

Tesis de Posgrado

Quinasa de proteínas dependientes de calcio/fosfolípidos (PKC) en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Gómez, María Laura

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gómez, María Laura. (1991). Quinasa de proteínas dependientes de calcio/fosfolípidos (PKC) en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2440_Gomez.pdf

Cita tipo Chicago:

Gómez, María Laura. "Quinasa de proteínas dependientes de calcio/fosfolípidos (PKC) en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2440_Gomez.pdf

**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**QUINASA DE PROTEÍNAS DEPENDIENTE DE
CALCIO/FOSFOLÍPIDOS (PKC)
EN EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi***

MARÍA LAURA GÓMEZ

**Tesis presentada para optar por el título de
Doctor en Ciencias Biológicas**

Director: Dra. María Teresa Téllez-Iñón

1991

**Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética
y Biología Molecular (INGEBI-CONICET)**

A mis padres, a
Nicolás, a Marisa y
a Chicha.

Quiero agradecer a todas aquellas personas que hicieron posible que pudiera realizar esta tesis:

A la Dra. María Teresa Téllez-Iñón por la guía y consejo que me proporcionó, y sobre todo por su gran paciencia.

A la Dra. Mirtha M. Flawiá por la confianza que me tuvo cuando empecé a trabajar en el instituto.

Al Dr. Héctor N. Torres por su apoyo durante mi trabajo de tesis.

A la Dra. Mónica Esteva por haberme proporcionado el material para mi trabajo.

Al Dr. Alberto Kornblihtt por todas sus enseñanzas.

A los Dres. Gerardo Glikin, Alejandro Mentaberry, Luis Jiménez de Asúa y Alejandro Paladini por la colaboración prestada en muchos momentos.

A María Julia Alvarez, Tito Contreras, Leonor Acevedo, Mariano Rodríguez, Gabriel Paissan, Irma Gelmi, Luis Acosta, Lidia Parodi y Marta Garibaldi por la ayuda que me prestaron en todo momento.

A Adriana Urman por su excelente trabajo de procesamiento de textos y en especial por su amistad.

A Norberto Malarini por los gráficos de la tesis, pero especialmente por su buen humor de todos los días.

A todos mis compañeros del INGEBI, en especial a Mercedes Goin y Bettina Orman; y a Fernando Bravo, Pablo Rabinowicz, Sandra Ogueta, Gustavo Pesce, Anabella Srebrow, Viviana Bernath, Andrés Muro, Alejandro Schijman, Sonia Lafon, Gabriela Levitus, Laura Moratinos, Rosana Celnik, Silvia Cabral, Pablo Saltz, Alvaro

Estevez, Ximena Ares, Martín Vázquez, Nelson Duseti, Nora Paños, Dan Kaplan, Alfredo Panebra y Florencia Rodríguez por lo compartido durante todo este tiempo.

A todos los compañeros que en este momento están muy lejos: Leonardo Erijman, Daniel Altschuler, Ricardo Attar, Guillermo Taccioli, Eric Grotewold y Javier Cáceres.

A los integrantes del laboratorio 209: Rita Ulloa y Marisa Farber y al staff masculino: Horacio Martinetto, Jorge Muschietti, Omar Coso, Alberto Díaz y Diego Fraidenraich por su compañerismo y por haberme aguantado durante tanto tiempo.

A mis más recientes amigas: Teresa Arnedo y Trinidad Angosto.

A mis amigas de mucho tiempo: Ana Pastini y Claudia Ochatt.

A mi Gran amiga Graciela Bianchini, por todos los momentos compartidos durante muchos años.

Y finalmente y muy especialmente quiero agradecer a mis padres, porque sin su ayuda, aliento y comprensión no podría haber terminado esta tesis.

Este trabajo fue realizado gracias al aporte de la Organización Mundial de la Salud, Programa Especial para Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

"(...) Usted, querido señor, es tan joven, está tan lejos de toda iniciación, que quisiera encarcelarle, tanto como puedo, que tenga paciencia frente a todo lo no resuelto en su corazón y que trate de amar los problemas mismos como a cerrados aposentos y como a libros escritos en un idioma muy extraño. No busque ahora respuestas; no le pueden ser dadas porque no podría vivirlas. Y de eso se trata: vivirlo todo. Viva usted ahora los problemas. Viviéndolos tal vez en un lejano día, poco a poco, sin advertirlo, penetre en la respuesta. Quizá lleve en usted la posibilidad de formar, de crear: modo de vida particularmente venturoso y puro. Edúquese para esto... pero reciba con gran confianza lo que sobrevenga y, con tal de que ello proceda de su voluntad, de alguna necesidad profunda, tómelo sobre sí y no reniegue de nada (...)"

(De Cartas a un joven poeta, de Rainer M. Rilke)

I N D I C E

Pág.

ABREVIATURAS

INTRODUCCION

1.	Enfermedad de Chagas	1
1.1.	Enfermedad.....	1
1.2.	La Historia.....	2
2.	<u>Trypanosoma cruzi</u>	3
2.1.	Ubicación sistemática.....	3
2.2.	Ciclo de vida.....	5
3.	Sistemas de transducción de señales	6
3.1.	Eucariotes superiores.....	6
3.2.	Eucariotes inferiores.....	11
4.	Quinasa de proteínas tipo "C" (PKC)	12
4.1.	Generalidades.....	12
4.2.	Distribución de la enzima.....	14
4.3.	Heterogeneidad molecular de la PKC (Isoformas).....	16
4.3.1.	Estructura de las PKC- α , β y γ	16
4.3.2.	Estructura de las PKC- δ , ϵ , ζ , η y L.....	19
4.3.3.	Papel de las regiones ricas en cisteínas y de la región de pseudosustrato en la activación de la PKC.....	21
4.3.4.	Propiedades y expresión de las PKC- α , β y γ	27
4.3.5.	Propiedades y expresión de las nPKCs (δ , ϵ , ζ , η y L).....	37
4.3.6.	Isoformas de PKC en <i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Drosophila melanogaster</i>	45
5.	Metabolismo de los inositol fosfolípidos y transducción de señales	47
5.1.	Generalidades.....	47
5.2.	Inositol-1,4,5 trisfosfato como segundo mensajero.....	49
5.3.	Receptor de IP ₃	50
5.4.	Caminos enzimáticos.....	51
5.4.1	Fosfolipasa C.....	54
5.4.2	Proteínas G.....	59
5.4.3	Activación de las PLCs.....	63
6.	Ciclo de fosfatidilcolina y transducción de señales	63
6.1	Hidrólisis de fosfatidilcolina inducida por agonistas.....	65
6.2.	Biosíntesis de fosfatidilcolina.....	66
6.3	Transducción de señales por productos de hidrólisis de fosfatidilcolina.....	67
7.	Esteres de forbol y promoción de tumores	67
8.	Activación, regulación y funciones de la PKC	71
8.1.	Interacción de la PKC con Ca ²⁺	71

8.2.	Activación <i>in vitro</i> de la PKC.....	72
8.3.	Especificidad de sustrato.....	73
8.4.	Sustratos <i>in vitro</i>	74
8.5.	Sustratos <i>in vivo</i>	77
8.6.	Regulación de la PKC por inhibidores naturales.....	79
8.7.	Autofosforilación de la PKC.....	81

MATERIALES Y METODOS

1.	Organismos y condiciones de cultivo.....	84
2.	Homogeneización y fraccionamiento.....	84
3.	Purificación de fracción de membranas de <u>Trypanosoma cruzi</u>	85
4.	Fraccionamiento subcelular.....	85
5.	Ensayos enzimáticos.....	86
5.1.	Quinasa de proteínas dependientes de Ca ²⁺ / fosfolípidos (PKC).....	86
5.2.	Medición simultánea de autofosforilación de PKC y de fosforilación del péptido GS (1-12).....	87
5.3.	Unión de ésteres de forbol.....	88
5.4.	Otras determinaciones realizadas.....	88
6.	Preparación del sustrato radioactivo para las quinasas de proteínas.....	90
7.	Purificación de quinasa de proteínas tipo "C" (PKC) del extracto soluble de <u>Trypanosoma cruzi</u>	91
7.1.	Cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa).....	91
7.2.	Cromatografía hidrofóbica en Fenil-Sefarosa.....	92
7.3.	Cromatografía en hidroxilapatita.....	92
7.4.	Cromatografía de afinidad en anticuerpo anti-PKC-sefarosa.....	93
7.4.1.	Preparación de anticuerpo anti-PKC-sefarosa.....	93
7.4.2.	Cromatografía en Anticuerpo-antiPKC-sefarosa.....	93
8.	Purificación de PKC de membranas de <u>Trypanosoma cruzi</u>	93
9.	Purificación de quinasa de proteínas tipo "C" de cerebro bovino (PKCBb).....	94
10.	Purificación parcial del "inhibidor" de PKC.....	95
10.1.	Cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa).....	95
10.2.	Cromatografía de filtración molecular (Ultrogel AcA34).....	95
11.	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	95
11.1.	Preparación de los geles.....	95
11.2.	Preparación de las muestras y corrida electroforética.....	96
12.	Fosforilación en geles de poliacrilamida.....	96
13.	<u>Western blot</u>	97
14.	Inmunoprecipitación con anticuerpos específicos.....	98

RESULTADOS Y DISCUSION

1.	Distribución subcelular de la quinasa de proteínas "C" (PKC) en <u>Trypanosoma cruzi</u>	101
2.	Purificación de la PKC de fracción citosólica.....	104
2.1.	Cromatografía en DEAE-Celulosa.....	104
2.2.	Cromatografía en Fenil-Sefarosa.....	106
2.3.	Cromatografía de afinidad en anticuerpo anti-PKC-sefarosa.....	108
3.	Caracterización de la PKC soluble de <u>Trypanosoma cruzi</u>	109
3.1.	Activación de la enzima.....	109
3.1.1.	Activación por Ca ²⁺	109
3.1.2.	Activación por PS y DG.....	114
3.2.	Especificidad de sustrato.....	117
3.3.	Curva de Mg ²⁺	120
3.4.	Curva de ATP.....	122
3.5.	Inhibidores de PKC.....	123
3.6.	Activación de la PKC por proteólisis.....	125
4.	Purificación de PKC de fracción particulada de <u>Trypanosoma cruzi</u>	126
5.	Unión de ésteres de forbol a fracciones particuladas de <u>T. cruzi</u>	128
6.	Cromatografía en hidroxilapatita.....	132
7.	Caracterización de las isoformas de PKC de <u>Trypanosoma cruzi</u>	132
7.1.	Activación por ácido araquidónico.....	133
7.2.	Autofosforilación.....	135
8.	Caracterización inmunológica de la PKC.....	138
9.	Purificación de una proteasa dependiente de Ca ²⁺	141

CONCLUSIONES.....	146
-------------------	-----

BIBLIOGRAFIA.....	148
-------------------	-----

ABREVIATURAS

5-HT.....	5-hidroxitriptamina
AA.....	ácido araquidónico
ACTH.....	hormona adenocorticotrofina
AMPc.....	3'-5' adenosina monofosfato cíclico
CaBP.....	proteína que une Ca ²⁺
CaM.....	calmodulina
CT.....	CTP:fosfocolina citidil transferasa
DG.....	diacilglicerol
EGF.....	factor de crecimiento epidérmico
G3P.....	glicerol-3-fosfato
GDP.....	guanosina difosfato
GMPc.....	3'-5' guanosina monofosfato cíclico
GnRH.....	hormona liberadora de gonadotrofina
GTP.....	guanosina trifosfato
IP.....	inositol-1-fosfato
IP ₂	inositol-1,4-bisfosfato
IP ₃	inositol 1,4,5-trisfosfato
liso-PC.....	liso-fosfatidilcolina
OAG.....	1-oleoil-2-acetilglicerol
PA.....	ácido fosfatídico
PAF.....	factor activador de plaquetas
PC.....	fosfatidilcolina
PDBu.....	forbol 12,13-dibutirato
PDGF.....	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI.....	fosfatidilinositol

PIP.....fosfatidilinositol 4-fosfato
PIP₂.....fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKA.....quinasa de proteínas dependiente de AMPc
PKC.....quinasa de proteínas dependiente de
 fosfolípidos y Ca²⁺
PL.....fosfolípidos
PLA₂.....fosfolipasa A₂
PLC.....fosfolipasa C
PLD.....fosfolipasa D
PMA.....forbol 12-miristato-13-acetato
PS.....fosfatidilserina
TnC.....troponina C
TRH.....hormona liberadora de tirotrófina

INTRODUCCION

1. ENFERMEDAD DE CHAGAS

1.1. Enfermedad

La enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria, cuyo agente causal es un protozoario, denominado *Trypanosoma cruzi*. Este es vehiculizado por un insecto que se alimenta de sangre, conocido científicamente con el nombre de *Triatoma infestans*, y popularmente en nuestro medio y regiones de idioma quichua con el nombre de vinchuca.

El parásito *Trypanosoma cruzi* efectúa parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo de la vinchuca. El período final de su evolución se realiza en la parte terminal del intestino del insecto y durante la picadura y succión de sangre por aquél se produce la expulsión de tripanosomas a la piel; el prurito y rascado posterior facilitan su penetración y vehiculización a la circulación sanguínea.

La enfermedad se vincula a un cuadro agudo, más o menos inmediato y a otro crónico, alejado y de mucha mayor importancia. El primero puede no advertirse en una gran mayoría de casos, aunque lleguen a darse manifestaciones cardíacas transitorias; en general, se resuelve hacia la curación completa, lo que depende, entre otras cosas, del estado físico previo del individuo infectado.

Desde esa fase aguda, que es inaparente o que presenta manifestaciones mínimas, en otras circunstancias se pasa lentamente a la más seria que es la fase crónica: entonces, se producirán lesiones en el corazón, en el aparato digestivo y en el sistema nervioso central.

Esta enfermedad es estrictamente americana y no guarda relación en ningún aspecto con su homónima africana. Se extiende desde el sur de Estados Unidos, particularmente en los estados de Califor-

nia y Texas, hasta el sur de nuestro país considerándose como límite de su extensión el paralelo 43° S; descontando algunas áreas del Caribe que están exentas de ella.

Se ha considerado a la enfermedad de Chagas como una enfermedad socioeconómica típica, inseparable de la pobreza y el subdesarrollo por la vinculación entre la proliferación de los insectos y las viviendas precarias donde pueden guarecerse, proliferar y alimentarse. También se ha vinculado a la enfermedad con alteraciones ecológicas producidas por desmontes masivos y a una ubicua adaptación de los insectos hospedadores de la tripanosomiasis no sólo en los domicilios sino también en los peridomicilios.

1.2. La Historia

Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, médico brasileño, fue comisionado por el Ministerio de Salud Pública de Brasil para estudiar la presencia de focos de paludismo en el nordeste de Brasil, más específicamente en la población de Lassance, perteneciente al estado de Minas Gerais. Cuando estudiaba esa población en 1909 (Chagas, 1909) halló enfermos que en la sangre presentaban un parásito, *Trypanosoma*, al cual denominó *cruzi* en honor al investigador y epidemiólogo brasileño Oswaldo Cruz. Estas personas presentaban diversas alteraciones clínicas, fundamentalmente cardíacas y en el aparato digestivo; además, sufrían agrandamiento de la glándula tiroidea, bocio.

Entre sus investigaciones, logró infectar y reproducir en monos la enfermedad que él observaba en humanos, mediante la inoculación de tripanosomas que había hallado en la sangre de los pacientes.

En 1912, Carlos Chagas viajó a Buenos Aires y presentó en los ambientes científicos porteños la enfermedad por él descubierta y el resultado de sus estudios efectuados en Brasil. Su visita le significó críticas científicas y una desilusión personal, ya que

se le demostró el error de haber incluido como manifestación específica de la nueva tripanosomiasis recién descrita, a enfermos con alteraciones de la glándula tiroidea. Ocurría que esa patología correspondía a otras entidades y estados pluricarenciales de la región en la que Chagas efectuó el descubrimiento. Se suponía entonces que la tripanosomiasis era un hallazgo casual y que no representaba necesariamente una enfermedad.

Salvador Mazza, médico argentino con formación en bacteriología y patología, no había sido indiferente, a la inversa de muchos, a los estudios de Carlos Chagas y a su transitorio fracaso en Buenos Aires. Quizá todos los datos aislados, aunque contradictorios, que había escuchado sobre la nueva enfermedad y sus propias investigaciones en animales, lo llevaron a sugerir la creación de un instituto en nuestro país que se dedicara a estudiar las enfermedades propias de la región.

En el año 1926, Mazza organizó la primera sociedad científica de Jujuy. En los meses y años siguientes se van creando sucesivas filiales de esa primitiva sociedad en distintas provincias. En 1928 se crea oficialmente la "Misión de Estudios de la Patología Regional Argentina" (MEPRA). La MEPRA no sólo ratificó la enfermedad de Chagas cuando ésta era negada internacionalmente y en especial en el orden nacional, sino que logró grandes adelantos en el estudio de los síntomas y lesiones causados por la enfermedad. En resumen, ratificó lo efectuado por Carlos Chagas.

2. Trypanosoma cruzi

2.1. Ubicación sistemática

El *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas (Trypanosomiasis americana). Su ubicación sistemática es la siguiente (Hoare, 1972; Levine *et al*, 1980):

Tipo: Protozoa (Goldfuss, 1818)
Subtipo: Sarcomastigophora (Honigberg y Balamuth, 1963)
Superclase: Mastigophora (Dresing, 1866)
Clase: Zoomastigophora (Calkins, 1909)
Orden: Kinetoplastida (Honigberg, 1963; emend Vickerman, 1976)
Suborden: Trypanosomatina (Kent, 1880)
Familia: Trypanosomatidae (Doflein, 1901)
Género: Trypanosoma (Gruby, 1843)
Subgénero: Schizotrypanum (Chagas, 1909)
Especie: cruzi (Chagas, 1909)

La familia Trypanosomatidae se caracteriza por poseer un flagelo y un cinetoplasto únicos. En el género *Trypanosoma* están comprendidos parásitos digenéticos que tienen en uno de sus estadios de desarrollo la forma tripomastigote. Este género (Hoare 1972) se divide en dos secciones: Salivaria y Estercoraria. En la primera están comprendidos tripanosomas patógenos que se multiplican en el estadio tripomastigote en el mamífero, completan el desarrollo en la parte anterior del vector, y son transmitidos por inoculación.

En la segunda se agrupan especies no patógenas (con excepción de *Trypanosoma cruzi*). Se multiplican en el mamífero como amastigote o epimastigote, completan su desarrollo en la parte posterior del vector y son transmitidos por contaminación.

En esta clasificación existen excepciones: el *Trypanosoma equiperdum* perteneciente a la sección Salivaria, que se transmite directamente de mamífero a mamífero; y el *Trypanosoma rangeli*,

perteneciente a la sección Estercoraria, que completa su desarrollo en la parte anterior del vector y es transmitido por inoculación.

En cuanto al subgénero *Schizotrypanum*, éste sólo se encuentra en el hemisferio occidental. Infecta a más de cien especies de mamíferos, pertenecientes a los órdenes Marsupialia, Edentata y Rodentia y también a los Primates, Carnivora, Lagomorpha, Artiodactyla y Chiroptera, y pueden transmitirlos más de ochenta especies de triatómidos.

2.2. Ciclo de vida

Trypanosoma cruzi presenta 3 estadios morfológicos relacionados con el ciclo de vida: la forma amastigote no flagelada y las formas epimastigote y tripomastigote flageladas.

El amastigote y el epimastigote se pueden multiplicar; en cambio, el tripomastigote no tiene capacidad de multiplicarse, pero es la forma infectiva.

El ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* involucra el desarrollo dentro de dos huéspedes: un huésped definitivo (mamífero) y un huésped intermediario (insecto vector)(Figura 1).

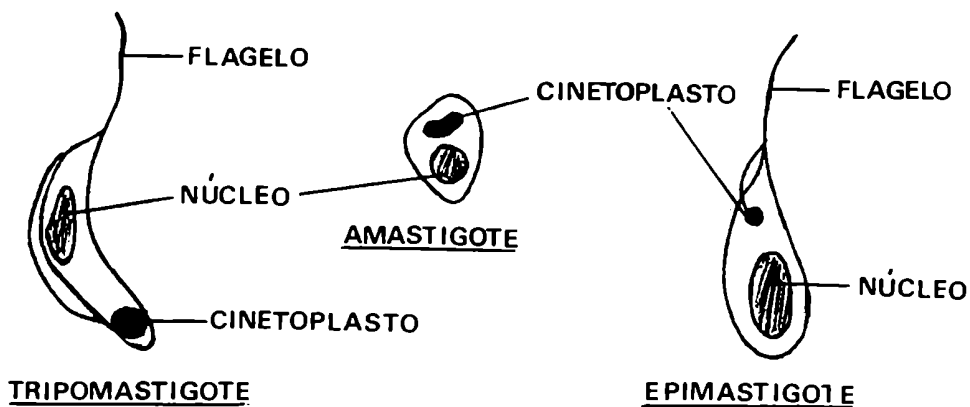


Figura 1: Diagrama de las formas morfológicas de *T. cruzi* (Esquema publicado en el Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, marzo 1976).

Los epimastigotes proliferan en el insecto vector y eventualmente se diferencian en el recto a la forma tripomastigote metacíclico. Cuando los tripomastigotes metacíclicos contenidos en las heces del insecto penetran en el huésped mamífero, no se multiplican en la sangre sino que invaden células de varios tejidos (músculo cardíaco e intestino) y se diferencian a amastigotes y pasan a través de varios ciclos de división.

Los amastigotes finalmente se diferencian a tripomastigotes que son liberados por ruptura de la célula huésped, reingresando en la corriente sanguínea. Podrán entonces infectar nuevas células o podrán ser ingeridos por el insecto vector, cuando éste de alimento de la sangre del mamífero infectado.

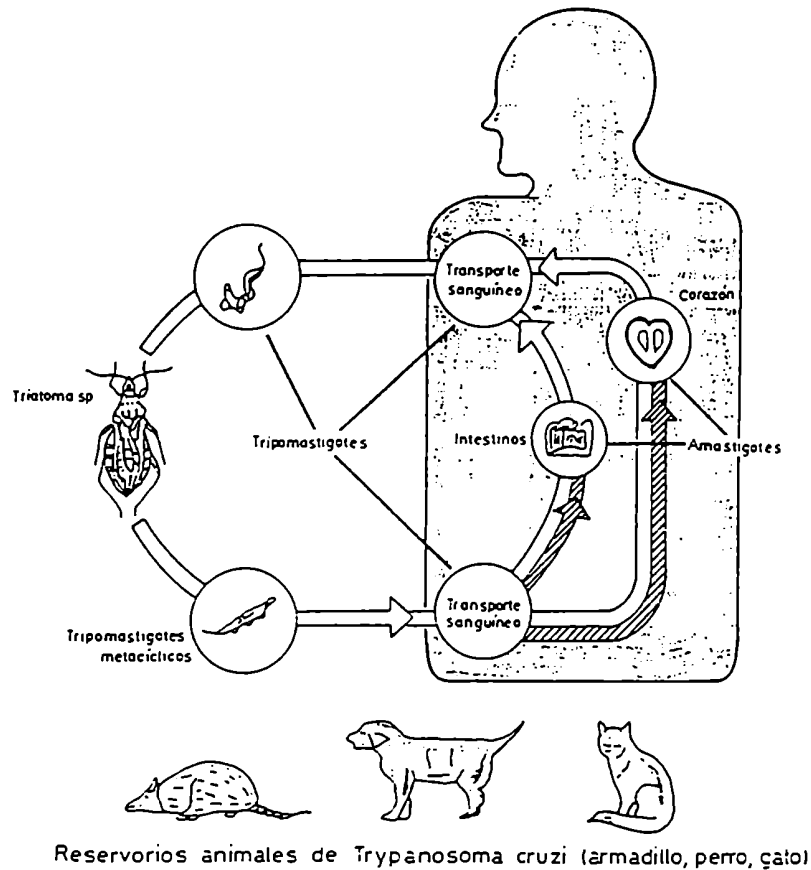
Los tripomastigotes sanguíneos provenientes del mamífero se diferencian a epimastigotes al llegar al intestino medio del insecto vector y así se completa el ciclo (Figura 2).

3. SISTEMAS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES

3.1. Eucariotes superiores

En la superficie externa de las células existen antenas moleculares, llamadas receptores, que reciben señales externas y activan determinados caminos que regulan procesos celulares tales como secreción, contracción, metabolismo y crecimiento. La principal barrera en este flujo de información es la membrana plasmática, donde los mecanismos de transducción traducen las señales externas en señales internas que son llevadas por "segundos mensajeros".

Desde el punto de vista molecular este proceso depende de determinadas proteínas ubicadas en la membrana celular, que transmiten información induciendo cambios conformacionales en otra proteína. Más adelante esta información es transmitida a moléculas pequeñas o a iones ubicados en el citoplasma celular. Estos son los segundos mensajeros, que al difundirse permiten que la señal se propague rápidamente a través de la célula.



▨ Los parásitos también permanecen en los intestinos o en el corazón.

Figura 2: Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* (Sacado de Tropical Disease Research: TDR Eight Programme Report. UNDP/WORLD BANK/WHO, Geneva, 1987).

Se conocen dos caminos principales de transducción de señales. En uno de ellos el segundo mensajero es el AMP cíclico y el otro utiliza una combinación de segundos mensajeros que incluyen iones Ca^{2+} , inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol (DG).

Estos dos caminos tienen muchas características en común. En ambos una molécula receptora ubicada en la superficie celular transmite información a través de la membrana plasmática hacia el

interior de la célula por intermedio de una familia de proteínas G, que solamente se activan cuando unen GTP. Estas proteínas G activan una enzima "amplificadora" que está ubicada en la cara interna de la membrana. Esta enzima convierte precursores en segundos mensajeros. Por regla general estos precursores están fosforilados. Por ejemplo la enzima "amplificadora" adenilil ciclasa convierte ATP en AMP cíclico, mientras que la enzima "amplificadora" fosfolipasa C (PLC) cliva el lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) en DG e IP₃.

En los dos caminos los estadios finales son similares: los segundos mensajeros inducen cambios estructurales en proteínas celulares. Los segundos mensajeros pueden actuar principalmente de dos maneras. En una actúa directamente uniéndose a una proteína, lo que induce un cambio conformacional en la misma. En la otra el segundo mensajero actúa indirectamente, activando una quinasa de proteínas que fosforila otra proteína; esta última es la que sufre un cambio conformacional.

El camino que utiliza al AMP_c como segundo mensajero involucra dos tipos de proteínas G, una estimulatoria (G_s) y la otra inhibitoria (G_i)(Figura 3a).

