

03081



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO** 9

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL C.C.H.

"ESTUDIO DE LA INTERACCION DE LA PROTEINA CINASA C ACTIVA CON RECEPTORES INTRACELULARES EN HEPATOCITOS DE RATA."

**TESIS DE POSGRADO**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN INVESTIGACION**  
**BIOMEDICA BASICA**

**P R E S E N T A :**  
**M. en I.B.B. ERIKA PATRICIA RENDON HUERTA**

DIRIGIDA POR LA DRA. MARTHA ROBLES FLORES.

MEXICO, D. F.

ENERO DEL 2000

275795



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Martha Robles Flores.

Agradezco a los miembros del comité tutorial del doctorado: Dr. Fernando López Casillas, Dr. Enrique Ortega Soto y Dra. Martha Robles Flores por sus críticas y comentarios que enriquecieron los avances de este trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. J. Adolfo García Sáinz, Dra. Lorenza González Mariscal, Dr. Rolando Hernández Muñoz, Dr. José Pedraza Chaverri, Dra. Martha Robles Flores, Dr. Ricardo Rosales Ledezma y Dr. Alejandro Zentella Dehesa por sus valiosos comentarios en la revisión de esta tesis.

A Martha Robles con respeto y admiración, por su paciencia, apoyo y esfuerzo en mi formación académica.

A Guillermo Mendoza por su ayuda incondicional en los aspectos técnicos.

A Hector González por su colaboración en nuestro laboratorio.

A mis amigos y compañeros que forjaron en mi una motivación más para la culminación de esta etapa académica.

A Ricardo con todo mi amor, por su incansable apoyo.

A mi hija Andrea y a mi bebé.

## INDICE

I.	RESUMEN	
II.	SUMMARY	
III.	INTRODUCCION:.....	1
IV.	JUSTIFICACION DEL ESTUDIO.....	14
V.	HIPOTESIS .....	15
VI.	OBJETIVOS.....	15
VII.	MATERIALES Y METODOS.....	16
VIII.	RESULTADOS .....	18
IX.	DISCUSION .....	24
X.	CONCLUSIONES.....	34
XI.	BIBLIOGRAFIA.....	36

## I. RESUMEN

Las proteínas cinasas catalizan el proceso de fosforilación de proteínas blanco y constituyen un mecanismo de regulación esencial en las células, que junto con las fosfatasas, son parte fundamental de la maquinaria del aparato de transducción de señales actuando principalmente como elementos amplificadores del mensaje hormonal.

La proteína cinasa C (PKC) es parte integral del sistema de transducción de señales hormonales acoplado a receptores que inician la degradación de componentes lipídicos en las membranas. Esta enzima forma parte de una familia de serina-treonina cinasas que son activadas por fosfolípidos ácidos, específicamente la fosfatidilserina, pero que tienen diferentes requerimientos por calcio, diacilglicerol y derivados de fosfolípidos para su activación. Por lo anterior, los patrones de activación de las diferentes isoformas de PKC pueden variar de acuerdo a la duración y localización intracelular de esos cofactores (1).

Estas cinasas fueron las primeras proteínas de señalización en las cuales se observó el fenómeno de la translocación a nuevos sitios subcelulares (como la membrana plasmática, elementos del citoesqueleto y núcleo) como resultado de su activación (2, 3).

Por otro lado, el estudio de las funciones de la PKC se complica por la presencia de sus múltiples isoformas en un mismo tipo celular. En los últimos tiempos, se ha demostrado que la presencia de módulos o motivos en las proteínas es lo que regula la interacción específica proteína-proteína, concentrando a las enzimas en lugares específicos de la célula y favoreciendo la fosforilación de sustratos proteicos presentes en esos sitios. Por tanto, la localización precisa de cada isoforma de PKC parece ser crítica para su función. Además, la intercomunicación entre diferentes rutas de transducción de señales que comparten cinasas y/o fosfatasas, hace que su localización sea particularmente crítica para la célula evitando así una intercomunicación innecesaria. Parece ser que las células han resuelto este problema utilizando proteínas adaptadoras ("scaffolding proteins") que forman complejos multienzimáticos con cinasas y fosfatasas y que usan más de una ruta de señalización.

Se ha propuesto que las formas activadas de la PKC se localizan en sitios subcelulares específicos por la unión a proteínas de anclaje llamadas RACKs (por

Receptor for Activated C Kinase). A la fecha se han identificado tres RACKs en cerebro y corazón de rata, y al menos 7 de ellas en hepatocitos de rata (4). Hasta ahora, han sido clonadas solamente dos RACKs mostrando que pertenecen a la superfamilia de proteínas que tienen repetido el motivo WD-40, entre las cuales se incluye a la subunidad beta de las proteínas G.

Con base en lo anterior y dado que en hepatocitos se coexpresan 7 isoformas de PKC, es de gran importancia la identificación y caracterización de proteínas que interaccionan con las PKC en este sistema para determinar cómo se regula la actividad de las diferentes isoformas de PKC, cómo transducen las señales y cuáles son sus sustratos en los distintos sitios celulares.

Para lograr esto, el objetivo de este estudio fue el de llevar a cabo la caracterización bioquímica de la interacción de diversas proteínas con la PKC, esperando identificar, al igual que en otros sistemas celulares, a proteínas que interaccionen de manera específica con las PKCs, y que presenten algunas características comunes con las proteínas ya clonadas.

Se purificaron a homogeneidad algunas proteínas que por ensayos de unión mediante la técnica de "overlay" mostraron unión específica a proteína cinasa C. Se identificaron a dos de estas proteínas por secuenciación del extremo amino: una como calreticulina y la otra como la subunidad de 32 Kda que se asocia al factor SF2 de procesamiento de RNAm. Aunque estas dos proteínas ya habían sido clonadas, se desconoce cuál es su función precisa y hasta el momento no había habido ningún reporte que indicara que eran sustratos de la PKC o que tuvieran alguna interacción con ella.

Los estudios de unión con estas proteínas puras mostraron que ambas interaccionan *in vitro* con todas las isoformas de PKC que se expresan en hepatocitos de rata. Sin embargo, los estudios de fosforilación *in vitro* de estas proteínas utilizando complejos inmunes de cada isoforma de PKC, demostraron que solamente calreticulina es sustrato de las isoformas de PKC. Utilizando células intactas se demostró, tanto por experimentos de co-inmunoprecipitación como por experimentos de marcaje metabólico, que la calreticulina y algunas isoformas de PKC se asocian *in vivo*, demostrando que su interacción tiene relevancia fisiológica.



## II. SUMMARY

Protein kinases and phosphatases are a fundamental part of the signal transduction machinery within the cell acting as amplifier elements of the hormonal signals.

Protein kinase C (PKC) is an integral part of the signal transduction apparatus utilized by signals that initiate the degradation of lipidic components within the membrane. This enzyme belongs to a family of serine-threonine kinases which are activated by acidic phospholipids, particularly by phosphatidylserine but that have different requirements of calcium, diacylglycerol and phospholipid derivatives for their activation. Thus, the activation patterns of the different PKC isoforms can change according to the intracellular localization and permanence of their cofactors (1). These kinases were among the first signaling proteins which were observed to translocate towards new subcellular sites (such as the plasmatic membrane, the cytoskeleton and the nucleus) as a result of their activation process (2,3).

On the other hand, the study of the PKC function is complicated by the existence of many isoforms within the same cellular type. It has been showed lately that the presence of the so called motifs in the protein structure are essential to regulate the specific protein-protein interactions, that concentrate the enzymes at specific locations within the cell, thus favouring the phosphorylation of substrate proteins that are found at the same sites. Therefore, the precise localization of each PKC isoform seems to be critical for their function. Additionally, the sharing of kinases between pathways also makes it critical that the cell route the various signals properly to prevent unnecessary crosstalk. Cells seems to have solved this problem with the use of scaffolding/adapter proteins by forming multienzyme complexes that are used by more than one pathway and are therefore shared.

It has been suggested that the PKC activated forms are localized within specific subcellular sites by their interaction with proteins called RACKs (Receptor for Activated C Kinase). To date, there have been identified at least seven RACKs in the rat hepatocyte and only two from rat brain and heart have been cloned, evidencing that they belong to the superfamily of proteins in which the WD-40 motif is repeated. The latter proteins include the  $\beta$ -subunit of the G proteins.

Due to the fact that seven PKC isoforms are coexpressed in the hepatocyte, it has become very important to identify and to characterize proteins that interact with the PKCs in order to understand how is regulated the activity of the different PKC isoforms, how each of them transduce the signals and which are their substrates at the different subcellular sites.

In view of this, the aim of this study was to perform the biochemical characterization of the interaction of PKC with several proteins that may have similar properties with the RACKs reported before.

In this work, we have purified to homogeneity several proteins that showed specific binding to PKC using an overlay assay approach. Two of these proteins were identified by amino-terminal sequencing as calreticulin and as the 32 Kda subunit of pre-splicing mRNA factor SF2.

Binding studies using these purified proteins demonstrated that both interact in vitro with all PKC isoforms expressed in hepatocytes. However, phosphorylation studies in vitro with PKC isozyme-specific immune complexes showed that only calreticulin is PKC substrate. Interestingly, it was observed in intact cells by metabolic labelling and by co-immunoprecipitation studies, that calreticulin is a target of PKC phosphorylation and associates with several PKC isozymes in vivo indicating that their interaction is physiologically relevant.

### III. INTRODUCCION

La proteína cinasa C (PKC) pertenece a una familia de serina-treonina cinasas que constituye una parte integral del sistema de transducción de señales hormonales, jugando un papel muy importante en el control de un gran número de procesos celulares, los cuales incluyen secreción, función de receptores de membrana, diferenciación celular y promoción de tumores.

La proteína cinasa C fue primero identificada por Nishizuka y colaboradores como un precursor para una proteína cinasa independiente de cofactores, la proteína cinasa M (PKM), la cual es generada por proteólisis (5, 6). Poco tiempo después se demostró que la PKC intacta tenía actividad de cinasa cuando estaba asociada a membranas (7). La purificación a partir de la membrana, de los componentes que activan a la PKC revelaron que los fosfolípidos ácidos, especialmente la fosfatidilserina (PS) podían mantener la actividad de la PKC a altas concentraciones de calcio (7). Posteriormente, se identificó al diacilglicerol (DAG) como un cofactor adicional que podía incrementar la actividad máxima disminuyendo la concentración de calcio requerida a niveles fisiológicos (8). Estos hallazgos relacionaron a la PKC con la hidrólisis, estimulada por hormonas, de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) dando como resultado la producción de 1,2-diacilglicerol (DAG) y de inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>).

Hoy en día es bien conocido que la proteína cinasa C es parte integral del sistema de transducción de señales acoplado a fosfolipasa C (PLC). El proceso de transducción inicia cuando un agonista, por ejemplo la vasopresina en hepatocitos, se une a su receptor (en este caso un receptor de siete dominios transmembranales acoplado a proteína G). El complejo hormona-receptor cataliza el intercambio de GTP por GDP sobre una proteína G asociada, G<sub>p</sub>, activándola exactamente como los receptores adrenérgicos activan a la G<sub>s</sub>. La G<sub>p</sub> activada, activa a su vez a una fosfolipasa C en la membrana plasmática, la cual produce dos segundos mensajeros por hidrólisis del PIP<sub>2</sub>. Los productos de esta hidrólisis son el DAG y el IP<sub>3</sub>. El DAG activa directamente a la proteína cinasa C uniéndose a estructuras conocidas como "dedos de zinc". El segundo producto derivado de la acción de la PLC, el IP<sub>3</sub>, difunde de la membrana plasmática al retículo

endoplásmico, en donde se une a receptores específicos y causa la apertura de canales de calcio liberando el calcio secuestrado al citosol (9). El aumento en las concentraciones de calcio junto con el DAG y la interacción de la PKC con fosfolípidos ácidos hacen que la cinasa se encuentre en su estado "catalíticamente competente" y así fosforilar a sus sustratos específicos (figura 1).

Sin embargo, la PKC también está involucrada en sistemas de transducción de señales en los cuales puede llevar a cabo procesos de desensibilización o transactivación de cinasas. De acuerdo a esto, se sabe que muchos receptores acoplados a proteínas G regulan cascadas de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) dando como resultado la activación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), proteínas cinasas activadas por "stress" y MAPK que actúan como reguladores transcripcionales entre otras (10, 11). En muchos casos, la estimulación de la cascada de ERK lleva a la activación de pequeñas proteínas de unión a GTP como p21 Ras. Esta activación es mediada también por receptores acoplados a proteínas G. El mecanismo por el cual la PKC está involucrada con la activación de estas cinasas se describe brevemente en la figura 2 (12).

### **CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES:**

A la fecha se han identificado 11 isoformas de PKC en células de mamífero, las cuales constituyen una familia de cinasas cuyas estructuras están relacionadas entre sí. Las isoformas de PKC descritas ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$  y  $\zeta$ ) poseen diferencias en cuanto a su localización, especificidad de sustrato y propiedades cinéticas (13).

Las subespecies  $\beta$ I y  $\beta$ II son el resultado del procesamiento alternativo en donde cada uno de sus RNAm derivan de un solo gen.

Como se muestra en la figura 3, las isoformas que constituyen la familia de PKC, están formadas de una sola cadena polipeptídica dividida en dos dominios separados por una región hipervariable (también llamada región bisagra): el dominio regulatorio (región amino-terminal) y el dominio catalítico (región carboxilo-terminal). Cada uno de estos dominios posee regiones altamente conservadas y regiones variables.

Las isoformas de PKC han sido clasificadas en tres grupos de acuerdo a su estructura y a su regulación por cofactores: las convencionales (cPKC):  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\gamma$ , las

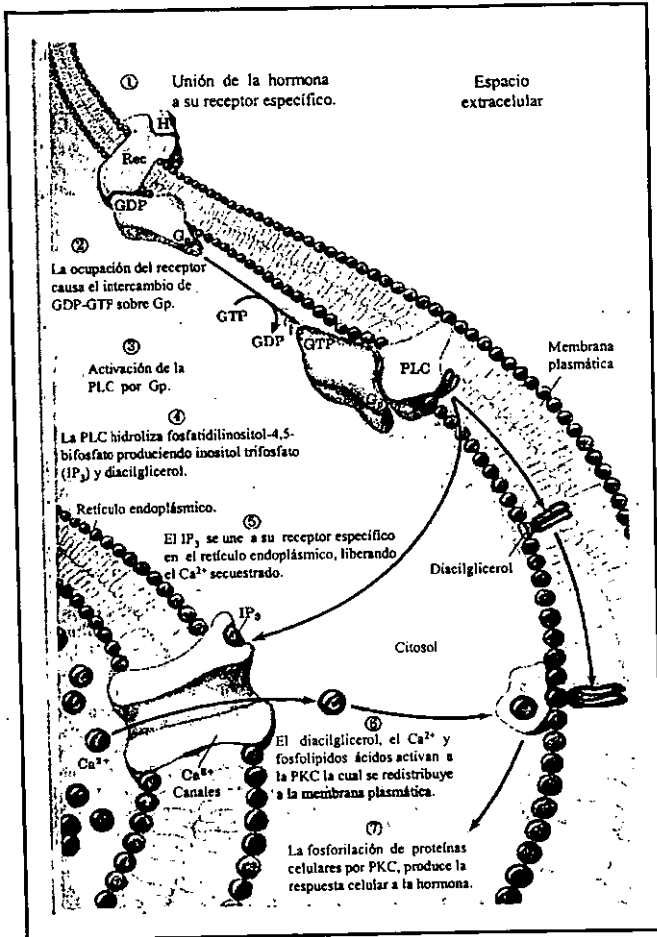
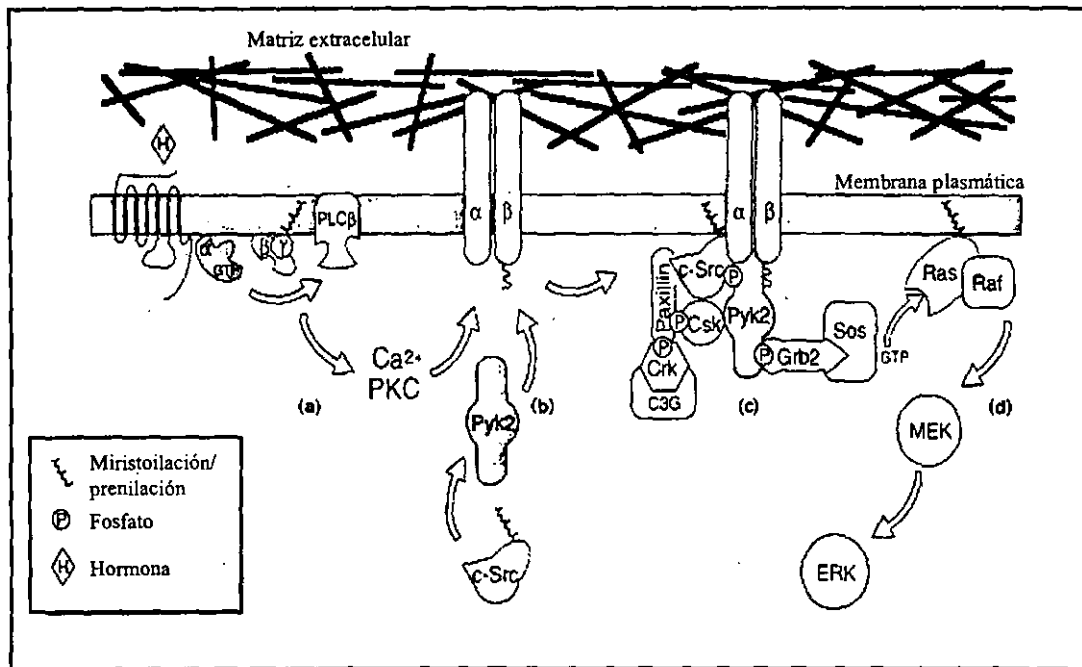
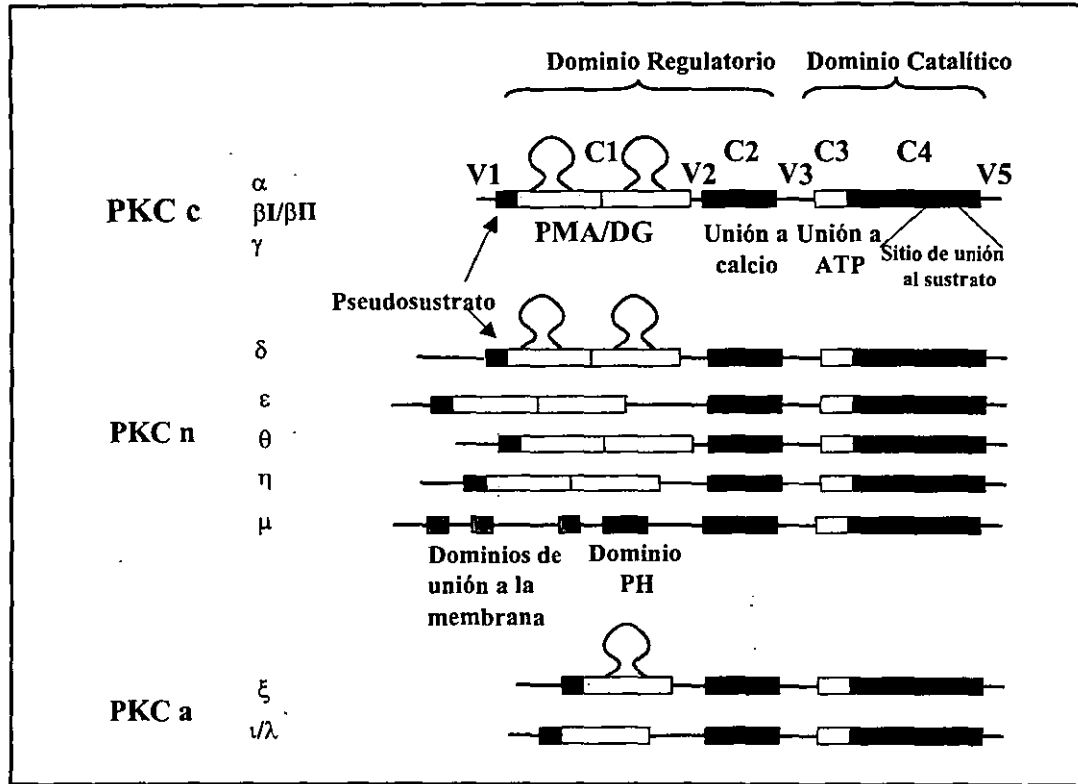


Figura 1. Sistema de transducción de señales acoplado a fosfolipasa C. La hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato por PLC produce dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). Ambos contribuyen a la activación de la PKC; la liberación del Ca<sup>2+</sup> al citosol por la interacción del IP<sub>3</sub> con su receptor en el retículo endoplásmico, también activa a otras enzimas dependientes de calcio. H representa a la hormona, Rec, receptor, PLC, fosfolipasa C.



**Figura 2.** Activación de MAP cinasas modulada por la vía de activación de PKC y el reclutamiento de la proteína Pyk2 a adhesiones focales. En este modelo el reclutamiento de familia de cinasas como Pyk2, reguladas por calcio y por PKC, es inducido por receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y a dímeros de integrinas iniciando el ensamblaje de un complejo de activación de Ras basado en la adhesión celular. La señal es dependiente tanto de la adhesión celular a la matriz extracelular como de las señales mediadas por GPCR. (a) La activación de GPCR estimula la activación de fosfolipasa C (PLC) mediada por las subunidades  $G\alpha$  o  $G\beta\gamma$ , incrementando el calcio intracelular y la actividad de la PKC. (b) Pyk2, la cual es predominantemente citosólica en ausencia de estimulación, se recluta a heterodímeros  $\alpha\beta$  de integrina en donde se activa, se autofosforila y se une a dominios SH2 de c-Src. (c) El complejo basado en integrinas recluta a proteínas adicionales, tales como paxilina y complejos de RasGEF, Grb2-Sos1 y Crk-C3G. (d) El intercambio de Ras-GTP inicia la cascada de Raf- MEK-ERK.



**Fig 3.** Secuencia esquemática de las isoformas de PKC indicando la estructura de dominios de cada subfamilia de PKC. La figura fue tomada de la ref. 11.

cuales son reguladas por DAG, fosfatidilserina (PS) y  $Ca^{+2}$ ; las nuevas (nPKC):  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\mu$  y  $\theta$  reguladas por DAG y PS y las atípicas (aPKC):  $\lambda$ , y  $\zeta$  cuya regulación no ha sido claramente establecida, aunque su actividad es estimulada por PS (Tabla 1).

**TABLA I.** Isoformas de PKC expresadas en tejidos de mamíferos.

	SUBESPECIES	RESIDUOS DE AA.	ACTIVADORES LIPÍDICOS Y $Ca^{+2}$	EXPRESION EN TEJIDOS
CPKC	$\alpha$	672	$Ca^{+2}$ , DAG, PS, FFA, lisoPC	Universal
	$\beta$ I	671	" " "	Algunos Tejidos
	$\beta$ II	671	" " "	Muchos Tejidos
	$\gamma$	697	" " "	Cerebro
NPKC	$\delta$	673	DAG, PS	Universal
	$\epsilon$	737	DAG, PS, FFA, PIP <sub>3</sub>	Cerebro y otros
	$\eta$ (L)	683	DAG, PIP <sub>3</sub> , PS, Colesterol sulfato	Piel, Pulmón, Corazón
	$\theta$	707	PS, ?	Músculo, Células T, etc.
	$\mu$	912	PS, ?	Células NRK
APKC	$\zeta$	592	PS, FFA, PIP <sub>3</sub> ?	Universal
	$\lambda$ (t)	587	PS, ?	Muchos Tejidos

DAG: Diacilglicerol; PS: fosfatidilserina; FFA: Ac. grasos cis-insaturados; LysoPC: lisofosfatidilcolina; PIP<sub>3</sub>: fosfatilinositol 3, 4, 5-trifosfato.

### Dominio regulatorio:

El dominio regulatorio de la familia de proteínas cinasas C, posee un peso molecular que varía de 20 a 70 Kda de acuerdo a cada isoforma. Este dominio está constituido de una región autoinhibitoria de la enzima o región pseudosustrato, y una o dos regiones conservadas: la región C1 presente en todas las isoformas y la región C2 presente en las isoformas de cinasas C convencionales y nuevas. Se ha comprobado que cada una de estas regiones están presentes en otras proteínas formando módulos funcionales y estructurales (15).

