K., Downes, C.P. and Harden, T. K. (1989) *J Biol. Chem.* 264: 13917.
7. Cassel, D. and Pfeuffer, T. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 2669.
8. Holmgren, J. (1981) *Nature* 292: 413.
9. García-Sáinz, J.A. (1985) *Ciencia* 36: 97.
10. Pfeuffer, E., Drehev, R.M., Metzger, H. and Pfeuffer, T. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3086.
11. Smigel, M. D. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 1976.
12. García-Sáinz, J.A., (1991) *NIPS* 6: 169.
13. Yoshimasa, T., Sibley, D.R., Bouvier, M., Lefkowitz, R.J., and Caron, M. G. (1987) *Cell* 48: 913.
14. Hernández-Sotomayor, S.M.T., Macías-Silva, M., Plebański, M. and García-Sáinz, J.A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 972: 311
15. Mitchell, R.H. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 415: 81.
16. Gilman, A.G. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56: 615
17. Blank, J.L., Ross, A.H. and Exton, J.H. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 18206.
18. Cockcroft, S. and Gomperts, B.D. (1985) *Nature* 314: 534.
19. Litosch, I., Wallis, C. and Fain, J.N. (1985) *J Biol. Chem.* 260: 5464
20. Bizzarri, C., Di Girolamo, M., D'Orazio, M.C. and Corda, D. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4889.
21. Nakamura, T. and Ul, M. (1985) *J Biol. Chem.* 260: 3584.
22. Brass, L.F., Shaller, C.C. and Belmonte, E. J. (1987) *J. Clin. Invest.* 79: 1269.
23. Rubin, R.P., aWithiam-Leitch, M and Laychock, S.G. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177: 22.
24. Melsenhelder, J. Suh, P.G., Rhee, S.G. and Hunter, T. (1989) *Cell* 57: 1109.
25. Wahl, M.I., Daniel, T.O. and Carpenter, G. (1988) *Science* 241: 988.
26. Billah, M.M. and Anthes, J.C. (1990) *Biochem. J* 269: 281.
27. Fain, J. N. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1053: 81.
28. Spat, A., Bradford, P.G., McKinney, J.S., Rubin, R.P., Putney, J.W. Jr. (1986) *Nature* 319: 514.
29. Burgess, G.M., Bird, G.St.J., Obie, J.F. and Putney, J.W. Jr. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(8): 4772.
30. Irvine, R.F. and Moor, R.M. (1986) *Biochem J* 240: 917.
31. Houslay, M.D. (1987) *Trens Pharm. Sci.* 12: 1.
32. Kikkawa, U., Kishimoto, A. and Nishizuka, Y. (1989) *Ann Rev. Biochem.* 58: 31.
33. Sakane, F., Yamada, K., Imal, S. and Kanoh, H. (1991) *J. Biol. Chem.* 266 (11): 7096.

34. Maraganore, J.M. (1987) *TIBS* 12: 176.
35. Billah, M. and Siegel, M.I. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144: 683.
36. Oishi, K., Raynor, L.R., Charp, P.A. and Kuo, J.F. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (14): 6865.
37. Daniel, K.W., Waite, M. and Wykle, R. (1986) *J. Biol. Chem.* 261 (20): 9128.
38. Weiss, B.A. and Insel, P. A. (1991) *J. Biol. Chem.* 266 (4): 2126.
39. Burch, R.M. Luini, A. and Axelrod, J. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7201.
40. Burch, R.M. (1989) *Mol. Neurobiol.* 3: 155.
41. Pernas, P., Masliah, J., Olivier, J.L., Salvat, C., Rybkine T. and Berezlat, G. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178 (3): 1298.
42. Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B.A., Morrison, A.R. and Lefkowitz, J.B. (1986) *Ann Rev Biochem.* 55: 69.
43. Krause, H., Dieter, P. Sculze-Specking, A., Balhorn, A. and Decker, K. (1991) *Eur. J. Biochem.* 199: 355.
44. Kolesnick, R.N. and Clegg, S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (14): 6534.
45. Cabot, M.C., Welsh, C.J., Cao, H. and Chabbott, H. (1988) *FEBS Lett.* 233 (1): 153.
46. Besterman, J.M., Duronio, V. and Cuatrecasas, P. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8785.
47. Bocckino, S.B., Blackmore, P.F., Wilson, P.B. and Exton, J. H. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 15309.