En este camino el último paso está mediado por una quinasa de proteínas, la PKA, que fosforila una proteína particular cuando es activada por AMP_c. La PKA está constituida por 2 subunidades, una catalítica y la otra regulatoria. El AMP_c se une a la subunidad regulatoria, liberando a la catalítica que está libre para fosforilar proteínas.

En el otro camino interviene el fosfatidilinositol, un típico fosfolípido situado primariamente en la parte interna de la bicapa lipídica (Figura 3b).

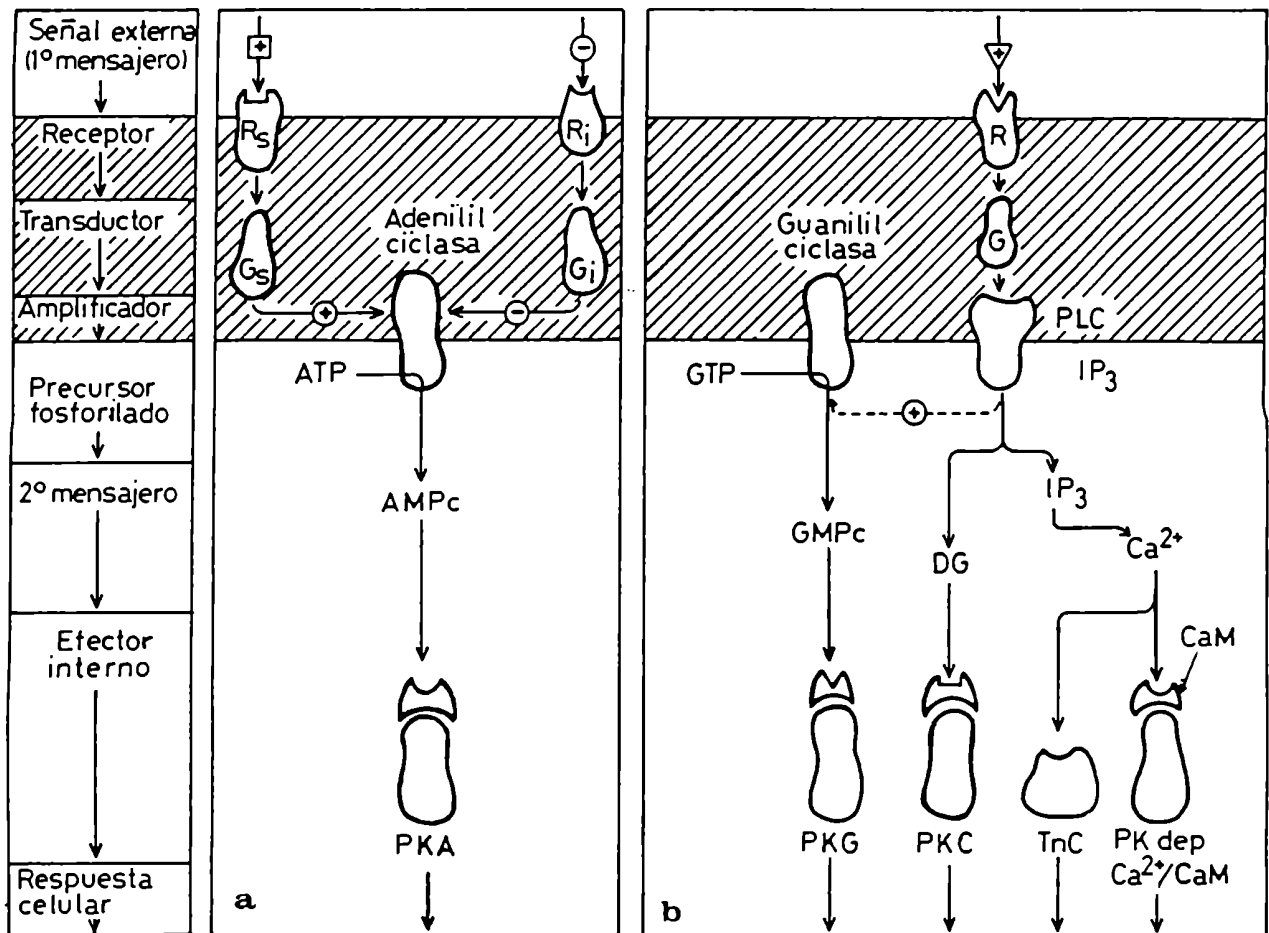


Figura 3: Caminos de transducción de señales celulares

a: camino que utiliza el AMPc.

b: camino de hidrólisis de los fosfoinosítidos.

Este se convierte en el PIP₂ que tiene 3 grupos fosfato en lugar de 1, como todos los lípidos de membrana. En este caso una proteína G acopla los receptores de membrana a una proteína amplificadora, la PLC (Litosch y Fain, 1986; Cockcroft, 1987; Smrcka *et al*, 1991). Esta última proteína cliva al PIP₂ dando como resultado DG e IP₃.

El DG interactúa con la quinasa de proteínas C (PKC). Esta enzima

requiere Ca^{2+} y fosfolípidos para su actividad. El DG al unirse a la PKC la activa, aumentando la afinidad de la misma por el Ca^{2+} y los fosfolípidos, fosforilando distintos sustratos celulares.

El IP_3 se une a un receptor de membrana intracelular (Supattapone *et al*, 1988) provocando la liberación de Ca^{2+} al citosol. El Ca^{2+} liberado se une a una familia de proteínas, que incluyen calmodulina (CaM) y troponina C (TnC). A su vez, la calmodulina activa a una quinasa de proteínas, y la troponina C estimula directamente la contracción muscular.

La calmodulina, proteína ubicua y multifuncional, que une calcio en el rango de concentración micromolar, es la transductora de la acción del ión, activando un variado grupo de enzimas (Klee *et al*, 1980). Estas enzimas cumplen a veces, reacciones de una misma ruta metabólica, en direcciones opuestas, por ejemplo: la activación de la adenilato ciclasa (Salter *et al*, 1981) y de la fosfodiesterasa del nucleótido cíclico (Sharma *et al*, 1980).

También han sido descritas quinasas de proteínas dependientes de calcio/calmodulina, como por ejemplo: la quinasa de la cadena liviana de la miosina (Adelstein y Klee, 1981) y la fosforilasa quinasa (Carlson *et al*, 1979).

Estudios recientes sugieren que la fosforilación de proteínas en varios tejidos está regulada por el complejo calcio/calmodulina (Schulman y Greengard, 1978; Alper *et al*, 1980; Landt y McDonald, 1980). Por ejemplo, en cerebro la calmodulina estimula la fosforilación de un gran número de proteínas solubles (Walaas *et al*, 1983; O'Callaghan *et al*, 1980) y de proteínas asociadas a membranas (Schulman y Greengard, 1978; Walaas *et al*, 1983). Es probable que la diversidad de fosforilaciones dependientes de calcio/calmodulina esté mediada por una familia de quinasas de proteínas (Adelstein y Klee, 1981; Carlson *et al*, 1979; Yamauchi y Fujisawa, 1980; Kennedy y Greengard, 1981; Ahmad *et al*, 1982), algunas de las cuales serían específicas de sustrato (Adelstein y Klee,

1981; Carlson *et al*, 1979).

3.2. Eucariotes inferiores

En eucariotes inferiores, a diferencia de lo que ocurre en eucariotes superiores, la modulación del metabolismo por señales extracelulares es en general un proceso muy poco conocido.

En tripanosomas, se ha postulado que el AMP_c está relacionado con la diferenciación de los parásitos *in vivo* (Strickler y Patton, 1975; Mancini y Patton, 1981). Sin embargo, aún no está aclarado qué papel cumpliría dicho nucleótido cíclico en estos eucariotes. La enzima que sintetiza este nucleótido, la adenilil ciclasa, fue descrita en *Trypanosoma brucei* (Voorheis y Martin, 1980, 1981, 1982) y en *Trypanosoma cruzi* (da Silveira *et al*, 1977; Eisenchlos *et al*, 1986a, 1986b). También se detectó en Tripanosomátidos la fosfodiesterasa que hidroliza al nucleótido cíclico: en *T. gambiense* (Walter y Hoppe-Seyler's, 1974), en *T. brucei* (Walter y Opperdoes, 1982) y en *T. cruzi* (Gonçalves *et al*, 1980; Téllez-Iñón *et al*, 1985).

En Tripanosomátidos también se encontró una proteína que une específicamente al nucleótido cíclico y cuya función no se conoce (Rangel-Aldao *et al*, 1983, 1984, 1985). En *T. cruzi* se describió una actividad de quinasa de proteínas dependiente de AMP_c (Ulloa *et al*, 1988). De acuerdo a estos resultados, la acción del nucleótido en Tripanosomátidos estaría mediada de la misma manera que en eucariotes superiores.

En los últimos años, no sólo se determinó la importancia de los niveles de calcio en el control de muchos sistemas enzimáticos, sino que se demostró que el mismo puede ser mediador (segundo mensajero) intracelular, de varias señales que actúan a nivel de la membrana de las células (Means y Chafouleas, 1982).

En el protozoario ciliado *Paramecium*, al menos dos procesos bien conocidos, el movimiento de cilias y la exocitosis, son sensibles

a los niveles de calcio. El ión Ca^{2+} influye en el movimiento de cilias y flagelos en una variedad de protozoarios (Naitoh y Kaneko, 1972; Holwill y McGregor, 1975). Es posible que algunos o todos los efectos del Ca^{2+} sobre el movimiento de las cilias estén mediados a través de fosforilaciones de proteínas dependientes de Ca^{2+} . En *Chlamydomonas*, por ejemplo, el Ca^{2+} juega un papel importante en la fototaxis y en el control de la ondulación del flagelo (Stavis y Hirschberg, 1973; Schmidt y Eckert, 1976).

En *Paramecium tetraurelia* han sido descritas dos actividades de quinasa de proteínas dependientes de Ca^{2+} , independientes de calmodulina o lípidos (Gundersen y Nelson, 1987).

Con respecto a calmodulina en eucariotes inferiores, ésta ha sido descrita en *Trypanosomas* africanos (Ruben et al, 1983) y en *T. cruzi* (Télliez-Iñón et al, 1984). En cuanto a quinasas de proteínas dependientes de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ se encontraron en *Saccharomyces cerevisiae* (Londesborough y Nuutinen, 1987), en *Aspergillus nidulans* (Bartelt et al, 1988) y en *Neurospora crassa* (Ulloa et al, 1991).

Recientemente han sido descritas quinasas dependientes de $\text{Ca}^{2+}/$ fosfolípidos en: *Neurospora crassa* (Favre y Turian, 1987), *Saccharomyces cerevisiae* (Ogita et al, 1990), *Dictyostelium discoideum* (Ludérus et al, 1989) y también en los protozoarios parásitos *Trypanosoma cruzi* (Gómez et al, 1989) y *Trypanosoma brucei* (Keith et al, 1990).

4. QUINASA DE PROTEINAS TIPO "C" (PKC)

4.1. Generalidades

Desde su descubrimiento en 1977 (Inoue et al, 1977), la PKC se ha convertido en el foco de atención de los investigadores interesados en la tumorigénesis y en los mecanismos por los cuales se

transmiten las señales externas al interior de las células.

La PKC es una enzima dependiente de calcio y fosfolípidos, y es activada por diacilglicerol (Takai *et al*, 1979; Kishimoto *et al*, 1980). El diacilglicerol está normalmente ausente de las membranas celulares, pero es producido a partir de inositol fosfolípidos en respuesta a señales extracelulares. Pequeñas cantidades de diacilglicerol incrementan la afinidad de la PKC por el calcio, activando totalmente a la enzima sin variación en los niveles de calcio intracelular (Kishimoto *et al*, 1980; Kaibuchi *et al*, 1981; Nishizuka, 1984).

En reacciones enzimáticas *in vitro*, varios diacilgliceroles sintéticos son capaces de activar a la PKC. Los diacilgliceroles con dos cadenas de ácidos grasos largos, como la dioleína, no pueden ser intercalados fácilmente en las membranas celulares, pero si uno de los ácidos grasos es reemplazado por un grupo acetilo, el diacilglicerol resultante (1-oleoil-2-acetilglicerol, OAG) puede ser dispersado fácilmente en la membrana lipídica y activar a la PKC en células intactas (Kaibuchi *et al*, 1983).

La enzima consiste en una única cadena polipeptídica de 77 kDa, compuesta por dos dominios funcionalmente diferentes que pueden ser separados por tiol proteasas dependientes de calcio (Kikkawa *et al*, 1982; Kishimoto *et al*, 1983). Uno de los dominios es hidrofóbico y se une a membranas; el otro es hidrofílico y lleva el centro activo. Este último fragmento es activo aun en ausencia de Ca^{2+} , fosfolípidos y diacilglicerol.

In vitro, la PKC tiene un amplio rango de sustratos, fosforilando residuos serina y treonina; no así, residuos tirosina (Nishizuka, 1980; Takai *et al*, 1982). No se conoce aún la naturaleza de los sustratos fisiológicos de la quinasa de proteínas "C" en casi todos los tejidos investigados.

4.2. Distribución de la enzima

La PKC está ampliamente distribuida en tejidos y órganos de mamíferos (Inoue *et al*, 1977; Nishizuka, 1980; Kuo *et al*, 1980; Kikkawa *et al*, 1982; Minakuchi *et al*, 1981); el cerebro es el órgano donde hay mayor actividad enzimática. En cerebro, una gran proporción de la enzima está asociada a las membranas sinápticas, mientras que en otros tejidos la enzima está presente principalmente en la fracción soluble como forma inactiva (Kikkawa *et al*, 1982). Cuando las células son estimuladas, la PKC se translocaría a las membranas (Kraft y Anderson, 1983). Sin embargo, no se conoce su exacta ubicación intracelular debido a que la extracción de la enzima usualmente se realiza en presencia de altas concentraciones de quelantes de Ca^{2+} para prevenir la proteólisis por proteasas dependientes del catión.

En condiciones de arresto del crecimiento celular, el porcentaje de PKC unido a membranas es muy bajo, probablemente debido a que la enzima se disocia de las membranas al remover el calcio. Mediante procedimientos inmunocitoquímicos, con anticuerpos monoclonales anti PKC, se demostró que la enzima está ausente en el núcleo (Kikkawa *et al*, 1986). Aunque recientemente se demostró que al tratar células NIH3T3 con el éster de forbol, PMA, aumentaba específicamente la PKC en el núcleo (Leach *et al*, 1989). En núcleos de hígado de rata ha sido purificada parcialmente una quinasa de proteínas C que es reconocida por un anticuerpo policlonal anti-PKC de rata, revelándose una banda entre 80 y 82 kDa (Masmoudi *et al*, 1989).

La PKC tendría un rol importante en la regulación del crecimiento y diferenciación celulares en tejidos de mamíferos (Kuo *et al*, 1980) y también en otros metazoarios incluyendo a *Drosophila* (Rosenthal *et al*, 1987) y a *Caenorhabditis elegans* (Tabuse y Mirva, 1983; Maruyana y Brenner, 1991).

Es posible que la PKC tenga un rol similar en plantas. En zapa-

llitos italianos, *zucchini*, se demostró activación de la fosforilación de histonas en presencia de fosfatidilserina (Schafer *et al*, 1985). En cultivos de células de trigo se purificó y caracterizó parcialmente una quinasa de proteínas tipo "C" y se demostró que existen proteínas endógenas que sirven como sustrato de esta enzima (Olah y Kiss, 1986).

Michell en 1975 describió en hongos la presencia de polifosfoinosítidos, pero su significado no fue investigado en ese momento. Posteriormente, en el hongo *Neurospora crassa* se demostró la existencia de PKC y se la caracterizó parcialmente (Favre y Turian, 1987). Esta enzima es acídica, requiere calcio en el rango micromolar para su actividad y entre los lípidos ensayados la fosfatidilserina es el mejor activador. La principal diferencia con la enzima de tejidos de mamíferos fue la aparente falta de efecto del diacilglicerol y de los ésteres de forbol en la activación de la misma.

En otro hongo, *Saccharomyces cerevisiae* ha sido descrita una actividad de quinasa de proteínas tipo C (Ogita *et al*, 1990) codificada probablemente por un gen llamado PKC1 que es esencial para su división celular (Levin *et al*, 1990). La PKC de este hongo no es activada por ésteres de forbol, como la de mamíferos.

En el hongo *Dictyostelium discoideum* se describió una actividad de quinasa de proteínas regulada por Ca^{2+} , fosfatidilserina y diacilglicerol, y estimulada por ésteres de forbol (Ludérus *et al*, 1989).

En *Trypanosoma brucei* se ha descrito un polipéptido que tiene homología con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) de mamíferos (Hide *et al*, 1989). En células de mamíferos, cuando un ligando se une al receptor de EGF se produce una cascada de reacciones que llevaría finalmente a la activación de la PKC. Entonces, la presencia en *Trypanosoma brucei* de una proteína homóloga al receptor de EGF y de una proteína tipo PKC (Keith

et al, 1990) sugiere que el crecimiento y diferenciación de estos parásitos serían controlados de manera similar que en mamíferos.

4.3. Heterogeneidad Molecular de la PKC (Isoformas)

La enzima PKC fue descrita por primera vez en el año 1977 (Inoue *et al*, 1977; Takai *et al*, 1977; Nishizuka y Takai, 1982). La PKC es una quinasa de proteínas específica de serina y treonina, dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos para su activación (Ullrich *et al*, 1984, 1985; Coussens *et al*, 1985).

Inicialmente, la PKC fue purificada como una única enzima, pero ahora se la conoce como a una familia de enzimas muy relacionadas (Nishizuka, 1988). En cerebro de varias especies de mamíferos han sido identificadas, por técnicas de clonado molecular, 7 subtipos de PKC, PKC- α , β_1 , β_{11} , γ , δ , ϵ y ζ (Nishizuka, 1988).

Recientemente, han sido identificados otro dos subtipos: el primero, PKC- η en pulmones y piel de ratón (Osada *et al*, 1990), y el segundo, PKC-L, que se expresa en pulmones, piel y corazón humanos (Bacher *et al*, 1991).

Mediante cromatografía en columna de hidroxilapatita han sido identificados, a partir de preparaciones de cerebros de conejo, mono y rata (Jaken y Kiley, 1987; Huang *et al*, 1987; Huang *et al*, 1986a) y de corazón de rata (Qu *et al*, 1991) tres subtipos de PKC. Estos 3 subtipos son denominados PKC tipo I, II y III.

Basados en análisis inmunoquímicos se ha demostrado que las PKCs tipo I, II y III son los productos de los cDNAs γ , β_1/β_{11} y α respectivamente. Las enzimas nativas codificadas por los cDNAs δ , ϵ , ζ , η y L todavía no han sido identificadas (Huang *et al*, 1989; Osada *et al*, 1990; Bacher *et al*, 1991).

4.3.1. Estructura de las PKC- α , β y γ .

Los cDNAs inicialmente aislados en varios laboratorios pueden ser agrupados en 4 isotipos: α , β_1 , β_{11} y γ (Parker *et al*, 1989), y

son derivados de 3 genes distintos ubicados en los cromosomas humanos 17 (α), 16 (β) y 19 (γ) (Coussens *et al*, 1986). Las secuencias para estos 4 ADNc se muestran en la figura 4.

Los cDNAs β_I y β_{II} derivan de un *splicing* diferencial en el extremo 3' del gen β dando lugar a 2 proteínas con secuencia idéntica hasta el aminoácido 621, seguido por 52 (para β_I) y 50 (para β_{II}) aminoácidos con un 50% de identidad entre ellos. Estas dos secuencias 3' β derivarían de 2 exones distintos en el extremo 3' del gen β (Kubo *et al*, 1987a, 1987b); la homología implicaría que estos 2 exones derivaron de un evento de duplicación.

Por comparación de las secuencias de la figura 4, estas proteínas contienen 4 regiones altamente conservadas (C₁-C₄) rodeadas por 5 regiones variables (V₁-V₅). Cuando se compara con la secuencia de otras quinasas de proteínas, se observa que la región C-terminal de las PKCs (C₃-V₅) corresponderían al dominio catalítico (Parker *et al*, 1986). Esto sería corroborado por estudios proteolíticos, que indican que por clivaje en un sitio de la región V₃ se genera un fragmento catalíticamente activo de PKC- α (Young *et al*, 1988).

En la región C-terminal hay secuencias características de todas las quinasas de proteínas: GXGXXG...K que formarían parte del sitio de unión a ATP (Kamps *et al*, 1984).

Por fuera del dominio catalítico de la quinasa, existen regiones de interés, aunque no hay mucha homología con otras proteínas conocidas. En PKC- α los residuos 19-36 constituirían un sitio de pseudosustrato (House y Kemp, 1987), que es el responsable de ocupar el sitio de unión al sustrato en ausencia de efectores (figura 4).

Este sitio de pseudosustrato localizado cerca de las regiones V₁/C₁ está bastante conservado en las PKC- α , β y γ . Inmediatamente después de este sitio (hacia el extremo C-terminal) existe un sitio rico en cisteínas (región C₁).

Está constituido por una repetición en tándem que contiene seis residuos de cisteínas: CX₂CX₁₃CX₂CX₇CX₇C. Las repeticiones en tándem de cisteínas se asemejan a los dominios "dedos de zinc". Un dominio de "dedos de zinc" comprende una repetición de aproximadamente 30 aminoácidos con un átomo de zinc entre pares de residuos cisteína e histidina. La secuencia CX₂CX₁₃CX₂C ha sido observada en varias metaloproteínas y también en ciertas proteínas que unen ADN (Berg, 1986, 1990). La presencia de este patrón repetido es de gran interés, por lo que sería importante establecer si la PKC es una metaloproteína en sí misma, o si esta estructura juega un papel en la interacción con los fosfolípidos (por analogía con las interacciones hidrofóbicas e iónicas de estas estructuras con el ADN) o directamente con el ADN. Recientemente, se ha propuesto que la región rica en cisteínas sería requerida para la unión de los ésteres de forbol a la PKC (Ono *et al*, 1989a; Gschwendt *et al*, 1991).

Después de las repeticiones de cisteínas y antes del dominio catalítico existe una región de aproximadamente 200 aminoácidos. Dentro de esta secuencia (región C₂) existiría el único sitio potencial de unión a Ca²⁺, muy cercano a la estructura "*E-F hand*" característica de la calmodulina y de otras proteínas que unen Ca²⁺ (van Eldik *et al*, 1982). Este sitio se encuentra en la PKC- α , pero no está conservado ni en la PKC- β ni en la PKC- γ , aunque ambas muestran dependencia a Ca²⁺.

4.3.2. Estructura de las PKC- δ , ϵ , ζ , η y ι

Mediante rastreo de librerías de cDNAs de cerebro han sido identificados 3 transcriptos de PKC que son productos de genes únicos (Ono *et al*, 1987a, 1988a, 1988b; Ohno *et al*, 1988; Schaap *et al*, 1989) y que se denominaron δ , ϵ y ζ . Aunque estas 3 proteínas muestran homología significativa general con las PKC- α , β y γ , están menos relacionadas con ellas. Como se observa en la figura 5, hay colinearidad en los dominios catalíticos de las PKC- δ , ϵ y ζ , pero en los dominios regulatorios hay muchas dele-

ciones.

La región C2 (donde existiría el sitio de unión a Ca^{2+}) falta en estas 3 enzimas. Las 2 regiones ricas en cisteínas, C2, están presentes en las dos primeras y en la PKC- ζ solamente existe una.

Recientemente, se ha demostrado la existencia de un miembro adicional de la familia PKC, la PKC η (Osada *et al*, 1990). Se prepararon anticuerpos policlonales contra un péptido deducido de la secuencia de cDNA y éstos reconocen una proteína de 82 kDa en extractos de pulmón de ratón y en células COS1 transfectadas con el cDNA de la PKC η . Esta PKC tiene las secuencias C1 (secuencia rica en cisteínas) y C3 (dominio catalítico) que son comunes a todas las PKCs (figura 5). La PKC η al igual que las PKC δ , ϵ y ζ no tiene la región C2. En epidermis de ratón también han sido detectados mRNAs para PKC.

Este año ha sido aislado y caracterizado un cDNA humano que codifica para una quinasa de proteínas relacionada con la familia de PKC (Bacher *et al*, 1991). Tal como las PKC- δ , ϵ y ζ no contiene la región C2, implicada en la interacción con el Ca^{2+} (figura 5). La ausencia de un dominio regulatorio de Ca^{2+} distingue a la PKC-L y los otros miembros de esta subfamilia (δ , ϵ y ζ) de las moléculas clásicas de PKC (α , β y γ).

A diferencia de las otras PKCs, cuyas expresiones están enriquecidas en cerebro, la PKC-L se expresa principalmente en pulmón y también se encuentra en piel y corazón. La presencia de ésta en pulmón y piel indicaría que se expresa en células que tienen un rápido recambio.