- La región pseudosustrato, presente en todas las isoformas, excepto en PKC  $\mu$ , consiste de una secuencia de 8 aminoácidos (Arg-Lys-Gly-Ala-Leu-Arg-Gln-Lys) muy parecida al sitio de fosforilación de los sustratos de la enzima. La sustitución de una Ser en lugar de



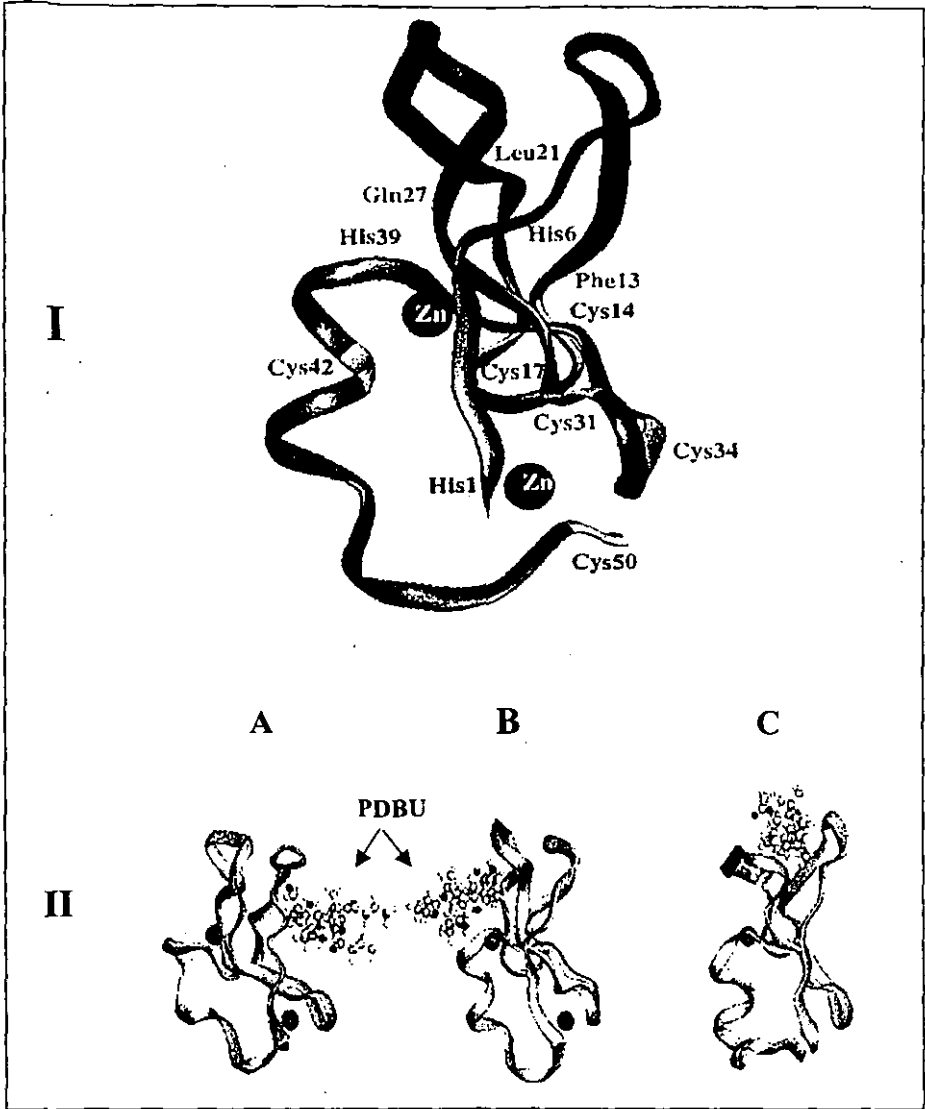
Ala, hace a esta secuencia un sustrato excelente de la cinasa por presentar residuos básicos flanqueando al sitio de fosforilación.

De acuerdo a algunos estudios, el papel de la región pseudosustrato es muy importante ya que se ha propuesto que en ausencia de cofactores activadores, la enzima se encuentra en una conformación plegada en la cual la región pseudosustrato se une a la región de unión al sustrato del dominio catalítico, evitando la fosforilación de sustratos potenciales.

La región pseudosustrato está protegida de proteólisis cuando la enzima no está catalíticamente activa, a diferencia de su estado activo en el cual es muy sensible a proteólisis por tripsina o endoproteasas.

- La región C1, es una secuencia rica en cisteínas que coordina 2 átomos de  $Zn^{+2}$ , formando las estructuras llamadas "dedos de zinc" (figura 4). Esta se pliega en una estructura globular con dos hojas  $\beta$  apartadas formando la cavidad de unión del DAG y/o ésteres de forbol (compuestos diterpénicos que pueden activar directamente a la PKC) a la cinasa, a través de la formación de puentes de hidrógeno y los grupos sulfhidrido de los residuos de cisteína. Sorprendentemente, la unión del éster de forbol al dominio C1 no induce un cambio conformacional significativo en la enzima pero altera la hidrofobicidad del dominio promoviendo interacciones hidrofóbicas con la membrana. Aunque todas las isoformas de cinasa C poseen dos de estas estructuras, excepto la isoforma  $\xi$  que posee una, se ha reportado que la estequiometría de unión de los ésteres de forbol a la cinasa C es de 1:1 (16).
- La región C2, dilucidada a partir de la sinaptotagmina (17) y de la fosfolipasa C (18, 19), está presente en las cPKC y es una región rica en hojas  $\beta$ , cuya estructura tridimensional forma una cavidad en la cual se encuentra una secuencia de aspárticos con los cuales se lleva a cabo la interacción con los iones  $Ca^{+2}$ . La unión de iones divalentes induce un cambio conformacional el cual expone residuos de lisina sobre la cara anterior del dominio C2.

En las nPKC está presente una región denominada por algunos autores "C2-like", ya que aunque presentan los residuos estructurales de la región C2, no poseen los residuos de aspartato funcionales necesarios para la unión con el  $Ca^{+2}$ .



**Figura 4. I) Estructura en solución determinada por resonancia magnética nuclear del segundo dominio rico en cisteína de la PKC $\alpha$ . Este dominio está constituido por dos cadenas  $\beta$  antiparalelas y una hélice en el extremo carboxilo terminal y II) Tres posibles modelos de unión del éster de forbol 12,13-dibutirato (PDBU). En los modelos A y B el éster de forbol puede estar localizado a ambos lados de las cadenas  $\beta$  antiparalelas y en C está localizado entre las dos cadenas. Tomada de J. Med. Chem. (1996) 39:2541-53.**

- El dominio pH ("plekstrin-homologe") identificado por primera vez en la plekstrina, un sustrato típico de PKC en plaquetas, está presente exclusivamente en la isoforma  $\mu$  de PKC.

### **Dominio Catalítico:**

El dominio catalítico de la proteína cinasa C tiene una alta similitud con el de la proteína cinasa A. Este dominio, de aproximadamente 45 Kda, está constituido por las regiones C3 y C4, presentes en todas las isoformas reportadas (20).

- La región C3, contiene una secuencia de Gly-X-Gly-X-X-Gly-X<sub>16</sub>-Lys (donde X representa cualquier aminoácido), la cual es una estructura típica para los sitios de unión a ATP. Esta secuencia es muy similar para todas las isoformas excepto para  $\xi$  en la cual el tercer residuo de glicina es reemplazado por alanina.
- La región C4 está constituida por tres grupos de secuencias que son únicas en todas las isoformas de proteínas cinasas C. Estas secuencias son: Gly-Gly-Asp-Leu-Met, Tyr-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 protéico y están involucradas en la reacción de transferencia del grupo fosfato. En la isoforma  $\mu$  existen pequeños cambios que hacen que su especificidad de sustrato sea algo distinta.

## **ACTIVACIÓN DE LA PKC**

La base molecular del proceso de activación de la PKC dista mucho de ser clara en el presente y constituye un campo de estudio muy activo. Se ha demostrado que la activación de la enzima está regulada por dos mecanismos distintos e igualmente importantes: por fosforilación, en el cual la enzima alcanza el estado denominado "catalíticamente competente", y por la unión de moduladores positivos (segundos mensajeros).

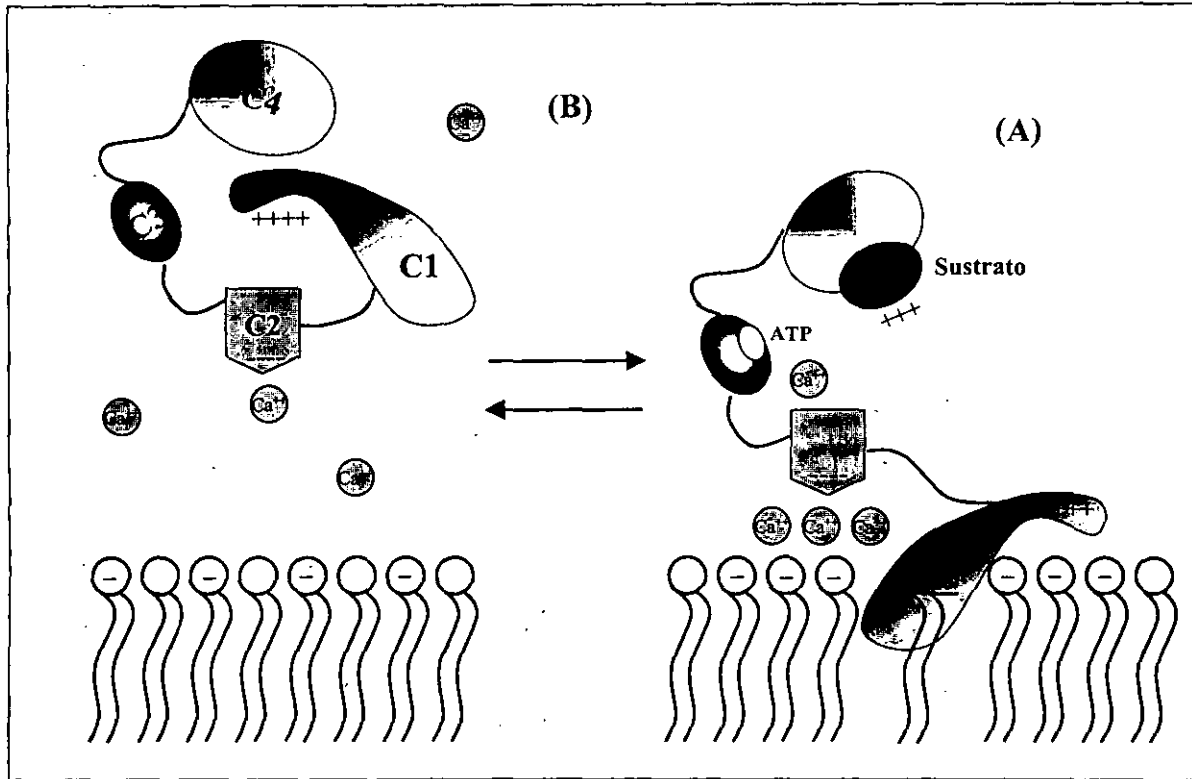
Experimentos del grupo de Fabbro et al. (21) dieron la primera evidencia de que la proteína cinasa C se fosforila *in vivo*. Específicamente, ellos demostraron que la PKC se sintetiza como un precursor desfosforilado e inactivo con una Mr de 74 Kda, posteriormente se localiza como una forma transitoria fosforilada de 77 Kda y finalmente como una forma madura de 80 Kda.

De acuerdo a las evidencias experimentales, se ha propuesto que una vez que ha sido sintetizada, la PKC se convierte a su estado catalíticamente competente por una transfosforilación en el asa de activación localizada en su sitio activo. Recientes estudios han mostrado que esta transfosforilación es realizada por la cinasa-1 dependiente de fosfoinosítidos (PKC-1) (22, 23). La carga negativa adquirida por esta fosforilación, alinea correctamente a los residuos involucrados en la catálisis y localiza a la enzima en el citosol.

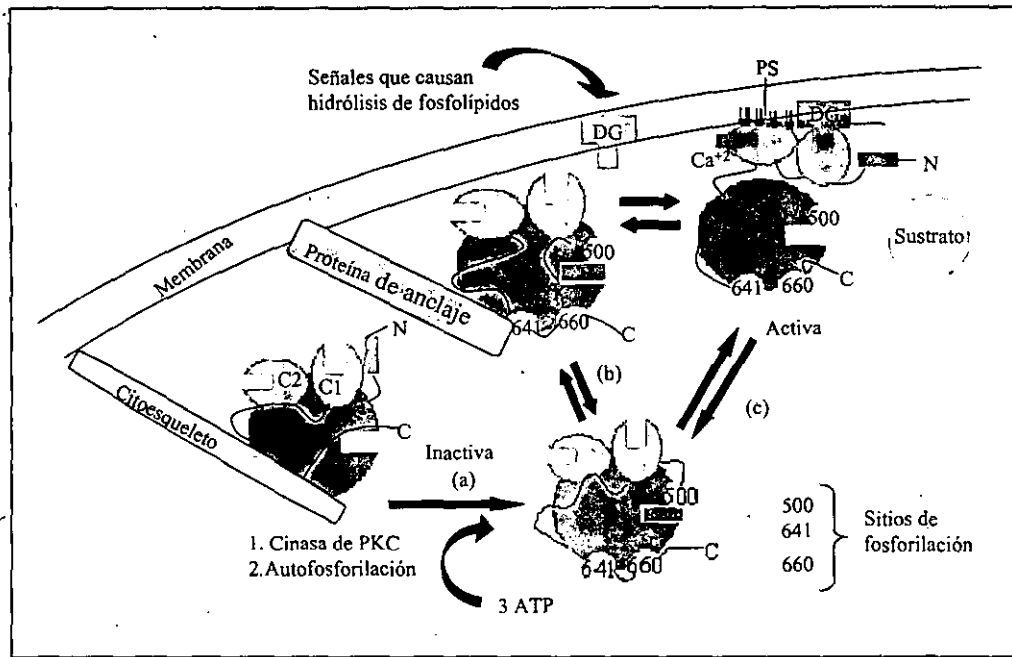
La primera consecuencia de la transfosforilación es una autofosforilación en el extremo carboxilo de la cinasa que estabiliza la conformación catalíticamente competente y probablemente regula la localización subcelular de la enzima. De acuerdo a lo anterior, el asa de activación es entonces el primer sitio fosforilado en la proteína cinasa C (24). Sin embargo, se ha demostrado que cuando la región pseudosustrato está ocupando el sitio activo, éste queda enmascarado, sugiriendo que el pseudosustrato debe estar fuera del sitio activo para que ocurra la fosforilación (figura 5).

Las posiciones en las cuales se lleva a cabo la fosforilación de la cinasa han sido reportadas para la PKC  $\beta$ II: la Thr 500 en el asa de activación y Thr 641 y Ser 660 en el extremo carboxilo. Se ha demostrado por estudios de mutagénesis dirigida que la carga negativa en la posición 500 de la cinasa C  $\beta$ II es indispensable para mantener su estado catalíticamente competente (25) (figura 6). Una vez fosforilada el asa de activación, la proteína cinasa C es autofosforilada en Thr 641. La desfosforilación en esta posición de la PKC  $\beta$ II (21) o una mutación de Thr a alanina en la PKC  $\beta$ I resulta en una enzima inactivable (26). Curiosamente, una mutación en el residuo correspondiente para la PKC  $\alpha$  resulta en una enzima activable, aunque muestra una baja estabilidad (27).

La tercera fosforilación *in vivo* se lleva a cabo en la Ser 660. Esta fosforilación final correlaciona con la liberación de la proteína cinasa C al citosol, sugiriendo que su papel es dirigir la localización subcelular de la cinasa C. Las dos reacciones de autofosforilación en el carboxilo terminal son desencadenadas por la fosforilación en el asa de activación. Por lo tanto, es la fosforilación por una cinasa de cinasa C la que inicia



**Fig 5. Modelo de la conformación activa (A) e inactiva (B) de la PKC.** En la conformación inactiva, la región pseudosustrato de la cinasa C se encuentra interaccionando con la región de unión al sustrato (región C4). Después de ser fosforilada la PKC en el asa de activación y en el extremo carboxilo, la aparición de los cofactores específicos promueve la liberación de la región pseudosustrato permitiendo la interacción de la región C1 con la membrana y la fosforilación de los sustratos correspondientes.



**Figura 6. Modelo para la regulación de la proteína cinasa C (PKC) por fosforilación, proteínas blanco y cofactores (tomado de ref.26).** La PKC se asocia con el citoesqueleto en una conformación tal que expone el asa de activación manteniendo al carboxilo terminal (C) cercano al sitio activo. (a) Una transfosforilación por una cinasa de cinasa C (en Thr 500 para la PKC  $\beta$ II) alinea correctamente los residuos para la catálisis, seguida de una autofosforilación en dos posiciones de extremo carboxilo terminal (Thr 641 y Ser 660 en PKC  $\beta$ II). La fosforilación en Thr 641 expone a la cinasa en su estado catalíticamente competente y la subsecuente fosforilación en Ser 660 libera a la proteína cinasa C madura en el citosol. (b) El destino específico para cada isoforma de PKC puede estar modulado por proteínas de anclaje específicas. (c) La unión del diacilglicerol al dominio C1 y fosfatidilserina al dominio C2 provoca la remoción de la región pseudosustrato del sitio activo. El dominio C2 de las proteínas cinasas C convencionales tiene también un sitio de unión para Ca<sup>2+</sup>, el cual incrementa alostéricamente la afinidad de este dominio por fosfatidilserina y DAG. La interacción de la enzima activada con otras proteínas blanco, como los RACKs (receptores para la proteína cinasa C activa) puede ubicar a la enzima en regiones cercanas a sus sustratos. N, se refiere al extremo amino terminal.

esta cascada de fosforilaciones. De acuerdo a esto, la transfosforilación por PDK-1 convierte a la PKC a su estado catalíticamente competente; sin embargo, la enzima todavía no está activa y no puede responder a la presencia de sus cofactores específicos sino hasta que ha adquirido las dos fosforilaciones del extremo carboxilo.

Aunque la fosforilación de las cinasas C se lleva a cabo en residuos altamente conservados, se han reportado ejemplos en los cuales esto no es así. Este el caso de la PKC  $\delta$ , la cual se ha demostrado que cuando se encuentra en su forma activa es fosforilada en residuos de tirosina. Este evento puede jugar un papel en la regulación de la actividad de esta isoforma diferente a las anteriormente reportadas (28). Una explicación a estos hallazgos es que, probablemente, el mecanismo preciso de regulación para una isoforma determinada de PKC no es el mismo que el descrito para otras isoformas.

En otros estudios realizados en baculovirus, se ha observado que la desfosforilación en el asa de activación provoca una pérdida irreversible en la actividad de la proteína cinasa C, mientras que la desfosforilación en el extremo carboxilo terminal resultó en una refosforilación inmediata siempre y cuando se adicione ATP.

Una vez que la PKC se encuentra en su conformación catalíticamente competente y localizada en el citosol, puede ser activada por la unión de moduladores positivos tales como el diacilglicerol (DAG), fosfolípidos ácidos de cadena larga, particularmente la fosfatidilserina, y en el caso de las isoformas convencionales de PKC, también por el calcio.

El DAG es uno de los segundos mensajeros producido por la hidrólisis del PIP<sub>2</sub> o de la fosfatidilcolina (PC) por fosfolipasa C. Es un compuesto hidrofóbico de aparición transitoria, ya que su desaparición se produce en segundos o minutos de su formación y activa a la PKC. El dominio hidrofóbico del DAG es crítico para asegurar que la molécula quede insertada en la membrana con una orientación tal que los grupos hidroxilo y carbonilo estén presentes en la interfase. Uno o más de estos grupos pueden interaccionar específicamente con la cinasa y por lo menos uno puede ligar directamente al  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta unión en múltiples puntos del DAG al complejo PKC/PS/ $\text{Ca}^{2+}$  es prerequisite para la activación completa de la PKC (20).

En presencia de diacilglicerol, la proteína cinasa C posee una especificidad importante para unirse a fosfolípidos ácidos como la fosfatidilserina, por lo menos en un orden de magnitud mayor que a membranas que contienen otro tipo de lípidos (15). Sin

embargo, aunque la fosfatidilserina es el fosfolípido preferido por la proteína cinasa C, se ha encontrado actividad con ácido fosfatídico (PA) y con fosfatidilinositol (PI). La PC y fosfatidiletanolamina (PE) no tienen ningún efecto sobre la cinasa. Por otro lado, la fosfolipasa A2 (PLA2) cataliza la hidrólisis de fosfolípidos generando lisofosfolípidos y ácidos grasos libres, generalmente ácido araquidónico. Algunos metabolitos oxigenados del ácido araquidónico, el araquidonato libre y la lipoxina A, así como la lisofosfatidilcolina son también activadores de la PKC.

Aunque los análisis bioquímicos y de mutagénesis han establecido que la región C2 de la cinasa une a lípidos ácidos, todavía no se han identificado con exactitud cuáles son las determinantes de unión para la fosfatidilserina. Algunos estudios utilizando anticuerpos anti-idiotípicos para este fosfolípido han propuesto que en la región C2 reside un motivo de unión para la fosfatidilserina (29); sin embargo una mutación en este motivo no produjo ningún efecto sobre la regulación de fosfolípidos. Otros estudios han demostrado que las  $\alpha$ PKC y  $\beta$ PKC interaccionan con vesículas de fosfolípidos cargados negativamente a través de interacciones electrostáticas (30).

La proteína cinasa C ha sido conocida como una proteína que está involucrada en la proliferación celular y se le ha considerado como un receptor de compuestos diterpénicos tales como los ésteres de forbol, que poseen una estructura hidrofóbica análoga a la del DAG y se intercalan fácilmente en la membrana activando directamente a la PKC (figura 7).

Algunos estudios han revelado que el mecanismo por medio del cual el DAG y los ésteres de forbol activan a la PKC, es incrementando linealmente la afinidad de la PKC por las membranas. La interacción de la proteína cinasa C con los ésteres de forbol ha mostrado ser tan fuerte que ésta puede mantener una interacción de la PKC con membranas neutras, es decir en ausencia de lípidos ácidos y por lo tanto en ausencia de interacciones con el dominio C2 (15).

La estequiometría de unión del éster de forbol a la PKC es de 1:1 y la interacción se lleva a cabo en la región C1 de la cinasa C. Sin embargo, muchas de las isoformas de esta cinasa poseen dos dominios C1. Aunque todavía no se entiende bien la presencia de estos dos dominios, Blumberg et al. (31) establecieron que estos dominios en la PKC intacta no son equivalentes, ya que realizando estudios de transfección usando mutantes de la PKC  $\delta$  revelaron que solo el segundo dominio C1 juega un papel determinante en la "translocación" de la PKC en respuesta a éster de forbol.



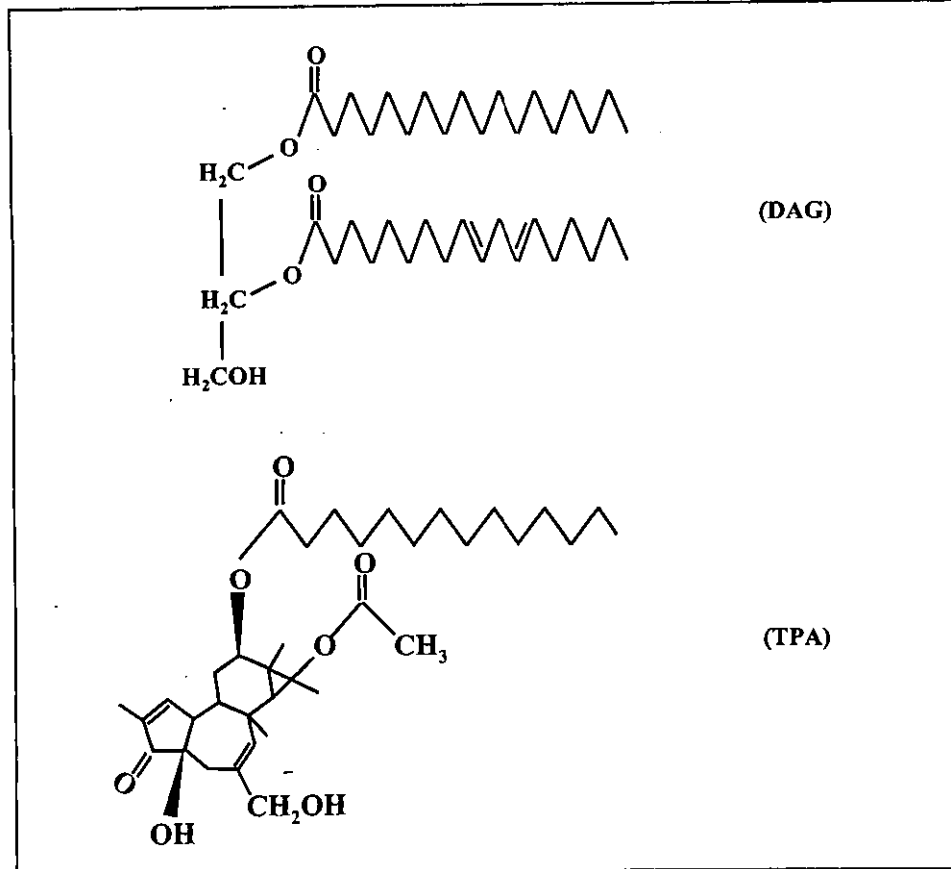


Figura 7. Estructura del 1,2-diacilglicerol (DAG) y del potente promotor de tumores tetradecanoil-forbol-acetato (TPA).

La translocación (redistribución) de la PKC entre los compartimentos soluble y asociado a membranas parece estar involucrada en la activación de la cinasa, en el acceso a sustratos específicos y en su degradación proteolítica ("down regulation")(2). La activación de la PKC por segundos mensajeros, que promueven su asociación con las membranas, no parece deberse a una simple interacción de ligando entre el DAG y la molécula de PKC. Parece ser que en este proceso, la molécula de PKC existe en más de una configuración activa reversible e irreversible. La activación reversible produce el típico modelo de activación enzimática por segundo mensajero. Sin embargo, la interacción inusual de la enzima con las membranas resulta en la formación de un complejo que no puede ser liberado fácilmente a pesar de que la PKC no contiene ninguna región de secuencias típicas de interacción con membranas tales como hélices transmembranales. Este estado de la enzima, irreversiblemente asociado a la membrana, puede ser provocado por varios factores, incluyendo la adición de ésteres de forbol, alta densidad de carga negativa, o posiblemente otras proteínas (32).

