



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Regulación diferencial de la actividad de la
Proteína Cinasasa C por ésteres de forbol y
Epinefrina.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

RAÚL BARZALOBRE GERÓNIMO



TUTOR: DRA. MARTHA ROBLES FLORES

2009



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Hoja de Datos del Jurado

<p>1.Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta</p>	<p>1.Datos del alumno Barzalobre Gerónimo Raúl 57 44 56 08 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 098237315</p>
<p>2.Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>2.Datos del tutor Dra Martha Robles Flores</p>
<p>3.Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>3.Datos del sinodal 1 Dr Luis Felipe Jiménez García</p>
<p>4.Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>4.Datos del sinodal 2 Dra María de Lourdes Segura Valdez</p>
<p>5.Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>5.Datos del sinodal 3 Dra María Cristina Castañeda Patlán</p>

<p>6.Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>6.Datos del sinodal 4 M en C Héctor González Aguilar</p>
<p>7.Datos del trabajo escrito Título</p> <p>No de páginas Año</p>	<p>7. Datos del trabajo escrito Regulación diferencial de la actividad de la actividad de la Proteína Cinasa C por ésteres de forbol y Epinefrina 78 p 2009</p>

Muchos aspectos de la biología influyen directamente en nuestras circunstancias personales y en nuestro sistema de valores. Ser biólogo no es un trabajo; es elegir un modo de vida.

Ernst Mayr.

La evolución es un zapatero remendón y en una situación determinada emplea lo que tiene más a la mano.

François Jacob.

La naturaleza para ser ordenada debe ser obedecida.

Francis Bacon.

¡Desafortunados los científicos que sólo tengan en sus cabezas ideas claras!

Louis Pasteur.

La gran tragedia de la ciencia: el asesinato de una bella hipótesis a manos de un hecho feo.

Thomas Henry Huxley.

El placer de observar y comprender a la naturaleza debe ser un regalo maravilloso.

Albert Einstein.

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M (Universidad Nacional Autónoma de México), bajo la dirección de la Doctora Martha Robles Flores.

RECONOCIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la excelente formación académica recibida y permitirme formar parte de la gran comunidad universitaria de la máxima casa de estudios de México.

A la Facultad de Ciencias y a todos los profesores que la integran y que contribuyeron en mi formación académica, científica y humana.

Al Colegio de Ciencias y Humanidades, plantel Sur, pues es el inicio de mi formación como universitario y donde confirmé mi vocación por la Biología.

Al departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y a la Dra. Martha Robles Flores por la dirección del presente trabajo de tesis, la enseñanza y las facilidades brindadas durante su elaboración.

A los miembros del jurado por haber revisado mi trabajo, por sus valiosos comentarios y sugerencias muchas gracias:

Dr. Luis Felipe Jiménez García.

Dra. María de Lourdes Segura Valdez.

Dra. María Cristina Castañeda Patlán.

M. en C. Héctor González Aguilar.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a mi familia; parte imprescindible de mi vida, pues su apoyo ha sido fundamental para la culminación de esta etapa de mi vida. A mis padres **Bertha Gerónimo Barroso** y **Arturo Barzalobre Sánchez**, por regalarme esta bella herencia llamada educación y por ser siempre ejemplos a seguir de superación profesional. A mi papá por respaldarme en todo el camino que he recorrido y a su afecto y cariño que aunque no lo demuestre como muchos sé que está presente. A mi mamá; soporte trascendental de toda mi vida, por la gran dedicación que has puesto en educar a mis hermanos y a mí, por todos los consejos, el cariño y el amor que nos has dado, por ser un gran ejemplo para vencer los obstáculos y salir adelante, por el interés y por creer sinceramente en la carrera que he estudiado. Gracias por ser mi mamá, pues sin ti no hubiera llegado a este momento de mi vida.

A mis hermanos Conny, Rafael a quienes quiero mucho y siempre fueron, son y serán parte importante de mi vida, por compartir muchas vivencias (tristes y alegres). A mi hermanito Arturo, a quien adoro, desde que llegaste a nuestras vidas has sido una luz y nos has regalado muchas alegrías, ha sido un experiencia única el verte crecer (¡Zi que zi!).

A mis abuelitos Rafael y Concepción (q.e.p.d) y Lorenzo y María (Papá Lencho y Mamá Mary) (q.e.p.d), quienes siempre han sido mis ejemplos para salir adelante con fortaleza ante las carencias y las dificultades que te pone la vida.

A mis tíos(as) por todo su cariño y apoyo incondicional que me han dado y por estar siempre pendientes de mi, en especial a mi tío Jaime por los momentos de alegría que me ha regalado. A todos mis primos que en diferentes etapas de mi vida han compartido conmigo muchos instantes de felicidad.

A Oscar y Alberto quienes han sido mis amigos desde la infancia y con los que he reído, bromeado, llorado y peleado, pero siempre brindándome el apoyo y compartiendo sus valiosas enseñanzas.

A todos mis amigos de la licenciatura quienes han sido un valioso tesoro por todos los bellos recuerdos y apreciables momentos de sabiduría que me dieron y compartieron en las aulas de clase, las prácticas de laboratorio y de campo, muchos de ustedes son vivos ejemplos de superación profesional: Jorge (George), Salvador (Chavita), Marina, Mariana, Lizeth, Alejandra, Massa, Israel, Roberto (Tío), Magaly, Pedro, Gaby, Isaac (Chaco), Tania, Edgardo, Marlem y a todos los que me faltaron pero saben que los estimo mucho. ¡Gracias por su amistad!

A la doctora Martha Robles Flores por todas las facilidades dadas para la realización de este trabajo de tesis, por el tiempo que dedicó para asesorarme en esta tesis, pues sin ella este proyecto no se hubiera finalizado.

A Cristina y a Héctor quienes me ayudaron e instruyeron a trabajar de forma correcta e hicieron más agradable mi estadía en el laboratorio y lo más importante; por darme su amistad.

Al Colegio Xicotécatl y a todos sus profesores por todas las valiosas enseñanzas que adquirí de ellos, pues son parte importantísima de mi trayectoria académica.

Í N D I C E

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 HISTORIA DE LA PROTEÍNA CINASA (PKC).....	3
1.2 ESTRUCTURA GENERAL DE PKC.....	5
1.3 ESTRUCTURA DEL DOMINIO REGULADOR DE PKC.....	6
1.3.1 Dominio Regulador.....	7
1.3.2 Pseudosustrato.....	7
1.3.3 Módulos blanco membranales.....	8
1.4 DOMINIO CATALÍTICO O DE CINASA.....	11
1.5 MECANISMOS DE REGULACIÓN.....	12
1.5.1 Maduración.....	13
1.5.2 Activación catalítica.....	15
1.5.2.1 Fosfatidilserina.....	16
1.5.2.2 Diacilglicerol (DAG) y éster de forbol.....	17
1.5.2.3 Ácidos grasos.....	19
1.5.2.4 Ceramida.....	20
1.5.2.5 Otros lípidos.....	20
1.5.2.6 Iones calcio (Ca ²⁺).....	21
1.6 LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE PKC.....	22
1.7 MODULACIÓN NEGATIVA O DOWN REGULATION.....	23
1.8 CONSERVACIÓN DE PKCs CLÁSICAS, PKCs NUEVAS Y PKCs ATÍPICAS EN ORGANISMOS MULTICELULARES.....	26
1.9 FUNCIONES.....	27
1.9.1 Importancia de las isoformas de PKC en la proliferación celular.....	27
1.9.2 PKC y Apoptosis.....	29
1.9.3 PKC y transformación neoplásica.....	31
1.9.4 Isoformas de PKC en enfermedades cardiovasculares.....	33
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34

3. OBJETIVOS.....	35
General.....	35
Específicos.....	35
4. HIPÓTESIS.....	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
5.1 Purificación de hepatocitos.....	37
5.2 Tratamiento de hepatocitos con activadores de PKC.....	37
5.3 Lisado de hepatocitos.....	38
5.4 Purificación parcial de isoformas de PKC por Cromatografía de intercambio iónico.....	38
5.5 Detección de las isoformas eluidas.....	38
5.6 Separación de las fracciones citosólicas y membranales de los hepatocitos.....	39
5.7 Cuantificación de proteínas y electroforesis.....	39
5.8 Ensayos de electroinmunotransferencia (Western blot) para la detección de PKC.....	40
5.9 Medición de la actividad de PKC en inmunoprecipitados.....	41
6. RESULTADOS.....	44
6.1 Efectos del TPA sobre la detección de las isoformas α , δ y θ de la PKC.....	44
6.2 Efectos de la Epinefrina y el TPA en la detección de PKC α y PKC θ	47
6.3 Activación de las isoformas PKC α , PKC δ y PKC θ producida como resultado del tratamiento de hepatocitos con TPA o con Epinefrina.....	49
6.4 Efectos del TPA y la Epinefrina sobre la actividad enzimática de isoformas de PKC en los picos de elusión 1 y 2.....	53
7. DISCUSIÓN.....	57
8. CONCLUSIONES.....	61
9. LITERATURA CITADA.....	62

RESUMEN.

La proteína cinasa C (PKC) es miembro de la familia de las Serinas/Treoninas fosfotransferasas que están implicadas en diversas rutas de señalización celular. Uno de los mecanismos reguladores de la proteína cinasa C es el fenómeno conocido como “down-regulation” o modulación negativa, la cual se define como la inactivación catalítica y la posterior degradación proteolítica de la enzima. La activación crónica (por tiempos prolongados) de PKC por ésteres de forbol causa la degradación casi completa de esta enzima, presumiblemente como resultado de la proteólisis. Sin embargo, diferentes grupos han señalado que la down-regulation de la Proteína cinasa C es variable según el estímulo empleado, la isoforma implicada y que puede ser inducida también a tiempos cortos de tratamiento con diversos agentes activadores de PKC. La base molecular precisa de este fenómeno no se conoce con claridad.

El objetivo de este trabajo de tesis fue examinar el mecanismo de “down regulation” que sucede a tiempos breves de activación de PKC con ésteres de forbol (TPA) y con epinefrina en hepatocitos de rata. Se purificaron parcialmente las isoformas de PKC que se expresan en hepatocitos de rata utilizando cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa. Se encontró que en estas células, existen dos subpoblaciones de isoformas de PKC que eluyen en dos picos, uno a menor fuerza iónica (0.08 M de NaCl, pico 1) mientras que la otra subpoblación eluye a mayor fuerza iónica (0.25 M de NaCl o pico 2). El tratamiento de hepatocitos recién aislados durante 5 minutos con TPA o con epinefrina, indujo una respuesta diferencial en las isoformas de PKC α , δ y θ co-expresadas en hepatocitos de rata. En cuanto a la expresión de estas isoformas, se produjo una pérdida de detección selectiva de estas isoformas α , δ y θ que eluyen en el pico 1. Al mismo tiempo, se observó que la pérdida de detección de estas isoformas fue selectiva para el tratamiento con TPA ya que la epinefrina no produjo este efecto. Al evaluar el efecto del TPA y de la epinefrina sobre la redistribución y por tanto, en la activación “in vivo” de estas isoformas, así como en la medición de su actividad “in vitro”, se observó que las subpoblaciones que eluyen de la columna de DEAE-celulosa en el pico 2 correspondientes a las isoformas α y θ de PKC, se activan con TPA y con epinefrina, ya que se redistribuyen a fracción particulada y se incrementa su actividad catalítica. Por el contrario, las subpoblaciones que eluyen en el pico 1 de estas isoformas, se inhiben pues disminuye en más de un 60% su actividad. Adicionalmente, se observó que la PKC δ no se activa ni con TPA ni con epinefrina ya que no sufre redistribución como consecuencia del tratamiento con estos agentes, y se inhibe selectivamente la actividad de la subpoblación de esta isoforma que eluye en el pico 2 como resultado del tratamiento de las células con TPA.

Los resultados sugieren que las subpoblaciones de PKC α y θ que eluyen en el pico 1, presentaron algún cambio post-traducciona l teniendo como consecuencias tanto la pérdida de su detección por el anticuerpo usado, como la pérdida de su actividad. Con base en esto, los datos sugieren que es la subpoblación de las isoformas que eluyen en el pico 1 la que se modifica y falta en la detección en los Western blots correspondientes a este pico y en la detección total de PKC en los ensayos de translocación.

ABREVIATURAS.

AKAPs	Proteínas de anclaje a cinasa-A
AMPc	Adenosina cíclica monofosfato.
ATP	Adenosina de trifosfato.
DAG	Diacilglicerol.
ERK	Cinasas reguladas extracelularmente, por sus siglas en inglés Extracellular-signals- regulated kinase.
GMPc	Guanosina cíclica 5-monofosfato.
GPCRs	Receptores Acoplados a Proteínas G.
JNK	c-Jun N-terminal cinasa.
LPC	Lisofosfatidilcolina.
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos, por sus siglas en inglés Mitogen-activated Protein Kinase.
MARKSs	Sustratos miristoilados de cinasas C ricos en Alanina.
MEK	Proteína cinasa de la MAPK, por sus siglas en inglés mitogen- activated, ERK-activating kinase.
MEKK	Proteína cinasa de la MEK, por sus siglas en inglés mitogen-ativated Protein kinase kinase kinase.
NF-κB	Factor Nuclear- κB.
NSCLC	Cáncer de pulmón carente de células pequeñas, por sus siglas en ingles non- small cell lung cancer.
PA	Ácido fosfatídico.
PC	Fosfatidilcolina.
PDBu	Forbol 12,13- dibutirato.
PDK1	Cinasas dependientes de fosfoinositidos.
PKC	Proteína Cinasa C.
PKG	Proteína Cinasa G.
PKM	Proteína Cinasa M.
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.
PIP ₃	Fosfatidilinositol 3, 4,5-trifosfato.
PLD	Fosfolipasa D.
PMA	Forbol 12-miristato13-acetato.
PS	Fosfatidilserina.
RACKs	Receptores para Cinasas C activada.
SMasa	Esfingomielinasa.
STICKs	Sustratos que interactúan con cinasas C.
TCR	Receptor de la célula T.
TPA	12-O-tetradecanoil forbol 13-acetato.

1. Introducción.

1.1 Historia de la PKC.

La fosforilación es un lenguaje universal usado por las células para retransmitir información entre y dentro de las células. Una de las familias de cinasas que juega un rol clave en la transducción de señales celulares es la familia de la *proteína Cinasa C* (PKC). Los miembros de esta familia interpretan la información de señales que resultan de la hidrólisis de fosfolípidos; las comunican a sustratos a través de la célula, causando cambios a corto y largo plazo en las funciones celulares (Conn P. M. and Means. A. R., 2000). Hace casi medio siglo, Hokin y Hokin hallaron la primera evidencia de que las células usan lípidos para transducir información. Esto inició una ráfaga de investigaciones dentro del cambio de estímulos dependiente de lípidos y llegó a ser rápidamente aceptado que los fosfoinosítidos eran hidrolizados en respuesta a un gran número de señales extracelulares diversas. Sin embargo, la enzima efectora acoplada a esta ruta de señalización de lípidos permaneció oculta por otros 25 años. (Conn P. M. and Means. A. R., 2000). Mientras tanto, la investigación de las bases moleculares del cáncer había identificado un potente promotor de tumores, cuyo mecanismo permaneció desconocido, pero que inducía respuestas biológicas dramáticas en todos los sistemas biológicos virtualmente examinados. Se había conocido milenariamente que la savia lechosa exudada de plantas pertenecientes a la familia Euforbiaceae, es un potente irritante ya que el aceite del croton, derivado del *Croton tiglium*, era usado como contrairritante y purgante. Hacia fines de 1960, el ingrediente activo fue identificado como forbol diterpeno tetracíclico de la familia de diésteres, con cadenas variantes de acil en las posiciones C-2 y C-3. El componente más potente fue el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, ó el también descrito TPA por 12-*O*-tetradecanoil forbol 13-acetato). No obstante, los blancos moleculares para este promotor de tumores permanecieron imprecisos, pues la lipoficidad del PMA causaba rápidamente su distribución dentro de las membranas y esto había hecho difícil a los investigadores el identificar si la molécula se une específicamente a las células. Un adelanto repentino ocurrió cuando Peter Blumberg y colaboradores sintetizaron un éster de forbol menos hidrofóbico, el forbol 12,13-dibutirato (PDBu), el cual pensaron sería suficientemente soluble en agua para vencer la alta intercalación membranal no específica del PMA pero que retendría su farmacóforo. En 1980, lograron usar esta molécula para presentar que los ésteres de forbol tienen un sitio de enlace saturable y de alta afinidad en la fracción membranal de las células. El cerebro presentó únicamente altos niveles de enlace y los receptores fueron asociados con un fosfolípido específico, fosfatidilserina. La incógnita permaneció: ¿Cuál es la función de los ésteres de forbol?

A principios de 1970, Yasutomi Nishizuka y colaboradores al estar trabajando con una proteína cinasa G recién descubierta revelaron que un fragmento constitutivamente activo de la proteína cinasa G, insensible al GMPc, era generado en una hendidura proteolítica. Esto les permitió hipotetizar sobre un módulo regulador que había sido liberado y forzaba la catálisis; una hipótesis que resultó en el origen del descubrimiento de la *proteína cinasa C*. De allí en adelante este grupo de investigadores, empezaron a purificar una cinasa que era constitutivamente activa, la cual nombraron *proteína cinasa M* (PKM., M por su requerimiento de Mg²⁺). Posteriormente se dieron cuenta que los altísimos niveles de esta cinasa nueva fueron obtenidos de los stocks de cerebro de rata congelado comparados con los de cerebros de ratas recién sacrificadas. Aprovechando

su experiencia con la *proteína cinasa G* (PKG) estos investigadores estuvieron examinando un dominio de cinasa generado proteolíticamente y por lo tanto empezaron a identificar la proenzima. En 1977 el grupo de Nishizuka reportó el descubrimiento de esta proenzima. La llamaron *proteína cinasa C* porque ésta era activada por la proteasa dependiente de Ca^{2+} , *calpaína*. Pronto llegó a ser evidente que la actividad de la proenzima fue dependiente de fosfolípidos aniónicos, en particular fosfatidilserina. Curiosamente, un extracto crudo de fosfolípidos de membranas de cerebro fue el más efectivo en activar a la cinasa, permitiendo al grupo de Nishizuka, investigar una impureza que podría ser el activador principal

La identificación del diacilglicerol como la impureza responsable para esta estimulación permitió a Nishizuka crear la brecha conceptual para que la *proteína cinasa C* pudiera ser blanco para el diacilglicerol como un segundo mensajero. Estos hallazgos distintivos anunciaron los inicios de las investigaciones de una de las enzimas más descritas en la literatura en las pasadas dos décadas

El interés en el área de la transducción de señales por la proteína cinasa C se colocó en la delantera cuando esta enzima fue identificada como el receptor del promotor de tumores éster de forbol. La localización y asociación subcelular similar con fosfatidilserina de los receptores de éster de forbol y la proteína cinasa C, junto con los efectos rápidos de los ésteres de forbol sobre la proteína cinasa C, marcó una comparación directa. En 1982, Nishizuka y colaboradores publicaron el primer artículo el cual presentaba a los ésteres de forbol uniéndose y activando directamente a la proteína cinasa C; al siguiente año, varios grupos de investigación presentaron a los ésteres de forbol y a la proteína cinasa C co-purificados.

Al descubrir que la proteína cinasa C es directamente activada por ésteres de forbol, una avalancha de reportes sobre los efectos en las células llegaron a principios de los años 80s. El primer tema de coyuntura, se reportó por Anderson y colaboradores, quienes observaron en la redistribución de la proteína cinasa C del citosol a la membrana los resultados de la estimulación de ésteres de forbol. Esta translocación ha servido como parámetro de la activación de la proteína cinasa C; sin embargo en los últimos años se ha reportado que esta familia de cinasas presenta translocación a nuevos sitios celulares, como elementos del citoesqueleto, el núcleo y otros compartimientos subcelulares.

En las últimas dos décadas se ha realizado una gran cantidad de estudios de los mecanismos de activación de la proteína cinasa C. Esta familia de cinasas sirve como prototipo para entender cómo funciona una proteína que es finamente regulada por las interacciones de sus intradominios y con otras macromoléculas (Conn P. M. and Means. A. R., 2000).

1.2 Estructura general de la Proteína Cinasa C (PKC).

La familia de la proteína cinasa C está estrechamente relacionadas dentro de la célula con una amplia variedad de eventos biológicos y tiene funciones reguladores centrales en la proliferación y ciclo celular, diferenciación, tumorigénesis, apoptosis, remodelación del citoesqueleto, modulación de canales iónicos, secreción y transformación (Martelli A.M. *et al.*, 2006). La clonación de la proteína cinasa C reveló que es una familia de enzimas relacionadas, con 12 isoformas identificadas en mamíferos, con diferente expresión y especificidad de tejido, y localización subcelular. Comparten una estructura primaria común: un polipéptido único que abarca de los 70 a 90 kDa que comprende un dominio catalítico carboxilo terminal (COOH-terminal) de 45 kDa altamente conservado y un dominio regulador amino terminal (NH₂) de 40 kDa que contiene uno o dos módulos blanco de membrana los cuales a su vez contienen una región de enlace a ATP designada como C3 y un dominio de cinasa C4 que contiene el sitio de unión al sustrato y la región de transferencia de fosfato. Entre los dominios C1 y C4 se localizan 5 regiones variables (V1 -V5), donde la región V3 llamada región bisagra conecta al dominio regulador con el dominio catalítico. Los módulos blancos de membrana presentes en este dominio regulador, son de dos tipos, un dominio C1 y uno C2; el dominio C1 se une a diacilglicerol y a sus análogos funcionales, los ésteres de forbol. Este dominio también se une selectivamente al fosfolípido aniónico, fosfatidiserina. El dominio C2 une calcio (Ca²⁺) ya que presenta 5 residuos aspárticos los que se une este catión (Conn P. M. and Means. A. R., 2000).

Actualmente 12 isoformas de PKC han sido identificadas en mamíferos, los cuales comparten un requerimiento común por fosfolípidos, pero difieren en su estructura primaria, características bioquímicas y dependencia de otros activadores, lo que define la clasificación de las isoformas de PKC en tres subfamilias (Corbalán-García and Gómez-Fernández; 2006; Martelli A.M. *et al.*, 2006) (Figura 1):

- Las PKCs clásicas o convencionales (cPKC), $-\alpha$ (alfa), $-\beta_1$, $-\beta_2$ (beta I y beta II resultado de la edición alternativa de RNAm alternativo), y γ (gamma). Poseen un dominio conocido como C1, el cual se compone de dos subdominios de dedos de zinc ricos en cisteínas, haciendo a estas isoformas sensibles a segundos mensajeros como el diacilglicerol (DAG) o a sus análogos farmacológicos los ésteres de forbol. Junto a C1 existe un dominio de unión a Ca²⁺ llamado C2 el cual hace activas a estas isoformas de manera dependientes de Ca²⁺ (Corbalán-García and Gómez-Fernández., 2006; Martelli A.M. *et al.*, 2006).

- Las PKCs nuevas (nPKC), $-\delta$ (delta), $-\epsilon$ (épsilon), $-\eta$ / L(eta), $-\theta$ (theta) $-\mu$ (mu), y ν (nu) también contienen el dominio C1 por lo que son activadas por el diacilglicerol (DAG) y ésteres de forbol. El dominio C2 que presentan precede al dominio C1 en la secuencia primaria, pero este dominio C2 no responde a Ca²⁺ ya que carece de los 5 residuos aspárticos necesarios para la unión de Ca²⁺ lo que hace a estas isoformas independientes de este catión (Corbalán-García and Gómez-Fernández., 2006; Martelli A.M. *et al.*, 2006).

- Las PKCs atípicas (aPKC), $-\zeta$ (zeta), $-\iota/\lambda$ (iota/lamda) presentan una actividad catalítica independiente a diacilglicerol (DAG) y a Ca²⁺, probablemente porque el dominio regulador único que presentan carece de la región de unión a Ca²⁺ y solo posee un dominio de dedo de zinc rico en cisteínas de baja afinidad para DAG y por lo tanto

no puede ser activado por el DAG ni por ésteres de forbol, por lo que estas isoformas requieren para su actividad, fosfatidilserina, ácidos fosfatídicos y la fosforilación por cinasas dependientes de fosfoinosítidos (PDK1) (Martelli A.M. *et al.*, 2006; Moscat J. *et al.*, 2006). En lugar de ello, las PKCs atípicas contienen un dominio PB1 localizado en la región reguladora. Este dominio de aproximadamente 85 aminoácidos se une a otro dominio PB1 presente en otras proteínas tales como ZIP/p62, Par6 o MAPK5 a través de la interacción PB1-PB1 (Corbalán-García and Gómez-Fernández., 2006).

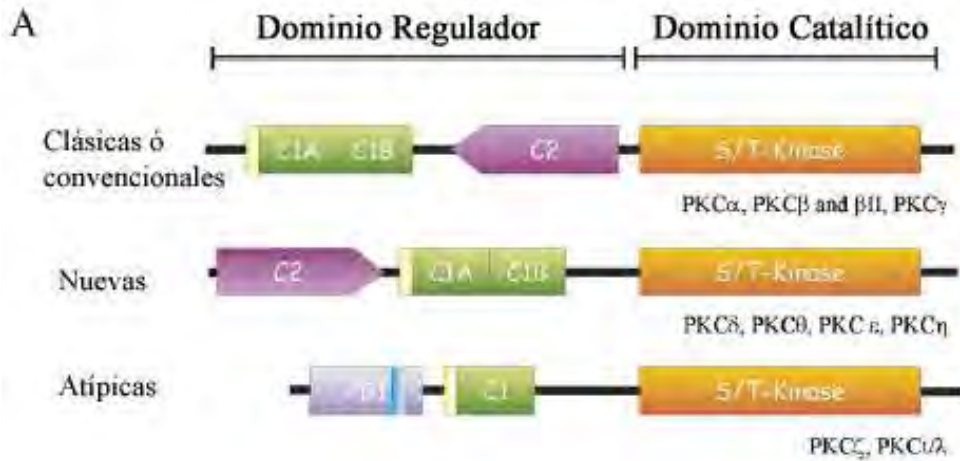


Figura 1. Representación esquemática de la estructura primaria de los miembros de la familia de la proteína cinasa C. Composición de los dominios de PKC. Estructura que muestra las tres clases de las isoformas de PKC. El dominio regulador está localizado en la región N-terminal que contiene varios dominios: el pseudosustrato (amarillo); el dominio C1 (verde); el dominio C2 (púrpura). El dominio PB1 contiene al motivo OPCA (OPC, repetición octicosapeptida; PC=OPR y AID, dominio de interacción de las PKCs atípicas), que adopta como un sitio de unión, que consiste de una secuencia consenso de 28 aminoácidos con residuos conservados ácidos e hidrofóbicos representada por una caja azul. Todas las cinasas tienen una base conservada (naranja) que presenta el sitio de unión a ATP, sustratos y fosfotransferasas. Esta familia de cinasas puede ser dividida en tres subfamilias dependiendo de su estructura primaria y propiedades bioquímicas. Las PKCs clásicas son reguladas por Ca^{2+} , fosfatidilserina y diacilglicerol. Las PKCs nuevas son reguladas por diacilglicerol y fosfolípidos ácidos y son independientes al Ca^{2+} . Las PKCs atípicas presentan un dominio C1 que no responde a Ca^{2+} ni al diacilglicerol por lo que son reguladas por fosfolípidos ácidos, ceramidas e interacciones proteína-proteína (imagen tomada y modificada de Corbalán-García and Gómez-Fernández., 2006).