48. Bocckino, S.B., Wilson, P.B. and Exton, J.H. (1987) *FEBS Lett.* 225 (1,2): 201.
49. Huang, R., Kucera, G.L. and Rittenhouse, S.E. (1991) *J. Biol. Chem.* 266 (25): 1852.
50. Loffelholz, K. (1989) *Biochem. Pharmacol.* 38: 1543.
51. Corradetti, R., Lindmar, R. and Loffelholz, K. (1983) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226: 826.
52. Blusztajn, J.K., Liscovitch, M., Mauron, C., Richardson, U.I. and Wurtmann, R.J. (1987) *J. Neural. Transm.* 24: 247.
53. Van Blitterswijk, W.J., Hilkmann, H, de Wit, J. and Van der Bend, R.L. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(16): 10337.
54. Cohen, P. (1982) *Nature* 296: 613.
55. Hunter, T. (1987) *Cell* 50: 823.
56. Ohno, S, Konno, Y., Akita, Y., Yano, A. and Suzuki, K. (1990) *J. Biol. Chem.* 265(11): 6296.
57. Crabos, M. Imber, R. Woodtill, T., Fabbro, D. and Erne, P. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178(3): 878.
58. Farago, A. and Nishizuka, Y. (1990) *FEBS Lett.* 268(2): 350.
59. House, C. and Kemp, B. (1987) *Science* 238: 1726.
60. Gschwendt, M., Klittstein, W. and Marks, F. (1991) *TIBS* 16: 167.
61. Nishizuka, Y. (1988) *Nature* 334: 661.
62. Berg, J. (1986) *Science* 232: 485.
63. Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L. Young, S, Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D. and Ullrich, A. (1986) *Science* 233: 853.
64. Coussens, L., Parker, P.J., Rhee, L., Yang-Feng, T.L.,

ESTA TESTS NO DEBE
-39- SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Chen, E., Waterfield, M.D., Francke, U. and Ullrich, A. (1986) *Science* 233: 859.
65. Masmoudi, A., Labourdette, G., Mersel, M., Huang, F.L., Huang, K.P., Vincendon, G. and Malviya, A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264(2): 1172.
66. Huang, K.P., Zwiller, J., Vincendon, C., Malviya, A.N., Rogue, P., Labourdette, G., Masmoudi, A., Yoshida, Y. and Huang, F.L. (1990) *J. Biol. Chem.* 265(7): 4161.
67. Mischak, H., Bodentelch, A., Kolch, W., Goodnight, J., Hofer, F. and Mushinski, J.F. (1991) *Biochemistry* 30: 7925.
68. Schaap, D. and Parker, P.J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265(13): 7301.
69. Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. and Nishizuka, Y. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3099.
70. Osada, S., Mizuno, K., Saido, T.C., Akita, Y., Suzuki, K., Kuroki, T. and Ohno, S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265(36): 22434.
71. Dell, E., Kiss, Z. and Kuo, J.F. (1988) *FEBS Lett.* 231(2):407.
72. Cambier, J.C., Newell, M.K., Justement, L.B., McGuire, J.C., Leach, K.L. and Chen, Z.Z. (1987) *Nature* 327: 629.
73. Capitani, S., Girard, P.F., Mazzei, G.J., Kuo, J.F., Berezney, R. and Manzoli, F.A. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142(2): 367.
74. Chiarugi, V., Magnelli, L., Pasquall, F., Vannucchi, S., Bruni, P., Quattrone, A., Basl, G., Capaccioli, S. and Ruggiero M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173(2): 528.
75. Shinomura, T., Asaoka, Y., Oka, M., Yoshida, K. and Nishizuka, Y. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5149.