Cuando la PKC es activada, se transloca del citoplasma a la membrana plasmática, a elementos del citoesqueleto, a núcleos y a otros componentes celulares (33-35). Se sabe que una célula determinada generalmente expresa diversas isoformas de PKC. Muchas de estas isoformas se encuentran localizadas en estructuras celulares específicas en su forma inactiva. Estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos, indican que la actividad biológica de las PKCs está fuertemente regulada por su localización celular (1, 36). Utilizando también microscopía convencional o confocal de fluorescencia ha sido posible observar que cada isoforma, una vez activada, se redistribuye a una localización celular específica y muchas veces distinta a las isoformas restantes, por lo que se presume que cada una realiza funciones específicas.

La incorporación y utilización de nuevas técnicas está permitiendo descubrir mecanismos de activación y redistribución de las diversas isoformas de proteína cinasa C, que hacía algunos años todavía eran desconocidos (37, 38). Recientemente, ha sido posible observar la translocación de isoformas de PKCs mediante la utilización de proteínas de fusión, en donde la isoforma de PKC es expresada transitoriamente en células transfectadas con la secuencia correspondiente a la isoforma de PKC fusionada a la de una proteína fluorescente verde (GFP) como marcador. Con esta técnica, se ha

observado la translocación de la PKC $\gamma$ -GFP del citoplasma a la membrana plasmática en células COS-7 estimuladas bajo diferentes condiciones: cuando se estimuló a las células con TPA se produjo una translocación unidireccional, mientras que cuando se utilizó un ionóforo de calcio (A23187), se produjo una translocación reversible (39).

Los resultados obtenidos en los estudios de redistribución de la PKC, han servido también para proponer la función que puede tener una isoforma determinada en un compartimento celular específico. Algunos ejemplos son los estudios realizados con la PKC $\alpha$ , la cual se ha demostrado que se encuentra principalmente en contactos focales de fibroblastos REF52 no estimulados. Una vez que se lleva a cabo su activación, la cinasa se transloca al perinúcleo (40).

En estudios realizados en fibroblastos Rat-1, se ha demostrado que la PKC  $\alpha$  se encuentra altamente concentrada en estructuras caveolares de células no estimuladas. La realización de experimentos de fosforilación *in vitro* ha sugerido que la enzima se encuentra constitutivamente activa en estos compartimentos. Por lo tanto, la toma de moléculas por las caveolas está relacionada a su actividad y, por tanto, PKC  $\alpha$  puede jugar un papel clave en la internalización de las caveolas (36).

Asimismo, utilizando microscopía de fluorescencia ha sido posible observar la translocación de diferentes isoformas de PKC en células eritroleucémicas murinas (MEL). De las seis isoformas expresadas en estas células ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\mu$ ,  $\xi$ ,  $\theta$ ), únicamente la PKC  $\theta$  esta localizada en las asas mitóticas de células MEL en división. Esta isoforma es translocada del núcleo al citosol en células MEL que no están en crecimiento y que han sido tratadas con ésteres de forbol. Este evento es acompañado por la fosforilación de la cinasa seguida de su "down-regulation". De acuerdo a estos estudios se ha propuesto que la PKC  $\theta$ , a diferencia de las otras isoformas, juega un papel en el progreso del ciclo celular (41).

También ha sido posible estudiar el proceso de translocación de la PKC $\delta$  y su papel en la regulación del ciclo celular en células COS-7 y CHO-K1 en cultivo (42). En este caso se estimuló a las células con 3 agentes diferentes: i) con ATP, ii) con TPA y iii) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El estímulo con ATP causó una translocación transitoria a la membrana plasmática por 30 segundos y una subsecuente retranslocación al citosol. El TPA indujo una lenta translocación de la PKC $\delta$ -GFP a las membranas y esta fué unidireccional. Interesantemente, el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no produjo translocación de la cinasa, pero aumentó su actividad más de tres veces.

Como se muestra en estos trabajos, existen diferentes patrones de redistribución de la PKC y no necesariamente la activación requiere de redistribución de la enzima, por lo que el estudio de los diferentes mecanismos involucrados en la translocación y activación de las diversas isoformas de PKC es complejo.

### **Interacción de PKC con proteínas.**

La observación de que la interacción estable de la PKC activada con las membranas se inhibía cuando éstas eran tratadas con tripsina, sugirió que las proteínas de membrana podían unir a la forma activa de la PKC (43).

Con respecto a la interacción de la PKC activa con proteínas, cada vez es más claro que la presencia de motivos o módulos en las proteínas es la que está jugando un papel crucial en la localización precisa de elementos que se comparten en las cascadas de transducción evitando una intercomunicación innecesaria, ya que por la presencia de estos motivos en las proteínas, se pueden llevar a cabo interacciones específicas proteína-proteína. Se han encontrado proteínas adaptadoras que forman complejos multienzimáticos con cinasas y/o fosfatasas que se usan en más de una vía de señalización, manteniéndolas en sitios específicos en los que solo tienen acceso a sustratos localizados en ese lugar (44).

Otras evidencias han mostrado que cuando se activa la PKC se asocia con proteínas de la fracción particulada, probablemente del citoesqueleto, así como con proteínas nucleares (3, 45).

Se han reportado hasta ahora un gran número de proteínas que interactúan con PKC utilizando diversas técnicas. Entre las más utilizadas están: i) los ensayos de "overlay" (una modificación de un Western Blot, en el que se utiliza a la PKC pura, en lugar de un anticuerpo, como sonda para revelar a las bandas de proteínas a las cuales se une la PKC), ii) la técnica de "interaction cloning" (la cual utiliza a la PKC como una sonda para identificar secuencias de cDNA dentro de una biblioteca de cDNA), y iii) el análisis genético de doble híbrido en levaduras para analizar las interacciones proteína-proteína.

Por estos métodos se ha encontrado que la PKC se une a proteínas adaptadoras de diversas formas. Un grupo de ellas son proteínas que pueden unir directamente fosfatidilserina y que son sustratos de la PKC. Entre estas proteínas se encuentran: talina,

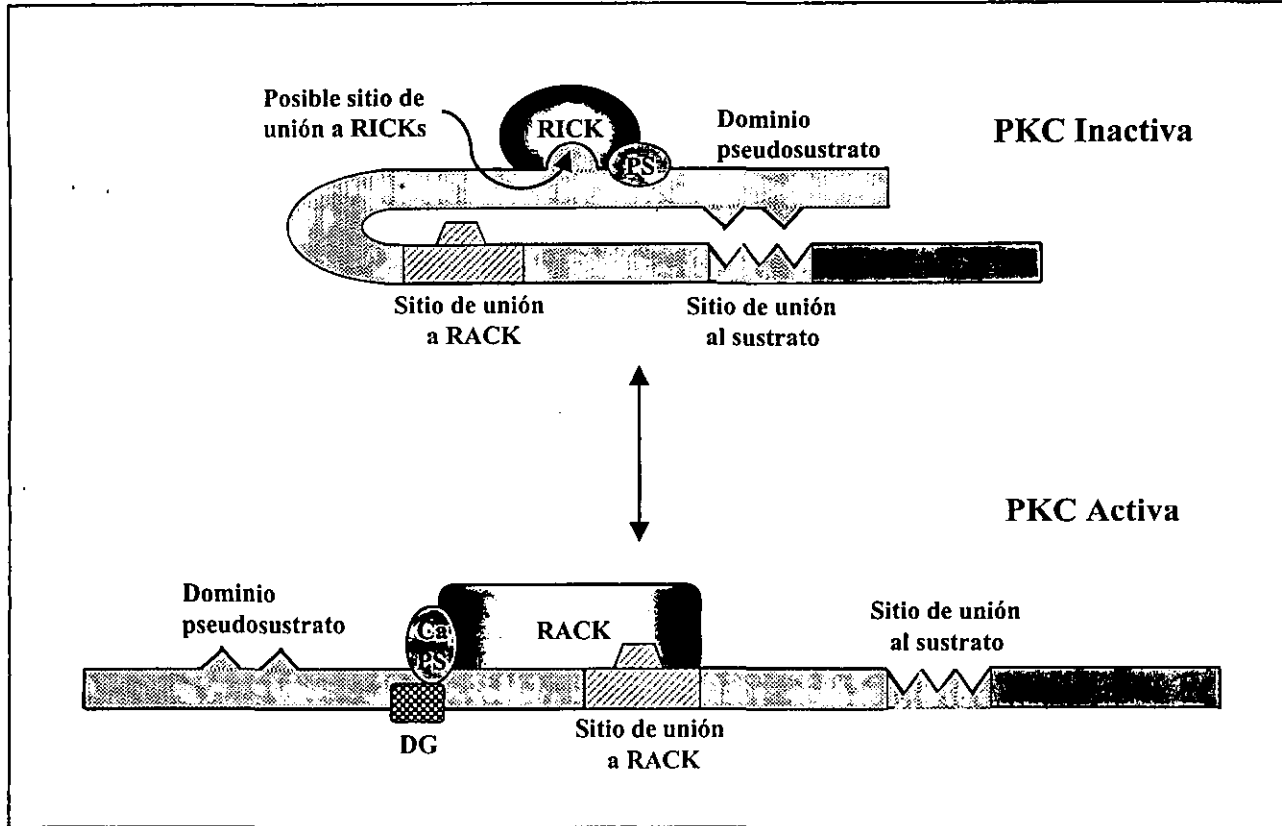
vinculina, MARCKS (los sustratos miristoilados de cinasa C ricos en alanina), AKAP 79 y gravina/AKAP 250 (llamadas así ya que originalmente se les descubrió como proteínas que se anclaban a la proteína cinasa A y que eran dependientes de las concentraciones de AMPc), SBRC (un producto génico relacionado a sdr que une a una cinasa C) y Btk ("Bruton tyrosine kinase").

Las proteínas MARCKS son de los sustratos mejor caracterizados de la PKC (46). Se ha observado que su unión a la cinasa disminuye cuando esta se encuentra fosforilada y diversos estudios sobre los patrones de expresión de MARCKS durante el desarrollo del cerebro, utilizando ratones transgénicos, sugieren que estas proteínas puedan ser importantes en los eventos de reconocimiento célula-célula a través del desarrollo.

La familia de proteínas AKAPs ha sido también identificada como proteínas que interactúan con PKC. AKAP 79, una proteína neuronal altamente expresada en ciertas regiones del cerebro humano, así como su homólogo en rata (AKAP 150), ha sido estudiada recientemente en células de insecto Sf21 (47). AKAP 79 se asocia, *in vitro* e *in vivo*, con isoformas convencionales, nuevas y atípicas de la PKC y se ha mostrado que no se requiere de los activadores lipídicos de la cinasa ni de la misma cinasa activa para que se lleve a cabo la interacción. Dado que la PKC está inactiva cuando se une a AKAP 79, se cree que el sitio activo de la cinasa pueda participar en las interacciones proteína-proteína. En este estudio se demostró que un péptido de AKAP 79 (aminoácidos 31-52) se une en o muy cerca del surco de unión al sustrato en el centro catalítico de la PKC  $\beta$ II. Esta interacción inhibe la actividad de cinasa de la enzima, ya que el péptido es rico en residuos básicos los cuales representan determinantes clave en las interacciones PKC-pseudosustrato, por lo que se comporta como una región pseudosustrato.

SBRC es un sustrato de PKC que se une al dominio regulatorio de la enzima de una manera dependiente de fosfatidilserina y es fosforilada *in vivo* después de la activación de la PKC por PMA. La unión de esta proteína parece que no es exclusiva para la PKC $\delta$ , ya que también une a la PKC $\alpha$  (48). La cinasa Btk también une a todas las isoformas de PKC de una manera dependiente de lípidos y se ha sugerido que esta proteína une la forma inactiva o por lo menos la no completamente activa de la PKC. Estudios recientes han demostrado que el dominio C1 de las isoformas de PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$  y PKC $\alpha$  se une al dominio de homología a plecstrina de Btk (49).

Un segundo grupo de proteínas adaptadoras a PKC son las llamadas RACKs (denominadas así por receptor for activated C kinase) identificadas por primera vez por Mochly-Rosen et al (50). Estas proteínas están presentes en la fracción particulada y han sido descritas como proteínas que unen solamente a la forma activa de la PKC de una manera específica y saturable. A la fecha se han identificado tres RACKs en membranas de cerebro y de corazón de rata (50 y 51) y se han identificado también al menos 7 proteínas que se comportan como RACKs en la fracción insoluble en Tritón X-100 de hepatocitos de rata (4). Hasta ahora dos RACKs han sido clonadas y el análisis de su secuencia muestra que pertenecen a la superfamilia de proteínas que tienen el dominio WD-40, que incluye a la subunidad beta de proteínas G (52, 53). Acorde con esto, también se ha observado que existe una reactividad inmunológica cruzada entre las RACKs identificadas en hepatocitos de rata y la subunidad beta de las proteínas G (54). La unión PKC-RACKs es una unión dependiente de fosfolípido y se sugiere que esto puede servir para estabilizar la asociación de la enzima con sitios específicos de la membrana. Sin embargo, se ha observado que un puente de fosfatidilserina no es suficiente para la unión de la PKC a las RACKs, por lo que se requiere de una interacción directa proteína-proteína (51). Esta unión no se inhibe por un péptido sustrato, indicando que el sitio de unión a la RACK en la PKC es distinto al sitio de unión a sus sustratos (figura 8). RACK1 es una proteína de 36 kDa que fue clonada a partir de cerebro de rata, no es sustrato de PKC y se ha sugerido que sea una RACK específica para PKC $\beta$ II, ya que colocaliza con esta isoforma en el perinúcleo de miocitos cardiacos (50). El sitio de unión a RACK1 ha sido mapeado en el dominio C2 de las PKCc (aminoácidos 186-198, 209-216 y 217-226) y estudios de resonancia magnética nuclear y rayos X del dominio C2, sugieren que las secuencias correspondientes a los sitios de unión a RACK1 en PKC están sobre tres cadenas  $\beta$  expuestas en este dominio (17). Por otra parte, se ha encontrado que PKC $\epsilon$  se une a actina filamentosa (F-actina) en condiciones *in vitro* y en sinaptosomas (55) y ya que esta unión se lleva a cabo únicamente con la forma activa de la PKC $\epsilon$ , parece ser que F-actina tiene las características de ser una RACK para esta isoforma. El sitio de unión a F-actina ha sido mapeado en el dominio C1 de PKC $\epsilon$  (aminoácidos 223-228), sin embargo existen evidencias que indican que la unión de las isoformas de PKCn a sus RACKs se lleva a cabo mediante el dominio V1 (56). El sitio de unión a RACK sobre PKC $\epsilon$  ha sido mapeado en los aminoácidos 14-21. Un



**Figura 8. Modelo de la interacción de PKC con proteínas adaptadoras (tomado de la ref11).** Este modelo describe la unión de RICKs con la forma inactiva de PKC y la unión de RACKs con la forma activa de PKC. Los sitios de las interacciones proteína-proteína están ejemplificados en el dominio regulador, sin embargo, hay sitios adicionales presentes en el dominio catalítico.

péptido correspondiente a esta secuencia inhibe selectivamente la translocación de PKC $\epsilon$  y no la de otras isoformas (57).

Un tercer grupo de proteínas que también interactúan con PKC son los llamados RICKs (receptores para la cinasa C inactiva) (14). Estas proteínas no requieren ser sustratos de la PKC, y se ha demostrado que unen preferencialmente la forma inactiva de la cinasa. El mecanismo de disociación es muy semejante al de las proteínas AKAPs en donde la PKA se disocia de la AKAP después de una elevación en las concentraciones de AMPc. En el caso de los RICKs, se ha observado que el éster de forbol PMA u otros activadores promueven su disociación de la PKC.

Por último se pueden citar un grupo de proteínas llamadas STICKS (sustratos que interactúan con cinasa C) (58). Estas son proteínas de alto peso molecular que se ha encontrado que se unen a PKC en fibroblastos REF 52. La PKC directamente interactúa y fosforila a la proteína modificando las funciones de este grupo de proteínas. Entre estas se encuentran las aducinas, proteínas que poseen subunidades con un dominio relacionado a las proteínas MARCKS. Este dominio, presente en  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  aducina una calmodulina y contiene el principal sitio de fosforilación para la PKC. Las aducinas son proteínas de citoesqueleto que facilitan las interacciones entre espectrina y actina para formar el esqueleto membranal subcortical. Estos estudios han dado evidencia de una actividad de PKC endógena incrementada en células con oncogenes alterados y han sugerido que la fosforilación de las aducinas por PKC tiene una influencia directa en la organización del citoesqueleto celular (59).

#### IV. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Con base en lo anterior y dado que en hepatocitos de rata se coexpresan 7 isoformas de PKC, es de gran importancia la identificación y caracterización de proteínas que interactúan con las PKC. Con este estudio se podrá determinar si esta interacción se lleva a cabo con algunas o con todas las isoformas de PKC y si se lleva a cabo en condiciones *in vitro* e *in vivo*.



péptido correspondiente a esta secuencia inhibe selectivamente la translocación de PKC $\epsilon$  y no la de otras isoformas (57).

Un tercer grupo de proteínas que también interactúan con PKC son los llamados RICKs (receptores para la cinasa C inactiva) (14). Estas proteínas no requieren ser sustratos de la PKC, y se ha demostrado que unen preferencialmente la forma inactiva de la cinasa. El mecanismo de disociación es muy semejante al de las proteínas AKAPs en donde la PKA se disocia de la AKAP después de una elevación en las concentraciones de AMPc. En el caso de los RICKs, se ha observado que el éster de forbol PMA u otros activadores promueven su disociación de la PKC.

Por último se pueden citar un grupo de proteínas llamadas STICKS (sustratos que interactúan con cinasa C) (58). Estas son proteínas de alto peso molecular que se ha encontrado que se unen a PKC en fibroblastos REF 52. La PKC directamente interactúa y fosforila a la proteína modificando las funciones de este grupo de proteínas. Entre estas se encuentran las aducinas, proteínas que poseen subunidades con un dominio relacionado a las proteínas MARCKS. Este dominio, presente en  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  aducina una calmodulina y contiene el principal sitio de fosforilación para la PKC. Las aducinas son proteínas de citoesqueleto que facilitan las interacciones entre espectrina y actina para formar el esqueleto membranal subcortical. Estos estudios han dado evidencia de una actividad de PKC endógena incrementada en células con oncogenes alterados y han sugerido que la fosforilación de las aducinas por PKC tiene una influencia directa en la organización del citoesqueleto celular (59).

#### IV. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Con base en lo anterior y dado que en hepatocitos de rata se coexpresan 7 isoformas de PKC, es de gran importancia la identificación y caracterización de proteínas que interactúan con las PKC. Con este estudio se podrá determinar si esta interacción se lleva a cabo con algunas o con todas las isoformas de PKC y si se lleva a cabo en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

## V. HIPOTESIS

La hipótesis del presente trabajo será que, al igual que en otros sistemas celulares, las proteínas identificadas interactúen con la proteína cinasa C activa de manera isoforma-específica tanto *in vivo* como *in vitro* y que presenten algunas características comunes con las proteínas ya clonadas.

## VI. OBJETIVOS

El objetivo central del presente trabajo es el de llevar a cabo la caracterización bioquímica de la interacción de diversas proteínas con la proteína cinasa C, utilizando como modelo experimental a hepatocitos de rata, para evaluar las posibles consecuencias fisiológicas de su interacción. Para ello se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1) Identificar a proteínas que interactúan con la PKC en hepatocitos de rata utilizando ensayos de "overlay".
- 2) Establecer un método adecuado de purificación a homogeneidad de las proteínas que evite su degradación.
- 3) Caracterizar bioquímicamente a estas proteínas, determinando su contenido de aminoácidos, sus pesos moleculares, su pI, así como su contenido de carbohidratos.
- 4) Establecer la identidad de estas proteínas obteniendo la secuencia de sus extremos amino y comparándola con bancos de secuencias conocidas.
- 5) Determinar qué tipo de interacción se lleva a cabo con la PKC. Si se da únicamente con la forma activa o si se lleva a cabo también con la forma inactiva de la cinasa.
- 6) Determinar la especificidad de la interacción con la PKC, y si se lleva a cabo con cualquier isoforma o si es específica para cada una.
- 7) Determinar si estas proteínas además de unir PKC, son sustrato de ella *in vitro* y si esto es cierto, establecer si la fosforilación de la proteína se lleva a cabo por una isoforma determinada.

## V. HIPOTESIS

La hipótesis del presente trabajo será que, al igual que en otros sistemas celulares, las proteínas identificadas interactúen con la proteína cinasa C activa de manera isoforma-específica tanto *in vivo* como *in vitro* y que presenten algunas características comunes con las proteínas ya clonadas.

## VI. OBJETIVOS

El objetivo central del presente trabajo es el de llevar a cabo la caracterización bioquímica de la interacción de diversas proteínas con la proteína cinasa C, utilizando como modelo experimental a hepatocitos de rata, para evaluar las posibles consecuencias fisiológicas de su interacción. Para ello se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1) Identificar a proteínas que interactúan con la PKC en hepatocitos de rata utilizando ensayos de "overlay".
- 2) Establecer un método adecuado de purificación a homogeneidad de las proteínas que evite su degradación.
- 3) Caracterizar bioquímicamente a estas proteínas, determinando su contenido de aminoácidos, sus pesos moleculares, su pI, así como su contenido de carbohidratos.
- 4) Establecer la identidad de estas proteínas obteniendo la secuencia de sus extremos amino y comparándola con bancos de secuencias conocidas.
- 5) Determinar qué tipo de interacción se lleva a cabo con la PKC. Si se da únicamente con la forma activa o si se lleva a cabo también con la forma inactiva de la cinasa.
- 6) Determinar la especificidad de la interacción con la PKC, y si se lleva a cabo con cualquier isoforma o si es específica para cada una.
- 7) Determinar si estas proteínas además de unir PKC, son sustrato de ella *in vitro* y si esto es cierto, establecer si la fosforilación de la proteína se lleva a cabo por una isoforma determinada.

- 8) Estudiar si la unión a PKC y la fosforilación de estas proteínas se llevan a cabo también *in vivo* para ver si la interacción puede tener relevancia fisiológica.
- 9) Clonar y expresar alguna de las proteínas identificadas, para estudios posteriores de los determinantes moleculares implicados en la interacción con PKC.

## VII. MATERIALES Y METODOS

La metodología utilizada en la realización de los experimentos se encuentra descrita en los artículos que se muestran como parte integral de esta tesis, y que aparecen incluidos en la sección de resultados. A continuación se mencionarán algunas técnicas que se utilizaron para la obtención de resultados adicionales del trabajo de tesis y que no se describieron en los artículos presentados.

### **Clonación y expresión de los genes para la calreticulina y para una proteína asociada a SF2.**

Para llevar a cabo la clonación del gen de calreticulina, se llevó a cabo primero un análisis de la estructura primaria del gen para posteriormente, con base en la secuencia de bases del RNAm, diseñar un par de oligonucleótidos sintéticos para ser utilizados como cebadores ("primers") en RT-PCR abarcando el marco de lectura completo de la proteína. Se diseñaron los primers modificando la secuencia original del gen para generar un sitio de restricción que permitiera clonar al gen de una manera dirigida. Con los primers sintetizados se procedió a realizar el ensayo de RT-PCR utilizando para ello RNA obtenido de hígado de rata. Una vez obtenido el producto de PCR correspondiente al gen de calreticulina, éste se purificó y se cortó con la enzima Xba I para clonar de manera dirigida en el plásmido vector pFasBac Htc.

En el caso del gen para la proteína de 32 Kda asociada al factor de procesamiento de RNAm SF2, las clonas correspondientes a la secuencia nucleotídica completa o parcial de la proteína se obtuvieron de una biblioteca de cDNA de embrión de rata disponibles en Research Genetics Inc. Esta proteína fue clonada en el vector pGEX1, el cual es un vector de expresión para proteínas de fusión que expresan un gen clonado

- 8) Estudiar si la unión a PKC y la fosforilación de estas proteínas se llevan a cabo también *in vivo* para ver si la interacción puede tener relevancia fisiológica.
- 9) Clonar y expresar alguna de las proteínas identificadas, para estudios posteriores de los determinantes moleculares implicados en la interacción con PKC.

## VII. MATERIALES Y METODOS

La metodología utilizada en la realización de los experimentos se encuentra descrita en los artículos que se muestran como parte integral de esta tesis, y que aparecen incluidos en la sección de resultados. A continuación se mencionarán algunas técnicas que se utilizaron para la obtención de resultados adicionales del trabajo de tesis y que no se describieron en los artículos presentados.

### **Clonación y expresión de los genes para la calreticulina y para una proteína asociada a SF2.**

Para llevar a cabo la clonación del gen de calreticulina, se llevó a cabo primero un análisis de la estructura primaria del gen para posteriormente, con base en la secuencia de bases del RNAm, diseñar un par de oligonucleótidos sintéticos para ser utilizados como cebadores ("primers") en RT-PCR abarcando el marco de lectura completo de la proteína. Se diseñaron los primers modificando la secuencia original del gen para generar un sitio de restricción que permitiera clonar al gen de una manera dirigida. Con los primers sintetizados se procedió a realizar el ensayo de RT-PCR utilizando para ello RNA obtenido de hígado de rata. Una vez obtenido el producto de PCR correspondiente al gen de calreticulina, éste se purificó y se cortó con la enzima Xba I para clonar de manera dirigida en el plásmido vector pFasBac Htc.