A pesar de que las PKC-L y PKC η se expresan en distintos organismos (humano y ratón respectivamente) tienen un 93% de homología total entre sí. Por tanto, es bastante probable que se trate de una única isoforma.

```

V1                                     C1
-----
MADVTPAAEPAPQDVANRFARSGALBQKQNVHEVKNHRTARFFKQPTFCSHCTDFIAGFGKQGFQCCVCCFVWHKRCHE
MADPAAGPPFSEGEESTVRFARSGALBQKQNVHEVKNHRTARFFKQPTFCSHCTDFIAGFGKQGFQCCVCCFVWHKRCHE
MADPAAGPPFSEGEESTVRFARSGALBQKQNVHEVKNHRTARFFKQPTFCSHCTDFIAGFGKQGFQCCVCCFVWHKRCHE
MAGLGPVGVDSEGGPRPLFCRKGALBQKQNVHEVKNHRTARFFKQPTFCSHCTDFIAGFGKQGFQCCVCCFVWHKRCHE
.....

FVTFSCPGADKGPDTDDPRSKKXFKIHTYGSPTFCCHCGSLLYGLIHQGMKCDTCMANVHKQCVINVPSLCGMDHTEKRG
FVTFSCPGADKGPASDDPRSKKXFKIHTYSSPTFCCHCGSLLYGLIHQGMKCDTCMANVHKQCVINVPSLCGMDHTEKRG
FVTFSCPGADKGPASDDPRSKKXFKIHTYSSPTFCCHCGSLLYGLIHQGMKCDTCMANVHKQCVINVPSLCGMDHTEKRG
FVTFSCPGADKGPASDDPRSKKXFKIHTYSSPTFCCHCGSLLYGLIHQGMKCDTCMANVHKQCVINVPSLCGMDHTEKRG
.....

V2                                     C2
-----
RVLKAEV TDEKLVTVRDAKQILPMDPNGLSDPYVVKLKLIPDPKSESQKQKTKIRSTLNFRWDESFTFKLKPSCDFER
RVLKAEV TDEKLVTVRDAKQILPMDPNGLSDPYVVKLKLIPDPKSESQKQKTKIRSTLNFRWDESFTFKLKPSCDFER
RVLKAEV TDEKLVTVRDAKQILPMDPNGLSDPYVVKLKLIPDPKSESQKQKTKIRSTLNFRWDESFTFKLKPSCDFER
RVLKAEV TDEKLVTVRDAKQILPMDPNGLSDPYVVKLKLIPDPKSESQKQKTKIRSTLNFRWDESFTFKLKPSCDFER
.....

V3                                     C3
-----
LSEEWMDRTFRNDFMGLSFGVSELKQASVDCWFKLLSQEEGEYFNVPVPEGESEANEELRQKFE
LSEEWMDRTFRNDFMGLSFGVSELKQASVDCWFKLLSQEEGEYFNVPVPEGESEANEELRQKFE
LSEEWMDRTFRNDFMGLSFGVSELKQASVDCWFKLLSQEEGEYFNVPVPEGESEANEELRQKFE
LSEEWMDRTFRNDFMGLSFGVSELKQASVDCWFKLLSQEEGEYFNVPVPEGESEANEELRQKFE
.....

C3
-----
GPAGNKVISPSED RRQPSNLDKRVKLDTFNFMVLGKGSFGKVMADLRKGTTELATKILKQDVIQDDDVECTAVE
SQGTVPPEEXTINTVSKFDNNGRDRMQLTDFNFMVLGKGSFGKVMADLRKGTTELATKILKQDVIQDDDVECTAVE
SQGTVPPEEXTINTVSKFDNNGRDRMQLTDFNFMVLGKGSFGKVMADLRKGTTELATKILKQDVIQDDDVECTAVE
SSSPISPSPSPSTDSKRCFFGASPGALHISDFSLMVLGKGSFGKVMADLRKGTTELATKILKQDVIQDDDVECTAVE
.....

V4                                     C5
-----
KRVLALLDK PPFLTQLHSCFQTDRLYFVMEYVNGGDLMYHIQQVGRKEPHAVYAAEITIGLFFLQSKGIIYR
KRVLALPGK PPFLTQLHSCFQTDRLYFVMEYVNGGDLMYHIQQVGRKEPHAVYAAEITIGLFFLQSKGIIYR
KRVLALPGK PPFLTQLHSCFQTDRLYFVMEYVNGGDLMYHIQQVGRKEPHAVYAAEITIGLFFLQSKGIIYR
KRVLALGGRPGGRPHFLTQLHSTFQTDRLYFVMEYVNGGDLMYHIQQVGRKEPHAVYAAEITIGLFFLQSKGIIYR
.....

DLKLDNVMLDSEGHIKIADFGMCKENIWDGVTTKFCGTPDYIAPEIIAYQPYGKSVDMWAFVLLYEMLAGQPPFDGED
DLKLDNVMLDSEGHIKIADFGMCKENIWDGVTTKFCGTPDYIAPEIIAYQPYGKSVDMWAFVLLYEMLAGQPPFDGED
DLKLDNVMLDSEGHIKIADFGMCKENIWDGVTTKFCGTPDYIAPEIIAYQPYGKSVDMWAFVLLYEMLAGQPPFDGED
DLKLDNVMLDSEGHIKIADFGMCKENIWDGVTTKFCGTPDYIAPEIIAYQPYGKSVDMWAFVLLYEMLAGQPPFDGED
.....

EDELQSIEMHNVAYPKSMKKEAVAICKGLMTKHPGKRLCCGPEGERDVREHAFFRIDWEKLERKEIQPPYKPKADGR
EDELQSIEMHNVAYPKSMKKEAVAICKGLMTKHPGKRLCCGPEGERDIKEHAFFRIDWEKLERKEIQPPYKPKADGR
EDELQSIEMHNVAYPKSMKKEAVAICKGLMTKHPGKRLCCGPEGERDIKEHAFFRIDWEKLERKEIQPPYKPKADGR
EDELQSIEMHNVAYPKSMKKEAVAICKGLMTKHPGKRLCCGPEGERDIKEHAFFRIDWEKLERKEIQPPYKPKADGR
.....

V5
-----
GAENFDKFTTGGQVLTPTDQLVIANIDQSDFEQSYVNPQFVHPILQSAV
NAENFDKFTTGGQVLTPTDQLVIANIDQSDFEQSYVNPQFVHPILQSAV
DTSNFDKFTTGGQVLTPTDQLVIANIDQSDFEQSYVNPQFVHPILQSAV
SGENFDKFTTGGQVLTPTDQLVIANIDQSDFEQSYVNPQFVHPILQSAV
.....

```

Figura 4: Comparación de las secuencias de las PKC- α , β I, β II y γ

Las secuencias muestran regiones variables (V_1 - V_5) y conservadas (C_1 - C_4). El dominio catalítico (C_3 - V_5) contiene secuencias (Δ) características de quinasas de proteínas. Los residuos marcados (\bullet) en C_1 pertenecen al dominio de repeticiones de cisteínas. Los residuos básicos (\blacksquare) están en el sitio primario del clivaje de la PKC- α . La flecha indica el punto de divergencia de las secuencias de β I y β II.

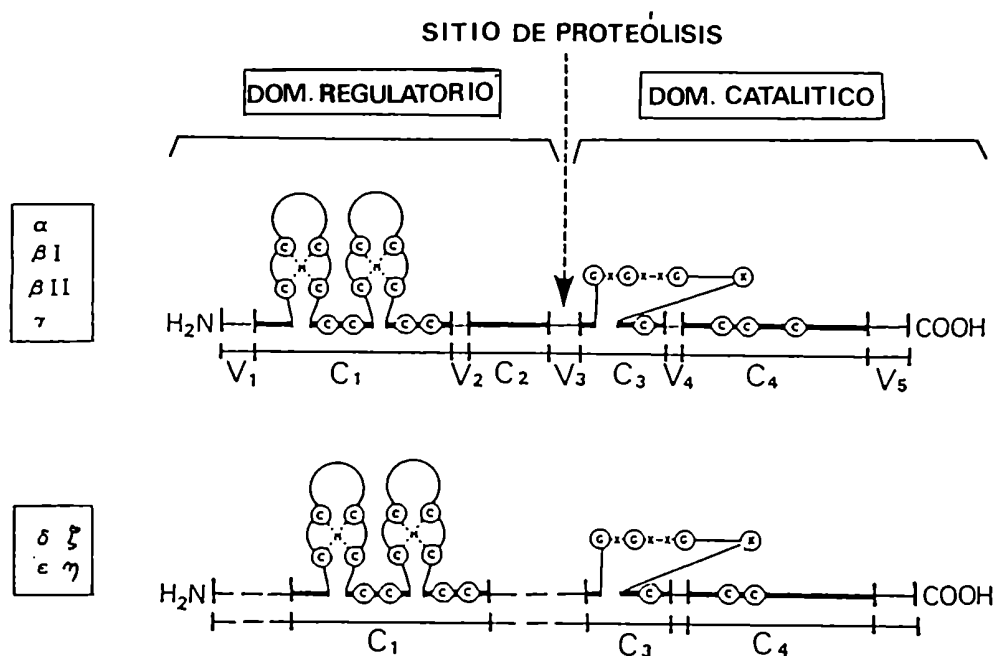


Figura 5: Estructura común de las isoformas de PKC.

C, G, K, X y M representan cisteína, glicina, lisina, cualquier aminoácido y un metal, respectivamente.

4.3.3. Papel de las regiones ricas en cisteínas y de la región de pseudosustrato en la activación de la PKC

Como ya se ha mencionado, House y Kemp describieron en las PKC- α , β y γ un sitio de pseudosustrato que se asemeja al sitio de fosforilación del sustrato. Cuando en un péptido sintético correspondiente al sitio de pseudosustrato, se sustituye la alanina por una serina, éste se convierte en un potente sustrato de la PKC. Los autores proponen que en ausencia de cofactores este sitio interactuaría con el sitio activo de la enzima y en consecuencia ésta se inactivaría. El motivo central de la región de pseudosustrato

(RKGALR) es idéntico en secuencia y posición en las PKC- α , β y γ . En las PKC- δ , ϵ y ζ se encuentran motivos similares (figura 6).

Todos estos motivos de pseudosustrato tienen una secuencia GA flanqueada por residuos básicos (subrayados en la figura 6).

Se ha sugerido que las regiones ricas en cisteínas son esenciales para la unión de los ésteres de forbol (Ono *et al*, 1989a). Por lo tanto es posible que el éster de forbol, PMA, y el DG se unieran por puentes de hidrógeno al grupo sulfhidrilo de las cisteínas de esa región. Podría existir otro puente de hidrógeno entre un grupo dador del PMA o DG y el grupo carbonilo de la asparagina que está presente en la segunda región rica en cisteínas de las PKC- α , β , γ , δ y ϵ (Figura 6).

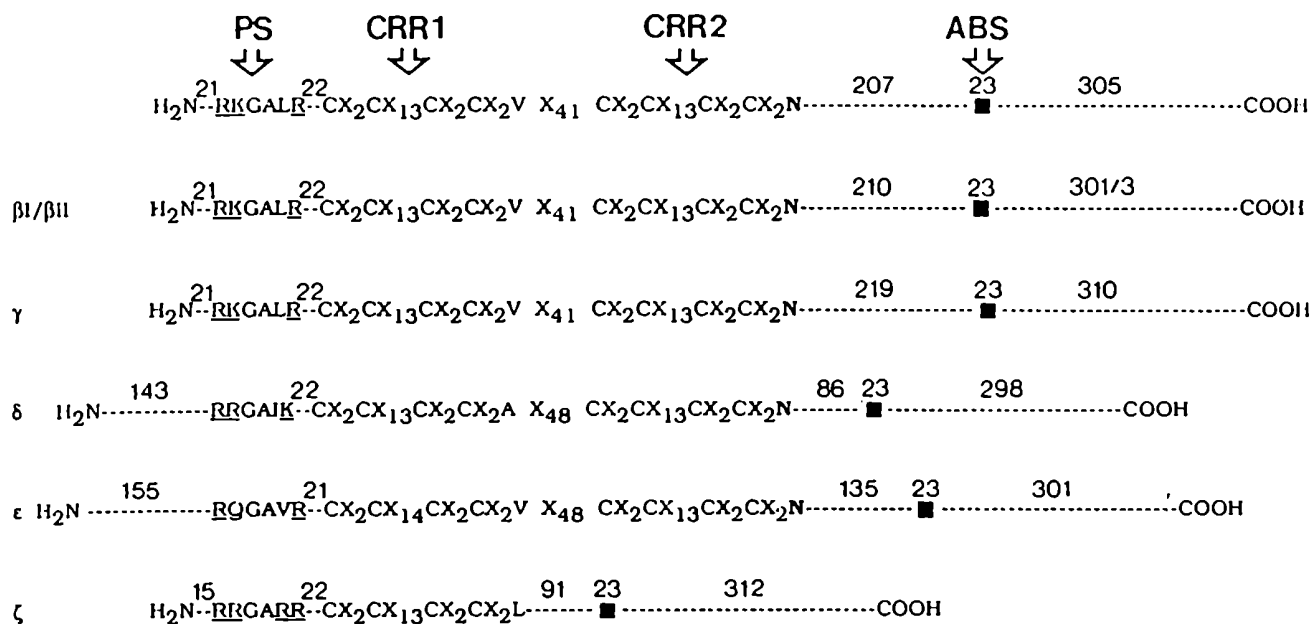


Figura 6: Secuencia y localización de los dominios regulatorios de las isoformas de PKC.

La posición del motivo de pseudosustrato (PS) y de las regiones ricas en cisteínas (CRR) está indicada por flechas. El sitio de unión a ATP (ABS, GXGX₂GX₁₆K) está representado por cuadrados negros. También se indica el número de aminoácidos que hay entre cada región.

El DG presenta 2 grupos aceptores (carbonil ésteres) y un grupo dador (hidroxilo libre) y por lo tanto se podría unir a la PKC en una sola orientación (Figura 7a).

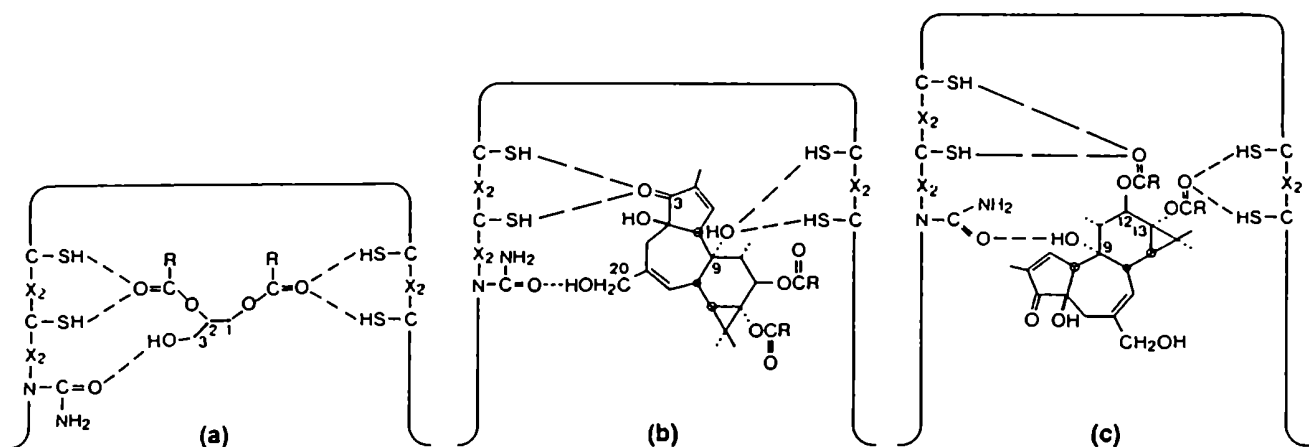


Figura 7: Unión de diacilglicerol (a) y del éster de forbol PMA (b) y (c) a la segunda región rica en cisteínas. C-SH, cisteína, N-CO-NH₂, asparagina y R, residuo de ácido graso.

Sin embargo el PMA contiene 2 regiones con grupos dador y aceptor. Una es la región C-3/C-9/C-20, con los grupos aceptores en el carbonilo de C-3 y en el hidroxilo de C-9 y el grupo dador en el hidroxilo de C-20 (Figura 7b). La otra es la región C-9/C-12/C-13, con los carbonil ésteres de las posiciones 12 y 13 como aceptores de hidrógeno y el hidroxilo de C-9 como dador de hidrógeno (Figura 7c). Se considera que estas 2 regiones en el PMA son esenciales para la actividad de promoción de tumores y para su unión a la PKC.

Se comparó la geometría molecular del PMA y el DG y se llegó a la conclusión que el grupo hidroxilo del C-9 y los grupos éster de C-12 y C-13 del PMA corresponderían a los residuos C-3, C-2 y C-1 del DG, respectivamente. Ambos tendrían los requerimientos geomé-

tricos necesarios para ser activadores de la PKC.

La estructura *tipo DG* presente en el PMA no tendría importancia para su unión a la PKC debido a que otros promotores de tumores y activadores de la PKC no tienen esta región *tipo DG* (Figura 8).

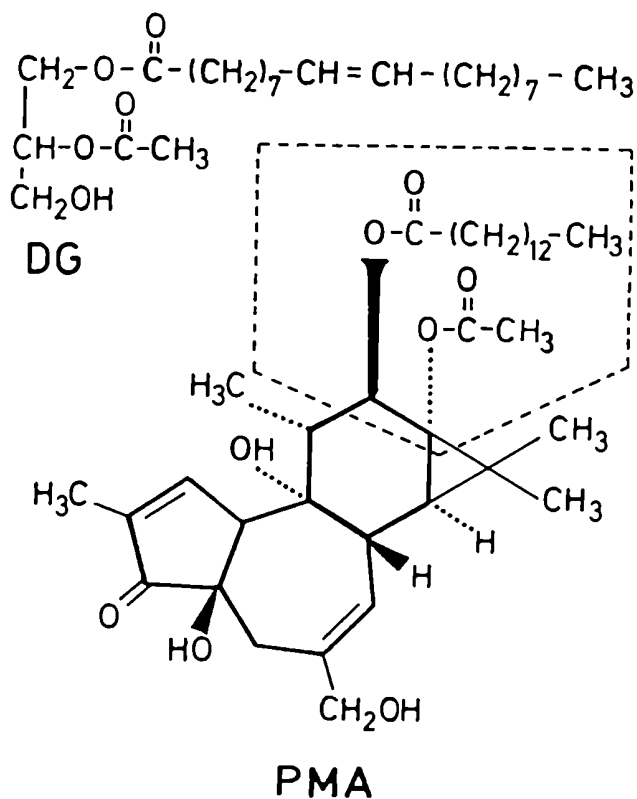


Figura 8: Estructuras del diacilglicerol sintético (1-oleoil-2-acetilglicerol, DG) y del éster de forbol (forbol 12-miristato-13-acetato, PMA)

El PMA contiene una estructura tipo diacilglicerol en su molécula, como se muestra entre las líneas punteadas.

Otro éster de forbol, el forbol 12-desoxi-13-tetradecanoato es un potente promotor de tumores y competidor del PMA por su sitio de

unión; esto indicaría que el grupo C-12 no es necesario en la unión del PMA a la PKC. Por lo tanto, la región C-3/C-9/C-20 y no la C-9/C-12/C-13 sería esencial en el PMA para su unión a la región rica en cisteínas (Figura 7b)(Gschwendt *et al*,1991).

Los residuos de ácidos grasos de cadena larga presentes en el C-13 del forbol 12-desoxi-13-tetradecanoato y los del C-12 del PMA estarían involucrados en la interacción con los fosfolípidos, que como se sabe son requeridos absolutamente para la activación de la PKC.

Este modelo de interacción PMA-PKC está sustentado por una evidencia adicional. El residuo asparagina presente en la segunda región rica en cisteínas (Figura 6) sería esencial para una unión fuerte del PMA, debido a que ofrecería un puente de hidrógeno adicional con el grupo C-20 del PMA (Figura 7b). Conforme con este modelo se demostró que la PKC- ζ , que no contiene esta segunda región rica en cisteínas (Figura 6), no es activada a concentraciones nanomolares de PMA (Ono *et al*, 1989b). La PKC de *Saccharomyces cerevisiae* solamente contiene una región rica en cisteínas sin residuo de asparagina y no responde a ésteres de forbol (Ogita *et al*, 1990).

Recientemente se encontró un cDNA específico de cerebro humano que codifica para una proteína a la que se denominó "*n-chimaerin*" (Ahmed *et al*, 1990). Esta proteína contiene una región rica en cisteínas y es capaz de unir PMA. De acuerdo con el modelo propuesto (Gschwendt *et al*, 1991) la región rica en cisteínas de la "*n-chimaerin*" tiene una asparagina en la misma posición que la de la segunda región rica en cisteínas de las PKC- α , β , γ , δ y ϵ . Por lo tanto, se puede concluir que a pesar de que el PMA se uniría débilmente a la primera región de cisteínas (por interacción con los residuos de cisteína) probablemente sería necesaria una unión más fuerte por intermedio del residuo de asparagina presente en la segunda región rica en cisteínas, para que ocurra la activación de la PKC a concentraciones nanomolares de PMA.

La unión de PMA a las regiones ricas en cisteínas produciría un cambio conformacional en la PKC (Figura 9). Como fue sugerido por House y Kemp, un cambio conformacional de este tipo removería la secuencia de seudosustrato del centro activo (sitios de unión a ATP y sustrato). Es sorprendente que en todas las PKCs la secuencia de seudosustrato se encuentra a 21-22 aminoácidos de las regiones ricas en cisteínas; mientras que otros intervalos, por ejemplo la distancia entre el amino terminal y las regiones ricas en cisteínas (43-182 aminoácidos) o entre las regiones ricas en cisteínas y el sitio de unión a ATP (73-206 aminoácidos), difieren considerablemente en longitud (Figura 6). Por lo tanto, la distancia entre el dominio de seudosustrato y las regiones ricas en cisteínas sería crucial para la activación de las PKCs.

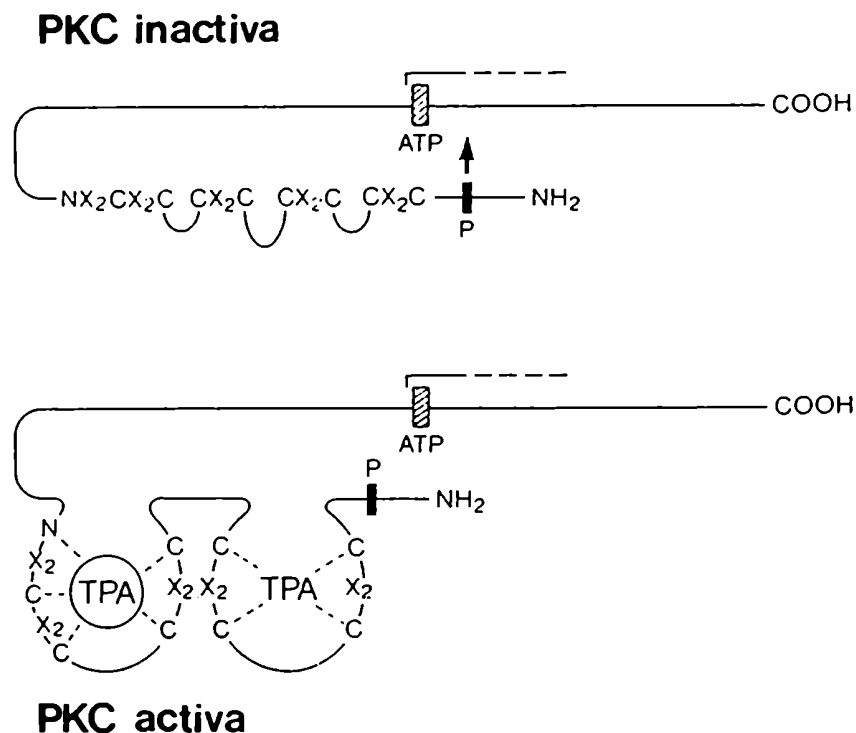


Figura 9: Modelo de activación de PKC por PMA.

El *looping* de las regiones ricas en cisteínas como consecuencia de la unión del PMA, removería el seudosustrato (P) del centro activo. La segunda región rica en cisteínas, que contiene un residuo de asparagina, se uniría al PMA con mayor afinidad (simbolizado por el círculo), que la primera región rica en cisteína. C, cisteína; N, asparagina.

El cambio conformacional inducido por el activador no fisiológico, PMA, junto con los fosfolípidos de membrana, sería suficiente para remover el sitio de pseudosustrato del centro activo de las PKCs. En las PKC- α , β y γ la activación por DG requeriría Ca^{2+} . La unión de Ca^{2+} a una región que se encuentra entre el sitio de unión a ATP y la región rica en cisteínas aumentaría el cambio conformacional producido por el DG. Por otro lado, las PKC δ y ϵ que no poseen el dominio de unión a Ca^{2+} serían activadas solamente por DG y la PKC ζ que no posee ni el sitio de unión a Ca^{2+} ni la segunda región rica en cisteínas no requeriría ni calcio ni DG para su activación.

4.3.4. Propiedades y expresión de las PKC- α , β y γ

En los primeros estudios realizados con el fin de determinar la distribución tisular de la PKC se utilizó PDBu[3H] como sonda. Estos revelaron que la enzima se distribuía homogéneamente en el cerebro, con altas concentraciones en el hipocampo, *substantia nigra*, y cortex encefálico y cerebelar (Worley *et al*, 1986). Análisis de *Northern blot* en los que se usaron oligonucleótidos específicos como sondas, sugieren que las subespecies de PKC se expresan específicamente en ciertos tejidos (Coussens *et al*, 1986; Knopf *et al*, 1986; Ohno *et al*, 1987; Kubo *et al*, 1987a). Por técnicas de histoquímica *in situ*, hibridando con oligonucleótidos específicos se demostró una distribución diferente de los transcritos de las subespecies en cerebro y bazo de rata (Brandt *et al*, 1987). Por otro lado, Wood *et al* (1986) utilizaron por primera vez tinción inmunohistoquímica para identificar la PKC en cerebro.

Combinando técnicas bioquímicas, inmunológicas y citoquímicas se ha logrado determinar el patrón de expresión de las distintas subespecies de PKC (Kikkawa *et al*, 1987a, 1987b; Kitano *et al*, 1987; Shearman *et al*, 1987; Saito *et al*, 1988). El encéfalo contiene gran cantidad de PKC tipo II, particularmente la subespecie β_{II} , mientras, que el cerebelo contiene una alta actividad de PKC

tipo I (subespecie γ). La tabla 1 muestra la distribución de 4 isoformas de PKC (α , β_1 , β_{11} y γ) en fracciones solubles de cerebro de rata.

Tabla 1. Distribución de isoformas de PKC en cerebro de rata

Tejido nervioso	Actividad específica			
	α	β_1	β_{11}	γ
cerebro total	4,9	1,2	8,5	5,2
encéfalo	2,8	0,3	10,3	3,2
cerebelo	6,0	3,2	10,3	21,5
hipocampo	10,8	0,3	12,9	8,3
médula espinal	3,2	1,1	2,4	0,2

La actividad específica se midió por incorporación de ^{32}P del ATP[γ - ^{32}P] en histona H-1, y se definió como pmoles ^{32}P incorporados/min.mg de masa húmeda de tejido.

La enzima tipo I (isoforma γ) se expresa en la rata post-natalmente, y se encontró solamente en cerebro y médula espinal (Shearman *et al*, 1987). La mayor actividad de esta isoforma se encontró en cortex cerebelar, particularmente, en los cuerpos celulares, dendritas y axones de las células de Purkinje y en las células piramidales del hipocampo. Probablemente, la PKC- γ juegue un papel en la modulación de algunas funciones neuronales especializadas, tales como, la potenciación a largo plazo y la depresión (Lovinger *et al*, 1986).

Normalmente, la actividad de la PKC- β_{II} es mucho mayor que la de la PKC- β_I . En el cortex cerebelar, esta última isoforma está localizada principalmente en la lámina granular y la PKC- β_{II} en las terminaciones nerviosas presinápticas.

Por otro lado, la PKC- α (tipo III) se encontró en la mayoría de los tejidos y células examinados (Ido *et al*, 1987; Kikkawa *et al*, 1987a; McCaffrey *et al*, 1987; Pelosin *et al*, 1987).