1.3 Estructura del dominio regulador de la proteína cinasa C.

La proteína cinasa C es una proteína multimodular (figura 2) que está bajo una estricta regulación conformacional. La fosforilación y el enlace de cofactores inducen cambios conformacionales de largo alcance que regulan las interacciones entre intradominios, de los cuales el más importante es el enlace de la secuencia del pseudosustrato autoinhibitorio a la cavidad de enlace de sustrato. Una bisagra proteolíticamente lábil conecta el dominio regulador al dominio catalítico. La fisura en esta bisagra libera al dominio catalítico de la autoinhibición impuesta por el dominio regulador, es constitutivamente lo que lo hace estar constitutivamente activo. Es notable que la purificación de este dominio catalítico, del cerebro de bovino permitiera el descubrimiento de la proteína cinasa C (Newton A. C., 2001).

1.3.1 Dominio Regulador.

El dominio regulador fluctúa aproximadamente de 20 a 70 kDa según la isoforma de PKC, y contiene dos tipos de reguladores críticos: un dominio llamado pseudosustrato que se une a la cavidad de sustrato y actúa como un módulo auto-inhibitorio; y dos módulos blancos de membrana (C1 y C2) que reclutan a la proteína cinasa C a la membrana en la generación de diacilglicerol. La unión de las membranas a los módulos blancos de membrana proporciona la energía para liberar al pseudosustrato del sitio activo.

1.3.2 Pseudosustrato.

El pseudosustrato es un interruptor molecular en la regulación de la proteína cinasa C. Se ha identificado en casi todas las isoformas de proteínas cinasas C y se ha propuesto que en la ausencia de cofactores, éste se enlaza y bloquea estéricamente la cavidad de enlace del sustrato. La activación resulta de la liberación del pseudosustrato de esta cavidad. Consistente con esta hipótesis, el pseudosustrato es proteolíticamente lábil cuando PKC está activa, no obstante resiste a la proteólisis cuando la enzima es inactiva (Conn P. M. and Means. A. R., 2001).

Kemp y colaboradores originalmente identificaron una extensión de aminoácidos en la región reguladora de la PKC que tenía el marco clásico de un “pseudosustrato”. La secuencia se asemejaba al de un sustrato excepto una Alanina (Ala) que ocupaba la posición de fosfoaceptor. Encontraron que los péptidos basados sobre esta secuencia eran efectivos inhibidores competitivos de la proteína cinasa C, y que los péptidos modificados por una Serina (Ser) en la posición fosfoaceptora eran relativamente sustratos buenos de la enzima. La evidencia adicional de que esta secuencia aportaba un rol autoinhibitorio de Makowske y Rosen, quienes presentaron un anticuerpo que generaron contra la secuencia del pseudosustrato capaz de activar la proteína cinasa C en ausencia de cofactores, presumiblemente al retirar el pseudosustrato del sitio activo. Estos hallazgos apoyaron la hipótesis de que el pseudosustrato ocupaba la cavidad de enlace del sustrato de la proteína cinasa C, por lo tanto mantenía a la enzima en una conformación inactiva (Revisado en Newton A. C, 2001).

Extensos estudios bioquímicos establecieron que la proteína cinasa C es regulada alostéricamente por su pseudosustrato. Usando proteasas como pruebas conformacionales, se estableció que la activación de la proteína cinasa C es acompañada por la liberación de la secuencia de pseudosustrato del núcleo de la cinasa (Orr J. W *et al.*, 1992). Específicamente, el pseudosustrato de la proteína cinasa C es resistente a la proteólisis cuando la enzima es inactiva pero altamente susceptible a la proteólisis en una Arginina (Arg o R) específica cuando la enzima está activa. (Orr J. W. and Newton. A. C, 1994).

El modelaje molecular de la proteína cinasa C, basado en la estructura de cristal de la proteína cinasa A, sugiere que el pseudosustrato es mantenido en la cavidad de enlace del sustrato por una hendidura electrostática: la cavidad de enlace al sustrato tiene una carga negativa muy alta. Este potencial electronegativamente fuerte resulta, en parte, de un grupo conservado de residuos ácidos (EGEDEDE) que rodea la cavidad de enlace al sustrato; sin embargo la incógnita de cómo los cofactores causan la liberación del

pseudosustrato, es abordada con estudios recientes de energética donde se propone que los módulos membranales blanco en la membrana proveen la energía para liberar el pseudosustrato de la abertura electrostática localizada en el centro de la cinasa (Conn P. M. and Means. A. R., 2000).

1.3.3 Módulos blanco membranales.

Un gran número de enzimas de señalización toma ventaja de dos módulos de "direccionamiento" membranales para regular reversiblemente su distribución espacial. En varios casos, cada módulo se enlaza a las membranas con baja afinidad, con una estrecha unión lograda cuando ambos dominios son acoplados a la membrana. Cuando la afinidad de un módulo por membranas es dependiente de los cambios en la composición de la membrana (como la generación de segundos mensajeros lipídicos) o estructuras de proteínas (por ejemplo la fosforilación) la interacción con la membrana es reversiblemente regulada. La proteína cinasa C ha servido como un paradigma para la regulación reversible de la ubicación membranal por la regulación concertada de dos módulos blancos membranales (Newton A. C, 2001).

La función de estos módulos no sólo es regular el enlace membranal y por consiguiente la ubicación del pseudosustrato de la proteína cinasa C. Estudios con proteínas quiméricas han revelado que la naturaleza de los módulos reguladores pueden afectar la especificidad del sustrato y la función biológica de la proteína entera (Dekker. L. V. *et al.*, 1993; Biro. T. *et al.*, 1997) Además, los módulos reguladores aislados influyen la función celular: por ejemplo, la microinyección del dominio CIB en oocitos de *Xenopus* promueve la maduración meiótica y el dominio regulador de la proteína cinasa C modula la actividad de la fosfolipasa D. Por lo tanto, los módulos de direccionamiento membranales no sólo regulan la ubicación y equilibrio del pseudosustrato dentro y fuera del sitio activo sino también los parámetros funcionales adicionales que involucran a la proteína: las interacciones proteínicas (Newton A. C, 2001).

Dominio C1. El dominio C1 es una región rica en cisteínas de aproximadamente 50 residuos que están presentes en todas las isoenzimas de la proteína cinasa C. En las proteínas cinasas C convencionales y nuevas está presente como una repetición en tandem, llamada CIA y C1B (Newton., 2001). En el caso de las proteínas cinasas C atípicas, estas no contienen un dominio en tandem C1, solamente un dominio esta presente (Figura 1), referido como atípico porque ésta no se enlaza a diacilglicerol ni a ésteres de forbol. En el caso de PKC ζ y λ/ι este dominio ha sido implicado en la interacción con ceramida e interacciones proteína-proteína (Corbalán-García and Gómez-Fernández., 2006).

La determinación de las estructuras de cristal y de resonancia magnética nuclear del dominio C1B revelaron que es un dominio globular con dos hojas plegadas desmontadas formando la cavidad de enlace al ligando (Zhang. G. *et al.*, 1995; Hommel. U. *et al.*, 1994) (Figura 2). Dos átomos de Zinc (Zn^{2+}) son coordinados por residuos de Histidina (His o H) y Cisteína (Cis o C) en los extremos opuestos de la secuencia primaria, ayudando a estabilizar el dominio. En dominios atípicos, una cara de la cavidad de enlace al ligando está comprometida y el módulo no puede enlazarse a ésteres de forbol o a diacilglicerol (Newton., 2001).



Figura 2. Estructura del dominio C1B de PKC δ . Diagrama de listón mostrando la estructura cristalográfica de rayos X de los residuos 231-280 en el dominio C1B de PKC δ uniéndose con ésteres de forbol determinado por Hurley y colaboradores. Los ésteres de forbol se muestran en naranja; las esferas rojas representan los 2 átomos de Zinc (imagen tomada y modificada de Newton., 2001).

Dominio C2.

El dominio C2 es miembro de la superfamilia de dominios C2 que se unen a Ca²⁺/lípidos (sus siglas en inglés CaLB: Ca²⁺/ lipid-binding) (Corbalán-García and Gómez-Fernández., 2006). El dominio C2 no solo se encuentra en PKCs clásicas y nuevas, también en un gran número de proteínas diferentes a las proteínas cinasas C (Nalefski. E. A. and Falke. J. J., 1996). Los dominios C2 fueron descritos como los segundos de los cuatro dominios funcionales conservados hallados en las isoformas de PKC α , β y γ dependientes de Ca²⁺ de mamíferos (Corbalán-García and Gómez-Fernández., 2006).

Estos dominios están clasificados como topología I o topología II dependiendo de la orientación y la conectividad de las hojas plegadas- β que forman el dominio. De este modo, la primera hebra en el dominio C2 con topología I (convencional) ocupa la misma posición estructural que la octava hebra - β en el dominio C2 con topología II (nueva). Como resultado, los dominios con topología II representan una permutación circular de aquellos que tienen la topología I. De esta forma, el amino y carboxilo terminal están localizados en la cima del dominio de topología tipo I y en el fondo del dominio de la topología tipo II. La razón para estas dos topologías en los dominios C2 permanece incierta (Nalefski E.A and Falke.J.J., 1996; Rizo. J. and Sudhof. T.C., 1998) (Figura 4).

El dominio C2 presente en las isoformas clásicas de PKC es un módulo globular de aproximadamente 130 residuos, rico en hojas plegadas β , con asas formadas por secuencias en los extremos opuestos de la estructura primaria viniendo juntos para formar una cavidad (Sutton. R. B *et al.*, 1995). En el dominio C2 sensible a Ca²⁺ (Ca²⁺) (Figura 3), esta cavidad es alineada por cinco residuos de ácido aspártico que coordinan a 2 ó 3 iones de Ca²⁺ (Sutton. R. B. and Sprang, S. R., 1998). En los dominios C2 de las isoformas de PKC nuevas, los residuos de ácido aspártico están ausentes, por lo que no se enlazan a Ca²⁺ (Pappa. H. *et al.*, 1998).



Figura 3. Estructura del dominio C2 de PKC α . El modelo de listón muestra la estructura cristalográfica de rayos X de los residuos 157-289 del dominio C2 de PKC α . Esta estructura fue descrita por Sprang y colaboradores (Sutton. R. B. and Sprang, S. R., 1998). Los 5 aspartatos son presentados en barras azul marino, y los tres iones de Ca $^{2+}$ son mostrados por esferas naranjas. Ambas estructuras son coloreadas para indicar la conectividad de las hebras: del amino terminal en azul al carboxilo terminal en rojo (imagen tomada y modificada de Newton., 2001).

El rol principal del dominio C2 en las PKCs convencionales es actuar como motivo blanco de membrana activado por Ca $^{2+}$ (W. Cho and R.V. Stahelin., 2005; Nalefski E.A and Falke. J.J., 1996; Rizo. J. and Sudhof. T.C., 1998; Verdaguer. N. *et al.*, 2004). Sin embargo, las PKCs nuevas también contienen el dominio C2 de topología tipo II que en algunos casos se une a fosfolípidos cargados negativamente de manera independiente al Ca $^{2+}$, y en otras ocasiones, media las interacciones proteína-proteína (Corbalán-García and Gómez-Fernández., 2006).

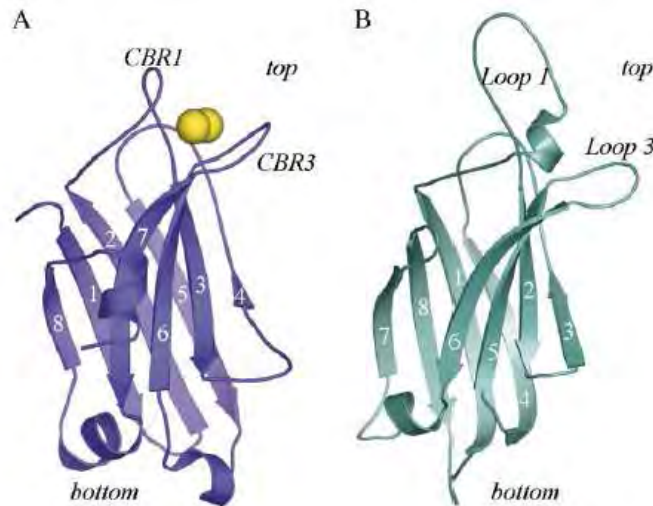


Figura 4. Diagramas de listón de las estructuras del dominio C2 de PKC α (A) y PKC ϵ (B) como miembros representativos de la topología I y II respectivamente. Las dos diferentes topologías resultan de una permutación circular de las hebras β que dejan el amino terminal y el carboxilo terminal en la cima o en el fondo del sándwich- β , respectivamente. Es importante notar que el área de interacción membranar está localizada en la cima de cada dominio independientemente de la topología exhibida (Figura tomada y modificada de Corbalán-García and Gómez-Fernández., 2006).

Para las PKCs clásicas, la coordinación de Ca^{2+} en los dominios C2 provoca un incremento dramático en la afinidad de la proteína cinasa C por las membranas aniónicas. Esta interacción membranal muestra una insignificante selectividad por las cabezas de fosfolípidos, más allá de los requerimientos por la carga negativa. El sitio de enlace a Ca^{2+} tiene un alto potencial electrostático negativo, que es neutralizado eficazmente al unirse el Ca^{2+} . Sin embargo esta neutralización de cargas no es suficiente para efectuar el enlace membranal durante la mutación de los residuos de ácido aspártico que no promueven el enlace membranal (Edwards. A. S. and Newton. A. C., 1997) y los dominios C2 de las isoformas nuevas que carecen de estos residuos de ácido aspártico no se enlazan constitutivamente a las membranas aniónicas. Además, la coordinación actual de Ca^{2+} es requerida para el enlace membranal, sugiriendo que el Ca^{2+} actúa como un puente entre el dominio C2 y las cabezas de fosfolípidos.

Los dominios de las PKCs clásicas funcionan claramente como una ancla membranal regulada por Ca^{2+} , la función de los dominios C2 de las PKCs nuevas, al igual que los dominios de las PKCs atípicas permanece desconocida. Una posibilidad atractiva es que estos módulos independientes de ligandos controlan la distribución de la proteína cinasa C, vía interacciones proteína-proteína (Newton., 2001).

1.4 Dominio catalítico o de cinasa.

El dominio catalítico de aproximadamente 45 kDa es altamente conservado, contiene la región C3 de unión a ATP y la región C4 de cinasa que contiene los sitios conceso de fosforilación, este dominio interactúa con los sustratos, y es responsable de la actividad de fosfo-transferencia. El dominio C3 esta presentes en todas la isoformas (Kuo-Ping., 1989).

La región C3 contiene la secuencia Gly-X-Gly-X-X-Gly-X16- Lys (donde X representa cualquier aminoácido), que es típica para los sitios de unión con ATP. Esta secuencia es muy similar para todas las isoformas excepto para la PKC η en la cual el tercer residuo de glicina es reemplazado por Alanina.

La región C4 está constituida por todos los grupos de secuencias que son únicas en todas las isoformas de proteínas cinasas C. Estas secuencias son: Gly-Gly-Asp-Leu-Met, Try-Arg-Asp-Leu-Lys-Leu-Asp-Asn y Thr-Phe-Cys-Gly-Thr-Pro y constituyen la llamada asa de activación. Su presencia es crucial para el reconocimiento del sustrato proteico y está involucrada en la reacción de la transferencia del grupo fosfato. En las isoformas μ y ν existen pequeños cambios que hacen que su especificidad sea distinta.

El dominio catalítico tiene aproximadamente 40% de identidad en su secuencia de aminoácidos con el de la proteína cinasa A (Orr J. W. and Newton. A. C, 1994), difiriendo principalmente en su secuencia carboxilo terminal (Newton., 2001). La proteína cinasa C ha permanecido refractaria a la cristalografía, sin embargo el modelaje molecular de esta enzima se ha basado en la estructura resuelta de la proteína cinasa A, y ha sido usada para identificar a los residuos expuestos de la superficie. Como es esperado, los residuos mantienen el plegamiento del dominio catalítico o son importantes en la catálisis, con diferencias en residuos encontrados principalmente sobre la superficie de la proteína (Newton., 2001).

La secuencia de la proteína cinasa A termina con una fenilalanina (Phe) que se arroja dentro de la proteína. Todas las isoenzimas de la proteínas cinasas C tienen esta fenilalanina (Phe) la cual es seguida inmediatamente por un sitio de fosforilación conservado llamado “motivo de fosforilación hidrofóbico”. Este motivo de fosforilación es seguido por una secuencia corta única de cada isoenzima la cual es crítica en la regulación de la proteína cinasa C; se forma el sitio de anclaje para la cinasa, PDK-1 que como se describirá más adelante, y, como tal, es esencial para la función de la enzima. Esta secuencia también regula críticamente la distribución subcelular de la proteína cinasa C. Fields y colaboradores encontraron que trece residuos del carboxilo terminal dictan la translocación nuclear y la función biológica de la proteína cinasa C β II. (Gokmen-Polar. Y. and Fields. A. P., 1998; Newton., 2001).

1.5 Mecanismos de regulación

La proteína cinasa C está bajo una regulación espacial y estructural intensa. Su estado de fosforilación, conformación, y localización subcelular tienen que ser controlados precisamente para su función fisiológica. Por lo tanto, esta proteína debe estar procesada por fosforilación, tener su pseudosustrato expuesto, y estar localizada en la zona intracelular correcta. Las perturbaciones en cualquiera de estos puntos de la regulación desorganiza la señalización por la cinasa (Newton., 2001).

A pesar del gran número de isoformas de la proteína cinasa C, y la expresión de múltiples isoenzimas en la misma célula, cada PKC parece tener su propia función entonces ¿Cómo es que se controla la especificidad de cada isoenzima? Los activadores originales de PKC son fosfatidilserina, iones calcio y diacilglicerol. Los mediadores lipídicos adicionales, que incluyen ácidos grasos y lisofosfolípidos también permiten la actividad catalítica. Puesto que estos mediadores afectan la actividad catalítica de cada isoforma de PKC, representan un mecanismo para la regulación específica de las isoformas. La habilidad de los diferentes estímulos fisiológicos para translocar selectivamente a las isoformas a distintos compartimentos subcelulares es un mecanismo adicional por el cual las células pueden regular, dónde, cuándo, y qué PKCs actúan. Newton y colaboradores reportan que la fosforilación en serina/treonina define la “maduración”, como necesaria para la capacidad catalítica y para la localización subcelular correcta de las isoformas de PKC. Estos estudios demuestran que la función fisiológica específica de cada PKC es regulada por tres eventos: “*maduración, activación catalítica y localización*” (Shirai Y. and Saito N., 2002) (Figura 5).

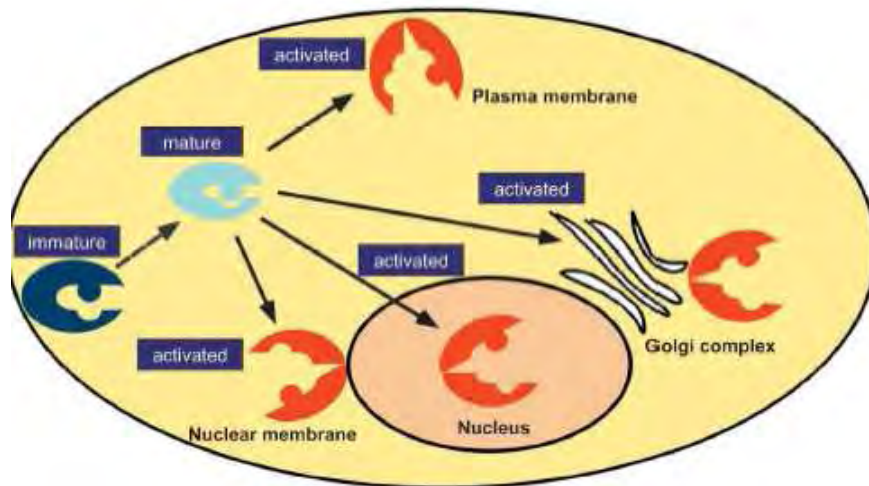


Figura 5. Vista general de la activación de PKC. Las funciones fisiológicas de PKC son controladas por tres eventos: *maduración*, *activación catalítica* y *localización*. Las PKCs inmaduras recién traducidas (en azul marino) no son catalíticamente competentes. La maduración de PKC se lleva a cabo mediante una transfosforilación en su asa de activación por la PKDK-1, la que resulta en una autofosforilación en el extremo carboxilo de PKC. Estas fosforilaciones producen la PKC catalíticamente competente o madura. En la estimulación de varios receptores, esta PKC madura puede ser activada catalíticamente por varios activadores y trasladada a compartimentos subcelulares específicos incluyendo la membrana plasmática, el aparato de Golgi y la membrana nuclear (presentadas en rojo) (Figura tomada de Shirai Y. and Saito N., 2002).

1.5.1 Maduración.

La maduración es la fosforilación ordenada de serinas/treoninas que procesan las isoformas de la PKC, que son requeridas para que la enzima gane capacidad catalítica y una correcta localización subcelular. Aquellas enzimas que no se fosforilan se acumulan en la fracción insoluble de las células y no son competentes para señalizar (Newton., 2001).

La proteína cinasa C es procesada por tres eventos de fosforilación para ser competente y así responder a segundos mensajeros. Particularmente esta enzima es primero fosforilada en el “loop de activación” o “asa de activación” por otra cinasa, la “cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos” (PDK-1), posteriormente le siguen dos eventos ordenados de autofosforilación en el carboxilo terminal, uno sobre el motivo de vuelta (turn motif) y el segundo sobre el motivo conservado hidrofóbico de fosforilación o (hydrophobic motif). Se piensa que las fosforilaciones en estos dos sitios del carboxilo terminal adecuan a la enzima en una conformación cerrada, estabilizada, catalíticamente competente, y resistente a proteasas y fosfatasas (Flores Robles et al., 2008).

Un ejemplo donde se lleva a cabo esta serie de fosforilaciones es en la isoforma PKC β II, el primer paso en su maduración es la fosforilación de la treonina 500 en la entrada al sitio catalítico, “la asa de activación” llevada a cabo por PDK-1 (Newton., 2001). Esta fosforilación alinea al sitio activo lo cual permite la subsecuente autofosforilación sobre la Treonina 641 en el “motivo de vuelta” o “turn motif” y la Serina 660 en el “motivo hidrofóbico” llamado así por estar flanqueado por residuos hidrofóbicos (Shirai Y. and Saito N., 2002) (Figura 6).

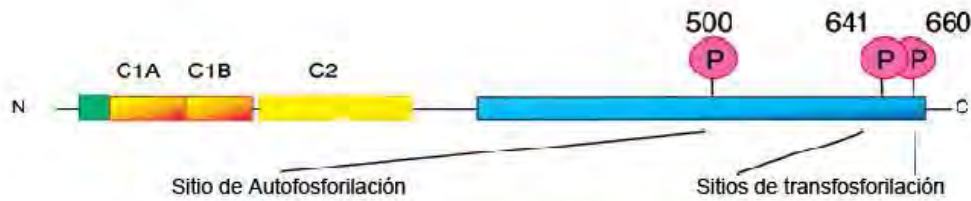


Figura 6. Esquema donde se muestra el asa de activación, el motivo de cambio (turn), y el motivo hidrofóbico, los cuales son sitios de fosforilación en las isoformas de PKC para su maduración. En el esquema de PKC β II se presentan las posiciones relativas de los sitios de fosforilación (Figura tomada y modificada de Newton., 2001).

Las fosforilaciones descritas anteriormente son conservadas entre las isoenzimas de la proteína cinasa C y son requeridas para la función de las enzimas. Sin embargo, una vez que la serina y la treonina del carboxilo terminal son fosforiladas, las enzimas asumen su conformación madura, y subsecuentemente la desfosforilación de la Treonina del asa de activación no altera su habilidad para ser activada y/o para translocar. En contraste, la desfosforilación de la Serina/Treonina en el motivo de vuelta (turn motif) anula la actividad de cinasa, lo que sugiere que estos residuos son críticos para la activación (Shirai Y. and Saito N., 2002).

Los sitios de fosforilación son conservados entre las isoenzimas de la PKC, sugiriendo que todas las PKCs maduran vía rutas similares (Figura 7). Las excepciones son las PKC atípicas y la isoforma nueva PKC δ . Las PKCs atípicas tienen un ácido glutámico (Glu o E) en lugar de un serina o una treonina en el motivo hidrofóbico. En la PKC δ , la treonina 505 en el asa de activación no es necesaria para su actividad catalítica, porque la carga negativa en la asa de activación es compensada por un Glu500. La serie de fosforilaciones son requeridas para la habilidad catalítica y la localización de las PKCs en el estado de reposo. Por lo tanto, esto representa uno de los pasos limitantes para la activación de la PKC (Newton., 2001; Shirai Y. and Saito N., 2002; Gschwendt. M., 1999).

Está claro que el estado de fosforilación de PKC determina su actividad catalítica así como las interacciones con otras proteínas que pueden regular su localización subcelular.

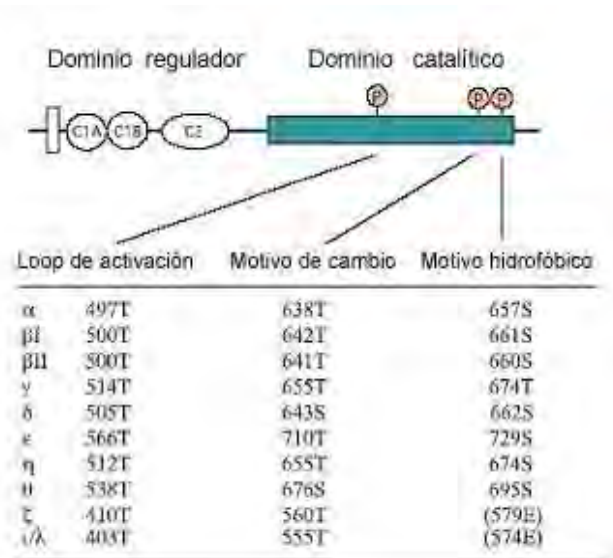


Figura 7. Posiciones de los residuos conservados de serina/treonina en el asa de activación, el motivo de cambio, y motivo hidrofóbico de las 10 isoformas de PKC en mamíferos (Figura tomada y modificada Shirai Y. and Saito N., 2002).