En el caso del gen para la proteína de 32 Kda asociada al factor de procesamiento de RNAm SF2, las clonas correspondientes a la secuencia nucleotídica completa o parcial de la proteína se obtuvieron de una biblioteca de cDNA de embrión de rata disponibles en Research Genetics Inc. Esta proteína fue clonada en el vector pGEX1, el cual es un vector de expresión para proteínas de fusión que expresan un gen clonado

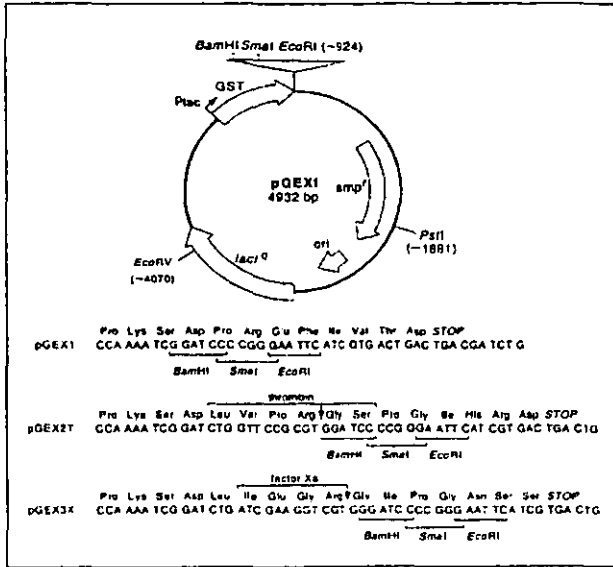


Figura 9. pGEX1. pGEX1 es un vector de expresión de proteínas de fusión que expresa un gen clonado como una proteína de fusión a GST. El represor *lac* (producto del gen *lacI*) se une al promotor  $P_{lac}$ , reprimiendo la expresión de la proteína de fusión GST. Después de la inducción con IPTG, se elimina la represión y la proteína de fusión GST se expresa.

como una proteína de fusión a glutatión S-transferasa (GST) (figura 9). Las clonas positivas se seleccionaron en medios con ampicilina. Se realizó un precultivo con las colonias transformadas incubando 16 horas a 37°C y se indujo la expresión de la proteína de fusión añadiendo 0.4 mM de IPTG. La proteína de fusión se purificó después de lisar a las células por sonicación y cargando el lisado a una columna de GST-sefarosa. La proteína se expresará en células Sf2 1 de insecto o en células HepG2 de la misma manera descrita en el párrafo anterior (60, 61).

## VIII. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la realización de la tesis están descritos en los artículos anexos.

Además de estos, se incluyen algunas figuras de resultados que no fueron incluidos en estos artículos.

### Resumen:

Se detectaron previamente por lo menos siete proteínas que unían a PKC activa en una fracción insoluble en Tritón X-100 de hepatocitos de rata (4). A la fecha solo se había descrito un método de purificación de proteínas RACKs a partir de una fracción insoluble en detergente de cerebro de rata adulta (62). Este método consiste de una precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columnas de intercambio catiónico y fenil sefarosa. En nuestro trabajo (trabajo 1) se desarrolló un método de purificación para las proteínas expresadas en los hepatocitos de rata aprovechando su capacidad para precipitar en soluciones con Tritón X-100.

De acuerdo a los objetivos planteados, los resultados obtenidos en la primera parte del trabajo de tesis, pueden resumirse de la siguiente manera:

- 1) El método descrito anteriormente favoreció la purificación de proteínas de bajo peso molecular (14, 15.3, 16.1 y 34.4 Kda). Al realizar la segunda precipitación se enriqueció significativamente a dos proteínas: la de 14 Kda y las de 15.3 y 16.1 Kda, las cuales migraron como un doblete. Las proteínas de mayor peso molecular se perdieron considerablemente en el sobrenadante de esta segunda precipitación (Prot. Expres. Pur. (1997) 10: 32-37, figura 2).
- 2) Se realizó una prueba del contenido de carbohidratos de las proteínas purificadas utilizando un kit de detección de glicanos (Boehringer Mannheim). Ninguna de las proteínas probadas dió una señal positiva, lo que indicó que no se trataba de glucoproteínas (resultados no mostrados).



- 3) La fracción obtenida de la primera precipitación mostró la presencia de proteínas con un peso molecular mayor a las obtenidas en la segunda precipitación. Con el fin de obtener a estas proteínas puras, se decidió modificar los gradientes de elución de la columna de DEAE-celulosa por un gradiente semilineal (de 0 a 0.3 M y de 0.3 a 0.5 M de NaCl). Los resultados de esta parte de la purificación nos permitieron obtener una fracción muy enriquecida de una proteína con un peso molecular aproximado de 32 kDa y una proteína de 60 kDa. Estas fracciones fueron también obtenidas por electroelución y el grado de pureza fue evaluado también por SDS-PAGE teñido con la técnica de nitrato de plata (resultados no mostrados).
- 4) Una vez obtenidas las proteínas en forma pura, se sometieron a un análisis de aminoácidos realizado por la W. M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory Facility en la Universidad de Yale. En este análisis se observó que para las proteínas de 15.3 y 16.1 kDa la composición y el % relativo de cada aminoácido fueron semejantes excepto en el contenido de serinas y treoninas. Esto sugirió que probablemente la proteína de 15.3 kDa fuera un derivado de proteólisis de la de 16.1 kDa (Prot. Expres. Pur. (1997) 10: 32-37, tabla 2).

Con los datos obtenidos, se realizó un análisis con el programa PROPSEARCH para determinar la posible identidad de estas proteínas. Este análisis arroja resultados en *porcentaje de identidad* de la composición de aminoácidos entre dos o más proteínas distintas. Un valor cercano al 100% hablaría de que ambas proteínas son muy parecidas, sin que esto signifique que se trate de la misma. Esto se confirma posteriormente, con la lectura de su secuencia. Los análisis del PROPSEARCH resultan útiles para aquellas proteínas en las cuales el extremo amino se encuentra bloqueado, ya que el valor del *porcentaje de identidad* genera una idea sobre qué proteína es.

Los resultados obtenidos de acuerdo a este análisis son los siguientes:

PROT. (kDa)	IDENTIDAD (%)
14	- Histona H4 (90)
15.3	- Histona H2B (90)
16.1	- Histona H2B (100)

34.4	- Aldolasa - Endonucleasa - Desoxirribonucleasa (82)
------	---

5) Para establecer la identidad de las proteínas, se secuenció el extremo amino de por lo menos cuatro proteínas purificadas (de 15.3, 16.1, 32 y 60 Kda). La secuenciación se realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Las proteínas de 34.4 y 38 Kda presentaron el extremo amino bloqueado. La secuencia de cada proteína se comparó con un banco de secuencias en el programa SwissProt. Los resultados fueron los siguientes:

PROT. (kDa)	SECUENCIA	IDENTIFICACION
15.3	1 DGKKRLRSRKESYSVYVYKG 20 Similitud: 25 DGKKRKRSRKESYSVYVYKV 44	- HISTONA H2B
16.1	1 AVTKQKKGKRRKRSRKESYSV 23 Similitud: 18 AVTKQKKGKRRKRSRKESYSV 29	- HISTONA H2B
32	1 LHTEGDKAFVEFLTDEIKEE 20 Similitud: 74 LHTDGDKAFVDFLSDEIKEE 93	PROTEINA ASOCIADA AL SPLICING FACTOR SF2
60	<div style="text-align: right; margin-right: 20px;">(W) (G)</div> 1 DPAIYFKEQFLDGDAXTRX 20 Similitud: 18 DPAIYFKEQFLDGDA 32	CALRÉTCULINA

De las proteínas identificadas, dos poseen características muy interesantes. Estas proteínas son: una proteína de 32 Kda asociada a un "splicing factor" SF2, y otra identificada como calreticulina (CRT), de 60 Kda. Ambas proteínas son ácidas y pertenecen a la superfamilia de proteínas con motivos WD-40, de manera semejante a las RACKs clonadas.

De acuerdo al interés por estudiar la interacción de estas proteínas con la PKC, los resultados obtenidos en la segunda parte del trabajo de tesis son los siguientes:

a) Se purificó a homogeneidad a la CRT por dos métodos diferentes: 1) a partir de una fracción insoluble en Tritón X-100 de hepatocitos de rata y una electroelución (método

descrito en Prot. Expres. Pur. (1997) 10: 32-37) y 2) por el método reportado por Milner, et al (63), el cual se basa principalmente en precipitaciones con sales de amonio, precipitaciones isoelectricas y cromatografía de intercambio iónico (descrito en Biochem. J (1999) 344: 469-475).

- b) El rendimiento obtenido de la CRT purificada por el método de Milner, et al, proporcionó la cantidad de proteína necesaria para la caracterización bioquímica de su interacción con PKC. La CRT purificada por nuestro método se evidenció como una sola banda que migra con un peso molecular de 60 Kda. Esto fue así, ya que se recuperó finalmente por electroelución después del gradiente semilineal empleado. Sin embargo, la CRT obtenida por Milner et al se evidenció como un doblete que migra con un peso molecular de 60 y 55 Kda respectivamente sugiriendo la presencia de dos formas moleculares de CRT (Biochem. J (1999) 344: 469-475, figura 1).
- c) Se confirmó la identidad de la CRT purificada por ambos métodos mediante un ensayo de Western Blot utilizando un anticuerpo dirigido contra el extremo carboxilo de la CRT humana (péptido QAKDEL) (Biochem. J (1999) 344: 469-475, figura 1).
- d) Con la CRT pura, se realizaron ensayos de unión a PKC *in vitro*. En estos ensayos se utilizó una fracción de isoformas de PKC parcialmente pura para determinar cuál de ellas se unía a calreticulina. Esto se llevó a cabo utilizando la técnica de overlay con anticuerpos específicos dirigidos contra cada isoforma de PKC. Los resultados obtenidos demostraron que la CRT es capaz de unir a todas las isoformas expresadas en hepatocitos de rata en presencia de fosfatidilserina, 1,2-dioleína y CaCl<sub>2</sub>. Sin embargo, la PKC  $\alpha$  unió fuertemente las dos formas de la calreticulina (la de 60 y la de 55 Kda), mientras que la PKC  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  unieron principalmente a la forma de 55 kDa y la PKC  $\theta$ ,  $\xi$  y  $\mu$  a la forma de 60 Kda (Biochem. J (1999) 344: 469-475, figura 2).
- e) Dado que la interacción de la CRT se lleva a cabo *in vitro* con todas las isoformas de PKC expresadas en hepatocitos de rata, se probó si esta proteína podía ser fosforilada por la cinasa, es decir, si además de interaccionar con ella servía como un sustrato de la PKC. Los ensayos *in vitro*, utilizando inmunoprecipitados de cada isoforma de PKC, demostraron que la CRT es un excelente sustrato de todas las isoformas de

cinasa, incluyendo la PKC $\mu$  la cual posee algunas características estructurales y funcionales distintas a las otras isoformas. Esta fosforilación fue dependiente de los cofactores específicos para la cinasa C. Es importante mencionar que la fosforilación de la calreticulina fue más eficiente que la observada para la histona H1-IIIS, típico sustrato de PKC, utilizada como control positivo (Biochem. J (1999) 344: 469-475, figura 3).

- f) Se determinó si la CRT es capaz de asociarse con las isoformas de PKC *in vivo*. Para ello, se utilizaron hepatocitos de rata intactos los cuales se incubaron en presencia o en ausencia de activadores de la PKC (1 $\mu$ M de PMA para activar directamente a la cinasa o 10  $\mu$ M de adrenalina +10  $\mu$ M de propanolol para activar a la PKC via receptores  $\alpha$ 1 adrenérgicos). Se analizaron los inmunoprecipitados de CRT utilizando anticuerpos específicos contra cada isoforma de PKC. Estos resultados mostraron que la CRT inmunoprecipitó con las isoformas de PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\theta$ ,  $\xi$  y  $\mu$  pero no con las PKC  $\delta$  y  $\epsilon$ , por lo que la interacción calreticulina-PKC sí se lleva a cabo en las células *in vivo*. Además, los resultados obtenidos en hepatocitos control y activando a la PKC por ambas vías, sugieren que la CRT está constitutivamente asociada con estas isoformas de PKC *in vivo*, ya que en ambas condiciones se revela la presencia de la CRT (Biochem. J (1999) 344: 469-475, figura 4).
- g) Se determinó también si la CRT, es fosforilada por isoformas de PKC activa en células intactas. Esto se realizó con células marcadas metabólicamente con [32P] ortofosfato y estimuladas con 1 $\mu$ M de PMA o 10  $\mu$ M de adrenalina +10  $\mu$ M de propanolol en presencia o ausencia de un inhibidor específico de PKC permeable a las células (Ro 31-8220). Los resultados obtenidos, inmunoprecipitando a la calreticulina y analizando la autoradiografía correspondiente, mostraron un incremento en la fosforilación de ambas formas moleculares de calreticulina (la de 60 y 55Kda) como resultado de la activación de PKC. Esta fosforilación no se llevó a cabo cuando se utilizó el inhibidor específico para la PKC (Biochem. J (1999) 344: 469-475, figura 5).

Actualmente, hemos obtenido avances en los experimentos de clonación y expresión de la proteína de 32 Kda asociada al factor de "splicing" SF2 y de calreticulina. Con respecto a los resultados obtenidos en esta parte del trabajo, con la proteína de 32

Kda, se realizó un curso temporal de la expresión de esta proteína como una proteína de fusión a GST en bacterias DH5 $\alpha$  y BL21. El tiempo óptimo de expresión para la proteína fue de 2.5 h posterior a la inducción con 0.4 mM de IPTG. La proteína SP32-GST migró en SDS-PAGE como una proteína de 55 Kda (figuras 10 y 11, resultados no publicados).

Para determinar si la proteína de 32 Kda une a las isoformas de PKC expresadas en hepatocitos de rata, se realizaron experimentos de "overlay" utilizando a la proteína de fusión purificada por afinidad en una columna de GST-sefarosa. Los resultados de tres experimentos distintos mostraron que todas las isoformas de PKC son capaces de unir a la proteína de 32 Kda. Sin embargo se observan tres patrones de unión distintos: 1) el caso de las isoformas de PKC  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\mu$  las cuales unieron a la proteína de manera independiente de cofactores de la cinasa, 2) a diferencia de las anteriores, las isoformas de PKC  $\theta$  y  $\xi$  unieron más fuertemente a la proteína de fusión y esta unión es independiente de cofactores y 3) las isoformas  $\delta$  y  $\epsilon$  unen a la proteína pero de manera aparentemente dependiente de cofactores (figura 12 a y b, resultados no publicados).

## Purification and Characterization of Receptors for Activated Protein Kinase C from Rat Hepatocytes

Martha Robles-Flores,\* Erika Rendón-Huerta,\* and J. Adolfo García-Sáinz†

\*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, and †Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-456, 04510 México, D.F., México

Received August 2, 1996, and in revised form December 20, 1996

It has been proposed that protein kinase C may be targeted to specific locations via interactions with anchoring proteins located at various subcellular sites. A group of proteins collectively termed RACKs (Receptors for Activated C-Kinase) have been identified. Here, we made use of a rapid and simple method to purify several RACKs from rat hepatocytes, taking advantage of the ability of these proteins to be precipitated with Triton X-100. The method can be used for the isolation of other proteins that share these properties. Four proteins were purified to apparent homogeneity with  $M_r$  values of 14, 15, 16, and 34 kDa. Amino acid composition and biochemical characteristics of these proteins are presented. © 1997 Academic Press

Protein kinase C (PKC)<sup>1</sup> is a family of enzymes that transduces a plethora of signals promoted by lipid hydrolysis. It often has been observed that, upon cell stimulation, primarily cytosolic PKC is associated to membrane compartments, but despite extensive studies, the mechanism of activation of PKC is not fully understood as yet (1-4). Although all members so far identified of the PKC family require phosphatidylserine for activation, other lipid mediators exert profound positive or negative effects on each PKC isoform (4). Several models of PKC-membrane interaction have been proposed (5,6). A role of proteins that may target the activated PKC molecule to specific sites has been postulated recently by the identification of several PKC-binding proteins that may act as receptors for the activated form of PKC. These have been termed RACKs (Receptors for Activated C-Kinase) and show phospholipid-dependent binding to PKC that could serve to stabilize the associa-

tion of the active enzyme to specific locations in the cells (7-11).

To date, three putative RACKs have been identified in membranes from adult rat brain and heart (9,10) and at least seven proteins that behave like RACKs in a Triton-insoluble fraction of rat hepatocytes (11). Recently, a 36-kDa RACK from rat brain was cloned (12); it shares some sequence similarities with the  $\beta$  subunit of G proteins, both containing seven repeats of the WD-40 motif (12). Similarly, we have observed that there is immunological crossreactivity between G-protein  $\beta$  subunits and hepatocyte RACKs (13). Other RACKs have not been characterized yet, but several lines of evidence suggest that they may be cytoskeletal elements or associated proteins since: (i) they are present in detergent-insoluble particulate fractions of cells, which have been reported to be enriched in cytoskeletal proteins (14), and (ii) PKC translocates to cytoskeletal elements upon stimulation (8,15-17). Only one method for the purification of 28-, 30-, and 33-kDa RACKs from the detergent-insoluble fraction of adult rat brain has been (briefly) outlined previously (18); this purification procedure consists of ammonium sulfate precipitation and chromatography over phenyl-Sepharose and cation-exchange columns. Here, we characterized some of the RACKs we have identified previously in rat hepatocytes (11). The ability of these proteins to precipitate in solutions containing Triton X-100 allowed us to purify them to apparent homogeneity in only four steps.

### MATERIAL AND METHODS

Murine monoclonal antibodies to PKC isoenzymes were purchased from Upstate Biotechnology, Inc., or from Seikagaku Kogyo Co.; goat anti-mouse and anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugates were from Bio-Rad. Leupeptin, trypsin inhibitor, phosphatidylserine, 1,2-dioleoin, and Triton X-100 were obtained from Sigma. DEAE-cellulose (DE-52) was from What-

<sup>1</sup> Abbreviations used: PKC, protein kinase C; RACKs, receptors for activated C-kinase; *pI*, isoelectric point; DIG, digoxigenin; G-protein, guanine nucleotide binding protein; PVDF, polyvinylidene difluoride.

man. The digoxigenin glycan detection kit was purchased from Boehringer Mannheim.

#### Isolation of Rat Hepatocytes

Male Wistar rats (200–250 g) fed *ad libitum* were used. Hepatocytes were isolated by the collagenase perfusion method described by Berry and Friend (19).

#### Purification of RACKs

**Step I: First precipitation with Triton X-100.** Freshly isolated rat hepatocytes obtained from two livers (approximately 10 g wet weight) were homogenized with an ultraturrax in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer containing 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, and 0.1 mg/ml trypsin inhibitor. The homogenate was maintained at 0–5°C for 30 min before being centrifuged at 28,000g for 20 min. All further steps were carried out at 0–5°C. Supernatant was discarded and pellet resuspended in the same buffer but without Triton X-100 at a protein concentration of 7 mg/ml.

**Step II: DEAE-cellulose chromatography.** The re-suspended pellet was applied to a 70-ml DEAE-cellulose (DE-52) anion exchange column (2.5 × 20 cm) which had been equilibrated with buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.5). The column was washed with 500 ml of buffer A containing 0.2 M NaCl, followed with a 400-ml linear gradient of NaCl (0.2–1.2 M) in buffer A plus 0.5 mM EDTA and 0.5 mM EGTA. Fractions of 4 ml were assayed for absorbance at 280 nm, and peak fractions were pooled, concentrated to 40 ml (Amicon system, YM 3000 membrane), and dialyzed against buffer A.

**Step 3: Second precipitation with Triton X-100.** The dialyzed eluate was supplemented with 0.5% Triton X-100 and maintained for 30 min at 0–5°C before being centrifuged at 28,000g 20 min. The supernatant was discarded and the pellet gently solubilized in homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 2 mM EDTA and 10 mM EGTA) plus 1 N NaOH (4:1 ratio, final pH 8). The preparation was aliquoted and frozen at –20°C.

**Step 4: Electroelution of RACKs.** An aliquot of 0.6 ml (1.4 mg protein) of the solubilized pellet from the previous step was subjected to 12.5% SDS-PAGE. The proteins corresponding to 14, 15, 16, and 34 kDa were cut off the gel, taking as reference the position visualized by Coomassie blue staining, molecular weight standards, and another sample of 50 µg solubilized pellet that were run in parallel. Each protein was recuperated from gel slices by electroelution with electrophoresis buffer (25 mM Tris-HCl, 189 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3) for 5 h in a final volume of 1.5 ml.

#### Determination of RACK Binding Activity by an Overlay Assay

PKC binding to RACKs was determined by the method of Wolf and Sahyoun (8) as modified by Mochly-Rosen *et al.* (9). Briefly, sample protein from each purification step was separated by SDS-PAGE (12.5% gels) and transferred to nitrocellulose membranes, which were then blocked with 3% (w/v) BSA. Partially purified and concentrated PKC (100–200 units; 1 unit is defined as 1 pmol of <sup>32</sup>P transferred from [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP to histone per minute per milligram of protein; final protein concentration, 0.5 mg/ml) was incubated for 1 h at 30°C with the nitrocellulose strips in blotting buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% polyethylene glycol, and 0.2 M NaCl) in the presence of phosphatidylserine (20 µg/ml), 1,2-diolein (0.8 µg/ml), and CaCl<sub>2</sub> (1 mM) or in their absence plus EGTA (0.5 mM). The PKC/blotting buffer mixture was removed and the membranes were washed three times with blotting buffer. Bound PKC was detected using anti-PKC antibodies and second goat anti-mouse IgG antibodies conjugated to alkaline phosphatase.

#### Partial Purification of PKC

PKC was purified as described previously (20). Briefly, hepatocytes were homogenized in ice-cold buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 50 mM 2-mercaptoethanol, and 0.1 mg/ml trypsin inhibitor), incubated at 4°C for 30 min, and centrifuged. Portions of the supernatant were applied to DEAE-cellulose columns that had been equilibrated with column buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.5) at 4°C. After washing with column buffer, PKC was eluted with column buffer containing 0.08 M NaCl, 2 mM EDTA, and 0.1 mg/ml trypsin inhibitor. The eluate was concentrated with an Amicon device (YM-30 membrane) and used for overlay assays.

#### Detection of Sugars in Proteins

The possible content of carbohydrates in purified proteins was determined by the Digoxigenin Glycan Detection Kit (Boehringer Mannheim). Adjacent hydroxyl groups in sugars of glycoconjugates are oxidized to aldehyde groups by mild periodate treatment. The spacer linked steroid hapten digoxigenin (DIG) is then attached covalently to these aldehydes via a hydrazide group. Digoxigenin-labeled glycoconjugates are detected subsequently with an enzyme immunoassay using a digoxigenin-specific antibody conjugated to alkaline phosphatase.

#### Amino Acid Analysis and Amino-Terminal Sequencing

The amino acid composition and the amino-terminal sequencing of all purified RACKs were performed using

TABLE I  
Purification of RACKs from Freshly Isolated Rat Hepatocytes

Purification step	Protein (mg)	Binding activity <sup>a</sup>	Purification (fold)	Yield (%)
(I) Homogenate	2000	0.05	1	100
(II) First precipitation	512	0.195	3.9	25.6
(III) DEAE-cellulose	64	1.56	31.2	3.2
(IV) Second precipitation	12.4	8.06	161.2	0.62
(V) Electroelution, 14 kDa	2.16	46.29	925.8	0.2
(V) Electroelution, 15–16 kDa	3.41	58.8	1176	0.31

<sup>a</sup> One unit is defined as the minimal amount of protein (100  $\mu$ g) required to bind PKC in the original homogenate (data are the mean of six purifications with very similar results).

the services offered by the W. M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory Facility at Yale University.

## RESULTS AND DISCUSSION

We have recently reported the existence of at least seven proteins with apparent  $M_r$  values between 12 and 36 kDa that behave like RACKs in rat hepatocytes (11). The aim of this work was to characterize the most abundant RACKs in these cells using an easy and rapid purification method. In common with RACKs identified so far in other systems, these proteins were found only in the detergent-insoluble fraction of the cells as judged by an overlay assay (11). This approach has been employed successfully by several authors to identify PKC-binding proteins, some of which have been found to be PKC substrates (12,21). In this work, we made use of this method both to localize the proteins and to evalu-

ate their binding activity at each purification step (see Fig. 4).

### Purification of Proteins That Bind Activated PKC

Since RACKs were detected only in the Triton X-100-insoluble fraction from homogenate rat hepatocytes (11), our starting material to purify the proteins was this precipitate. A typical purification procedure is summarized in Table I in which it can be observed that the first precipitation with Triton X-100 per se represents a 3.9-fold enrichment over the initial homogenate. The precipitated protein was resuspended in homogenization buffer without Triton X-100 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, and 0.1 mg/ml trypsin inhibitor). It was observed that it was easier to dissolve the protein at alkaline pH, and thus that it probably was negatively charged at this pH value. We reasoned,

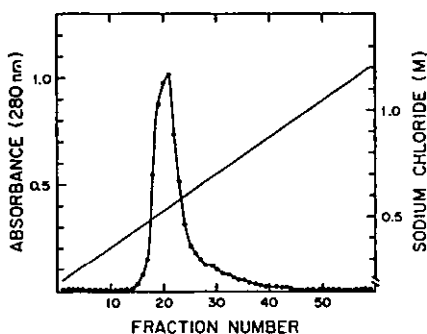


FIG. 1. DEAE-cellulose chromatography profile of the Triton-insoluble homogenate fraction from rat hepatocytes. The column (2.5  $\times$  20 cm) was extensively washed off with buffer (20 mM Tris, pH 7.5, containing 0.2 M NaCl) and then eluted at a flow rate of 25 ml/h with a linear 0.2–1.2 M NaCl gradient in the same buffer plus 0.5 mM EDTA-EGTA. Fractions of 4 ml were collected and analyzed for their absorbance at 280 nm.