En 1986, Huang *et al* describieron por primera vez un método de purificación, para separar al menos 3 tipos de PKC (tipo I, II y III) en cerebro de rata.

Estas isoformas aisladas por cromatografía en hidroxilapatita, reaccionaban en forma distinta a anticuerpos policlonales anti-PKC total y tenían diferentes sitios de autofosforilación. Por otro lado, compartían ciertas características: un peso molecular de 82 kDa, observado por electroforesis en geles disociantes de poliacrilamida, copurificaban por cromatografías de intercambio iónico, hidrofóbica, filtración en geles y de afinidad, y por último, la unión de [3 H]PMA y la actividad de quinasas de proteínas eran dependientes de Ca^{2+} y fosfatidilserina. Como ya se ha mencionado, estas 3 isoformas, tipo I, II y III, son los productos de las cDNAs γ , β y α respectivamente.

En conejo también fueron clonadas las PKC- α , β y γ (Ohno *et al*, 1987). Por análisis de *Northern blot*, se demostró que los mRNAs de α y β se encontraban principalmente en cerebro, mientras que el mRNA de γ se encontraba en muchos tejidos. En cerebro los mRNAs mayoritarios eran α y β ; en pulmón los 3 mRNAs se expresaban en forma comparable; y en bazo el mRNA α era el predominante. En otros tejidos examinados, incluyendo hígado, músculo y riñón, el mRNA γ era el principal. Esta distribución diferencial de estos 3 mRNAs, sugiere que estas 3 isoformas tendrían papeles diferentes.

En cerebro de mono se purificaron por cromatografía en hidroxila-

patita las isoformas α , β y γ (Huang *et al*, 1987). Estas 3 isoformas tienen comportamiento similar a las de cerebro de rata: tienen un peso molecular de 82 kDa y tanto la unión de ésteres de forbol como la actividad de quinasa de proteínas son dependientes de Ca^{2+} y fosfolípidos.

Por análisis inmunológicos, utilizando anticuerpos monoespecíficos, se detectaron estas 3 isoenzimas en los cerebros de trucha arcoiris y de pollo. En consecuencia, estas 3 isoformas estarían ampliamente distribuidas en el cerebro de vertebrados.

Estos autores demuestran que en el cerebelo de mono la enzima predominante es la γ , en cortex encefálico la β y en el bulbo olfatorio la α . En los tejidos periféricos, timo y bazo, la enzima mayoritaria es la β .

Existe suficiente evidencia que relaciona la modulación de la actividad neuronal con la activación de la PKC, ya sea, por aumento de la hidrólisis de los inositol fosfolípidos o por adición de ésteres de forbol (Malenka *et al*, 1986; Madison *et al*, 1986; Baraban *et al*, 1985; Akers *et al*, 1986; Higashida y Brown, 1986). En particular, la PKC jugaría un papel importante en el control de la liberación de los neurotransmisores y en la memoria a largo plazo. Entonces, es probable que cada isoforma participara en funciones regulatorias especializadas, debido a su predominio en alguna región específica del cerebro. Por ejemplo, la presencia de altos niveles de PKC- γ en cerebelo, hipocampo y amígdala indicaría que esta isoforma tiene importancia en el aprendizaje y en la memoria (Huang *et al*, 1987).

Estas 3 isoformas tienen diferencias en el modo de activación, propiedades cinéticas y especificidad de sustrato (Kikkawa *et al*, 1988). Por ejemplo, el 1-estearoil-2-araquidonilglicerol, el principal diacilglicerol derivado de los inositol fosfolípidos, es más activo a bajas concentraciones para la PKC tipo II (subespecies β_1 y β_{11}) que para la PKC tipo III (subespecie α). Por

otro lado, los diacilgliceroles sintéticos (1,2-didecanoilglicerol y 1,2-dioctanoilglicerol) son efectivos activadores de la PKC tipo I (subespecie γ), pero no de las PKC- α y β .

También algunas isoformas de PKC se activarían por los productos metabólicos de los fosfolípidos de membrana (diacilglicerol y ácido araquidónico) y por sus metabolitos (lipoxina A), que aparecen en forma sucesiva después de la estimulación de un receptor (Hansson *et al*, 1986). La activación en presencia de ácido araquidónico (AA) y Ca^{2+} no requiere fosfolípidos. La PKC- γ se activa a bajas concentraciones de AA, la PKC- β responde menos al AA y la PKC- α solamente se activa a altas concentraciones de AA (Sekiguchi *et al*, 1987). Por el momento, no hay evidencia de que la activación por ácido araquidónico ocurra en condiciones fisiológicas.

La afinidad (K_m) para ATP y Mg^{2+} y los valores de K_a para fosfatidilserina (PS), son similares para las PKC- α , β_1/β_{11} y γ (Marais y Parker, 1989). Como ha sido observado en muchas quinasas de proteínas, el K_m aparente para el Mg^{2+} es sustancialmente superior al del ATP, que se unirían como un complejo Mg-ATP. Esto sugeriría que existe un sitio de unión a Mg^{2+} de baja afinidad, que contribuye a la actividad catalítica de la enzima. La activación por PS es altamente cooperativa, cuando se utiliza el ensayo de micelas mixtas (Hannun *et al*, 1985). Sin embargo, al contrario de estos trabajos (en los cuales se utiliza una mezcla de isoformas de PKC de roedores), se observó que la activación de las distintas isoformas de PKC de cerebro bovino, ocurre a concentraciones más altas de PS (Parker *et al*, 1989). También en otro trabajo, en el que utilizan las distintas isoformas de PKC de rata, se demuestra que se necesitan concentraciones más altas de PS cuando usan el ensayo de micelas mixtas (Huang *et al*, 1988).

Se investigó el efecto de otros lípidos sobre la actividad de la PKC; la cardiolipina es tan efectiva como la PS en la activación de las distintas isoformas (Huang *et al*, 1988). Dos fosfatidilal-

coholes, el fosfatidiletanol y el fosfatidilmetanol, son capaces de sustituir a la PS en la activación de las distintas isoformas de PKC. Sin embargo, la respuesta de la PKC- γ era mayor que la de las otras isoformas (Asoaka *et al*, 1988).

Las PKC- α , β_1/β_{11} y γ son dependientes de DG y ésteres de forbol, para su activación (Huang *et al*, 1988)(Marais y Parker, 1989). Sin embargo, los estudios sobre la dependencia de DG y ésteres de forbol, de las distintas isoformas, se complica cuando se utilizan distintos fosfolípidos. Por ejemplo, los valores de K_a para DG varían 2,5 veces cuando se utiliza fosfatidilserina; mientras que los valores de K_a varían más de 20 veces al utilizar cardiolipina en lugar de fosfatidilserina (Huang *et al*, 1988). En el caso de las isoformas bovinas, utilizando fosfatidilserina, el valor de K_a para DG es 5 veces menor para la PKC- α comparado con las PKC- β y γ ; también se observó que la PKC- γ es menos sensible al PMA (Marais y Parker, 1989). La variación en la respuesta de las distintas isoformas de PKC al DG y a los ésteres de forbol, bajo distintas condiciones, implica que existen diferencias reales en la unión de esos efectores; el patrón preciso de sensibilidad que existiría *in vivo* dependería de la composición de las membranas, con las cuales interactuarían las PKCs.

En cuanto a la dependencia de Ca^{2+} de las distintas isoformas, el panorama es bastante complejo. De un trabajo a otro varían los valores de K_a para cada isoforma (Jaken y Kiley, 1987; Huang *et al*, 1988; Marais y Parker, 1989; Kosaka *et al*, 1988; Nunn y Watson, 1987). Esta variación se debe al tipo de sustrato utilizado en el ensayo; por lo tanto, el requerimiento absoluto de Ca^{2+} para la activación de las distintas isoformas de PKC *in vivo*, dependería del sustrato en particular. Los valores de K_a para Ca^{2+} para las distintas isoformas de PKC (usando histona como sustrato, en un ensayo de micelas mixtas) están en el orden de 200 a 500 nM (Jaken y Kiley, 1987; Marais y Parker, 1989; Huang *et al*, 1988). Estos valores cubren el rango que va desde un nivel estacionario a un nivel cercano a la máxima estimulación. Por tanto,

la movilización de Ca^{2+} probablemente influenciaría el nivel de activación de cada isoforma, en respuesta al diacilglicerol; al menos, respecto a los sustratos que son "dependientes de Ca^{2+} " para su fosforilación.

Como fue originalmente informado por el laboratorio de Nishizuka, la PKC muestra una clara preferencia por la histona H-1 (rica en lisina) respecto de otras histonas; de manera tal, que este sustrato ha sido comunmente usado en los métodos de purificación y en los análisis cinéticos de esta enzima (Inoue *et al*, 1977; Takai *et al*, 1977).

Con respecto a los valores de K_m para histona varían de laboratorio en laboratorio, para las distintas isoformas (Huang *et al*, 1988; Marais y Parker, 1989). Se han obtenido resultados similares con otros sustratos, por ejemplo: la proteína básica de mielina y protamina. Con la protamina se ha observado, que mientras la V_{max} no varía entre las distintas isoformas, el K_m es de 3 a 4 veces mayor en la PKC- γ que en las α y β . Con respecto, a péptidos sintéticos ocurre algo muy parecido que con la protamina. Estas variaciones en K_m y V_{max} para diferentes sustratos sugiere que estas isoformas fosforilarían distintas proteínas blanco *in vivo*.

Debido a que las PKC- β_1 y β_{11} coeluyen en una columna de hidroxilapatita, la comparación de ambas actividades se ha tenido que efectuar con proteínas recombinantes purificadas de células COS que expresaban cada una de las construcciones relevantes (Ono *et al*, 1987b). Este trabajo demostró que no hay diferencias detectables entre estas dos quinasas en cuanto a su regulación.

Como ya ha sido mencionado, el diacilglicerol y los ésteres de forbol estimulan a la PKC aumentando la afinidad de la misma por el Ca^{2+} y los fosfolípidos. En consecuencia, los ésteres de forbol se utilizaron para estimular directamente a la PKC en células intactas. Se cree, que los ésteres de forbol se intercalan en la

membrana celular, y en combinación con los fosfolípidos promueven la translocación de la enzima a la membrana. Esta translocación está asociada con la activación de la PKC (Kraft *et al*, 1982; Kraft y Anderson, 1983); y como resultado de esto ocurriría la degradación proteolítica o *down-regulation* de la enzima (Rodríguez-Pena y Rozengurt, 1984; Ballester y Rosen, 1985). Este proceso de *down-regulation* estaría involucrado en respuestas secretorias de plaquetas y neutrófilos humanos (Tapley y Murray, 1984, 1985; Melloni *et al*, 1986).

Debido a que la degradación *in situ* de la PKC estaría involucrada en la expresión o supresión de muchas funciones fisiológicas (Berridge, 1987; Nishizuka, 1986), se compararon los patrones de degradación proteolítica de las isoformas α , β y γ *in vitro*, con los de las células RBL-2H3 (células basofílicas leucémicas de rata) que contienen las isoformas α y β (Huang *et al*, 1989).

Cuando se trabajó con las isoformas purificadas, se demostró que la PKC- γ era más susceptible a proteólisis triptica que las α y β . En ausencia de Ca^{2+} y fosfolípidos la PKC- α era relativamente resistente a la digestión triptica.

En cuanto a las células RBL-2H3, se demostró que la PKC α era más resistente a la degradación inducida por el éster de forbol PMA, que la PKC- β . En estas células las PKC- α y β tienen diferente localización subcelular; la PKC β es predominantemente citosólica, mientras, que la PKC- α se encuentra tanto en la fracción citosólica como en la particulada. Después de tratar células RBL-2H3 con PMA, la PKC- β desaparece de la fracción soluble más rápidamente que la PKC- α . Algo de la PKC- β sería translocada a membranas, como lo demuestra el incremento de ésta en la fracción particulada, aunque esta translocación es transiente. Todavía no se sabe que papel cumpliría la PKC- β en estas células. Algunas variantes de las células RBL-2H3 que no responden a antígeno son deficientes en PKC- β . Por lo tanto, sería posible que esta isoforma fuera un componente crítico en la respuesta secretoria de

estas células, pero aún no ha sido determinada la consecuencia en el proceso de secreción, de la activación de la enzima por DG o PMA y de su rápida degradación por proteólisis.

La proteólisis limitada de la PKC da origen a 2 fragmentos, uno correspondiente al dominio regulatorio y el otro al catalítico. El sitio de proteólisis es la región llamada "bisagra", V₃ (Kishimoto *et al*, 1983; Parker *et al*, 1986).

Si la degradación proteolítica o *down-regulation* diferencial de las diferentes isoformas de PKC, fuera un fenómeno común en muchos tipos celulares, sería posible, comparando las velocidades de degradación de cada isoforma con las respuestas fisiológicas, asociar el papel de cada isoforma con una función fisiológica dada.

La conversión de la PKC- α de la forma insensible a la forma sensible a tripsina, requiere Ca²⁺ y fosfolípidos. El DG estimula esta conversión reduciendo el requerimiento de Ca²⁺. Probablemente, estos activadores inducen cambios conformacionales en la enzima, convirtiéndola en un mejor sustrato para la tripsina, más que alterando la actividad de la tripsina. Cuando se ensayó a la tripsina, en presencia de los activadores de PKC, usando metil ester p-toluensulfonil-L-arginina como sustrato, su actividad no se vio alterada (Huang *et al*, 1989).

La exposición de células a PMA, o la generación de DG por hidrólisis de los fosfoinosítidos mediada por receptor, aumentaría la proteólisis de la PKC, así como, su translocación a membranas y su activación (Huang *et al*, 1989).

En general la formación de DG por la degradación de los fosfoinosítidos mediada por receptor, es transiente, a diferencia de los efectos a largo plazo producidos por el PMA no metabolizable. Además el PMA interactúa con fosfolípidos de membranas más ácidos que el DG, y esto resultaría en las distintas velocidades de degradación de la PKC por estos dos compuestos. Por lo tanto, no

es sorprendente que en células RBL-2H3 estimuladas con antígeno, el grado de translocación y degradación de la PKC sea mucho menor que cuando las células son inducidas con PMA (White y Metzger, 1988).

Se han identificado en las isoformas α , β y γ los sitios de proteólisis por las proteasas dependientes de Ca^{2+} , calpaína I y II (Figura 10)(Kishimoto *et al*, 1989).

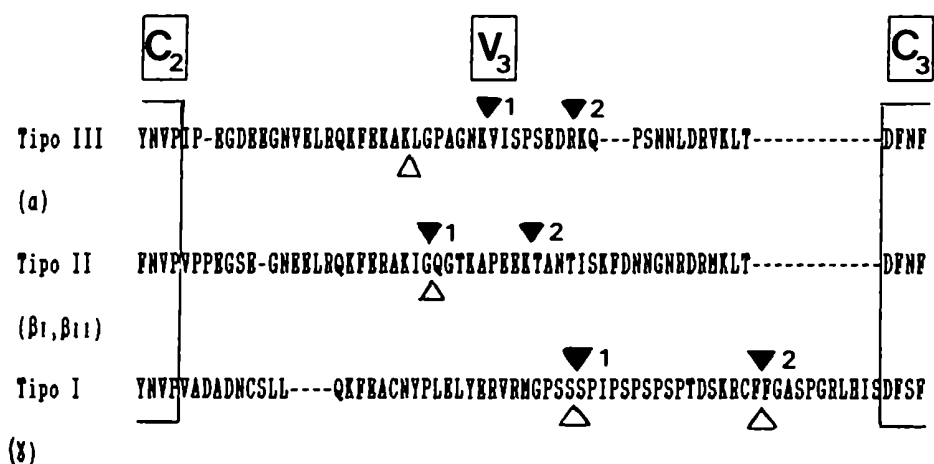


Figura 10: Sitios de clivaje de PKC por calpaína I y II.

V₃: tercera región variable de PKC; ▼ sitio de clivaje de calpaína I; △ sitio de clivaje de calpaína II; los números 1 y 2 representan el sitio 1 y sitio 2 de clivaje, respectivamente.

Todos los sitios de clivaje están ubicados en la región variable, V₃, que conecta el dominio regulatorio con el dominio catalítico. No hay una secuencia común alrededor de los sitios de clivaje. Al igual que con tripsina, con calpaína la PKC- γ es clivada más rá-

igual que con tripsina, con calpaína la PKC- γ es clivada más rápidamente y la PKC- α es relativamente resistente a la proteólisis. La calpaína I cliva preferencialmente la forma activa de la enzima, debido a que la proteólisis aumenta en presencia de Ca^{2+} , fosfolípidos y DG o PMA, que normalmente activan a la PKC.

Aunque la proteólisis limitada de la PKC genera un fragmento catalíticamente activo, llamado previamente quinasa M (Inoue *et al*, 1977; Kishimoto *et al*, 1983), todavía no se conoce la significación fisiológica de esta proteólisis. Se pueden considerar dos alternativas posibles. Primero, esta proteólisis activaría a la PKC, y el fragmento activo resultante jugaría un papel en el control de funciones celulares (Tapley y Murray, 1984; Melloni *et al*, 1986). Segundo, habría un proceso que inicia la degradación de la PKC, eliminando eventualmente a la enzima de la célula. En una gran variedad de tejidos y tipos celulares se ha demostrado que el PMA provoca la translocación de la PKC del citosol a la membrana y su subsecuente eliminación o *down-regulation*, aunque no siempre se recupera la quinasa M en el citosol (Rodríguez-Pena y Rozengurt, 1984; Blackshear *et al*, 1985; Ballester y Rosen, 1985; Stabel *et al*, 1987; Young *et al*, 1987).

4.3.5. Propiedades y expresión de las nPKCs (δ , ϵ , ζ , η y L)

Después de haber identificado por técnicas de clonado las PKC- α , β y γ , se identificó a partir de una biblioteca de cDNA de cerebro de conejo, una nueva PKC, a la que se denominó nPKC. Esta isoforma tiene un 35% de identidad con las otras PKCs (Ohno *et al*, 1988). El cDNA se expresó en bacterias, se purificó la proteína y con ella se prepararon anticuerpos policlonales. Un extracto de cerebro de conejo inmunoprecipitado con el anticuerpo, reveló dos bandas: una de 90 y la otra de 75 kDa.

Células COS transfectadas con una construcción de cDNA de nPKC, mostraron un aumento de 5 veces en la capacidad de unir [^3H]PDBu con respecto a las células control. En la mezcla de reacción se

usó una concentración muy baja de [³H]PDBu (5 nM), indicando que los receptores de ésteres de forbol en estas células son de alta afinidad. Los inmunoprecipitados (nPKC) tenían capacidad de unir ésteres de forbol. La unión de esta proteína a ésteres de forbol es dependiente de PS e independiente de Ca²⁺. Asimismo, se observó autofosforilación de una proteína de 90 kDa que coincide con la obtenida por inmunoprecipitación.

Además, se demostró por experimentos de *Northern blot* que en diferentes tejidos de conejo se expresa la nPKC.

Posteriormente, a esta nueva PKC se la denominó PKC- ϵ (Ono *et al*, 1988a). En este caso se la clonó a partir de una biblioteca de cDNA de rata. Se purificó PKC- ϵ a partir de células COS transfectadas con cDNA de nPKC y se comparó sus propiedades enzimáticas con la PKC- α , que es la isoforma que se expresa normalmente en células COS (Konno *et al*, 1989). La PKC- ϵ eluye de una columna de hidroxilapatita en una posición coincidente con la PKC- β , por lo tanto, se separa de la PKC- α . La PKC- ϵ se activa con fosfolípidos y diacilglicerol o ésteres de forbol de una manera similar a las PKCs convencionales. Sin embargo, la dependencia de cofactores y la especificidad de sustratos son diferentes de las otras PKCs. La más importante es que la PKC- ϵ es independiente de Ca²⁺, probablemente debido a la falta del dominio C2. Un fosfolípido, cardiolipina, aumenta su actividad 3 a 4 veces, comparado con la fosfatidilserina. Aunque la cardiolipina activa a la PKC- ϵ , no sería un activador fisiológico debido a que se localiza mayormente en la membrana mitocondrial. La concentración óptima de Mg²⁺ (3 mM) es claramente diferente de las otras PKCs (10-20 mM). También la PKC- ϵ se autofosforila en residuos treonina y serina. Se examinó la fosforilación de sustratos proteicos por la PKC- ϵ ; la proteína básica de mielina es mejor sustrato para la PKC- ϵ , mientras que la histona H-1 para la PKC- α .

El aislamiento de un gen "tipo PKC- ϵ " en el nematodo *Caenorhab-*

ditis elegans indicaría la conservación evolutiva de este tipo de enzima, independiente de Ca^{2+} , en metazoarios (Tabuse *et al*, 1989).

Recientemente se ha clonado una PKC- ϵ a partir de una biblioteca de cDNA de rata (Schaap *et al*, 1989).

Esta proteína une ésteres de forbol y se expresa mayormente en pulmones, corazón y cerebro. Anticuerpos policlonales específicos contra PKC- ϵ reconocen una banda de aproximadamente 90 kDa en extractos de células COS transfectadas con cDNA de PKC- ϵ .

El dominio regulatorio inhibe la actividad catalítica del dominio de quinasa; esta inhibición termina con la unión de los efectores o con el clivaje proteolítico de la enzima. En esta inhibición intervienen las secuencias de pseudosustrato que se encuentran en el extremo amino-terminal (House y Kemp, 1987). El rol de estas secuencias en la inhibición de la actividad catalítica de la enzima, ha sido demostrada mutagenizando el sitio de pseudosustrato en la PKC- α (Pears *et al*, 1990).

Para determinar la influencia del dominio regulatorio sobre la actividad catalítica de la PKC- ϵ , se construyó una proteína química con las secuencias regulatorias de la PKC- ϵ y el dominio catalítico de la PKC- γ (Pears *et al*, 1991). Esta proteína se expresó en células COS, y anticuerpos dirigidos contra el dominio catalítico de la PKC- γ confirmaron la identidad de esta proteína.

Esta PKC- ϵ/γ se comporta como la PKC- ϵ debido a que no puede fosforilar histonas eficientemente, a pesar de que contiene el dominio catalítico de la PKC- γ , que usa eficientemente este sustrato. Originalmente se consideraba que la unión de los efectores, liberando la interacción entre el dominio regulatorio y el catalítico, permitía a este último funcionar independientemente. Sin embargo, al menos en el caso de la PKC- ϵ , parecería que el dominio regulatorio juega un papel mucho más complejo, dirigiendo la selección del sustrato. Esta selección se daría regulando el

acceso al sitio activo después de la activación. Probablemente, pequeños péptidos similares en secuencia a la del pseudosustrato, podrían acceder al sitio activo, mientras que la entrada de polipéptidos grandes estaría bloqueada.

Los sustratos fisiológicos de la PKC- ξ serían pequeños péptidos, o tendrían una conformación específica que les permitiría interactuar con secuencias "de entrada" en el dominio regulatorio y de ese modo acceder al dominio catalítico. Alternativamente, se requeriría una señal de activación para que la PKC- ξ funcionara. Esta señal podría ser una fosforilación, una defosforilación o la unión de un efector aún no identificado.

La región V_1 es mucho más grande en la PKC- ξ que en las PKC- α , β y γ (Schaap y Parker, 1990). Esta región podría ser la que regule la selección del sustrato. La digestión triptica de la PKC- ξ genera la llamada quinasa de proteínas M (PKM), que es capaz de fosforilar histonas, descrito por Nishizuka (Kishimoto *et al*, 1983). El sitio de clivaje inicial fue mapeado y se encuentra en la región C-terminal del C_1 , de manera que la remoción de las regiones V_1 y C_1 , es suficiente para alterar el rango de sustrato (Schaap *et al*, 1990).

La falta de conservación de la región V_1 entre las distintas isoformas de la PKC sugiere que cada una de ellas tendría sustratos específicos que no podrían ser fosforilados por todas las isoformas. Esta especificidad sería importante para generar la diversidad de caminos de transducción de señales presentes en una célula. Si esto fuera cierto para la PKC- ξ , uno podría imaginar que la activación inicial generaría una quinasa solamente capaz de fosforilar un número limitado de sustratos, pero el subsecuente clivaje proteolítico aumentaría el número de sustratos fosforilables. Por lo tanto, se puede decir que la PKC- ξ tendría diferentes rangos de sustrato dentro de una misma célula, dependiendo del mecanismo de activación.

Por otra parte, existe evidencia de *splicing* alternativo para el gen de la PKC- ϵ . Se ha aislado a partir de cerebro de rata una versión truncada de la enzima (PKC- ϵ') (Ono *et al*, 1988a), y también se han encontrado en cerebro y pulmón de rata transcriptos más cortos que difieren de la PKC- ϵ en el extremo 5' (Schaap *et al*, 1990). Es interesante estudiar si las PKC- ϵ truncadas tienen un rango de sustrato más amplio que la PKC- ϵ . Este mecanismo generaría mayor diversidad de los caminos de transducción de señales celulares.

A partir de una biblioteca de cDNA de cerebro de rata han sido aislados cDNAs que codifican para las subespecies δ y ζ (Ono *et al*, 1988a). Estas dos isoformas pertenecen a la subfamilia de nPKC, debido a que no poseen el dominio C2 de unión a Ca^{2+} . Por otro lado, la PKC- ζ no posee la segunda región rica en cisteínas que está presente en todas las PKCs.

Se realizaron experimentos de expresión transiente del cDNA δ en células COS7. Tres días después de la transfección, se realizó la ruptura de las células y el extracto se aplicó a una columna de TSK DEAE-5PW. En las células no transfectadas eluía un solo pico correspondiente a la PKC- α . Cuando las células eran transfectadas con el cDNA de PKC- δ , aparecía un pico adicional, después del pico de PKC- α .

La actividad de la PKC- δ , usando histona H-1 como sustrato, se activaba dos veces con el agregado de fosfatidilserina; el diacilglicerol no activa, mayormente, a la enzima. No está claro si estas propiedades se deben a la estructura del dominio regulatorio o al sustrato utilizado. En general, la dependencia de la PKC a fosfatidilserina y diacilglicerol depende del sustrato utilizado; algunas PKCs pueden fosforilar protamina en ausencia de fosfolípidos, diacilglicerol y Ca^{2+} (Takai *et al*, 1984). También es posible, que la expresión de los cDNAs en las células COS7 fuera incompleta.

Se estudió la distribución tisular en rata de las PKC- δ y ζ mediante técnicas de *Northern blot*. La PKC- δ fue detectada en bazo, riñón y pulmón y en cerebro. Con respecto a la PKC- ζ , se expresa principalmente en cerebro, riñón y pulmón.