1.5.2 Activación catalítica.

El distintivo de la activación de la proteína cinasa C en la célula es su translocación. El descubrimiento de la proteína cinasa C como el receptor para ésteres de forbol inició un aumento de los estudios sobre los efectos de los ésteres de forbol que fueron vinculados por un tema conector: la redistribución de la Proteína Cinasa C del citosol a la membrana (Newton., 2001; Conn P. M. and Means. A. R., 2000).

Los estudios iniciales de la proteína cinasa C se enfocaron en su requerimiento de cofactores para su activación, y tres activadores clásicos fueron identificados: fosfatidiserina, Ca^{2+} y diacilglicerol. Estudios posteriores vincularon los requerimientos para activar, a la habilidad de promover el enlace membranal. Los estudios bioquímicos y biológicos sobre la PKC, han establecido los roles centrales de los dominios C1 y C2 en una redistribución espacial y orquestada la cual permite su activación (Newton., 2001).

La activación de la proteína cinasa C depende de la liberación del pseudosustrato de la cavidad de unión al sustrato. El rol de los cofactores es permitir que se lleve a cabo este cambio conformacional. Específicamente, el enlace de los ligandos a ambos dominios C1 y C2 (para las isoformas convencionales y nuevas de la proteína cinasa C) proporcionan la energía para romper las interacciones electrostáticas entre el pseudosustrato básico y la cavidad ácida de unión al sustrato. Pero ¿por qué hay dos módulos blancos de membrana? La proteína cinasa C puede ser reclutada a la membrana solamente por uno u otro de los módulos. Sin embargo, la unión mediada por cualquiera de los módulos C1 o C2 es muy débil para proporcionar la energía para liberar el pseudosustrato. Ambos dominios deben estar enlazados a la membrana por interacciones de alta afinidad que resultan en la liberación del pseudosustrato. Por lo tanto la naturaleza ha asegurado especificidad en la activación de la proteína cinasa C por unión membranal tomando ventaja del el “sinergismo” (enlace constante múltiples)

de tener dos puntos de adhesión membranal (figura 8). Esto también asegura reversibilidad: el metabolismo de diacilglicerol resulta en la pérdida de un punto de adhesión, con la interacción del dominio C2 llega a ser muy débil para activar a la proteína. Un gran número de moléculas de señalización usan dos anclas membranales para lograr alta afinidad y adhesiones membranales reversibles (Conn P. M. and Means. A. R., 2000).

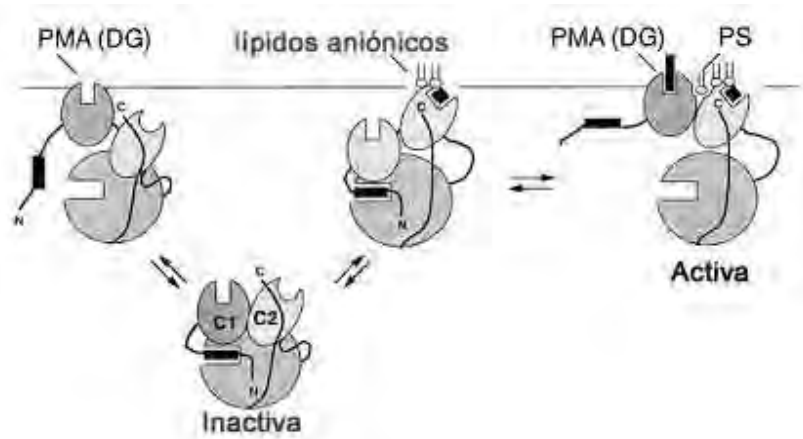


Figura 8. Modelo de la regulación de PKC por sus dos módulos blanco membranales. El pseudosustrato (rectángulo negro) ocupa el sitio activo/cavidad de unión al sustrato (rectángulo abierto) del dominio catalítico (círculo gris grande) de la PKC, de este modo bloquea estéricamente la unión al sustrato, manteniendo a la PKC en una forma inactiva. En esta conformación, la región de bisagra separa al dominio regulador del dominio catalítico protegiendo a la PKC de la proteólisis (línea en forma de S). La enzima puede ser reclutada a las membranas ya sea por el dominio C1 (izquierda) o el dominio C2 (parte media derecha). Izquierda: El reclutamiento por el dominio C1 es mediado por el DAG y los ésteres de forbol, ocurre en ausencia de lípidos aniónicos, no causa un cambio detectable en la conformación de región de bisagra, y resulta solo en una activación débil de la PKC (esta interacción es fisiológicamente improbable que suceda ya que todas las membranas celulares contienen lípidos aniónicos). Centro: El reclutamiento por el dominio C2 está mediado por lípidos aniónicos, es regulado por el Ca^{2+} en isoformas clásicas y resulta en una interacción membranal que es muy débil para liberar al pseudosustrato del sitio activo. Derecha. La activación de la PKC resulta cuando ambos dominios C1 y C2 se unen a las membranas. La energía de interacción es más grande que la obtenida de las interacciones separadas del dominio C1 y C2, porque cuando ambos dominios están unidos a la membrana hay un reconocimiento adicional y selectivo por la fosfatidiserina. La energía suministrada por la unión con el DAG y la fosfatidiserina ayuda al rompimiento de las interacciones electrostáticas entre el pseudosustrato básico y la cavidad de unión del sustrato, resultando en la liberación del pseudosustrato y la activación de la PKC. En resumen, la PKC puede ser reclutada a la membrana ya sea por el dominio C1 o C2, pero ambos dominios tienen que estar unidos en orden para liberar al pseudosustrato de la cavidad del sitio activo (imagen tomada y modificada de Newton, A. C. and Johnson J. E., 1998).

1.5.2.1 Fosfatidilserina.

La actividad catalítica de todas las isoformas de PKC es regulada por fosfatidilserina (PS), que es un aminofosfolípido encontrado exclusivamente sobre la cara citoplasmática de la membrana. La proteína cinasa C es perfectamente activa en presencia de fosfatidilserina la cual es esencial para la actividad máxima. Esta actividad con PS parece ser la mayor responsable para liberar el pseudosustrato de la cavidad de unión al sustrato. Se piensa que se une a cualquiera de los dominios C1 y C2 pero los sitios de enlace específicos no han sido identificados (Conn P. M. and Means. A. R., 2000). La estructura de cristal del dominio C2 de PKC α en la presencia de Ca^{2+} y PS revela una cadena corta de PS que es coordinada en el dominio C2. Además, la unión de

PS al subdominio C1B de PKC β II también ha sido reportada. Sin embargo son necesarios estudios adicionales para determinar cómo la PS interactúa con cada isoforma (Shirai Y. and Saito N., 2002).

Estudios de unión a ligandos (‘‘binding’’) revelaron que, en la ausencia de diacilglicerol, la PKC desarrolla poca selectividad por fosfatidilserina comparada con otros lípidos aniónicos monovalentes. Sin embargo, la presencia de diacilglicerol causa que la proteína cinasa C se enlace a superficies que contienen fosfatidilserina con una orden de afinidad de altísima magnitud en comparación con las membranas compuestas de otros lípidos aniónicos. De este modo, el reconocimiento de fosfatidilserina depende del dominio C1. La estimulación por fosfatidilserina es estereo-específica para sn-1,2-fosfatidil-L-serina. Al mismo tiempo, se ha sugerido que este requerimiento surgió de las propiedades estructurales membranales únicas de la fosfatidilserina que optimizan la superficie de la membrana para la unión de la PKC. Estudios con membranas enantioméricas han establecido que el requerimiento estereoespecífico resulta de los determinantes moleculares de la PKC reconociendo el tamaño de la molécula de fosfatidilserina (Johnson. J. E. *et al.*, 1998; Newton., 2001).

Estudios preliminares se enfocaron en el dominio C2, al que se le confirió sensibilidad a la fosfatidilserina. Sin embargo las mutaciones hechas en este dominio, incluyendo un motivo de enlace a fosfatidilserina, no tuvo el efecto suficiente sobre la selectividad de la fosfatidilserina de la proteína entera (Johnson. J. E *et al.*, 1997). Otros estudios con el dominio aislado de la proteína cinasa β II han recapitulado la especificidad de la fosfatidilserina inducida por diacilglicerol en el dominio aislado C1B. Específicamente, el dominio aislado C1B se enlaza a las membranas aniónicas que contienen 2% de moléculas de éster de forbol con 15 pliegues de altísima afinidad si el lípido aniónico es fosfatidilserina comparado con el fosfatilglicerol. De acuerdo con este hallazgo, el dominio C1 está presente en todas las isoformas de la proteína cinasa C. Los determinantes exactos en el dominio C1 que reconocen a la fosfatidilserina faltan ser determinados (Bittova. L. *et al.*, 2000; Newton., 2001).

1.5.2.2 Diacilglicerol (DAG) y éster de forbol.

El diacilglicerol y los ésteres de forbol regulan a la PKC al incrementar dramáticamente la afinidad membranal de la enzima, sirviendo como ‘‘pegamentos moleculares’’ para reclutar a la PKC a las membranas. Ambos ligandos regulan a la proteína cinasa C, sin embargo difieren en los mecanismos para hacerlo, consecuentemente, pueden tener efectos biológicos muy diferentes por dos razones. La primera es el reclutamiento y la activación membranal iniciada por diacilglicerol que es de vida corta y rápidamente metabolizada; cuando una hormona por ejemplo la epinefrina se une a su receptor específico en este caso el receptor α_1 adrenérgico localizado en la membrana plasmática, se forma el complejo receptor-hormona el cual cataliza el intercambio de GTP-GDP a una proteína G asociada, G_q . La G_q activada a su vez activa a una fosfolipasa C específica enlazada a membrana, la cual cataliza la producción de dos segundos mensajeros al hidrolizar al fosfatidilinositol 4,-5-bisfosfato en la membrana plasmática en Diacilglicerol e inositol 1,4,5-trisfosfato, o IP_3 . El inositol trisfosfato (IP_3) se difunde de la membrana plasmática hacia el retículo endoplasmático, donde este se une a receptores específicos de IP_3 y causa que los canales de Ca^{2+} dentro del R.E se abran. El Ca^{2+} secuestrado es entonces liberado al citosol. La $[Ca^{2+}]$ citosólica se eleva aproximadamente a 10^{-6} M. El Diacilglicerol y el Ca^{2+} activan a la proteína cinasa C.

Entonces la PKC activada fosforila a sus proteínas celulares blanco cambiándoles sus actividades catalíticas (Nelson, L. David and Cox M. Michael., 2000) (figura 9). La segunda razón es que, en contraste, los ésteres de forbol no son fácilmente metabolizados y por lo tanto resultan en una activación constitutiva de la PKC, además los ésteres de forbol son más potentes, por varios órdenes de magnitud, que el diacilglicerol, sobre una base molar, en reclutar a la PKC hacia las membranas (Newton., 2001; Conn P. M. and Means. A. R., 2000).

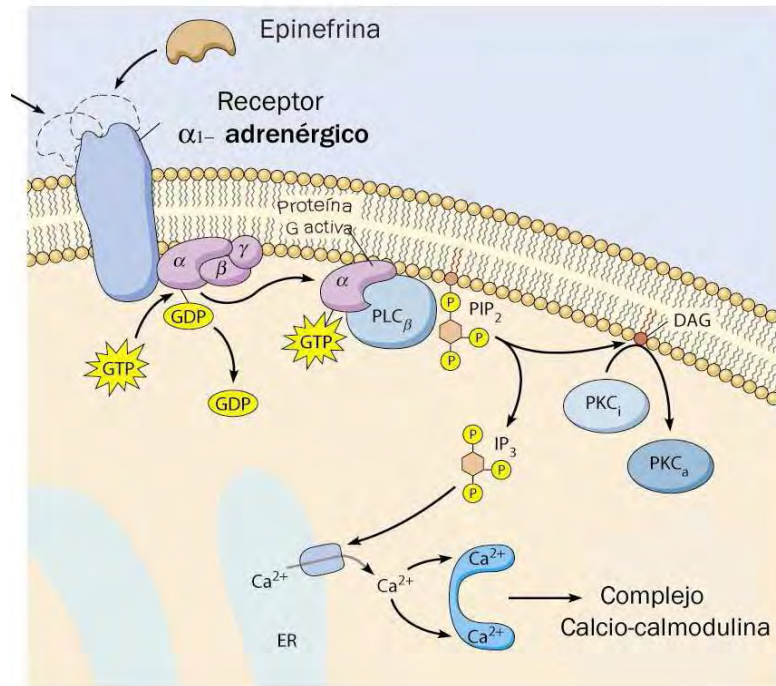


Figura 9. Ruta del Inositol-fosfolípido-Calcio $^{2+}$, iniciada por la activación del receptor α_1 - adrenérgico (imagen tomada y modificada de <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-14/CB14.html>, 2009).

El diacilglicerol y los ésteres de forbol (figura 10) activan a las proteínas cinasas C convencionales y nuevas al unirse al dominio C1. El dominio C1 de las PKCs convencionales y nuevas tiene dos dominios ricos en cisteínas (C1A y C1B), cada uno contiene aproximadamente 50 aminoácidos incluyendo seis cisteínas y dos residuos de histidinas (His o H) arregladas en un motivo de dedo de zinc. Las PKCs atípicas carecen de uno de los dos dominios ricos en cisteínas y por lo tanto son insensibles a la activación por estos compuestos (Shirai Y. and Saito N., 2002).

El diacilglicerol es un segundo mensajero lípido y hay dos tipos de DAG que parecen ser importantes para la activación fisiológica de la PKC. Uno es rápidamente producido a través de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) siguiendo la activación de los receptores acoplados a proteínas G. El otro es resultado de la hidrólisis de la fosfatidilcolina (PC) vía fosfolipasa D. Esta última producción de diacilglicerol ocurre más lento y es más continuo. Además de las diferencias temporales, la composición de los ácidos grasos del diacilglicerol es diferente dependiendo del fosfolípido del cual sea liberado. Interesantemente, las isoformas de la proteína cinasa C son diferencialmente sensibles a la composición de los ácidos grasos del diacilglicerol. Por lo tanto la composición del diacilglicerol y su liberación temporal pueden regular la activación selectiva de las isoformas (Shirai Y. and Saito N., 2002).

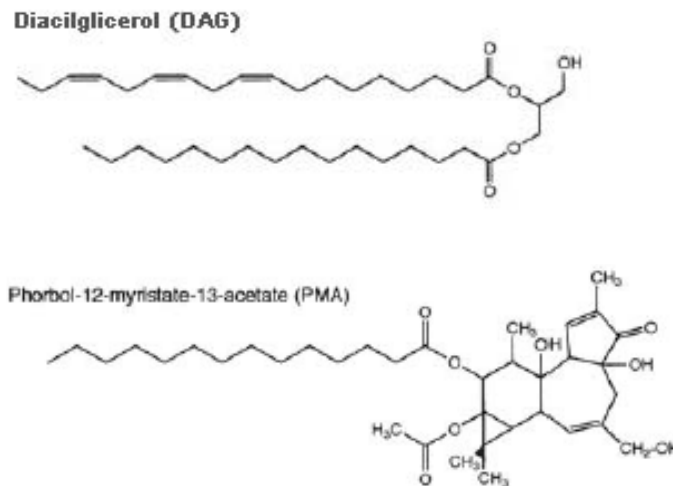


Figura 10. Estructura química del Diacilglicerol (DAG) y del 12 forbol -13-miristato acetato (PMA). El diacilglicerol (DAG) y los ésteres del forbol (como el PMA) activan a las PKCs clásicas y nuevas al unirse a su dominio C1 (figura tomada y modificada de Becker K.P. and Hannun. Y. A., 2005).

Por otro lado, la considerable potencia de los ésteres de forbol es ilustrada por el hallazgo de que 2 mol % de éster de forbol (2 moléculas de éster de forbol por 98 moléculas de lípidos) incrementa la afinidad de la proteína cinasa C por membranas que contienen fosfatidilserina por 4 órdenes de magnitud (Newton., 2001). Como resultado de esta unión de alta afinidad los ésteres de forbol son capaces de reclutar a la proteína cinasa C por el dominio C1 solo, a membranas neutras, en la ausencia de cualquier interacción con el dominio C2 (Conn P. M. and Means. A. R., 2000).

Análisis estructurales han revelado elegantemente el mecanismo de este pegamento molecular. Como se mencionó anteriormente, la ocupación de la cavidad de unión al sustrato por el pseudosustrato, resulta en la exposición de una superficie hidrofóbica continua (Zhang. G. *et al.*, 1995). Por lo tanto, los ligandos del dominio C1 reclutan a la proteína cinasa C al alterar las propiedades de la superficie del dominio para favorecer la penetración de la membrana (Newton., 2001).

Varias isoformas de la proteína cinasa C contienen dos dominios C1, el C1A y el C1B. Por lo tanto, los ésteres de forbol pueden regular a la proteína cinasa C por los dominios C1 (ambos simultáneamente), para algunas isoformas como la PKC α , pero sólo a través del dominio C1B en otras isoformas como la PKC δ (Newton., 2001).

1.5.2.3 Ácidos grasos.

Los ácidos grasos son conocidos por activar a las isoformas de la PKC de manera específica. Por ejemplo, los ácidos grasos saturados poseen una cadena larga de carbonos que activan a las PKCs α, β, γ y ϵ *in vitro*; y este efecto es permitido por la co-presencia de diacilglicerol (DAG). Similarmente, los ácidos grasos no saturados tales como el ácido araquidónico y el ácido oleico estimulan a las PKCs γ, ϵ . En contraste, la PKC δ no es activada por ácidos grasos saturados y es inhibida por el ácido araquidónico (Nishizuka. Y., 1995; Shirai Y. and Saito N., 2002).

1.5.2.4 Ceramida.

La ceramida es un potente segundo mensajero lípido que media una variedad de efectos celulares, incluyendo la diferenciación celular y apoptosis. La ceramida puede ser producida en la célula ya sea del rompimiento de la esfingomielina por la esfingomielinasa (SMasa) ó por la síntesis por la ceramida sintasa. Es también un modulador de la actividad de la PKC, aunque sus efectos son controversiales. Por ejemplo, la ceramida a baja concentraciones activa a la PKC α y a altas la inhibe o no tiene efecto sobre la actividad de cinasa (Figura 11) (Shirai Y. and Saito N., 2002; Becker K. P. and Hannun Y. A., 2005).

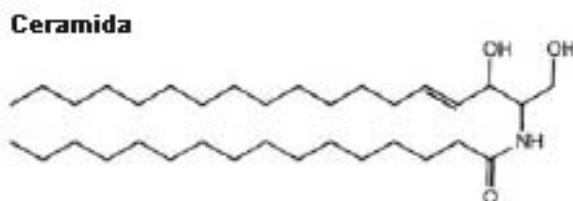


Figura 11. Estructura química de la Ceramida. Es un potente segundo mensajero lípido que media una variedad de efectos celulares (figura tomada y modificada de Becker K.P. and Hannun. Y. A., 2005).

1.5.2.5 Otros lípidos.

El sulfato de colesterol es un lípido del tejido epidérmico y un metabolito del colesterol formado durante la diferenciación del epitelio escamoso. Se ha reportado que activa selectivamente a la PKC η (Becker K. P. and Hannun Y. A., 2005).

El ácido fosfatídico (PA) (figura 12) se produce en la célula como un producto de la hidrólisis mediada por fosfolipasa D (PLD) o por la directa fosforilación del diacilglicerol por la diacilglicerol cinasa. En investigaciones de regulación de lípidos en las isoformas clásicas de PKC, se ha demostrado la habilidad del PA para sustituir a la fosfatidilserina (PS) en la activación de PKC. Por otra parte, hay evidencias de un posible rol del PA como un activador primario para los miembros de la familia atípica de la proteínas cinasa C. La activación de las PKCs atípicas ζ , medida por autofosforilación, se ha demostrado en extractos de células COS, y en la sobre expresión de PKC ζ tratada con PA (Becker K. P. and Hannun Y. A., 2005).

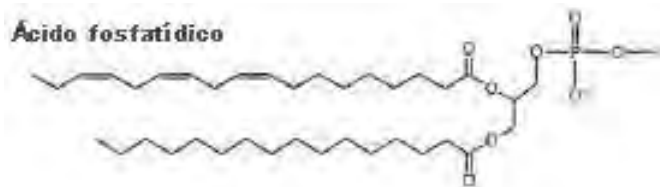


Figura 12. Estructura química del Ácido fosfatídico. Es un posible activador primario para los miembros de la familia atípica de la proteínas cinasa C (figura tomada y modificada de Becker K. P. and Hannun. Y. A., 2005).

Los lisofosfolípidos tales como la lisofosfatidilcolina (LPC) también incrementan la actividad de la proteína cinasa C. La LPC incrementa la actividad de las PKCs convencionales pero no de las PKCs nuevas. Otros lípidos que modifican la actividad de la proteína cinasa C incluyen fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato y el fosfatidilinositol 3, 4,5-trifosfato. Estos compuestos activan a las PKCs $\epsilon, \eta, \text{y } \zeta$ pero no a las convencionales PKC $\alpha, \beta I, \beta II, \text{ y } \gamma$ (Shirai Y. and Saito N., 2002).

Tomando estos datos se demuestra que el diacilglicerol (DAG) no es el único lípido con propiedades activadoras de PKC. Otros lípidos exhiben efectos selectivos sobre diferentes isoformas de la proteína cinasa C, por lo tanto proporcionan un mecanismo imperfecto para la activación selectiva de isoformas (Shirai Y. and Saito N., 2002).

1.5.2.6 Iones calcio (Ca^{2+}).

Las PKCs clásicas destacan por su regulación única que depende del Ca^{2+} : este catión facilita la translocación al incrementar la afinidad del dominio C2 por lípidos aniónicos. Debe ser notable que el incremento intracelular de Ca^{2+} no sea esencial para la translocación y activación de la proteína cinasa C: si la unión es suficientemente ajustada, esta es llevada a cabo por el dominio C1, el dominio C2 no necesita ser completamente acoplado con la membrana para la activación. De este modo, la estimulación de los ésteres de forbol pueden causar la translocación de las isoformas convencionales de la proteínas cinasas C en la ausencia de cambios intracelulares de calcio (Ca^{2+}).

Una de las primeras observaciones hechas por Nishizuka acerca de la proteína cinasa C fue que el diacilglicerol y el calcio (Ca^{2+}) sinergizan al activar a la enzima. Esto es, que la presencia de un ligando reduce dramáticamente la cantidad de un segundo ligando requerido para activar a la enzima. Este sinergismo no resulta de las interacciones alostéricas entre los dominios C1 y C2. Además, cada ligando causa independientemente que la afinidad de la proteínas C por lípidos aniónicos se incremente. Si uno se quita la contribución de los lípidos aniónicos, no hay sinergismo. Por lo tanto, las variaciones de Ca^{2+} por 5 órdenes de magnitud no tiene efecto sobre la afinidad de la proteína cinasa C por membranas neutras que contienen ésteres de forbol, una interacción mediada sólo por el dominio C1.

Un mecanismo regulador atractivo para las proteínas cinasas C convencionales es que el elevado Ca^{2+} intracelular recluta a la proteína cinasa C a la membrana por el dominio C2 y por la reducción en dimensionalidad, se incrementa dramáticamente la probabilidad de encontrar diacilglicerol y acoplamiento del dominio C1. Por lo tanto el acoplamiento del dominio C2 incrementa la eficiencia de búsqueda por diacilglicerol (Newton., 2001).

1.6 Localización intracelular de PKC.

Poco después de descubrir que la proteína cinasa C comprende efectivamente una familia de proteínas, llegó a ser aparente que numerosas isoformas estuvieran presentes en tipos celulares específicos, que las isoformas específicas estaban localizadas en ubicaciones intracelulares determinadas, y que estas ubicaciones fueran diferentes en tipos celulares diferentes (Conn P. M. and Means. A. R., 2000).

Kraft y colaboradores reportaron por primera vez que la proteína cinasa C se transloca de la fracción soluble a la fracción particular en respuesta al forbol miristato acetato (PMA) (Kraft. A.S. *et al.*, 1982). Subsecuentes métodos bioquímicos e inmunológicos al usar anticuerpos de isoformas específicos han revelado que la estimulación fisiológica incluyendo aquella con hormona liberadora de tiotropina, también induce la translocación de la PKC, y algunas respuestas son isoformas-específicas, como: α -trombina y el factor de crecimiento derivado de plaquetas inducen la translocación de PKC α , pero no de PKC ϵ , y ζ al núcleo en líneas celulares IIC9 y Swiss 3T3 (Revisado en. Shirai Y. and Saito N., 2002).

Está ampliamente aceptado que las funciones biológicas de las PKCs dependen de su correcta distribución espacial. La localización de PKC es determinada, por lo menos en parte, por proteínas de anclaje. El rol del anclaje de PKC o de las proteínas de anclaje es para posicionar a las isoformas de PKC en sitios intracelulares específicos cerca de sus sustratos o de sus reguladores de actividades tales como fosfatasas y cinasas o en compartimientos intracelulares (figura 13). Por lo tanto, la regulación espacial de PKC es un mecanismo clave para determinar la especificidad funcional y reguladora de una isoforma de PKC (Maissel *et al.*, 2006).

Existen abundantes proteínas de anclaje que se unen a la PKC. Algunas proteínas de unión regulan a múltiples isoformas de la proteína cinasa C. También hay proteínas de unión para PKCs no fosforiladas y fosforiladas así como para proteínas cinasas C activadas (Newton., 2001).

Es importante considerar que las proteínas de unión no sólo conducen a las PKCs hacia los sustratos apropiados, sino también impiden eventos incorrectos de fosforilación. Por lo tanto, las interacciones directas de la proteína cinasa C con sustratos y/o proteínas de unión a sustratos aseguran que sólo las proteínas apropiadas sean fosforiladas *in vivo*. Un tercer rol para las proteínas de anclaje de PKC es la localización dinámica de la PKC misma. Ciertas proteínas de anclaje pueden jugar roles esenciales en la dirección de la PKC entre compartimientos. Finalmente, una cuarta función de las proteínas de unión a la proteína cinasa C es integrar la información con otras rutas de señalización (Jaken. S. and Parker. P. J., 2000).

Las proteínas de anclaje se enlazan a la proteína cinasa C por múltiples mecanismos. Algunas proteínas se enlazan en el dominio regulador y otras se enlazan en el dominio catalítico. Por lo tanto, la naturaleza ha tomado ventaja de la superficie única de las isoformas de la PKC, maniobrándolas a sitios intracelulares específicos. Estas superficies permiten el diseño de péptidos para inhibir competitivamente las isoformas específicas (Newton., 2001).