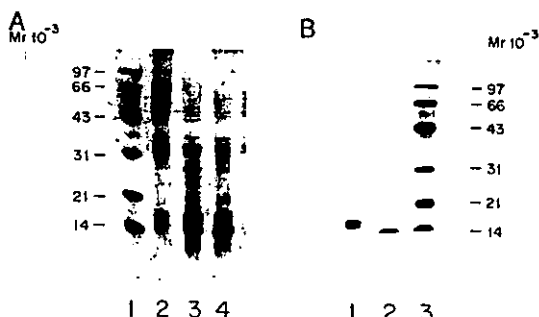


FIG. 2. SDS-PAGE of rat hepatocyte protein derived from each purification step. Samples (50  $\mu$ g (A) or 5  $\mu$ g (B)) were separated by 12.5% SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining (A) or silver staining (B). (A) Lane 1, molecular weight standards; lane 2, first precipitate with Triton X-100; lane 3, DEAE-cellulose column chromatography; lane 4, second precipitate with Triton X-100. (B) Lane 1, 16- to 17-kDa RACKs; lane 2, 14-kDa RACK; lane 3, molecular weight standards.



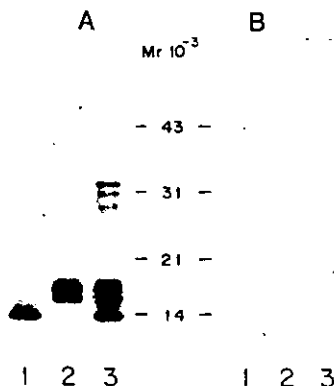


FIG. 3. Overlay assay to determine binding of protein kinase C to purified RACKs. Samples (12  $\mu$ g) from the electroelution step (lane 1, 14-kDa RACK, and lane 2, 16- to 17-kDa doublet) or from the second precipitation with Triton X-100 (lane 3) were subjected to SDS-PAGE (12.5% gels) and blotted onto nitrocellulose. PKC binding was determined by incubating the blots with PKC in the presence (A) or absence (B) of phosphatidylserine, 1,2-diolein, and  $\text{Ca}^{2+}$  for 1 h. Mixture was removed, membranes were washed, and bound PKC was detected with monoclonal antibodies against PKC- $\alpha/\beta$  isozymes and alkaline phosphatase-conjugated second antibody. Positions of  $M_r$  standards are indicated.

therefore, that the protein could bind to an anion exchanger like DEAE-cellulose equilibrated at pH 7.5. The resuspended pellet was then applied to a 70-ml DE-52 anion exchange column (2.5  $\times$  20 cm) equilibrated with buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.5). Preliminary overlay assay showed us that the proteins of interest began to elute at 0.5 M NaCl (data not shown); thus, we discarded proteins that eluted at lower salt concentrations by washing the column with buffer A containing 0.2 M NaCl. Elution of the column was developed with a linear gradient from 0.2 to 1.2 M NaCl in the same buffer as shown in Fig. 1. A single peak of protein was obtained that corresponds to an approximately 31-fold purification over the original homogenate and 8-fold over the previous purification step, as can be seen in Table 1. The pooled peak fractions were concentrated to 40 ml using an Amicon concentrating system (YM 3 membrane) and dialyzed against 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5.

As can be observed in Fig. 2A, at this purification point, the most abundant bands were those with apparent  $M_r$  values of 14, 15.3, 16.1, 34.4, and 38 kDa. We attempted to isolate these proteins by filtration column chromatography but it was difficult to achieve, not only because they have very similar molecular weights, but also because they form aggregates and it was necessary to employ high ionic strength or denaturing agents (such as 4 M guanidine HCl or 3 M urea to effectively deaggregate

them. The presence of reducing agents like 2-mercaptoethanol was ineffective. In order to avoid these problems and the time-consuming column filtration step, we tested whether these proteins conserved their ability to precipitate in the presence of Triton X-100. Results presented in Fig. 2A and in Table 1 indicate that a protein of 14 kDa and a doublet of 15–16 kDa were enriched significantly (161-fold over initial homogenate or 5.1-fold over the previous step) by a second precipitation with Triton X-100. It can also be observed that although proteins of 31–38 kDa were also precipitated, a considerable number of them were lost in the supernatant. All these proteins had good binding activity, demonstrating that they behave like RACKs (see Figs. 3 and 4). In this respect, it is remarkable that the PKC-binding domain of RACKs survives SDS-PAGE, electroblotting, and repetitive washes, suggesting that binding of PKC to them is not easily reversible and that activated PKC recognizes a specific sequence rather than a tertiary structure on RACKs. This is consistent with previous data (9–13) that indicate that the sequence KGDYEKILVALCGGN is critical for RACK binding to PKC. Finally, an aliquot of this resuspended pellet was subjected to 12.5% SDS-poly-

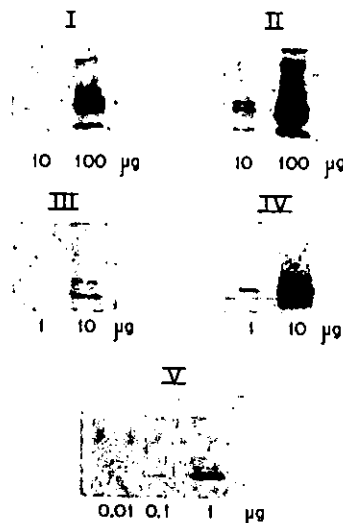


FIG. 4. Minimal amount of protein required in each purification step to show PKC binding activity. Sample protein in the amount indicated was subjected to SDS-PAGE (12.5% gels), blotted, and incubated with PKC in the presence of phosphatidylserine, 1,2-diolein, and  $\text{Ca}^{2+}$  by using the overlay assay. PKC bound was detected with monoclonal antibody against PKC- $\alpha/\beta$  isozymes and developed with alkaline phosphatase-conjugated second antibody. (I) Homogenate, (II) first precipitation with Triton X-100, (III) DEAE-cellulose column chromatography, (IV) second precipitation with Triton X-100; (V) electroeluted material.

TABLE 2  
Amino Acid Analysis of Purified RACKs

Amino acid	Number of residues			
	RACK 14,000	RACK 15,300	RACK 16,100	RACK 34,400
Asx	11.49	9.72	9.40	24.15
Thr	6.21	5.92	8.99	17.45
Ser	9.96	7.28	11.03	19.09
Glx	16.81	17.10	18.15	34.26
Pro	0.00	6.65	8.01	22.31
Gly	n.d.	16.43	17.18	27.70
Ala	32.68	16.90	15.53	37.66
Val	12.05	9.54	9.58	20.83
Met	0.00	0.81	1.06	2.53
Ileu	5.90	7.31	7.29	15.07
Leu	11.16	15.33	13.10	27.72
Tyr	0.00	3.50	4.34	7.93
Phe	0.00	2.68	3.98	10.80
His	3.52	2.44	2.29	4.63
Lys	15.05	12.41	13.92	36.05
Arg	7.47	9.40	8.81	12.80
Total residues	132	143	151	322
<i>pf</i>	5.10	4.99	5.17	6.00

acrylamide gel electrophoresis followed by electroelution of the desired protein (14, 15.3, 16.1, or 34.4 kDa) from gel slices as described under Material and Methods. By these procedures, the 14-kDa RACK was purified about 237-fold from starting material (or 925-fold from the original homogenate) with an overall recovery of about 0.42% (or 0.2% from homogenate) as shown in Fig. 2B and in Table 1. The doublets of 15–16 kDa were purified about 301-fold over starting material (1176 over original extract) with an overall yield of 0.66% (0.31% from homogenate). The proteins were stable and apparently homogeneous since only a single band of each one was detected both by silver staining of gels (Fig. 2B) and by the overlay assay (Figs. 3 and 4).

#### Characterization of Purified Proteins

Samples of each purified protein either that had been blotted onto PVDF membranes or that were still in SDS-PAGE gel slices were subjected to amino-terminal sequencing and amino acid analysis. The 14- and 34.4-kDa proteins failed to sequence at their amino terminus, indicating that they are blocked at this position. This is consistent with the knowledge that about 85% of mammalian proteins have blocked amino termini (22).

We also examined in the four purified RACKs the possible content of carbohydrates using an enzyme immunoassay kit (Boehringer Mannheim), as described under Material and Methods. None of the proteins tested gave positive signal in comparison with a control

glycoprotein (transferrin), indicating that they are not glycoproteins (not shown).

The data obtained from the amino acid analysis of purified RACKs are presented in Table 2. The results do not include Cys or Trp which cannot be quantitated accurately following hydrolysis of gel slices. Asparagine and glutamine are converted to their corresponding acids during hydrolysis and it is not possible, therefore, to discriminate between Asn or Asp and Glu or Gln. In spite of this, the calculated isoelectric point (EMBL Computational Services), considering most Asx and Glx as aspartic and glutamic acids, gave a theoretically acidic *pf* that was in good agreement with that obtained experimentally by analytical isoelectrofocusing (not shown). Additionally, it can be observed that whereas the amino acid compositions of 14- and 34.4-kDa RACKs are very different compared to each other and with respect to the 15- and 16-kDa proteins, the amino acid contents of 15- and 16-kDa proteins are rather similar, except in the amount of serine and threonine residues, suggesting that the first one may derive from the 16-kDa RACK by proteolysis.

In summary, a simple procedure is described here for the purification of proteins that behave as RACKs from rat hepatocytes. This procedure may be helpful for the further characterization of these proteins and the study of their functional role(s).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Guillermo Mendoza-Hernández for assistance with analytical electrofocusing for the *pf* determinations. This

research was supported partially by Grants from CONACyT (1049P-N) and DGAPA (IN218396) to M.R.F.

## REFERENCES

- Kraft, A. S., Anderson, W. B., Cooper, H. L., and 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**, 13193-13196.
- Kiley, S., Schaap, D., Parker, P., Hsieh, L., and Jaken, S. (1990) Protein kinase C heterogeneity in GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> rat pituitary cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 15704-15712.
- Young, S., Parker, P. J., Ullrich, A., and Stabel, S. (1987) Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochem. J.* **244**, 775-779.
- Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**, 484-496.
- Newton, A. C. (1993) Interaction of proteins with lipid head-groups: Lessons from protein kinase C. *Ann. Rev. Biophys.* **22**, 1-25.
- Bell, R. M., and Burns, D. J. (1991) Lipid activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**, 4661-4664.
- Gopalakrishna, R., Barsky, S. H., Thomas, T. P., and Anderson, W. B. (1986) Factors influencing chelator-stable, detergent-extractable, phorbol diester-induced membrane association of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **261**, 16438-16445.
- Wolf, M., and Sahyoun, N. (1986) Protein kinase C and phosphatidylserine bind to Mr 110,000/115,000 polypeptides enriched in cytoskeletal and postsynaptic density preparations. *J. Biol. Chem.* **261**(28), 13327-13332.
- Mochly-Rosen, D., Khaner, H., and Lopez, J. (1991) Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3997-4000.
- Mochly-Rosen, D., Khaner, H., Lopez, J., and Smith, B. L. (1991) Intracellular receptors for activated protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**(23), 14866-14868.
- Robles-Flores, M., and García-Sáinz, J. A. (1993) Activated protein kinase C binds to intracellular receptors in rat hepatocytes. *Biochem. J.* **296**, 467-472.
- Ron, D., Chen, C., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E., and Mochly-Rosen, D. (1994) Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the  $\beta$  subunit of G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 839-843.
- Robles-Flores, M., and García-Sáinz, J. A. (1994) Immunological crossreactivity of G-protein  $\beta$  subunit and receptors for activated C-Kinase. *Biochem. Mol. Int.* **34**, 465-473.
- Ben-Ze'ev, A., Duerr, A., Solomon, F., and Penman, S. (1979) The outer boundary of the cytoskeleton: A lamina derived from plasma membrane proteins. *Cell* **17**, 859-865.
- Kiley, S. C., and Jaken, S. (1990) Activation of  $\alpha$ -protein kinase C leads to association with detergent-insoluble components of GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> cells. *Mol. Endocrinol.* **4**, 59-68.
- Mochly-Rosen, D., Henrich, C. J., Cheever, L., Khaner, H., and Simpson, P. C. (1990) A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Cell Regul.* **1**, 693-706.
- Tanaka, S., Tominaga, M., Yasuda, I., Kishimoto, A., and Nishizuka, Y. (1991) Protein kinase C in rat brain synaptosomes. *FEBS Lett.* **294**, 267-270.
- Smith, B. L., and Mochly-Rosen, D. (1992) Inhibition of protein kinase C function by injection of intracellular receptors for the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 1235-1240.
- Berry, M. N., and Friend, D. A. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* **43**, 506-520.
- Robles-Flores, M., Alcántara-Hernández, R., and García-Sáinz, J. A. (1991) Differences in phorbol ester-induced decrease of the activity of protein kinase C isozymes in rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1094**, 77-84.
- Chapline, C., Ramsay, K., Klauk, T., and Jaken, S. (1993) Interaction cloning of protein kinase C substrates. *J. Biol. Chem.* **268**(10), 6858-6861.
- Fasman, G. D. (Ed.) (1990) The mechanism of N-terminal acetylation in proteins. *Crit. Rev. Biochem.* **18**, 281-325.

calreticulin) antibodies were obtained from Upstate Biotechnology. Alkaline-phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG was from Bio-Rad. PMA, Histone H1-HIIS, phosphatidylserine, Triton X-100 and 1,2-diolein were from Sigma. Protein A-Sepharose and Ro 31-8220 were from Calbiochem; DEAE-cellulose (DE-52) was from Whatman. [ $^{32}$ P]P<sub>i</sub> and [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (6000 Ci/mmol) were from DuPont-NEN.

#### Isolation of rat hepatocytes

Male Wistar rats (200–250 g) fed *ad libitum* were used. Hepatocytes were isolated by the method of Berry and Friend [20].

#### Purification of calreticulin

Calreticulin was purified to homogeneity from the Triton X-100-insoluble fraction of rat hepatocyte homogenates as described by Robles-Flores et al. [18], or from perfused rat livers by the method of Milner et al. [21].

#### Protein sequencing

N-terminal sequence analysis was performed on purified protein electroblotted on PVDF membrane with a model LF3000 Protein Sequencer (Beckman) by using chemicals and software supplied by the manufacturer.

#### Immunoblot analysis

Purified protein (10  $\mu$ g) was separated by SDS/PAGE [10% (w/v) gel] and transblotted to nitrocellulose membrane as described by Towbin et al. [22]. Protein was immunodetected with 1  $\mu$ g/ml rabbit polyclonal anti-(human calreticulin) antibodies and developed with a goat anti-rabbit IgG second antibody coupled to alkaline phosphatase.

#### Partial purification of PKC

PKC was purified as described previously [23]. In brief, hepatocytes were homogenized in ice-cold buffer [20 mM Tris/HCl (pH 7.5)/10 mM EGTA/2 mM EDTA/0.5% (v/v) Triton X-100/50 mM 2-mercaptoethanol/1 mM PMSF/10  $\mu$ g/ml leupeptin/0.1 mg/ml trypsin inhibitor], incubated at 4 °C for 30 min and then centrifuged. Portions of the supernatant were applied to DEAE-cellulose columns that had been equilibrated with column buffer [20 mM Tris/HCl (pH 7.5)/50 mM 2-mercaptoethanol] at 4 °C. After the column had been washed with column buffer, total PKC was eluted with column buffer containing 0.25 M NaCl, 2 mM EDTA and 0.1 mg/ml trypsin inhibitor. The eluate was concentrated with an Amicon device (YM-30 membrane) and used for overlay assays.

#### Determination of PKC binding activity by an overlay assay

PKC binding was determined as described previously [15]. In brief, sample protein was separated by SDS/PAGE [10% (w/v) gel] and transferred to nitrocellulose membranes, which were then blocked with 3% (w/v) BSA. Partly purified and concentrated PKC (100–200 units; one unit is defined as 1 pmol of  $^{32}$ P transferred from [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP to histone/min per mg of protein; the final protein concentration was 0.5 mg/ml) was incubated for 1 h at 30 °C with the nitrocellulose strips in blotting buffer [50 mM Tris/HCl (pH 7.5)/1% poly(ethylene glycol)/0.2 M NaCl] in the presence of phosphatidylserine (20  $\mu$ g/ml), 1,2-diolein (0.8  $\mu$ g/ml) and CaCl<sub>2</sub> (1 mM). The PKC/blotting buffer mixture was removed and the membranes were washed three

times with blotting buffer. Bound PKC was detected with isoenzyme-specific anti-PKC antibodies and goat anti-mouse or goat anti-rabbit IgG second antibodies conjugated with alkaline phosphatase.

#### PKC immune complex kinase assay

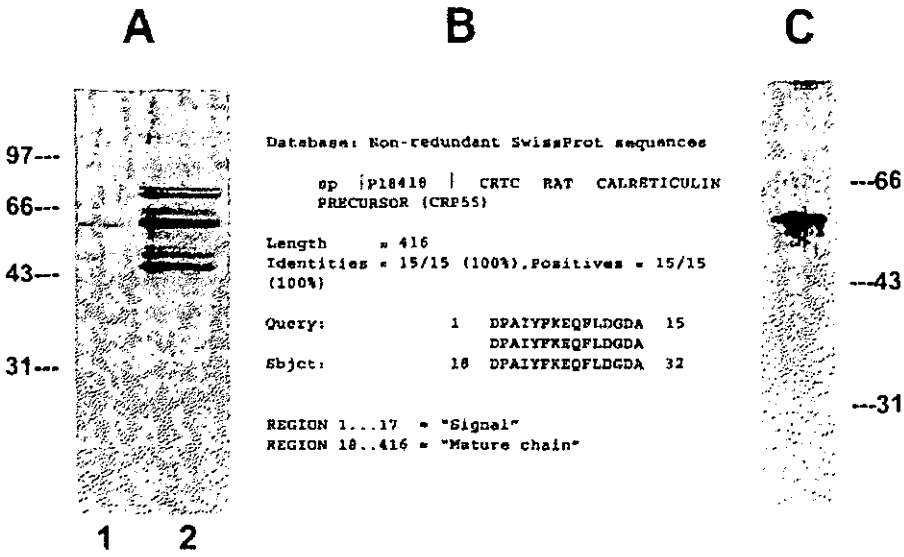
Aliquots (1 ml) of partly purified and concentrated PKC (1 mg/ml) as described above but in the presence of phosphatase inhibitors (10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 11 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate and 0.2 mg/ml phosphoserine) and in the absence of 2-mercaptoethanol were incubated at 4 °C with 1  $\mu$ g/ml isoenzyme-specific PKC antibody for 1 h with gentle shaking. Then 20  $\mu$ l of Protein A-Sepharose [30% (w/v), Calbiochem] was added and incubation continued for 1 h. Immune complexes were then washed three times with buffer A [50 mM Tris/HCl/0.6 M NaCl/1% (v/v) Triton X-100/0.5% (v/v) Nonidet P40 (pH 8.3)] containing 0.1 mg/ml trypsin inhibitor and 1 mM PMSF, and once with kinase buffer [20 mM Tris/HCl (pH 7.5)/10 mM MgCl<sub>2</sub>/0.5 mM CaCl<sub>2</sub>/50 mM 2-mercaptoethanol]. Kinase activity was initiated by resuspending the immunoprecipitates in 50  $\mu$ l of assay mixture, consisting of kinase buffer plus 20  $\mu$ g/ml phosphatidylserine, 0.8  $\mu$ g/ml 1,2-diolein, 10  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (6000 Ci/mmol) and 200  $\mu$ g/ml of protein substrate (histone H1-HIIS or calreticulin). Reactions proceeded for 20 min at 30 °C, then were terminated by the addition of 50  $\mu$ l of SDS/PAGE sample buffer, boiled for 5 min and analysed by SDS/PAGE [12.5% (w/v) gel] and autoradiography.

#### Metabolic labelling and determination of specific phosphorylation

Freshly isolated rat hepatocytes were incubated with 500  $\mu$ Ci/ml [ $^{32}$ P]P<sub>i</sub> (carrier-free, 10 mCi/ml) in phosphate-free Krebs-Ringer buffer supplemented with 10 mM Hepes and 10 mM glucose, pH 7.4, for 90 min at 37 °C with shaking. When Ro 31-8220 (300 nM), PMA (1  $\mu$ M) or adrenaline (epinephrine) (10  $\mu$ M) plus propranolol (10  $\mu$ M) were added, they were added to the incubation medium for the last 5 or 10 min of the incubation as indicated in the figure legends. Cell lysates were prepared and immunoprecipitated with anti-calreticulin antibody (1  $\mu$ g/ml) as described above for PKC and then resolved by SDS/PAGE [12.5% (w/v) gel]. Phosphorylated calreticulin was detected by autoradiography and total protein was determined in the same membrane by immunoblotting with the enhanced chemiluminescence (ECL<sup>®</sup>) Western blotting detection system (Amersham). Autoradiographs were quantified with an Image Densitometer (Bio-Rad GS-670). The total specific phosphorylation was calculated as the ratio of  $^{32}$ P-labelled protein to total protein.

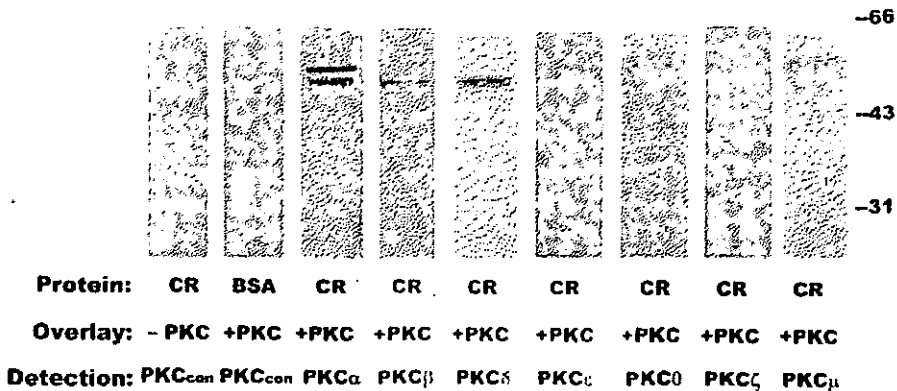
## RESULTS

Previously we reported the existence of at least seven proteins that behave like RACKs in rat hepatocytes [15]. We also developed a rapid and simple purification method of several RACKs, taking advantage of the ability of these proteins to be precipitated with Triton X-100 [18]. The method can be used for the isolation of other proteins that share this property, although not all proteins are precipitated with the same efficiency [18]. To isolate new proteins that behave like RACKs, we employed this protocol to isolate a protein from the Triton-insoluble fraction of rat hepatocyte homogenates by DEAE-cellulose chromatography followed by a second precipitation step with Triton X-100 and by electroelution of the desired protein. The aim of the present study was to identify the isolated PKC-binding protein by N-terminal sequencing and to characterize its interaction with PKC.



**Figure 1** Identification of the purified protein as calreticulin

(A) SDS/PAGE analysis of purified PKC-binding protein. Protein was purified from the Triton X-100-insoluble fraction from rat hepatocyte homogenates by DEAE-cellulose chromatography (lane 2) followed by a second precipitation with Triton X-100 and electroelution of the 60 kDa band (lane 1). Sample protein (10  $\mu$ g) was separated by SDS/PAGE [12.5% (w/v) gel] followed by staining with Coomassie Blue. The positions of molecular mass markers are indicated (in kDa) at the left. (B) Analysis of the purified protein by N-terminal sequencing. The results obtained from a search of the SwissProt database are shown. The one-letter amino acid notation is used. (C) Immunoblot analysis. Purified calreticulin from rat hepatocytes (10  $\mu$ g) was separated by SDS/PAGE [10% (w/v) gel] and transferred to nitrocellulose membrane. Immunoblot analysis was performed with anti-calreticulin polyclonal antibody (Upstate Biotechnology) and developed with alkaline-phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG second antibody. The positions of molecular mass markers are indicated (in kDa) at the right.



**Figure 2** Overlay assay to determine the binding of PKC isoenzymes to purified calreticulin

Samples (12  $\mu$ g) of purified calreticulin (CR) or BSA were subjected to SDS/PAGE [10% (w/v) gel] and blotted to nitrocellulose. PKC binding was determined by incubating the membranes in the absence or presence of partly purified PKC and in the presence of phosphatidylserine, 1,2-dioleiln and  $Ca^{2+}$  for 1 h. The mixture was removed, membranes were washed and bound PKC was detected with isoenzyme-specific anti-PKC antibodies (which in all cases recognized the C-terminus) or with consensus anti-PKC (PKC<sub>con</sub>) (which recognized all isoforms) as indicated. Membranes were developed with an alkaline-phosphatase-conjugated second antibody. The positions of molecular mass markers are indicated (in kDa) at the right. Results are representative of four independent experiments.

As shown in Figure 1(A) (lane 1), we purified to homogeneity protein with an apparent molecular mass of 60 kDa from the Triton X-100-insoluble fraction of rat hepatocytes.

