

00 562
4
2ej

"EFECTO DEL FORBOL MIRISTATO ACETATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA
PROTEINA CINASA C EN HEPATOCITOS DE RATA"

MARTHA ROBLES FLORES

INFORME DE TRABAJO

Presentado a la División de Estudios de Posgrado de la

FACULTAD DE QUIMICA

de la

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Como requisito para obtener el grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS

(BIOQUIMICA)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cd. Universitaria, 1988.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

I.- INTRODUCCION	1
Sistema de Fosfoinosítidos-calcio y de generación de diacilglicerol.	
A. Transducción de la Señal	3
B. Propagación de la Señal: Acción de la proteína cinasa C	9
Activación de la proteína cinasa C	11
Localización de la proteína cinasa C	14
Sustratos e inhibidores de la PKC	15
Funciones de la PKC	17
II.- OBJETIVOS	20
III.- MATERIALES Y METODOS	21
Sustancias utilizadas	21
Animales	21
Aislamiento de hepatocitos	21
Incubación con PMA	22
Purificación de la PKC a partir de hepatocitos de rata	22
Determinación de la actividad de la PKC	23
IV.- RESULTADOS	25
V.- DISCUSION	37
VI.- CONCLUSIONES	45
VII.- BIBLIOGRAFIA	46

I.- INTRODUCCION

Una de las características esenciales de los seres vivos es la de poder comunicarse con su medio ambiente. En la mayoría de los organismos superiores, existen 2 sistemas principales de comunicación entre las células: el sistema hormonal o endócrino y el sistema nervioso. La interrelación entre estos dos sistemas es tan estrecha, que se puede considerar como uno solo: el sistema neuroendócrino. En ambos sistemas, las células se comunican unas con las otras por medio de mensajeros químicos.

En la forma de comunicación endócrina, una glándula libera hormonas que pueden actuar sobre células u órganos localizados en cualquier parte del organismo. Las glándulas endócrinas secretan hormonas al torrente sanguíneo; cada célula blanco está equipada con receptores, los cuales son proteínas capaces de reconocer específicamente a las moléculas de hormona destinadas a actuar en esa célula. Las hormonas que interactúan como receptores localizadas en la membrana plasmática no necesitan entrar a la célula para producir su efecto en ella, sino que pueden transmitir su mensaje generando otras señales en el interior de la célula, las cuales actúan como segundos mensajeros. Así, el componente inicial en la transmisión de señales es la molécula de receptor al unirse a su ligando en la superficie de la célula; éste transmite la información a través de la membrana plasmática hacia el interior de la célula por medio de una familia de proteínas "G": proteínas de membrana que no pueden activarse a menos que unan GTP; Las proteínas G activan a su vez a una enzima "amplificadora" que convierte a moléculas precursoras en segundos

Sistema de Fosfoinosítidos-Calcio, y de generación de diacylglycerol.

A) Transducción de la señal.

La primera descripción que se hizo del calcio como mensajero intracelular fue dada en 1883 cuando el inglés Syney Ringer observó que el tejido muscular que estaba examinando no se contraía si utilizaba agua destilada para la preparación del medio de cultivo en vez de agua del grifo. Pronto descubrió que el ingrediente faltante, presente en el agua de Londres, era el calcio.

Más tarde, en 1953, Mabel y Lowell Hokin, observaron que la administración de acetilcolina a células secretoras pancreáticas, aumentaba la incorporación de fosfato radiactivo a fosfatidilinositol, uno de los fosfolípidos constituyentes de la membrana celular. Sin embargo, no fue sino hasta 1975 en que Robert Michell percibió claramente la asociación de este fenómeno con los cambios en el calcio citosólico, proponiendo que el recambio de fosfatidilinositol estaba involucrado en el mecanismo de transducción utilizando calcio (3). De 1975 a la fecha, el avance en el conocimiento sobre este tema ha sido muy grande, y sigue evolucionando con gran rapidez. La visión actual que se tiene de este fenómeno es la siguiente:

"La activación de los receptores acoplados a este sistema provoca la activación de una proteína "G" (llamada Gp). Esta proteína no ha sido aislada, ni siquiera caracterizada a profundidad, las evidencias de su existencia son las siguientes: 1) la afinidad para agonistas de los receptores acoplados a este sistema es modulada por nucleótidos de guanina. 2) el flúor,

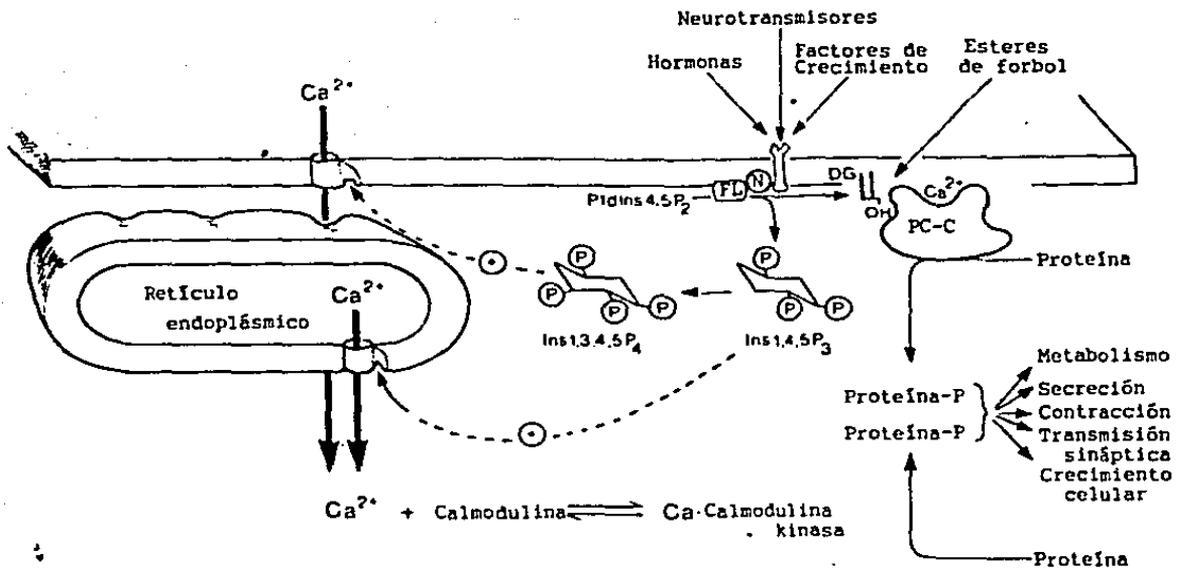


Figura # 1. Modelo Sobre el Mecanismo de Acción de los Mensajeros del Sistema Fosfoinosítidos-Calcio. N, proteína G acopladora; FL, fosfolipasa C; DG, diacilglicerol; Ptd Ins 4,5 P₂ fosfatidil inositol 4,5 bifosfato; PC-C, proteína cinasa C; Ins 1,4,5 P₃, inositol trifosfato.

el GTP y sus análogos no hidrolizables son capaces de estimular al efector, la fosfolipasa C, 3) algunos de los receptores acoplados a este sistema son capaces de desencadenar en membranas plasmáticas una actividad de GTPasa; y 4) los efectos de hormonas que estimulan a la fosfolipasa C en preparaciones sub-celulares, son dependientes de la presencia de nucleótidos de guanina (10).

Una vez activada esta proteína "Gp", se induce la activación de una o más proteínas efectoras. En cuanto a éstas, recientemente se ha descubierto que no solamente puede ser un miembro de la familia de fosfolipasas de tipo C, específicas para el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato o para fosfatidil-colina, sino también fosfolipasas de tipo A₂, específicas para fosfatidilcolina (13,14,24). Se ha sugerido también últimamente que la actividad de una fosfolipasa D es hormona dependiente y que produce segundos mensajeros a partir de fosfatidilcolina (39,49). Estos tipos de fosfolipasas generan segundos mensajeros los cuales producen a su vez varias señales y activan a la proteína cinasa c, enzima clave en la cascada amplificadora de la señal en el interior de la célula. Según el tipo de fosfolipasas que se active, los segundos mensajeros que se producen son:

a) fosfolipasas tipo C: se conocen hasta la fecha tres tipos de fosfolipasas C (PLC-I, II y III). Cada una de ellas consiste de una sola cadena polipeptídica con un peso molecular calculado de 150 Kd, 148 Kd y 85 Kd respectivamente; tienen muy poca homología en su secuencia de aminoácidos y por ende total disimilitud inmunológica, pero sin embargo poseen propiedades

catalíticas semejantes, y el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato es su sustrato preferido (15-18). La hidrólisis de este fosfolípido produce dos segundos mensajeros: el inositol 1,4,5 trifosfato y el diacilglicerol (figura 1). Se conoce también la existencia de otra fosfolipasa tipo C que no utiliza al fosfatidil inositol como sustrato sino a la fosfatidilcolina. La hidrólisis de fosfatidilcolina produce fosfocolina y diacilglicerol como productos (25,27,67).

El inositol 1,4,5 trifosfato tiene la capacidad de interactuar con receptores intracelulares localizados a nivel del retículo endoplásmico liso (28). La activación de estos receptores por este segundo mensajero induce la apertura de un canal que libera calcio de este organelo, aumentando de 3 a 10 veces la concentración de calcio citosólico, desde un valor de 100 a 200 nM hasta 600 ó 1,000 nM. Este incremento en la concentración de calcio es un factor de acoplamiento muy importante, pues es capaz de activar a múltiples enzimas en forma directa y además a proteínas cinasas dependientes del catión o del complejo calcio-calmodulina; así, la señal se propaga ocasionando la modificación covalente (fosforilación) de múltiples enzimas y proteínas en general, ocasionando en muchos casos cambios en su actividad (fig. 1).

Por otro lado, el diacilglicerol es un activador de la proteína cinasa C descubierta por Nishizuka (30), de la que se hablará más adelante.

Datos recientes demuestran además que no es esto todo lo que ocurre durante la transducción; se ha demostrado que el inositol 1,4,5 trifosfato puede ser fosforilado por una cinasa para la

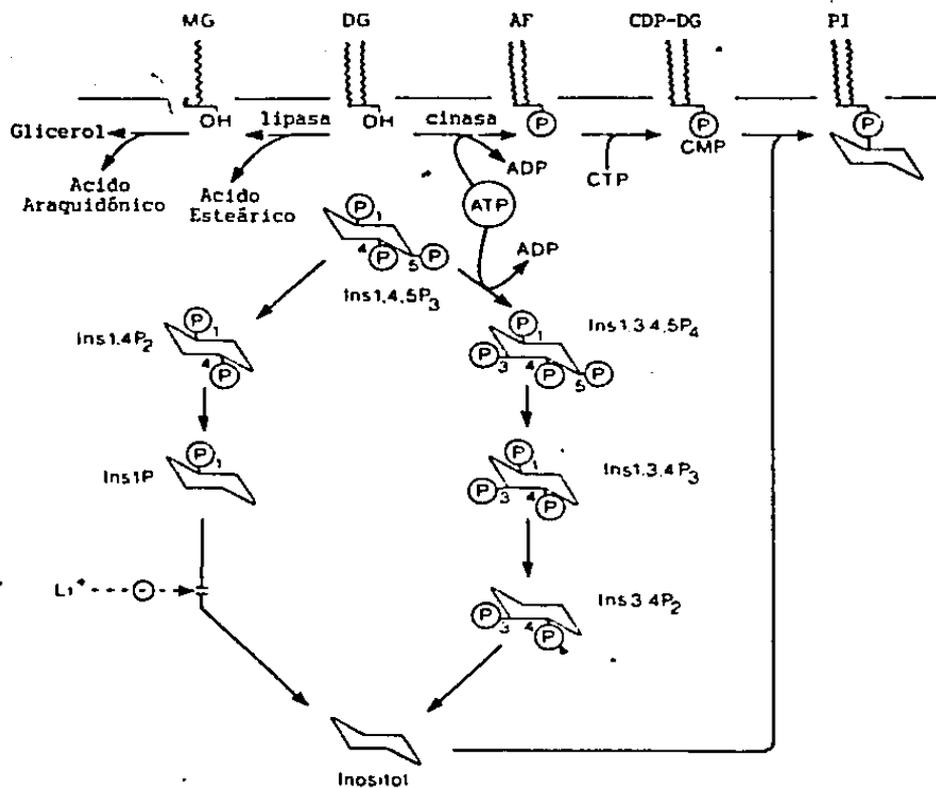


Figura # 2. Ciclos metabólicos de los lípidos de inositol. MG, monoacilglicerol; DG, diacilglicerol; AF, ácido fosfatídico; CDP, citidíndifosfato-diacilglicerol; PI, fosfatidil inositol; Ins 1,3,4,5 P₄, inositol 1,3,4,5, tetrafosfato; Ins 3,4 P₂, inositol 3,4 bifosfato; Ins IP, inositol 1 fosfato; Ins 1,4 P₂, inositol 1,4 bifosfato; Ins 1,4,5 P₃ inositol 1,4,5 trifosfato.

formación del inositol 1,3,4,5 tetrafosfato; este compuesto parece tener una función importante regulando la entrada de calcio del exterior de la célula (31,32). Es importante señalar que el retículo endoplásmico tiene una cantidad muy limitada de calcio acumulado y que este calcio es posiblemente el que inicia la respuesta, pero es captado rápidamente por diversos organelos como el mismo retículo o las mitocondrias y además es sacado de las células por una ATPasa de la membrana plasmática; ello significa que para sostener una respuesta por un tiempo prolongado (más de 5 minutos) se requiere de un abastecimiento mayor de calcio y es en este proceso en el que probablemente participe el inositol tetrafosfato (3).

Se sabe que existe una interconversión rapidísima de los fosfoinosítidos (figura 2), lo cual mantiene niveles más o menos constantes de ellos en la membrana plasmática de las células. Asimismo, el inositol 1,4,5 trifosfato es metabolizado hasta la obtención de inositol libre el cual es reciclado a fosfatidilinositol. También el diacilglicerol generado es rápidamente metabolizado y en gran parte fosforilado a ácido fosfatídico y reincorporado a los fosfoinosítidos (figura 2).

b) Fosfolipasa tipo A₂.- la información que se tiene sobre el papel de estas fosfolipasas en la transducción de señales que activan a la proteína cinasa C es muy reciente, y por tanto escasa. Sin embargo, la cantidad de reportes y de evidencias que apoyan la existencia de esta otra ruta de modulación de la proteína cinasa C ha ido en aumento últimamente (14,25,27,33,49, 67).

Las fosfolipasas tipo A_2 son esterasas dependientes de calcio, que catalizan la hidrólisis de la posición 2-éster de los 3-sn-fosfoglicéridos. Constituidas por una sola cadena polipeptídica, poseen cerca de su extremo aminoterminal una región rica en residuos de cisteína, la cual posee alta homología con el dominio regulador de la proteína cinasa C; esto ha llevado a hipotetizar que los elementos estructurales involucrados en la interacción con superficies fosfolipídicas, puedan ser compartidas por la proteína cinasa C y las fosfolipasas A_2 (34).

La hidrólisis de fosfatidilcolina por la fosfolipasa A_2 genera por un lado, ácidos grasos insaturados: oleico o araquidónico, que según se ha demostrado recientemente, estimulan a la proteína cinasa C en la presencia o ausencia de calcio y de fosfolípidos y por otro lado, la lisofosfatidilcolina (14). También recientemente se ha visto que varios lisofosfolípidos y la esfingosina, son potentes inhibidores de la proteína cinasa C, sugiriéndose que pueden funcionar como moduladores negativos de esta cinasa. Además, se ha visto que la lisofosfatidilcolina y otros lisofosfolípidos regulan la actividad de la proteína cinasa C de una manera bifásica: la estimulan a baja concentración ($<20 \mu\text{M}$), inhibiéndola a altas concentraciones ($[30 \mu\text{M}]$) (14) (figura 3).

Se sabe también que aunque tanto la lisofosfatidilcolina como el diacilglicerol requieren de calcio para sus efectos, la lisofosfatidilcolina disminuye la afinidad de la proteína cinasa C por el calcio, mientras que el diacilglicerol la aumenta.