76. Kalbuchi, K., Takai, Y. and Nishizuka, Y. (1981) *J. Biol. Chem.* 256(14): 7146.
77. Hannun, Y. and Bell, R.M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 2962.
78. Bazzi, M.D. and Nelsestuen, G.I. (1987) *Biochemistry* 26: 1974.
79. Kuroda, T., Mikawa, K., Mishima, H. and Kishimoto, A. (1991) *J. Biochem.* 110: 364.
80. Thompson, N.T., Bonser, R.W., Hodson, H.F. and Garland, G. (1988) *Biochem. J.* 255: 417.
81. Kraft, A.S., Anderson, W.B., Cooper, H.L. and Sando, J.J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 13193.
82. Kraft, A.S. and Anderson, W.B. (1983) *Nature* 301: 621.
83. Tapley, P.M. and Murray, A.W. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122: 158.
84. Hirota, K., Hirota, T., Aguilera, G. and Catt, K.J. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 3243.
85. Drust, D.S. and Martin, T.F.J. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 531.
86. Farrar, W.L., Thomas, T.P. and Anderson, W.B. (1985) *Nature* 315: 235.
87. Fearon, C.W. and Tashjian, A.H. Jr. (1985) *J. Biol.*

- Chem. 260: 8366.
88. Naor, Z., Zer, J., Zakut, H. and Hermon, J. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8203.
 89. Melloni, E., Pontremoli, S., Michetti, M., Sacco, O., Sparatore, B. and Horecker, B.C. (1986) 261: 4101.
 90. Ballester, R. and Rosen, O. (1985) J. Biol. Chem. 260: 15194.
 91. Boscá, L., Diaz-Guerra, M.J.M. and Mojena, M. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 160(3): 1243.
 92. Kishimoto, A. et al. (1983) J. Biol. Chem. 258: 1156.
 93. Huang, K.P., Nakabayashi, H. and Huang, F.L. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83:8535.
 94. Huang, K.P., Nakabayashi, H. and Huang, F.L. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 8539.
 95. Rodriguez-Pena, A. and Rozengurt, E. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120: 1053.
 96. Ase, K., Berry, M., Kikkawa, U., Kishimoto, A. and Nishizuka, Y. (1986) FEBS Lett. 236: 396.
 97. Wender, P.A., Cribbs, C.M., Koehler, K., Sharkey, N., Herald, Ch. L., Kamano, Y., Pettit, G.R. and Blumberg, P.M. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7197.
 98. Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, Ch., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4868.
 99. Jeffrey, A.M. and Liskamp, R.M.J. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 241.
 100. Lell, U., Hauser, G. and Froimowitz, M. (1990) Mol. Pharmacol. 37: 286.
 101. Nakamura, H., Kishi, Y., Pajares, M.A. and Rando, R.R. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9672.
 102. Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. and Nishizuka, Y. (1988) J. Biol. Chem. 263(14): 6927.
 103. Dreher, M.L. and Hanley, M.R. (1988) TIPS 9: 114.
 104. Ryves, W.J., Evans, A.T., Olivier, A.R., Parker, P.J. and Evans, F.J. (1991) FEBS Lett 288(1,2): 5.
 105. Hocevar, B.A. and Fields, A.P. (1991) J. Biol. Chem. 266(1): 28.
 106. Strulovicli, B., Daniel-Issakani, S., Baxter, G., Knopf, J., Sultzman, L., Cherwinski, H., Nestor Jr., J., Webb, D.R. and Ransom, J. (1991) J. Biol. Chem. 266(1): 168.
 107. Kishimoto, A., Nishiyama, K., Nakanishi, H., Uratsuli, Y., Nomura, H., Takeyama, Y. and Nishizuka, Y. (1985) J. Biol. Chem. 260: 12492.
 108. Ferrari, S., Marchiorli, F., Borin, G. and Pinna, L.A. (1985) FEBS Lett. 184: 72.
 109. Romhányi, T., Sepródi, J., Antoni, F., Mészáros, G., Buday, L. and Faragó, A. (1986) Biochim. Biophys. Acta 888: 325.
 110. Woodgett, J.R., Gould, K.L. and Hunter, T. (1986) Eur. J. Biochem. 161: 177.
 111. Erusalimsky, J.E., Brooks, S.F., Herget, T., Morris, C. and Rozengurt, E. (1991) J. Biol. Chem. 266(11): 7073.
 112. Seykora, J.T., Ravetch, J.V. and Aderem, A. (1991)

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2505.