La existencia en la fracción particulada de epidermis de ratón, de una quinasa de proteínas activada por fosfolípidos y ésteres de forbol e independiente de Ca^{2+} , fue descripta por primera vez en 1986 (Gschwendt *et al*, 1986a). Este hallazgo fue sustentado por el clonado de los cDNAs para las PKC- δ , ϵ y ζ (Ono *et al*, 1987a; 1988a; Ohno *et al*, 1988). Estos cDNAs no poseen el dominio C2, que sería el dominio de unión a Ca^{2+} presente en las isoformas α , β y γ . Cuando se utilizó un anticuerpo preparado en conejo, contra un péptido sintético del extremo carboxilo-terminal de la PKC- δ , éste reconoce en bazo porcino una quinasa de proteínas que no responde a Ca^{2+} y que tiene un peso molecular de 76 kDa (Leibersperger *et al*, 1990). Esta secuencia, presente en la PKC- δ , es específica de esta isoforma. Este suero reacciona con quinasas que responden a PMA y que son independientes de Ca^{2+} en muchas otras especies, aunque existen diferencias mínimas en los pesos moleculares de todas ellas (Leibersperger *et al*, 1991). Esta enzima tipo PKC- δ también está presente en queratinocitos de ratones recién nacidos, en células endoteliales primarias bovinas y en varias líneas celulares originadas de tejidos humano, murino y de rata. En la mayoría de estas células la proteína tiene un peso molecular de 82 kDa. Esta quinasa p82, tipo PKC- δ , se encuentra en varios tejidos murinos, pero a diferencia de las PKC- α , β y γ , está localizada exclusivamente en la fracción particulada. Además del cerebro, que es rico en PKC tipo δ y en PKC- α , β y γ , la epidermis, útero, placenta, pulmones, riñones y bazo tienen un gran exceso de PKC tipo- δ . Debido a que la piel de ratones es ampliamente utilizada como el sistema *in vivo* para la investigación de la promoción de tumores inducida por ésteres de forbol, la alta concentración de una enzima activada por PMA (PKC tipo- δ) en epidermis de ratón es de gran interés. Por lo tanto,

la PKC tipo- δ sería la isoforma de PKC principalmente responsable de los efectos mediados por PMA en epidermis de ratón.

Por estudios ontogenéticos, la PKC tipo- δ está presente en epidermis de ratones recién nacidos, y su concentración aumenta entre el día 7 y 14 después del nacimiento. Este tipo de incremento ha sido observado en la PKC- γ en cerebro de ratón (Yoshida *et al*, 1988). La cantidad de PKC- α , β y γ también aumenta en epidermis y cerebro de ratón durante este período, después del nacimiento. El aumento de la concentración de las isoformas de PKC en el ratón, entre los días 7 y 14 después del nacimiento, posiblemente reflejaría el cambio de la epidermis de ratón recién nacido al del estado adulto. Esto se correlaciona con la reducción de la actividad mitótica y el engrosamiento de la epidermis, así como con cambios en la expresión de la queratina epidérmica (Fürstenberger *et al*, 1985). Es interesante destacar, que la proliferación celular y la promoción de tumores inducidas por PMA tienen un tiempo de desarrollo similar (Fürstenberger *et al*, 1985; Gschwendt *et al*, 1986b).

Después de la aplicación tópica de PMA a piel de ratón ocurre la *down-regulation* de la PKC-tipo δ . La cantidad de PKC tipo- δ disminuye rápidamente y luego de 16 horas llega a nivel menor del 20% respecto del control. Con respecto a las PKC- α , β y γ , éstas son proteolizadas después de 8 horas de tratamiento con PMA. Previamente, se observó una disminución de la PKC tipo- δ después de 2 horas de tratamiento (Gschwendt *et al*, 1989). Esta demora se debería a la aparición de un fragmento de PKC aún activo, PKM, que posteriormente se degradaría totalmente.

A partir de una biblioteca de cDNA de epidermis de ratón, ha sido aislado un clon que codifica para una proteína relacionada con la familia de PKC, de 78 kDa. A esta proteína se la denominó PKC- η (Osada *et al*, 1990); pertenece a la nueva subfamilia de PKCs (nPKCs) que no tiene la región C2 que existe en las PKCs convencionales (α , β y γ).

La PKC- η muestra una mayor homología con la PKC- Σ . Esta similitud se extiende a la región V1, que contiene una secuencia (EXWXDLXPXXKV), también presente en la PKC- Δ . Por el momento no ha podido ser determinada la función de esta región. La similitud en la secuencia, entre las PKC- η y Σ sugiere una similitud en sus propiedades bioquímicas. La PKC- η une ésteres de forbol, con afinidad menor que la de la PKC- α .

Un aspecto común en la distribución de los otros miembros de la familia PKC, es su concentración en cerebro (Nishizuka, 1988; Ohno *et al*, 1987; Ono *et al*, 1988a). En cambio, la expresión de la PKC- η es muy baja en cerebro y alta en pulmón y piel. La presencia de una nPKC, independiente de Ca^{2+} , en piel de ratón, implicaría que los efectos de los ésteres de forbol en piel de ratón involucran la activación de la nPKC.

Recientemente ha sido clonado un cDNA que codifica para una nueva PKC. Esta enzima, PKC-L, pertenece a la subfamilia nPKC y ha sido aislada de una biblioteca de cDNA de queratinocitos humanos (Bacher *et al*, 1991). Por análisis de *Northern blot* se determinó que su expresión era más abundante en pulmón, mientras que en corazón y piel la expresión era menor. En cerebro, la PKC-L está ausente. Si bien la PKC-L tiene bastante homología con la PKC- Ξ , las diferentes distribuciones tisulares estarían en contra de la posibilidad de que la PKC-L fuera la homóloga humana de la PKC- Ξ de rata (o de la nPKC de conejo).

Se investigó la expresión de la PKC-L en varias líneas celulares humanas derivadas de piel. El mRNA para PKC-L se expresa en la línea de carcinoma de piel humano, SCL-1, y en la línea de queratinocitos humanos HaCaT. También se expresa en la línea celular A431 de carcinoma epidermoide humano. La expresión de la PKC-L en líneas celulares derivadas de piel y la capacidad de la enzima de unir ésteres de forbol, sería evidencia suficiente para que la PKC-L fuera capaz de transmitir señales mediadas por ésteres de forbol.

Esta enzima se autofosforila y la autofosforilación se activa con el agregado de fosfatidilserina y ésteres de forbol.

Cuando se compararon las secuencias aminoacídicas de las PKC-L y η , se encontró un 93% de homología total. En consecuencia, la PKC-L y η no son dos isoformas sino una, que se expresan en distintos organismos.

4.3.6. Isoformas de PKC en *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*

En el nematodo *Caenorhabditis elegans* se clonó el gen tpa-1, que está involucrado en la acción del PMA. Este gen codifica para una proteína de 526 aminoácidos.

En la proteína tpa-1 aproximadamente el 45% de los aminoácidos 1 a 148 son idénticos a aquéllos de la región C₁ de las PKCs; en esta región también existen las regiones ricas en cisteínas. En esta región no existe una secuencia correspondiente a la región C₂ de las PKCs.

La región comprendida entre el aminoácido 220 al 526 en la proteína tpa-1 tiene bastante homología con el dominio catalítico de varias quinasas de proteínas, aunque la mayor homología (53-63%) la comparte con la PKC. En esta región también existen sitios potenciales de unión a ATP. Las secuencias DLKLDN (aminoácidos 351 a 356) y GTPDYISPE (aminoácidos 389 a 397) sugieren que la proteína tpa-1 es una quinasa de serina y treonina, como las PKCs conocidas.

En el mismo nematodo la mutación del gen unc-13 provoca movimientos no coordinados. El gen afecta al sistema nervioso y fue clonado a partir de una biblioteca de expresión (Maruyama y Brenner, 1991).

El gen unc-13 codifica para una proteína de 1734 aminoácidos. Una región central de 300 aminoácidos de la proteína unc-13 tiene

bastante similitud con el dominio regulatorio de la PKC. En la PKC este dominio contiene las regiones C₁ y C₂, que son responsables de la dependencia a diacilglicerol o ésteres de forbol, fosfatidilserina y Ca²⁺. En la zona que correspondería a la región C₁ de las PKCs, solamente existe una de las repeticiones de cisteínas, como ocurre en la PKC- ξ . También tiene una región homóloga al dominio C₂ de la PKC. El sitio de unión a ATP, que se encuentra en todas las quinasas de proteínas, no existe en la proteína unc-13. Por lo tanto, posiblemente esta proteína no sea una quinasa de proteínas.

Por la secuencia aminoacídica, se puede suponer que la proteína unc-13 interactuaría con ésteres de forbol y Ca²⁺. Para investigar esto, se expresó en *E. coli* una proteína recombinante que contenía los aminoácidos 389 a 1090 de la proteína unc-13. Se hicieron ensayos *in vitro* de unión a ésteres de la proteína y se determinó que esta proteína une [³H]PDBu en forma dependiente de Ca²⁺. El agregado de diacilglicerol (10 µg/ml) inhibe un 50% la unión del [³H]PDBu. Sin embargo, a diferencia de las PKCs, no requiere fosfatidilserina para la unión de los ésteres de forbol.

Mutaciones en el gen unc-13 causan diferentes defectos del sistema nervioso en *C. elegans*. Algunos de los fenotipos del mutante, como resistencia al inhibidor de acetilcolinesterasa y acumulación de acetilcolina a un nivel muy alto, se explicaría como un defecto en la liberación y almacenamiento de la acetilcolina. De hecho, los ésteres de forbol y el Ca²⁺ aumentan la liberación de neurotransmisores por neuronas (Tanaka *et al*, 1984; Zurgil y Zisapal, 1985).

A partir de bibliotecas genómicas y de cDNA de *Drosophila melanogaster* (Rosenthal *et al*, 1987) se identificó una proteína homóloga a la PKC de mamíferos. Esta proteína tiene un 64% de homología con la PKC- α , 62% con PKC- β y 58% con la PKC- γ de mamíferos. Contiene los dominios de repeticiones de cisteínas, pero no existe un dominio de unión a Ca²⁺.

Mediante experimentos de *Northern blot* se encontraron tres mRNAs igualmente abundantes en el adulto. En el embrión no fue detectado ningún mensajero. Los bajos niveles de mRNAs en el embrión reflejarían la utilización de las proteínas maternas en este estadio del desarrollo, la utilización de otro gen de PKC que en las condiciones del experimento no pudo ser detectado o que la PKC sólo es requerida en etapas más tardías del desarrollo.

5. METABOLISMO DE LOS INOSITOL FOSFOLIPIDOS Y TRANSDUCCION DE SEÑALES

5.1. Generalidades

A fines de la década del 40, Folch (Folch, 1949) aisló a partir del cerebro los polifosfoinosítidos. Más adelante se demostró que consistían en difosfoinosítidos (fosfatidilinositol 4-fosfato, PIP) y trifosfoinosítidos (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, PIP₂) (Dittmer y Dawson, 1961). Tanto el PIP como el PIP₂ son producidos a partir del fosfatidilinositol (PI) a través de fosforilaciones secuenciales en el inositol, por acción de las quinasas de PI y PIP (Colodzin y Kennedy, 1965; Michell y Hawthorne, 1965; Kai *et al*, 1966).

Una gran variedad de señales extracelulares (Tabla 2) inducen el recambio de los inositol fosfolípidos en los respectivos tejidos blanco (Michell, 1975; Berridge, 1981).

Inicialmente se supuso que el blanco primario de las señales extracelulares era el PI (Hokin y Hokin, 1953), pero ahora se sabe que después de la estimulación del receptor, el PIP₂ es degradado inmediatamente para producir 1,2-diacilglicerol (DG) y *myo*-inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) (Abdel-Latif *et al*, 1977; Agranoff *et al*, 1983; Berridge *et al*, 1983; Fisher *et al*, 1984). Estos dos compuestos, DG e IP₃ son producidos por la acción de la fosfolipasa C (PLC) que es activada cuando los receptores son ocupados por hormonas que movilizan Ca²⁺.

Tabla 2: Agonistas que inducen el recambio de los inositol fosfolípidos

- Acetilcolina (M1)	- Bombesina
- Norepinefrina ($\alpha 1$)	- Pancreozimina
- Epinefrina ($\alpha 1$)	- Sustancia P
- Dopamina (D2)	- Bradiquinina
- Histamina (H1)	- Tromboxanos
- Serotonina	- Trombina
- ACTH	- Factor activador de plaquetas
- Vasopresina	- Angiotensina II
- Despolarización del K ⁺	- Colecistoquinina
- Estimulación eléctrica	- Ceruleína
- Quimiatractantes	- Gastrina
- Secretagogos	- Factores de crecimiento
- Mitógenos	- Leucotrieno B ₄
- TRH	- Formil-Met-Leu-Phe
- GnRH	- Fitoheماغlutinina
- 5-Hidroxitriptamina	- Concanavalina A
- Adenosina	- Interleukina I
- Colágeno	

En el cerebro, los polifosfoinosítidos están localizados en dos conjuntos diferentes: un conjunto metabólicamente estable asociado con la mielina y, otro conjunto lábil asociado con neuronas, membranas de la glía y membranas plasmáticas (Eichberg y Hauser, 1967).

En algunos tejidos, habría un único conjunto de fosfoinosítidos que es hidrolizado en respuesta a un agonista. Esto se demostró por primera vez en la glándula de la sal de aves, donde un conjunto discreto de PI se hidrolizaba por estimulación con ACh, formando un conjunto de PA. Si se bloqueaba con atropina, este conjunto de PA revertía al conjunto original de PI (Hokin y

Hokin, 1964).

Estudios realizados en células WRK-1 (Koreh y Monaco, 1986) y en eritrocitos (Muller *et al*, 1986) indican que una parte del PIP₂ (presumiblemente ubicado en la membrana plasmática) sería inaccesible a la PLC, debido a que serviría como anclaje de las proteínas del citoesqueleto (Anderson y Marchesi, 1985; Yang *et al*, 1986).

El IP₃ libera Ca²⁺ de vesículas no mitocondriales (Burgess *et al*, 1984; Joseph *et al*, 1984; Streb *et al*, 1983). El aumento de Ca²⁺ citosólico libre produce una variedad de efectos a través de la acción de quinasas de proteínas dependientes de Ca²⁺/calmodulina y de la modulación directa de otras actividades enzimáticas (Rasmussen, 1984).

Por otro lado, el diacilglicerol actúa sobre la PKC aumentando la afinidad de la enzima por el Ca²⁺ y la fosfatidilserina, causando la activación de la misma a concentraciones fisiológicas de Ca²⁺ (10⁻⁷ M) (Nishizuka, 1984).

5.2. Inositol-1,4,5 trisfosfato como segundo mensajero

El Ca²⁺ citosólico puede ser movilizado desde compartimientos intracelulares y/o extracelulares. Cuando la mayoría de las células son activadas por agonistas que movilizan Ca²⁺ se producen 2 fases en la movilización del ión. Inicialmente el Ca²⁺ es liberado de compartimientos intracelulares y luego sigue un flujo de Ca²⁺ desde el medio extracelular (Putney, 1978; Rasmussen y Barrett, 1984; Rubin, 1982; Schulz y Stolze, 1980). Parte del calcio citosólico derivado de compartimientos intracelulares es liberado hacia el exterior de la célula (Altin y Bygrave, 1985), aunque también hay evidencias de que ese Ca²⁺ es tomado por las mitocondrias (Biden *et al*, 1986).

Hace algunos años se sugirió que un segundo mensajero generado durante la hidrólisis de los polifosfoinosítidos en la membrana

plasmática, estaría involucrado en la movilización del Ca^{2+} intracelular (Michell, 1975; Fain y Berridge, 1979a, 1979b).

La adición de IP_3 a células pancreáticas permeabilizadas resultaba en la liberación del Ca^{2+} intracelular (Streb *et al*, 1983). La liberación de Ca^{2+} en células permeabilizadas es rápida y ocurre a concentraciones muy bajas de IP_3 (10^{-7}M). Esta liberación es transiente debido a que el IP_3 se metaboliza rápidamente y el Ca^{2+} es tomado nuevamente por el retículo endoplásmico.

En base a experimentos de fraccionamiento subcelular y al uso de inhibidores metabólicos, el IP_3 liberaría Ca^{2+} de una fracción de membrana que forma parte del retículo endoplásmico (Biden *et al*, 1984; Carstem y Miller, 1985; Joseph *et al*, 1984; O'Rourke, 1985).

5.3. Receptor de IP_3

El IP_3 que se forma después de la hidrólisis de los fosfoinosítidos, puede ser posteriormente hidrolizado (Berridge e Irvine, 1989) o interactuar con receptores que intervienen en la liberación intracelular de Ca^{2+} .

Ha sido purificada una proteína de 250 kDa, que se piensa que es el receptor de IP_3 (Supattapone *et al*, 1988). Esta proteína es abundante en las células de *Purkinje cerebelares*; es una glicoproteína que une heparina y concanavalina, y es sustrato de la quinasa dependiente de AMPc.

Se le han dado varios nombres: P400 (Furuichi *et al*, 1989), PCPP260 (Walaas *et al*, 1986) y GP-A (Groswald y Kelly, 1984).

A partir de una biblioteca de cDNA de cerebelo de ratón se obtuvo un cDNA que codifica para la proteína P400 (Furuichi *et al*, 1986). Esta proteína tiene 2749 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 313 kDa. Por perfiles hidropáticos, se llegó a la conclusión de que la proteína tendría 9 dominios transmembrana;

pero por estudios de inmunolocalización se determinó que una región grande amino-terminal se encuentra en la cara citoplasmática del retículo endoplásmico. Por lo tanto, existen 7 dominios transmembrana cercanos al extremo carboxilo-terminal. El dominio citoplasmático contendría el sitio de reconocimiento de IP₃, así como los elementos regulatorios. También se considera que la región que transloca el Ca²⁺ estaría ubicada en los dominios transmembrana. Sin embargo, esta asignación de dominios funcionales todavía es tentativa.

5.4. Caminos enzimáticos

En la figura 11 se resumen los principales eventos intracelulares que ocurren en el hígado como consecuencia de la producción de IP₃ y DG a partir del PIP₂.

Dos enzimas diferentes producen la hidrólisis del PIP₂ (Irvine, 1982): una fosfomonoesterasa (*paso a*) que cliva el fosfato de la posición 5 del anillo inositol para dar PIP, y la fosfolipasa C que al ser activada por alguna señal extracelular produce diacilglicerol e IP₃ (*paso e*). El PIP es metabolizado posteriormente por una fosfomonoesterasa para dar PI (*paso b*), aunque también podría ser sustrato de la fosfolipasa C. La resíntesis del PIP y del PIP₂ tiene lugar por acción de la PI quinasa (*paso c*) y de la PIP quinasa (*paso d*), ambas enzimas requieren ATP para su actividad.

El *myo*-inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃) activa la liberación del Ca²⁺ de compartimientos intracelulares. Este compartimiento intracelular sería el retículo endoplásmico (Streb *et al*, 1984). Solamente parte del conjunto de Ca²⁺ del retículo endoplásmico es sensible al IP₃; en promedio el IP₃ libera de un 30 a un 50% del conjunto de Ca²⁺ no mitocondrial, el restante es liberado por ionóforos de Ca²⁺. Esto implica que el conjunto insensible a IP₃ es un compartimiento separado por una membrana. La localización anatómica y la identidad de los conjuntos sensibles y no sensibles a IP₃ aún no se conocen.

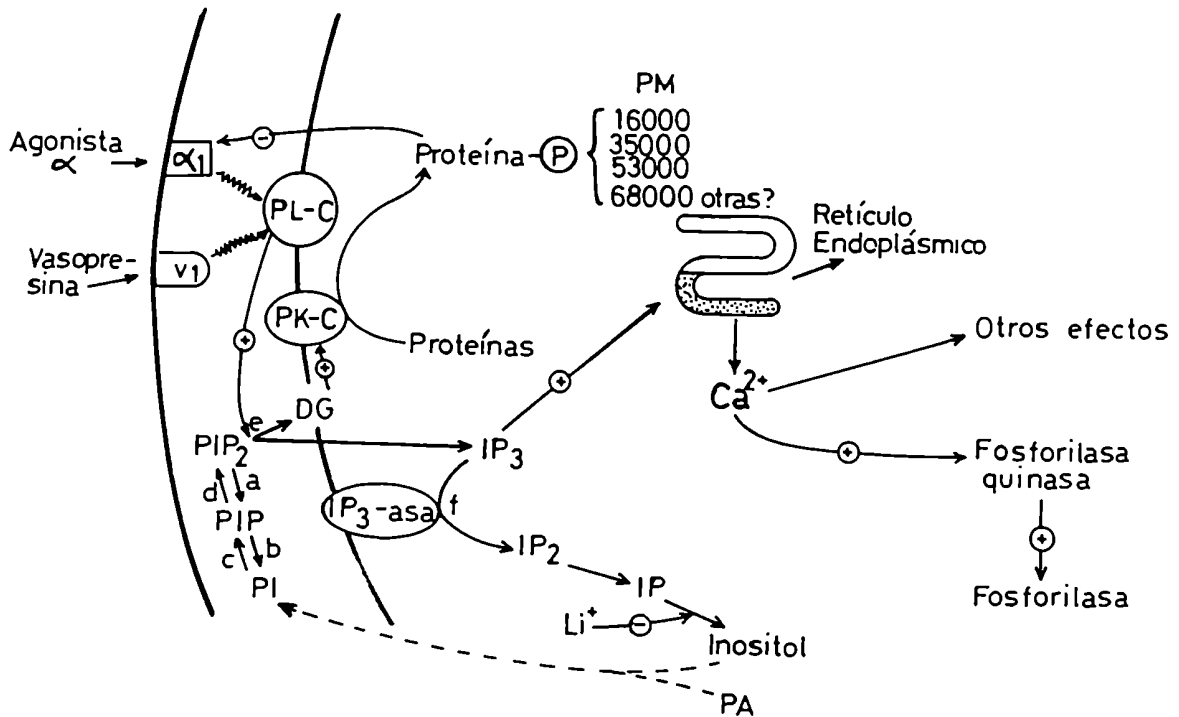


Figura 11: Eventos intracelulares que ocurren como consecuencia de la activación de la fosfolipasa C (PLC)

Las reacciones anotadas con letras son : a, PIP_2 fosfomonoesterasa; b, PIP fosfomonoesterasa; c, PI quinasa; d, PIP quinasa; e, PIP_2 fosfodiesterasa; y f, IP_3 fosfomonoesterasa.

Luego el IP_3 es hidrolizado por una fosfomonoesterasa específica, dando *myo*-inositol-1,4-bisfosfato (IP_2) (paso f). Esta enzima se ha encontrado predominantemente en la membrana plasmática de hepatocitos (Seyfred *et al*, 1984) y en eritrocitos (Downes *et al*, 1982; Hawkins *et al*, 1984). El IP_2 subsecuentemente es hidrolizado a inositol-1-fosfato (IP), que a su vez es metabolizado a *myo*-inositol por una fosfomonoesterasa sensible al Li^+ (Berridge *et*

al, 1982; Hallcher y Sherman, 1980). El diacilglicerol es hidrolizado a ácido fosfatídico (PA) que es transportado al retículo endoplásmico por una proteína de intercambio donde se convierte en PI, y este último, finalmente, es transportado a la membrana plasmática por otra proteína de intercambio (Berridge, 1981).

Como ya se había mencionado, el diacilglicerol que es producido en las membranas a partir del PIP₂, aumenta la afinidad de la PKC por el Ca²⁺, de manera tal que la concentración del ión necesaria es del orden de 10⁻⁷ M. En consecuencia, se tiene una enzima totalmente activada sin un incremento neto de la concentración de Ca²⁺. Entonces se puede concluir que la PKC es bioquímicamente dependiente y fisiológicamente independiente del Ca²⁺.

Cuando se estimulan plaquetas con trombina, colágeno o factor activador de plaquetas (PAF), se liberan algunos productos de los gránulos plaquetarios (serotonina), de los cuerpos densos (nucleótidos de adenina), de los gránulos α (β -tromboglobulina) y de los lisosomas (hidrolasas ácidas). Estas reacciones están asociadas principalmente con la fosforilación de dos proteínas endógenas, una de 40 kDa y otras de 20 kDa (Haslam y Lynham, 1977; Kawahara *et al*, 1980; Ieyasu *et al*, 1982; Sano *et al*, 1983).

La proteína de 20 kDa es idéntica a la cadena liviana de la miosina, y la enzima responsable de esta reacción es dependiente de calmodulina y requiere absolutamente de la movilización de Ca²⁺ (Hathaway y Adelstein, 1979; Naka *et al*, 1983). Por otro lado, la PKC es la enzima responsable de la fosforilación de la proteína de 40 kDa (Kawahara *et al*, 1980; Ieyasu *et al*, 1982; Sano *et al*, 1983).

Cuando las plaquetas son estimuladas, se produce rápidamente diacilglicerol (DG) con la concomitante desaparición de los inositol fosfolípidos (Kawahara *et al*, 1980; Ieyasu *et al*, 1982; Sano *et al*, 1983; Bell y Majerus, 1980). El DG se produce transientemente; después de un minuto desaparece formándose nuevamente inosi-

tol fosfolípidos o degradándose a ácido araquidónico. La aparición transiente del DG en membranas está siempre asociada con la activación de la PKC.

Cuando se tratan células intactas con el diacilglicerol OAG o el éster de forbol PMA, no se inducen la hidrólisis de los inositol fosfolípidos, la formación de diacilglicerol, ni la liberación de ácido araquidónico (Kaibuchi *et al*, 1983).

Las plaquetas son útiles para demostrar la activación directa de la PKC, debido a que la fosforilación de la proteína de 40 kDa puede utilizarse como indicador. La fosforilación de esta proteína confirmaría entonces la activación de la PKC.

No hay movilización del Ca^{2+} medido indirectamente por la fosforilación de la proteína de 20 kDa (Kaibuchi *et al*, 1983) o directamente usando un indicador intracelular de Ca^{2+} , quin-2 (Rink *et al*, 1983).

Basándose en estas observaciones, se llega a la conclusión de que el diacilglicerol que se produce transientemente a partir de los inositol fosfolípidos, es un activador directo de la PKC.