Se ha observado en algunos tipos celulares la activación de la fosfolipasa A_2 mediada por receptor (35), así como su

activación por distintas proteínas G (36), lo que apoya aún más, la existencia de esta otra vía de transducción de señales acopladas a la modulación de la proteína cinasa C. Otros reportes muestran además una relación entre la ruta de fosfolipasa A₂ y la de generación de diacilglicerol por fosfolipasa C, pues se ha visto que los 1,2-diacilgliceroles estimulan la degradación de fosfatidilcolina por fosfolipasa A₂ y la de esfingomelina por esfingomielinasa (24), como se ve en la figura 3.

c) Fosfolipasa tipo D: Esta enzima hidroliza a fosfolípidos en el enlace existente entre el grupo de cabeza polar y el ácido fosfatídico. Investigación muy reciente ha revelado evidencias que desafían una vez más el esquema clásico de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato por una fosfolipasa C para producir diacilglicerol (33,37,38,47,49). Estas evidencias sugieren que existe otra forma celular de generación de este segundo mensajero a partir de fosfatidilcolina involucrando la actividad de una fosfolipasa D. Los segundos mensajeros que se forman son colina y ácido fosfatídico, y a partir de éste, por acción de la fosfatidil fosfohidrolasa, se genera el diacilglicerol (33).

Algunos de los datos que apoyan la existencia de esta otra vía son: en células de embrión de rata en cultivo marcadas previamente con [³H] colina y con [³H]miristato (incorporado en más de un 90% en fosfatidilcolina), se observa que la hormona movilizadora de calcio, vasopresina, provoca: i) liberación celular de [³H]colina, ii) formación intracelular rápida de [³H]ácido fosfatídico seguida de formación de [³H] diacilglicerol, y iii) bloqueo de la formación de diacilglicerol por altas

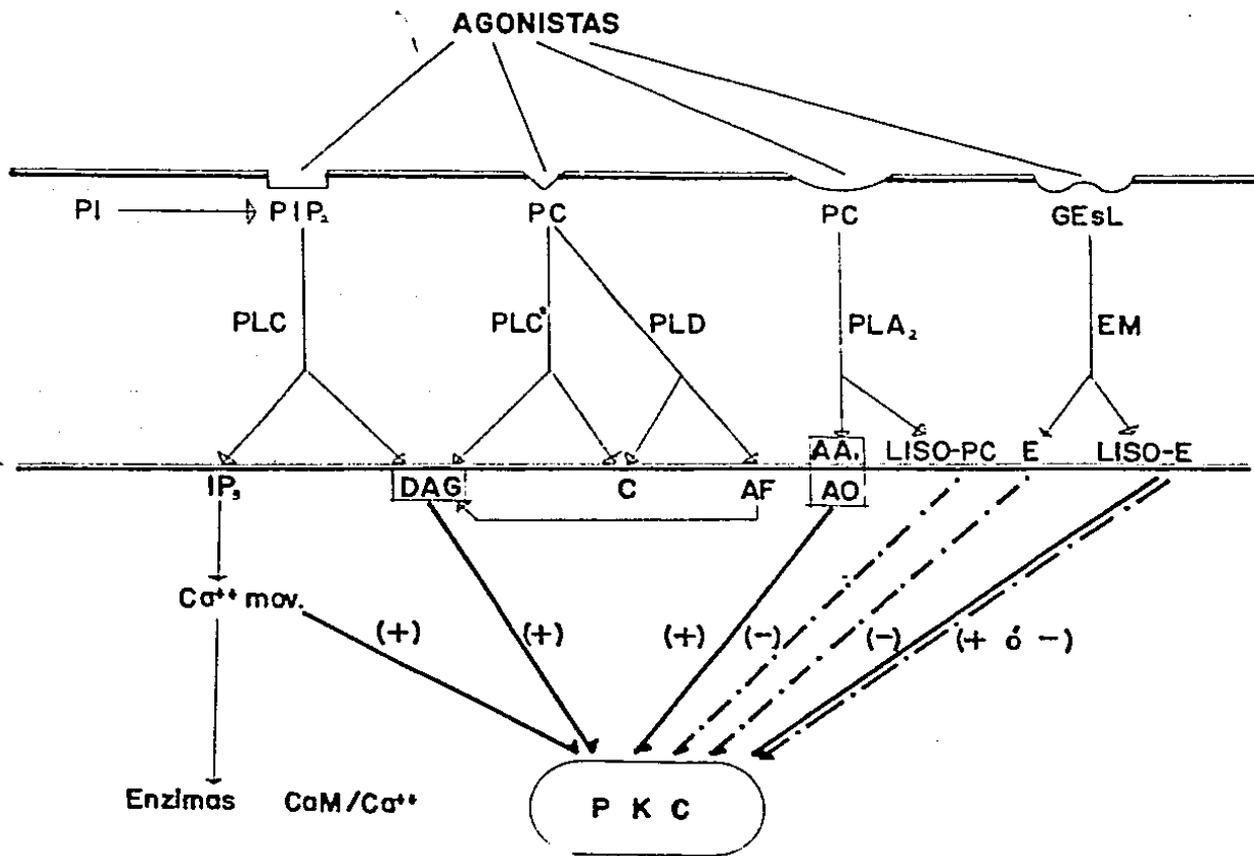


Figura # 3. Mecanismos de activación e inhibición de la proteína cinasa C. PI, fosfatidilinositol; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5 bifosfato; PC fosfatidilcolina; GEsL, glucoesfingolípidos; PLC, fosfolipasa C; PLD, fosfolipasa D; PLA₂, fosfolipasa A₂; EM, esfingomelinasa; IP₃, inositol 1,4,5 trifosfato;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

concentraciones de propanolol, que inhibe a la fosfatidil fosfohidrolasa (33).

Por otro lado, John Exton y colaboradores han reportado también actividad de fosfolipasa tipo D en hepatocitos de rata, que es estimulada por hormonas movilizadoras de calcio aparentemente a través de una proteína G (39,47).

Aunque aún es poco claro el papel de la fosfolipasa D en la transducción de señales que activan a la proteína cinasa c, se está progresando en forma espectacular en todo este campo, por lo que en los próximos años se aclararán muchas dudas acerca de estas preguntas.

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

La proteína cinasa C fue identificada en 1977 por Y. Nishizuka, y desde entonces se ha convertido en el foco de atención de investigadores interesados en el estudio de los mecanismos de transducción de señales y en tumorigénesis. Cuando se une un ligando a ciertos receptores de la superficie celular, se hidrolizan fosfatidilinositol 4,5 bifosfato o fosfatidilcolina, produciéndose varios segundos mensajeros, entre los que destaca el diacilglicerol. Se piensa que el efecto primario del diacilglicerol es activar a la proteína cinasa C (PKC), la cual a su vez fosforila a varias proteínas celulares en residuos de serina y treonina en una cascada de amplificación de la señal inicial, para producir la respuesta final de la célula.

Las técnicas de clonación molecular han permitido demostrar que la proteína cinasa C es una familia de múltiples subespecies con estructuras muy relacionadas entre sí. Hasta agosto de 1988,

se han identificado 7 subespecies de PKC, denominadas α , β I, β II, γ , δ , ϵ y ζ (figura 4). Todas ellas poseen dos dominios funcionales: uno hidrofóbico o regulatorio y otro hidrofílico o catalítico que lleva el sitio activo; todas también están constituidas por una sola cadena polipeptídica con cuatro regiones altamente conservadas (C_1 - C_4) y con cinco (V_1 - V_5) regiones variables, como se observa con la figura 3 (57-59).

La porción hacia el extremo carboxilo de cada enzima parece ser el dominio catalítico pues presenta varios grupos de secuencias homólogas a otras muchas proteínas cinasas; este dominio lleva dos regiones conservadas en todas las cinasas C: la C_3 , que tiene una secuencia de unión de ATP Gly-x-Gly-x-x-Gly.....Lys (donde x es cualquier aminoácido) y la C_4 que posee otra secuencia similar cuyo significado se desconoce.

La otra mitad de las PKC hacia el extremo NH_2 , lleva el dominio regulatorio, y posee las regiones conservadas C_1 y C_2 . Se piensa que los sitios involucrados en la unión con calcio, diacilglicerol y fosfolípido están contenidos en estas dos regiones C_1 y C_2 , aunque aún no han sido identificados con precisión. La región conservada C_1 contiene además una secuencia rica en residuos de cisteína repetida en tandem en todas las subespecies descritas excepto en ζ , que sólo posee una serie de ellas. Esta secuencia Cys-X₂-Cys-X₁₃₍₁₄₎-Cys-X₂-Cys-X₇-Cys-X₇-cys donde X representa a cualquier aminoácido, es muy similar a la secuencia consenso rica en cisteína de los llamados "dedos de zinc" ("zinc-DNA-binding finger") presente en muchas metaloproteínas y en proteínas que se unen al DNA para regular la

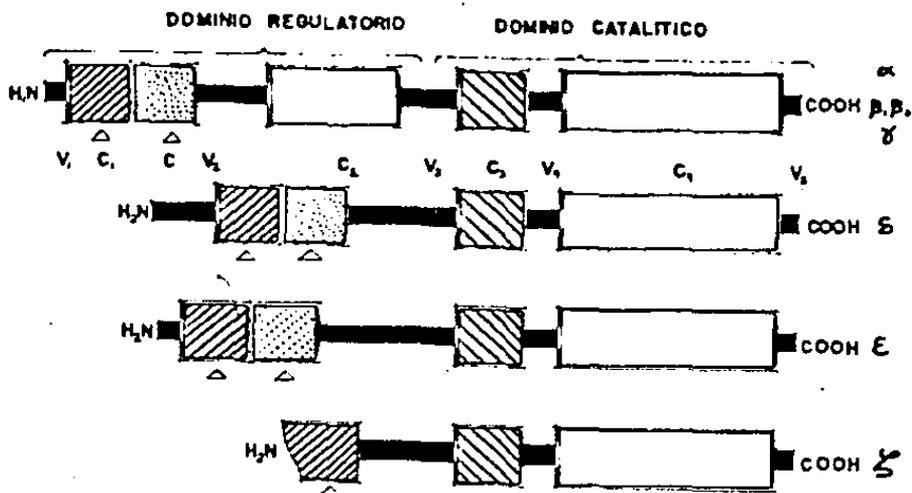
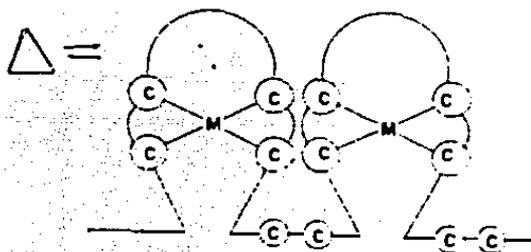


Figura # 4. Estructura de la familia de proteínas cinasas C.



Subespecie	α	β	βII	γ	ϵ	ζ	ξ
Nº de residuos aminoácidos	672	671	673	697	673	737	592
Peso molecular	76,799	76,790	76,933	78,360	77,517	83,474	67,740
Localización cromosómica (humano)	17	16		19	?	?	?
Activadores	PS-DAG-Ca ²⁺ ó AA-Ca ²⁺	PS-DAG-Ca ²⁺		PS-DAG-Ca ²⁺ ó AA	PS-DAG-(Ca ²⁺)	PS-DAG-(Ca ²⁺)	PS-DAG-(Ca ²⁺)
Tejidos en los que se expresa	Universal	Corazón y Pulmón	Hígado, testículo, riñón.	Sólo en cerebro y médula espinal.	Muchos Tejidos *	ESD en cerebro *	Muchos Tejidos *
Autofosforilación	En Ser	En Ser y Thr		?	?	?	?

Tomado de la ref. 24. PS, fosfatidilserina; DAG, diacilglicerol; AA, ácido araquidónico * expresión estimada solamente por análisis "Northern".

transcripción (45,58,61,62).

La diferencia principal entre el grupo de subespecies formado por α , β I, β II y γ con el grupo formado por δ , ϵ y ξ es que el segundo carece de la región conservada C₂. Las subespecies β I y β II derivan de un solo gene, que se transcribe en dos RNAm distintos por "splicing" alterno; difieren una de otra aproximadamente sólo en 50 residuos aminoácidos localizados en la región de sus extremos carboxilo.

La proteína cinasa C puede ser activada por proteólisis limitada con proteasas neutras dependientes de calcio, calpaína I o calpaína II. La hidrólisis ocurre en uno o dos sitios específicos de la región V₃, liberándose el fragmento catalítico, que es completamente activo en ausencia total de calcio, diacilglicerol y fosfolípido y se le denomina proteína cinasa M. Se sabe que la proteína cinasa C asociada a membrana es más susceptible a este tipo de proteólisis (46), pero el significado fisiológico de esto se desconoce actualmente.

En el cuadro siguiente anexo a la figura 4, se resumen las características principales de cada subespecie de la familia de proteína cinasa c.

Existen evidencias (60,63) de que las formas α , β I, β II y γ de proteína cinasa C, pueden autofosforilarse en la presencia de calcio, fosfatidilserina y dioleína in vitro; esta reacción se lleva a cabo en residuos de serina en las formas α y γ , mientras que en las formas β I y β II ocurre tanto en serina como en treonina. El significado fisiológico de esta autofosforilación se desconoce.

Activación de la PKC:

La proteína cinasa C requiere para su activación de Ca^{++} y de fosfolípido particularmente fosfatidilserina (48). El diacilglicerol aumenta dramáticamente la afinidad de la enzima por calcio y por fosfolípido. Solamente aquellos diacilgliceroles con la configuración 1,2- sn con ácidos grasos de diferente longitud de cadena, son capaces de activarla (68).

La PKC sirve también como receptor para un tipo de promotores de tumores: los ésteres de forbol. Estos compuestos, tal como el forbol 12 miristato 13 acetato (PMA), tienen una estructura muy similar a la del diacilglicerol (ver figura 5); se intercalan rápidamente en la membrana activando directamente a la PKC tanto in vitro como in vivo. Como el diacilglicerol, los ésteres de forbol aumentan dramáticamente la afinidad de la enzima por calcio. Sin embargo, los ésteres de forbol no son rápidamente metabolizados como ocurre con el diacilglicerol, y por tanto, pueden extender una fase de la respuesta celular usualmente limitada, distorsionando la secuencia normal de eventos, por lo que es probable que las señales inapropiadas dadas a través de la PKC resulten en las características tumorigénicas de estos compuestos.

Y. Hannun y R. M. Bell (79), estudiando la cinética de inhibición de la actividad de la PKC, por derivados de acridina propusieron un modelo de regulación de la enzima por fosfatidilserina y por diacilglicerol, consistente también con estudios de estequiometría y de cinética de la enzima. El modelo postula que la PKC interacciona con un calcio y con cuatro moléculas de

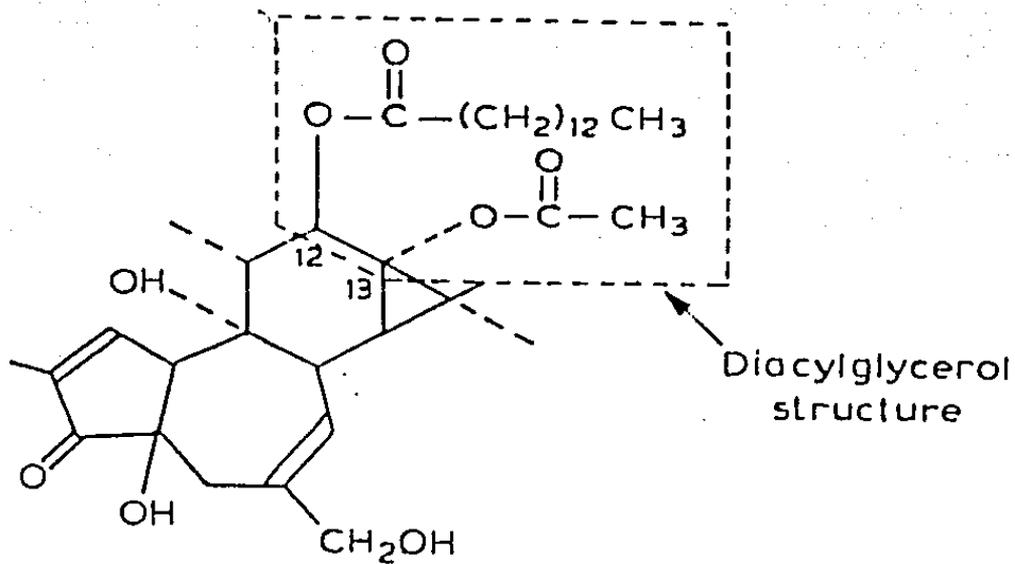


Figura # 5. Estructura del 4 β -forbol 12 β miristato 13 α acetato.

fosfatidilserina para formar el complejo "cebado" PKC-4PS-Ca²⁺; en este estado, la PKC está unida a superficie membranal pero inactiva. La adición de diacilglicerol o de PMA conduce a la activación mediante la formación de tres enlaces de hidrógeno con el complejo: dos se forman entre la PKC y el diacilglicerol, y el tercer enlace crítico se forma entre el diacilglicerol y el calcio (66,79).