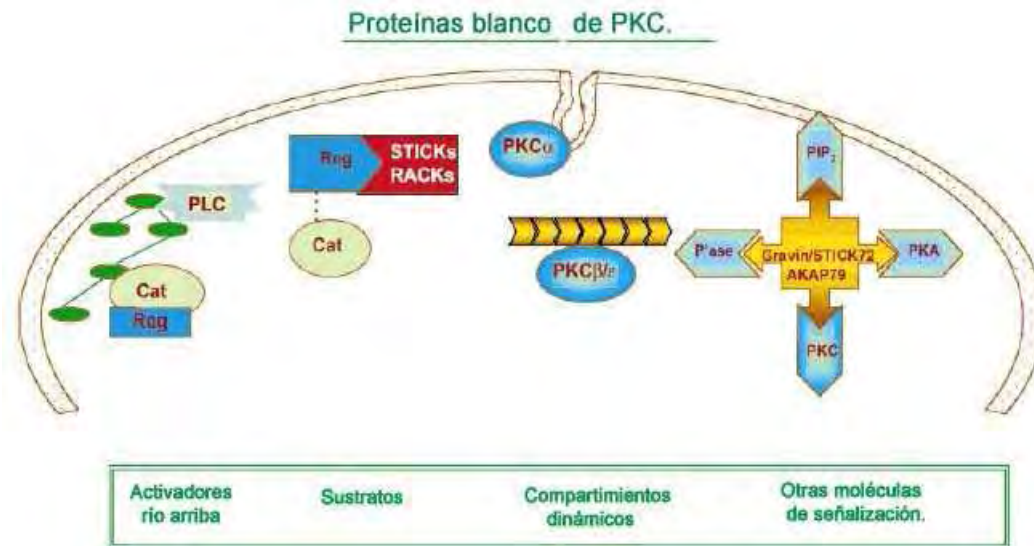


Figura 13. Funciones de la proteínas de anclaje de PKC. Las interacciones con varias tipos de proteínas que regulan y coordina las funciones de PKC dentro de la célula. Ciertas proteínas de unión como InaD acoplan a PKC a activadores río arriba como la fosfolipasa C (PLC). Para facilitar el reconocimiento del sustrato, PKC interactúa directamente con algunos de sus sustratos (STICKs) o con proteínas que promueven la fosforilación del sustrato (RACKs). Las PKCs se mueven parcialmente dentro de la célula, debido a sus interacciones con estructuras dinámicas. Finalmente, la actividad de PKC es acoplada a la actividad de otras rutas de señalización a través de uniones coordinadas con proteínas de anclaje, fosforilaciones selectivas, y modificaciones funcionales de proteínas sustrato (Figura tomada y modificada de Jaken. S. and Parker. P. J.).

1.7 Modulación negativa o Down-regulation.

El tratamiento de las células con ésteres de forbol resulta en una rápida redistribución de varias isoformas, típicamente hacia la membrana plasmática. Esta translocación sirve como distintivo de la activación de la PKC. Además, los ésteres de forbol tienen otros efectos profundos sobre las PKCs, excepto en las isoformas atípicas: el tratamiento prolongado con los ésteres de forbol resulta en la desaparición de la PKC de la fracción soluble en detergente de las células. Esta desaparición ha sido llamada *down-regulation* o *modulación negativa* y por muchos años se creía que era exclusivamente el resultado de la degradación proteolítica de la enzima. La bisagra del enlace a la membrana de la PKC es en extremo proteolíticamente lábil, por lo que se esperaba que la unión membranal prolongada resulte en la proteólisis de la enzima (Conn P. M. and Means. A. R., 2000). La down-regulation se ha demostrado con varias de las isoformas que se unen a ésteres de forbol biológicamente activos (Liu. W. S. and Heckman C. A., 1998).

La activación prolongada de las PKCs es seguida por una desensibilización de las isoformas y las respuestas celulares asociadas. Dependiendo de la duración del estímulo, que puede ser inducido por los ésteres de forbol ó por neuropéptidos, las isoformas presentan modulación negativa selectiva. Los procesos celulares así como los mecanismos moleculares involucrados son todavía imprecisos. Se ha propuesto que el estado de fosforilación puede predisponer a la enzima para su degradación. Las PKCs en el citosol pueden ser degradadas en el proteosoma, mientras que aquellas asociadas con membranas pueden ser blancas de degradación en vacuolas o lisosomas.

La función catalítica y la down-regulation de las enzimas pueden ser eventos asociados y significantes fisiológicamente en la señalización celular (Junoy. Brice., *et al* 2002; Liu. W. S. and Heckman C. A., 1998).

En estudios con líneas celulares gonadotrópicas α T3-1 y L β T2 se demostró que la down-regulation de las isoformas de PKC inducida por estímulos fisiológicos con GnRH (PKC ϵ), ó por el TPA (PKC ϵ , α) involucra principalmente al proteosoma, un organelo que degrada selectivamente a las proteínas multiubiquitiniladas, y dependiendo de la de la isoforma (PKC α) quizás cuente inicialmente con el estado fosforilado y/o la función catalítica de la isoforma. De este modo, la actividad del proteosoma parece ser parte de un proceso de adaptación de la respuesta celular a la activación crónica; por el nivel de regulación celular de PKC, este puede jugar un rol en las funciones dependientes de PKC (Junoy. Brice., *et al* 2002).

Por otra parte estudios con PKC α y ϵ han indicado que el paso clave en el proceso de desactivación es la desfosforilación de los sitios primarios de la enzima. De este modo se piensa que las enzimas desfosforiladas sufren la ubiquitinación y degradación proteolítica por el proteosoma 26S, un gran complejo multicatalítico de proteasas (Lee. H. W. *et al.*, 1996; Lee H. W. *et al.*, 1997; Hansra. G., *et al.*, 1999). Leontieva proporcionó evidencia de una ruta mayor para PKC α que involucra la ubiquitinación de la enzima madura activada fosforilada, y su subsiguiente degradación a través del proteosoma; también demostró por primera vez, en contraste con otros reportes, que ninguna internalización ni desfosforilación son pasos requisitos intermedios en la ruta ubiquitina/proteosoma de la down-regulation de PKC α . También presentó que el tráfico caveolar y la desfosforilación están implicados en una segunda ruta de desensibilización de PKC α independiente del proteosoma (Leontieva. O. V. and Black. J. D., 2004) (figura 14).

El Diacilglicerol (DAG) también causa la down-regulation. En las líneas celulares GH4C1, PKC ϵ fue mermado después de una fase de producción duradera de DAG durante 12 hrs. La down-regulation selectiva de PKC δ y ϵ ocurrió con altos niveles de DAG que fueron inducidos y mantenidos por la administración del factor de crecimiento derivado de plaquetas y bombesina. La exposición de la línea celular Swiss 3T3 al diacilglicerol sintético 1-oleoil-2-acetil-*sn*-glicerol también causó la down regulation de PKC δ y ϵ mientras que las PKC α y ζ no fueron afectadas porque una dosis notable del diacilglicerol probablemente fue metabolizada rápidamente (Revisado en Liu. W. S. and Heckman C. A., 1998).

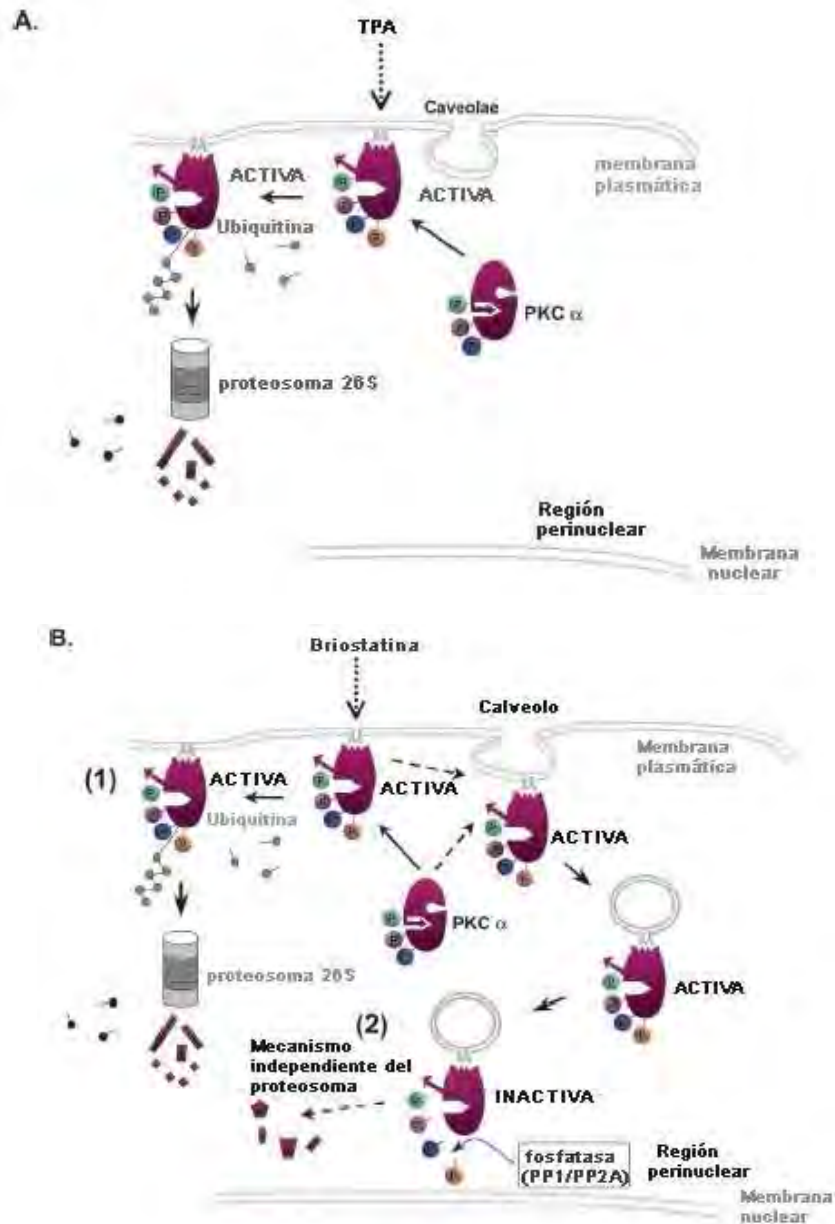


Figura 14. Dos rutas de la down-regulation inducidas por agonistas de PKC α en células intestinales epiteliales. (A) Después de la activación por PMA, la PKC α madura fosforilada, es localizada solamente en la membrana plasmática, donde sufre ubiquitinación seguida por la degradación causada por el proteosoma (los sitios primarios de fosforilación (P) en PKC α son indicados en verde, púrpura, y azul, el potencial de activación-fosforilación inducida esta indicada en naranja). (B) La briostatina dispara dos rutas de la down-regulation de PKC α en células intestinales epiteliales. Después de la activación con Briostatina, PKC α es primero reclutada a la membrana plasmática, donde es localizada en el calveolo y posiblemente en otros dominios membranales. 1) Una porción de la PKC activada sufre ubiquitinación en la membrana plasmática y es blanco para la degradación por el proteosoma. 2) Un pool de PKCs α activadas y asociadas al calveolo es transportado a la región perinuclear, donde esta sufre una completa desfosforilación y eventual degradación vía un mecanismo independiente del proteosoma (imagen tomada y modificada de (Leontieva, O. V. and Black, J. D., 2004).

1.8. CONSERVACIÓN DE PKCs CLÁSICAS, PKCs NUEVAS Y PKCs ATÍPICAS EN ORGANISMOS MULTICELULARES.

Las tres clases de isoformas de PKC: convencionales, nuevas y atípicas, están conservadas en una variedad de especies metazoarias incluyendo a dos organismos que son modelos genéticos, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila*. En *Drosophila*, existen por lo menos dos integrantes de las isoformas de PKC convencionales, dos de PKC nuevas (tipo δ/θ y tipo ϵ/η) y un integrante de la PKC atípica. En *C. elegans*, existe por lo menos una isoforma de PKC convencional, dos isoformas de PKC nuevas (tipo δ/θ y tipo ϵ/η), y uno de PKC atípica. La conservación evolutiva de la PKC convencional, las PKCs nuevas tipo δ/θ y tipo ϵ/η , y PKC atípica de gusanos a mamíferos implica roles independientes para las cuatro clases de PKC que son fundamentales para los organismos multicelulares (Shigeo Ohno and Yasutomi Nishizuka., 2002).

Además de las PKCs mencionadas anteriormente, existen proteínas cinasas llamadas PKN, PAK o PRK que comparten dominios de proteínas cinasas y están estrechamente relacionados con las isoformas de PKC. Esta familia de enzimas también comparte el dominio C2 con las isoformas de PKC convencionales y nuevas, y esta incluida como miembro extendido de la familia de PKC (Shigeo Ohno and Yasutomi Nishizuka., 2002).

En las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), las tres clases de PKC y PKN/PAK/PRK no existen, pero hay una o dos proteínas que están estrechamente relacionadas con PKC. Por ejemplo, la levadura *S. cerevisiae* posee las secuencias de los motivos HR1, C1, C2, y la cinasa serina/treonina (Figura 15). Esto sugiere que las proteínas cinasas de las levaduras retienen una forma ancestral que evolucionó dentro de las isoformas de PKC clásicas, nuevas y atípicas, y PKN/PAK/PRK en organismo multicelulares (Mellor. H. and Parker. P.J., 1998).

De este modo, los análisis genéticos de las isoformas en organismos modelos proporciona importantes pistas para entender los roles de las isoformas de PKC de mamíferos (Shigeo Ohno and Yasutomi Nishizuka., 2002).

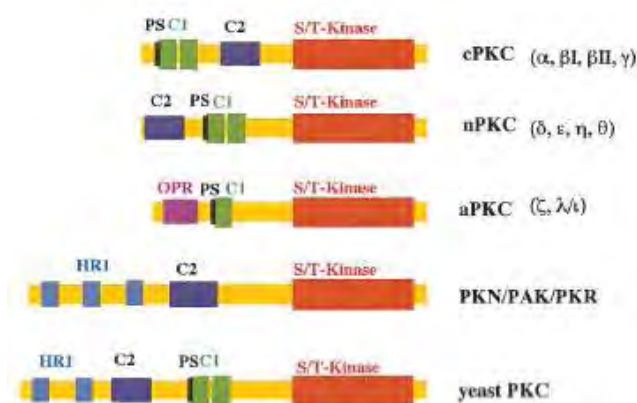


Figura 15. Representación esquemática de la comparación estructural entre las isoformas de PKC, las cinasas PKN/PAK/PRK y la PKC de la levadura. Todas las isoformas comparten el dominio C1 y el dominio catalítico de serina/treonina. También se observa el PS que representa a la secuencia del pseudosustrato que enmascara el sitio catalítico para suprimir la actividad de cinasa, el dominio HR1 que es también llamado dominio ACC (antiparallel coiled coil) y , que fue el primer descrito como una región de homología repetida tres veces de la region reguladora en el amino terminal de la proteína cinasa PKN/PAK/PRK (imagen tomada y modificada de Shigeo Ohno and Yasutomi Nishizuka., 2002).

1.9 Funciones.

Las funciones biológicas de la PKC han sido relacionadas principalmente con eventos que ocurren a nivel de la membrana plasmática y/o en el citoplasma porque la mayor parte de las isoformas de PKC están asociadas con el citoesqueleto en un estado inactivo y después de la maduración (fosforilación), las isoformas son reclutadas a la membrana plasmática (ó las membrana de los organelos citoplasmáticos) para llegar a ser activadas por completo en la presencia de cofactores específicos (Martelli A. M. *et al.*, 2006).

La presencia de múltiples isoformas de la proteína cinasa C dentro de tipos celulares únicos, la amplia especificidad de sustratos *in vitro*, y los múltiples efectos de los ésteres de forbol *in vivo*, han desconcertado la explicación de las funciones precisas de las isoformas de PKC. Lo que queda claro, es que las isoformas de PKC están involucradas en una plétora de funciones celulares, desde cambios a corto plazo (como cambios en la permeabilidad de la membrana) hasta los de largo plazo (como la memoria y el aprendizaje) (Conn P. M. and Means. A. R., 2000).

La generación de ratones knock-out carentes de isoformas específicas de PKC es el comienzo del esclarecimiento de algunas de las funciones fisiológicas de la proteína cinasa C. Por ejemplo la supresión del gen para PKC γ resultó en ratones que parecían relativamente normales, con efectos modestos solamente en la memoria y aprendizaje, indicando que esta isoforma en todo caso no es esencial para la viabilidad o sus funciones pueden ser compensadas por otras isoformas. Sin embargo, una diferencia interesante entre los ratones knock-out y ratones de tipo silvestre ha sido caracterizada: ratones que carecen PKC γ desarrollan respuestas reducidas a estímulos de dolor resultado del daño nervioso. Estudios con ratones knock-out en PKC ϵ también han implicado a esta isoforma como un blanco potencial para el dolor y, para la ansiedad, por ejemplo, ratones que carecen esta isoforma desarrollan menos ansiedad en respuesta a situaciones de peligro. Como otro ejemplo, la eliminación por targeting del gen que codifica a PKC β resulta en ratones con una respuesta inmune dañada, con los análisis de las células β de aquellos ratones, se reveló que la PKC β está involucrada en la activación de células B (Conn P. M. and Means. A. R., 2000).

1.9.1 Importancia de isoformas de PKC en la proliferación celular.

La proteína cinasa C esta implicada en el control de la proliferación, diferenciación, y sobrevivencia en varios tipos de tejidos. Sin embargo el rol específico de las isoformas de PKC en este proceso no ha sido directamente afirmado.

Las evidencias más directas y convincentes para la función de PKC ligada a la proliferación celular, han venido de una serie de estudios sobre la fosforilación de lámina B realizadas en líneas celulares HL60. La lamina B es fosforilada rápidamente por la PKC β II siguiendo su translocación al núcleo. Los sitios de fosforilación mediados por PKC yacen dentro del dominio del carboxilo terminal de la lámina B inmediatamente adyacente al dominio de bastón de la hélice α central. Funcionalmente, la fosforilación de los sitios permite la solubilización dependiente de tiempo de la lamina B. Tomando juntos estos hallazgos, lo que señalan es la relevancia de la

activación de PKC β II pues es requerida para la fosforilación y desarme de la lamina B y la entrada a la mitosis (Revisado en Martelli A. M. *et al.*, 2006).

Un tema relacionado con la proliferación celular es la reanudación de la meiosis espontánea en oocitos de ratón. En realidad los oocitos de mamíferos son arrestados en la etapa de G2 del ciclo celular y la reanudación in vivo de la meiosis es lograda por la hormona luteinizante. Estudios recientes han encontrado que las isoformas convencionales PKC α , β I, β II estuvieron presentes inicialmente en el citoplasma, y que después migraron al núcleo (o vesícula germinal) como enzimas completamente fosforiladas anterior a la ruptura de las vesículas germinales, que es el primer paso en el reanudamiento de la meiosis y corresponde al rompimiento de la envoltura nuclear. La translocación nuclear de estas isoformas podría estar relacionada con la acumulación de PI-PLC β I (que precede al rompimiento de las vesículas germinales) y posiblemente a la producción de DG. Tomando ventaja de la microinyección de anticuerpos específicos para las isoformas de PKC, ha sido posible demostrar que estas tres isoformas de PKC, una vez en el núcleo, están involucradas en la reiniciación de la meiosis. Lógicamente, podrían jugar un rol importante en la disolución de las vesículas germinales (Revisado en Martelli A. M. *et al.*, 2006).

Se debe enfatizar que las isoformas de PKC han sido implicadas también en la regulación negativa del ciclo celular, principalmente a través del inhibidor de la ciclina Cip/Kip dependiente de cinasa, p21 waf1/cip1, pero se desconoce si este asegura la implicación de las isoformas de PKC (Revisado en Martelli A. M. *et al.*, 2006).

La PKC α ha sido presentada por fosforilar a la cinasa Raf-1, que permite la activación de la cascada de cinasas reguladas por señales extracelulares y de proteínas cinasas activadas por mitógenos (ERK/MAPK), de este modo promueve la proliferación en un número de diferentes tipos de células. También, se ha demostrado que la PKC α media la diferenciación y proliferación de células pre-T vía ERK-MAPK, y, a vías controladas por proteínas de unión a elementos de respuesta a AMP-cíclico durante el desarrollo temprano de células T (Revisado en Michie A. M. and Nakagawa R, 2005).

La PKC α también puede impulsar la actividad transcripcional en células T de líneas celulares Jurkat, independientemente de la cascada de señalización ERK-MAPK, a través de su interacción con la pequeña GTPasa, Rho en la membrana plasmática. Subsecuentemente, PKC α ha sido implicada en la activación río abajo de NF- κ B en la activación de células T inducida por TCR/CD28 en la línea celular Jurkat. En estudios donde fue utilizado el ratón knock-out PKC θ $-/-$, se reveló que la PKC α es requerida absolutamente para la activación de NF- κ B (Revisado en Michie A. M. and Nakagawa, R., 2005). Interesantemente, Trushin *et al.*, estableció que la PKC α actúa cascada arriba de PKC θ , ya que la activación de NF- κ B fue bloqueada por el inhibidor de PKC θ (y PKC δ), rotlerina y fue dependiente de PKC α llegando a ser capaz de unirse a Ca $^{2+}$ y acoplarse al compartimiento membranal de la célula (Trushin S. A. *et al.*, 2003).

Por otra parte, análisis bioquímicos han mostrado, por ejemplo, que la PKC β II específicamente fosforila la proteína nuclear lamina B, en células humanas de eritroleucemia, una fosforilación que es requerida para la proliferación de estas células (Conn P. M. and Means. A. R., 2000).

Los primeros estudios para dirigir el rol de las isoformas atípicas de PKC en la función celular se enfocó en el impacto que podría tener su inhibición en el control de la proliferación celular, y contó con experimentos en los cuales las células fueron microinyectadas con péptidos inhibidores basados en la secuencia del pseudosustrato de las PKCs atípicas. Aquellos estudios permitieron proponer que las PKCs atípicas eran actores importantes en el control del crecimiento celular y sobrevivencia. Seguidamente, en experimentos de transfección usando mutantes dominantes negativos de aquellas cinasas, apoyaron esta noción e indicaron que el blanco de sus acciones era la ruta del factor nuclear (NF)- κ B. Esto fue considerado por ser de gran relevancia a medida de que NF- κ B está involucrado críticamente en la sobrevivencia y diferenciación celular, dos parámetros celulares importantes en inmunidad e inflamación (Moscato J. *et al.*, 2006).

Las isoformas atípicas PKC ν/λ , ζ que son efectores río abajo del la fosfoinositido 3-cinasa y son requeridas para la activación mitogénica en oocitos y fibroblastos, sugirió que pueden también transducir señales de sobrevivencia (Dempsey E. C. *et al.*, 2000). En concordancia con esto, Murray y Fields demostraron que las PKCs ν/λ protegen de los efectos de la apoptosis a las células K562 de la leucemia humana (Murray N. R. and Fields., 1997). Berra *et al.* ha presentado que la exposición de células a estímulos apoptóticos tales como radiaciones ultravioletas permitieron una disminución en la actividad de las PKCs atípicas ζ y/o ν/λ (Berra. *et al.*, 1997).

1.9.2 PKC y apoptosis.

La apoptosis es un proceso altamente regulado que permite la muerte celular y es esencial para la morfogénesis, desarrollo, diferenciación, y homeostasis de organismos multicelulares. Este proceso está ampliamente conservado a través de la evolución y puede ocurrir en respuesta a un amplio rango de estímulos. Su significado se entiende por su existencia en todos los eucariontes superiores y por las malformaciones resultantes de perturbaciones de los procesos apoptóticos durante el desarrollo. Las tasas incrementadas de apoptosis son responsables de varias enfermedades degenerativas, y la inhibición de la apoptosis está implicada en procesos autoinmunes y en la carcinogénesis (Martelli A. M. *et al.*, 2006).

La PKC juega un rol fundamental en la regulación y diferenciación de la proliferación celular, así como en la regulación de la sobrevivencia celular. Los métodos para definir el rol de la PKC en la apoptosis se basan en la activación de PKC por el PMA aunque la activación de PKC puede ser antiapoptótica o pro-apoptótica dependiendo del tipo de célula. Se han empezado a definir las funciones específicas de PKC en las rutas apoptóticas. Las isoformas que parecen ser antiapoptóticas en varios sistemas incluyen a PKC α , PKC β II, PKC ϵ y las isoformas atípicas λ/ν y ζ (Revisado en Dempsey E. C. *et al.*, 2000). Particularmente con la isoforma PKC α se sabe que la pérdida de esta isoforma generalmente se correlaciona con la inducción de apoptosis, sugiriendo que PKC α media señales de una manera anti-apoptótica, promoviendo la sobrevivencia. La PKC α puede mediar la sobrevivencia celular al incrementar los niveles de fosforilación/expresión de la proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y/o Bcl-AL (Revisado en Michie A. M. and Nakagawa R, 2005).

En contraste con las isoformas antiapoptóticas, PKC δ está emergiendo como un mediador común en la ruta apoptótica inducida por químicos y radiaciones. Sin embargo, el mecanismo preciso que ejecuta las acciones pro-apoptóticas de PKC δ puede variar considerablemente según el contexto biológico (el tipo celular, la naturaleza del estímulo apoptótico). Por ejemplo, la vía PKC δ /p38/MAPK media los efectos pro-apoptóticos del PMA en líneas cancerosas de próstata LNCaP dependientes de andrógenos (Steinberg Susan F., 2004). Otro ejemplo es la activación proteolítica de PKC δ causada por caspasas libera un fragmento catalíticamente activo en células inducidas para sufrir apoptosis por agentes perjudiciales para el DNA. La activación de PKC δ producida por caspasas puede servir para amplificar eventos río abajo en la ruta apoptótica porque la expresión del fragmento catalítico es suficiente para inducir la activación por caspasas y la apoptosis en una variedad de tipos celulares (figura 16) (Dempsey E. C. *et al.*, 2000).

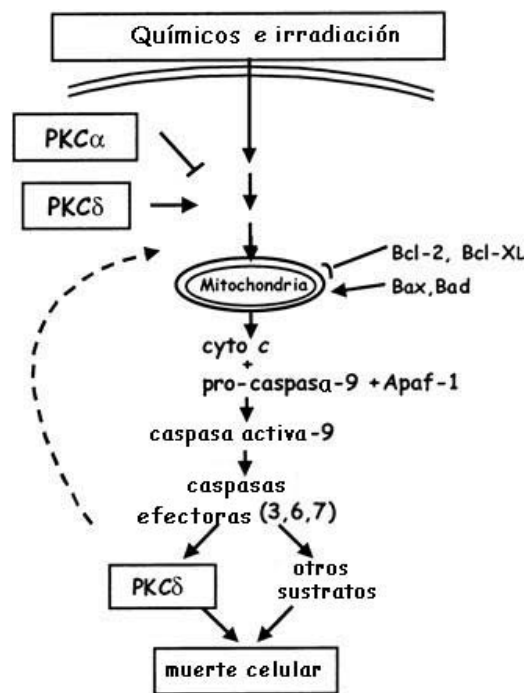


Figura 16. El rol de las isoformas de PKC en la apoptosis inducida por químicos y radiaciones. Los cambios específicos en la mitocondria inducidos por agentes dañinos para el DNA y toxinas celulares, resultan en la liberación del citocromo c de la mitocondria y la unión al factor apoptótico activador de proteasas-1 (Apaf-1) resulta en la activación de la caspasa 9, la cual activa a las caspasas efectoras. Las caspasas efectoras activadas dismantelan a la célula a través de hendiduras en las proteínas celulares, resultando en la fragmentación del DNA y la muerte celular. La inhibición de PKC α puede activar, considerando que la inhibición PKC δ puede suprimir, esta ruta (figura tomada y modificada de Dempsey E. C. *et al.*, 2000).