The purified protein was electroblotted to PVDF membranes and subjected to N-terminal sequence analysis. The sequence DPAYFKEQFLDGDGDA was obtained (single-letter codes), which was aligned with non-redundant SwissProt database sequences. To our surprise, we found a perfect match with the N-terminus of the mature chain of rat calcitriol, as shown in Figure 1(B). To confirm the identity of the purified protein, we made use of a commercially available antibody raised against the C-terminus of human calcitriol (peptide QAKDEL), which cross-reacts with rat calcitriol, and performed an immunoblot analysis. As can be seen in Figure 1(C), the antibody specifically recognized the 60 kDa purified protein, clearly confirming its identity as calcitriol. This protein, first characterized as an abundant high-capacity  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein, has been found in every cell (with the exception of erythrocytes) of higher organisms including plants [24] but remarkably, until now, it has not been connected with PKC in any way.

As reported by Murthy et al. [25], the protein has a 17-residue hydrophobic signal sequence at its N-terminus that is removed post-translationally by proteolytic cleavage. The mature protein (residues 18–416) is highly charged and is very acidic, with a pI of 4. It can be divided into at least three structural domains with distinct functional properties: the N, P and C domains [19,26]. The first one-third of the protein is referred to the N domain, within which there are six putative PKC phosphorylation sites, a binding site for rubella virus RNA, a segment that binds to steroid hormone receptor and the cytoplasmic domains of the integrin  $\alpha$  subunits [26].

In agreement with other reports, our results in Figure 1 indicate an apparent molecular mass of 60 kDa of calcitriol by SDS/PAGE, which is much larger than the calculated molecular mass from the primary sequence (46.6 kDa); this can be explained partly by a potential N-glycosylation site and partly by its highly acidic nature. When the protein was purified not by Triton X-100 precipitation but by the method of Milner et al. [21] or by immunoprecipitation, it was occasionally found to form doublets (Figure 2) with molecular masses of 60 and 55 kDa. This has been reported previously by other authors [27], who proposed that the behaviour might be due to the reversible oxidation of cysteine residues. Calcitriol has three cysteine residues, all located in the N-terminal domain, two of which most probably form a disulphide bridge that helps to stabilize this domain. Additionally, it has been reported in some systems that calcitriol exists in two molecular forms: one 'endocalcitriol' of 52 kDa probably bound to  $\alpha$  integrin cytoplasmic tails, and the other 'ectocalcitriol' of 62 kDa anchored to the cell surface [28].

Once we had established the identity of our PKC-binding protein as calcitriol, we next explored its specificity to bind PKC isoforms in the presence of the kinase activators by using the overlay assay. Rat hepatocytes express seven PKC isoenzymes [29], and M. Robles-Flores, H. Hernández-Aguilar and E. Mendón-Huerta, unpublished work) that were co-eluted by DEAE-cellulose chromatography as described in the Experimental section: two conventional isoforms ( $\alpha$  and  $\beta$ II), four novel isoforms ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  and  $\mu$ ) and one atypical isoform ( $\zeta$ ). We made use of this partly purified PKC extract as a probe in the overlay assay to explore which of them calcitriol binds to. Figure 2 shows clearly that all PKC isoenzymes tested bound to purified calcitriol in the presence of phosphatidylserine, 1,2-olein and  $\text{CaCl}_2$ . The interaction was not due to secondary antibody interactions and it was specific for calcitriol because

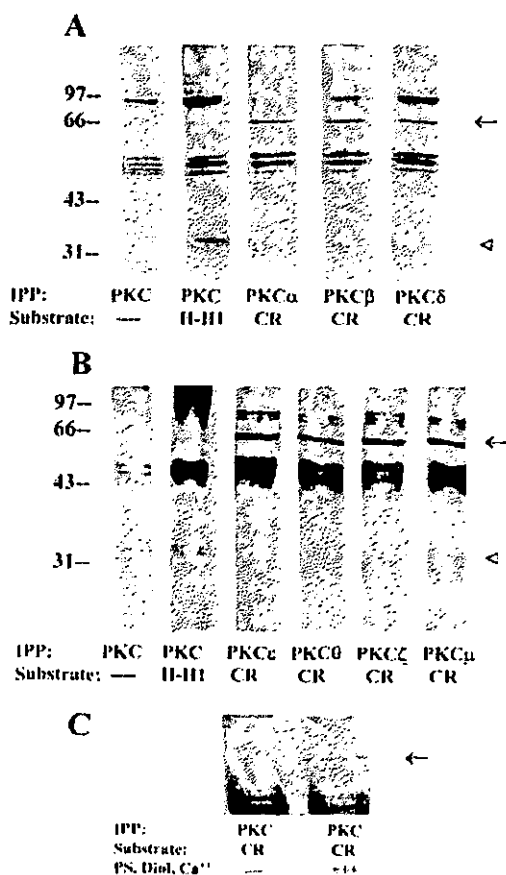


Figure 3 Phosphorylation *in vitro* of calcitriol by immunoprecipitated PKC isoenzymes

(A, B) Kinase activity was measured with the immunoprecipitates (IPP) as described in the Experimental section, in the absence or presence of substrate added to the immunoprecipitates as indicated. The arrows indicate the position of 60 kDa phosphorylated calcitriol (CR) and the open arrowheads the position of 31 kDa phosphorylated histone H1 (H-1). The positions of molecular mass markers are indicated (in kDa) at the left. (C) Kinase activity towards calcitriol was determined with PKC immunoprecipitates in the absence or presence of 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  phosphatidylserine, 0.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  1,2-olein and 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$  as indicated. The arrow marks the position of calcitriol. Results are representative of three independent experiments.

no PKC was detected bound to other proteins such as BSA (see Figure 2) under the conditions employed. Interestingly, whereas PKC $\alpha$  was the only activated isoform that interacted strongly with the two molecular forms of calcitriol (i.e. the 60 and 55 kDa bands), PKC $\beta$ , PKC $\delta$  and PKC $\epsilon$  bound only to the 55 kDa form and PKC $\theta$ , PKC $\zeta$  and PKC $\mu$  interacted preferentially with the 60 kDa form.

To examine whether calcitriol can also be a substrate *in vitro* for some of these PKC isoforms, we used PKC-isoenzyme-specific immune complexes to measure the phosphorylation activity of each towards the typical PKC substrate, histone H-1

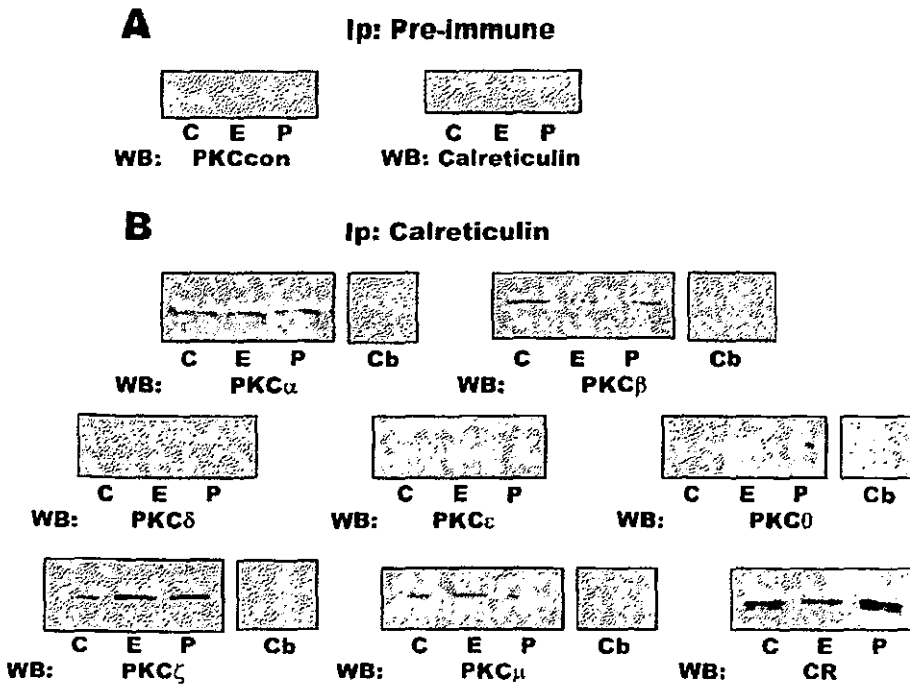


Figure 4 Association of calreticulin and PKC *in vivo*

Freshly isolated rat hepatocytes were incubated for 5 min in the absence (C) or presence of 1  $\mu$ M PMA (P) or 10  $\mu$ M adrenaline plus 10  $\mu$ M propranolol (E) at 37  $^{\circ}$ C with shaking. Proteins were immunoprecipitated (ip) with pre-immune serum (A) or with rabbit anti-calreticulin antibodies (B) from cell lysates of rat hepatocytes containing 1 mg of total cellular protein and subjected to Western blot analysis (WB) with rabbit anti-calreticulin (CR) antibodies, with the anti-PKC consensus antibodies (PKCcon) or isoenzyme-specific antibodies as indicated. In lanes marked Cb, the immunoblot analysis of control precipitates was performed in the presence of the antigen peptide to show the specificity of each antibody. Results are representative of four independent experiments.

I-S (0.2 mg/ml) in comparison with calreticulin (0.2 mg/ml). Figure 3(A) shows the results obtained with PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ /II and PKC $\delta$ , and Figure 3(B) shows those with PKC $\epsilon$ , PKC $\theta$ , PKC $\zeta$  and PKC $\mu$ . In each panel only one negative and one positive control are shown because the patterns obtained for them with each immunoprecipitated isoenzyme were identical. As can be seen, calreticulin was a very good substrate for all PKC isoforms *in vitro*, including PKC $\mu$ , which has been reported to differ in some structural and enzymic features from the other PKC types known so far [30]. Phosphatidylserine, 1,2-dioleiln and  $\text{Ca}^{2+}$  were required PKC cofactors because the phosphorylation of calreticulin was greatly diminished in their absence, as shown in Figure 3(C). Remarkably, histone H1-III5 (0.2 mg/ml), which appeared as a doublet at 31 kDa (Figures 3A and 3B, second lanes) was phosphorylated less efficiently than calreticulin (0.2 mg/ml), which appeared as a prominent band at 60 kDa in gels to which it was added. In addition to the band responding to autophosphorylated PKC, it can also be seen at several proteins that immunoprecipitate with PKC were also phosphorylated. We analysed the immunoprecipitates with anti-PKC antibodies and also with anti-histone antibodies (results not shown) and observed that two bands at 45 and 47 kDa responded to the catalytic fragment of PKC and that the other bands at approx. 31 kDa cross-reacted with histones. The

identity of the band at 43 kDa is unknown. Taken together, these results indicate clearly that calreticulin interacts with all PKC isoenzymes *in vitro*.

To determine whether calreticulin associates with PKC *in vivo* in response to the activation of PKC, we incubated intact rat hepatocytes at 37  $^{\circ}$ C for 5 min in the absence or presence of 1  $\mu$ M PMA to activate PKC directly or in the absence or presence of 10  $\mu$ M adrenaline plus 10  $\mu$ M propranolol ( $\beta$ -adrenergic antagonist) to activate PKC via  $\alpha_1$ -adrenergic receptors. The analysis of calreticulin immunoprecipitates of cell lysates by Western blotting with specific antibodies against each PKC isoenzyme showed that calreticulin immunoprecipitated with PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , PKC $\theta$ , PKC $\zeta$  and PKC $\mu$  but not with PKC $\delta$  and PKC $\epsilon$  (Figure 4B). No immunoreactive bands were observed in the precipitates obtained with non-immune serum (Figure 4A). Interestingly, it seems that calreticulin and PKC isoenzymes are constitutively associated *in vivo*, because they were detected in the immunoprecipitates from both unstimulated and PMA- or adrenaline-stimulated cells.

To examine whether the activation of PKC induces the phosphorylation of calreticulin in intact cells, freshly isolated rat hepatocytes were metabolically labelled with [ $^{32}$ P]P $_i$  and stimulated with 1  $\mu$ M PMA or 10  $\mu$ M adrenaline plus 10  $\mu$ M propranolol in the absence or presence of the selective and potent

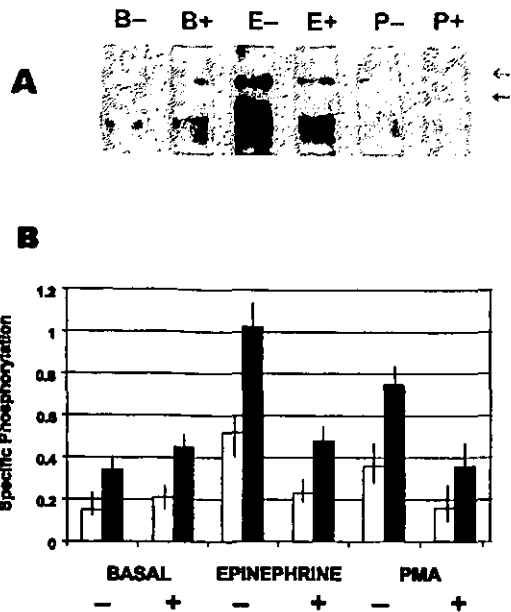


Figure 5 Induction of phosphorylation of calreticulin by activation of PKC *in vivo*

Freshly isolated rat hepatocytes were metabolically labelled with [ $^{32}$ P]P<sub>i</sub> for a total period of 90 min. Vehicle (-) or Ro 31-8220 (+) were added 20 minutes before the end of the incubation period and, in addition to the basal (B) samples, either PMA (P) or adrenaline (epinephrine) plus propranolol (E) was also present during the last 5 min of incubation, as described in the Experimental section. Calreticulin was immunoprecipitated from the corresponding cell lysates, subjected to SDS/PAGE [10% (w/v) gel], transferred to nitrocellulose, dried and autoradiographed. The determination of protein content was done after autoradiography in the same membrane by immunoblotting. An example of phosphorylated 60 kDa and 52 kDa calreticulin forms (arrows) is shown in the autoradiogram (A). (B) Autoradiograms and immunoblots were quantified with an image densitometer and the specific phosphorylation was determined as the ratio of phosphorylated protein to the total protein content. Values plotted are means  $\pm$  S.E.M. for three experiments with different cell preparations. Filled columns show values for the 60 kDa calreticulin; open columns show those for the 52 kDa calreticulin.

PKC-specific inhibitor Ro 31-8220. Cell lysates from control and treated cells were immunoprecipitated with antibodies directed against calreticulin and then resolved by SDS/PAGE [10% (w/v) gel]; the gels were subjected to autoradiography. The results shown in Figure 5 demonstrated that there was a significant increase in the phosphorylation of both the 60 kDa and the 52 kDa calreticulin forms during treatment with PMA or with adrenaline plus propranolol. Such stimulations were abolished by the pretreatment of labelled cells with 300 nM Ro 31-8220. Taken together, these results demonstrate that calreticulin and several PKC isoforms interact *in vivo* and suggest that calreticulin function might be regulated by PKC phosphorylation.

## DISCUSSION

In this study we have purified a PKC-binding protein with an apparent molecular mass of 55–60 kDa and identified it as calreticulin. Furthermore, we provide evidence that this protein and PKC interact together both *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*,

calreticulin was capable of binding to any activated PKC isoform tested (Figure 2); however, in intact cells it seemed to be constitutively associated with PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , PKC $\delta$ , PKC $\zeta$  and PKC $\mu$  but not with PKC $\theta$  and PKC $\epsilon$  (Figure 4), suggesting that they operate as signalling complexes.

Remarkably, it was also found that calreticulin is phosphorylated in response to PMA or  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation of PKC *in vivo* and that it is an excellent substrate for all PKC isoforms *in vitro*, even better than histone H1-III. Consistent with this is the fact that the PROSITE pattern motifs program used to search the calreticulin primary sequence for PKC putative phosphorylation sites gave six possible ones. In this regard, it is noteworthy that all putative PKC phosphorylation sites found were all located in the calreticulin N-domain, which has been involved in diverse protein-protein interactions [26]. The physiological effects that derive from calreticulin phosphorylation by PKC or from their interaction remain to be elucidated.

The fact that calreticulin was a PKC substrate does not exclude the possibility that it might also interact with PKC through a domain located outside the PKC catalytic site: GAP-43 and AKAP-79 are examples of PKC-binding proteins that are phosphorylated by PKC and are also capable of interacting with the kinase through other domains [10,31].

Calreticulin is an ancient and highly conserved protein. The similarities between calreticulins from diverse species, particularly in domains of the protein that are functionally important, suggest that it has had important biological functions for over 350 million years. That notwithstanding, the precise biological functions of calreticulin have been the subject of much debate and are only now becoming more clearly understood. Since the description of its Ca<sup>2+</sup>-binding properties, calreticulin has been characterized as a molecular chaperone, an extracellular lectin, an intracellular mediator of integrin function, an inhibitor of steroid-hormone-regulated gene expression and a C1q-binding protein [19,26,28]. Nevertheless, until now, and in spite of the scope and variety of its many assigned functions, it had not been connected with the key signal transducer, PKC. In this respect, the findings presented here were unexpected and emphasize that the characterization of the calreticulin-PKC interaction might shed light on undefined physiological roles of these two key proteins.

Consistent with our results, there is experimental evidence that indicates some similarities, both in function and in structure, between calreticulin and the RACKs. So far, two RACKs, RACK1 and  $\beta$ -COP, have been cloned [12,32]. Both RACKs have been shown to be members of the WD-40 family of regulatory proteins, which are made up of four to eight repeating units containing a conserved core of 27–45 residues bracketed by two characteristic dipeptide sequences, GH (Gly-His) and WD (Trp-Asp). Additionally, RACK1 is a member of the  $\beta$  subunit of the G-protein superfamily, composed exclusively of seven WD-40 repeats forming an overall  $\beta$ -propeller structure [16]. Several WD-repeat proteins belong to the structural group of ' $\beta$ -propeller' polypeptides; however, the previously known propeller proteins have no obvious sequence similarity to WD-repeat proteins but have an almost identical fold. Interestingly, the N-domain of calreticulin, with also no obvious sequence similarity to WD-40, is predicted to form eight anti-parallel  $\beta$ -sheets [26]. Within this N-domain are located the putative PKC phosphorylation sites, a segment that binds to steroid hormone receptor and the cytoplasmic domains of integrin  $\alpha$  subunits.

Integrins have been proposed as crucial  $\alpha\beta$  heterodimeric transmembrane proteins linking the cytoskeleton to the extracellular matrix. The adhesion-dependent clustering of integrins leads to the activation of non-receptor tyrosine kinase focal



adhesion kinase and the Ras/mitogen-activated-protein-kinase pathway, the stimulation of inositol lipid metabolism, an increase in intracellular  $[Ca^{2+}]$  and pH and the activation of PKC [33,34]. A direct association of RACK1 with the integrin  $\beta$  subunit cytoplasmic domain through its WD repeats five to seven has recently been reported, suggesting a direct linkage between integrins and PKC through RACK1 and further implicating PKC in integrin-mediated cell signalling [35]. As mentioned above, calreticulin has also been involved in integrin function and cell spreading: the functional knock-out of calreticulin by introducing anti-calreticulin antibody into cells or by gene disruption interferes with integrin-dependent cell adhesion [36]. Moreover, it has been reported that a cell-surface complex immunocaptured from B16 mouse melanoma cells contains  $\alpha 6 \beta 1$  integrin, two molecular forms of calreticulin and KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) docking protein [28]; one of the calreticulins, 'endocalreticulin', a 52 kDa protein, is probably bound to  $\alpha$  integrin cytoplasmic tails; the other calreticulin, 'ectocalreticulin', a 62 kDa protein, is probably anchored to surface KDEL receptor and co-operates with  $\alpha 6 \beta 1$  integrin, triggering cell spreading [28].

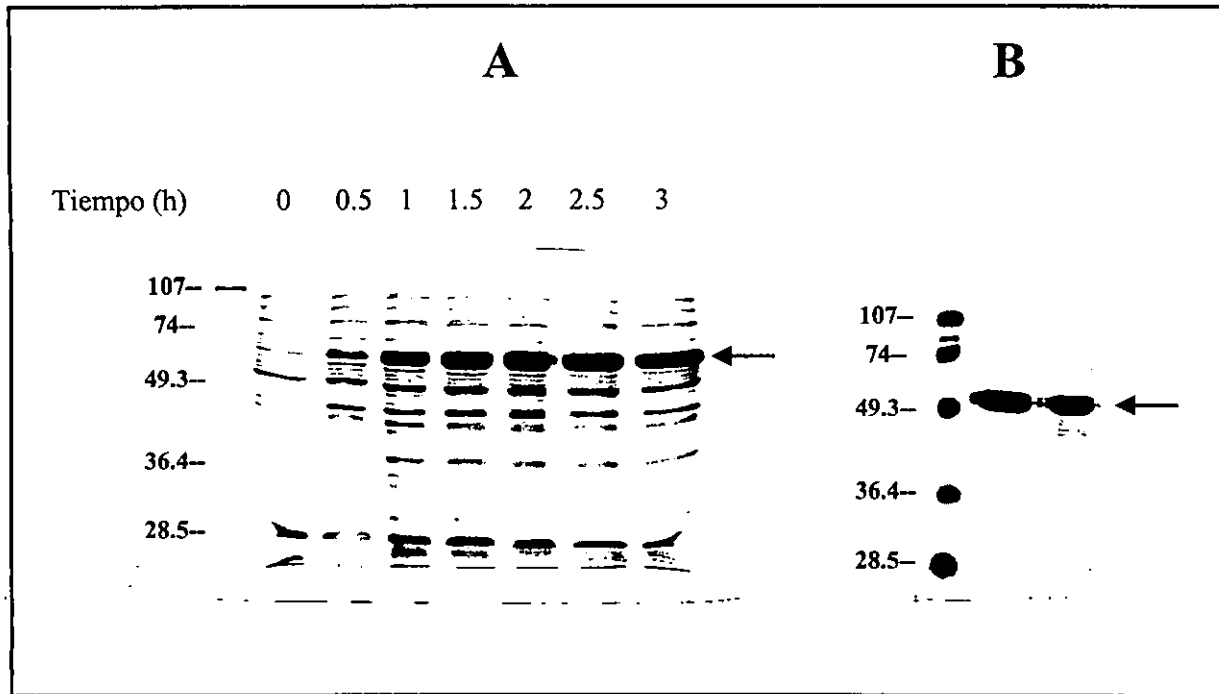
In view of the evidence presented here, it is tempting to speculate that the presence of multiple WD domains for putative protein-protein interaction might allow RACKs to function as scaffold proteins to recruit PKC and other proteins such as calreticulin to the membrane at the site of the membrane cytoskeletal junction to mediate important cellular functions.

This research was partly supported by grants from CONACYT (1049P-N) and DGAPA (IN20629B).