Estudios realizados in vitro han permitido demostrar que existen diferencias entre las diversas subespecies de proteína cinasa C en cuanto a su modo de activación (57,58,81). Las subespecies α y γ son activadas en menor grado por diacilglicerol en la presencia de fosfatidilserina que las especies βI y βII , mientras que estas últimas muestran además considerable actividad aún en la ausencia de calcio (58). Las subespecies β muestran propiedades cinéticas casi idénticas, y son pobremente activadas por ácido araquidónico libre, mientras que la subespecie γ , en contraste, es activada por concentraciones micromolares de éste. Las subespecies α responden sólo a altas concentraciones de Ca²⁺ (51,52). Sin embargo, se ha observado que la dependencia mostrada por la proteína cinasa C respecto a calcio, diacilglicerol y fosfolípido, varía marcadamente con el aceptor de fosfato utilizado en las reacciones in vitro (53), lo que sólo ha hecho posible la comparación entre los miembros de la familia de PKC bajo condiciones limitadas (usando generalmente como aceptor a Histona H-1 rica en lisina). Por tanto, es posible que las distintas subespecies de PKC respondan diferencialmente a activadores in vivo, pero el problema recién mencionado, junto

con el hecho de que las preferencias de sustrato y de activadores puedan ser el resultado de la distribución diferencial en varios tipos celulares así como de la compartimentalización dentro de la misma célula, deja en la actualidad importantes preguntas por contestar en cuanto a los mecanismos de activación in vivo de la proteína cinasa C.

Localización de la PKC:

El uso de técnicas tales como la hibridización in situ con RNA mensajero y el análisis "Northern" con pruebas oligonucleótidas específicas, ha sugerido que algunas isoenzimas de PKC se expresan específicamente en ciertos tejidos (58). El patrón de expresión de múltiples especies de PKC se ha examinado mucho usando también técnicas bioquímicas, citoquímicas e inmunológicas con anticuerpos específicos para cada subespecie. Mucho se conoce acerca de la distribución de α , β y γ y muy poco de la de δ , ϵ y ξ , como puede verse en el cuadro anexo a la figura 4. En la rata, la subespecie γ se expresa únicamente en el cerebro y en la médula espinal; muchos tejidos, incluyendo hígado, riñón, bazo, pulmón, corazón y testículo, contienen las subespecies β , particularmente β II, pero la subespecie α es la que se encuentra más ampliamente distribuida. Algunos tejidos como corazón, pulmón, corteza adrenal y plaquetas, parecen contener varias subespecies aún no definidas. Además, se ha observado que la mayoría de las células contienen más de una subespecie de PKC en diferente proporción, cuya distribución intracelular varía dependiendo del estado de proliferación de las células (54,58).

En cuanto a localización intracelular de la PKC, se ha observado en muchos modelos que la enzima se encuentra localizada predominantemente en el citosol en su estado basal, y que se transloca a la membrana cuando se activa como resultado de haber estimulado a la célula ya sea con hormonas movilizadoras de calcio o con el éster de forbol PMA (30,64,83,84,85). También se ha reportado su localización en núcleo, así como la translocación desde el citosol hasta el núcleo, en varios sistemas humanos y en hígado de rata (65,69,70). Sin embargo, se desconoce en la actualidad la topografía intracelular precisa de la proteína cinasa C, ya que además la enzima se extrae usualmente en la presencia de altas concentraciones de agentes quelantes de calcio para prevenir la proteólisis Ca^{2+} -dependiente que lleva a cabo la proteasa calpaína sobre la PKC.

Sustratos e inhibidores de la PKC.

Uno de los principales problemas que se presentan en la investigación de la fosforilación de proteínas al utilizar sistemas libres de células, es que la mayoría de las proteínas cinasas estudiadas en estas condiciones, pueden fosforilar a muchas proteínas, mientras que sólo algunas de ellas son sustratos fisiológicos. Las posibilidades de estudio in vivo sin embargo, son reducidas hasta el momento, pues el hecho de que varias cinasas compartan un mismo sustrato (71,72), así como el que existan múltiples especies de una enzima con respuesta diferencial a activadores y con distinta distribución en una misma célula, ha complicado grandemente la búsqueda de sustratos fisiológicos. Por esta razón, con excepción de los reportes que

existen sobre la fosforilación in vivo de histonas H1, H2B y H4 y de otras proteínas nucleares por proteína cinasa C (74,75), la mayoría de sustratos que se conocen para esta cinasa, se han encontrado en experimentos realizados in vitro. Estos sustratos incluyen (30,50,72-77):

a) Proteínas receptoras: receptores α_1 y β -adrenérgicos, receptor para factor de crecimiento epidérmico, receptor de insulina, receptor de transferrina, receptor de somatomedina C (IGF-I), receptor de interleucina 2, receptor para factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor colinérgico nicotínico.

b) Proteínas membranales transportadoras: ATPasa de Calcio, ATPasa Na^+/K^+ , canal de Na^+ , intercambiador Na^+/H^+ , transportador de glucosa.

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

d) Enzimas: glucógeno fosforilasa cinasa, glucógeno sintasa, fosfofructocinasa, β -hidroxil- β -metilglutaril-CoA reductasa, tirosina hidroxilasa, NADPH oxidasa, citocromo P450, guanilato ciclasa, adenilato ciclasa, DNA metilasa, factor de iniciación 2.

e) Otras proteínas: proteínas G, topoisomerasa II, proteína no histónica HMG 14 y 17, histonas H1, H2B y H4, proteína ribosomal 6S, fibrinógeno, GABA modulina, fosfolamban.

También han sido reportados varios inhibidores de la proteína cinasa C, los cuales incluyen: dibucaína, clorpromazina, adriamicina, verapamil, amilorida, tamoxifen, bilirrubina,

palmitoilearnitina, derivados isoquinolina-sulfonamida (H7), staurosporina (79), alquil-lisofosfolípidos (14), esfingosina y bases esfingoides (14,15,78,79), liso-fosfolípidos (14), sangivamicina (80), y derivados de acridina (79).

A excepción de H7, staurosporina y sangivamicina, conocidas por actuar como inhibidores competitivos con respecto al ATP, y de los derivados de acridina que se comportan como inhibidores no competitivos también con respecto al ATP, existe muy poca información sobre los mecanismos de acción por los cuales los demás inhibidores mencionados afectan la actividad de la PKC, lo que ha llevado a suponer que la mayoría de estas moléculas perturban la bicapa lipídica, inhibiendo como consecuencia a la PKC no específicamente (79).

Funciones de la PKC.

Una de las principales funciones de la proteína cinasa C es la de regular tanto positiva como negativamente la interacción de ciertos receptores de la membrana con componentes del aparato celular de transducción de señales. Cuando el control que ejerce es positivo, ocurre una potenciación de la respuesta que se produce al estímulo dado, pero puede ejercer también un control negativo de "feedback" sobre varios pasos en los procesos de transmisión de señales, produciendo entonces diferentes tipos de desensibilización, es decir, respuestas disminuidas a estímulos subsiguientes en el sistema bajo control.

Todas estas formas de acción ejercidas por la la PKC pueden operar tanto a corto como a largo plazo. Entre los diversos procesos celulares que modula la PKC produciendo respuestas

rápidas, están las siguientes (30,40,86,91):

- En sistemas endócrinos, secreción de aldosterona, prolactina, catecolaminas, insulina, hormona del crecimiento, calcitonina, hormona luteinizante, tirotropina, hormona paratiroidea y hormonas pituitarias.
- En sistemas exocrinos, secreción de amilasa, mucina, pepsinógeno, ácido gástrico y surfactante.
- En el sistema nervioso: liberación de acetilcolina, dopamina y otros neurotransmisores.
- En sistemas musculares: . contracción y relajación de músculo liso.
- En sistema inmune: liberación de histamina, liberación de serotonina, liberación de enzimas lisosomales, síntesis de tromboxanos, agregación plaquetaria y activación de linfocitos T y B.
- Otros sistemas y procesos metabólicos: lipogénesis en adipocitos, glucogenólisis en hígado (indirecto).
- Transporte de iones a través de la membrana: fosforila proteínas de membrana tales como canales, bombas y proteínas intercambiadoras como son la ATPasa de calcio, la ATPasa Na^+/K^+ , el canal de Na^+ , la proteína intercambiadora Na^+/H^+ y el transportador de glucosa.

Dentro de las respuestas a largo plazo moduladas por la activación de la proteína cinasa C están la síntesis de DNA y la regulación de la expresión de ciertos genes como el que codifica para γ interferon (82), interleucina 2 (58) y los proto-oncogenes myc, fos y jun (55,56,93,94,96). También, la fosforilación de

proteínas catalizada por PKC ejerce profundos efectos en los procesos de proliferación celular, desarrollo y diferenciación (58,92,97,98).

Existe correlación entre algunas de las respuestas rápidas y las producidas a largo plazo por la PKC, ya que se ha observado por ejemplo que la fosforilación de la proteína intercambiadora Na^+/H^+ por la cinasa C, produce una alcalinización intracelular al activarse expulsando protones fuera de la célula; este aumento en el pH intracelular está asociado a un incremento en la síntesis de DNA, seguido de proliferación celular (95).

La diversidad de funciones en las cuales se ha involucrado a la PKC, puede implicar la activación de diferentes subespecies de ella. Aunque en la actualidad, existe muy poca información sobre el papel fisiológico de cada subespecie, los estudios que se realicen en este aspecto, serán de importancia en el futuro.

II. OBJETIVOS

El presente trabajo, sobre el efecto del forbol 12-miristato 13-acetato en la actividad de la proteína cinasa c, tiene como objetivo general:

- Establecer las condiciones experimentales óptimas para estudiar la modulación hormonal de la actividad de la proteína cinasa C en hepatocitos aislados.

Para lograr esto, los objetivos particulares que se plantearon fueron:

- Establecer las condiciones de máxima recuperación de la actividad de proteína cinasa C en el proceso de purificación a partir de hepatocitos de rata.
- Establecer las condiciones de linealidad vs. tiempo y de linealidad vs. concentración de proteína en la determinación de la actividad de la PKC parcialmente purificada.
- Estudiar la distribución de la actividad de la proteína cinasa C en presencia o ausencia de PMA.

III. MATERIALES Y METODOS

1) Sustancias Utilizadas:

El adenosíntrifosfato (ATP), EGTA, EDTA, histona H1 tipo III-S (rica en lisina), fosfatidilserina, 1,2-dioleína, Tritón X-100, DEAE-celulosa y el 4 β forbol-12 β miristato -13 α acetato (PMA), fueron de Sigma Chemical Company. La colagenasa (tipo II), fue de Worthington, y el [γ ³²P]ATP fue obtenido de ICN Radiochemicals.

2) Animales:

Se utilizaron ratas hembra Wistar de 250 a 300 gr, alimentadas "ad libitum". En algunos experimentos se utilizaron ratas hipotiroideas, en las cuales se indujo el hipotiroidismo administrando en el agua de beber, 6-n-propil-tiouracilo (PTU) al 0.03% por un período de 40 a 50 días previos al experimento.

3) Aislamiento de Hepatocitos:

Las células se aislaron por el método de Berry y Friend (99) modificado por Tolbert, et al (100). Los animales se anestesiaron con cloroformo, se abrió la cavidad abdominal, se canuló la vena porta hepática y se perfundió con una solución amortiguadora Krebs-Ringer-bicarbonato sin calcio, saturada con O₂/CO₂ (95%/5%) a un pH de 7.4 y a 37°C. El hígado fue aislado y perfundido con la misma solución suplementada con calcio y colagenasa para digerir parcialmente el tejido hepático. Las células se dispersaron en la solución amortiguadora y se lavaron tres veces. Se obtuvo finalmente una concentración de 100-150 mg de

células/ml. La viabilidad se estimó por exclusión con azul de tripano al 0.1% y fue de 70-90%.

4) Incubación con el PMA:

Una vez aisladas las células, se incubaron 15 minutos (o durante diferentes tiempos según se especifique) a 37°C en un baño con agitación constante, en presencia o ausencia del forbol miristato acetato (PMA), a diversas concentraciones según se indique. Luego se centrifugan las células a 3,000 rpm durante un minuto, se decantan y se resuspenden en 1 ml de buffer de homogenización.

5.- Purificación de la proteína cinasa c.

Todos los pasos se llevan a cabo a 4°C:

1) Homogenización

a) Se resuspenden los hepatocitos en buffer A (Tris HCl 20 mM + 50 mM 2-mercaptoetanol + 0.1 mg/ml de inhibidor de tripsina, pH 7.5); en los casos en que lleva agentes quelantes, se le agrega 2 mM de EDTA y 1 mM EGTA).

↓ Ultraturrax, 15 segundos a máxima velocidad.

↓ Centrifugar 20 minutos a 15000 rpm

↓ Sobrenadante = fracción citosólica

b) El pellet se resuspende en 1 ml de buffer A + 0.5% Tritón X-100.

↓ Ultraturrax, 20 segundos a máxima velocidad.

Homogenado, reposar 30 minutos a 4°C



Centrifugar a 15,000 rpm durante 20 minutos.



Sobrenadante = fracción membranal solubilizada

2) Cromatografía en DEAE-celulosa

Se empacan columnas de 0.5 x 10 cm. con 1 ml de DEAE-celulosa pre-equilibrada en "batch" con buffer A' (Tris HCl 20 mM pH 7.5), y se equilibran con 2 lavados más de 2 ml cada uno, con el buffer A' + 2 mercaptoetanol.50 mM pH 7.5. Se aplican las fracciones citosólica y membranal a las columnas, después de lo cual se lavan con 8 ml de buffer A' + 2 mercaptoetanol 50 mM pH 7.5. Se eluye entonces la proteína cinasa C aplicando 3 ml de buffer B (Tris HCl 20 mM + 2 mM EDTA + 0.08 M NaCl + 2-mercaptoetanol 50 mM + 0.1 mg/ml inhibidor de tripsina, pH 7.5). Se recogen estos 3 ml en un vial, del que se toman alícuotas para determinar la actividad.

6.- Determinación de la actividad de la PKC:

La actividad se determina estimando la incorporación de ^{32}P a partir de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ a histona H1 tipo III-S (rica en lisina). La composición de la mezcla de reacción es la siguiente: tris HCl 20 mM, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 5 mM, 50 μg de histona H1-IIIS, ATP 10 μM , 1 μCi de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (800,000 cpm/nmol), 0.2 μg de 1,2-dioleína, 5 μg de fosfatidilserina y CaCl_2 0.5 mM .

La reacción se inicia agregando a una alícuota de enzima la cantidad necesaria de mezcla de reacción para obtener un volumen

final de 250 μ l.

Se incuba el tiempo indicado a 30°C con agitación constante, y la reacción termina agregando 1 ml de ácido tricloroacético frío al 25% + 100 μ l de albúmina al 1%. Los precipitados se colectan y lavan 4 veces con TCA al 10% en filtros de fibra de vidrio, en las que posteriormente se estima la radiactividad retenida utilizando un contador de centello líquido. La actividad de PKC se expresa como la diferencia obtenida al restarle a la actividad desarrollada en presencia de CaCl_2 , 1,2-dioleína y fosfatidilserina, la actividad presentada en su ausencia + 0.5 mM de EGTA.