La PKC δ juega un rol central en las respuestas a estrés genotóxico permitiendo la inducción de apoptosis en células expuestas a agentes nocivos del DNA. La activación de la tirosina cinasa (c-Abl, Lyn) permite la fosforilación de tirosina (activación) de PKC δ y la activación de la ruta MEKK1 (Cinasa Mek 1)/MKK7 (cinasa MAPK 7)/JNK (Revisado en Steinberg Susan F., 2004).

La fosforilación de la tirosina de PKC δ es crítica para su ruptura proteolítica y para la generación de los fragmentos catalíticos de 40 kDa de los dominios de PKC δ que se acumulan en el núcleo (el fragmento del dominio catalítico de 40kDa de PKC δ es una enzima constitutivamente activa dado que es liberado del forzado estado auto-inhibitorio impuesto por el dominio regulador, este induce la apoptosis cuando es sobre-expresado en ciertos tipos celulares). Los blancos nucleares para PKC δ se identificaron: DNA-PK nuclear (proteína cinasa dependiente de DNA), una enzima esencial para la reparación de la rotura de la doble hélice de DNA que es inhibida por la fosforilación dependiente de PKC δ ; hRad9, un componente clave del complejo activado de señalización genotóxico que también se une a proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 y media las respuestas apoptóticas de daños a DNA fosforilados por PKC δ ; c-Abl, una cinasa activada por estímulos apoptóticos que forma complejos con Lyn, DNA-PK, y PKC δ en el núcleo; p73 β , un homólogo estructural –funcional de p53 que interactúa con c-Abl y activa la transcripción de promotores p53; una histona H2B, cuya fosforilación puede contribuir a la condensación de la cromatina. DNA-PK y p73 β son dos ejemplos de sustratos que son fosforilados preferentemente por el fragmento catalítico liberado relativo a al enzima completa (Revisado en Steinberg Susan F., 2004).

Por otra parte el primer indicador independiente de que las isoformas atípicas podrían ser realmente importantes en la apoptosis vino de un estudio dirigido a identificar reguladores potencialmente relevantes de estas PKCs mediante el sistema de doble híbrido en levaduras. Esta estrategia permitió la identificación del andrógeno prostático sensible a proteína pro-apoptótica -4 (Par-4) como una proteína de enlace a PKCs atípicas. Esta proteína se une a isoformas atípicas de PKC e inhibe sus actividades enzimáticas. La sobre expresión de Par-4 en sistemas celulares modelo inhiben la activación de NF- κ B y activa la apoptosis. Esto es consistente con, y constituye una confirmación independiente de, el rol de las PKCs atípicas en la activación de NF- κ B (Revisado en Moscat. J. *et al.*, 2006).

La identificación de isoformas pro y antiapoptóticas sugieren que PKC puede funcionar como un censor molecular, promoviendo sobrevivencia bajo condiciones favorables y ejecutan la muerte células anormales y dañadas (Dempsey E. C. *et al.*, 2000).

1.9.3 PKC y transformación neoplásica.

Muchos de los intereses que inicialmente rodeaban a la PKC derivaron de la identificación de esta enzima como el receptor intracelular de los ésteres de forbol, una clase de promotor de tumores. Numerosos estudios han sugerido que las isoformas de PKC juegan un rol en la carcinogénesis y mantenimiento del fenotipo maligno. La potenciación de los fenotipos malignos puede ser mediada por la activación selectiva de isoformas de PKC o a través de la expresión alterada de la isoforma y/o localización comparada al tejido original (Martelli A. M. *et al.*, 2006).

La PKC se ha vinculado con las acciones funcionales de un gran número de proto-oncogenes incluyendo Ras, Raf y Bcl10. Por lo tanto, no es sorprendente que la desregulación de isoformas específicas haya sido implicada en el proceso celular que el cáncer promueve, como proliferación descontrolada, pérdida del control del ciclo celular y metástasis en un rango diverso de cánceres (Michie A. M. and Nakagawa R, 2005).

Uno de los primeros estudios que se enfocó especialmente en el rol de la PKC α involucró la generación de ratones transgénicos que expresaron PKC α tipo silvestre bajo el control del promotor CD2. Este resultó en la proliferación de PKC α en los timocitos. Las células aisladas de estos ratones desarrollaron una alta tasa de proliferación en respuesta a la estimulación única de anti-CD3 mAb. En apoyo a esto, se ha sugerido que PKC α juega un rol importante en la tumorigénesis y la progresión tumoral, por lo que esta isoforma ha sido implicada en varios procesos relacionados con el cáncer, como invasión y metástasis (Revisado en Michie A. M. and Nakagawa R., 2005). De este modo PKC α ha sido implicada en un número de cánceres, y ha llegado a ser un blanco para terapias que involucran oligonucleótidos antisentido (ASO), RNA de interferencia corta (siRNA) o inhibidores de PKC específicamente dirigidos contra PKC α (Michie A. M. and Nakagawa R., 2005).

En hepatocarcinogénesis inducida por dietilnitrosamina, la expresión y la actividad de PKC β estuvieron al máximo en 60 días post-hepatectomía. Como resultado, se ha sugerido un rol para la PKC β nuclear en la promoción de crecimiento selectivo de hepatocitos carcinógenos iniciados en hígado de rata. También usando el mismo experimento modelo, la actividad y la expresión nuclear incrementada fueron detectadas en nódulos de pulmón metastático, sugiriendo un posible rol para esta isoforma en el desarrollo de tumores secundarios (Revisado en Martelli A. M. *et al.*, 2006).

Las isoformas α y β I y β II han sido reportadas por jugar un importante rol en la carcinogénesis y metástasis de cánceres gastrointestinales. Por ejemplo se encontró que estas isoformas, desempeñaban un papel significativo en el mantenimiento del fenotipo transformado de las células gástricas cancerígenas y al inhabilitar estas isoformas resultaba en la inhibición de crecimiento celular, permitiendo sensibilidad a fármacos quimioterapéuticos, además la supresión mediada antisentido de PKC α y β 1 permitieron la supresión de la formación de tumores gástricos *de novo* en ratones desnudos en xenoinjertos gástricos (Jiang Xiao-Hua. *et al.*, 2004).

Para investigar la función de PKC- β II en el epitelio del colon, Murray *et al* generaron ratones transgénicos que expresaban altas concentraciones de PKC β II en el epitelio intestinal. Los ratones transgénicos PKC- β II exhibieron hiperproliferación del epitelio del colon y una susceptibilidad incrementada a azoximetano inducido por ACF y formación de tumores en el colon. Además los ratones transgénicos PKC β II exhibieron elevadas cantidades de β -catenina y disminución en la actividad de la cinasa glicógeno sintasa-3 β (GSK-3 β), indicando que PKC- β II estimuló la ruta de señalización proliferativa Wnt-APC- β catenina in vivo. Por lo tanto se demuestra que PKC β II juega un rol de promoción en la proliferación celular del epitelio y la carcinogénesis del colon, posiblemente a través de la activación de la ruta de señalización APC- β -catenina (Revisado en Dempsey E. C. *et al.*, 2000).

Regala *et al* proporcionó amplias evidencias de que la isoforma atípica PKC ι es crítica en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés Non-Small Cell Lung Cancer) pues las evidencias para llegar a estas conclusiones son múltiples. La primera, es que PKC ι es sobre-expresada en líneas celulares de NSCLC y tumores primarios. La prevalencia del sobre-expresión en NSCLC es similar a aquellos otros oncogenes implicados en el desarrollo de NSCLC tales como Met, EGFR, PI3K, y Raf. Segunda, la expresión de PKC ι predice la escasa supervivencia en pacientes con

NSCLC, por lo tanto la expresión de PKC ζ sostiene promesas considerables tales como una nueva herramienta para identificar las etapas tempranas de pacientes con NSCLC y con riesgos elevados de progresión o recaídas. Tercera, al igual que muchos otros oncogenes, PKC ζ es un blanco para frecuentes alteraciones somáticas genéticas específicas por amplificación de genes. El gen de PKC ζ reside en el cromosoma 3q26, el sitio más frecuente de ganancia de cromosomas en NSCLC. La amplificación de *PKC ζ* ocurre frecuentemente y se correlaciona con la expresión en líneas celulares y tumores primarios de NSCLC. Por lo tanto, la amplificación del gen *PKC ζ* es un importante mecanismo que dirige la sobre expresión de PKC ζ en NSCLC. Por que PKC ζ es requerida para el crecimiento de celular en NSCLC y tumorigenicidad *in vivo* (Regala R. P. *et al.*, 2005).

1.9.4 Isoformas de PKC en enfermedades cardiovasculares.

Los desórdenes cardiovasculares tales como hipertrofia e hipertensión cardiaca están entre las principales causas que encabezan las causas de mortalidad en países occidentales. Existe evidencia para un rol jugado por isoformas de PKC en la regulación de la transcripción genética promotora de linaje cardiaco (GATA-4 y Nkx-2.5) en células tronco embrionario a través de un mecanismo que involucra la expresión del gen de prodinorfina y la expresión de la dinorfina B. Sin embargo, PKC α parece estar implicada fuertemente también en el proceso hipertrófico de los miocitos ventriculares y en la expresión del receptor- α 1 de la hormona tiroidea que es un rasgo distintivo de hipertrofia cardiaca (Revisado en Martelli A. M. *et al.*, 2006).

Es cada vez más claro que la proliferación celular del músculo liso vascular está ligada profundamente a la etiología de la aterosclerosis e hipertensión (Revisado en Martelli A. M. *et al.*, 2006). Hay algunos reportes que presentan que en respuesta a la angiotensina II hay una translocación nuclear de PKC α (Martelli A.M. *et al.*, 1999; Wolf S.C. *et al.*, 2004). Por lo tanto, las isoformas de PKC en la proliferación celular del músculo liso pueden ser blancos interesantes para el desarrollo de drogas que traten enfermedades vasculares como la aterosclerosis e hipertensión (Martelli A. M. *et al.*, 2006).

Finalmente, la contribución de expresiones aberrantes de las PKCs en un amplio rango de padecimientos que afectan gravemente al ser humano, tales como el cáncer, debe ser investigada ampliamente y esto es un reto para el futuro ya que las isoformas de PKC así como sus sustratos, proporcionarán blancos importantes para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

La familia de la proteína cinasa C son enzimas exquisitamente reguladas por fosforilaciones, cofactores y por interacciones proteína-proteína. Las señales de la ruta de cinasa dependiente de fosfoinositido y la ruta del diacilglicerol proporcionan cada uno interruptores que regulan la función de la proteína cinasa C. El primero es requerido para fosforilar a la proteína y por lo tanto darle competencia catalítica, y el último es necesario para movilizar a la proteína cinasa C a la membrana y permitir la liberación del pseudosustrato. La ubicación de la enzima es finamente ajustada por proteínas de unión específica. Con la llegada de nuevas tecnologías para estudiar las isoformas específicas, los años siguientes se debe enriquecer nuestro entendimiento de la proteína cinasa C para continuar revelando el rol fisiológico de esta llave transductora de señales (Conn P. M. and Means. A. R., 2000).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Es bien conocido por reportes previos que el tratamiento de células en cultivo por tiempos prolongados (varias horas) con promotores de tumores como los ésteres de forbol induce la down-regulation clásica de la Proteína Cinasa C, en la que los niveles de expresión de la proteína son mínimos debido a que se induce la degradación proteolítica de la enzima. Sin embargo, existen una gran cantidad de evidencias experimentales de que el tratamiento de células a tiempos cortos (5 minutos) con ésteres de forbol (TPA), también induce una pérdida de detección selectiva de isoformas de PKC (α , δ y θ) que no puede ser explicada por una degradación proteolítica de la enzima.

3. OBJETIVOS

Objetivo General.

El objetivo general de este trabajo es estudiar el mecanismo de “down regulation” que ocurre a tiempos cortos de activación de PKC con ésteres de forbol (TPA) y con Epinefrina en hepatocitos de rata.

Objetivos específicos.

- a) Comparar mediante ensayos de Western blot los efectos del tratamiento con epinefrina y con éster de forbol (PMA) en la detección de expresión de las isoformas α , δ y θ de PKC de hepatocitos de rata.
- b) Examinar la redistribución de PKC α , δ y θ inducida por la activación con PMA ó con epinefrina en hepatocitos de rata.
- c) Investigar los efectos en la actividad de las isoformas α , δ y θ de PKC como resultado de su activación con PMA y con epinefrina.

4. HIPÓTESIS.

- El tratamiento de hepatocitos por breves lapsos de tiempo ya sea con TPA ó con epinefrina producirá cambios diferenciales en la activación (redistribución), en la detección de la expresión y en la actividad catalítica de las isoformas α , δ y θ de PKC.
- Los efectos de la hormona epinefrina en la activación de las isoformas α , δ y θ de la *Proteína Cinasa C* procedentes de hepatocitos de rata son distintos a los inducidos por ésteres de forbol.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Purificación de hepatocitos.

Se utilizó como modelo experimental a los hepatocitos de rata, aislados en fresco mediante el método de perfusión con colagenasa, descrito por Berry y Friend (1969). Para llevar a cabo este método se usaron ratas Wistar sexo macho, con un peso de 250 a 300 gramos (facilitadas por el bioterio de la Facultad de Medicina, U.N.A.M.). Se perfundió el hígado con amortiguador **Krebs-Ringer** a pH 7.35-7.40 a 37°C, en un ambiente saturado con O₂/CO₂ (5%/95%), hasta eliminar los residuos y coágulos sanguíneos. Una vez limpio el hígado, se perfundió con amortiguador **Krebs-Ringer** + CaCl₂ 1.27 mM. Se disolvió colagenasa tipo II (215 U/mg) en este amortiguador y se dejó que recirculara por 15-20 minutos; a continuación se disgregó cuidadosamente en presencia del buffer **Krebs-Ringer** + CaCl₂ hasta obtener una suspensión homogénea. Esta suspensión se filtró, se centrifugó tres veces a 4000 rpm por un minuto. Se tomó una alícuota para establecer viabilidad celular, mediante la técnica de tinción con azul de Tripano en amortiguador de **Krebs-Ringer** + CaCl₂. La viabilidad mínima que se empleó fue igual o mayor al 80%.

Solución Krebs-Ringer.

NaCl 120 mM, KCl 4.75 mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 24 mM, Glucosa 10 mM, pH 7.35-7.4.

5.2 Tratamiento de hepatocitos con activadores de PKC

Los hepatocitos recién aislados y viables se llevaron a una concentración de 150 a 200mg/ml de peso fresco en solución **Krebs-Ringer** + CaCl₂ 1.27 mM y se dividieron en tres partes:

- 1) Control, el cual se incubó sin activadores, sólo con el vehículo dimetil formamida (DMF).
- 2) Tratamiento farmacológico de PKC con TPA 10⁻⁶ M disuelto en DMF.
- 3) Tratamiento de PKC a través de receptores α_1 adrenérgicos. Se le añadió epinefrina 10⁻⁵ M + propranolol 10⁻⁵ M; el propranolol se agregó para bloquear los receptores β -adrenérgicos, que también se localizan en hepatocitos, y de esta forma, la Epinefrina se une únicamente con los receptores α_1 -adrenérgicos que están acoplados a la activación de la PKC.

La incubación simultánea de las tres partes se efectuó en baño con agitación a 37°C durante 5 minutos.

5.3 Lisado de hepatocitos.

Cada paso siguiente se realizó a 4°C.

Se retira el buffer con agonistas y antagonistas, en seguida se hace un lavado con buffer **Krebs-Ringer**, se retira el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspende en buffer de homogenización para llevar a una concentración de 150-200mg/ml en peso fresco: Tris-HCl 20mM, EGTA 10mM, EDTA 2mM, pH 7.5. Al momento de usar se adicionó lo siguiente: Inhibidor de tripsina (0.1mg/ml), 2-mercaptoetanol 50mM, Tritón X-100 (0.5%), PMSF 1mM, Leupeptina 20µM, Inhibidores de fosfatasas (Pirofosfato de Sodio (Na₂V0₄) (2.00 mg/ ml), NaF (4.64 mg/ ml)). Se lisaron los hepatocitos con un homogenizador por 90 segundos. Se dejó reposar el homogenizado de cada tratamiento por 30 minutos en hielo. Pasado este tiempo se centrifugó a 15 000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante para purificar a PKC (extracto crudo) y se descartó el precipitado.

5.4 Purificación parcial de isoformas de PKC por Cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa.

Una vez lisados los hepatocitos se obtuvo la fracción soluble en tritón X- 100 (sobrenadante) del paso anterior). Cada sobrenadante control y TPA se diluyó en amortiguador de lavado y se pasa por una columna con DEAE celulosa a pH 7.5. Las columnas se trataron con 8 ml de **amortiguador de elución I** y los eluidos recolectados se denominaron PKC I; en seguida se agregaron 4 ml de **amortiguador de elución II**, el cual produjo los eluidos PKC II. En estudios previos se encontró que los eluidos PKC I y PKC II poseen actividad de cinasa en ensayos de actividad in vitro, además se detectó la presencia de las isoformas alfa y beta en PKC I por inmunoensayos tipo Western blot. Mediante esta purificación parcial se detectaron las isoenzimas de PKC existentes en hepatocitos de rata.

5.5 Detección de las isoformas eluidas.

Ambos extractos de PKC I y PKC II se concentraron a 1 ml por separado mediante ultrafiltración con membrana de Amicon YM30. Se tomaron alícuotas de cada concentrado, se cuantificaron las proteínas por la técnica de Bradford y se separaron mediante SDS-PAGE al 10%. Más tarde se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron con anticuerpos específicos contra las isoformas de PKC.

Amortiguador de homogenización.

Tris 20mM, EDTA 2mM, EGTA 10mM a pH7.5, inhibidor de tripsina 0.1mg/ml, PMSF 1 mM, leupeptina 1µM y β-mercaptoetanol 50mM.

Amortiguador de lavado.

Tris 20 mM, y β-mercaptoetanol 50mM a pH 7.5.

Amortiguador de elución I.

Tris 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0.08 M, β -mercaptoetanol 50mM e inhibidor de tripsina 0.1 mg/ml a pH 7.5.

Amortiguador de elución II.

Tris 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0.25 M, β -mercaptoetanol 50mM e inhibidor de tripsina 0.1 mg/ml a pH 7.5.

5.6 Separación de las fracciones citosólicas y membranales de los hepatocitos.

Después de lavar las muestras de los tres lotes de hepatocitos con amortiguador **Krebs-Ringer** + CaCl_2 1.2 mM por centrifugación a 4000 rpm por 1 minuto, se separaron las fracciones celulares de la siguiente forma:

Citosol y membranas. Las muestras se lisaron en **amortiguador de homogenización sin Tritón-** y se centrifugaron a 15000 rpm (20 000 g) por 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes corresponden a la parte citosólica, mientras que los precipitados se rehomogenizaron con el **amortiguador de homogenización** con Tritón X-100 al 0.5%. A continuación, se incubaron en hielo por 30 minutos y se centrifugaron a 15000 rpm por 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes producidos son la fracción particulada soluble en detergente (membrana plasmática) y los precipitados corresponden a la fracción particulada insoluble en detergente (citoesqueleto).

Amortiguador de homogenización.

Tris 20mM, EDTA 2 mM, EGTA 10mM a pH 7.5, inhibidor de tripsina 0.1mg/ml, PMSF 1mM, leupeptina 1 μ M y β -mercaptoetanol 50mM.

Amortiguador de lisis.

Tris-HCl pH 7.4, NaCl 10 mM y Nonidet P-40 0.05%.

5.7 Cuantificación de proteínas y electroforesis.

Se cuantificaron las proteínas de cada tratamiento mediante la técnica de Bradford (Bradford 1961), utilizando el Kit de ensayo de proteínas BIO-RAD de IgG (Inmunoglobulina G) 1.38mg/ml como estándar. Se tomaron 100 μ g de proteína de cada fracción celular y se les añadió **solución de Laemmli** (4% SDS, 20% glicerol, 10% de β -mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8). Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS (SDS-PAGE) según Laemmli (Laemmli., 1970).

5.8 Ensayos de electroinmunotransferencia (Western blot) para la detección de PKC.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa por medio de una cámara de transferencia semiseca durante 90 minutos a 160 mAmp (por membrana de nitrocelulosa). Al finalizar la transferencia de proteínas, se comprobó si esta fue exitosa, al teñir la membrana con 5 ml de Rojo de Ponceau e incubarla por 5 minutos. Al observar las bandas de proteínas teñidas se lavaron la membranas 3 veces con 5ml de buffer **TTBS** (TBS + Tween 20 al 0.2%) por 5 minutos en agitación constante. Por último se lavaron las membranas con 5ml de buffer de **TBS 1X** (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5) durante 5 minutos en agitación constante.

Las membranas se trataron con leche desgrasada al 5 % en buffer de TBS 1X (.5g de leche desgrasada + 10 ml TBS) durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante, con el fin de bloquear interacciones inespecíficas. En seguida se lavaron las membranas dos veces con 5ml de buffer TTBS por 5 minutos en agitación constante. Más tarde las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios específicos anti-PKC durante toda la noche a una temperatura de 4°C y agitación constante. Posteriormente las membranas se lavaron 3 veces con 5 ml de buffer TBS-Tween por 5 minutos a temperatura ambiente y finalmente se hace un lavado con buffer de TBS por 10 minutos, antes de su incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo, conjugados con la peroxidasa de rábano (HRP) dos horas a temperatura ambiente en agitación constante. A continuación se lavaron de nuevo las membranas 3 veces con 5 ml de buffer TBS-Tween por 5 minutos a temperatura ambiente y después se lavó una vez con 5 ml de buffer TBS por 5 minutos. Consecutivamente las membranas fueron incubadas con ECL (reactivo de inmunodetección de proteínas por sus siglas en inglés Enhanced Chemiluminescence Reagent) para revelar las bandas por quimioluminiscencia.

Detección de PKC α por Western Blot

Para la detección de PKC α , se utilizó como anticuerpo primario anti-PKC α monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:1000 y como anticuerpo secundario HRP anti-ratón, a una dilución de 1:2000 (PIERCE).

Detección de PKC δ por Western Blot

Para la detección de PKC δ , se utilizó como anticuerpo anti-PKC δ policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:1000 y como anticuerpo secundario HRP anti-conejo, a una dilución de 1:5000 (PIERCE).

Detección de PKC θ por Western Blot

Para la detección de PKC θ , se utilizó como anticuerpo anti-PKC θ monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:1000 y como anticuerpo secundario HRP anti-ratón, a una dilución de 1:2000 (PIERCE).

5.9 Medición de la actividad de PKC en inmunoprecipitados.

Previo a los ensayos de actividad, los extractos crudos de hepatocitos se homogenizaron en presencia de una mezcla de inhibidores de fosfatasa (Pirofosfato de Sodio (Na V04) (2.00 mg/ ml), NaF (4.64 mg/ ml), fosfoferina (3mg/ml) y β -glicerol fosfato (81.8 mg/ml)) y el inhibidor de Tripsina como inhibidor de proteasas, los cuales también estuvieron presentes, durante la purificación de la PKC I y PKC II con DEAE celulosa.

- a) Inmunoprecipitación de las isoformas de PKC a partir de los eluidos obtenidos de la cromatografía con DEAE-celulosa.

Los concentrados de 1 ml de PKC I, correspondientes a cada tratamiento, se incubaron con anti-PKC (1mg/ml) correspondiente a cada isoforma por 1 hora a 4°C en agitación constante. En seguida se añadieron 20 μ l de una suspensión de proteína A agarosa al 50% y se incubó por 2 horas bajo las condiciones anteriores. Más tarde las muestras se lavaron por centrifugación por dos ocasiones a 9000 rpm por 1 minuto a 4°C con “buffer de lavado 1” (con detergentes y alta [NaCl]), en seguida las muestras fueron lavadas una vez con “buffer de lavado 2” (sin detergentes y baja [NaCl]).

- b) Ensayo de actividad de PKC.

Se incubaron los inmunoprecipitados anteriores por 20 minutos con “buffer de lavado 2” + β -mercaptoetanol (50 mM) a 4°C y se centrifugaron de nuevo para retirar el “buffer 2” cuidadosamente sin tocar el “pellet”. A cada muestra se le agregaron 50 μ l de mezcla de reacción (buffer K adicionado de ATP, sustrato y cofactores) incubándose con agitación a 30°C durante 20 minutos; en esta mezcla de reacción la PKC inmunoprecipitada efectúa la fosforilación del sustrato (histona) transfiriéndole fosfato radioactivo a partir del [³²P] ATP. La reacción se detuvo con la adición de 50 μ l de solución de Laemmli. Las muestras, hervidas y centrifugadas, se separaron en SDS-PAGE al 12.5%. Se tiñó el gel con una solución azul de Coomassie al de metanol al 25% y ácido acético al 10%. El gel se recubrió con celofán, se secó por calor y finalmente se expuso para autorradiografía a -70°C.

Amortiguador de inmunoprecipitación.

Tris 50 mM, NaCl 0.6 M, pH 8.3, inhibidor de tripsina 0.1mg/ml, tritón X-100 1%.

Buffer de lavado 1 para inmunoprecipitados con detergentes y alta [NaCl].

Tris 50 mM, NaCl 0.6 M, tritón X-100 1%, Igepal 0.5%, inhibidores de tripsina 0.1mg/ml e inhibidores de fosfatasas (Pirofosfato se Sodio (Na V04) (2.00 mg/ ml), NaF (4.64 mg/ ml), fosfoserina (3mg/ml) y β -glicerol fosfato (81.8 mg/ml)), pH 8.3.

Buffer de lavado 2 para inmunoprecipitados sin detergentes y baja [NaCl].

Tris 50mM, NaCl 0.15 M, inhibidor de tripsina 0.1mg/ml e inhibidores de fosfatasas (Pirofosfato se Sodio (Na V04) (2.00 mg/ ml), NaF (4.64 mg/ ml), fosfoserina (3mg/ml) y β -glicerol fosfato (81.8 mg/ml)), pH 7.5.

Buffer k 2x.

Tris 40 mM, MgCl 20 mM, CaCl₂ 0.5 mM, pH 7.5.