5.4.1 Fosfolipasa C

La estimulación de la hidrólisis de los fosfoinosítidos por una gran variedad de hormonas y neurotransmisores genera IP_3 y DG (figura 12). La fosfolipasa C, que cataliza la hidrólisis del PIP_2 , está presente en la mayoría de las células de mamíferos, en plantas y en varios microorganismos (Rhee *et al*, 1989; Henner *et al*, 1988; Kuppe *et al*, 1989). A partir del aislamiento directo de proteínas, la caracterización inmunológica y estudios de clonado molecular se llegó a la conclusión de que habría 4 tipos de PLC en tejidos de mamíferos (α , β , γ y δ). Todas ellas son polipéptidos únicos y productos de genes discretos (Rhee *et al*, 1989; Ryu *et al*, 1987). Mediante electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida se han determinado los pesos moleculares

de estas proteínas: 62-68 kDa, 159-154 kDa, 145-148 kDa y 85-88 kDa para las PLC- α , β , γ y δ respectivamente (Ryu *et al*, 1987). Las 4 enzimas tienen propiedades catalíticas similares, hidrolizan PI, PIP y PIP₂ y su actividad es dependiente de la concentración de Ca²⁺. Las velocidades de hidrólisis del PIP y PIP₂ por la PLC- α en ausencia de Ca²⁺ era aproximadamente un 30% de la velocidad máxima, mientras que la hidrólisis por las otras enzimas era insignificante en ausencia de Ca²⁺ (Rhee *et al*, 1989).

Los 4 tipos de enzimas no sólo son muy distintas en el tamaño, sino también en la secuencia aminoacídica. Esta falta de similitud es consistente con la ausencia de reactividad inmunológica cruzada entre ellas. Cuando se compararon las secuencias de las PLC- β , γ y δ se encontró entre un 40-60% de similitud en dos regiones. Estas dos regiones se llamaron X e Y, de 150 y 240 aminoácidos respectivamente (Figura 12). Estas 2 regiones constituirían, separada o conjuntamente un dominio catalítico. Este dominio sería importante en el reconocimiento específico de los fosfoinosítidos y en la hidrólisis de las uniones fosfodiéster. Las 3 enzimas tienen una región amino-terminal de 300 aminoácidos, que precede al dominio X. La homología en esta región es solamente del 20%.

La PLC bacteriana, específica de PI, reconoce la estructura de inositol-fosfato presente en el PI, pero no hidroliza PIP ni PIP₂ (Kuppe *et al*, 1989). Los genes que codifican para la PLC de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* han sido clonados y sus secuencias aminoacídicas son casi idénticas (Henner *et al*, 1988; Kuppe *et al*, 1989).

Aunque el tamaño de la PLC de *Bacillus* es mucho menor, existe un segmento de 70 aminoácidos que tiene un 20% de identidad con el dominio X de las PLCs de mamíferos. Esto estaría de acuerdo con la hipótesis de que el sitio activo de las PLCs se encontraría en el dominio X.

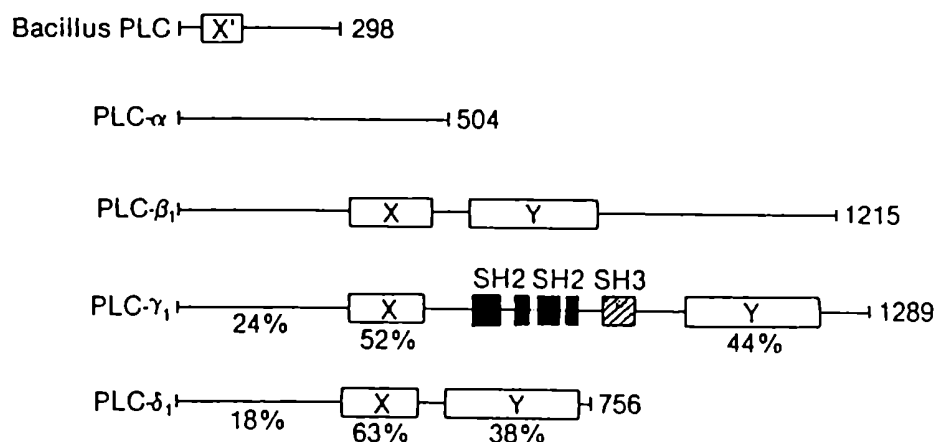


Figura 12: Representación lineal de fosfolipasa C de *Bacillus* y de cuatro tipos de mamíferos.

X e Y: dominios homólogos comunes de las PLC- β_1 , γ_1 y δ_1 ; X': dominio en *Bacillus* parcialmente homólogo al X de mamíferos. SH2 y SH3: homología de tipo src.

La secuencia de la PLC- α ha sido deducida a partir de cDNA de células basofílicas leucémicas de rata. Esta no muestra similitud con las secuencias de las otras PLCs (Bennett *et al*, 1988), además las propiedades catalíticas de la PLC- α son más parecidas a las de la PLC de *Bacillus* que a las de las otras PLCs de mamíferos. De manera tal que habría 2 posibilidades, la primera es que en mamíferos existirían 2 clases de PLCs, una que contiene los dominios conservados X e Y y la otra sin esas dos regiones. La segunda posibilidad es que el cDNA aislado de células basofílicas leucémicas de rata no sería un gen verdadero.

Utilizando como sondas los dominios conservados X e Y de las PLCs, se hizo un rastreo a baja rigurosidad de cDNA de varios tejidos. De esta manera se clonaron y secuenciaron 4 cDNAs relacionados con PLC (Emori *et al*, 1989). Estas 4 nuevas PLCs están re-

lacionadas estructuralmente con algunas de las 3 PLCs (β , γ y δ) aisladas de cerebro bovino y de rata (Figura 13). Esto sugiere que cada uno de las PLCs constituyen diferentes familias. La diferencia de estructura de los diferentes tipos de PLC no se debe a una diferencia en especie y/o tejido. Por ejemplo, en la PLC- γ_1 de cerebro de rata, bovino y humano existe un 95% de homología y esta enzima se encuentra en casi todos los tejidos de mamíferos.

La PLC tipo β tiene un dominio C-terminal de 400 aminoácidos que lo diferencia de los tipos γ y δ . Este dominio contiene aproximadamente un 40% de aminoácidos cargados (Katan *et al*, 1988). El gen que codifica para la PLC en *Drosophila*, Norp A, (Bloomquist *et al*, 1988) es similar al de PLC- β . La similitud entre ambas está dada por ese dominio con una alta proporción de aminoácidos cargados. Otra característica de la PLC- β es una región de residuos ácidos consecutivos, ubicada entre los dominios X e Y. La PLC Norp A no posee este dominio ácido. Por último, la PLC tipo δ se distingue debido a la ausencia de una región carboxi-terminal después de los dominios X e Y.

Las PLCs γ_1 y γ_2 contienen en la región existente entre los dominios X e Y, 3 regiones relacionadas en cuanto a secuencia con las porciones limitadas del oncogen *src* (Stahl *et al*, 1988; Suh *et al*, 1988). Las 3 regiones son duplicados de SH2 y SH3 (homología 2 y 3 del oncogen *src*). Por lo tanto, la PLC- γ puede ser dividida, desde el punto de vista estructural en 3 dominios: X, Y y SH (SH2 y SH3). Se estudió la función de cada uno de los dominios expresando plásmidos que codificaban para PLC- γ s truncadas en *Escherichia coli* (PLC- γ_1) (Emori *et al*, 1989) o en células COS1 (PLC- γ_2). Cuando se deletionaba el dominio SH se detectaba actividad de PLC, aunque se reducía a un 10-30% del control. En cambio, cuando la delección era en el dominio X o Y se perdía totalmente la actividad. En consecuencia, los dominios X e Y son esenciales para la actividad de la PLC, no así el dominio SH.

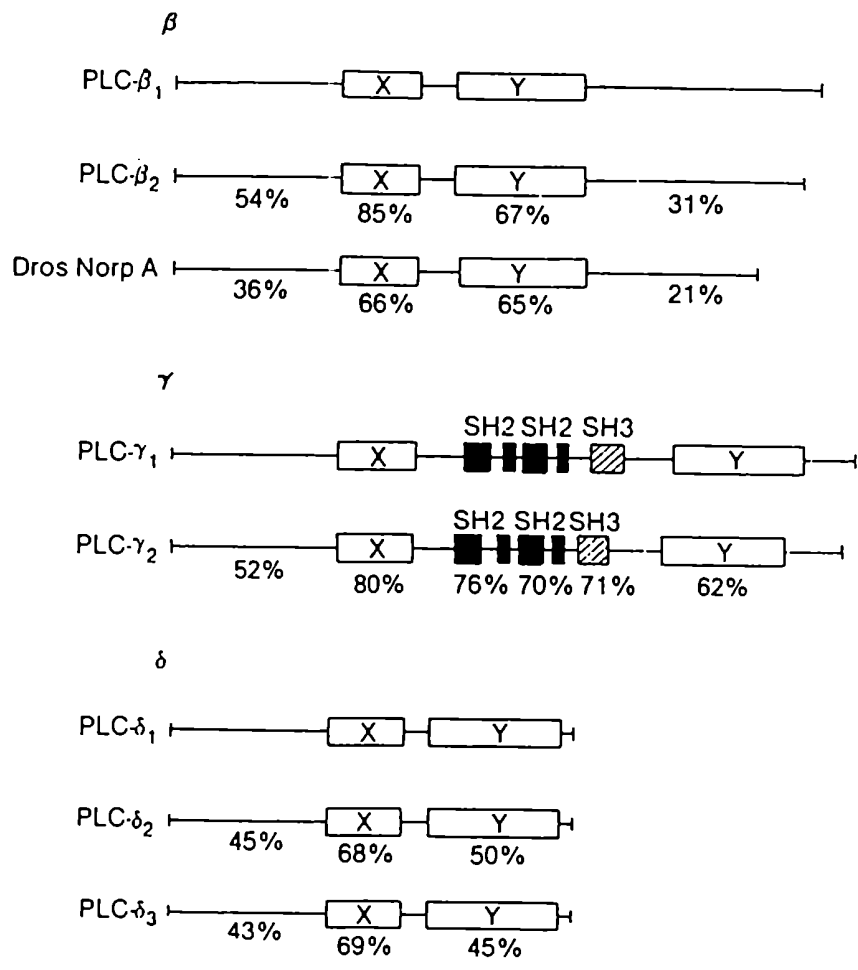


Figura 13: Representación lineal de los miembros de las PLCs tipo β, γ y δ.

Los porcentajes reflejan el grado de identidad con PLC-β₁, PLC-γ₁ o PLC-δ₁ para cada tipo.

Recientemente ha sido identificada por métodos bioquímicos otra PLC denominada PLC-ε, que tiene un peso molecular de 86 kDa. Esta enzima es citosólica y su actividad está regulada por proteínas G (Thomas *et al*, 1991).

5.4.2 Proteínas G

Existen 2 tipos de proteína G: las "pequeñas proteínas G" que son polipéptidos de aproximadamente 200 aminoácidos y las proteínas G heterotriméricas, compuestas por subunidades α , β y γ . Las primeras actúan regulando crecimiento celular, secreción de proteínas e interacción de vesículas intracelulares (Hall, 1990). Las segundas están asociadas a la transducción de señales mediadas por receptores que se encuentran en la superficie celular.

De acuerdo al modelo de acoplamiento de la adenilil ciclasa con las proteínas G, la interacción de un agonista con su receptor inicia 2 procesos; uno lleva a la desensibilización a través de una modificación del receptor y el otro es generador de señales que comienza con la activación de la proteína G (figura 14). Cuando el receptor activado interacciona con la proteína G se produce el intercambio de GDP, unido a la subunidad α , por GTP, de manera que el complejo α -GTP se disocia del heterodímero $\beta\gamma$. La subunidad α con GTP unido y la subunidad $\beta\gamma$ interaccionan con proteínas efectoras que posteriormente amplificarán la señal. Cuando el GTP unido a la subunidad α es hidrolizado a GDP finaliza el efecto regulatorio. Entonces la subunidad α se reasocia al complejo $\beta\gamma$.

Mediante estudios en los que se utilizan células permeabilizadas o membranas aisladas se ha establecido que las proteínas G están involucradas en la activación de la fosfolipasa C mediada por receptor. En estas preparaciones las respuestas inducidas por agonistas pueden ser simuladas por la adición de Ca^{2+} o potenciadas por el agregado de GTP o análogos del GTP.

Gomperts (1983) demostró que los nucleótidos de guanina estimulan la secreción Ca^{2+} -dependiente de histamina en mastocitos. Propuso que una proteína que une GTP (proteína G) estaría involucrada en eventos secretorios dependientes de Ca^{2+} .

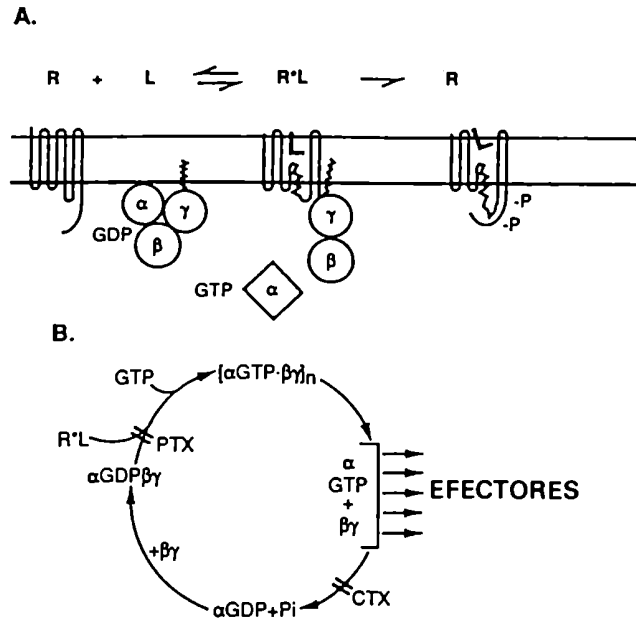


Figura 14: Transducción de señales por proteína G.

(A) un receptor (R) se asocia con un ligando específico (L), estabilizando la forma activada del receptor (R*), que puede intercambiar GTP por DGP unido a la subunidad α de una proteína G específica. El heterodímero $\beta\gamma$ permanecería asociado a la membrana mediante una modificación isoprenil (3) de la subunidad γ . El receptor es desensibilizado por fosforilación específica (-P).

(B) ciclo de proteína G. Las subunidades α (α GTP) y los heterodímeros $\beta\gamma$ pueden interactuar con diferentes efectores (fosfodiesterasa, fosfolipasa C, adenilil ciclasa, fosfolipasa A₂, canales iónicos).

PTX, toxina de *B. pertussis*; CTX, toxina de *V. cholerae*

Análogos no hidrolizables de GTP, GTP γ S y Gpp(NH)p, estimulan la liberación de 5-HT, ligada a fosfoinosítidos y la producción de DG en plaquetas permeabilizadas (Haslam y Davidson, 1984) y la liberación de hormonas paratiroides en células paratiroides bovinas permeabilizadas (Oetting *et al*, 1986). El efecto estimulador de los análogos de GTP son bloqueados en presencia

de GDPβS, indicando la participación de una proteína G, debido a que el GDPβS mantiene las proteínas G en un estado inactivo.

Para identificar las proteínas G que estarían involucradas en la activación de la PLC mediada por receptor se usó la ADP-ribosilación como herramienta (Ui, 1986). Dos toxinas bacterianas, la toxina de *V. cholerae* y la toxina de *B. pertussis*, catalizan una ADP-ribosilación dependiente de NAD⁺ que lleva a la inactivación de la proteína. La toxina de *V. cholerae* ADP-ribosila la subunidad α de G_s. La modificación de esta subunidad disminuye la hidrólisis del GTP unido a ella y la proteína sigue activando a la adenilil ciclasa, resultando en la sobreproducción de AMP_c. Por otro lado, la toxina de *B. pertussis* cataliza la ADP-ribosilación de la subunidad α de G_i. Esta modificación desacopla a la proteína de su receptor. Debido a que G_i inhibe a la adenilil ciclasa, el tratamiento con esta toxina lleva al aumento de la actividad de la enzima.

Cuando se hacía un pretratamiento de mastocitos con toxina de *B. pertussis* se inhibía la secreción de histamina en respuesta a un agonista (Nakamura y Ui, 1985). Posteriormente demostraron que la inhibición de la secreción de histamina se debía a la inhibición de la hidrólisis de los fosfoinosítidos. El grado de inhibición de la respuesta de los fosfoinosítidos fue dependiente de la concentración de la toxina de *B. pertussis* usada durante el pretratamiento y estaba correlacionado con el grado de ADP-ribosilación de una proteína de 41 kDa. Estas observaciones indicaban que la proteína ribosilada era una G_i u otra proteína muy similar a G_i. Debido a que la liberación de histamina inducida por el ionóforo de Ca²⁺, A23187, no estaba afectada por el tratamiento con toxina de *B. pertussis*, se postuló que la proteína sensible a la toxina actuaría en un paso entre la ocupación del receptor y la activación de la PLC. La inhibición de la hidrólisis de los fosfoinosítidos por la toxina de *B. pertussis* ha sido informado en muchos tipos celulares (Okajima *et al*, 1985; Verghese *et al*, 1986; Brandt *et al*, 1985; Steimberg *et al*, 1987). En algunos casos la

formación de IP₃ era sensible a la toxina de *V. cholerae* (Imboden *et al*, 1986).

Aunque las proteínas G_i, G_o y transducina pueden ser ADP-ribosiladas por la toxina de *B. pertussis* y G_s por la toxina de *V. cholerae*, la simple demostración de que un evento mediado por receptor es inhibido por cualquiera de estas dos toxinas, no es suficiente para identificar la proteína G involucrada. La falla de algunas respuestas de fosfoinosítidos, mediadas por receptor, de ser inhibidas por toxina de *V. cholerae* o toxina de *B. pertussis* (Burch *et al*, 1986; Lapetina, 1986; Lnyedi *et al*, 1986; Raben *et al*, 1987; Sasaguri *et al*, 1987; Baukal *et al*, 1988) llevó a sugerir que el acoplamiento de la PLC con los receptores estaría mediado por una única proteína G, denominada G_p o N_p (Litosch y Fain, 1986).

Una proteína G a la que se denominó G_z fue identificada por métodos de clonado molecular (Fong *et al*, 1988; Matsuoka *et al*, 1988). Esta proteína no es ADP-ribosilada ni por la toxina de *B. pertussis* ni por la toxina de *V. cholerae* y estaría relacionada con la regulación de la fosfolipasa C (Cockcroft, 1987; Negishi *et al*, 1987).

Mediante purificación en βX-agarosa (Pang y Sternweis, 1989, 1990) y por técnicas de biología molecular (Strathmann *et al*, 1989; Strathmann y Simon, 1990) se identificó otra clase de proteína G a la que se denominó G_q.

La subunidad α_q purificada a partir de cerebro bovino (Pang y Sternweis, 1990) tiene un peso molecular de 42 kDa, no es reconocida por anticuerpos contra otras subunidades α conocidas y no es sensible a la toxina de *B. pertussis*. Por otro lado, α_q purificada fue capaz de estimular la actividad de PLC parcialmente purificada (Smrcka *et al*, 1991).

5.4.3 Activación de las PLCs

Las acciones biológicas de PDGF y EGF están mediadas por receptores de membrana que poseen actividad citoplasmática de quinasa de tirosina, regulada por el ligando. Cuando los factores de crecimiento se unen al receptor, se inducen la autofosforilación del mismo en residuos tirosina y la estimulación de la actividad de PLC. Recientemente se observó que el tratamiento de varios tipos celulares con EGF o PDGF aumentaba el contenido de tirosinas fosforiladas de PLC- γ_1 , pero no de PLC- β_1 o PLC- δ_1 (Wahl *et al*, 1989; Margolis *et al*, 1989; Meisenhelder *et al*, 1989; Kumjian *et al*, 1989; Morrison *et al*, 1990). Además la fosforilación en tirosinas de la PLC- γ_1 estaba correlacionada con el aumento del recambio de PIP₂. Cuando se sustituían las 3 tirosinas de la PLC- γ_1 por fenilalanina se bloqueaba completamente la actividad de PLC estimulada por PDGF (Kim *et al*, 1990; Wahl *et al*, 1990).

La PLC- γ_2 tiene 2 de los 3 residuos de tirosina de la PLC- γ_1 , con lo que se puede especular que en la activación de la PLC- γ_2 estaría involucrada la fosforilación de las tirosinas, aunque no se conocen la naturaleza de la quinasa de proteínas ni las señales extracelulares ligadas a su activación.

Con respecto a las otras PLCs se sabe que las PLC- β_1 y β_2 son activadas por proteínas G, correspondientes a la familia G_q. Por último, todavía se desconoce la forma de activación de la PLC- δ .

6. CICLO DE FOSFATIDILCOLINA Y TRANSDUCCION DE SEÑALES

El PIP₂, vía PLC, no es la única fuente de DG. El catabolismo de la fosfatidilcolina (PC), inducido por agonistas, también es una fuente de DG (Pelech y Vance, 1989).

El DG puede generarse directamente de la PC, vía PLC o por acción de la fosfolipasa D (PLD). A partir de PC la PLD da ácido fosfa-

tídico (PA) y luego éste es clivado por la PA-fosfohidrolasa (PAP) a DG (Figura 15). Además la hidrólisis de la PC por la fosfolipasa A₂ (PLA₂) produce lisofosfatidilcolina y ácido araquidónico (AA). Este último es también capaz de activar a la PKC (Nishizuka, 1988). La liso-PC puede ser reesterificada a PC o catabolizada a glicerofosfocolina (GPC), la cual posteriormente puede ser degradada a glicerol-3-fosfato (G3P) y colina. El G3P puede ser reconvertido a DG vía síntesis de PA. El DG puede reaccionar con CDP-colina y de esta manera se completa el ciclo de recambio de la fosfatidilcolina.

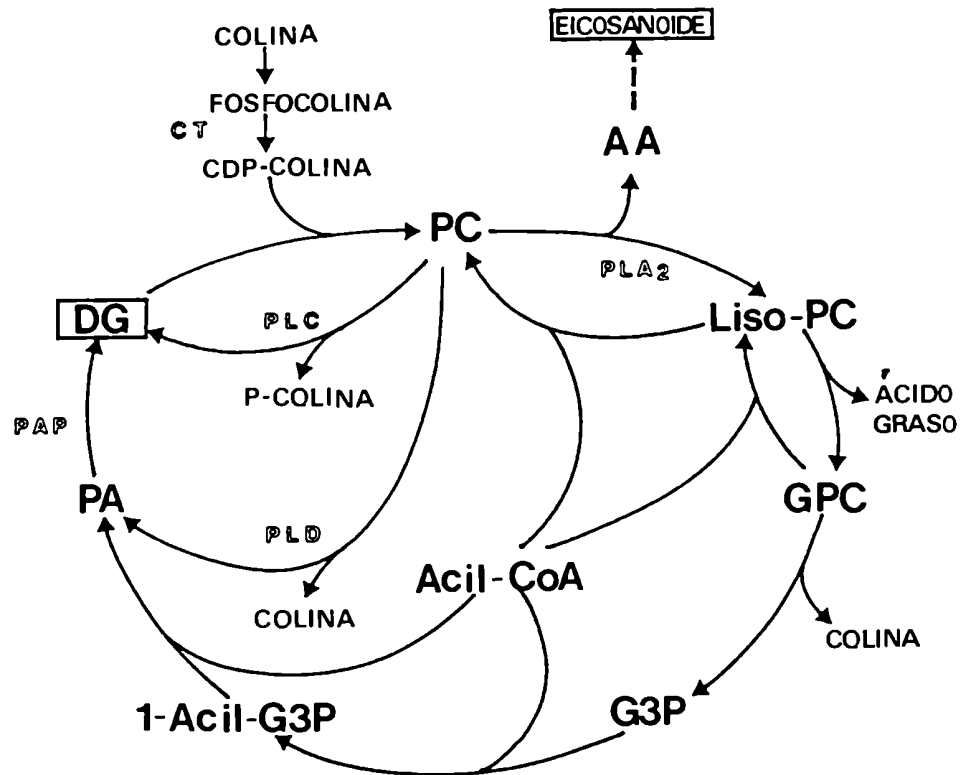


Figura 15: Ciclos de fosfatidilcolina para generar segundos mensajeros (diacilglicerol y eicosanoides).

6.1 Hidrólisis de fosfatidilcolina inducida por agonistas

Al igual que los inositol fosfolípidos, la fosfatidilcolina se encuentra exclusivamente en membranas de células eucariontes. Trabajos recientes señalan que la activación de una PLC específica de PC se daría en respuesta a ciertas hormonas, en forma análoga a la estimulación de la PLC específica de inositol fosfolípidos. El tratamiento de varios tipos celulares con vasopresina, PDGF, bombesina e interleukina-1 aumenta la producción de DG y/o fosfocolina (Irving y Exton, 1987; Besterman *et al*, 1986; Muir y Murray, 1987; Roscoff *et al*, 1988). Mientras que la vasopresina, PDGF, y bombesina también estimulan la hidrólisis del PIP₂ la interleukina-1 no lo hace.

En la mayoría de estos trabajos se llegó a la conclusión que el DG producido se generaba directamente a partir de PC debido a que también se producía fosfocolina. Por otro lado, se vio por cromatografía en capa delgada que la fosfocolina comigraba con la GPC. Por lo tanto, la aparición de la GPC se debería a la hidrólisis de la PC por la PLA₂, y a la posterior hidrólisis de la liso-PC formada por la lisofosfolipasa. El tratamiento de glándula pineal de rata con norepinefrina o el iónoforo de Ca²⁺, A23187, induce la formación de AA y liso-PC a partir de PC por activación de la PLA₂ (Ho y Klein, 1987).

Además de la acción de la PLC en la formación de DG, éste se puede obtener por las acciones secuenciales de la PLD y la PA-fosfohidrolasa, o de la síntesis *de novo* a partir de los productos de hidrólisis de la PC.

Estudios realizados con células REF52 (línea celular embrionaria de rata) o con hepatocitos de rata demuestran la implicación de la PLD en el catabolismo de la PC, inducido por agonistas (Cabot *et al*, 1988; Bocckino *et al*, 1987). Las células REF52 en respuesta a vasopresina muestran un aumento de la hidrólisis de la PC a PA y colina (Cabot *et al*, 1988). De la misma manera en hepatoci-

tos de rata tratados con vasopresina, se observa que el PA se acumula antes que el DG y que también está implicada una proteína G (Bocckino *et al*, 1987). En este caso no se vió incorporación de [³H]glicerol a PA o DG por lo que se descartó la síntesis *de novo* de DG como fuente de PA.