IV. RESULTADOS

La habilidad del PMA para activar a la PKC e inducir su translocación desde el citosol hasta la membrana, ha sido reportada en varios sistemas (64,84,85). En estudios realizados en nuestro laboratorio con hepatocitos de rata hipotiroidea, también se ha reportado este fenómeno (83); ya que al estimular a hepatocitos con las hormonas vasopresina y angiotensina II que activan el recambio de fosfoinosítidos, así como con PMA, se produjo un aumento en la actividad de PKC asociada a membrana simultáneo a una disminución en la actividad citosólica. Sin embargo, aunque estos datos sugirieron que la enzima sufre una redistribución como resultado de su activación, las condiciones de estudio empleadas impidieron estimar con claridad el fenómeno, ya que usualmente se obtenía una recuperación muy baja en este proceso. Con base en estas observaciones, decidimos caracterizar los efectos del PMA sobre la actividad de la PKC estableciendo para ello las condiciones óptimas de estudio de la actividad de la proteína cinasa c en hepatocitos aislados.

Lo primero que se hizo fue buscar las condiciones de linealidad de actividad contra tiempo, utilizando la técnica conocida de baja recuperabilidad en la purificación de la PKC. En las figuras 1 y 2 se observan los cursos temporales de la actividad de la proteína cinasa c asociada a membrana y a citosol obtenidos a los 2,4 y 8 minutos de reacción, así como a los 2.5, 5, 10 y 15 minutos, respectivamente.

Como puede observarse, aunque en la figura 1 se ve linealidad hasta los 8 minutos de reacción tanto con la cinasa asociada a membrana como con la de citosol, la ampliación del

tiempo de reacción a 10 y 15 minutos que se aprecia en la figura 2, nos muestra claramente que después de los 5 minutos de reacción, la actividad deja de ser lineal contra el tiempo. La diferencia de linealidad obtenida a los 8 minutos de reacción entre los experimentos de la figura 1 con respecto a los de la figura 2, se explica por las diferentes actividades específicas empleadas: 1,500,000 cpm/nmol en el caso de la Figura 1 y tan sólo 640,000 cpm/nmol en el de la figura 2. Decidimos entonces utilizar en adelante 600,000 a 800,000 cpm/nmol como actividad específica del [γ - 32 P]ATP, y 4 minutos de reacción en todas las determinaciones de actividad de la PKC. Para poder detectar una redistribución de la PKC en presencia de PMA, buscando al mismo tiempo las condiciones óptimas de purificación de la enzima, era necesario primero tener un punto de referencia utilizando las mismas condiciones empleadas anteriormente en ratas hipotiroideas, pero ahora con hepatocitos de rata normal, a fin de tratar de comprobar en éstos la aparente translocación de la PKC por acción de una dosis de 10^{-7} M de PMA. Los resultados se presentan en la figura # 3, en la que podemos observar que en los hepatocitos normales, el PMA indujo una disminución de un 61% en la actividad de la PKC citosólica con respecto al control, concomitante a un aumento de 197% (~2 veces) sobre la actividad control (basal) asociada a membrana.

Sin embargo, aunque estos resultados expresados en términos de porcentaje de actividad obtenida sobre el control sugieren que ocurre una translocación de la PKC desde el citosol hasta la membrana, no fueron convincentes, ya que se detectaron los

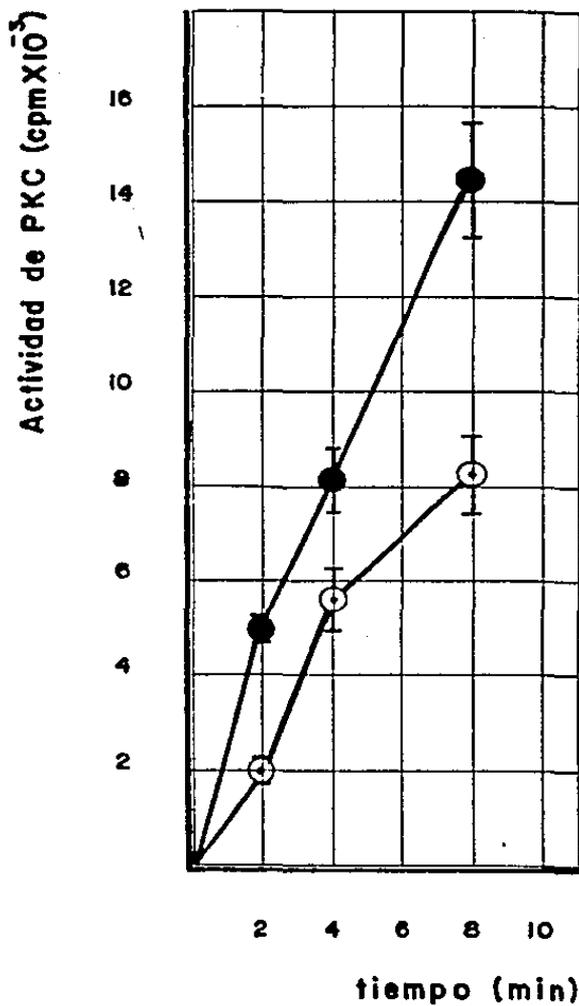


Figura # 1.- Curso temporal de la actividad de la proteína cinasa C asociada a membrana (●) y a citosol (○). Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de determinaciones por sextuplicado de 3 experimentos.

actividad de PKC ($\text{cpm} \times 10^3$)

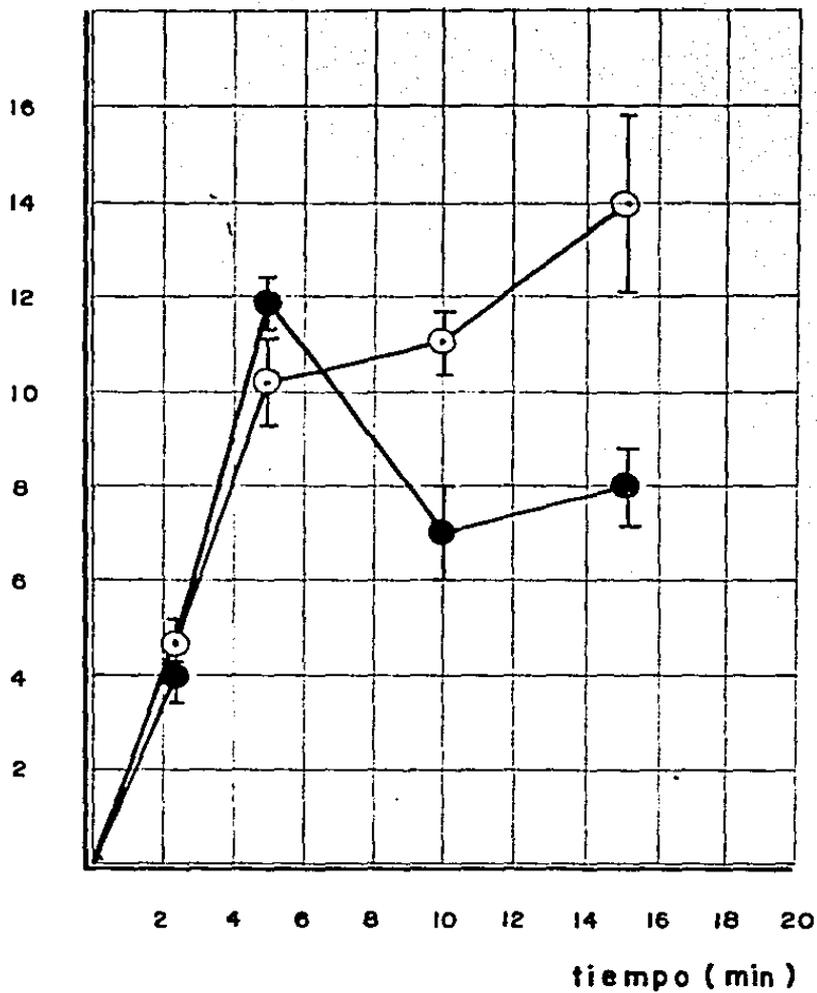


Figura # 2. Curso temporal de la actividad de proteína cinasa C asociada a membrana (●) y a citosol (○). Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de determinaciones por sextuplicado de 3 experimentos.

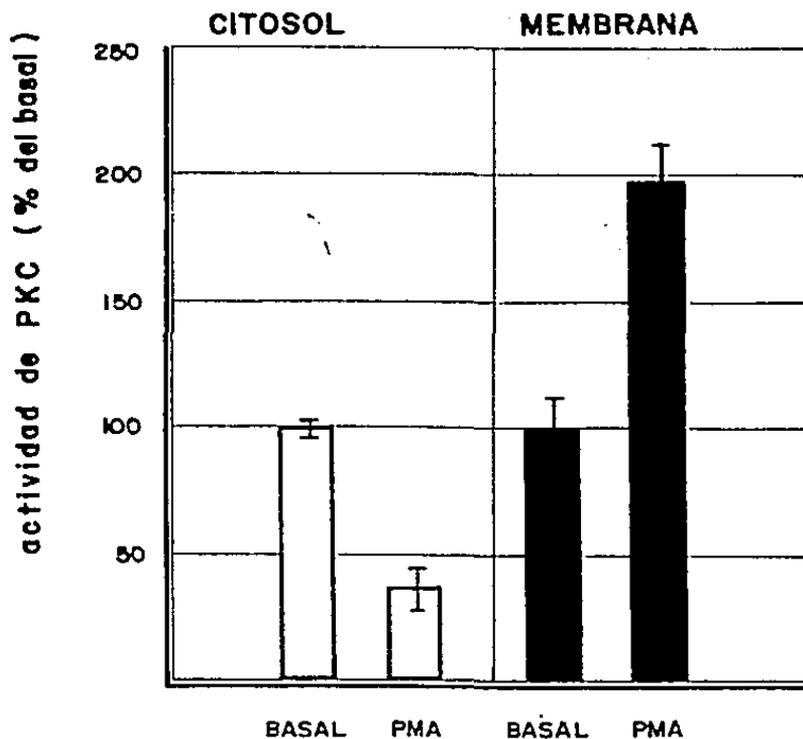


Figura # 3. Actividad de la proteína cinasa C asociada a membrana y a citosol obtenida con condiciones de baja recuperación. Los hepatocitos se trataron con o sin PMA $10^{-7}M$ durante 15 minutos. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de determinaciones por cuadruplicado de 4 experimentos.

siguientes problemas:

1) En general, la cantidad de actividad de PKC obtenida en presencia de sus cofactores (Ca^{++} , diolefina y fosfatidilserina) con respecto a la obtenida en ausencia de ellos + EGTA (actividad basal) fue siempre muy pobre: alrededor de solamente un 130-150% sobre la actividad basal.

2) La actividad basal de PKC obtenida en ausencia de cofactores + EGTA fue siempre muy elevada, por lo que la diferencia reportada entre la obtenida en presencia de los cofactores menos la basal, siempre resultó pequeña.

Se pensó entonces en buscar la forma de obtener mayor actividad de PKC mejorando las condiciones de purificación de la enzima a partir de hepatocitos aislados. El método de purificación que hasta entonces se había empleado era básicamente el mismo que el descrito en el punto # 5 del capítulo anterior, pero con las siguientes diferencias:

- No se utilizaban inhibidores de proteasas en todo el proceso de purificación.
- El agente quelante EDTA estaba presente en todos los pasos de la purificación, es decir, en el buffer de homogenización y en todos los empleados en la cromatografía en DEAE celulosa.

Decidimos agregar inhibidores de proteasas a los buffers de homogenización y de elución, y dejar al EDTA solamente presente durante el proceso de homogenización. De este modo, se evitaría la posible proteólisis provocada por la proteasa Ca^{++} -dependiente calpaína durante la homogenización, pero eluiríamos a la PKC en ausencia de quelante, de tal modo que quedaría disponible

suficiente concentración de Ca^{++} para activar a la enzima en la determinación de la actividad en presencia de cofactores en las alícuotas de eluato. Bajo estas condiciones, se purificó la PKC después de incubar a los hepatocitos de rata normal en ausencia o presencia de PMA 10^{-7}M durante 15 minutos. Se obtuvo como resultado una magnífica recuperación de la actividad ya que se consiguió como promedio un incremento del 1000% sobre la actividad basal.

Para descartar la posibilidad de que este gran incremento en la actividad se debiera a que se estuvieran activando cinasas dependientes de Ca^{++} junto con la PKC por haber copurificado con ésta, se hicieron experimentos en los que se determinó simultáneamente la actividad de la PKC en estas tres condiciones: a) en presencia de los cofactores Ca^{++} , dioleína y fosfatidilserina, b) en presencia sólo de Ca^{++} , y c) en la ausencia de cofactores + EGTA 0.5 mM. Se obtuvo como resultado que la actividad en presencia sólo de Ca^{++} , es cuantitativamente similar a la obtenida en ausencia total de cofactores + EGTA (actividad basal), por lo que quedó demostrado que toda la actividad de cinasa que determinábamos, era dependiente de Ca^{++} , dioleína y fosfolípido, es decir, era de proteína cinasa c.

También se investigó con mayor profundidad el papel del EDTA en la recuperación de la actividad de la enzima y se encontró que su presencia en el buffer de elución, y por ende, en las alícuotas de enzima cuya actividad se determina, no afecta la actividad de la PKC, lo que significa que el poco Ca^{++} que queda disponible en la mezcla de reacción, es suficiente para activar a

la enzima. Sin embargo, la presencia o ausencia del EDTA es determinante en el buffer con que se equilibra y se lava a la columna: si se equilibra y se lava con buffer + EDTA, la recuperación de la actividad cae a un 130-150% sobre el basal, y además, esta actividad basal es elevada, mientras que si se equilibra y lava con buffer sin EDTA, la recuperación de la actividad se incrementa a un 1000% sobre el basal, y esta actividad basal es tan baja como la obtenida en el tiempo cero en la determinación de la actividad de la PKC. Estos datos sugieren que el EDTA y los inhibidores de proteasas posiblemente estén disminuyendo la cantidad de grupos amino libres en la columna de DEAE-celulosa alterando significativamente la capacidad de la misma. Es importante señalar que esta condición es frecuentemente usada en la literatura (57,58).

Todos estos resultados nos llevaron a escoger en adelante las siguientes condiciones de purificación:

- Usar EDTA e inhibidores de proteasas en el buffer de homogenización.
- Equilibrar y lavar a las columnas con buffer sin EDTA y sin inhibidores de proteasas.
- Eluir con buffer que contiene EDTA + inhibidores de proteasas.
- Determinar la actividad de PKC incubando 4 minutos con la mezcla de reacción.