113. Sibley, D.R., Benovic, J.L. Caron, M.G. and Lefkowitz, R. (1987) Cell 48: 913.
 114. Bazzi, M.D., Lampe, P.D., Strasburg, G.M. and Nelses tuen, G.L. (1987) Blochim. Biophys. Acta 931: 339.
 115. Palvimo, J., Mahonen, A. and Menp, P.H. (1987) Blochim. Biophys. Acta 931: 376.
 116. Morris, C. and Rozenfurt, E. (1988) FEBS Lett. 231(2): 311.
 117. Walaas, S.I., Horn, R.S., Albert, K.A., Adler, A. and Walaas, O. (1988) Blochim. Biophys. Acta 968: 127.
 118. Wolf, M. and Sahyoun N. (1986) J. Biol. Chem. 261(28): 13327.
 119. Lewis, R.E., Cao, L., Perregaux, D. and Czech, M.P. (1990) Biochemistry 29: 1807.
 120. Hannun, Y.A., and Bell, R.M. (1987) Science 235: 670.
 121. McDonald, J.R., Gröschel-Stewart, U. and Walsh, M.P. (1987) Blochem. J. 242: 695.
 122. Toker, A., Ellis, C.A., Sellers, L.A. and Altken, A. (1990) Eur. J. Biochem. 191: 421.
 123. Hannun, Y.A. and Bell, R.M. (1988) J. Biol. Chem. 262(11): 5124.
 124. Majumdar, S., Rossi, M.W., Fujiki, T., Phillips, W.A., Disa, S., Queen, C.F., Johnston, R.B.Jr., Rosen, O.M., Corkey, B.E. and Korchak, H.M. (1991) J. Biol. Chem. 266(14): 9285.
 125. Loomis, C.R. and Bell, R.M. (1988) J. Biol. Chem. 263(4): 1682.
 126. Herbert, J.M. and Maffrand, J.P. (1991) Blochim. Biophys. Acta 1091: 432.
 127. Roach, P.J. and Goldman, M. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 7170.
 128. Bushfield, M., Murphy, G.J., Lavan, B.E., Parker, P.J., Hruby, V.J., Milligan, G. and Houslay, M.D. (1990) Blochem. J. 268: 449.
 129. Bushfield, M., Pyne, N.J. and Houslay, M.D. (1990) Eur. J. Biochem. 192: 537.
 130. Nishizuka, Y. (1986) Science 233: 305.
 131. Griendling, K.K., Bradford, C. and Alexander, W. (1988) J. Biol. Chem. 263(22): 10620.
 132. Garcia-Salnz, J.A. and Hernández-Sotomayor, S.M.T. (1987) Eur. J. Biochem. 163: 417.
 133. Huckle, W.R., McArdle, C.A. and Conn, P.M. (1988) J. Biol. Chem. 263(7): 3296.
 134. Wilkinson, M. and Morris, A. (1983) Blochem. Biophys. Res. Commun. 111: 498.
 135. Otani, S., Matsui, I., Kuramoto, A., Marisawa, S. (1985) Eur. J. Biochem. 147: 27.
 136. Watanabe, T., Taguchi, Y., Sakaki, K., Tsuyama, K., Kitamura, Y. (1981) Blochem. Biophys. Res. Commun. 100: 427.
 137. Degen, J.L., Estrarsen, R.D., Nagamine, Y. and Ruch, E. (1985) J. Biol. Chem. 260: 12426.
 138. Johnson, K.M., Vassallo, T. and Torres, B.A. (1985) J. Immunol. 134: 967.

139. Menapace, L., Armato, U. and Whitfield, J.F. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148(3): 1295.
140. Navre, M. and Ringold, G.M. (1988) *J. Cell Biol.* 107: 279.
141. Otte, A.P., Koster, C.H., Snoek, G.T. and Durston, A.J. (1988) *Nature* 334: 618.
142. Clu, R., Boyle, W.J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T. and Caron, M. (1988) *Cell* 54: 541.
143. Larsson, L.-G., Ivhed, I., Gidlund, M., Pettersson, U., Vennstrom, B. and Nilsson, K. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2638.