6.2. Biosíntesis de fosfatidilcolina

Una gran variedad de agentes (insulina, EGF, factor de crecimiento de fibroblastos, vasopresina) estimulan la síntesis de fosfatidilcolina (Warden y Friedkin, 1985; Kolesnick, 1987). La enzima que interviene en la síntesis de PC es la CTP:fosfocolinacitidiltransferasa (CT) (Vance y Pelech, 1984; Pelech y Vance, 1984). La CT estaría regulada por la provisión de los sustratos: CTP y fosfocolina, y por la translocación desde el citosol, donde estaría en un reservorio inactivo, al retículo endoplásmico, donde es activada por fosfolípidos (Pelech y Vance, 1984).

Existen 2 mecanismos de regulación de la translocación de la CT. Uno de ellos involucra la liberación de la CT desde el retículo endoplásmico al citosol, mediado por la quinasa de proteínas dependiente de AMPc. El otro mecanismo involucra la translocación de la enzima al retículo endoplásmico y la activación por ácidos grasos (Vance y Pelech, 1984; Pelech y Vance, 1984; Cornell y Vance, 1987). También el DG causaría la translocación de la CT al retículo endoplásmico.

La existencia de un ciclo de fosfatidilcolina presenta un gran número de ventajas frente al ciclo de inositol fosfolípidos. La hidrólisis de PC sería mayor debido a que el conjunto de PC es de 5 a 10 veces más grande que el de los inositol fosfolípidos. Más aún, la resíntesis de PC a partir de DG involucra un solo paso enzimático, mientras que el del PIP₂ involucra 5 pasos enzimáticos.

6.3 Transducción de señales por productos de hidrólisis de fosfatidilcolina

A diferencia de la hidrólisis de PIP_2 catalizada por la PLC, la hidrólisis de la PC produce DG, sin efecto sobre la concentración citoplasmática de Ca^{2+} . Por otro lado, es improbable que la fosfocolina formada a partir de la PC por la activación de la PLC, funcione como un segundo mensajero, debido a que normalmente está presente en gran cantidad en las células (Pelech y Vance, 1984). Sin aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , el DG producido a partir de la PC propaga la señal hormonal vía la activación de las quinasas de proteínas. Por ejemplo, el DG y el PMA activan a la PKC independientemente del Ca^{2+} (Misra y Sahyoun, 1988).

7. ESTERES DE FORBOL Y PROMOCION DE TUMORES

Algunos ésteres de forbol, como el forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), son potentes promotores de tumores, y el sitio primario de su acción sería la superficie de la membrana celular. También ejercen respuestas altamente pleiotrópicas en muchos tipos celulares *in vitro* e *in vivo*. Los ésteres de forbol afectan la morfología celular, el metabolismo de fosfolípidos, la unión de factores de crecimiento, la proliferación y la diferenciación celulares, la comunicación celular, la fosforilación de proteínas, así como también la expresión génica (Colburn, 1987).

El proceso carcinogénico involucra etapas múltiples y es modulado por factores exógenos (ambientales) y endógenos (genéticos y hormonales) (Weinstein *et al*, 1985). Estas etapas son: iniciación, promoción y progresión. Los promotores de tumores se pueden definir como compuestos que no tienen actividad carcinogénica por sí mismos, pero cuando se aplican repetidamente después de una dosis baja o subóptima de un carcinógeno (iniciador) aumentan la tumorigénesis (Weinstein *et al*, 1985).

En el modelo de epidermis de ratón, la iniciación es inducida por un potente mutágeno y es un proceso irreversible. Después de días, semanas o meses, sigue un paso reversible que involucra aplicaciones múltiples de un promotor de tumores, como el PMA (Loehrke *et al*, 1983; Hennings *et al*, 1985). Este tratamiento lleva a la formación de papilomas, algunos de los cuales pueden progresar y formar carcinomas. Es interesante mencionar que la abrasión mecánica de piel de ratón tratada previamente con mutágenos, promueve la formación de papilomas y carcinomas, probablemente por inducción de hiperplasia epidérmica regenerativa.

El éster de forbol PMA funciona como un potente agente promotor de tumores en la etapa de iniciación en el desarrollo de papilomas en piel de ratón.

También se observó que el PMA puede aumentar la capacidad de carcinógenos físicos y químicos, de oncogenes virales y celulares, de transformar células. El PMA aumenta la frecuencia de transformación viral de células infectadas con: adenovirus tipo 5 (Ad 5) (Fisher *et al*, 1978), virus de polioma (Seif, 1980) y virus de papiloma bovino (Amtmann y Sauer, 1982). Cuando está presente el éster de forbol, aumenta la transformación de células de mamíferos transfectados con el oncogen *Ha-ras* (Hsiao *et al*, 1984; Dotto *et al*, 1985). Además de tener efecto en la iniciación de la transformación viral, el PMA aumenta la expresión del fenotipo transformado en células previamente transformadas por virus. Por lo tanto, el PMA induciría cambios celulares, que a su vez son mediadores de la iniciación y expresión del estado transformado.

La PKC es blanco de los ésteres de forbol, ya que éstos activan directamente a la enzima tanto *in vitro* como *in vivo*, de manera que existiría una correlación entre la capacidad de los ésteres de forbol de promover tumores y de activar a la enzima (Castagna *et al*, 1982; Yamanishi *et al*, 1983). El PMA tiene una estructura similar al diacilglicerol (figura 8) y puede sustituirlo a concentraciones extremadamente bajas. Al igual que el diacilglice-

rol, el PMA aumenta la afinidad de la PKC por el Ca^{2+} (en el rango de 10^{-7} M), dando como resultado una enzima totalmente activada sin movilización del Ca^{2+} (Yamanishi *et al*, 1983).

El forbol-12,13 dibutirato (PDBu) es otro potente promotor de tumores. El [^3H]PDBu puede unirse a una preparación homogénea de PKC, solamente en presencia de Ca^{2+} y fosfolípidos, resultando también en la activación de la enzima. La PKC fosforilaría muchos sustratos, y estas modificaciones determinarían respuestas biológicas.

La expresión del gen E1A del adenovirus tipo 5 (Ad5) en una línea celular de fibroblastos embrionarios de rata (CREF) resulta en la transformación morfológica. La eficiencia de transformación mediada por el gen E1A, aumenta si el gen Ad5 E1A salvaje es cotransfectado con un gen de la PKC- β_1 de rata (Su *et al*, 1991). Utilizando genes E1A^{CS} (gen Ad5 E1A de virus mutantes sensibles al frío), que inducen la transformación a 37°C pero son defectivos a 32°C, se demostró que era necesario el gen E1A funcional para que aumente la transformación celular. En cultivos que expresan bajos niveles de PKC- β_1 , el aumento de la transformación viral se eliminaba cuando se agregaba el inhibidor de PKC H-7.

En cambio, la expresión de altos niveles de PKC- β_1 junto con la infección con virus Ad5 resultaba tóxico para las células. Estas observaciones sugieren que la capacidad del PMA de aumentar la transformación de células embrionarias de ratas infectadas con Ad5 (Fisher *et al*, 1978), sería consecuencia de alteraciones celulares inducidas por el promotor de tumores vía un camino mediado por PKC.

La piel es uno de los blancos de las alteraciones celulares inducidas por ésteres de forbol (Raick, 1973; Laskin *et al*, 1981). Después del tratamiento de piel con PMA, las células epidérmicas engrosan y aumenta la actividad mitogénica de las subpoblaciones germinativas de la epidermis. Los ésteres de forbol ejercen sus

efectos tumorigénicos expandiendo las poblaciones de células epidérmicas que ya fueron iniciadas (Yuspa *et al*, 1981). En células no iniciadas, los ésteres de forbol causan hiperplasia y engrosamiento celulares, pero si cesa la aplicación de ésteres de forbol se produce una regresión.

Han sido identificados varios factores celulares que controlan la mitogénesis y la diferenciación de células epidérmicas. Uno de ellos, el factor de crecimiento de transformación- α (TGF- α) es producido por la epidermis normal humana y por cultivos de queratinocitos humanos (Coffey *et al*, 1987). El TGF- α tiene homología estructural con EGF y ambos estimulan la proliferación de queratinocitos (Barrandon y Green, 1987).

Se ha demostrado que el PMA aumenta la expresión de TGF- α en queratinocitos normales (Pittelkow *et al*, 1989). Esta inducción estaría mediada por la PKC, debido a que el tratamiento de queratinocitos con un diacilglicerol permeable (OAG) produce un aumento en la expresión de TGF- α . Además, el efecto de este diacilglicerol se atenúa si se realiza un pretratamiento de los queratinocitos con el inhibidor de PKC, H-7.

La inducción de la transcripción del gen de TGF- α por PMA, estaría dada por un mecanismo molecular similar al de otros genes inducibles por ésteres de forbol (Angel *et al*, 1987; Lee *et al*, 1987). Por ejemplo, en el promotor del gen de la colagenasa se ha identificado una secuencia de *enhancer* inducida por PMA. Esta secuencia está altamente conservada en muchos promotores inducibles por PMA, y es el sitio de unión de un factor de transcripción, AP-1, que actúa en trans y cuya actividad está regulada por PMA. La cicloheximida es incapaz de inhibir la expresión inducida por PMA del gen de la colagenasa. Este factor sería activado por un mecanismo post-traducciona, que probablemente involucraría a la PKC. Este esquema regulatorio funcionaría para la inducción del gen del TGF- α (Pittelkow *et al*, 1989).

Después de un pretratamiento prolongado de queratinocitos con PMA ocurre la *down-regulation* de la respuesta de las células. Esto confirma resultados anteriores, donde tratamientos prolongados de células en cultivo con ésteres de forbol producen la *down-regulation* de la PKC y la pérdida de respuestas bioquímicas de las células al PMA (Collins y Rozengurt, 1982).

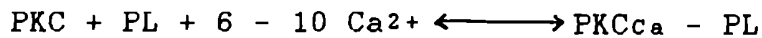
8. ACTIVACION, REGULACION Y FUNCIONES DE LA PKC

8.1. Interacción de la PKC con Ca^{2+}

El Ca^{2+} es necesario para la activación de las PKC- α , β y γ . Cada una de las tres funciones principales de la PKC, actividad enzimática, unión a ésteres de forbol y unión a fosfolípidos, tienen requerimientos diferentes de Ca^{2+} (Bazzi y Nelsestuen, 1987a). La estructura primaria de la enzima no muestra sitios de unión a Ca^{2+} del tipo EF-Hand o calelectrina (Parker *et al*, 1986; Ohno *et al*, 1987b). La unión de Ca^{2+} a la enzima se daría por alguna estructura inusual.

La unión de fosfolípidos es dependiente de Ca^{2+} (Bazzi y Nelsestuen, 1987a; Wolf *et al*, 1985a, 1985b; Hannun *et al*, 1985). Existirían dos modelos para explicar la unión de fosfolípidos en forma dependiente de Ca^{2+} : puente de Ca^{2+} y cambio conformacional de la proteína. En el primero, el Ca^{2+} actúa como un puente entre la proteína y las membranas. En esta interacción estarían involucradas una molécula de Ca^{2+} , cuatro de fosfatidilserina, una de diacilglicerol y una de PKC (Ganong *et al*, 1986; Hannun *et al*, 1986a). En el segundo modelo, la unión de Ca^{2+} induce un cambio conformacional de la enzima, que expone dominios hidrofóbicos y permiten la unión de la PKC a las membranas. Esta propiedad ha sido utilizada para purificar PKC (Walsh *et al*, 1984).

La unión del Ca^{2+} a la PKC estaría dada por el siguiente equilibrio:



La PKC se uniría al Ca^{2+} con baja afinidad ($\leq 2\text{Ca}^{2+}/\text{PKC}$, a $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+}) (Nelsestuen y Bazzi, 1991). El agregado de vesículas de fosfolípidos aumenta a seis los sitios de unión a Ca^{2+} . Entonces, a concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} , éste se uniría a la PKC con tan baja afinidad que sería indetectable. Esta propiedad llevaría a preguntarse si se puede considerar a la PKC como a una proteína que une Ca^{2+} .

Existen otras proteínas dependientes de fosfolípidos para la unión a Ca^{2+} : la calpactina I o lipocortina II (Glenney, 1986) y la lipocortina I o calpactina II (Schlaepper y Haigler, 1987). La fosfolipasa C también podría tener estas propiedades.

8.2. Activación in vitro de la PKC

Los sustratos *in vitro* que se usan más comúnmente en los ensayos, son péptidos o proteínas policatiónicas. Por otro lado, los fosfolípidos son polianiónicos, y la combinación sustrato-fosfolípidos produce interacciones iónicas inespecíficas y agregaciones.

Bazzi y Nelsestuen (1987) propusieron un modelo de activación de la PKC, en el cual el paso clave es la ocupación del sitio activo por el sustrato. Se definieron tres categorías de sustrato *in vitro*:

- A) Protamina: no requiere ningún cofactor para su fosforilación. Interactúa directamente con la PKC y forma agregados exponiendo el sitio activo.
- B) Proteína básica de mielina: requiere fosfolípidos pero no Ca^{2+} . Se une directamente a la PKC, pero necesita de un cofactor (fosfolípidos) para que se produzca la agregación; y de esta manera el sustrato es llevado hacia el sitio activo de la PKC.

C) Histonas: necesitan Ca^{2+} , fosfolípidos y DG o PMA. Interactúan muy débilmente con la PKC. Se necesita Ca^{2+} para que la enzima se una a la membrana y el agregado de DG o PMA produciría un cambio conformacional en la enzima, haciendo accesible el sitio activo al sustrato.

8.3. Especificidad de sustrato

En muchos laboratorios se ha estudiado la especificidad de sustrato de la PKC (Turner *et al*, 1985; Woodgett y Hunter, 1985; House *et al*, 1987). Aunque hay mucha diversidad en las secuencias locales de fosforilación, se determinó que la PKC requiere residuos básicos como muchas otras quinasas de serina y treonina (Glass y Krebs, 1982; Kemp *et al*, 1983). Hay mucha variación en la localización y número de estos residuos, a diferencia de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc en la que el sitio de reconocimiento está dado por la secuencia Arg-Arg-X-Ser (Krebs y Beavo, 1979). Debido a esta complejidad, se usaron péptidos análogos a la secuencia del sitio de fosforilación de varias proteínas, con un solo residuo básico (House *et al*, 1987). Uno de los péptidos usados fue el análogo de la glucógeno sintasa (residuos 1-10: PLSRTL^{SVSS}) que es un modelo útil porque es fosforilado con una constante de afinidad (K_m) de $32,5 \mu M$ y contiene un solo residuo Arg en la posición 4. Cuando se sustituye la Arg⁴ por leucina o lisina, el K_m aumenta a $1600 \mu M$. Por lo tanto, la PKC tendría preferencia por sustratos con un residuo de arginina como mínimo.

Por estos resultados y por trabajos anteriores en los que se utilizaron análogos de histona (O'Brien *et al*, 1984) y de la proteína básica de mielina (Turner *et al*, 1985), es evidente que la PKC reconoce determinantes específicos situados hacia el extremo amino terminal del residuo fosforilado.

Otro péptido utilizado fue el análogo de la proteína ribosomal S6 (residuos 229-239: AKRRRLSSLRA). En este caso, la Arg²³⁸ situada

hacia el extremo carboxilo terminal del residuo fosforilado es importante para mantener el Km bajo.

En conclusión, la PKC puede reconocer determinantes específicos primarios ubicados hacia los extremos carboxilo o amino terminales del residuo fosforilado, a diferencia de la quinasa dependiente de AMPc que tiene preferencia por la localización amino terminal de los determinantes específicos.

8.4. Sustratos in vitro

En la síntesis del glucógeno, la fosforilación covalente de la glucógeno sintasa es un mecanismo regulatorio importante (Cohen, 1982). La enzima de hígado puede ser fosforilada por muchas quinasas de proteínas (Camici *et al*, 1984). La exposición de hepatocitos de rata al éster de forbol PMA produce la inactivación de la glucógeno sintasa (Roach y Goldman, 1983). En otro trabajo se demostró que la PKC es capaz de fosforilar a la enzima *in vitro* (Ahmad *et al*, 1984), pero no se puede asegurar si esta fosforilación tiene algún significado fisiológico, ya que la glucógeno sintasa *in vitro* es un sustrato muy promiscuo.

La estructura del citoesqueleto varía en respuesta a una gran variedad de estímulos. Estos cambios son regulados por Ca²⁺. Algunas de las proteínas que constituyen el citoesqueleto o que interactúan con él, o algunos elementos contráctiles son fosforilados durante la activación celular (Kawamoto e Hidaka, 1984). La PKC es capaz de fosforilar elementos contráctiles, tales como la cadena liviana de la miosina (Endo *et al*, 1982) y la troponina C (Kato *et al*, 1983). También la PKC puede fosforilar vinculina y filamina, dos proteínas que unen actina (Kawamoto e Hidaka, 1984).

La vinculina está localizada en la zona donde los microfilamentos se unen a la membrna celular (Geiger, 1979; Burridge y Feramisco, 1980). Por lo tanto, la localización de la vinculina es adecuada para que sea fosforilada por la PKC. La filamina no tendría aso-

ciación específica con los fosfolípidos. Sin embargo, la PKC está distribuída en las fracciones citosólica y de membranas.

Se demostró que en presencia de actina, la PKC es incapaz de fosforilar vinculina y filamina; esto sugeriría que la unión de actina a estas proteínas ocurriría en la región de fosforilación por PKC. El tratamiento con PMA produce desorganización de los filamentos de actina (Rifkin, 1979). Entonces se podría suponer que la fosforilación por la PKC de estas proteínas que unen actina, estaría implicada en los cambios morfológicos inducidos por los ésteres de forbol.

Los ésteres de forbol, que actúan a través de la PKC, inducen los mismos efectos que algunos mitógenos polipeptídicos. Estos últimos se unen a receptores de membranas y tienen actividad de tirosina quinasa. Los promotores de tumores o el DG estimulan la fosforilación en tirosina de una proteína de 42 kDa (Bishop *et al*, 1983; Gilmore y Martin, 1983; Cooper *et al*, 1984). El receptor de EGF, que tiene actividad de tirosina quinasa, es fosforilado por la PKC (Cochet *et al*, 1984; Davis y Czech, 1985). Esta fosforilación reduce la actividad de quinasa de proteínas del receptor y su afinidad por EGF (Cochet *et al*, 1984; Friedman *et al*, 1984; Iwashita y Fox, 1984). Todos estos datos sugieren que existirían interacciones múltiples entre los eventos mediados por PKC y por tirosinas quinasas.

Las fosfoproteínas de membrana, pp60^{c-src} y pp60^{v-src} tienen actividad de tirosina quinasa (Hunter y Cooper, 1985). En ambas proteínas, la ser¹⁷ es el sitio principal de fosforilación en ser (Collett *et al*, 1979; Karess y Hanafusa, 1981; Cross y Hanafusa, 1983). En células tratadas con los promotores de tumores, PMA y teleocidina o con DG, se demostró que las dos fosfoproteínas se fosforilan en un sitio no descrito hasta el momento, Ser¹² (Gould *et al*, 1985). Previamente, se informó de un aumento de la fosforilación en la región amino terminal de la proteína pp60^{c-src}, después del tratamiento de células embrionarias de po-

llo con promotores de tumores o PDGF (Tamura *et al*, 1984). La fosforilación en la Ser¹² es mediada por la PKC (Gould *et al*, 1985). La Ser¹² en pp60^{src} está rodeada de varios residuos básicos; esta misma característica la comparten otros sustratos de PKC, como el receptor de EGF (Davis y Czech, 1985; Gould *et al*, 1985).

La similitud de este sitio de la pp60^{src} con el de EGF, y la ocupación completa de la Ser¹² después del tratamiento con promotores de tumores o agentes que aumenten los niveles de DG, sugiere que este sitio tendría una función fisiológica.

La topoisomerasa I produce la ruptura de uniones fosfodiéster en una de las cadenas de ADN, produciendo la relajación de las moléculas superenrolladas de ADN (Wang, 1985; Liu y Miller, 1981). Esta enzima es requerida para la síntesis de rRNA (Zhang *et al*, 1988) y está asociada con genes transcripcionalmente activos (Gilmour *et al*, 1986; Muscarella *et al*, 1987; Ness *et al*, 1988). Su actividad aumenta durante la proliferación celular (Tricoli *et al*, 1985).

La ADN topoisomerasa I es una enzima nuclear, y la PKC también ha sido detectada en el núcleo (Leach *et al*, 1989; Masmoudi *et al*, 1989). La PKC fosforila *in vitro* a la topoisomerasa I; esto resulta en un aumento (2 a 3 veces) de la actividad de la topoisomerasa I (Samuels *et al*, 1989).

Por lo tanto, la PKC podría ser esencial en el control de procesos nucleares antes y durante el crecimiento y diferenciación celulares.

Muchas otras proteínas celulares pueden ser fosforiladas por la quinasa de proteínas C: la proteína ribosomal S6 (Parker *et al*, 1985); la proteína que une calmodulina en eritrocitos, CaM-BP_{103/97} (Ling *et al*, 1986); la proteína-C asociada a filamentos de músculos cardíaco y esquelético (Lim *et al*, 1985); la proteína talina de citoesqueleto (Litchfield y Ball, 1986); la proteasa

neutra activada por Ca^{2+} , CANP (Hincke y Tolnai, 1986); el receptor muscarínico de cerebro, mAChR (Ho *et al.*, 1987); el receptor del ácido γ -aminobutírico A, receptor GABA_A (Browning *et al.*, 1990); el receptor de insulina (Bollag *et al.*, 1986); y la ATPasa Na^+/K^+ (Lowndes *et al.*, 1990). Algunas de estas proteínas son de membrana. Esto sugeriría que la PKC jugaría un papel regulatorio clave en la transducción de señales y el transporte de nutrientes e iones a través de las membranas celulares.

8.5. Sustratos in vivo

La quinasa de proteínas C fosforila muchas proteínas *in vitro*; sin embargo, han sido caracterizados muy pocos sustratos en células intactas. Uno de estos sustratos es una proteína ácida, estable al calor, denominada proteína de 60 kDa en pollos y proteína de 80-87 kDa en mamíferos (Rodríguez-Pena y Rozengurt, 1986; Rozengurt, 1986; Albert *et al.*, 1985; Blackshear *et al.*, 1985).

Esta proteína fue descrita por primera vez como un componente de los sinaptosomas de cerebro de rata (Wu *et al.*, 1982). Ha sido ampliamente usada como marcador de la activación de la PKC en fibroblastos; activación por ésteres de forbol (Bishop *et al.*, 1985; Blackshear *et al.*, 1986; Sato *et al.*, 1985), diacilgliceroles sintéticos (Blackshear *et al.*, 1985; Rozengurt *et al.*, 1984; Tsuda *et al.*, 1985), por fosfolipasa C exógena (Rozengurt *et al.*, 1983) y péptidos y factores de crecimiento (Blackshear *et al.*, 1985; Zachary *et al.*, 1986; Mahadevan *et al.*, 1987). También la proteína de 87 kDa es fosforilada en linfocitos, en respuesta al tratamiento con concanavalina A y calcio (Denis *et al.*, 1986).

La proteína de 87 kDa fue purificada a homogeneidad, a partir de cerebro bovino (Albert *et al.*, 1987). Es fosforilada únicamente en residuos serina por la PKC. Se calcularon las propiedades hidrodinámicas de la proteína y, a partir de estos datos, el peso molecular sería de 68 kDa, aunque por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS tiene un peso molecular de 87 kDa.

Esta proteína es de gran interés por las siguientes razones: (i) Es fosforilada después de algunos segundos de haber activado a la PKC, por factores de crecimiento en fibroblastos y neurotransmisores en células gliales y neuronas, y por ésteres de forbol y diacilgliceroles permeables. Estas propiedades la han convertido en un marcador conveniente de la activación de la PKC en células intactas; (ii) Es desfosforilada rápidamente en respuesta al bloqueo de receptores (Rodríguez-Pena *et al*, 1984); (iii) Es miristoilada (Aderem *et al*, 1988); una modificación que promovería su asociación con un medio más hidrofóbico, permitiendo una asociación más estrecha con la PKC; (iv) Une calmodulina. Esta unión puede ser inhibida por la fosforilación de la proteína por PKC (Graff *et al*, 1989).

A partir de una biblioteca de cDNA de núcleo caudado bovino, ha sido clonada la proteína de 87 kDa (Stumpo *et al*, 1989). Por secuenciación del cDNA se observó un marco de lectura abierto de 1005 pares de bases, de manera que la proteína tendría 335 aminoácidos y un peso molecular de 31949 Da. La discrepancia entre este peso molecular y el aparente de 87 kDa en geles con SDS, se debería a que el pI ácido y la hidrofiliidad general de la proteína no permitiría una unión completa del SDS (Reynolds y Tanford, 1970). Debido a la migración anómala de esta proteína, en geles con SDS no es razonable continuar denominándola proteína de "80-87 kDa". Entonces, en ausencia de una conocida actividad enzimática o de otra función, se propuso llamarla MARCKS (*Myristoylated alanine-rich C kinase substrate*)(Stumpo *et al*, 1989).

Las plaquetas han sido muy utilizadas para estudiar mecanismos de transducción de señales, en particular aquéllos que involucran la hidrólisis de los inositol fosfolípidos, en donde los segundos mensajeros DG e IP₃, activan a la PKC y liberan Ca²⁺ de compartimientos intracelulares, respectivamente (Nishizuka, 1984). Los agonistas de plaquetas, por ejemplo la trombina, aumentan la fosforilación de una proteína de 47 kDa, denominada p47. La PKC fosforila la proteína p47 (Nishizuka *et al*, 1984; Haslam y Lynham,

1977). Se han sugerido varios papeles para la p47: su fosforilación atenúa la liberación de Ca^{2+} de los compartimientos, degradando el IP_3 (Connolly *et al*, 1986); sería la subunidad α de la piruvato deshidrogenasa (Chiang *et al*, 1987); la p47 no fosforilada inhibe la polimerización de actina, implicándola en el control de la reorganización citoesquelética durante la secreción.

Utilizando una biblioteca de cDNA de células HL-60, se clonó y secuenció la proteína p47 (Tyers *et al*, 1988). Se encontró un marco de lectura abierto de 1050 pares de bases, que codificaría para una proteína de 40087 Da. La secuencia ha sido conservada a través de la evolución de los vertebrados. La p47 contiene una estructura de unión potencial a Ca^{2+} tipo EF-hand, y una secuencia (QKFARKSTRRSIRL) muy parecida al sitio de pseudosustrato de la PKC. Tiene tres sitios probables de fosforilación, tal vez análogos a las regiones de fosforilación de la proteína básica de mielina (Turner *et al*, 1985) y de la cadena liviana de la miosina (Ikebe *et al*, 1987).