El siguiente paso a seguir fue el de usar esta técnica de purificación de la PKC para buscar las condiciones más adecuadas de detección de la posible redistribución de la PKC por acción del PMA. En la figura # 4, podemos observar los resultados

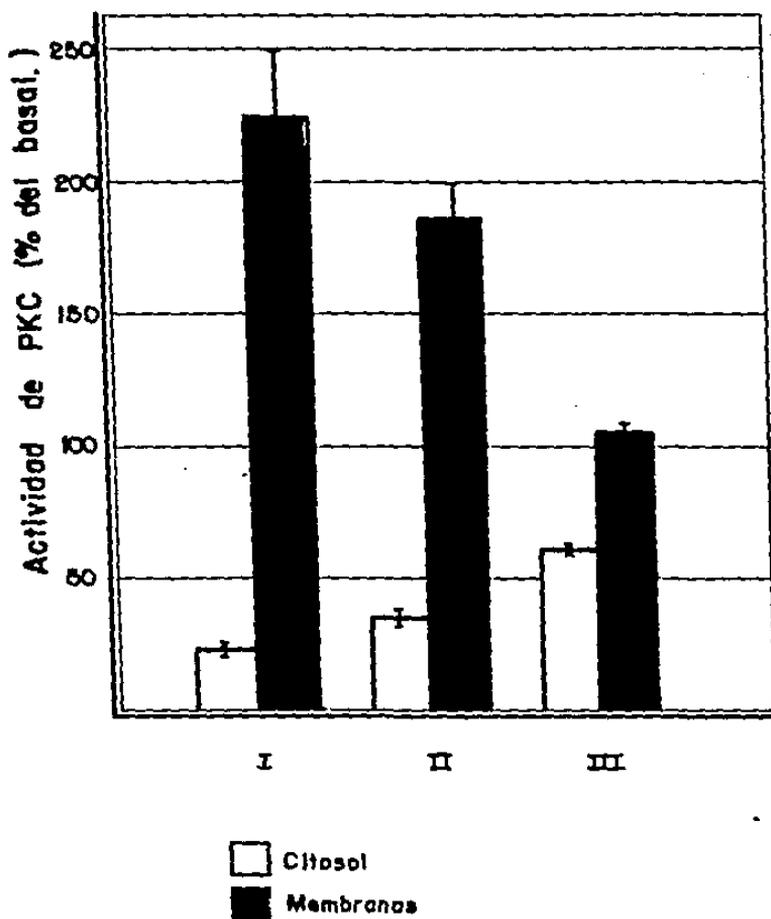


Figura # 4. Actividad de proteína cinasa C obtenida con condiciones de alta recuperación. Los hepatocitos se trataron con PMA $10^{-7}M$ durante 15 minutos. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de tres series de experimentos diferentes, con determinaciones por sextuplicado en cada uno.

obtenidos en tres grupos de experimentos con estas condiciones, al incubar en presencia o ausencia de PMA $10^{-7}M$ durante 15 minutos; como podemos apreciar, aunque hay una disminución en la actividad citosólica de PKC con un aumento en la actividad asociada a membrana, el efecto es variable. En muchos casos, inclusive, se obtuvieron resultados en los que hubo no solamente una disminución citosólica sino también una disminución en la actividad asociada a membrana (resultados no mostrados). Esto nos condujo a pensar que tal vez no veíamos el efecto del PMA en todos los casos debido a que no estábamos estimando la actividad en condiciones de linealidad contra cantidad de proteína cinasa c. Se decidió buscar estas condiciones primero para la PKC aislada de citosol.

Dado que el problema podía estar a nivel de la capacidad de columna (en cuanto a la cantidad de muestra con que se carga), a nivel de la determinación de la actividad (reacción), o de ambos, se diseñó un experimento en el cual se compararon simultáneamente estos parámetros; se hicieron 4 grupos de columnas a las que se les aplicaron las siguientes cantidades de muestra: 1280 μl , que consistía en el volumen normal de muestra, la mitad de éste (640 μl), la cuarta parte (320 μl) y la octava parte (160 μl). Las columnas se lavaron y eluyeron normalmente, y de los eluatos obtenidos de cada grupo de columnas, se tomaron alícuotas de 150 μl (volumen que normalmente se tomaba) y de 75 μl para la reacción. Los resultados obtenidos se presentan en la figura # 5, en la que se puede observar que el problema no era a nivel de la columna puesto que se recuperó el doble de la actividad de PKC

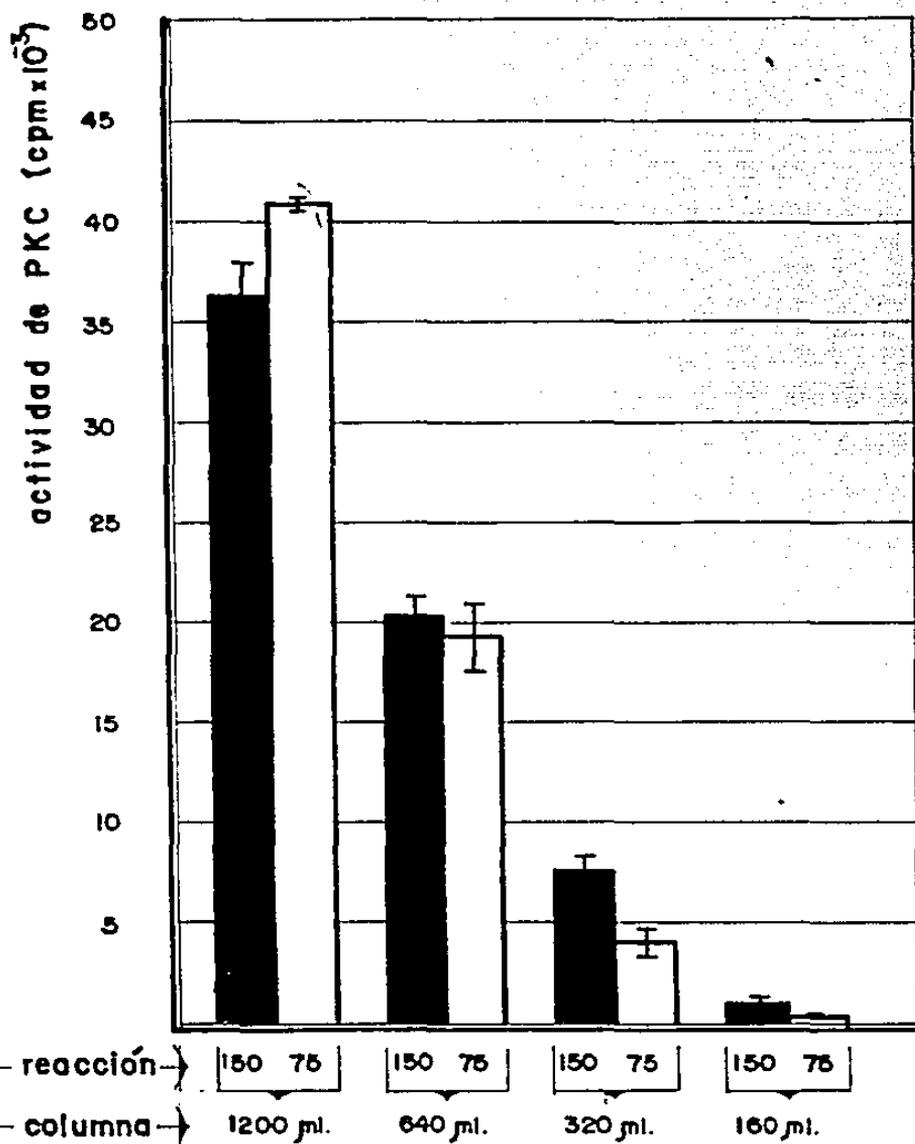


Figura # 5. Determinación de la linealidad de la actividad de la proteína cinasa C de citosol con respecto a la concentración de proteína, tanto a nivel de reacción como a nivel de columna con DEAE-celulosa. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de determinaciones por triplicado de 2 experimentos.

cada vez que se agregó el doble de muestra de proteína, a pesar de que con 160 μ l la linealidad de columna no es muy buena debido a que la recuperación se ve afectada con un volumen de muestra tan pequeño. Sin embargo, se observa claramente que la linealidad de actividad a nivel de reacción se obtiene solamente si se carga a la columna con muestras de 320 y de 160 μ l de proteína. Se decidió usar entonces 320 μ l como el volumen máximo de muestra para aplicar a la columna, y comprobar las condiciones de linealidad incubando ahora con o sin PMA 10^{-6} M variando el volumen de alícuotas para la reacción. En los resultados de la figura # 6 podemos ver con claridad que se obtuvo ya una linealidad de actividad de PKC de citosol con respecto a la concentración de proteína utilizada para la reacción, y además, que el PMA indujo una disminución en esta actividad citosólica de PKC de 85% con respecto al control (basal, en la gráfica).

Lo siguiente fue buscar las condiciones de linealidad de actividad respecto a concentración de proteína, para la PKC asociada a membranas.

Se diseñó el mismo tipo de experimento que para la PKC citosólica, variando la cantidad de muestra con que se carga a la columna, así como el volumen de muestra para la reacción. En los resultados de la figura # 7 se ve que hay problema tanto a nivel de columna como a nivel de reacción pues no hay linealidad en ningún caso a nivel de reacción, y sobre todo, llama la atención el que a nivel de columna no se vea linealidad de 1200 μ l a 640 μ l, pero sí la haya de 640 μ l a 320 μ l. Se pensó que el hecho de que se obtuviera baja recuperación de la actividad de PKC de membrana con la máxima cantidad de muestra aplicada a la columna,

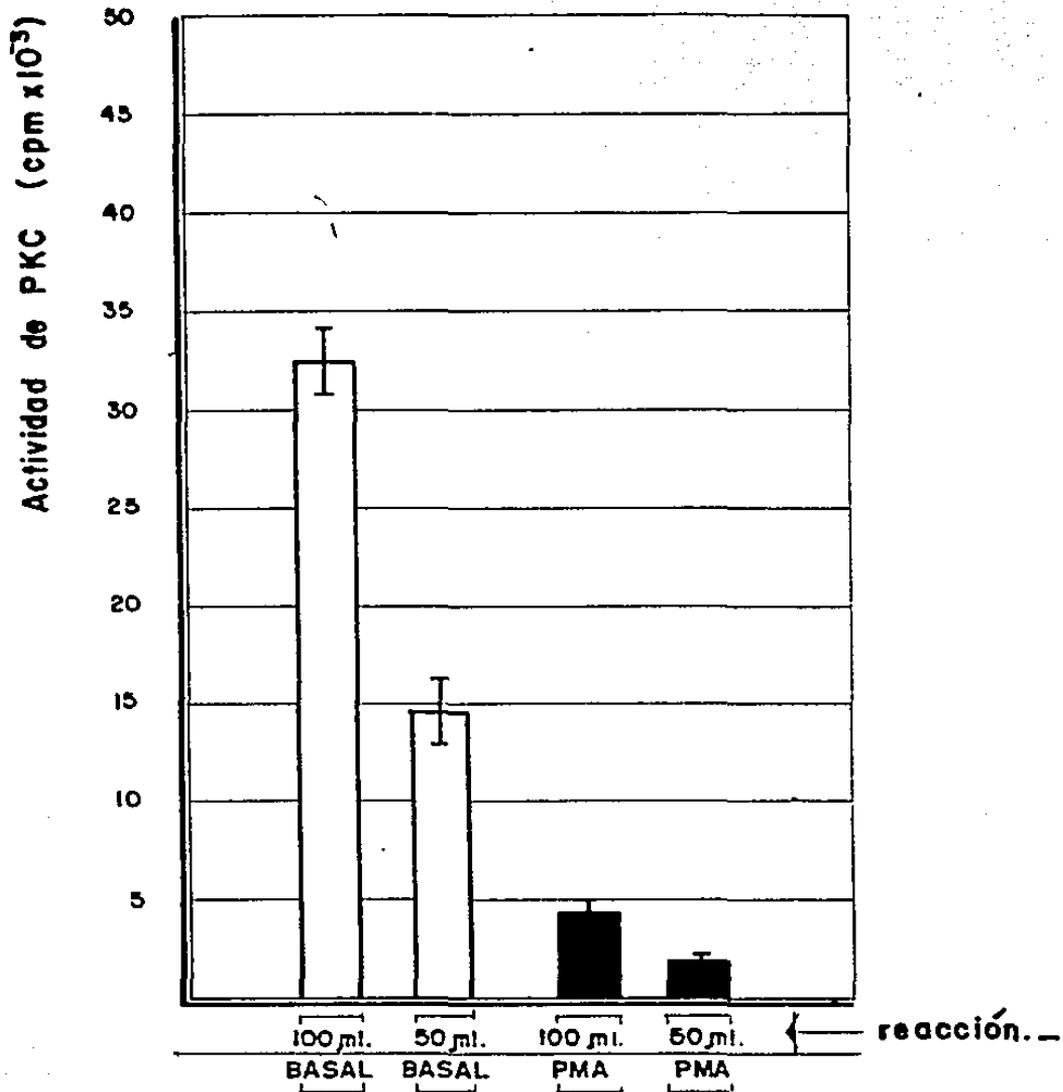


Figura # 6. Determinación de la linealidad de la actividad de la proteína cinasa C de citosol con respecto a la concentración de proteína utilizada para la reacción. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de determinaciones por sextuplicado de 3 experimentos.

Actividad de PKC ($\text{cpm} \times 10^{-3}$)

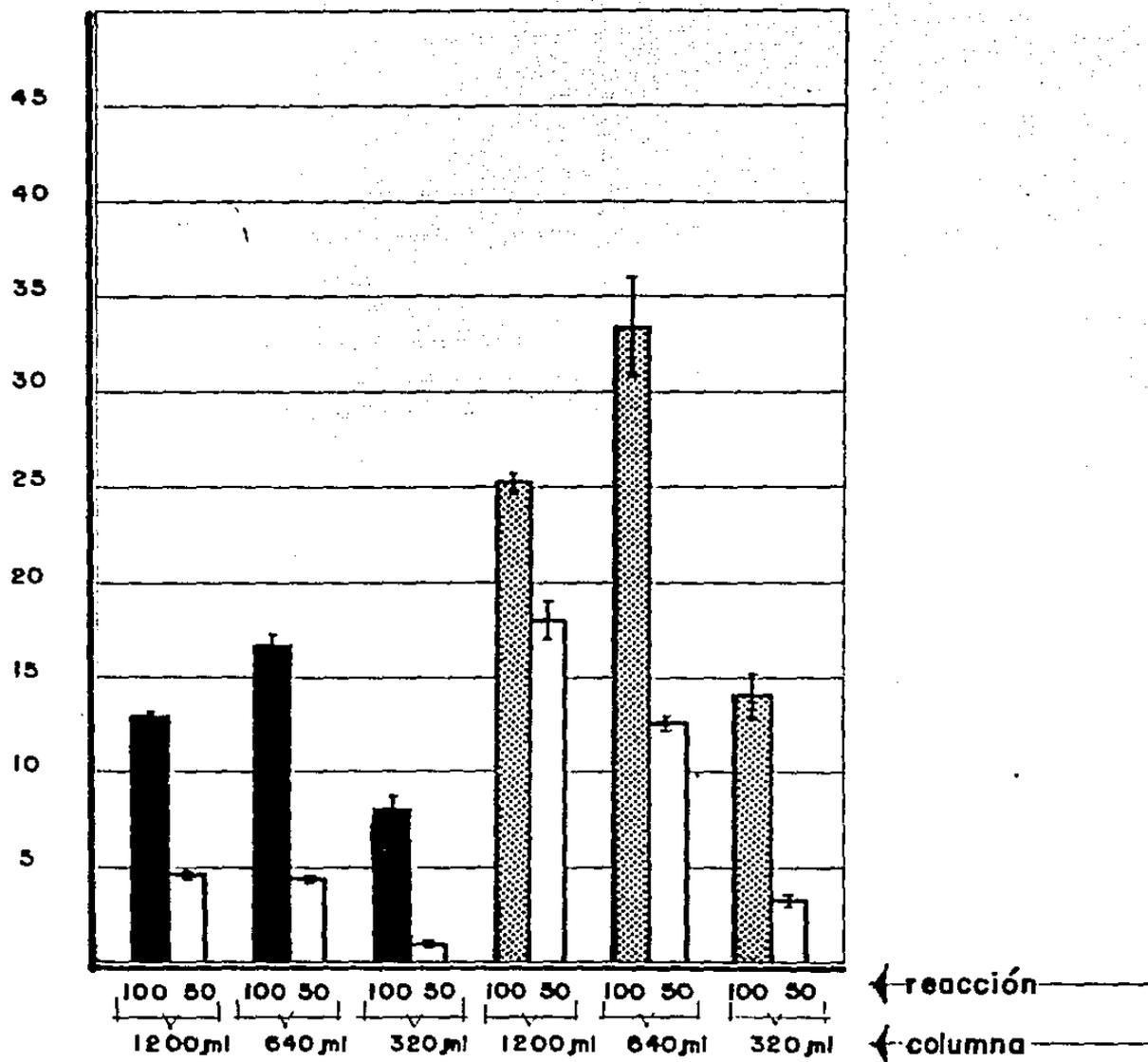


Figura # 7. Determinación de la linealidad de la actividad de proteína cinasa C de membranas con respecto a la cantidad de proteína utilizada, tanto a nivel de reacción como de columna. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de determinaciones por sextuplicado de 2 experimentos.

podría estar relacionado con problemas de intracción entre el volumen de DEAE con la columna (1 ml) con la presencia de Tritón X-100 al 1% en las muestras de fracción membranal con que se carga a ésta. Para probar esto, se siguieron dos estrategias:

- Por un lado, se usó otro detergente para solubilizar a la membrana, el CHAPS (colamido-propil-dimetilamonio-hidroxipropan-sulfato) 10 mM, que posee propiedades combinadas de los detergentes polares y de los detergentes hidrofóbicos en una sola molécula (101); se comparó la actividad obtenida con este detergente con la obtenida con Tritón X-100: el resultado fue el mismo con ambos detergentes.