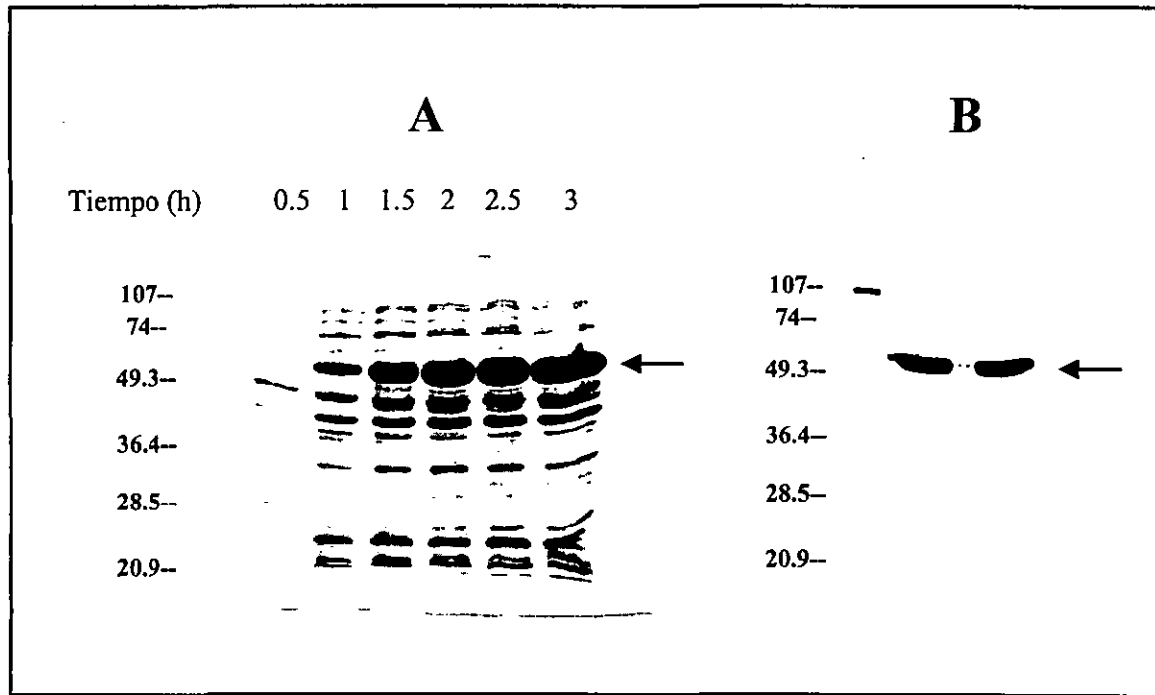
## REFERENCES

- Shoji, M., Girard, P. R., Mazzei, G. J., Vogler, W. R. and Kuo, J. F. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**, 1144-1149
- Parker, P. J., Kour, G., Marais, R. M., Mitchell, F., Pears, C., Schaap, D. and Stabel, S. (1989) *Mol. Cell. Endocrinol.* **55**, 1-11
- Wolf, M. and Sahyoun, N. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 13327-13332
- Kiley, S. C. and Jaken, S. (1990) *Mol. Endocrinol.* **4**, 59-68
- Misra, U. K. and Sahyoun, N. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**, 750-758
- Disatnik, M. H., Winnier, A. R., Mochly-Rosen, D. and Artega, C. L. (1994) *Cell Growth Differ.* **5**, 873-880
- Bonch, A. and Tenenhouse, H. S. (1988) *Biochem. Cell. Biol.* **68**, 262-272
- Mochly-Rosen, D. (1995) *Science* **268**, 247-251
- Newton, A. C. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 806-809
- Klauck, T. M., Faux, M. C., Labudda, K., Langeberg, L. K., Jaken, S. and Scott, J. D. (1996) *Science* **271**, 1589-1592
- Chapline, C., Colton, J., Tobin, H., Hulmes, J., Crabb, J. and Jaken, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 19482-19489
- Yao, L., Kawakami, Y. and Kawakami, T. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 9175-9179
- Mochly-Rosen, D., Khaner, H. and Lopez, J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 3997-4000
- Mochly-Rosen, D., Khaner, H., Lopez, J. and Smith, B. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 14868-14868
- Robles-Flores, M. and García-Sáinz, J. A. (1993) *Biochem. J.* **298**, 467-472
- Ron, D., Chen, C., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E. and Mochly-Rosen, D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 839-843
- Robles-Flores, M. and García-Sáinz, J. A. (1994) *Biochem. Mol. Biol. Int.* **34**, 465-473
- Robles-Flores, M., Rendón-Huerta, E. and García-Sáinz, J. A. (1997) *Protein Express. Purif.* **10**, 32-37
- Krause, K.-H. and Michalak, M. (1997) *Cell* **88**, 439-443
- Berry, M. N. and Friend, D. A. (1969) *J. Cell Biol.* **43**, 505-520
- Milner, R. E., Bakshi, S., Shemanko, C., Carpenter, M. R., Smilie, R., Vance, J. E., Opas, M. and Michalak, M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 7155-7165
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354
- Robles-Flores, M., Alcántara-Hernández, R. and García-Sáinz, J. A. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1094**, 77-84
- Heilman, C., Spamer, C., Leberer, E., Gerok, W. and Michalak, M. (1993) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **193**, 611-616
- Murthy, K. K., Bamville, D., Srikanth, C. B., Carrier, F., Holmes, C., Bell, A. and Patel, Y. C. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 4933
- Coppolino, M. G. and Dedhar, S. (1998) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 553-558
- Houen, G. and Koch, C. (1994) *Acta Chem. Scand.* **48**, 905-911
- Zhu, Q., Zatlina, P., White, T. and Tanzer, M. L. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 354-358
- Tobias, E. S., Rozengurt, E., Connell, J. M. C. and Houslay, M. D. (1997) *Biochem. J.* **328**, 545-551
- Gschwendt, M., Johannes, F. J., Kittstein, W. and Marks, F. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 20742-20746
- Dekker, L. V. and Parker, P. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12747-12753
- Csukai, M., Chen, C.-H., De Matteis, M. A. and Mochly-Rosen, D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 29200-29206
- Clark, E. A. and Brugge, J. S. (1995) *Science* **268**, 233-239
- Latrenik, R. M. and Yamada, K. M. (1996) *J. Cell Biochem.* **61**, 543-553
- Libental, J. and Chang, D. D. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 2379-2383
- Coppolino, G. G., Goodside, M. J., Demaux, N., Grinstein, S., St-Arnaud, R. and Dedhar, S. (1997) *Nature (London)* **388**, 843-846

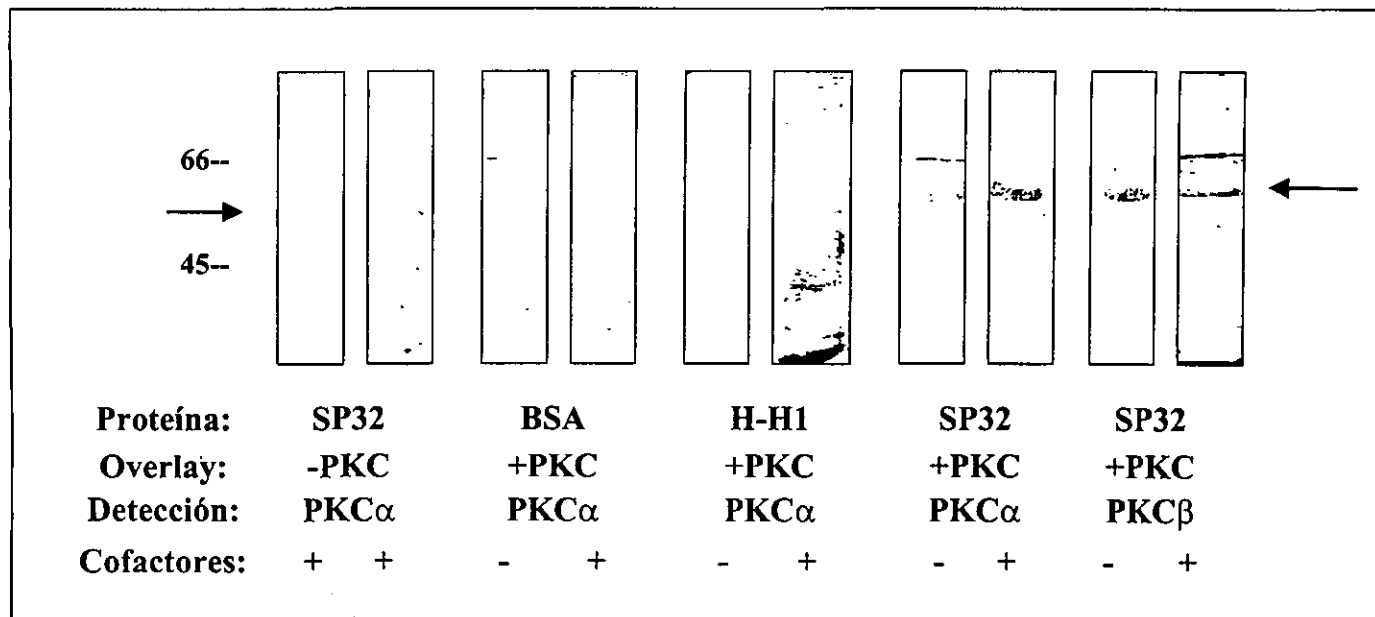
Received 4 January 1999/17 August 1999; accepted 21 September 1999



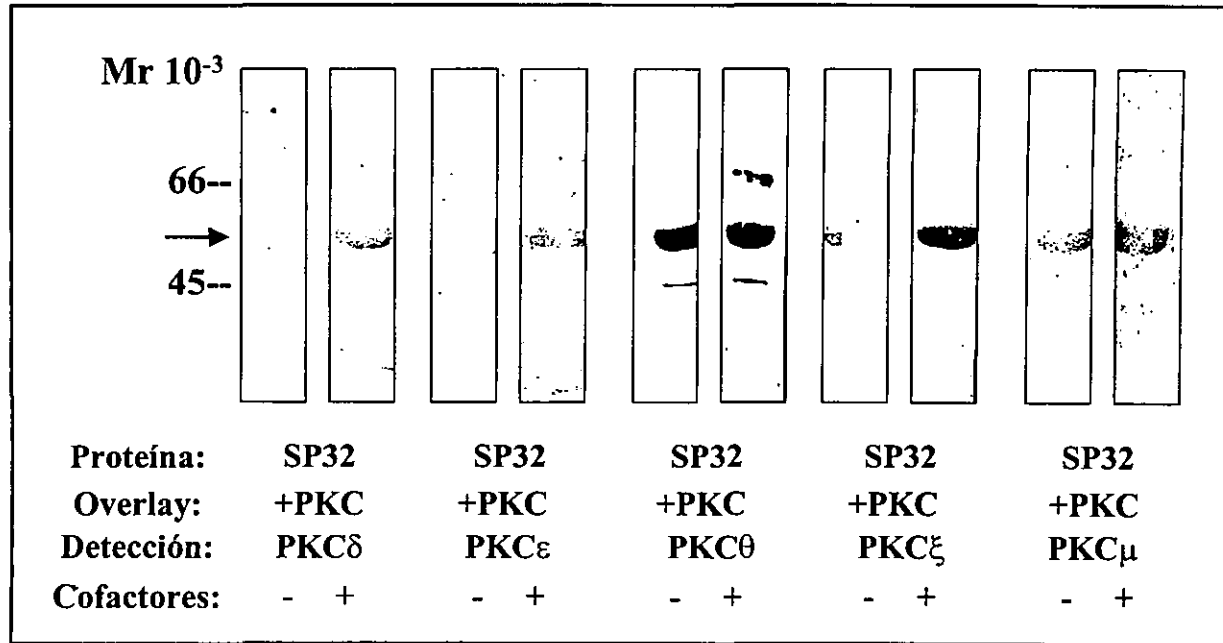
**Figura 10.** A) Curso temporal de la expresión de la proteína de 32 Kda asociada al factor de splicing SF2, después de inducir a la cepa DH5 $\alpha$  con 0.4 mM de IPTG. La proteína es visualizada como una proteína de fusión a GST de aproximadamente 55 Kda (indicada por una flecha). B) Proteína de fusión purificada por afinidad con una columna de glutatión-agarosa. Los estándares de peso molecular están indicados (Kda).



**Figura 11.** A) Curso temporal de la expresión de la proteína de 32 Kda asociada al factor de splicing SF2, después de inducir a la cepa BL21 con 0.4 mM de IPTG. La proteína es visualizada como una proteína de fusión a GST de aproximadamente 55 Kda (indicada por una flecha). B) Proteína de fusión SP32-GST expresada a las 2.5 h después de la inducción con IPTG y purificada a través de una columna de agarosa acoplada a glutatión. Los estándares de peso molecular están indicados (Kda).



**Figura 12a. Ensayo de overlay para determinar la unión de isoformas de PKC a la proteína de fusión SP32-GST.** Las muestras de SP32-GST, BSA e Histona H1 (H-H1) fueron sometidas a SDS-PAGE al 10% y transferidas a nitrocelulosa. La unión de la PKC se determinó incubando las membranas en presencia o en ausencia de PKC parcialmente purificada y en presencia o en ausencia de PS, 1,2-dioleína y  $\text{Ca}^{2+}$  durante 1 hora. La PKC unida a la CRT (flecha) se detectó con anticuerpos anti-PKC isoforma específicos. Los estándares de peso molecular se indican (Kda).



**Figura 12b. Ensayo de overlay para determinar la unión de isoformas de PKC a la proteína de fusión SP32-GST.** Las muestras de SP32-GST fueron sometidas a SDS-PAGE al 10% y transferidas a nitrocelulosa. La unión de la PKC se determinó incubando las membranas en presencia o en ausencia de PKC parcialmente purificada y en presencia o en ausencia de PS, 1,2-dioleína y Ca<sup>2+</sup> durante 1 hora. La PKC unida a la SP32-GST (indicada por una flecha) fue detectada con anticuerpos anti-PKC isoforma específicos.

## IX. DISCUSION

### **Purificación y caracterización de las proteínas que unen PKC.**

El objetivo de la primera parte del trabajo, se centró en encontrar un método de purificación que nos permitiera obtener de manera simple y rápida a las proteínas que habían sido detectadas previamente en hepatocitos de rata, como receptores de proteína cinasa C activa (RACKs) (4). Estas proteínas se habían encontrado solamente en la fracción insoluble en Tritón X-100, al igual que otras identificadas en corazón de rata (50). Se ha reportado que la fracción particulada insoluble en detergente de las células está enriquecida con varios elementos del citoesqueleto (64). Por otro lado, hay evidencias que muestran que una vez que se activa la PKC, esta es capaz de interactuar con elementos del citoesqueleto asociados con la fracción particulada de diferentes tipos celulares (33-35), lo que sugiere que las RACKs identificadas pueden formar parte de las proteínas del citoesqueleto. De acuerdo a esta evidencia, se utilizó la fracción insoluble en Tritón X-100 de los homogenados de hepatocitos como material de partida para la purificación de las RACKs de interés.

Los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis utilizando el método reportado en *Prot. Expres. Pur.* (1997) 10: 32-37 muestran en forma pura y enriquecida, a por lo menos tres proteínas de bajo peso molecular que unen PKC activa, de 14, 15.3 y 16.1 Kda respectivamente. A diferencia del único método reportado antes para la purificación de proteínas RACKs a partir de una fracción de cerebro de rata adulta (62), el cual consiste de una precipitación con sulfato de amonio y cromatografías sobre fenil-sefarosa y de intercambio catiónico, el método que nosotros utilizamos resultó ser más sencillo ya que con sólo una cromatografía de intercambio aniónico, dos precipitaciones con detergente y una electroelución, obteníamos a las proteínas puras y en forma estable. Como se muestra en la tabla I del trabajo *Prot. Expres. Pur.* (1997) 10: 32-37, el grado de purificación de las proteínas de bajo peso molecular evaluado por overlay y por SDS-PAGE teñidos con la técnica de nitrato de plata, fue bastante bueno, pues la proteína de 14 Kda se purificó aproximadamente 237 veces a partir del material de inicio (o 925 veces a partir del homogenado inicial) y las proteínas de 15.3 y 16.1 Kda 301 veces a partir del material de

inicio (o 1176 veces a partir del extracto original). Además, como se observa en la figura 4 (V) de este mismo trabajo, la unión de la proteína de 14 Kda a proteína cinasa C todavía es claramente evidenciada con sólo 1 µg de la proteína pura.

Las proteínas purificadas se comportaban como RACKS, ya que solamente unían la forma activa de la PKC. Es importante hacer notar que esta unión es fuerte, ya que la presencia de la cinasa interaccionando con las proteínas se observa aún después de haber sometido a las proteínas a SDS-PAGE y de haberlas transferido a membranas de nitrocelulosa con lavados repetidos utilizando un detergente moderadamente fuerte (polietilenglicol 1%). Esto indica que la unión no es fácilmente reversible y que la PKC está reconociendo una secuencia específica y no una estructura terciaria de la proteína.

En lo que se refiere a la caracterización de las proteínas purificadas por nuestro método (trabajo Prot. Expres. Pur. (1997) 10: 32-37) los resultados obtenidos en el análisis de aminoácidos mostraron que la mayoría de éstas tenían un pI ácido. Esto era compatible con los resultados que esperábamos ya que la columna que utilizamos era un intercambiador aniónico (DEAE-celulosa) con la cual eluimos a las proteínas utilizando un amortiguador con alta fuerza iónica (éstas comenzaban a eluir a 0.5M de NaCl), lo que significa que la interacción entre las proteínas y la resina era muy fuerte debido al carácter ácido de éstas. Sin embargo, al someter a las proteínas al análisis del PROPSEARCH, se observó que la identidad de las proteínas de bajo peso molecular (las cuales se enriquecían considerablemente después de la segunda precipitación con el detergente) fué del 100 % para la histona H4, en el caso de la proteína de 14 Kda, y del 90 y 100 % para la histona H2B en el caso de las proteínas de 15.3 y 16.1 Kda respectivamente. Estos resultados fueron confirmados por la secuencia del extremo amino correspondiente. De acuerdo a las características del método, el haber obtenido a proteínas básicas fue un hecho sorprendente para nosotros. Para explicar estos resultados, realizamos lecturas a 260 nm de cada alícuota eluída en paralelo con las lecturas correspondientes a 280 nm. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de ácidos nucleicos en todas las fracciones purificadas, por lo que la presencia de proteínas básicas puede explicarse por el hecho de que las histonas fueron co-purificadas en nuestro sistema por su fuerte interacción con los ácidos nucleicos. Por otro lado, no fue una novedad el encontrar que las histonas interaccionaban con la PKC, ya que éstas proteínas son consideradas de los mejores sustratos de la proteína cinasa C por lo que es de esperarse que interaccionen fuertemente con ella.

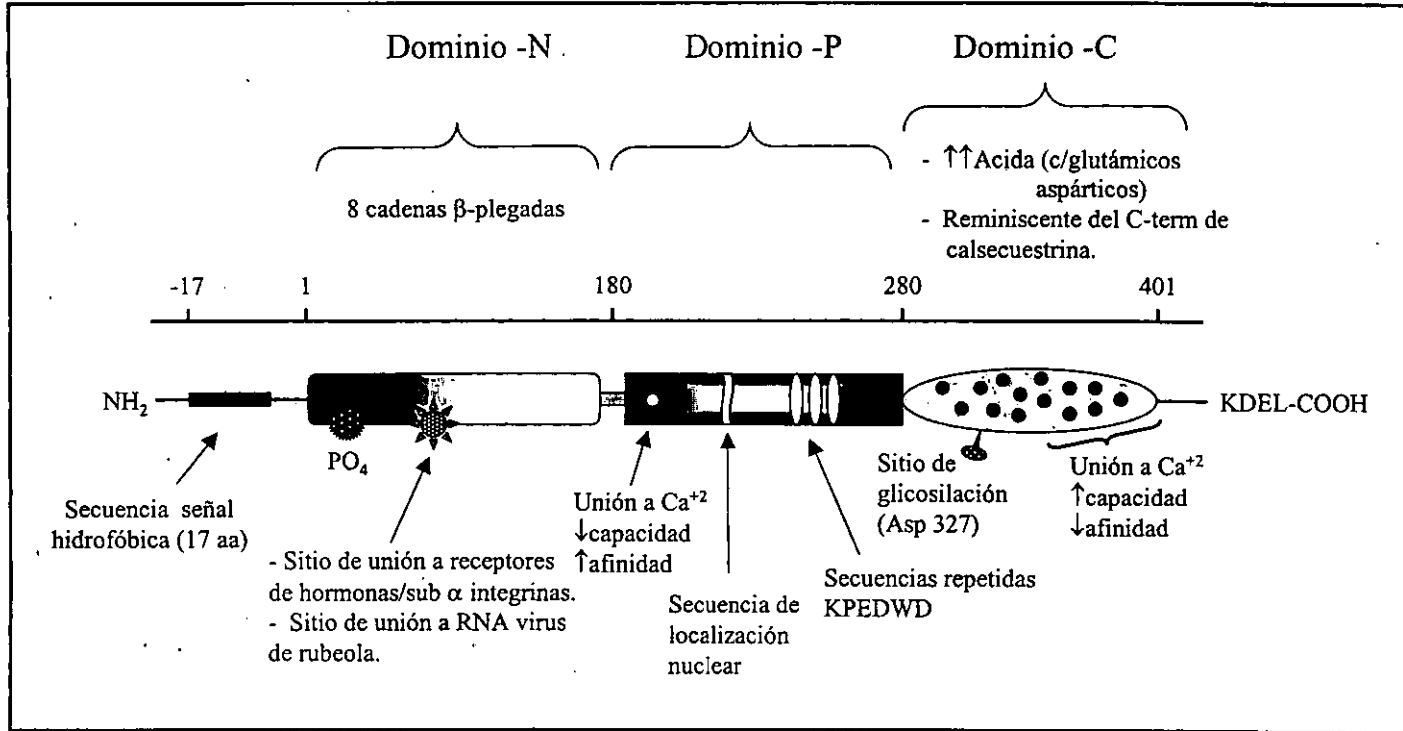
Las proteínas de mayor peso molecular, obtenidas después de aplicar el gradiente semilineal a la columna de DEAE-celulosa (de 32, 34, 38 y 60 Kda), también se analizaron de acuerdo a su composición de aminoácidos y por secuenciación de su extremo amino. La proteína de 32 Kda fue identificada como una proteína que está asociada al factor de splicing "SF2". Esta ha sido reportada como una glucoproteína ubicua en los tejidos, que forma homodímeros de 68 Kda y tiene un *pI* de 4.04. Interesantemente, tiene un sitio de fosforilación para PKC y cinco para caseína cinasa, además, posee sitios potenciales de glucosilación y un ácido hialurónico con gran afinidad. La proteína de 34 kDa tuvo una identidad considerable con proteínas como la aldolasa, exonucleasas y desoxirribonucleasas. La aldolasa ha sido reportada como un buen sustrato de la PKC $\mu$  (65) por lo que podría tratarse de una proteína que es sustrato de esta isoforma de PKC. En lo que se refiere a las exonucleasas y desoxirribonucleasas, se sabe que éstas proteínas se encuentran prácticamente en compartimentos nucleares, lo que apoyaría evidencias que muestran la presencia de la PKC en el núcleo sugiriendo una probable interacción de estas proteínas con isoformas específicas de la cinasa C. La proteína de 38 Kda no pudo ser identificada ya que su extremo amino se encontraba bloqueado y la proteína de 60 Kda fue identificada como calreticulina. Esta proteína es altamente conservada a través de la evolución y que a la fecha se le han encontrado múltiples funciones como el de almacenar Ca<sup>2+</sup>, funcionar como chaperona, regular mecanismos de adhesión mediados por integrinas o modificar la expresión de genes por unión a receptores de hormonas nucleares, entre otras.

La identificación de las proteínas de 32 y 60 Kda constituyó un hallazgo, ya que hasta la fecha, no había sido reportada alguna interacción de la PKC con estas proteínas.

### **Obtención de Calreticulina pura para ensayos posteriores.**

La calreticulina (CRT) es una proteína multifuncional que une calcio con alta afinidad, la cual ha sido implicada en el almacenaje de calcio en el retículo endoplásmico y sarcoplásmico. Esta proteína tiene una secuencia señal hidrofóbica de 17 residuos de aminoácidos en su extremo amino (figura 13). Esta secuencia es removida postraduccionalmente por proteólisis (66). Contiene además una secuencia señal de retención en el retículo endoplásmico, así como una secuencia señal de localización nuclear. La CRT está dividida en tres dominios estructurales cada uno con características funcionales





**Figura 13. Estructura de la calreticulina humana en la cual se muestran sus tres dominios, N, P y C, cada uno con sus características más sobresalientes.**

distintas. Estos son denominados dominios N, P y C (67, 68). El dominio N posee seis sitios de fosforilación para PKC, un sitio de unión para el RNA del virus de la rubeola, un segmento que se une a receptores para hormonas esteroideas y se une también a dominios citoplásmicos de las subunidades  $\alpha$  de integrinas (67). La CRT tiene tres residuos de cisteína localizados también en el dominio N, dos de los cuales muy probablemente forman un puente disulfuro que ayuda a estabilizar a este dominio.

En concordancia con otros reportes, la proteína que nosotros obtuvimos por el método de precipitación con Tritón X-100 y electroelución, tuvo un peso molecular de aproximadamente 60 kDa visualizada en SDS-PAGE al 10%, mucho mayor que la masa molecular calculada a partir de su secuencia primaria (67, 69) ya que, la calreticulina en su forma madura contiene 400 aminoácidos, por lo que la masa molecular correspondiente sería de 46.6 kDa. Esto puede ser explicado por su naturaleza fuertemente ácida (ya que posee un  $pI$  de 4.7) que provoca una migración anómala, y por otra parte la presencia de un sitio potencial de glucosilación, puede provocar también que la proteína migre con un peso molecular aparentemente mayor.

Cuando llevamos a cabo la purificación con el método reportado por Milner et al, obtuvimos además de la proteína de 60 kDa, una proteína de menor peso molecular (de 55 kDa), ambas migrando como un doblete. Esto ha sido reportado también por otros autores los cuales han propuesto que se deba a la oxidación reversible de residuos de cisteína presentes en el dominio N pues en un trabajo, utilizando CRT pura a partir de placenta, se encontró que ocasionalmente ésta formaba dímeros; cuando la CRT se sometía a un tratamiento con ácido yodoacético, previo al análisis por SDS-PAGE, aparecía una banda de menor peso molecular (70). Otra explicación que apoya la presencia de dos bandas es el hallazgo de dos formas moleculares de CRT: una llamada endocalreticulina (de 52Kda) que probablemente se une a los tallos citoplásmicos de las  $\alpha$  integrinas y la otra llamada ectocalreticulina (de 62 Kda) anclada a la superficie celular (71). Las dos proteínas obtenidas en el método de purificación reportado por Milner et al pueden ser, muy probablemente, estas dos formas moleculares de CRT.

### Caracterización de la interacción CRT-PKC activa y fosforilación de CRT por PKC.

En este trabajo demostramos que la calreticulina une a la forma activa de la PKC. Sin embargo, fue de gran interés estudiar si la interacción CRT-PKC se llevaba a cabo con todas las isoformas de PKC expresadas en nuestro sistema o si esta interacción era específica para alguna isoforma de PKC.

Nuestros resultados (descritos en el trabajo Biochem. J. (1999) 344: 469-475) demuestran que la PKC interacciona con la CRT en ensayos *in vitro* y en condiciones *in vivo*. Los ensayos *in vitro* demostraron que la CRT es capaz de unir a todas las isoformas de PKC expresadas, a diferencia de los experimentos *in vivo* en los cuales la CRT se asoció a cinco ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\theta$ ,  $\xi$  y  $\mu$ ) de las siete isoformas de PKC expresadas en el hepatocito de rata. Con lo anterior, se puede decir que la CRT no lleva a cabo su unión de acuerdo a una subfamilia de PKCs sino que lo hace de acuerdo a cada isoforma pues tanto las PKCs convencionales como las nuevas o atípicas son capaces de interaccionar con la CRT. El hecho de que la CRT no interacciona con todas las isoformas de PKC en condiciones *in vivo* puede sugerir lo siguiente:

- (a) Que la formación del complejo CRT-PKC depende de la redistribución de cada isoforma de PKC, es decir, las isoformas con las cuales interaccionó la CRT se encontraban en los mismos lugares específicos de la célula en los que se localiza a esta proteína (retículo endoplásmico, membrana y núcleo). Esto está de acuerdo con reportes en los cuales se ha encontrado la presencia de isoformas de PKC en estos sitios.
- (b) Que la interacción de la CRT con estas isoformas esté dando lugar a la formación de complejos de señalización comunes y por último,
- (c) El hecho de que en experimentos de fosforilación *in vivo* se encuentre en células control (en ausencia de los activadores de la PKC) a la CRT asociada a la PKC, hace pensar que la CRT y la cinasa son proteínas que están interactuando constitutivamente aún cuando la proteína cinasa C se encuentre sólo en su estado catalíticamente competente.