Mezcla de Reacción.

``Buffer K`` adicionado con 2 μ Ci (Curies) por muestra [γ^{32} P] ATP (6000 Ci/mmol) (el ATP se añade en el momento de hacer la reacción radioactiva) , Histona 200 μ g/ml de un stock de 5mg/ml, fosfatidilserina 20 μ g/ml de un stock de 10 mg/ml, y 1,2 dioleína 0.8 μ g/ml de un stock de 10 mg/ml.

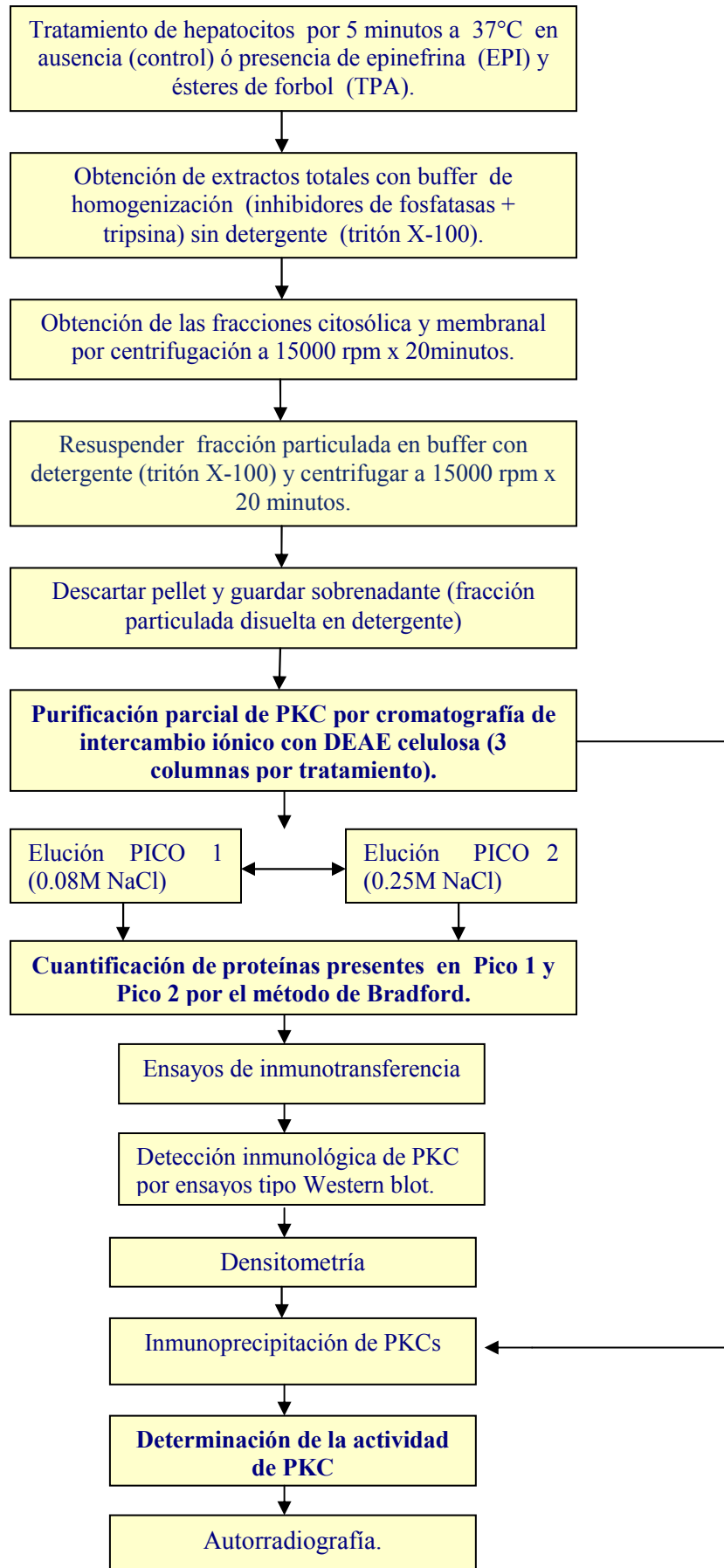


Figura 17. Diagrama de flujo de la estrategia experimental usada.

6. Resultados.

6.1 Efectos del TPA sobre la detección (expresión) de las isoformas α , δ y θ de la PKC.

Con el fin de establecer el efecto del TPA sobre la expresión de las isoformas α , δ y θ de la PKC, se incubó a los hepatocitos de rata intactos con el TPA a una concentración de 1 μ M por 5 minutos a 37°C. Después de esta incubación, se procedió a lisar a las células y obtener los extractos celulares solubles en detergente como se describe en los métodos experimentales para purificar la PKC por el método de intercambio iónico con columnas de DEAE-celulosa. Usando amortiguadores con distinta fuerza iónica (figura 16), se encontró que la mayoría de las isoformas de PKC que se expresan en hepatocitos de rata pueden ser separadas en dos subpoblaciones: una que eluye a baja concentración de sal (0.08 M de NaCl) o pico 1, y otra que eluye a mayor concentración de sal (0.25 M de NaCl) o pico 2. Posteriormente se cuantificaron las proteínas de Pico 1 y Pico 2 por el método de Bradford, usando 75 μ g de proteína por muestra para separarse en SDS-PAGE y así poder analizarse en ensayos de inmunotransferencia para detectar la presencia de las isoformas de PKC (figura 18) purificada de hepatocitos control en comparación con la purificada de hepatocitos tratados con TPA.

Se ha descrito que el tratamiento prolongado con TPA de distintos tipos celulares (más de 12 horas o incluso días) induce la pérdida de la detección de la PKC por degradación proteolítica designada como “down regulation” o modulación negativa (Young S. et al 1987, Ase K. et al., 1988, Lee, H. W. et al., 1997, Junoy Brice. et al., 2002). Además se ha sugerido, que ciertas isoformas de la PKC, puede suceder lo mismo en cuestión de minutos. Por lo anterior uno de los objetivos de este trabajo consistió en investigar los efectos en la expresión o detección de las isoformas α , δ y θ de PKC, de hepatocitos de rata, susceptibles de experimentar “down regulation” como resultado de su activación con TPA por 5 minutos.

A continuación se enlistan las isoformas de PKC en los picos 1 y 2 (en ausencia y presencia de TPA), y si éstas exhiben modulación negativa (pérdida de detección) mediante el análisis de ensayos de inmunotransferencia ó “Western blot”:

En **PKC α** el anticuerpo dirigido para detectar esta isoforma fue el anti-PKC α monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology). En el pico I se observa que la emisión de la señal de la isoforma PKC α disminuyó con respecto al control como efecto del tratamiento con TPA; este resultado indica que PKC α experimentó modulación negativa. Sin embargo en el pico II no encontramos pérdida de la señal de esta isoforma después del tratamiento con TPA, en comparación con su control (figura 18a).

En **PKC δ** el anticuerpo usado para detectar esta isoforma fue anti-PKC δ policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology). Se puede observar en el Pico I que la emisión de la señal de PKC δ es menor en comparación al control cuando fue activada con TPA. Esto indica que presentó modulación negativa, pero nuevamente ésta fue selectiva por la forma eluida en el pico I, ya que en cuanto al Pico II esta isoforma no registra dicho fenómeno (figura 18b).

Para el caso de **PKC θ** , el anticuerpo fue anti-PKC θ monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology). El efecto del tratamiento con TPA para esta isoforma dentro del Pico I fue una nula emisión de la señal en comparación con la del control, por lo tanto hubo down regulation.

En el pico II después del tratamiento no se observa la modulación negativa ya que se presenta una detección de la señal de la isoforma PKC θ semejante a la del control (figura **18c**).

De esta manera, los datos anteriores obtenidos en la purificación parcial de PKC α , δ y θ , utilizando la cromatografía en DEAE-celulosa, y el análisis de los eluidos mediante ensayos de “Western blot”, muestran que los efectos del TPA variaron según el pico de elución, pues en las proteínas eluidas en el pico 1 (con NaCl 0.08 M) este activador provocó en las tres isoformas modulación negativa, mientras que en las proteínas eluidas en el pico 2 (eluido con un amortiguador adicionado con NaCl 0.25 M) el TPA no produjo este fenómeno ya que no se observó la pérdida de detección de estas tres isoformas.

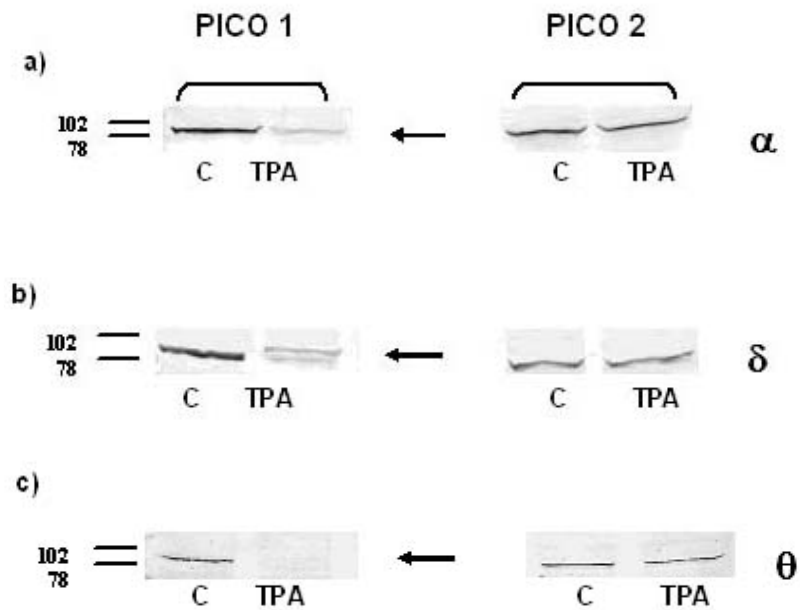


Figura 18. El efecto del TPA sobre la expresión (detección) de las isoformas PKC α , PKC δ y PKC θ es diferente en los picos de elución I y II. Hepatocitos aislados de rata (cepa Wistar de 250-300 g. macho) fueron incubados por 5 minutos en ausencia (C) ó en presencia de TPA a 37°C. Posteriormente se realizó la purificación de PKC por cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa, por la cual se obtuvieron los picos de elución 1 (eluido con 0.08 M de NaCl) y 2 (eluido con 0.25 M). En todos los casos (a, b, c), se tomaron 75 μ g de proteína para ensayos de inmunotransferencia revelándose con un anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina. Las posiciones del peso molecular (en kDa) están indicadas a la izquierda.

6.2 Efectos de la Epinefrina y el TPA en la detección (expresión) de PKC alfa y PKC theta.

Para determinar y comparar los efectos de la epinefrina en la expresión de la PKC, se procedió a analizar los efectos que generan el TPA y la Epinefrina sobre las isoformas PKC α y PKC θ , utilizando sus respectivos anticuerpos (anteriormente descritos). Se efectuaron ensayos en donde los hepatocitos de rata recién aislados, se incubaron con o sin Epinefrina 10 μM + 10 μM propranolol (antagonista β -adrenérgico) o con y sin TPA (1 μM) durante 5 minutos a 37°C. Las células se lisaron en un amortiguador de homogenización con Tritón X-100 adicionado con una mezcla de inhibidores de fosfatasas. Los lisados solubles en detergente se agregaron a una columna cromatográfica con DEAE-celulosa. Usando amortiguadores con distinta fuerza iónica, se lograron separar los dos picos de elución llamados Pico 1 y Pico 2, los cuales se resolvieron en SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a nitrocelulosa para su análisis por Western blot utilizando anticuerpos dirigidos contra las isoformas PKC α y PKC θ . Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano y las bandas se revelaron mediante quimioluminiscencia, posteriormente se analizaron las imágenes por el método de densitometría (figura 16).

Como se pueden observar en los resultados presentados en la figura 19 (panel a) en el pico de elución I la PKC α de células tratadas con TPA y reconocida por el anticuerpo anti-PKC α monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology), mostró una disminución en su detección en comparación con su control, pues se redujo la expresión de la señal considerablemente casi al 50 %. Con respecto a la acción de la Epinefrina en el pico 1, ésta no ejerce los mismos efectos que el éster de forbol, porque en comparación con el control la intensidad de la señal de PKC α no cambió. En el pico 2 se observa que no hubo pérdida de detección de la expresión obtenida de células tratadas en comparación con la obtenida de células control y que inclusive hay un ligero aumento en la detección de PKC α con epinefrina al contrastarla con el control.

Para determinar la expresión de PKC θ , se utilizó el anticuerpo anti-PKC θ monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology) para reconocer esta isoforma. Como se muestra en la figura 19 (panel b), el efecto provocado por el TPA en el pico de elución 1 es la pérdida de detección selectiva de la enzima obtenida de células tratadas con TPA al compararse con el control. Lo anterior contrasta con el resultado conseguido en el pico 2, porque se observa un aumento en la señal obtenida de células tratadas con TPA y con Epinefrina con respecto a la débil señal obtenida de células control.

En conjunto, estos datos indican que los efectos sobre la detección de la señal de las isoformas PKC α y PKC θ son diferentes según el tipo de activador empleado para activar a PKC en células intactas y son diferentes además para cada isoforma de PKC.

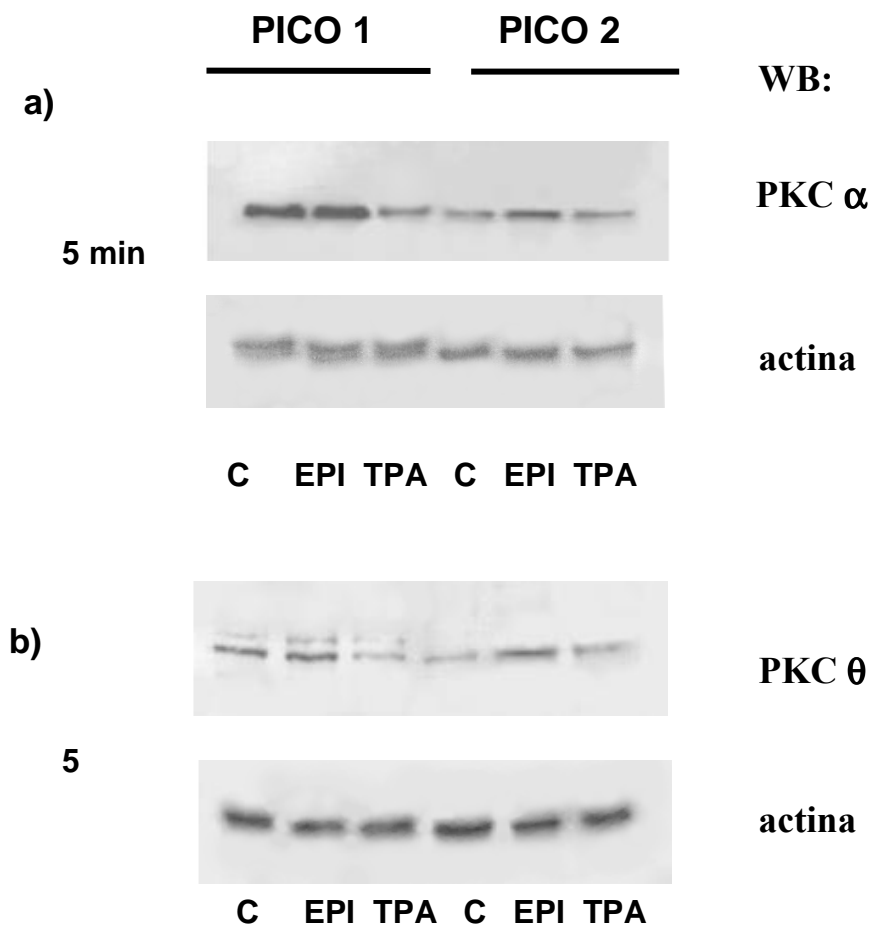


Figura 19. Efecto de los activadores Epinefrina y TPA sobre la expresión de las isoformas PKC α y PKC θ en los picos de elución 1 y 2. Los hepatocitos aislados de rata (cepa Wistar de 250-300 g. macho) fueron incubados por 5 minutos en ausencia (C) ó presencia de TPA (1 μ M) ó Epinefrina (10 μ M) a 37°C. Consecutivamente se realizó la purificación de PKC por cromatografía de intercambio iónico con DEAE celulosa, por la cual se obtuvieron los picos de elución 1 y 2. En ambos casos (a y b), extractos totales (75 μ g/línea) de proteína fueron obtenidos y se detectó la presencia de las isoformas PKC α y PKC θ mediante ensayos de inmunotransferencia que descrita en la sección de materiales y métodos. Las imágenes son representativas de por lo menos 3 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. La detección de actina se utilizó como control de que se cargó la misma cantidad de proteína de los picos de elución en cada carril.

6.3 Redistribución intracelular de las isoformas PKC α , PKC δ y PKC θ producida como resultado del tratamiento de hepatocitos con TPA o con Epinefrina.

Las acciones ejercidas por la PKC pueden ser localizadas en múltiples compartimientos celulares. Una clave para entender su regulación específica fueron las investigaciones donde se demostraban que dentro de la misma célula las isoformas individualmente tenían diferentes localizaciones después de ser estimuladas tanto por ésteres de forbol como por los activadores fisiológicos de la PKC ya que causan la redistribución de la enzima desde el citosol hacia los compartimientos membranales con la subsecuente activación de la cinasa (Mochly-Rosen and Gordon, 1998).

La translocación de PKC del citoplasma a las membranas ha sido presentada por varios grupos (Haller *et al.*, 1998; Almholt *et al.*, 1999; Gschwent *et al.*, 2000). Fundados en estudios de Western blot, se conoce que la translocación producida por el TPA origina un descenso de la señal de PKC en el citoplasma y un incremento relacionado de la misma en la membrana plasmática (Dessev G. *et al.*, 1988; Kiley S.C. y Jaken S., 1990). Para determinar de qué forma la translocación de las isoformas α , δ y θ se ve afectada por la acción ejercida de los activadores de PKC, se efectuaron ensayos redistribución intracelular en hepatocitos de rata, los cuales fueron obtenidos por medio de la técnica de Berry y Friend (Berry M.N. y Friend D.A., 1969), se incubaron con o sin Epinefrina 10 μ M + 10 μ M propranolol (antagonista β -adrenérgico) y con o sin TPA (1 μ M) durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente los hepatocitos fueron lisados para conseguir primeramente los componentes citosólicos y subsiguientemente las partes membranales (descritos en materiales y métodos); a cada fracción subcelular se le hizo cuantificación de proteínas. A los extractos se les resolvió por SDS-PAGE al 10%, y mediante ensayos de “Western blot”, se analizó la presencia de las tres isoformas en las fracciones subcelulares por medio de anticuerpos específicos. Para cada una de las tres isoformas se efectuaron análisis de densitometría y de análisis de imagen con el objetivo de cuantificar la presencia de las isoformas en los lotes control y en los tratados con TPA y Epinefrina (figura 20)

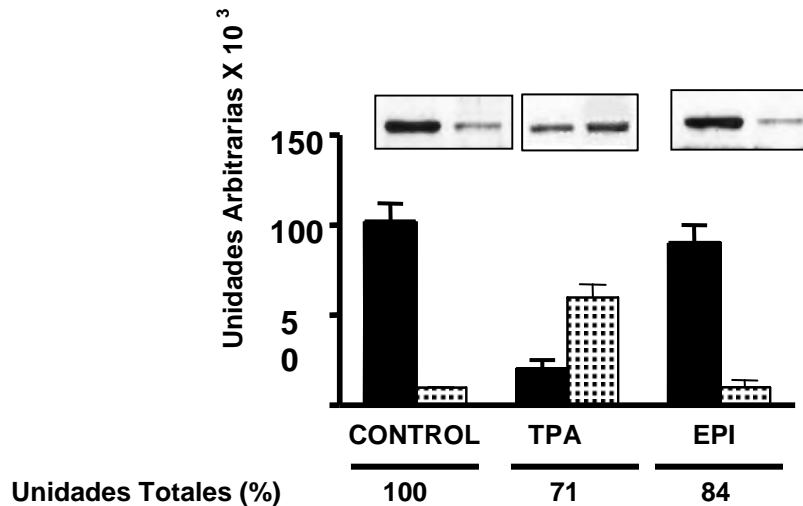
La separación de los extractos celulares en fracciones citosólica y particulada revelaron que PKC α está más asociada con la fracción particulada cuando a los hepatocitos se les incubaba con TPA por cinco minutos, indicando una translocación hacia los compartimientos subcelulares membranales provocada por el éster de forbol, probablemente su activación (figura 20 a). Por otra parte, cuando a PKC α se le incubaba con epinefrina, la cinasa se observa principalmente en la porción citosólica, revelando que este activador no induce su translocación, probablemente, su activación. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios del desplazamiento de PKC α después de su activación con TPA en líneas celulares de carcinoma de colon humano, donde se observó que esta isoforma se translocó a la membrana plasmática así como a la membrana nuclear (Masur y Lang, 2001). Llama la atención sin embargo que a pesar de que se observa translocación y activación de PKC α , también se obtuvo una pérdida de detección de la proteína total, como se aprecia en el % de unidades totales marcadas (figura 20 a).

Para la isoforma PKC δ se observa que después del tratamiento con TPA por cinco minutos, la estimulación no logra producir translocación y además se observa una clara disminución en la cantidad total de proteína detectada. En cuanto a la acción de la epinefrina sobre PKC δ se observa el mismo resultado, esta hormona no indujo translocación de la PKC y también se obtuvo disminución de detección, de la proteína total (figura **20 b**).

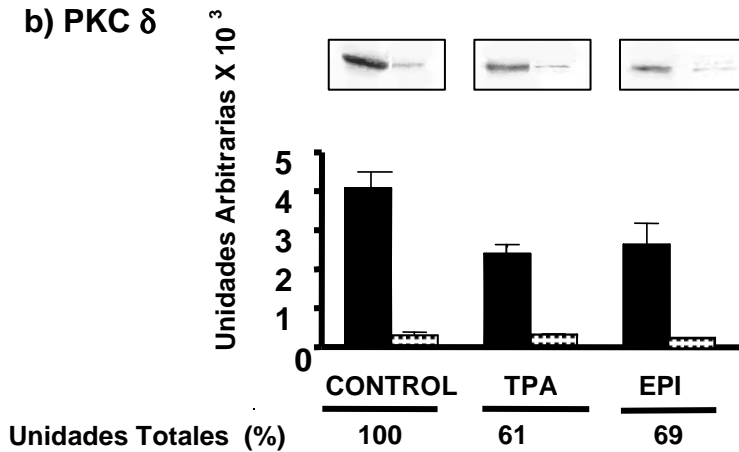
En el caso de PKC θ , los resultados muestran que posterior al tratamiento con TPA durante 5 minutos, se observa que sólo el tratamiento con TPA y no el de Epinefrina, provocó una redistribución de PKC θ desde el citosol a la fracción particulada, pero al igual que con PKC α y δ , se obtiene también una clara disminución en la cantidad total de proteína detectada (figura **20c**).

En conjunto, los resultados obtenidos en estos experimentos además de presentar los efectos diferenciales producidos por el TPA y la epinefrina sobre la activación (translocación) de las tres isoformas, también indican que estos activadores inducen la modulación negativa o “down regulation” en diferentes niveles (figuras **20 a, b y c**), y de manera selectiva sobre estas isoformas de PKC.

a) PKC α



b) PKC δ



■ Citosol

▤ Fracción particulada

Figura 20. Efecto del TPA y Epinefrina sobre la redistribución intracelular de PKC α , PKC δ y PKC θ . Hepatocitos aislados de rata (cepa Wistar de 250-300 g. macho) fueron incubados en ausencia (C) o en presencia de TPA 1 mM o de Epinefrina 10 μ M más propranolol por 5 minutos a 37°C. Las células se lisaron en ausencia o presencia de Tritón X-100 al 1% para obtener las fracciones citosólica y particulada. En todos los casos (a, b, y c), extractos totales de la fracción citosólica (barras negras) y particulada (barras de puntos) (75mg/línea) fueron obtenidos y se procesaron mediante la técnica de Western blot. Las membranas se incubaron con anticuerpos anti-PKC específicos para detectar la presencia de las isoformas PKC α , PKC δ y se revelaron con segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina mediante quimioluminiscencia. Se efectuó la densitometría en las autorradiografías. Las gráficas representan los promedios de entre 3-5 experimentos \pm el error estándar.

c) PKC θ

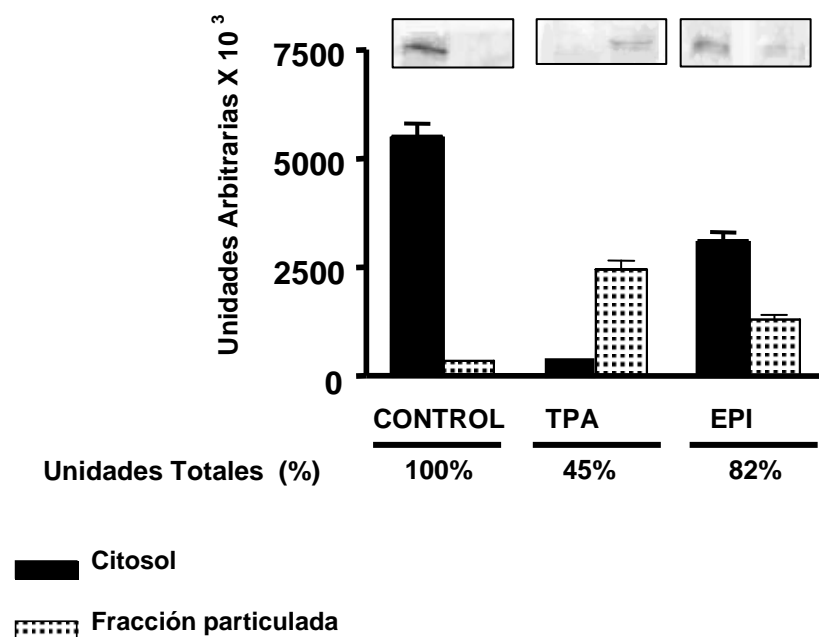


Figura 20. Efecto del TPA y Epinefrina sobre la redistribución intracelular de PKC α , PKC δ y PKC θ . Hepatocitos aislados de rata (cepa Wistar de 250-300 g. macho) fueron incubados en ausencia (C) o en presencia de TPA 1 mM o de Epinefrina 10 μ M más propranolol por 5 minutos a 37°C. Las células se lisaron en ausencia o presencia de Tritón X-100 al 1% para obtener las fracciones citosólica y particulada. En todos los casos (a, b, y c), extractos totales de la fracción citosólica (barras negras) y particulada (barras de puntos) (75mg/línea) fueron obtenidos y se procesaron mediante la técnica de Western blot. Las membranas se incubaron con anticuerpos anti-PKC específicos para detectar la presencia de las isoforma PKC θ y se revelaron con segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina mediante quimioluminiscencia. Se efectuó la densitometría en las autorradiografías. Las gráficas representan los promedios de entre 3-5 experimentos \pm el error estándar

6.4 Efectos del TPA y la Epinefrina sobre la actividad enzimática de isoformas de PKC en los picos de elución 1 y 2.

Basándose en los resultados obtenidos en los ensayos de translocación de las isoformas de PKC después de ser tratadas con el TPA y con la Epinefrina, se procedió a investigar los efectos que ejercen estos activadores sobre la actividad enzimática de la Proteína Cinasa C. Además, estas tres isoformas exhibieron de forma evidente el fenómeno de modulación negativa (en cuanto a pérdida de detección) a consecuencia del tratamiento con TPA y la Epinefrina. Por lo que se procedió a investigar si la incubación con estos activadores por 5 minutos influía en su actividad catalítica y confirmar si esto tenía alguna relación con la modulación negativa. También en este experimento se seleccionó a la isoforma PKC ζ de la familia de las atípicas, para usarla como control ya que ésta no manifiesta activación por el TPA en diversas líneas celulares, sin embargo no se conoce bien si ambos activadores pueden afectar indirectamente su actividad enzimática (Martelli A.M. et al., 2006; Moscat J. et al., 2006; Ways D.K. et al., 1992).