- Por otro lado, se bajó la concentración de Tritón X-100 a 0.5% y se diluyeron las muestras de PKC membranal 4 veces con buffer sin Tritón antes de ser aplicadas a la columna, con el fin de diluir lo más posible la concentración de Tritón X-100 y de evitar así posibles problemas de interacción con la DEAE celulosa. Se hizo esto también con PKC total obtenida de homogenizar a los hepatocitos de rata desde el principio con buffer + Tritón X-100. Los resultados que se obtuvieron al hacer experimentos bajo estas condiciones, nos mostraron con claridad que aún cargando a la columna con 640 μ l (la mitad de lo que usualmente se aplicaba) ya sea de homogenado total de PKC o de fracción membranal y tratadas de la manera antes descrita, se soluciona el problema de la interacción DEAE-Tritón X-100 y se obtiene linealidad de actividad de PKC con respecto a la concentración de proteína. Esto se logra tanto a nivel de columna como a nivel de reacción, pero usando un volumen máximo de 50 μ l

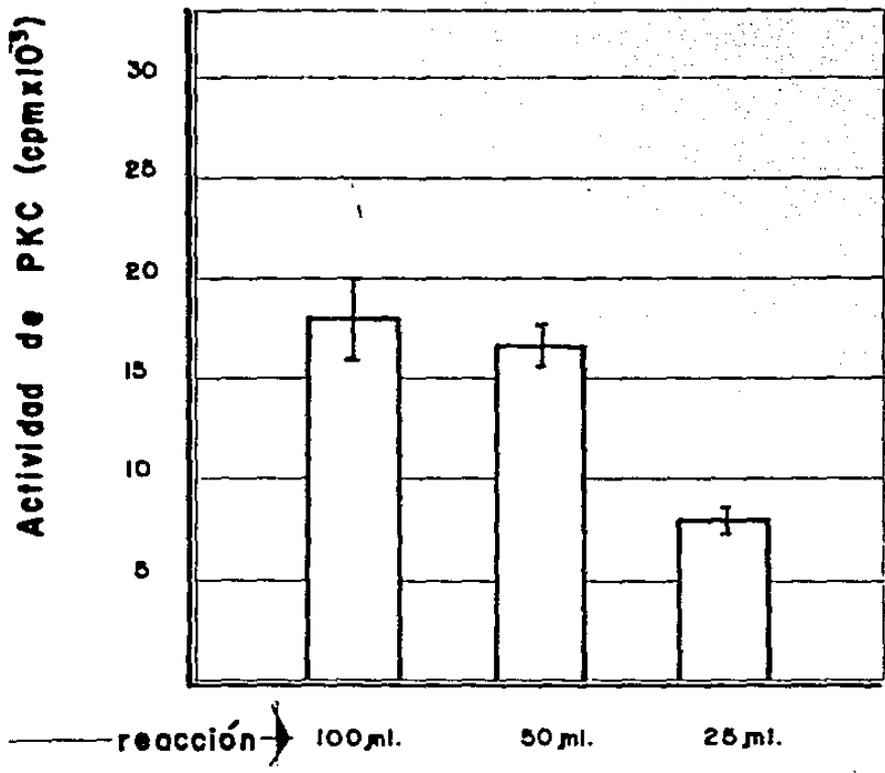


Figura # 8. Determinación de la linealidad de la actividad total (homogenado total) de la proteína cinasa C con respecto al volumen de muestra empleado en la reacción. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de determinaciones por sextuplicado de 3 experimentos.

de alícuota en la reacción en el caso de homogenado total, y un volumen máximo de 100 μl en el caso de fracción. En la figura # 8 se muestran los resultados obtenidos con PKC total, cargando a la columna con 640 μl de enzima cruda + 1920 μl de buffer sin Tritón y variando el volumen de alícuota tomado para la reacción. Como se ve en esta figura, no hay linealidad si se toman 100 μl de alícuota, pero sí la hay entre 50 μl y 25 μl en el volumen de alícuota tomado para la reacción.

Hasta aquí, nuestros resultados nos habían permitido lograr los dos primeros objetivos particulares planteados al principio de este trabajo. Sin embargo, al aplicar las condiciones óptimas para el estudio de la actividad de la PKC, linealidad contra tiempo y contra concentración de proteína, a la búsqueda de una posible translocación de la enzima como resultado de su activación con PMA, los resultados que consistentemente obteníamos eran que disminuía la actividad de PKC no sólo en citosol sino también en la membrana.

Investigando en la literatura, encontramos varios reportes de que la exposición prolongada al PMA conduce a una pérdida en la actividad de la PKC (58,102,104,108-112,114,115). Al mismo tiempo, otro reporte de P. Csermely et al (62) sobre el papel del Zinc⁺⁺ en la activación y unión de la PKC a membrana, sugería que los cambios en la distribución de la PKC eran dependientes del tratamiento con agentes quelantes, ya que la unión de la PKC a la membrana inducida por Zn⁺⁺ es reversible y puede recuperarse en el sobrenadante después del tratamiento con EGTA.

Esto nos llevó a plantearnos la siguiente pregunta: la asociación de la PKC a la membrana es dependiente de Ca⁺⁺ y por

tanto, ¿su distribución depende de las condiciones de homogenización?

Para contestar a esta pregunta se hicieron varios experimentos con hepatocitos incubados sin PMA, con el fin de comparar la distribución de la PKC obtenida al homogenizar a las células en dos condiciones: a) buffer sin agentes quelantes y b) buffer adicionado con 2 mM EDTA y 1 mM EGTA. Con cada una de estas condiciones, y usando el mismo lote de hepatocitos, se cuantificó la actividad de la PKC de citosol y de membrana. Como podemos ver en la figura # 9, mientras la cantidad total de actividad de PKC (suma de la de citosol + la de membrana determinada en homogenado total) permanece constante independientemente de las condiciones de homogenización empleadas, la distribución de la PKC sí cambia con estas condiciones, ya que sin agentes quelantes, la PKC permanece predominantemente asociada a la membrana y hay menor actividad en el citosol, situación que se invierte si el buffer de homogenización contiene EDTA-EGTA. Estos resultados demuestran que la asociación de la PKC a la membrana es dependiente de Ca^{++} y que su distribución por tanto depende de las condiciones de homogenización.

Como se mencionó anteriormente, habíamos encontrado varias evidencias de que el tratamiento con PMA por un tiempo prolongado (más de 18 horas) producía una pérdida en la actividad detectable de PKC (24,108-112). Aunque el tratamiento con PMA que nosotros dábamos a los hepatocitos era tan sólo de 15 minutos, nuestros resultados apoyaban esto, ya que a pesar de contar con una buena técnica de purificación de la enzima, y de estimar la actividad

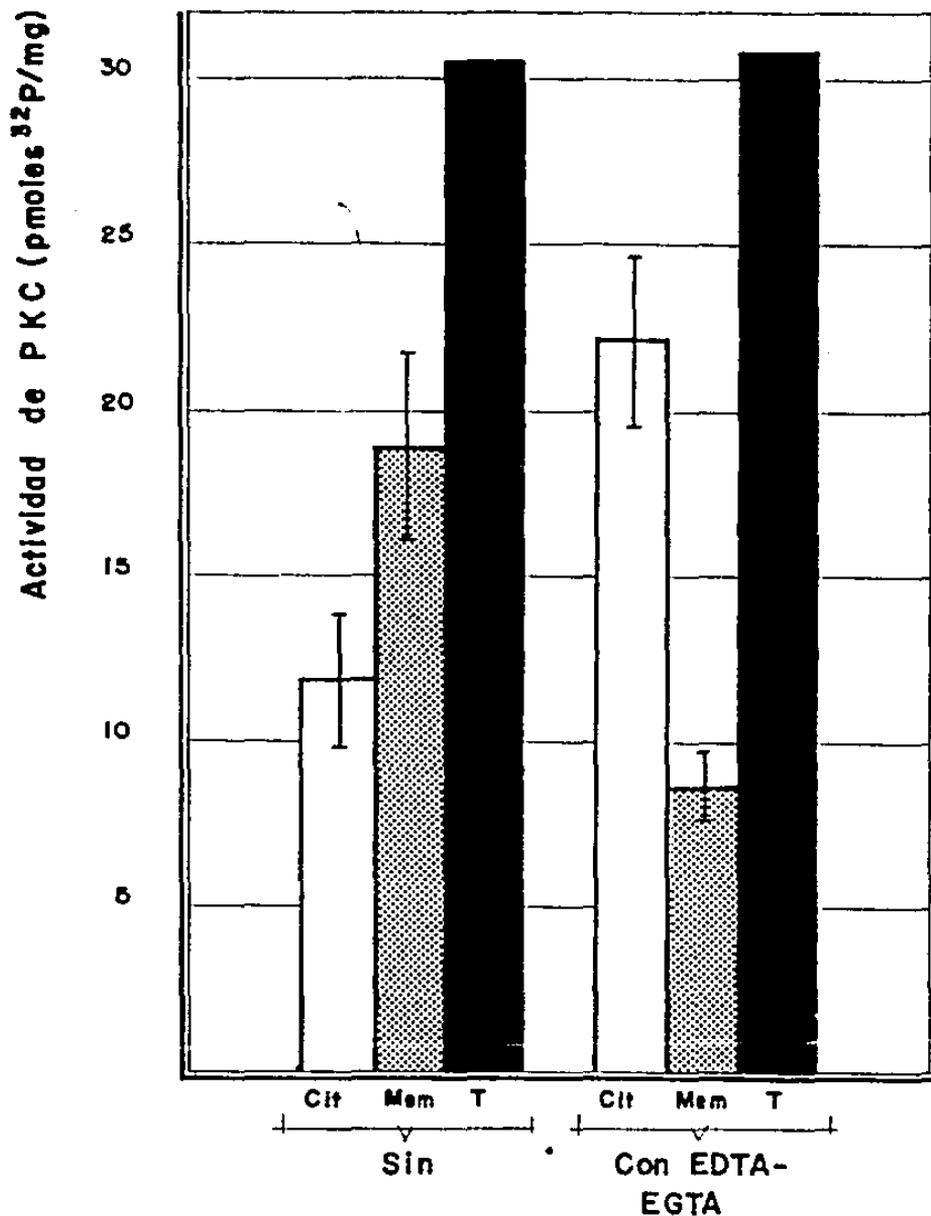


Figura # 9. Distribución de la actividad de la proteína cinasa C según las condiciones de homogenización empleadas. Cit, citosol; Mem, membrana; T, suma de la actividad de citosol + la de membrana. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de determinaciones por cuadruplicado de 5 experimentos.

en condiciones de linealidad, obteníamos en general que la actividad disminuía no sólo en citosol sino también en membrana. Sabiendo que la distribución es dependiente de las condiciones de homogenización, decidimos investigar en homogenados totales (célula completa), si había una disminución en la actividad total de la PKC. Para esto, se incubaron hepatocitos en la ausencia (con vehículo solamente) o presencia de PMA $10^{-6}M$ durante 15 minutos, después de los cuales se lavaron y resuspendieron en buffer de homogenización adicionado con EDTA 2 mM-EGTA 1 mM y con Tritón X-100 0.5%, y se procedió a la purificación de la PKC total. Los resultados se presentan en la figura # 10 en la que podemos ver claramente que el PMA indujo una pérdida de un 82% en la actividad total de la PKC con respecto al control.

Quisimos entonces investigar si esta pérdida en la actividad total de la enzima dependiente de Ca^{++} y de fosfolípido, era dependiente de la concentración de PMA empleada. Se incubaron hepatocitos con dosis crecientes de PMA (0 + vehículo, o sea, control; $10^{-9}M$; $3 \times 10^{-9}M$; $10^{-8}M$; $3 \times 10^{-8}M$; $10^{-7}M$; $3 \times 10^{-7}M$ y $10^{-6}M$) y se procedió a purificar la PKC total (con homogenados totales) paralelamente a la de citosol. En la figura # 11 se ve claramente que hay una dosis-respuesta a PMA, pues a mayor concentración de PMA utilizado se produce una pérdida mayor en la actividad de PKC tanto total como citosólica, siendo la [EC]₅₀ de $2 \times 10^{-8}M$ aproximadamente.

Por último, estudiamos el curso temporal de la desaparición de la actividad de la PKC utilizando una dosis máxima de PMA. Los hepatocitos se incubaron en ausencia (con vehículo) o presencia de PMA $10^{-6}M$ durante 1,5,10,30 y 60 minutos. En cada tiempo

Actividad de PKC (pmoles 32 P/mg)

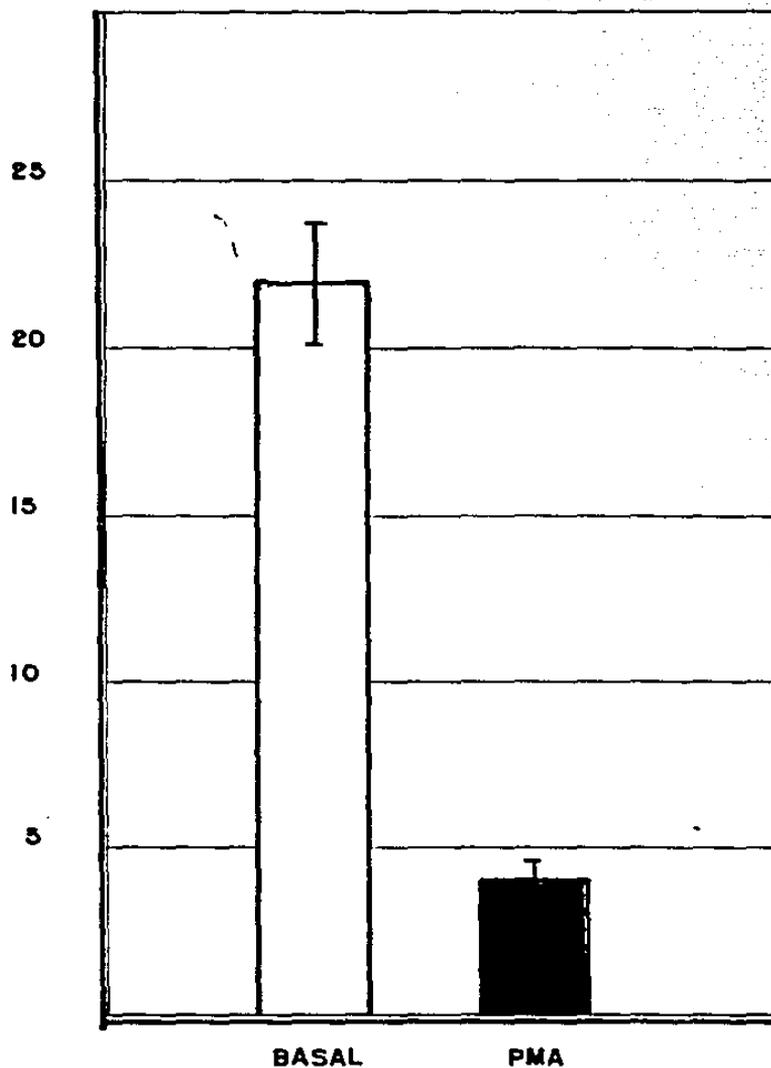


Figura # 10. Actividad total de la proteína cinasa C de hepatocitos incubados en ausencia (□) o presencia (■) de PMA 10^{-6} M durante 15 minutos. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de determinaciones por sextuplicado de 4 experimentos.