144. Gray, G.M. and Macara, I. G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263(22): 10714.
145. Kosaka, Y., Ogita, K., Ase, K., Nomura, H., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151: 973.
146. Houweling, M., Vaartjes, W.J. and Van Golde, L.M.I.G.I. (1989) *FEBS Lett.* 247: 487.
147. Azhar, S., Butte, J. and Reaven, E. (1987) *Biochemistry* 26: 7047.
148. Gopalakrishna, R. and Anderson, W. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6758.
149. Kraft, A. and Anderson, W. (1983) *J. Biol. Chem.* 258(15): 9178.
150. Cochet, C., Souvignet, C., Keramidis, M. and Chambay, E.M. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1349: 1031.
151. Van de Werve, G. and Massillon, D. (1990) *Biochem. J.* 269: 795.
152. Houslay, M.D., Gawler, D.J., Milligan, G. and Wilson, A. (1989) *Cell Signal.* 1: 9.
153. Solanski, V., Slaga, T.J.J., Callahan, M. and Hubermann, E. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1722.
154. Krug, E., Blomann, H.P. and Tashjian, A.H.Jr. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 11852.
155. Heldenreich, K.A., Toledo, S.P., Brunton, L.L., Watson, M.J., Daniel-Issakani, S. and Strulovici, B. (1990) *J. Biol. Chem.* 265(25): 15076.
156. Trillivas, I., McDonough, P.M. and Heller Brown, J. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(13): 8431.
157. Berry, N., Ase, K., Kikkawa, U., Kishimoto, A. and Nishizuka, Y. (1989) *J. Immunol.* 143: 1407.
158. Cooper, D.R., Watson, J.E., Acevedo-Duncan, M., Pollet, R.J., Standaert, M.L. and Farese, R.V. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161: 327.
159. Parls, S., Magnaldo, I. and Pouyssegur, J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263(23): 11250.
160. Ho, A.K., Thomas, T.P., Chik, C.L., Anderson, W.B. and Klein, D.C. (1988) *J. Biol. Chem.* 263(19): 9292.
161. Hepler, J., Earp, H.S. and Harden, T.K. (1988) *J. Biol. Chem.* 263(16): 7610.
162. Schollmeyer, J.E. (1988) *Science* 240: 911.
163. Diaz-Lavilada, I., Larrodera, P., Nieto, J.L., Cornet, M.E., Diaz-Meco, M.T., Sanchez, M.J., Guddal, P.H., Johansen, T., Haro, A. and Moscat, J. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(2): 1170.

164. Ways, K., Riddle, R., Ways, M. and Cook, P. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(2): 1258.
165. Parant, M.R., Klein, B. and Vial, H. (1990) *FEBS Lett.* 269(2): 331.
166. Pelech, S.L., Samiei, M., Charest, D.L., Howard, S.L. and Salari, H. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(14): 8696.
167. Borner, C., Eppenberger, U., Wyss, R. and Fabbro, D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2110.
168. Huang, K.P., Jeese Chan, K.F., Singh, T.J., Nakabayashi, H. and Huang F.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 12134.
169. Pears, C. and Parker, P.J. (1991) *FEBS Lett.* 284(1): 120.
170. Lindner, D., Gschwendt, M. and Marks, F. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176(3): 1227.
171. Gopalakrishna, R. and Anderson, W.B. (1987) *FEBS Lett.* 225(1,2): 233.
172. Boscoboinik, D., Szewczyk, A., Hensey, C. and Azzi, A. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(10): 6188.
173. Newburger, P.E., Chovaniec, M.E. and Cohen, H.J. (1980) . *Blood*, in press.
174. Whitin, J., Chapman, Ch.E., Simons, E.R., Chovaniec, M. and Cohen, H.J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255(5): 1874.
175. Gopalakrishna, R., Barsky, S., Thomas, T.P. and Anderson, W.B. (1988) *J. Biol. Chem.* 263(35): 16438.
176. Mochly-Rosen, D., Khaner, H. and López, J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3997.
177. Mochly-Rosen, D., Khaner, H., López, J. and Smith, B.L. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(23): 14866.
178. Channon, J.Y. and Leslie, C.C. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 5409.
179. Díez, E. and Mong, S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 14654.
180. Crompton, M.R., Moss, S.E. and Crompton, M.J. (1988) *Cell* 55: 1.
181. Melloni, E., Pontremoli, S., Michetti, M., Sacco, O., Sparatore, B., Salamino, F. and Horecker, B.L. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6435.
182. Cornell, R. and Vance, D.E. (1987) *Biochim Biophys. Acta* 919: 26.