Con el fin de establecer el efecto de la epinefrina y el TPA en la actividad enzimática de PKC α , PKC δ y PKC θ en el pico de elución 1, se efectuaron ensayos en hepatocitos de rata los cuales se incubaron con TPA (1 μ M) o con epinefrina (10 μ M + 10 μ M de propranolol), durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente las células se lisaron en un amortiguador de homogenización con Tritón X-100, adicionado con una mezcla de inhibidores de fosfatasas, con el objetivo de preservar el estado de fosforilación de las isoformas de PKC, importante para su actividad enzimática, porque se ha evidenciado que la actividad y estabilidad de la PKC está regulada por acontecimientos que conservan a la proteína en estado de fosforilación en su dominio catalítico (Bornacin F. y Parker P.J., 1996). Los extractos celulares solubles en Tritón X-100 se agregaron a columnas cromatográficas con DEAE-celulosa. Usando amortiguadores con distinta fuerza iónica, se lograron separar en dos picos de elución llamados Pico 1 y Pico 2. Dichos picos fueron sometidos a inmunoprecipitación con anticuerpos anti PKC de isoformas específicos y con estos inmunoprecipitados obtenidos se efectuaron las pruebas de actividad enzimática de PKC in vitro, como está descrito en la sección de materiales y métodos (figura 16).

A continuación se presentan los resultados que manifiestan el comportamiento catalítico de las 3 isoformas de PKC sobre el sustrato histona, al que se le transfirió 32 P a partir de [γ 32 P] ATP, como se describe en la metodología.

Como se muestra en las figura 21, en el pico de elución 1, el tratamiento con TPA causó una reducción considerable en la actividad enzimática de las isoformas PKC α y PKC θ y esto se manifestó en la baja de la intensidad de 32 P transferido a la histona (se ve como un doblete) con respecto al control. La disminución de su actividad fue del orden de 50% para alfa y 40% para theta. En el caso de PKC δ , se observa que esta isoforma no manifiesta pérdida de su actividad enzimática al ser tratada con el éster de forbol pues la intensidad de la banda de histona fosforilada, no mostró cambios con respecto al control. Como se esperaba, la actividad de PKC ζ no mostró cambio por tratamiento con TPA con respecto al control.

En el pico de elución 2, el tratamiento con TPA presenta un resultado contrastante con el obtenido en el pico 1, debido a que este activador provocó un incremento importante en la actividad enzimática de PKC α y de PKC θ como se muestra en que la intensidad de las bandas de histona fosforilada es superior respecto a los controles. Hay un aumento de actividad aproximadamente del doble para theta. Respecto a PKC δ , sorprendentemente sucedió un descenso significativo del 50% en su actividad en comparación al control. En PKC ζ no se produce algún cambio en su actividad enzimática como se esperaba al no ser modulada por TPA (figura 22).

Con respecto al tratamiento con epinefrina, como se puede observar en la figura 22, el tratamiento con esta hormona en el pico de elución 1 no provoca pérdida alguna en la actividad de las cuatro isoformas, ya que todas conservan aproximadamente el 100% de su actividad (figura 22).

Dentro del pico de elución 2, las cuatro isoformas no presentaron una caída en su actividad después de ser incubadas con la epinefrina, por el contrario, el caso más notable es el de PKC α , en el que se puede apreciar un aumento en la actividad con respecto a su control (figura 22).

En conjunto, los datos obtenidos nos indican que las dos subpoblaciones de isoformas de PKC fueron activadas de modo diferente por TPA y por epinefrina. Las subpoblaciones que eluyen de la columna de DEAE-celulosa en el pico II correspondientes a las isoformas α y θ de PKC, se activan con TPA y con epinefrina, ya que se redistribuyen a fracción particulada y se incrementa su actividad catalítica. Las subpoblaciones que eluyen en el pico I de estas isoformas disminuye en más de un 60% su actividad. La PKC δ no se activa ni con TPA ni con epinefrina ya que no sufre redistribución como consecuencia del tratamiento con estos agentes, y se inhibe la actividad de la subpoblación de esta isoforma que eluye en el pico II como resultado del tratamiento de las células con TPA.

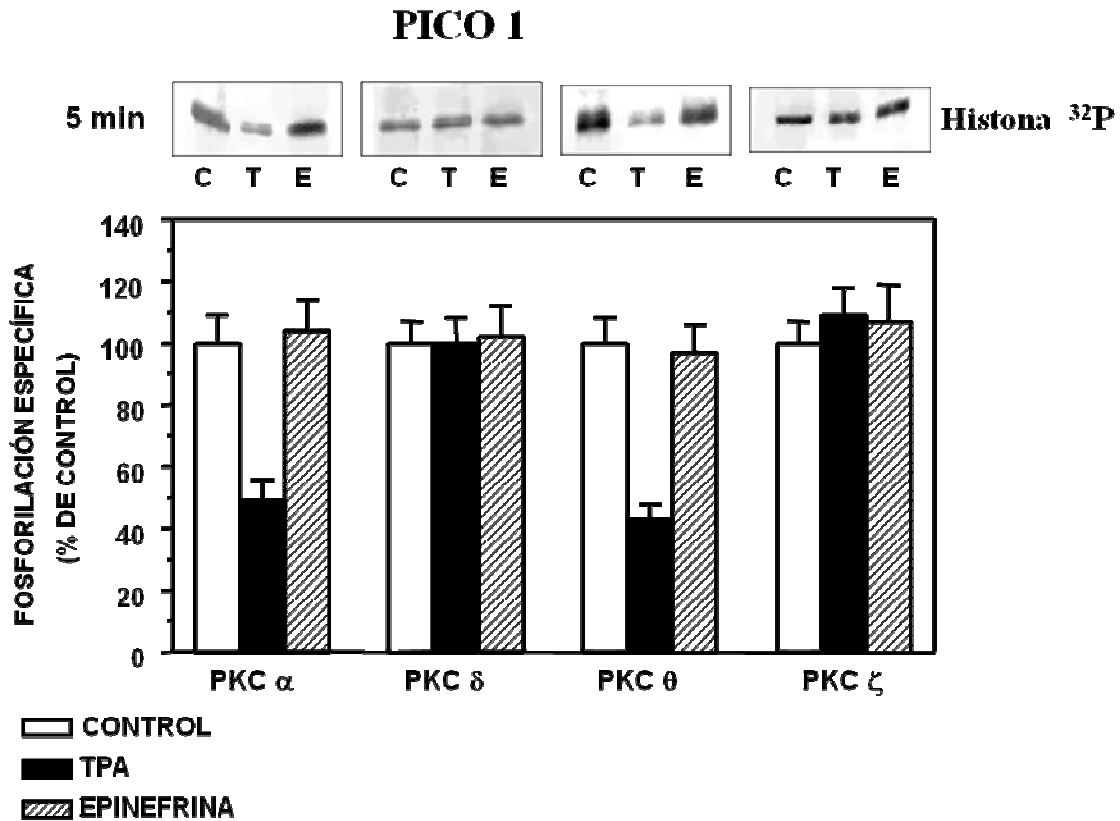


Figura 21. Efecto del TPA y Epinefrina (vía receptores α 1-adrenérgico) sobre la actividad enzimática de PKC α , PKC δ , PKC θ y PKC ζ eluidas en el pico 1. Hepatocitos de rata (cepa Wistar de 250-300 g. macho) recién aislados fueron incubados por 5 minutos en ausencia (C., barras blancas) ó en presencia de TPA 1 μ M (barras negras) ó Epinefrina 10 μ M + propranolol (barras rayadas) durante 5 minutos a 37°C. La PKC se purificó parcialmente de los extractos celulares por cromatografía en DEAE celulosa para obtener las isoformas de PKC que eluyen en el pico I. Se inmunoprecipitaron las isoformas α , δ , θ y ζ a partir de este pico de elusión I y con los inmunoprecipitados se determinó la actividad catalítica de estas isoformas *in vitro* donde fue usado como sustrato la Histona H1 descrito en materiales y métodos. Al finalizar esta reacción, las muestras se separaron mediante SDS-PAGE al 12%, se tiñeron con azul de Coomassie y el gel ya seco se expuso para autorradiografía, como se observa en el panel superior. Las gráficas presentan los resultados de la fosforilación específica definida como el cociente de la proteína fosforilada (autorradiografía) entre el total de la proteína (gel coloreado). Los valores de las gráficas representan el promedio de 3-5 experimentos \pm el error estándar ($p < 0.05$).

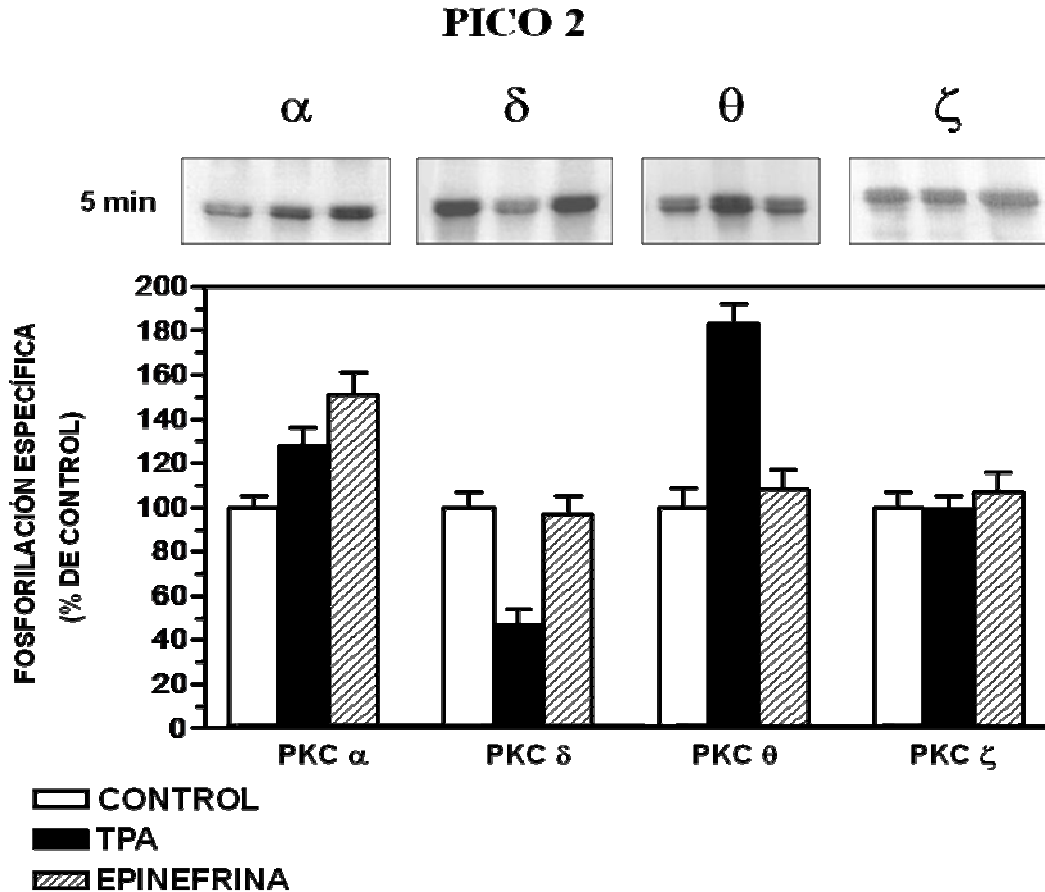


Figura 22. Efecto del TPA y Epinefrina (vía receptores α_1 -adrenérgico) sobre la actividad enzimática de PKC α , PKC δ , PKC θ y PKC ζ eluidas en el pico 2. Hepatocitos de rata (cepa Wistar de 250-300 g macho) recién aislados fueron incubados por 5 minutos en ausencia (C, barras blancas) ó en presencia de TPA 1 μ M (barras negras) ó Epinefrina 10 μ M + propranolol (barras rayadas) durante 5 minutos a 37°C. La PKC se purificó parcialmente de los extractos celulares por cromatografía en DEAE celulosa para obtener las isoformas de PKC que eluyen en el pico II. Se inmunoprecipitaron las isoformas α , δ , θ y ζ a partir de este pico de elución II y con los inmunoprecipitados se determinó la actividad catalítica de estas isoformas *in vitro* donde fue usado como sustrato la Histona H1 descrito en materiales y métodos. Al finalizar esta reacción, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE al 12%, se tiñeron con azul de Coomassie y el gel ya seco se expuso para autorradiografía, como se observa en el panel superior. Las gráficas presentan los resultados de la fosforilación específica definida como el cociente de la proteína fosforilada (autorradiografía) entre el total de la proteína (gel coloreado). Los valores de las gráficas representan el promedio de 3-5 experimentos \pm el error estándar ($p < 0.05$).

7. DISCUSION.

Uno de los mecanismos reguladores de la proteína cinasa C es el fenómeno conocido como “down-regulation” o modulación negativa, la cual se define en conjunto como la inactivación catalítica y la posterior degradación proteolítica de la enzima. La inducción de la modulación negativa de la PKC parece ser una consecuencia de su activación y probablemente el aumento de su proteólisis refleja: a) la activación de una proteasa, b) una modificación conformacional en la PKC que la haga susceptible a la acción de la misma o bien una combinación de ambos procesos. Diversos trabajos con mutagénesis dirigida han demostrado que la defosforilación de la PKC predispone a la proteína a la modulación negativa debido a una pérdida en la estabilidad molecular que la hace sensible a la acción de fosfatasas y de agentes oxidantes, produciéndose la inactivación de la enzima

Se ha reportado ampliamente en diversos linajes celulares, la acción del TPA y del DAG sobre la PKC durante tratamientos prolongados. La modulación negativa inducida por estos agentes en la PKC se ha presentado desde las 12 hasta las 72 horas de tratamiento dependiendo del tipo celular. Según lo anterior, la modulación negativa de la PKC se presenta invariablemente cuando la exposición al TPA es por lapsos prolongados de tiempo, por lo que este procedimiento se ha utilizado comúnmente como una forma de inducir la pérdida de expresión de isoformas de PKC.

El proceso de down-regulation ha sido demostrado en varias de las isoformas que se unen biológicamente a los ésteres de forbol (subfamilias clásicas y nuevas). Las proteínas en el citosol pueden ser degradadas en el proteosoma, mientras que aquellas que están asociadas con membranas pueden ser blanco para degradación en vacuolas o lisosomas (Liu and Heckman., 1998). Sin embargo, diferentes grupos han señalado que la down-regulation de la Proteína cinasa C es variable según el estímulo empleado y la isoforma implicada; por ejemplo, en células GH4C1, la PKC α no presenta down-regulation cuando es tratada con TPA o TRH (hormona liberadora de tirotrópina), mientras que en otras células, PKC α desaparece después de aplicar TPA. En la misma línea celular la down-regulation de PKC β II se indujo con TPA, no así cuando se añadió la TRH (Kiley S. et al., 1990; Akita Y. et al 1990).

La activación crónica de las isoformas de PKC es seguida por la desensibilización de las isoformas y las respuestas celulares asociadas. Dependiendo de la duración del estímulo ya sea por ésteres de forbol o por neuropéptidos, las isoformas sufren down-regulation de forma selectiva (Junoy, B et al., 2002). Sin embargo, existe también evidencia experimental que indica que la activación de PKC por tiempos cortos también produce “down regulation” de algunas isoformas como consecuencia de su activación transitoria, que no puede ser explicada por una degradación proteolítica de la enzima. Por lo tanto el principal objetivo de este trabajo fue examinar el mecanismo de “down regulation” que sucede a tiempos breves de activación de PKC (activación aguda) con ésteres de forbol (TPA) y con Epinefrina en hepatocitos de rata.

En el presente trabajo de tesis se presentan evidencias que demuestran que las isoformas α , δ y θ de PKC derivadas de hepatocitos de rata responden de manera diferente a los agentes usados para activarlas: el éster de forbol TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13 acetato) y la hormona epinefrina. Para entender por qué ocurre esto, debe tomarse en cuenta en primer lugar que los diferentes efectos obtenidos de estos dos agentes sobre

las isoformas de PKC pueden deberse a que no activan a la PKC de la misma manera: mientras que el TPA, por su naturaleza hidrofóbica, entra por difusión a la célula y se une directamente a la PKC en la región C1 del dominio regulatorio de la enzima activándola de manera directa, la epinefrina no entra a la célula sino que interacciona con el receptor α_1 -adrenérgico de los hepatocitos para iniciar la cascada de señalización intracelular que lleva a la activación de PKC. Es decir, en este caso, la epinefrina actúa de forma totalmente fisiológica, activando la vía de transducción que produce los segundos mensajeros calcio y diacilglicerol, los cuales son activadores fisiológicos de la PKC. Además, el TPA causa un incremento dramático en la afinidad de PKC por las membranas, y no es instantáneamente metabolizado como el diacilglicerol, resultando en una activación constitutiva de PKC (Newton., 2001) en lugar de la activación transitoria fisiológica inducida por el diacilglicerol.

Las tres isoformas de PKC estudiadas se purificaron parcialmente a partir de las células tratadas in vivo con TPA o con epinefrina durante 5 minutos, por cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa) en dos subpoblaciones que eluyen de la columna en dos picos distintos: una subpoblación de las tres isoformas eluye a menor fuerza iónica (0.08 M de NaCl, pico 1) mientras que la otra subpoblación eluye a mayor fuerza iónica (0.25 M de NaCl o pico 2). Esto sugiere que cada una de estas isoformas de PKC sufre alguna(s) modificación(es) post-traduccionales como resultado de su activación, que hacen que tengan diferente afinidad por la columna. Interesantemente, los anticuerpos utilizados para detectar las isoformas α , δ y θ obtenidas del pico 1 de elución (0.08 M NaCl) no detectaron estas isoformas, pero sí lo hicieron en las muestras obtenidas del pico 2 de elución. Además, la pérdida de detección de estas isoformas fue selectiva para el tratamiento con TPA en las isoformas eluidas en el pico 1, mientras que la detección de la señal fue mayor selectivamente para el tratamiento con epinefrina en las formas eluidas en el pico 2 (ver figuras **18** y **19**).

Se conoce que el mecanismo esencial para regular la función de varios miembros de la superfamilia de las proteínas cinasas de mamíferos es el control reversible por fosforilación/desfosforilación. Sin embargo, también se encuentran otras modificaciones post-traduccionales, las cuales modulan la actividad de la mayoría de las proteínas en células eucariotas. Las modificaciones post-traduccionales de las proteínas representan mecanismos ubicuos y esenciales para controlar la actividad, localización, estabilidad y la interacción proteína-proteína. Diversas investigaciones han reportado en varias líneas celulares (incluyendo a los hepatocitos de rata) otros efectos provocados por el TPA, donde el tratamiento con este promotor de tumores disipa parcial o completamente la actividad enzimática de la PKC sobre varios de sus sustratos como, la vinculina, la histona H1, la protamina y otros (Cochet C. *et al.*, 1986; Robles Flores M. *et al.* 1988; González A. H., 2001). Esta caída en la actividad enzimática se ha relacionado fuertemente con la desfosforilación de la enzima en residuos claves los cuales conservan a la PKC en un estado catalíticamente apto. Distintos trabajos han mostrado que la desfosforilación es un suceso precedente a la inactivación de la enzima. Bornacin y colaboradores han revelado que la fosforilación del residuo de treonina 638 de PKC α está involucrada en la tasa de desfosforilación e inactivación de la enzima, ya que la pérdida del fosfato en el residuo de treonina 638 hace proclive a la PKC α a los agentes oxidantes, efectos de proteasas y a las fosfatasa quienes causan un detrimento significativo de la actividad catalítica (Ways D.K. *et al.*, 1992).

Por otra parte, la fosforilación de los residuos de tirosina ha emergido como un importante mecanismo de modulación de la actividad de PKC (Konishi, H et al., 1997). Otras modificaciones que también se han reportado en PKC es la nitración en residuos de tirosina: Se ha señalado que el óxido nítrico (NO) induce la nitrosilación de tirosina de PKC ϵ mediada por el peroxinitrito in cardiomiocitos de conejos in vitro, y in vivo en el miocardio de conejo precondicionado con NO de donadores. Además, la nitrosilación de PKC ϵ facilita su interacción con la proteína selectiva de anclaje RACK 2 y promueve la translocación y activación de PKC ϵ (Balafanova, Z et al., 2002). La nitración de los residuos de tirosina tiene muchas características en común con la fosforilación: ambas modificaciones son reversibles y específicas llevando a la célula a modificar la función de la proteína flexible, y más específicamente en respuesta a los estímulos ambientales.

Las modificaciones post-traduccionales son mecanismos esenciales para influenciar las acciones de la PKC. Estas pueden regular a la PKC ya sea interviniendo directamente en sus habilidades catalíticas o por otros medios tales como, regulando la interacción de la cinasa con otras proteínas e influyendo sobre su localización intracelular (Robles-Flores et al., 2008). Por lo tanto, los datos conseguidos en este trabajo, sugieren que la pérdida de actividad enzimática de las isoformas PKC α , δ y θ , se origine a que el TPA induce una fosforilación en su extremo carboxilo, que se sabe controla la actividad catalítica de la enzima. Por otro lado, la pérdida de detección de la isoforma en cuestión, puede estar relacionada también con este hecho, ya que la proteína modificada puede no ser ya reconocida por el anticuerpo utilizado.

Desde su descubrimiento a principios de los años ochenta, la translocación (redistribución) de la PKC desde el citosol hasta la fracción particulada ha servido como el criterio de activación distintivo de PKC (Newton A. and Jonson J., 1998). Las isoformas convencionales y nuevas de PKC migran hacia las membranas en respuesta a los altos niveles de diacilglicerol, que resultan en una activación completa de estas isoformas (Corbalán-García and Gómez-Fernández; 2006). Con base en este criterio de activación, en este trabajo se observó que solamente se logra la activación de la isoforma α con TPA y de la isoforma θ tanto con TPA como con epinefrina, como se observa en la figura 20. La isoforma δ no sufrió ninguna redistribución en respuesta al tratamiento con TPA o con epinefrina. Estos resultados fueron congruentes con los datos obtenidos de la medición de la actividad in vitro de las isoformas de PKC eluidas en los picos 1 y 2 utilizando como sustrato la histona H1. Como puede verse en la figura 21, solamente las isoformas α y θ obtenidas en el pico 1 a partir de las células tratadas con TPA son las que perdieron su actividad, pero estas mismas isoformas obtenidas del pico 2, mostraron un incremento en su actividad (figura 22), congruente con la translocación observada como resultado de su activación tanto con TPA como con epinefrina (figura 20). La isoforma δ , en la que ningún tratamiento indujo su redistribución, no tuvo cambios en su actividad en el pico 1 e inclusive disminuyó su actividad en la obtenida del pico 2.

En resumen, si la translocación nos indica que algunas subpoblaciones de PKC α y θ son las que mostraron redistribución, probablemente, activación, éstas deben ser las correspondientes a las que eluyen en el pico 2, las cuales presentaron un incremento en su actividad en los ensayos. Los resultados sugieren que las subpoblaciones de PKC α y θ que eluyen en el pico 1, sufren algún cambio post-traduccional teniendo como

consecuencias tanto la pérdida de detección por el anticuerpo usado, como la pérdida de su actividad. Por lo tanto, tomando en conjunto todos los datos, probablemente es la subpoblación de las isoformas que eluyen en el pico 1 la que falta en la detección en los Western blots correspondientes a este pico y que falta en la detección total de PKC en los experimentos de translocación.

¿Cuál es la razón por la que una población o “pool” de una misma isoforma responda al tratamiento con TPA o con epinefrina y otro “pool” no? Existen varias posibilidades: que existan diferentes subpoblaciones porque tienen modificaciones post-traduccionales distintas y esto hace que respondan distinto a los estímulos, o también que exista una compartimentalización intracelular en la que la interacción con proteínas de anclaje juegue un papel trascendental. A este respecto, se sabe que las “proteínas de anclaje” o “scaffolding proteins” se acoplan a la PKC. Ciertas proteínas de unión regulan a múltiples isoformas de la proteína cinasa C. Asimismo hay proteínas de unión para PKCs no fosforiladas, fosforiladas y activadas. Las proteínas de anclaje se asocian a la proteína cinasa C por múltiples mecanismos. Algunas proteínas se unen en el dominio regulador y otros se asocian en el dominio catalítico. Por lo tanto, la naturaleza ha tomado ventaja de la superficie única de las isoformas de la PKC, manipulando su localización en sitios intracelulares específicos (Newton., 2001). Hay dos categorías generales para las proteínas que median el anclaje al sustrato. La primera incluye sustratos que interactúan con cinasas C (STICKs) y la segunda incluye a las proteínas que no son sustratos sino que posicionan a la PKC en la vecindad de los sustratos: Receptores para Cinasa C (RACKs) (Jaken. S. and Parker. P. J., 2000), y se piensa que probablemente *in vivo*, los RACKs se anclan a la PKC translocada (activa) en dominios membranales específicos en la cercanía de proteínas sustrato adecuadas, y consecuentemente promueve la fosforilación del sustrato.

En resumen, el presente trabajo de tesis da evidencias de que la activación de las isoformas de PKC α , δ y θ promovida por la hormona epinefrina y el promotor de tumores TPA, es diferente pues involucra a la naturaleza de las isoformas, a las modificaciones post-traduccionales que ya tienen o que se inducen en ellas, a las proteínas a las que se encuentran asociadas en los diferentes compartimentos intracelulares y al tipo celular trabajado.