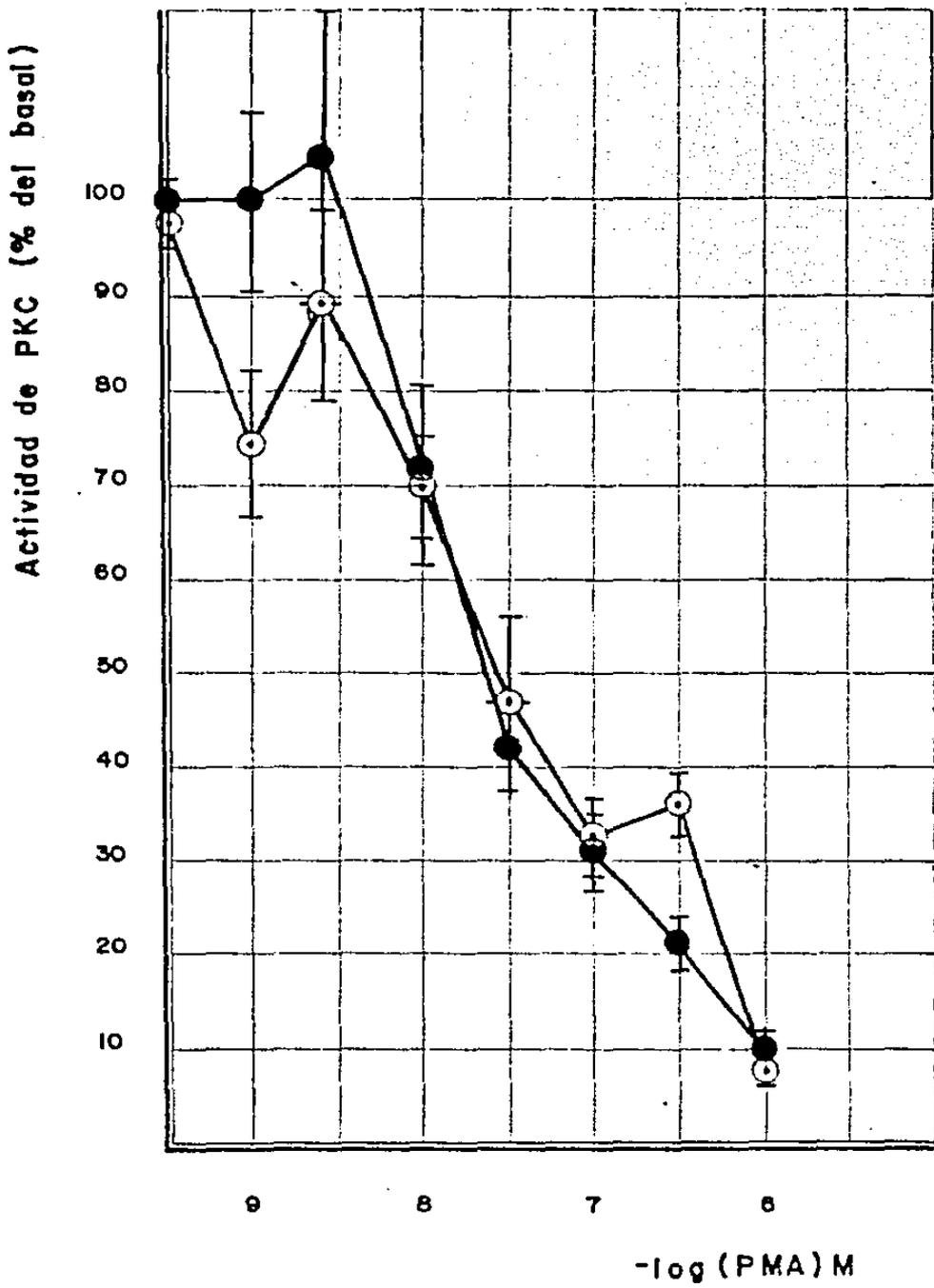


Figura # 11. Actividad de la proteína cinasa C en función de la concentración de PMA empleada. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de determinaciones por cuadruplicado de 3 experimentos. (●) Actividad de citosol, (○) actividad de la PKC total.

indicado, se tomaron alícuotas de los hepatocitos, se lavaron y resuspendieron en el buffer de homogenización adicionado de EDTA-EGTA y Tritón X-100 0.5%, y se procedió a purificar la PKC total. En la figura # 12, se puede observar que mientras la actividad total de la PKC de los controles permanece constante durante el tiempo de incubación a 37°C, sorprendentemente, desde un minuto de incubación con PMA $10^{-6}M$, ya desapareció el 86% de la actividad total de la PKC, y continúa desapareciendo hasta un 98% en el resto del tiempo de incubación.

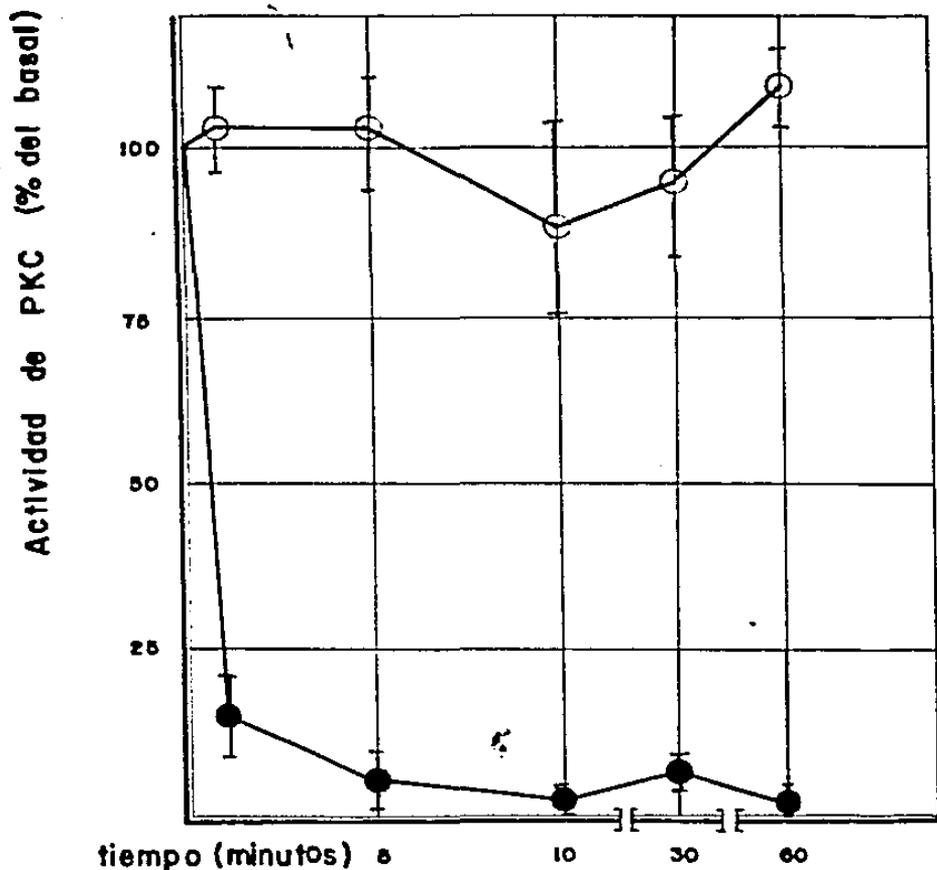


Figura # 12. Curso temporal de la actividad de la proteína cinasa C obtenida en ausencia (O) o presencia (●) de PMA $10^{-6}M$. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de determinaciones por sextuplicado de 2 experimentos.

V. DISCUSION

En cuanto a los dos primeros objetivos planteados en este trabajo, que fueron los de establecer las condiciones de máxima recuperación de la PKC, así como de linealidad de la actividad contra tiempo y contra concentración de proteína, se puede mencionar como más relevante lo siguiente:

Se mejoraron las condiciones de recuperación de la actividad de la enzima como lo refleja el hecho de que inicialmente se obtenía una actividad de un 130-150% sobre el basal hasta un 1000% sobre el basal. Se encontró que el punto clave para la obtención de máxima recuperación de la actividad de la PKC estriba en el proceso de purificación por cromatografía con DEAE-celulosa, al evitar el uso de agentes quelantes en los buffers con que se equilibra y se lava la columna, y al evitar también un exceso en la concentración de Tritón X-100 presente en el volumen de muestra. La explicación de esto, en el caso de los agentes quelantes, es que muy probablemente ocurre una interacción entre el EDTA y la DEAE-celulosa. Como sabemos, esta resina es un intercambiador aniónico (por poseer carga positiva), y como el EDTA es un ácido, y por tanto posee carga negativa a un pH neutro, es posible que a un pH de 7.5 que es al que se equilibra, lava y eluye la columna, tenga carga negativa y se pegue a la DEAE bajando la capacidad de pegado de la columna para las proteínas. En cuanto al Tritón X-100, es posible que la porción hidrofílica de su molécula (es un polioxietilenglicol, por tanto rico en grupos OH) interaccione también con la resina a un pH de 7.5, interfiriendo con la unión de la proteína a la DEAE-

celulosa; además seguramente perturba las interacciones hidrofóbicas (101).

Estas observaciones, fueron de gran utilidad para poder obtener proteína cinasa C semi-pura cuyo método de estimación de su actividad en condiciones de linealidad, fuera lo suficientemente sensible para poder hacer visible cualquier efecto producido en ella. Con esta metodología entonces, investigamos la distribución intracelular de la PKC en ausencia o presencia del PMA, habiéndose encontrado un hecho notable: la distribución de la PKC cambia con las condiciones de homogenización.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Salman Azhar (113) en hígado de rata en el sentido de que la composición del buffer de homogenización es un factor importante en la distribución observada de la PKC, ya que purificando a la PKC con técnicas de centrifugación diferencial en gradientes de densidad con sacarosa para separar fracciones nuclear, mitocondrial y microsomal, de las que posteriormente aísla la PKC, el autor obvia el paso de la homogenización inicial en buffer con agentes quelantes, encontrando que el 85% de la PKC total se localiza en la fracción "particulada" mientras que solamente un 15% se localiza en la fracción citosólica.

Nuestros resultados apoyan también lo observado por Peter Csermely et al (62) en linfocitos T al estudiar el papel del zinc en la unión reversible de la PKC a la membrana. Este autor muestra que el Ca^{++} , Zn^{++} o $Ca^{++} + Zn^{++}$ hacen que se retenga la actividad de la PKC en las membranas al tratarlas con EDTA-EGTA

en presencia de un exceso de Ca^{++} o de Zn^{++} , ya que si sólo les tratan con agentes quelantes, se disocia la PKC de ellas y se recupera en el sobrenadante. Además, reporta que el Ca^{++} sólo es capaz de inducir una translocación parcial de la actividad de PKC a la membrana, y que el Zn^{++} contribuye a esta unión.

Nuestros datos sugieren que la PKC se localiza normalmente asociada a la membrana, más bien que libre en el citosol, no solamente por los resultados obtenidos que apoyan todo lo anteriormente expuesto, sino también porque no logramos detectar una translocación de la PKC desde el citosol hasta la membrana por acción del PMA bajo condiciones de alta recuperación de la enzima. Encontramos que el efecto más claro que ejerce este compuesto sobre la actividad de la PKC no es el de su translocación, sino el de promover la desaparición de la actividad detectable de la enzima. Sin embargo, no podemos descartar el que ocurra también una translocación transitoria de alguna de las isoenzimas de la PKC a la membrana, por las siguientes razones:

David Klein ha reportado (103) que la distribución subcelular de la PKC en pinealocitos permeabilizados con digitonina en presencia de EDTA + EGTA es de más de 80% en el citosol y menos del 10% en la membrana, y que es en esta pequeña fracción estable de PKC resistente a tratamiento con quelantes, en donde se observa un aumento de 2.5 veces en la actividad de la PKC como resultado de la incubación con PMA. Es posible que con las condiciones de purificación utilizadas anteriormente por nuestro grupo, que son las que usan actualmente la mayoría de los investigadores, se favorezca la purificación de una de las subespecies de PKC, resistente a quelantes, que como vimos en la

figura # 3, de este trabajo, sí sufra una translocación a la membrana por acción del PMA. Con las condiciones de purificación de alta recuperación de la enzima sin embargo, tal vez no logramos detectar la translocación transitoria de alguna subespecie de PKC poco abundante en el hígado de rata, debido a que su actividad quedaría enmascarada por la de la especie de PKC en mayor proporción sobre la que el PMA produce otro efecto: la desaparición de la actividad dependiente de calcio y de fosfolípido.

En relación a este efecto principal que produce el PMA en nuestro sistema, existen varias posibilidades de explicación, las cuales son importantes de discutir, y que pueden ser sujetos de experimentación en la continuación de este trabajo.

Estas especulaciones son las siguientes:

a) ¿El PMA induce una degradación de la PKC? Existen varios reportes de que la proteína cinasa C asociada a membrana es más susceptible a proteólisis por las proteasas Ca^{++} dependientes calpaína I y II (102-106). Nuestros datos nos indican que existe más PKC en la membrana que en citosol en condiciones normales (basales), y que, mientras esta PKC no sea activada con PMA, no ocurre una degradación aparente, esté o no presente leupeptina, que es el inhibidor de la calpaína. Por lo tanto, si la desaparición de la PKC es debida a una degradación de la misma, debe degradarse una forma diferente de la enzima, puesto que la PKC de los controles no desaparece con nuestras condiciones de homogenización, aún sin agregar agentes quelantes y sin la presencia de leupeptina. Es posible que la calpaína reconozca

solamente la forma completamente activada de la PKC que se logra con su interacción con diacilglicerol o con PMA, y no al "complejo cebado" PKC-4PS-Ca⁺⁺ presente supuestamente en la membrana. Al reconocer la forma activada, corta a la PKC en dos fragmentos: por un lado, el fragmento catalítico, irreversiblemente activo e independiente de Ca⁺⁺, dioleína y fosfatidilserina (107), y por ende, no detectable bajo nuestras condiciones de estimación de la actividad, y por otro, el fragmento regulatorio que lleva la secuencia consenso de "zinc-DNA-binding-finger".

Las evidencias que apoyan esta especulación son:

- en queratinocitos de rata, se ha visto que la pérdida de PKC por tratamiento con PMA se previene exponiendo a las células a un inhibidor de la calpaína, que es la leupeptina (105).
- en miocitos de rata, también se ha reportado una disminución en la actividad de la PKC tanto en citosol como en membrana (a pesar de un incremento inicial transitorio en la actividad asociada a membrana), viéndose que después de una exposición de 30 minutos a PMA, el tiempo requerido de las células para recuperar su actividad normal es de 10 horas, tanto para la actividad citosólica como para la de membrana (109).
- Nishizuka (30,58) ha reportado que la calpaína I, que es activada con concentraciones micromolares de Ca⁺⁺, corta a la PKC en la presencia de fosfatidilserina y diacilglicerol, o en la presencia de PMA. Además, recientemente ha encontrado que varias subespecies de PKC coexpresadas en un solo tipo celular, desaparecen a

diferente velocidad como consecuencia del tratamiento con PMA.