Por otro lado, en lo que se refiere a la fosforilación de la CRT por PKC, se demostró que la CRT es fosforilada cuando se activa a la PKC en células *in vivo*, vía receptores  $\alpha_1$

adrenérgicos o directamente con PMA. Aún cuando no podemos excluir la posibilidad de que la CRT está siendo fosforilada directamente por otra proteína en condiciones *in vivo*, el hecho de que la fosforilación se vea considerablemente disminuida en presencia de un inhibidor específico para la cinasa C, el Ro 31-8220, hace pensar que la PKC está implicada directamente en el aumento de su fosforilación. Por otro lado, es importante hacer notar que la CRT fue un excelente sustrato para todas las isoformas de PKC *in vitro*, aún mejor que la propia histona H1-III. Para explicar esta fosforilación, se analizó la secuencia primaria de la CRT en un programa de cómputo que detecta secuencias probables de fosforilación (PROSITE). Este análisis mostró que la CRT posee seis sitios probables de fosforilación para PKC. Cabe mencionar que estas secuencias están localizadas en el dominio N de la CRT (figura 14), el cual se ha reportado que es el dominio más conservado entre todas las calreticulinas clonadas (72) y que está involucrado en las interacciones proteína-proteína (73). Algunos reportes han mostrado que el dominio N se une a una secuencia de la subunidad  $\alpha$  de integrinas (74) e interacciona con un dominio de unión a DNA de receptores de glucocorticoides (73, 75). Los resultados obtenidos del análisis con el programa PROSITE mostraron que de acuerdo a la secuencia consenso reportada para los sitios de fosforilación por PKC (en la cual el residuo de serina/treonina a fosforilar debe de estar flanqueado a ambos lados por aminoácidos básicos separados a una distancia de 0-2 aminoácidos), las secuencias encontradas en el dominio N de la CRT no cumplen estrictamente con estas características, sin embargo, si se toma en cuenta que la distancia de la separación de los aminoácidos básicos sea de tres, entonces la CRT posee seis sitios probables de fosforilación por PKC (figura 14, secuencias marcadas con rectángulos). Con base en lo anterior, tomando en cuenta que la CRT es un excelente sustrato para PKC, se puede decir que aún cuando los sitios de fosforilación presentes en la CRT, no cumplen estrictamente con el orden de aminoácidos básicos alrededor de los residuos a ser fosforilados, es lógico pensar que alguna o algunas de estas secuencias sean reconocidas y fosforiladas por PKC.

De acuerdo a los resultados de interacción y fosforilación obtenidos en este trabajo, se puede decir que la calreticulina forma parte del amplio grupo de proteínas que, hasta la fecha, han sido reportadas que interaccionan con la PKC y a su vez son sustratos de ella, pues no se puede excluir la posibilidad de que ésta interacción se lleve a cabo a través de algún sitio localizado fuera del sitio activo. Algunas proteínas, como la GAP-43 y AKAP-

1											M	L	L	S	V	P	L	L	L	G	L	L	G	L	A	A	A	17			
18	D	P	A	I	Y	F	K	E	Q	F	L	D	G	D	A	W	T	N	R	W	V	E	S	K	H	K	S	D	F	G	47
48	K	F	V	L	S	S	G	K	F	Y	G	D	Q	E	K	D	K	G	L	O	T	S	O	D	A	R	F	Y	A	L	77
78	S	A	R	F	E	P	F	S	N	K	G	Q	T	L	V	V	Q	F	T	V	K	H	E	Q	N	I	D	C	G	G	107
108	G	Y	V	K	L	F	P	G	G	L	D	Q	K	D	M	H	G	D	S	E	Y	N	I	M	F	G	P	D	I	C	137
138	G	P	G	T	K	K	V	H	V	I	F	N	Y	K	G	K	N	D	L	I	N	K	D	I	R	C	K	D	D	E	167
168	F	T	H	L	Y	T	L	I	V	R	P	D	N	T	Y	E	V	K	I	D	N	S	Q	V	E	S	G	S	L	E	197

**Figura 14. Secuencia de aminoácidos del dominio N de la calreticulina.** En esta secuencia se muestran los seis posibles sitios de fosforilación por PKC (en rectángulos) predichos por el programa PROSITE, los sitios consenso de fosforilación por PKC reportados a la fecha (secuencias subrayadas) y los tres residuos de cisteína en los cuales se puede llevar a cabo un puente disulfuro (en rombos).

79 son ejemplos de sustratos de PKC que pueden unirse a ella a través de un sitio distinto al sitio activo (44, 74).

La CRT es una proteína ampliamente conservada en los seres vivos desde plantas hasta mamíferos, lo que sugiere que tenga una función trascendental en las células. Tiene un 90 % de aminoácidos idénticos en humano, conejo, rata y ratón. Además estas calreticulinas tienen un alto nivel de homología con secuencias de cDNA de la calreticulina de *Drosophila*, y de otras especies distantes como *Onchocerca volvulus* y *Schistosoma mansoni* (72, 76). También ha sido identificada recientemente en plantas y el cDNA de plantas que producen flores, como *Arabidopsis thaliana*, se usó para determinar si la secuencia de aminoácidos predicha para la CRT en estas especies contiene características estructurales similares a aquellas encontradas en animales (67).

La calreticulina fue inicialmente caracterizada como una proteína de retículo endoplásmico y sarcoplásmico. Sin embargo, a la fecha se le han designado otras funciones como el de ser una chaperona molecular, una lectina extracelular, un mediador intracelular de las funciones de integrinas, un inhibidor de la expresión de genes regulados por hormonas esteroides y una proteína de unión al factor C1q del complemento. Se ha mostrado que también se asocia con proteínas en el citoplasma, el núcleo y compartimentos celulares (76, 74). Cabe mencionar, que lo más interesante es que, a pesar de que se sabe que la calreticulina posee todas esas funciones, se desconoce el papel fisiológico preciso de esta proteína, y a la fecha todavía no existían reportes en la literatura en los que se mencionara que tuviera alguna relación con la proteína cinasa C. Desde este punto de vista, los resultados obtenidos en nuestro trabajo, constituyen un hallazgo y abren un nuevo campo de estudio para determinar si la interacción CRT-PKC puede ejercer alguna influencia sobre las funciones fisiológicas de estas dos proteínas.

Otro punto importante para analizar es el de poder considerar a la calreticulina un RACK. Estructuralmente hablando, el análisis de la secuencia primaria de la calreticulina ha mostrado que su dominio N, en el cual se encuentran los sitios de fosforilación por la cinasa C, contiene una estructura globular con ocho cadenas  $\beta$ -plegada. Esta estructura asemeja a la conformación adoptada por proteínas que poseen secuencias repetidas WD-40. Dentro de este grupo de proteínas se encuentran dos RACKs clonadas: RACK1 y  $\beta$ -COP. Estas proteínas poseen de 4 a 8 unidades repetidas con un centro conservado de 27 a 45 residuos flanqueados por dos secuencias repetidas características, GH (Gly-His) y WD (Trp-Asp). El dominio N de la CRT no posee las secuencias observadas en las RACKs; sin

embargo, la estructura tridimensional adoptada por las cadenas  $\beta$  es muy semejante a la adoptada por proteínas del grupo WD-40, por lo que se puede considerar parte de ellas.

Por otro lado, en lo que se refiere a su función, se ha demostrado que la calreticulina regula los mecanismos de adhesión mediados por integrinas (77). En experimentos de knock-out del gene para calreticulina en los cuales no se lleva a cabo la interacción con las integrinas, la función de adhesión a proteínas de matriz extracelular y el flujo de calcio disparado por integrinas a fuentes extracelulares se ve alterado (76). La regulación de las integrinas por CRT, puede llevarse a cabo directa e indirectamente. Directamente, se une a la integrina y estabiliza su conformación como parte de un "complejo de adhesión temprano". Esta interacción promueve un influjo de calcio y vías de señalamiento posteriores que permiten el desarrollo de sitios de adhesión completa. Indirectamente, se ha propuesto que la calreticulina incrementa la expresión de vinculina y como consecuencia modula la función de integrinas (78).

Se ha propuesto que las integrinas (proteínas transmembranales  $\alpha\beta$  heterodiméricas) son cruciales para la comunicación del citoesqueleto y la matriz extracelular. El grupo de integrinas dependiente de los procesos de adhesión lleva a la activación de una tirosina cinasa de adhesión focal citosólica y a una vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos, a la estimulación del metabolismo de lípidos de inositol y a un incremento en las concentraciones de calcio y del pH intracelular y por lo tanto a la activación de la PKC (79, 80). También, se ha reportado una asociación directa de RACK1 con el dominio citoplásmico de la subunidad  $\beta$  de integrinas a través de sus cinco a siete dominios WD, lo que sugiere una interacción directa entre integrinas y PKC a través de RACK1 implicando a la PKC en los procesos de señalamiento celular mediados por integrinas (81). Como se mencionó anteriormente, la CRT ha estado involucrada en la función de integrinas y en su distribución en la célula. Se ha reportado que un complejo de superficie celular inmunocapturado a partir de células de melanoma B16 de ratón contiene a la integrina  $\alpha\beta 1$ , a dos formas moleculares de CRT y a la proteína de anclaje KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu)(71). Una de las calreticulinas, "la endocalreticulina", es una proteína de 52 Kda que está probablemente unida a los tallos citoplásmicos de las integrinas  $\alpha$  y la otra calreticulina, "la ectocalreticulina", es una proteína de 62 Kda que está probablemente anclada a la superficie de KDEL y coopera con la integrina  $\alpha\beta 1$  disparando su distribución en la célula. Estos estudios sugieren una relación directa entre integrinas y PKC a través de RACKS y CRT.

Por último, cabe mencionar que una característica clave de las proteínas RACKs es que han sido descritas como proteínas que unen solamente la forma activa de la PKC y que no son sustratos de ella. De acuerdo a esto, la CRT no podría ser considerada estrictamente un RACK, ya que aunque también une la forma activa de la cinasa, ella es un buen sustrato de la PKC. Por lo anterior la CRT es una de las proteínas que hasta la fecha han sido identificadas como proteínas que interaccionan con la cinasa C activa y que son sustratos de ella.

### **Expresión de la proteína de 32 Kda asociada al factor de splicing SF2 y su interacción con PKC.**

La proteína de 32 Kda (SP32) es una proteína ubicua en todos los tejidos cuyas diferencias entre especies están confinadas a su extremo amino. Esta proteína tiene un carácter ácido debido a su  $pI$  el cual es de 4.04 y tiene tres sitios potenciales de glucosilación. El encontrar que ésta proteína interaccionara con PKC fue también una sorpresa pues a la fecha no existe en la literatura ningún reporte que indique esta interacción. La proteína SP32 posee algunas características comunes con CRT, como son que ambas pertenecen a la familia de proteínas WD-40, que ambas unen al factor C1q del complemento y que ambas tienen sitios de fosforilación para PKC, entre otras. Con base en esto, fue de gran interés estudiar si la interacción con la PKC tenía las mismas características que con CRT.

Dado que podíamos obtener mayor cantidad de esta proteína pura expresándola en bacterias, en esta parte del trabajo, se encontró que utilizando dos cepas de bacterias distintas (BL21 y DH5 $\alpha$ ) se obtuvo un máximo de expresión de la proteína a las 2.5 h después de haber estimulado con 0.4 mM de IPTG. Sin embargo, la cepa BL21 expresó el doble de la cantidad de proteína (4.3 mg/ml), a diferencia de la cepa DH5 $\alpha$  (2.1 mg/ml) (figuras 10 y 11), por lo que la proteína expresada en esta cepa fue utilizada para los experimentos de interacción con PKC. Posteriormente, la proteína se obtuvo en forma pura como una proteína de fusión a GST a partir de una columna de glutatión-sefarosa (figura 11b, resultados no publicados).

En lo que se refiere a la interacción con la PKC, los resultados obtenidos en los ensayos de overlay demostraron que la proteína SP32 es capaz de interaccionar con las siete isoformas de PKC expresadas en los hepatocitos: sin embargo, algunas isoformas unieron a



la proteína SP32 independientemente de la presencia de los cofactores específicos de la cinasa. Estas isoformas fueron las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\theta$ ,  $\xi$  y  $\mu$ . Interesantemente las isoformas  $\theta$  y  $\xi$  mostraron una unión más fuerte a diferencia de las demás. Las isoformas  $\delta$  y  $\epsilon$  fueron las únicas isoformas que unieron a la SP32 de una manera dependiente de cofactores de la cinasa. Estos resultados sugieren que algunas de las isoformas de PKC no requieren estar en su forma activa para interactuar con la proteína SP32, a diferencia de CRT en la cual la interacción es totalmente dependiente de los cofactores de la cinasa.

## X. CONCLUSIONES.

- El método descrito en el trabajo *Prot. Expres. Pur. (1997) 10: 32-37* permitió la purificación de proteínas de bajo peso molecular que interaccionan con la PKC activa.
- De las proteínas purificadas por gradiente semilineal, se detectaron dos con características muy interesantes. La proteína de 32 Kda asociada a un splicing factor "SF2" y la calreticulina de 60 Kda.
- Estas proteínas fueron obtenidas a homogeneidad. La proteína de 32 Kda se obtuvo en forma pura como una proteína de fusión a GST expresada en bacterias y la calreticulina se purificó por métodos bioquímicos utilizando una columna de intercambio aniónico y precipitaciones con sales de amonio.
- Los ensayos *in vitro* de interacción de la CRT con la PKC, mostraron que la CRT es capaz de unir a todas las isoformas de PKC en presencia de sus cofactores. La isoforma de PKC  $\alpha$  unió fuertemente a las dos formas de CRT (de 55 y 60 Kda). Las isoformas  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  unieron principalmente a la forma de 55 Kda y las isoformas  $\theta$ ,  $\xi$  y  $\mu$  a la forma de 60 Kda. Los ensayos *in vivo* mostraron que la CRT interacciona con las isoformas de PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\theta$ ,  $\xi$  y  $\mu$ . Esta asociación se lleva a cabo tanto en células control como en células en las cuales se activa a la PKC, por lo que se considera que la CRT está constitutivamente asociada con estas isoformas *in vivo*.
- Los ensayos de fosforilación *in vitro* de la CRT por PKC mostraron que la CRT es un buen sustrato de todas las isoformas expresadas en los hepatocitos y esta fosforilación es dependiente de los cofactores de la cinasa. Los experimentos de fosforilación realizados con células intactas mostraron un incremento en la fosforilación de ambas formas de CRT por PKC.

- Los ensayos *in vitro* de interacción utilizando a la proteína de 32 Kda mostraron que las isoformas de PKC  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\mu$  unieron a esta proteína de manera independiente de cofactores de la cinasa, las isoformas  $\theta$  y  $\xi$  mostraron una unión mas fuerte y tambien independiente de los cofactores y las isoformas  $\delta$  y  $\epsilon$  unieron a la PKC pero de manera dependiente de sus cofactores.
- Los ensayos *in vitro* de fosforilación utilizando a la proteína de 32 Kda aparentemente muestran que esta proteína no es sustrato de la PKC, ya que ninguna isoforma de PKC es capaz de fosforilarla.

**XI. BIBLIOGRAFÍA**

1. Nishizuka, Y. (1992) *Science* 258:607-614.
2. Kraft, AS, Anderson, WB, Cooper, HL y Sando, JJ. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 13186-13193.
3. Dessey, G, Iovcheva, C, Tasheva, B y Goldman, R. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2994-2998.
4. Robles-Flores, M y García-Sainz, JA. (1993) *Biochem. J.* 296: 467-472.
5. Takai, Y, Kishimoto, A., Inove, M y Nishizuka, Y. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 7603-7609
6. Inove, M., Kishimoto, A., Takai, Y. y Nishizuka, Y. (1977) *J. Biol. Chem.* 252:7610-7616.
7. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T. y Nishizuka, Y. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:3692-3695.
8. Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:2273-2276.
9. Nishizuka, Y. (1986) *Science.* 233:305-312.
10. Van Biesen, T, Luttrell, MI, Hawes, BE y Lefkowitz, RJ. (1996) *Endocrinol. Rev.* 17: 698-714.
11. Gutkind, JS. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 1839-1842.
12. Luttrell, L, Daaka, Y y Lefkowitz J. (1999) *Cur. Opin. Cell Biol.* 11:177-183.
13. Dekker, L.V., Palmer, R.H. y Parker, P.J. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:396.
14. Mochly-Rosen, D y Gordon, AS. (1998) *FASEB J.* 12: 35-42.
15. Newton, A.C. (1995) *Curr Biol* 5:973-976.
16. Mosior, M. y Newton, A.C. (1996) *Biochemistry* 35:1612-1623.
17. Sutton, R.B., Davletov, B.A., Berghuis, A.M., Sudhof, T.C. y Spang, S.R. (1995) *Cell.* 80:929-938.
18. Grobler, J.A., Essen, L-O, Williams, R. y Hurley, J.H. (1996) *Nat. Struct. Biol.* 3:788-795.
19. Essen, L-O, Perisic, O., Cheung, R., Katan, M. y Williams, R.L. (1996) *Nature* 380:595-602.
20. Kuo-Ping Huang (1989) *TINS* 12(11): 425-432.

21. Borner, C., Filipuzzi, I., Wartmann, M., Eppenberger, U. y Fabbro, D. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:13902-13909.
22. Chau, M.M., Hoy, W., Johnson, J., Graham, L.K., Lee, M. H., Chen, C. S. y Newton, A.C. (1998) *Curr Biol* 8:1069-77.
23. Le Good, J.A., Ziegler, W.H., Parekh, D.B., Alessi, D.R., Cohen, P. y Parker, P.J. (1998) 281:2042-5. Keranen, L.M., Dutil, E.M. y Newton, A.C. (1995) *Curr. Biol.* 5:1394-1403.
24. Keranen, L.M., Dutil, E.M. y Newton, A.C. (1995) *Curr. Biol.* 5:1394-1403.
25. Orr, J.W. y Newton, A.C. (1994) *J. Biol. Chem.* 269(44):27715-27718.
26. Zhang, J., Wang, L., Schwartz, J., Bond, R.W. y Bishop, W.R. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:19578-19584.
27. Bornancin, F. y Parker, P.J. (1996) *Curr. Biol.* 6:1114-1123.
28. Li, W., Mischak, H., Yu, J-C, Wang, L-M, Mushinski, J.F., Heidaran, M.A. y Pierce, J.H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269(4): 2349-2352.
29. Newton, A.C. (1997) *Curr. Opinion Cell Biol.* 9:161-167.
30. Igarashi, K., Kaneda, M., Yamaji, A., Saido, T., Kikkawa, U., Ono, Y., Inoue, K. y Umeda, M. (1995) 270:29075-29078.
31. Szallasi, Z., Bogi, K., Gohari, S., Biro, T., Acs, P. y Blumberg, P.M. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 18299-18301.
32. Bell, RM (1986) *Cell* 45: 631-639.
33. Zalewski, PD, Forbes, IJ, Valente, L, Apostolous, S y Hurst, Np. (1988) *Biochem. Pharmacol.* 37: 1415-1417.
34. Jaken, S, Leach, K y Klauck, T. (1989) *J. Cell Biol.* 109: 697-704.
35. Kiley, SC y Jaken, S (1990) *Mol Endocrinol.* 4: 59-68.
36. Mineo, Ch, Ying, Y-S, Chapline, C, Jaken, S and Anderson, GW. (1998) *J. Cell Biol.* 141 (3): 601-610.
37. Mochly-Rosen, D., Henrich, C.J., Cheever, L., Khaner, H., y Simpson, P. C. (1990) *Mol. Biol. Cell* 1:693-706.
38. Disatnik, M.H., Buraggi, G. y Mochly-Rosen, D. (1994) *Exp. Cell Res.* 210:287-297.
39. Sakai, N., K. Sasaki, N. Ikegaki, Y. Shirai y N. Saito. (1997) *J. Cell Biol.* 139:1465-1476.
40. Hyatt, S.I., Klauck, T. y Jaken, S. (1990) *Mol. Carcinogen.* 3:45-53.

41. Passalacqua, M, Patrone, M, Sparatore, B, Melloni, E y Pontremoli, S. (1999) *Biochem. J.* 337: 113-118.
42. Ohmori, S., Y. Shirai, N. Sakai, M. Fujii, H. Konishi, U. Kikkawa y N. Saito. (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18(9): 5263-5271.
43. Gopalakrishna, R, Barsky, SH, Thomas, TP y Anderson, WB. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:16438-16445.
44. Klauck, TM, Faux, MC, Labudda, K, Langeberg, LK, Jaken, S y Scott, JD. (1996) *Science* 271: 1589-1592.
45. Kiley, SC y Jaken, S (1990) *Cell Mol. Endocrinol.* 4: 59-68.
46. Blackshear, PJ. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 1501-1504.
47. Faux, MC, Rollins, E.N, Edwards, AS, Langeberg, LK, Newton, AC y Scott, JD. (1999) *Biochem. J.* 343: 443-452.
48. Izumi, Y, Hirai, S-i, Tamai, Y, Fujise-Matsuka, A, Nishimura, Y y Ohno, S. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 7381-7389.
49. Yao, L, Suzuki, H, Ozawa, K, Deng, J, Lehel, C, Fucamachi, H, Anderson, W, Kawakami, T. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 13033-13039.
50. Mochly-Rosen, D, Khaner, H y Lopez, J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3997-4000.
51. Mochly-Rosen, D, Khaner, H, Lopez, J y Smith, BL. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 14866-14868.
52. Ron, D, Chen, C, Caldwell, J, Jamieson, L, Orr, E, y Mochly-Rosen, D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 839-843.
53. Csukai, M, Chen, CH, De Matteis, MA y Mochly-Rosen, D. (1997) *J Biol. Chem.* 272: 29200-29206.
54. Robles-Flores M y García-Sáinz, JA (1994) *Biochem, Mol. Biol. Int.* 34: 465-473.
55. Prekeris, R, Mayhew, MW, Cooper, JB y Terrian, DM. (1996) *J. Cell Biol.* 132: 77-90.
56. Sossin, WS y Schwartz, JH. (1993) *Trends. Biochem. Sci.* 18: 207-208.
57. Jhonson, JA, Gray, MO, Chen, C -H y Mochly-Rosen, D (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 24962-24966.
58. Chapline, C, Cotton, J, Tobin, H, Hulmes, J, Crabb, J y Jaken, S. (1998) *J. Biol. Chem.* 273 (31): 19412-19419.

59. Fowler, L, Dong, L, Bowes, RC 3<sup>rd</sup>, van de Water, B, Stevens, JL and Jaken, S. (1998) *Cell Growth. Differ.* 9 (2): 177-184.
60. Kuroda, S, Tokunaga, C, Kiyohara, Y, Higuchi, O, Konishi, IL, Mizuno, K, Gill, GN y Kikkawa, U. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 31029-31032.
61. Konishi, H, Matsuzaki, H, Tanaka, M, Ono, Y, Tokunaga, C, Kuroda, S y Kikkawa, U. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7639-7643.
62. Smith, BL y Mochly-Rosen, D. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188: 1235-1240.
63. Milner, RE, Baksh, S, Shemanko, C, Carpenter, MR, Smillie, R, Vance, JE, Opas, M y Michalak, M. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 7155-7165.
64. Ben-Ze'ev, A, Duerr, A, Solomon, F y Penman, S. (1979) *Cell* 17: 859-865.
65. Gschwendt, M, Johannes, FJ, Kittstein, W y Marks, F. (1997) *J. Biol. Chem.* 272 (33): 20742-6.
66. Murthy, KK, Banville, D, Srikant, CB, Carrier, F, Holmes, C, Bell, A y Patel, YC (1990) *Nucleic Acids Res.* 18: 4933.
67. Coppolino, MG y Dedhar, S. (1998) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30: 553-558.
68. Krause, K-H y Michalak, M (1997) *Cell* 88: 439-443.
69. Ostwal, TJ y MacLennan, DH. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 974-979.
70. Houen G. y Koch, C. (1994) *Acta Chem. Scandinavica.* 48: 905-911.
71. Zhu, Q, Zelinka, P, White, T y Tanzer, ML (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232: 354-358.
72. Michalak, M RE, Milner, K, Burns, K, y Opas, M. (1992) *Biochem. J.* 285: 681-692.
73. Burns, K, Duggan, B, Atkinson, EA, Fanulski, KS, Nemer, M, Bleackley RC, Michalak, M. (1994) *Nature* 367: 467-480.
74. Dedhar, S. (1994) *Trends Biochem. Sci.* 19: 269-271.
75. Berg, J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 6513-6515.
76. Dekker, LV y Parker, PJ (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 12747-12753.
77. Coppolino, MG, Woodside, MJ, Demaurex, N, St-Arnaud, S, St-Arnaud, R y Dedhar, S. (1997) 386: 843-847.
78. Opas, M, Szewezenko-Pawlikowski, M, Jass, GS, Michalak, N y Michalak, M. (1996) 135: 1913-1923.
79. Clark, EA y Brugge, JS (1995) *Science* 268: 233-239.

80. Latrenie, RM y Yamada KM (1995) *J. Cell. Biochem.* 61: 543-553.
81. Lillental, J. Y Chang, DD. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 2379- 2383.