8. CONCLUSIONES.

1. Las isoformas de PKC α , δ y θ co-expresadas en hepatocitos de rata responden de manera diferente al tratamiento de las células con agentes activadores de PKC.
2. Cada isoforma de PKC α , δ y θ existe en los hepatocitos en por lo menos dos “pools” o subpoblaciones que pueden ser separadas por cromatografía de intercambio iónico.
3. Las subpoblaciones que eluyen de la columna de DEAE-celulosa en el pico II correspondientes a las isoformas α y θ de PKC, se activan con TPA y con epinefrina, ya que se redistribuyen a fracción particulada y se incrementa su actividad catalítica. Las subpoblaciones que eluyen en el pico I de estas isoformas, se inhiben pues disminuye en más de un 60% su actividad y no muestran redistribución.
4. La PKC δ no se activa ni con TPA ni con epinefrina ya que no sufre redistribución como consecuencia del tratamiento con estos agentes, y se inhibe la actividad de la subpoblación de esta isoforma que eluye en el pico II como resultado del tratamiento de las células con TPA.
5. La pérdida de la detección de las proteínas α y θ de PKC así como la disminución de su actividad como resultado del tratamiento de las células con TPA, puede deberse a la inducción de cambios post-traduccionales (tales como cambio en el estado de fosforilación en su extremo carboxilo) inducidos en estas isoformas por el TPA.
6. La selectividad de la modulación negativa producida por el TPA o la epinefrina, que presentan las isoformas de PKC en dos picos de elución de diferente fuerza iónica, posiblemente sea el resultado de los diferentes complejos de señalización que se forman de acuerdo a la vía de activación de cada isoforma usada por la célula.
7. La existencia de subpoblaciones de cada isoforma de PKC estudiada puede también deberse a la presencia de modificaciones post-traduccionales en las PKCs en diferentes compartimentos subcelulares.

9. LITERATURA CITADA.

- Acs, P., Bögi, K., Lorenzo, P. S., Márquez, A. M., Biro, T., Szallasi, Z., Blumberg, P.M.** (1997). The catalytic domain of protein kinase C chimeras modulates the affinity and targeting of phorbol ester-induced translocation. *J. Biol. Chem.*, 272:35: 22148–22153.
- Akita Y., Onho J., Yajimna Y., Susuki K.** (1990). Possible role of Ca²⁺ independent protein kinase C isozymes, nPKC epsilon, in thyrotropin-releasing hormone-stimulated signal transduction: differential down-regulation of nPKC epsilon in GH4C1 cells. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 11062-11066.
- Alcántara H. R., Leyva I.D., García-Sáinz J.A.** (2001). Protein kinase C-alpha (1b)-adrenoceptor coimmunoprecipitation: effect of hormones and phorbol myristate acetate. *Eur J Pharmacol.* 419:1:9-13.
- Ali S, Chen X, Lu M, Xu JZ, Lerea KM, Herbert SC, Wang W-H.** (1998). The A kinase anchoring protein is required for mediating effects of PKA on ROMK1 channels. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 95: 10274-10278.
- Almholt, K., Arkhammar, P.O., Thastrup, O., and Tullin, S.** (1999). Simultaneous visualization of the translocation of protein kinase C α -green fluorescent protein hybrids and intracellular calcium concentrations. *Biochem. J.* 337: 211–218.
- Ananthanarayanan. B., Stahelin. R. V., Digman. M. A., Cho. W.** (2003). Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are determined by the ligand affinity and conformational flexibility of their C1 domains. *J. Biol. Chem.*, 278: 46886–46894.
- Ase K., Berry N., Kikkawa U., Kishimoto A., Nishizuka Y.** (1988). Differential down-regulation of protein kinase C subspecies in KM3 cells. *FEBS Lett.* 236: 396-400.
- Avazeri, N., Courtot, A-M., Lefevre, B.** (2004). Regulation of spontaneous meiosis resumption in mouse oocytes by various conventional PKC isozymes depends on cellular compartmentalization. *J. Cell Sci.*, 117: 4969-4978.
- Balafanova, Z., Bolli, R., Zhang, J., Zheng, Y., Pass, J.M., Bhatnagar, A., Tang, X-L., Wang, O., Cardwell, E. and Ping, P.** (2002). Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase C ϵ (PKC ϵ), facilitating PKC ϵ translocation via enhanced PKC ϵ -RACK2 interactions. *J. Biol. Chem.* 277:17: 15021-15027
- Becker, K. P., Hannun, Y. A.** (2005). Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62:1448-1461.
- Berra, E., Municio, M., Sanz, L., Frutos, S., Díaz-Meco, M., and Moscat, J.** (1997). Positioning atypical protein Kinase isoforms in the UV-induced apoptotic signaling cascade. *Molecular Cell Biology.*, 17: 4346-4354.
- Berry M.N., Friend D.A.** (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J. Cell. Biol.* 43: 506-520.
- Biro. T., Acs, G., Acs, P., Modarres, S., Blumberg, P.M.** (1997). Recent advances in understanding of vanilloid receptors: a therapeutic target for treatment of pain and inflammation in skin. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2 :1 :56-60.

Bittova, L., Stahelin, R. V., Cho, W. J. (2000). Roles of ionic residues of the C1 domain in protein kinase C- α activation and the origin of phosphatidylserine specificity. *J Biol Chem.*, 276: 6: 4218-4226.

Bornacin F. and Parker P.J. (1996). Phosphorylation of threonine 638 critically controls the dephosphorylation and inactivation of protein kinase C α . *Curr. Biol. Chem.* 271: 32785-8.

Boyer J. L., Waldo G. L., Evans T., Northup J.K., Downes C.P., Harden T.K. (1989). Modification of Alf-4 and receptor-stimulated phospholipase C activity by G-protein beta gamma subunits. *J. Biol. Chem.* 264: 13917-22.

Brodie, C., Blumberg, M. (2003). Regulation of cell apoptosis by protein kinase C δ . *Apoptosis.*, 8:19-27.

Carrasco, S., Merida, I., (2004). Diacylglycerol-dependent binding recruits PKC θ and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes. *Mol. Biol. Cell.*, 15 2932–2942.

Cerda S.R, Mustafi R, Little H, Cohen G, Khare S, Moore C, Majumder P and Bissonnette M. (2006). Protein kinase C δ inhibits Caco-2 cell proliferation by selective changes in cell cycle and cell death regulators. *Oncogen.*, 1-16.

Cho, W., Stahelin, R.V. (2005). Membrane–protein interactions in cell signalling and membrane trafficking. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 34: 119–151.

Clerk A, Bogoyevitch MA, Andersson MB, Sugden PH. (1994). Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. *J. Biol Chem.*, 269: 32848–32857.

Conn P.M and Means A. R. (2000). Principles of Molecular Regulation. Human Press Inc. Totowa, NJ, U.S.A. p.p: 205-218.

Corbalán-García, Senena., Gómez-Fernández, J. C. (2006) Protein kinase C regulatory domains: The art of decoding many different signals in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1761:633–654.

Cochet C., Souvignet C., Keramidas M., Chambaz E.M. (1986). Altered catalytic properties of Protein kinase C in phorbol ester treated cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134 : 1031-1037.

Csukai, M., Chen, CH., De Matteis, M. A., Mochly-Rosen, D. (1997). The coatomer protein b0-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase C ϵ . *J Biol Chem.*, 272:29200-29206.

D'Acosta, A. M., Robinson, J. K., Maududi, T., Chaturvedi, V., Nickoloff, B. J., Denning, M. F. (2006).The proapoptotic tumor suppressor protein kinase C- δ is lost in human squamous cell carcinomas. *Oncogene.*, 25:378-386.

Dajani, F. Olav., Sandnes, Dagny., Melien, Øyvind., Rezvani, Firous., Nilssen, S. Laila., Thoresen, G. Hege., and Christoffersen, Thoralf. (1999). Role of Diacylglycerol (DAG) in Hormonal Induction of S Phase in Hepatocytes: The DAG-Dependent Protein Kinase C Pathway Is Not Activated by Epidermal Growth Factor (EGF), but Is Involved in Mediating the Enhancement of Responsiveness to EGF by Vasopressin, Angiotensin II, and Norepinephrine. *Journal of Cellular Physiology.*, 180:203–214

- Dell'Aquila, M. L., Faux, M. C., Thorburn, J., Scott, J. D.** (1998). Membrane-targeting sequences on AKAP79 bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *EMBO J.*, 2246-2260.
- Dekker, L. V., McIntyre, P., Parker, P. J.** (1993). Mutagenesis of the regulatory domain of rat protein kinase C- ϵ . A molecular basis for restricted histone kinase activity. *J Biol Chem.* 268(26):19498-19504.
- Dessev G., Iovcheva C., Tasheva B., Goldman R.** (1988). Protein kinase activity associated with the nuclear lamina. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2994-2998.
- Dempsey, E. C., Newton, A.C., Mochly-Rosen., Fields, A. P., Reylan, M.E., Insel, P. A., Messing, R. O.**(2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol :Lung Cell. Mol.*, 279:429-438.
- Edwards, A. S., Newton, A. C.** (1997). Regulation of protein kinase C beta II by its C2 domain, *Biochemistry.*, 36: 15615-15623.
- García Sáinz, J. A.** (2002). Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular. Fondo de cultura Económica. Impreso en México. p.p: 94-96.
- Gomez-Fernandez, J., Torrecillas. A., Corbalan-Garcia, S.** (2004). Diacylglycerols as activators of protein kinase C. *Molecular Membrane Biology.*, 21: 339–349.
- González Aguilar H.** (2001). Base Molecular de la modulación negativa “ Down-regulation” que presenta la proteína cinasa como resultado de su activación en hepatocitos de rata. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química U.N.A.M.
- Gokmen-Polar, Y., Fields, A. P.** (1998). Mapping of a molecular determinant for protein kinase C betaII isozyme function. *J Biol Chem.*, 273:32:20261-20266.
- Graff, R. J., McNulty, M. A., Hanna, R. K., Konicek, W. B., Lynch, L. R., Bailey, N., Spring., Banks, C., Capen, A., Goode, Robin., Lewis, E. J., Sams, L., Huss, L. K., Campbell, M. R., Iversen, W. P., Neubauer. L. B., Brown, J. T., Musib, L., Geeganage, S., Thornton, D.** (2005)The protein kinase C β -Selective Inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), Suppresses Signaling through the AKT Pathway, Induces Apoptosis, and Suppresses Glioblastoma Xenografts.*Cancer Research.*, 65: 16:7462-7469.
- Gschwendt, M.** (1999). Protein kinase C delta . *Eur. J. Biochem.*, 259:3: 555-564.
- Gschwend, J.E., Fair, W.R., and Powell, C.T.** (2000). Bryostatín 1 induces prolonged activation of extracellular regulated protein kinases in, and apoptosis of LNCaP human prostate cancer cells overexpressing protein kinase calpha. *Mol. Pharmacol.*, 57: 1224–1234.
- Haller, H., Lindschau, C., Maasch, C., Olthoff, H., Kurscheid, D., and Luft, F.C.** (1998). Integrin-induced protein kinase C alpha and C epsilon translocation to focal adhesions mediates vascular smooth muscle cell spreading. *Circ. Res.*, 82: 157–165.
- Hansra, G., Garcia-Paramio, P., Prevostel, C., Whelan, R. D., Bornancin, F., Parker, P. J.,** (1999). Multisite dephosphorylation and desensitization of conventional protein kinase C isotypes. *Biochem J.*, 342:337–344.
- Hommel, U., Zurini, M., Luyten, M.** (1994). Solution structure of a cysteine rich domain of rat protein kinase C. *Struct Biol.*, 1: 6: 383-387.
- Jaken, S., Parker, .P. J.** (2000). Protein kinase C binding partners.*BioEssays.*, 22:245-251.

Jiang, X.H., Tu, S. S. P., Cui, J. T., Lin, M. C. M., Xia, H. H. X., Wong, W. M., Chan, A. O., Yuen, M. F., Jiang, S. H., Lam, S. K., Kung, H. F., Soh, J. W., Weinstein, I. B., and Wong, B. CH. Y.(2004). Antisense Targeting Protein kinase C α and β I Inhibits Gastric Carcinogenesis. *Cancer Research.*, 64:5787-5794.

Johnson, J. A., Gray, M. O., Chen, CH., Mochly-Rosen, D. (1996). A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function. *J Biol Chem.*, 271:24962-24966.

Johnson, J. E., Edwards, A. S., Newton, A. C. (1997). A putative phosphatidylserine binding motif is not involved in the lipid regulation of protein kinase C. *J Biol Chem.*, 272: 49: 30787-30792.

Johnson, J. E., Zimmerman, M. L., Daleke, D. L., Newton, A. C. (1998). Lipid structure and not membrane structure is the major determinant in the regulation of protein kinase C by phosphatidylserine. *Biochemistry.*, 37: 35: 12020-12025.

Junoy, Brice., Maccario, Helene., Mas, Jean-Louis., Enjalbert, Alain., and Drouva, S. V. (2002).Proteasome Implication in Phorbol Ester- and GnRHInduced Selective Down-Regulation of PKC (α , ϵ , ζ) in α T₃-1 and L β T₂ Gonadotrope Cell Lines. *Endocrinology.*, 143:4:1386–1403.

Kashiwagi, K., Shirai, Y., Kuriyama, M., Sakai, N., Saito, N. (2002). Importance of C1B domain for lipid messenger-induced targeting of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 277: 18037–18045.

Kenessey, A., Sullivan, A. E., Ojamaa, K. (2006). Nuclear localization of protein kinase C α induces thyroid hormone receptor - α 1 expression in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 290:381-389.

Kiley S., Schaap D., Parker P.J., Hseh L.L., Jaken S. (1990). Protein Kinase C heterogeneity in GH4C1 rat pituitary cells. Characterization of a Ca²⁺ independent phorbol ester receptor. *J. Biol. Che.*, 265: 15704-15712.

Kiley, C. S., Clark, J. K., Duddy, K. S., Weich, R. D., Jaken, S. (1999). Increased protein kinase C δ in mammary tumor cells: relationship to transformation and metastatic progression.*Oncogene.*,18: 6748-6757.

Kikkawa, U., Matsuzaki, H., Yamamoto, T. (2002). Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions. *J Biochem.*, 132: 6: 831-839

Konishi, H., Tanaka, M., Takemura, Y., Matsuzaki H., Ono, Y., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1997). Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 11233-11237

Kraft, A.S., Anderson, W.B., Cooper, H. L., Sando J.J. (1982). Decrease in cytosolic calcium/phospholipid-dependent protein kinase activity following phorbol ester treatment of EL4 thymoma cells. *J Biol Chem.* 257: 22: 13193-13196.

Kuo-Ping, Huang. (1989). The mechanism of protein kinase C activation 12(11):425-432. *Trends in Neurosciences.*, 12: 11: 425-432.

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

- Lee, H. W., Smith, L., Pettit, G. R., Bingham, Smith, J. B. (1996). Dephosphorylation of activated protein kinase C contributes to downregulation by bryostatin. *Am J Physiol.*, 271:C304–C311
- Lee, H. W., Smith, L., Pettit, G. R., Smith, J. B. (1997). Bryostatin 1 and phorbol ester down-modulate protein kinase C α and ϵ via the ubiquitin/proteasome pathway in human fibroblasts. *Mol Pharmacology.*, 51:439–447
- Lehel, C., Olah, Z., Jakab, G., Szallasi, Z., Petrovics, G., Harta, G., Blumberg, P. M., Anderson, W. B. (1995) Protein kinase C epsilon subcellular localization domains and proteolytic degradation sites. A model for protein kinase C conformational changes. *J. Biol. Chem.*, 270: 19651–19658.
- Leontieva, Olga. V., Black, J. D. (2004). Identification of two distinct pathways of Protein Kinase C α down-regulation in intestinal epithelial cells. *J.Biol.Chem.*,279: 7: 5788- 5801.
- Liu, W. S., Heckman, C. A., (1998). The Sevenfold Way of PKC Regulation. *Cell. Signal.*, 10:8:529-542.
- Maissel, A., Marom, M., Shutman, M., Shahaf, G., Liveh, E. (2005). PKC η is localized in the Golgi, ER and nuclear envelope and translocates to the nuclear envelope upon PMA activation and serum-starvation: C1b domain and the pseudosubstrate containing fragment target PKC η to the Golgi and the nuclear envelope. *Cellular Signalling.*, 18: 1127-1139.
- Maisur, K., Lang, K., Niggemann, B., Znaker K. S., Entschladen. (2001)High PKC α and Low E-Cadherin Expression Contribute to High Migratory Activity of Colon Carcinoma Cells. *Molecular Biology of the Cell.*, 12:1973-1982.
- Martelli, A. M., Evangelisti, C., Nyakern, M., Manzoli, F. A. (2006). Nuclear protein kinase C. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1761:542-551.
- Martelli, A. M., Sang N., Borgatti, P., Capitani, S., Neri, L. M. (1999). Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C., *J. Cell. Biochem.* 74: 499-521.
- Medkova, M., Cho, W. (1999). Interplay of C1 and C2 domains of protein kinase C-alpha in its membrane binding and activation. *J. Biol. Chem.*, 274:19852–19861.
- Mellor, H., Parker, P. J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.*, 332: 281–292.
- Michie, A. M., Nakagawa, R. (2005). The link between PKC α regulation and cellular transformation. *Inmunology Letters.*, 96:155-162.
- Mochly-Rosen, D., Gordon, A. S. (1998). Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity *FASEB J.*, 12: 35-42.
- Mochly-Rosen. D., Kauva L. M. (1998). Modulating protein kinase C signal transduction. *Adv. Pharmacol.* 44: 91-145.
- Murray, N. R., Fields, A. P. (1997). Atypical proteins kinase C ζ protects human leukemia cells against drug-induced apoptosis. *Journal of Biology Chemistry.*, 272: 27521-27524.
- Nalefski, E. A., Falke, J. J. (1996).The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci.*, 5: 12: 2375-2390.
- Nelson, L. David and Cox M. Michael. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. USA. p.p: 449-457.

- Newton Alexandra C, Johnson Joanne E.** (1998). Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein functions by two membrane-targeting modules. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1376:155-172
- Newton, A. C.** (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.*, 101: 2553-23564.
- Newton, A. C.** (2003). Regulation of the ABC kinases by Phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.*, 370: 361-371.
- Nishizuka, Y.** (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.*, 258: 607–614.
- Nishizuka, Y.** (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular response. *FASEB.*, 9: 484–496.
- Nishizuka, Y.** (2003). Discovery and Prospect of Protein kinase C Research: Epilogue. *J.Biochem.*,133: 155-158.
- Oancea, E., Teruel, M. N., Quest, A. F., Meyer, T.** (1998). Green Fluorescent Protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J. Cell Biol.*, 140: 485–498.
- Ohmori S. Shirai Y., Sakai N., Fujii M., Konishi H., Kikkawa U., Saito N.** (1998). Three distinct mechanisms for translocation and activation of the delta subspecies of protein kinase C. *Mol. Cel. Bio.* 18: 5263-5271.
- Ohno, S., Nishizuka, Y.**(2002). Protein Kinase C Isotypes and Their Specific Functions: Prologue. *J. Biochem.*, 132: 509-511.
- Orr, J.W., Keranen, L. M., Newton, A. C.** (1992). Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 267: 15263–15266.
- Orr, J.W., and Newton, A.C.** (1994). Requirement for negative charge on “activation loop” of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 269: 27715–27718
- Oster, H., Leitges, Michael.** (2006). Protein kinase C α but not PKC ζ Suppresses Intestinal Tumor Formation in *Apc^{Min/+}* Mice. *Cancer Research.*, 66:14:6955-6963.
- Pappa, H., Murray-Rust, J., Dekker, L. V., Parker, P. J., McDonald, N. Q.** (1998). Crystal structure of the C2 domain from protein kinase C- δ . *Structure.*, 6: 885–894.
- Prekeris, R., Hernandez, R. M., Mayhew, M. W., White, M. K., Terrian, D. M.** (1998) Molecular analysis of the interactions between protein kinase C- ϵ and filamentous actin. *J Biol Chem.*, 273: 26790-26798.
- Prekeris, R., Mayhew, M. W., Cooper, J. B., Terrian, D. M.** (1996). Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J Cell Biol*; 132:77-90.
- Prevostel C., Alice V., Joubert D. and Parker P. J.** (2000). Protein kinase C α actively downregulates through caveolae-dependent traffic to an endosomal compartment. *Journal of Cell Science*; 113: 2575-2584.

- Pu, Y., Perry, A.N., Yang, D., Lewin, Y. N., Kede, N., Braun, C. D., Choi, H. S., Blumberg, M. P., Garfield, H. S., Stone, C. J., Duan, D., and Marquez, E. V. (2005).** A Novel Diacylglycerol-lactone Shows Marked Selectivity *in Vitro* among C1 Domains of Protein Kinase C (PKC) Isoforms α and δ as Well as Selectivity for RasGRP Compared with PKC α . *The Journal of Biological Chemistry.*, 280:29: 27329-27338.
- Puceat, M., Hilal-Dandan, R., Strulovici, B., Brunton, L. L., Brown, J. H. (1994).** Differential regulation of protein kinase C isoforms in isolated neonatal and adult rat cardiomyocytes. *J Biol Chem.*, 269:16938–16944
- Regala, R. P., Weems, C., Jamieson, L., Khor, A., Edell, E. S., Lohse, C. M., and Fields, P. (2005).** Atypical Protein Kinase C ϵ is an Oncogene in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.*, 65: 8905-8911.
- Rendon, H. E., Mendoza, H. G, and Robles, F. M. (1999).**Characterization of calreticulin as a protein interacting with protein kinase C. *Biochem J.* 344: 469-475.
- Rizo, J., Sudhof, T. C. (1998).** C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain, *J. Biol. Chem.*, 273: 15879–15882.
- Robles Flores M., Meléndez L., García W., Mendoza H. G., Lam. T. T., Castañeda P. C., González A.H. (2008).** Posttranslational modifications on protein kinase C isozymes. Effects of epinephrine and phorbol esters. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1783: 695-712.
- Robles Flores M., Alcantara Hernandez. R., García. Sáinz. A. J. (1991).** Differences in phorbol ester induced decrease of the activity of protein kinase C isozymes in rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 134: 1031-1037.
- Robles Flores M., Garcia-Sainz J. A. (1992).** Activated protein kinase C binds to intracellular receptors in rat hepatocytes. *Biochem. J.*, 296: 467-472.
- Rybin, Vitalyi. O., Guo, Jianfen., Sabri, Abdelkarim., Elouardighi, Hasnae., Schaefer, Eric., Steinberg, Susan. F. (2004).** Stimulus-specific Differences in Protein Kinase C δ Localization and Activation Mechanisms in Cardiomyocytes. *The Journal of Biological Chemistry.*, 279:18:19350-193612.
- Rybin, Vitalyi. O., Sabri, Abdelkarim., Short, Jacob., Braz, Julian. C., Molkentin, Jeffery. D., Steinberg, Susan. F. (2003).** Cross-regulation of Novel Protein Kinase C (PKC) Isoform Function in Cardiomyocytes. Role of PKC ϵ in activation loop phosphorylations and PKC δ in hydrophobic motif phosphorylations. *The Journal of Biological Chemistry.*, 278:16:14555–14564.
- Salamanca, A. D., Khalil, A. R. (2005).** Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hipertensión. *Biochemistry Pharmacology.*, 70: 1537-1547.
- Schultz, A., Jonsson J.-I., Larsson, C. (2003)** The regulatory domain of protein kinase c θ localises to the Golgi complex and induces apoptosis in neuroblastoma and Jurkat cells. *Cell Death Differ.*, 10:662–675.
- Shah, S. A., Looby, E., Volkov, Y., Long, A., Kelleher, D. (2005).** Ursodeoxycholic acid inhibits translocation of protein kinase C in human colonic cancer cell lines. *European Journal of Cancer.*, 41:2160-2169.
- Shirai, Y. and Saito, N. (2002).** Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting. *J. Biochem.*, 132:663-668.

- Stahelin, R. V., Digman, M. A., Medkova, M., Ananthanarayanan, B., Rafter, J. D., Melowic, H. R., Cho, W.** (2004). Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase C δ . *J. Biol. Chem.*, 279: 29501–29512.
- Steinberg, Susan. F.** (2004). Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase C δ . *J. Biochem.*, 384: 449–459
- Sutton, R. B., Davletov, B. A., Berghuis, A. M., Sudhof, T. C., S.R. Sprang,** (1995). Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/ phospholipid-binding fold. *Cell.*, 80:929–938.
- Sutton, R. B., Sprang, S. R.** (1998). Structure of the protein kinase C β phospholipid-binding C2 domain complexed with Ca²⁺. *Structure.*, 6: 1395–1405.
- Taguchi, Katsunari., Yang, Ming., Goepel, Mark., Michel, Martin. C.** (1998). Comparison of human α 1-adrenoceptor subtype coupling to protein kinase C activation and related signalling pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 357: 100–110.
- Trushin, S. A., Pennington, K. N., Carmona, E. M., Asin, S., Savoy, D. N., Billadeau, D. D., Paya, C. V.** (2003) Protein kinase C α (PKC α) acts upstream of PKC α to activate I κ B kinase and NF- κ B in T lymphocytes. *Mol Cell Biol.*, 23: 7068–7081.
- Valverde A.M., Sinnet-Smith, Van Lint J., Rozengurt E.** (1994). Molecular cloning a characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8572-8576.
- Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., Ochoa, W., Gomez-Fernandez, J., Fita, I.** (2004). Handbook of Metalloproteins. Membrane binding C2-like domains, in: A. Messerschmidt, W.Bode, M. Cygler (Eds.). New York.
- Wagner, S., Harteneck, C., Hucho, F., and Buchneer, K.** (2000). Analysis of the subcellular Distribution of Proteins Kinase C α Using PKC-GFP Fusion Proteins. *Experimental Cell Research.*, 258:204-214.
- Ways D.K., Cook P. P., Webster C., Parker P.J.** (1992). Effect of phorbol esters on protein kinase C zeta. *J Biol. Chem.* 267: 4799-4805.
- Wolf S. C, Brobeck C, Sauter G, Risler T, Brehm B. R.** (2004). Endothelin-1 regulates protein kinase C isoforms differently in smooth muscle cells and in cardiomyocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44: S1: S302-303.
- Yedovitzky, M., Mochly-Rosen, D., Johnson, JA., Gray, M. O., Ron, D., Abramovitch, E., Cerasi, E., Neshher, R.** (1997). Translocation inhibitors define specificity of protein kinase C isoenzymes in pancreatic β -cells. *J Biol Chem.* 272: 1417-1420.
- Young S., Parker P.J., Ulrich A., Stabel S.** (1987). Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochem. J.* 244: 775-779.
- Zhang, Jie., Anastasiadis, Liu. Yan., Thompson, A. E., Fields, P. A.** (2004). Protein kinase C(PKC) β II Induces Cell Invasion through a Ras/Mek, PKC γ /Rac 1-dependent Signaling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry.*, 279:21:22118-22123.
- Zhang, G., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Hurley, J. H.** (1995). Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell.*, 81:6: 917-924.