- A Fournier y A. Murray (111), utilizando anticuerpos que reconocen a la PKC completa o al dominio regulatorio, encontraron que la aplicación de una sola dosis de TPA durante 30 minutos en la piel de ratón, es suficiente para producir una rápida y completa pérdida en la actividad de PKC, que se mantiene hasta cuatro días. Observan que este fenómeno está asociado con la pérdida de la PKC íntegra inmunológicamente detectable y con la acumulación de un fragmento más pequeño, correspondiente al fragmento regulatorio. Es interesante hacer notar que este fragmento es el que contiene la secuencia consenso característica de proteínas que regulan la transcripción del DNA, lo que sugiere que este fragmento puede regular la transcripción de proteínas específicas para mediar procesos de proliferación, desarrollo y diferenciación, que se sabe son respuestas a largo plazo que puede producir la activación de la PKC.
- la calpaína ha sido involucrada en varios procesos que tienen relación con las respuestas tardías de la PKC: así, se ha reportado su participación en mitosis (105) y en la proteólisis limitada de el receptor del factor de crecimiento epidérmico, y del receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (114), además de la conocida en PKC que produce una forma irreversiblemente activada de ésta. Por otro lado, se sabe que la

ciclosporina A, que inhibe a la calpaína, inactiva al antiporter Na^+/H^+ cuya actividad se ha propuesto que es importante en la alcalinización del pH intracelular, que antecede a la síntesis de DNA y a la división celular (106).

b) ¿El PMA hace que se produzca un inhibidor endógeno? En las condiciones de ensayo empleadas en esta investigación, es posible que ocurra esto. Esto podría comprobarse estudiando las constantes cinéticas y graficando el recíproco de la actividad obtenida con o sin PMA, contra el recíproco de la concentración de ATP o de histona; si solamente la velocidad máxima se viera afectada (V_{max}) en respuesta al PMA, se debería a una cantidad disminuída de PKC activa (recuérdese que V_{max} es igual a K_3 [enzima total]) y no a un cambio de afinidad hacia ATP o hacia la histona. Nuestros experimentos se hacen en condiciones de velocidad inicial y saturación de substratos por lo que en principio deben reflejar V_{max} , es decir [enzima total]. Si se produjera un inhibidor no unido covalentemente, éste se separaría en la purificación (ya fuera por la dilución en la homogenización, la purificación parcial con DEAE-celulosa o bien en pasos de purificación posteriores). Aunque debe realizarse una exploración más a fondo, nuestros datos sugieren que esta posibilidad es poco probable.

c) ¿El PMA puede inducir un cambio en la PKC desde una forma activa a otra inactiva, el cual puede involucrar un cambio en su comportamiento cromatográfico? El mecanismo de la disminución en la actividad detectable de la PKC puede involucrar por ejemplo un

cambio en el estado de fosforilación de la enzima, ya que actualmente se sabe que puede sufrir una autofosforilación, pero no se conoce cómo y por qué le ocurre. Hay evidencia por ejemplo de que la proteína cinasa II-calcio calmodulina dependiente al autofosforilarse en un residuo de treonina, se convierte en una forma independiente de calcio (116). El PMA podría hacer que se activaran además fosfatasas. Si esto ocurriera, podríamos obtener también una forma de PKC con un estado de fosforilación diferente, que igualmente se comportara cromatográficamente de un modo distinto. Esto se podría comprobar usando inhibidores de fosfatasas al incubar con PMA. La posibilidad de que exista un cambio en la conducta cromatográfica de la PKC no puede descartarse y será necesario hacer una evaluación utilizando DEAE-celulosa y diferentes fuerzas iónicas (perfil de elución con gradiente de NaCl) y usar otros medios de purificación con la hidroxilapatita (98).

VI. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se lograron los objetivos particulares planteados al inicio de esta investigación, lo que abre el camino para poder estudiar la modulación hormonal de la proteína cinasa C en hepatocitos aislados. Las conclusiones obtenidas son las siguientes:

- 1a) Los agentes quelantes y el Tritón X-100 juegan un papel muy importante en la recuperación de la actividad de la PKC durante el proceso de su purificación por cromatografía en DEAE-celulosa.
- 2a) La distribución de la PKC cambia con las condiciones de homogenización, por lo que la composición del buffer de homogenización es esencial pues la asociación persistente de la PKC a la membrana depende de calcio.
- 3a) El forbol miristato acetato produce una desaparición de la actividad de proteína cinasa dependiente de calcio y de fosfolípido (PKC). Esta desaparición ocurre muy rápidamente y es dependiente de la concentración de PMA.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Berridge, M.J. (1985). *Sci. Am.* 253 (4): 124
- 2) García-Sáinz, J.A. (1987) En: *Mensaje Bioquímico* 10: 177
- 3) Malbon, C., George, S.T. and Moxham, C.P. (1987) *TIBS* 12: 172
- 4) Berridge, M.J. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56: 159
- 5) Gilman, A.G. (1987) *Ann Rev. Biochem.* 56: 615
- 6) García-Sáinz, J.A. (1987) *Hormonas: Mensajeros Químicos y Comunicación Celular. Colección "Ciencia desde México"*. Ed. Fondo de Cultura Económica. México
- 7) Hauschildt, S., Hirt, W. and Bessler, W. (1988) *FEBS Lett.* 230: 122.
- 8) Crouch, M. F., and Lapetina, E.G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (7): 3363
- 9) Mire-Sluis, A. R., Hoffbrand, A.V., and Wickremasinghe, R.G. (1987). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148 (3): 1223.
- 10) Fain, J.N., Wallace, M.A. and Wojcikiewicz, R.H. (1988) *FASEB J.* 2: 2569
- 11) Majerus, P. W., Connolly, T.M., Bansal, V.S., Inhorn, R.C., Ross, T.S. and Lips, D. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (7): 3051
- 12) Taylor, S.J. and Exton, J.H. (1987) *Biochem. J.* 248: 791
- 13) Slivka, S.R. Meier, K.E. and Insel P. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (25): 12242
- 14) Oishi, K., Raynor, R.L., Charp, P.A. and Kuo, J.F. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (14): 6865.
- 15) Suh, P.G., Ryu, S.H., Moon, K.H., Suh, H.W. and Rhee, S.G. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5419
- 16) Suh, P.G., Ryu, S.H., Moon, K.H., Suh, H.W. and Rhee, S.G. (1988) *Cell* 54:161
- 17) Bennett, C.F. and Crooke, S.T. (1987) *J. Biol. Chem.* 262 (28): 13789
- 18) Bennett, C.F., Balcarek, J.M., Varrichio, A. and Crooke, S.T. (1988) *Nature* 334: 268.
- 19) Schimmel, R.J. (1988) *Biochem. J.* 253: 93
- 20) Donaldson, S.K., Goldberg, N.D., Walseth, T.F. and Huetteman, D.A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 5749
- 21) Homma, Y., Imaki, J., Nakanishi, O. and Takenawa, T. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (14): 6592
- 22) Carafoli, E. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56: 395
- 23) Burch, R.M., Connor, J.R. and Axelrod, J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 6306.
- 24) Kolesnick, R.N. and Clegg, S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (14): 6534.
- 25) Daniel, K.W., Waite, M. and Wykle, R. (1986) *J. Biol. Chem.* 261 (20): 9128.
- 26) Allan, D. and Quinn, P. (1988) *Biochem. J.* 254: 765
- 27) Rosoff, P.M., Savage, N. and Dinarello, C.A. (1988) *Cell* 54: 73.
- 28) Spat, A., Bradford, P.G., McKinney, J.S., Rubin, R.P., Putney, J.W. Jr. (1986) *Nature* 319: 514.
- 29) Berridge, M.J. (1987) *ISI Atlas of Sci.* 1: 91
- 30) Nishizuka, Y. (1986) *Science* 233: 305
- 31) Irvine, R.F., y Moor, R.M. (1986) *Biochem. J.* 240: 917
- 32) Houslay, M.D. (1987) *Trends Pharm. Sci.* 12: 1

- 33) Cabot, M.C., Welsh, C.J., Cao, H. and Chabbott, H. (1988) FEBS Lett 233 (1): 153
- 34) Maraganore, J.M. (1987) TIBS 12: 176
- 35) Billah, M. and Siegel, M.I. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 144: 683.
- 36) Burch, r.M., Luini, A., and Axelrod, J. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 7201
- 37) Besterman, J.M., Duronio, V. and Cuatrecasas, P. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 6785
- 38) Ferrari, S., Marchiori, F., Marín, O. and Pinna, L.A. (1987) Eur. J. Biochem. 163: 481.
- 39) Bocchino, S.B., Blackmore, P.F., Wilson, P.B. and Exton, J.H. (1987) J. Biol. Chem. 262: 15309
- 40) Griendling, K.K., Bradford, c. and Alexander, W. (1988) J. Biol. Chem. 263 (22): 10620
- 41) Bell, J.D., Buxton, I.L.O., Brunton, L.L. (1985) J. Biol. Chem. 260: 2625
- 42) Sugden, D., Vanecek, J., Klein, D.C., Thomas, T.P. and Anderson, W.B. (1985) Nature 314: 359
- 43) García-Sáinz, J.A., Hernández-Sotomayor, S.M.T., Contreras-Rodríguez, J.L. and Macías-Silva, M. (1988) Enviado a publicación.
- 44) Hernández-Sotomayor, S.M.T., Macía-Silva, M., Plebański, M. and García-Sáinz, J.A. (1988) Biochem. Biophys. Acta. En prensa.
- 45) Berg, J. (1986) Science 232: 485
- 46) A. Kishimoto et al. (1983) J. Biol. Chem. 258: 1156
- 47) Bocckino, S.B., Wilson, P.B. and Exton, J.H. (1987) FEBS Lett, 225 (1,2): 201
- 48) Y. Nishizuka (1983) Trends Biochem. Sci 8: 13
- 49) Tettenborn, C.S., and Mueller, G.C. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 155 (1): 249.
- 50) Lynch, C.J., Bocckino, S.B., Blackmore, P.F. and Exton, J.H. (1987) Biochem. J. 248: 807
- 51) Sekiguchi, K., Tsukuda, M., Ogita, K., Kikkawa, I. and Nishizuka, Y. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 145: 797.
- 52) Wooten, M.E. and Wrenn, R.W. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 67
- 53) Bazzi, M.D. and Nelsestuen, G. I. (1987) Biochemistry 26: 1974
- 54) Shearman, M.S. et al (1988) FEBS Lett. 234: 387
- 55) Ciu, R., Boyle, W.J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T. and Karon, M. (1988) Cell 54: 541.
- 56) Larsson, L-G., Ivhed, I., Gidlund, M., Pettersson, U., Vennstrom, B. and Nilsson, K. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2638.
- 57) Ono, Y., Fujii, t., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. and Y. Nishizuka (1988) J. Biol. Chem. 263 (14) : 6927.
- 58) Nishizuka, Y. (1988) Nature 334: 661
- 59) Kosaka, Y., Ogita, K., Ase, K., Nomura, H., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 151(3): 973.
- 60) Huang, K.P., Nakabayashi, H. and Huang, F.L. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 8535.
- 61) Johnston, M. (1987) Nature 328: 353

- 62) Csermely, P., Szamel, M., Resch, K. and Somogyi, J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (14): 6487
- 63) Huang, K-P., Nakabayashi, H. and Huang, F. L. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 83: 8539
- 64) El-Fakahany, E.E., Alger, B.E., Lai, W.S., Pitler, T.A., Worley, P.F. and Baran, J.M. (1988) *FASEB J.* 2: 2575
- 65) Deli, E., Kiss, Z. and Kuo, J.F. (1988) *FEBS Lett.* 231 (2): 407
- 66) Chauhan, V.P.S. and Brockerhoff, H. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155 (1): 18
- 67) Slivka, S.R., Meier, K.E. and Insel, P.A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 12242
- 68) Severin, S.E., Toumasyan, E.K., Shuets, V.I., Molotkovsky, J.G. and Bergelson, L.D. (1988) *FEBS Lett* 232: 286
- 69) Cambier, J.C., Newell, M.K., Justement, L.B., McGuire, J.C., Leach, K.L. and Chen, Z.Z. (1987) *Nature* 327: 629.
- 70) Capitani, S., Girard, P.F., Mazzei, G.J., Kuo, J.F., Berezney, R. and Manzoli, F.A. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142 (2): 367.
- 71) Butler, A.P., Byus, C.V. and Slaga, T.J. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 9421.
- 72) Sibley, D.R., Benovic, J.L., Caron, M.G. and Lefkowitz, R. (1987) *Cell* 48: 913
- 73) Bazzi, M.D., Lampe, P.D., Strasburg, G.M. and Nelsestuen, G.L. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 931: 339.
- 74) Palvimo, J., Mahonen, A. and Menp, P.H. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 931: 376.
- 75) Morris, C. and Rozengurt, E. (1988) *FEBS Lett.* 231 (2): 311.
- 76) Brinkmeier, H. and Jockusch, H. (1987) *Biochem. Biophys. Res.*
- 77) Walaas, S.I., Horn, R.S., Albert, K.A., Adler, A. and Walaas, O. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 968: 127
- 78) Winicov, I. and Gershengorn, M.C. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 12179.
- 79) Hannun, Y., A. and Bell, R.M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (11): 5124.
- 80) Loomis, C.R. and Bell, R.M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (4): 1682.
- 81) Dreher, M.L. and Hanley, M.R. (1988) *TIPS* 9: 114
- 82) Wilkinson, M. and Morris, A. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 498
- 83) Hernández-Sotomayor, S.M.T. and García-Sáinz, J.A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 167: 4889
- 84) Vaartjes, W.J., de Hass, C.G.M. and Van den Bergh, S.G. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138 (3): 1328
- 85) Wolf, M., Le Vine III, H., May Jr. W.S., Cuatrecasas, P. and Sahyoun, N. (1985) *Nature* 317: 546
- 86) García-Sáinz, J.A. and Hernández-Sotomayor, S.M.T. (1987) *Eur. J. Biochem.* 163: 417
- 87) Nambi, P., Whitman, M., Aiyar, N. and Croke, S.T. (1988) *Biochem. J.* 254: 449.
- 88) Chambaut-Guerin, A.M., Thomopoulos, P. (1987) *Eur. J. Biochem.* 170: 381
- 89) Enjalbert, A., Sladeczek, F., Buillon, G., Bertrand, P., Shu, C., Epelbaum, J., García-Sáinz, J.A., Jard, S., Lombard, C., Kordon, C. and Bockaert, J. (1986) *J. Biol. Chem.* 261 (9):

- 4071.
- 90) Yoshimasa, T., Sibley, D.R., Bouvier, M., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1987) *Nature* 327: 67
 - 91) Huckle, W.R., McArdle, C.A. and Conn, P.M. (1988). *J. Biol. Chem.* 263 (7): 3296
 - 92) Menapace, L., Armato, U. and Whitfield, J.F. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 148 (3): 1295
 - 93) Gray, G.M. and Macara, I.G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (22): 10714
 - 94) Moore, J.P., Menzel, G.E., Hesketh, T.R. and Metcalfe, J.C. *FEBS Lett.* 233 (1): 64
 - 95) Pandiella, A., Beguinot, L., Velu, T.J. and Meldolesi, J. (1988) *Biochem. J.* 254: 223
 - 96) Lamph, W.W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P. and Verma, I.M. (1988) *Nature* 334: 629
 - 97) Navre, M. and Ringold, G.M. (1988) *J. Cell Biol.* 107: 279
 - 98) Otte, A.P., Koster, C.H., Snoek, G.T. and Durston, A.J. (1988) *Nature* 334: 618
 - 99) Berry, M.N. and Friend, D.S. (1969) *J. Cell. Biol.* 43: 506
 - 100) Tolbert, M.E.M., White, A.C., Aspry, K., Cutts, J. and Fain, J.N. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 1938
 - 101) Neugebauer, J. (1987) "A Guide to the properties and uses of detergents in Biology and Biochemistry" *Calbiochem. Brand Biochemicals.*
 - 102) Paris, S., Magnaldo, I. and Pouyssegur, J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (23): 11250
 - 103) Ho, A.K., Thomas, T.P., Chik, C.L., Anderson, W.B. and Klein, D.C. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (19): 9292.
 - 104) Hepler, J., Earp, H.S. and Harden, T.K. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (16): 7610
 - 105) Schollmeyer, J.E. (1988) *Science* 240: 911
 - 106) Von Ruecker, A. A., Rao, G. and Bidlingmaier, F. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 151 (3): 997
 - 107) Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982) *J. Biol. Chem.* 257 (13): 7847
 - 108) Liscovitch, M., Slack, B., Blusztajn, J.K. and Wurtman, R.J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262 (36): 17487
 - 109) Narindrasorosak, S., Brickenden, A., Ball, E. and Sanwal, B.D. (1987) *J. Biol. Chem.* 262 (22): 10497
 - 110) Chida, K., Kato, N., and Kuroki, T. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 13013
 - 111) Fournier, A. and Murray, A.W. (1987) *Nature* 330: 767
 - 112) Gopalakrishna, R. and Anderson, W.B. (1987) *FEBS Lett.* 225 (1,2): 233.
 - 113) Azhar, S., Butte, J. and Reaven, E. (1987) *Biochemistry* 26: 7047
 - 114) Shetton, a.D., Monk, P.N., Consalvey, S.D., Huang, S.J., Dexter, T.M. and Downes, C.P. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3284
 - 115) Bouscarel, B., Meurer, K., Decker, C. and Exton, J.H. (1988) *Biochem. J.* 251: 47
 - 116) Thiel, G., Czernik, A.J., Gorelick, F. Nairn, A.C. and Greenaard, P. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6337