Existe otra proteína que es sustrato de la PKC, la denominada P-57, conocida también como GAP-43 o B50. Esta proteína une calmodulina con alta afinidad en ausencia de Ca^{2+} (Cimler *et al*, 1987; Basi *et al*, 1985; Andreasen *et al*, 1983). Esta proteína comparte algunas características con la proteína MARCKS: i) es fosforilada por la PKC, tanto en sistemas libres de células como en células intactas; ii) tiene migración anómala en geles de poliacrilamida con SDS; iii) tiene un punto isoeléctrico ácido; y iv) tiene una composición aminoacídica inusual (alto porcentaje de alanina y ácido glutámico).

8.6. Regulación de la PKC por inhibidores naturales

En cerebro de rata ha sido purificado un inhibidor de la PKC (Schwantke y Le Peuch, 1984), ácido y que tiene un peso molecular de 20 kDa. Por tratamiento del inhibidor con proteasas se pudo determinar que todo, o al menos la parte requerida para su ac-

tividad, era de origen polipeptídico. Estudios del efecto del inhibidor sobre la fosforilación de histona H-1 por PKC, indican que existe competencia respecto de la PKC y las histonas; en cambio, no existe competencia respecto del ATP, fosfatidilserina, diacilglicerol y Ca^{2+} . La inhibición podría darse por interacción directa entre el inhibidor ácido y las histonas, pero se descarta porque la concentración del inhibidor requerida para un 50% de inhibición es muy baja comparada con la concentración de histona. Por lo tanto, es improbable que ocurra una inhibición competitiva por interacción entre el inhibidor y las histonas básicas.

La cromatografía de interacción hidrofóbica dependiente de Ca^{2+} ha sido usada para aislar proteínas que unen Ca^{2+} . En presencia de Ca^{2+} , estas proteínas exponen sitios hidrofóbicos. Por esta técnica han sido aisladas dos proteínas que unen Ca^{2+} , una de 17 kDa (17K CaBP) y la otra de 12 kDa (12K CaBP). Ambas proteínas inhiben a la PKC, son ácidas y estables al calor (McDonald y Walsh, 1985a, 1985b, 1986).

Para determinar si la inhibición de la actividad de la PKC por las proteínas 17K CaBP y 12K CaBP era dependiente de Ca^{2+} , se estudió la dependencia de Ca^{2+} en presencia y en ausencia de los inhibidores (McDonald *et al*, 1987). La mitad de la activación máxima de la PKC en ausencia de inhibidores, ocurre a $0,6 \mu\text{M}$ Ca^{2+} , en cambio en presencia de cualquiera de estos dos inhibidores, la PKC se inhibe a todas las concentraciones de Ca^{2+} . Habría dos alternativas para explicar estos resultados. La primera es que la afinidad por el Ca^{2+} de las proteínas 17K CaBP y 12K CaBP sería igual o mayor que la de la PKC. La segunda es que ambas proteínas serían independientes de Ca^{2+} . Si los inhibidores de PKC no son regulados, se parecerían al inhibidor proteico estable al calor de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc (Walsh *et al*, 1971).

Estos inhibidores de PKC son bastante específicos, debido a que

no tienen efecto sobre la fosfodiesterasa de AMPc dependiente de calmodulina, ni sobre la quinasa de proteínas dependiente de AMPc. La 17K CaBP tampoco inhibe a la quinasa de la cadena liviana de la miosina (McDonald y Walsh, 1986).

La PKC está ampliamente distribuida en tejidos y especies (Kuo *et al*, 1980; Minakuchi *et al*, 1981). Entonces, si la proteína 17K CaBP tuviera un papel fisiológico en la regulación de PKC, uno esperaría que su distribución también fuera amplia.

Por inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-17K CaBP se detectó a la proteína en muchos tejidos bovinos, en hígado y riñón de rata y en plaquetas humanas (McDonald *et al*, 1987).

En conclusión, la gran especificidad de acción y la amplia distribución de la proteína 17K CaBP en muchos tejidos, es consistente con la hipótesis que esta proteína funciona en la regulación de la PKC.

8.7. Autofosforilación de la PKC

Además de fosforilar sustratos, la PKC es capaz de autofosforilarse (Kikkawa *et al*, 1986; Huang *et al*, 1986a; Mochly-Rosen y Koshland, 1987; Mitchell *et al*, 1989). La autofosforilación altera la afinidad de la enzima por los ésteres de forbol, aumenta su sensibilidad a Ca^{2+} (Huang *et al*, 1986a) y aumenta la velocidad de fosforilación de sustratos (Mochly-Rosen y Koshland, 1987). También la autofosforilación alteraría la asociación de la PKC con las membranas (Wolf *et al*, 1985) e incrementaría la sensibilidad de la enzima a la proteólisis (Ohno *et al*, 1990). La autofosforilación de la PKC es un mecanismo intrapéptidico, en el cual una única cadena polipeptídica se autofosforila (Newton y Koshland, 1987).

Recientemente se identificaron los sitios principales de autofosforilación de la PKC- β_{11} de rata (Flint *et al*, 1990). Los residuos serina y treonina fosforilados se encuentran en el extremo

amino terminal, en la cola carboxilo terminal, y en la región bisagra entre los dominios regulatorio y catalítico (figura 16). Debido a que la autofosforilación es un mecanismo intrapeptídico, es necesaria una flexibilidad extraordinaria de la enzima para que pueda fosforilarse en estas tres regiones, ya que todos los sitios potenciales de fosforilación no pueden ocupar simultáneamente el sitio activo.

Las secuencias que rodean los sitios de fosforilación no tienen similitud con los sitios de fosforilación de sustratos. La identificación de una enzima que se modifique por sí misma en tres regiones de su secuencia primaria, tiene amplias implicancias en la flexibilidad proteica y en el control de las funciones biológicas.

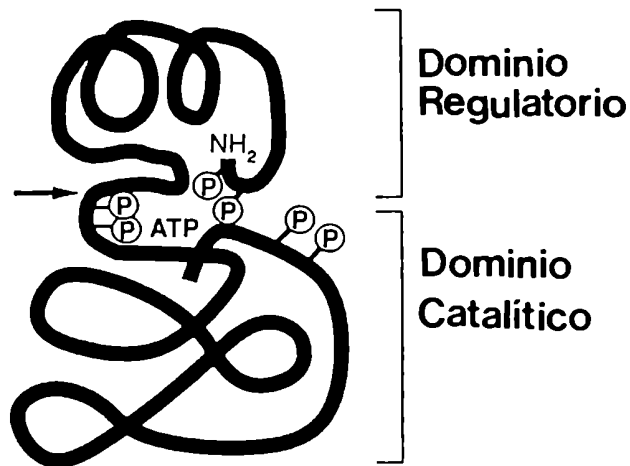


Figura 16: Ilustración de PKC con los sitios de autofosforilación

Todos los sitios de fosforilación están marcados, aunque una única molécula de PKC no estaría modificada en todos los sitios. La flecha marca el sitio de clivaje por tripsina, que separa los dos dominios.

MATERIALES Y METODOS

1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

El trabajo se realizó con formas epimastigotes del parásito *Trypanosoma cruzi*, cepa Tul 2 derivada de la cepa Tulahuén (Pizzi, 1945).

El cultivo se efectuó a 30°C sin agitación en un medio líquido monofásico modificado por Engel.

Los parásitos se cosecharon en fase exponencial (7 días) por centrifugación a 1000 xg durante 15 minutos a 4°C, se lavaron 3 veces con sacarosa 0,25 M y KCl 5 mM (SKS) y se resuspendieron en el mismo medio.

En algunos experimentos se empleó la cepa Tul 0 derivada de la cepa Tulahuén (Pizzi, 1945).

2. HOMOGENEIZACION Y FRACCIONAMIENTO

Los parásitos se sometieron a ruptura en un desintegrador Sorvall-Ribi, por presión y descompresión a 350 Kg/cm² (5000 psi) en atmósfera de nitrógeno, en una relación de 100 mg (peso húmedo) por ml de SKS.

La ruptura de los parásitos se comprobó al microscopio óptico. Al homogenato se le agregó inhibidores de proteasas (leupeptina, 10 µg/ml; benzamidina, 1 mM; PMSF, 0,1 mM; inhibidor de tripsina, 2 µg/ml; EGTA, 0,5 mM; Trasylol, 25 U/ml y TLCK, 0,5 mM) y se centrifugó a 1000 xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante de 1000 xg (S₁) se centrifugó a 105000 xg durante 1 hora a 4°C, obteniéndose el sobrenadante de 105000 xg (S₁₀₀ o fracción citosólica) y el sedimento de 105000 xg (P₁₀₀).

3. PURIFICACION DE FRACCION DE MEMBRANAS DE Trypanosoma cruzi

El pellet de 105000 xg, P₁₀₀, obtenido como se indicó en el apartado 2. de este capítulo, se homogeneizó en buffer A (20 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,5 mM EGTA; 0,5 mM EDTA; 10% glicerol y 5 mM β-mercaptoetanol) y se sembró en un gradiente discontinuo de sacarosa en buffer A (2,2; 1,9; 1,6 y 1,3 M sacarosa). Se centrifugó en un rotor SW28 durante 90 minutos a 25000 rpm. Las bandas obtenidas que sedimentaron a 1,3, 1,6 y 1,9 M sacarosa se extrajeron y se lavaron dos veces en buffer A por centrifugación a 105000 xg durante 30 minutos.

4. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Los parásitos epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepas Tulahuen 2 o Tulahuen 0) se resuspendieron en el medio SKS con inhibidores de proteasas (10 ml g⁻¹ de peso húmedo) y se lisaron mediante 3 ciclos de congelación-descongelación.

El homogenato se sometió a centrifugaciones diferenciales a: 500 xg durante 15 minutos, 1000 xg durante 15 minutos, 5000 xg durante 15 minutos, 11000 xg durante 30 minutos, 30000 xg durante 30 minutos y 1050000 xg durante 60 minutos.

Los sedimentos de cada centrifugación corresponden a las siguientes fracciones enriquecidas: nuclear, flagelar, mitocondrial, lisosomal-glicosomal pesada, lisosomal liviana y microsomal, respectivamente.

Como marcadores de las fracciones mitocondrial, glicosomal y citosólica, se ensayó actividad de citrato sintasa, hexoquinasa y enzima málica, respectivamente (Cannata *et al*, 1979; 1982).

Las fracciones se resuspendieron en SKS y se determinó distintas actividades enzimáticas y concentración de proteínas.

5. ENSAYOS ENZIMATICOS

5.1. Quinasa de proteínas dependientes de Ca^{2+} /fosfolípidos (PKC)

Las condiciones fueron similares a las previamente descritas por Takai *et al*, 1977.

La mezcla de incubación (60 μ l) contenía: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 0,1 mg/ml Histona H-1 (rica en lisina) o 25 μ M del péptido sintético GS (1-12), 50 μ M ATP[γ - ^{32}P](actividad específica: 500-1000 cpm/pmol y 0,5 mM EGTA o 0,5 mM $CaCl_2$; 60 μ g/ml fosfatidilserina y 3 μ g/ml dioleína. Los lípidos fueron sonicados en agua bidestilada antes de agregarlos a la mezcla de incubación.

Se inició la reacción por la adición de ATP[γ - ^{32}P] y se incubó durante 10 minutos a 30°C.

La reacción se terminó colocando 40 μ l sobre papeles de fosfocelulosa Whatman P-81 (2x2 cm), que se sumergieron inmediatamente en 75 mM H_3PO_4 y se lavaron tres veces por diez minutos en la misma solución (Roskoski, 1983).

Los papeles se secaron y se contó la radioactividad en una solución centelleante de tolueno-omnifluor.

También se utilizaron los siguientes sustratos para medir actividad de PKC: 0,1-1 mg/ml de histonas II-AS, VI-S y VIII-S, protamina y de los sustratos ácidos caseína y fosvitina y 25 μ M kemptido.

En el caso de haber usado histonas, protamina o kemptido la reacción se terminó en forma idéntica que con histona H-1 o péptido sintético GS (1-12).

Cuando se usó fosvitina o caseína, la reacción se detuvo con el agregado de 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, se agregó a cada tubo 2 mg de albúmina bovina como portador, y se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm en centrífuga clínica.

El precipitado se disolvió en 0,1 ml de NaOH 2 N. Las proteínas se volvieron a precipitar con 2 ml de TCA al 10%, 0,2% ácido fosfotúngstico. Se repitió la centrifugación y el precipitado se disolvió en 0,1 ml de NaOH 2 N y se contó la radioactividad con 3 ml de mezcla BRAY para centelleo.

5.2. Medición simultánea de autofosforilación de PKC y de fosforilación del péptido GS (1-12)

La PKC purificada fue primeramente incubada a 30°C durante distintos tiempos (0 a 10 minutos) en una mezcla de reacción (en un volumen final de 180 µl) que contenía: 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM DTT, 15 mM MgCl₂, 150 µM EDTA, 150 µM EGTA, 2 mM CaCl₂, 200 µg/ml de fosfatidilserina ± 75 µM ATP[γ-³²P](actividad específica: 500-1000 cpm/pmol).

Después de la primera incubación, una alícuota de 40 µl de la mezcla enzima/ATP fue diluida con 20 µl de la solución del péptido GS (1-12)(concentración final del sustrato: 25 µM) e incubado durante 2 minutos.

La reacción se paró con el agregado de TCA (concentración final: 5%) y 80 µg de seroalbúmina bovina como portador. Se centrifugó a 15000 xg durante 10 minutos.

La incorporación del ³²P en el péptido GS (1-12) se cuantificó diluyendo el sobrenadante en un volumen igual de agua y pipeteándolo en papel de fosfocelulosa Whatman P81. Los papeles se lavaron 4 veces en ácido fosfórico 75 mM, se secaron y se contó radioactividad en tolueno-omnifluor.

La autofosforilación de la PKC se determinó redisolviendo el precipitado de 15000 g en 30 µl de NaOH 1 N, reprecipitando con 700 µl de 10% TCA y separando la PKC filtrando en un filtro Millipore de 0,45 µm (tipo HA). El filtro se lavó 2 veces con 10% TCA, se secó y se contó radioactividad con tolueno-omnifluor.

5.3. Unión de ésteres de forbol

Se utilizó el método de Mahoney *et al* (1986), con algunas modificaciones.

La mezcla de reacción contenía: 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 1,25 mM CaCl₂, 5 mM Mg(CH₃COO)₂, 50 µg/ml fosfatidilserina, 5 mg/ml BSA, [³H]PDBu o [³H]PMA (actividad específica: 20 Ci/mmol), la solución de enzima a ensayar, en ausencia o en presencia de 30 µM PDBu o PMA no radioactivos, respectivamente.

La reacción se inició con el agregado del éster de forbol marcado. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego una hora a 4°C.

Se agregó 0,4 ml de PEG 8000 30% (p/v) frío y se dejó otros 30 minutos a 4°C (para precipitar proteínas).

Se centrifugó durante 15 minutos a 12000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 20-40 µl de Triton X-100 1% (v/v). Finalmente, se contó radioactividad con mezcla centelleante Tolueno-Omnifluor/Triton/ácido acético glacial (270 ml Tolueno Omnifluor, 230 ml Triton X-100 y 10,2 ml ácido acético glacial).

5.4. Otras determinaciones realizadas

5.4.1. Proteínas: se determinaron por el método de Lowry *et al* (1951), con seroalbúmina bovina como patrón.

5.4.2. Citocromo C: se midió su absorción a 410 nm (banda de Soret).

- 5.4.3. CoCl₂: se midió su absorción a 500 nm.
- 5.4.4. Malato deshidrogenasa: la actividad se determinó por el consumo de NADH en presencia de oxalacetato, midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm (Worthington Enzyme Manual).
- 5.4.6. Lactato deshidrogenasa: se determinó su actividad por el consumo de NADH en presencia de piruvato, midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm (Worthington Enzyme Manual).
- 5.4.7. Catalasa: la actividad enzimática se determinó por la disminución de la oxidación de ioduro a iodo, acoplada a la reducción de H₂O₂ (Terenzi et al, 1971).
- 5.4.8. Citrato sintasa: se determinó espectrofotográficamente a 412 nm, a 30°C en una mezcla de reacción que contenía: 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 0,05 mM acetil CoA, 0,1 mM 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoato)(DTNB) y la fracción enzimática, en un volumen final de 1 ml. La reacción comenzó con el agregado de 2,5 mM de oxalacetato.
- 5.4.9. Hexoquinasa: la mezcla de reacción en un volumen de 1 ml contenía: 50 mM Tris-acetato pH 8, 0,3 mM NADP⁺, 10 mM MgCl₂, 50 mM glucosa, 10 mM ATP y 0,3 unidades de glucosa-6-P-dehidrogenasa. La reacción comenzó con el agregado de la enzima y se midió aumento de absorbancia a 340 nm a 30°C.
- 5.4.10. Enzima málica dependiente de NADP⁺, activable por aspartato: se determinó utilizando una mezcla de reacción que contenía, en un volumen de 1 ml: 50 mM Tris-acetato pH 7,6, 10 mM MnCl₂, 5 mM L-malato, 0,15 mM NADP⁺ y la fracción enzimática. Luego de registrar la producción de

NADPH durante 1 minuto, por aumento de absorbancia a 340 nm, se agregó L-aspartato (2,5 mM concentración final) y se continuó registrando durante otros 2 minutos.

6. PREPARACION DEL SUSTRATO RADIOACTIVO PARA LAS QUINASAS DE PROTEINAS

Para la síntesis de ATP[γ - ^{32}P] se utilizó el procedimiento de Johnson y Walseth (1979) modificado por Gupa *et al* (1982). La síntesis involucra la transferencia del [^{32}P] del [^{32}P]1,3-difosfoglicerato al ADP, como parte de una conversión enzimática en 4 etapas, del L-glicerol-3-fosfato al 3-fosfoglicerato.

Se prepararon las siguientes soluciones stock:

a) Mezcla de enzimas, que contiene

100 μl de glicerol-3-fosfato dehidrogenasa (de músculo de conejo; 60 U/mg; 2 mg/ml),

2 μl de triosafosfato isomerasa (de músculo de conejo; 5000 U/mg; 2 mg/ml),

40 μl de gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (de músculo de conejo; 80 U/mg; 10 mg/ml), y

40 μl de lactato dehidrogenasa (de músculo de conejo; 550 U/mg; 5 mg/ml).

b) Mezcla de reacción:

0,60 M Tris/HCl pH 9, 0,14 M MgCl_2 , 0,07 M DTT, 1,4 mM L-glicerol-3-fosfato y 6,0 mM β -NAD $^{+}$.

c) Buffer para dilución de enzimas: 0,10 M Tris/HCl pH 9, 10 mM DTT.

Se centrifugaron en microcentrífuga 7,5 μ l de la mezcla de enzimas a 13000 rpm durante 10 minutos. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 100 μ l del buffer de enzimas.

La mezcla de incubación para síntesis de ATP[γ - 32 P] contenía 10 μ l de la mezcla de reacción, 3 μ l de una mezcla (v/v) de 4 mM ADP y 80 mM piruvato de sodio, 5 μ l de la mezcla de enzimas y solución de [32 P] (volumen final: 100 μ l). La incubación se realizó 30 minutos a temperatura ambiente.

Una vez finalizada la reacción, se calentó a 60°C durante 5 minutos y se analizó la mezcla de reacción (1 μ l) y ATP no radioactivo por cromatografía ascendente en capa delgada sobre polietilenoimino-celulosa (PEI-celulosa) impregnada en reactivo fluorescente, usando 1,5 M LiCl como solvente. La posición del ATP[γ - 32 P] fue localizada por autorradiografía durante unos minutos y el ATP frío por luz UV. El rendimiento fue aproximadamente del 98%.

7. PURIFICACION DE QUINASA DE PROTEINAS TIPO "C" (PKC) DEL EXTRACTO SOLUBLE DE Trypanosoma cruzi

7.1. Cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa)

El sobrenadante de 100000 xg, S₁₀₀, (150 ml 1,1 mg/ml proteína) se diluyó tres veces con buffer A. Luego se sembró en una columna de DEAE-celulosa (2,7x13,8 cm) equilibrada con el mismo buffer. Se lavó con buffer A hasta que la D₀₂₈₀ < 0,1. Finalmente, se eluyó con un gradiente lineal de 0-0,2 M NaCl en buffer A, en un volumen total de 400 ml, recogiendo fracciones de 8 ml cada una.

A todas las fracciones de la columna, incluyendo percolado y lavado, se les determinó actividad de PKC.

7.2. Cromatografía hidrofóbica en Fenil-Sefarosa

Las fracciones con actividad de PKC, eluidas entre 0,05 y 0,10 M NaCl de la DEAE-celulosa se sembraron en una columna de fenil-sefarosa (1,0x5,0 cm) y se eluyó por dos métodos distintos:

- a) La columna fue equilibrada en buffer B (20 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,1 mM CaCl₂) y antes de sembrar la muestra, ésta se ajustó a 2 mM MgCl₂ y 2 mM CaCl₂. Se lavó con 20 ml de buffer B y luego con otros 20 ml de buffer B con 0,5 M NaCl. Finalmente se eluyó con 40 ml de buffer C (20 mM Tris/HCl pH 7,4 y 1 mM EGTA). Se recogieron fracciones de 1 ml cada una.
- b) La columna se equilibró con buffer A conteniendo 1 M NaCl y previo al sembrado se ajustó la muestra a 1,5 M NaCl. Se lavó con el mismo buffer de equilibrio hasta DO₂₈₀ < 0,10. Se eluyó con un gradiente lineal de 1 a 0 M NaCl en buffer A. El volumen de elución fue de 40 ml, recolectándose fracciones de 1 ml cada una.

Se midió actividad de PKC en las fracciones de ambas columnas, incluidos el percolado y el lavado.

7.3. Cromatografía en hidroxilapatita

Las fracciones con actividad de PKC obtenidas de la columna de DEAE-celulosa, fueron diluidas tres veces con buffer D (0,02 M NaHPO₄ pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 10% (v/v) glicerol), y se sembraron en una columna de hidroxilapatita (1,7x3,0 cm) previamente equilibrada con buffer D, de acuerdo al método de Huang *et al* (1986).

Se lavó con el mismo buffer de equilibrio hasta DO₂₈₀ < 0,1. Finalmente, se eluyó con un gradiente (70 ml de volumen total) compuesto de buffer D y buffer D con 0,18 M NaHPO₄ pH 7,5, recogándose fracciones de 1,5 ml cada una.

7.4. Cromatografía de afinidad en anticuerpo anti-PKC-sefarosa

7.4.1. Preparación de anticuerpo anti-PKC-sefarosa

Se hidrató 1 g de sefarosa 4B activada con CNBr durante 15 minutos con HCl 10^{-3} M. Luego se filtró y se lavó varias veces con NaHCO₃ 0,1 M. La sefarosa se resuspendió en 30 ml de 0,1 M NaHCO₃ más 5 ml de 0,5 M NaCl y se le agregó 21 µg de un anticuerpo policlonal contra PKC de cerebro bovino. Se dejó agitando durante 12 horas a 4°C. Finalmente, se filtró la sefarosa, se lavó y resuspendió en 0,1 M NaHCO₃. El rendimiento fue del ?%.

7.4.2. Cromatografía en Anticuerpo-antiPKC-sefarosa

Se armó una columna de 0,7x2,5 cm y se equilibró con buffer 20 mM Tris/HCl pH 7,4. Las fracciones con actividad de PKC obtenidas de la columna de fenil-sefarosa se pasaron por la columna 3 veces por gravedad o una vez a un flujo de 2 ml/hora. Se lavó con 10 ml del mismo buffer de equilibrio y, finalmente, se eluyó con un gradiente lineal (10 ml de volumen total) de 0 a 1 M NaCl en 20 mM Tris/HCl pH 7,4. Se recogieron fracciones de 0,5 ml cada una.

8. PURIFICACION DE PKC DE MEMBRANAS DE Trypanosoma cruzi

El sedimento de 105000 xg, extracto crudo de membranas, se resuspendió y homogeneizó en buffer A con inhibidores de proteasas y 1% de Triton X-100. Se agitó suavemente durante 1 hora a 4°C y se centrifugó a 105000 xg durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante (75 ml, 0,5 mg/ml de proteína) se sembró en una columna de DEAE-celulosa (7x2,6 cm) previamente equilibrada con buffer A. Se lavó con el mismo buffer de equilibrio hasta $DO_{280} < 0,1$ y se eluyó con un gradiente lineal de 0-0,5 M NaCl en buffer A, en un volumen total de 200 ml, y se recogieron fracciones de 4 ml cada una.

Se determinó actividad de PKC a todas las fracciones de la columna.

9. PURIFICACION DE QUINASA DE PROTEINAS TIPO "C" DE CEREBRO BOVINO (PKCBb)

Se homogeneizó cerebro bovino (150 g) en 3 volúmenes (p/v) de buffer E (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoetanol, 0,25 M sacarosa, con inhibidores de proteasas, en un desintegrador de tejidos Ultraturrax modelo T18-10 IKA. Se centrifugó 1 hora a 10000 xg a 4°C. El sobrenadante se filtró por gasa y se sembró en una columna de DEAE-celulosa (2,7x8,8 cm) equilibrada con buffer A. Se lavó con 250 ml de buffer A, luego con 250 ml de buffer A conteniendo 0,015 M NaCl, y se eluyó con un gradiente de 0,015-0,30 M NaCl en buffer A (250 ml de volumen total), recogándose fracciones de 5 ml cada una.

Las fracciones con actividad de PKC (utilizando 0,4 mg/ml de Histona H-1 como sustrato) se juntaron y se llevaron a 30% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se agitó durante 40 minutos a 4°C, y se centrifugó a 12000 xg durante 30 minutos. Se descartó el sedimento, y el sobrenadante se sembró en una columna de fenil-sefariosa (1,7x8,8 cm) equilibrada con buffer A y 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se lavó con el mismo buffer de equilibrio hasta $\text{DO}_{280} < 0,10$. Se eluyó con un gradiente de 1 a 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en buffer A (volumen total de 100 ml). Cuando pasaron 90 ml del gradiente se agregó 50 ml de buffer A a la cámara de mezcla, para asegurar la elución total de la PKC. Se recogieron fracciones de 5 ml cada una.

Se juntaron las fracciones con actividad de PKC y se sembraron en una columna de treonina-agarosa (1x10 cm) equilibrada con buffer A. Se lavó con buffer A hasta $\text{DO}_{280} < 0,10$. Finalmente se eluyó con un gradiente de 0 a 1 M NaCl en buffer A (volumen total de 100 ml). Se recogieron fracciones de 2 ml cada una.

10. PURIFICACION PARCIAL DEL "INHIBIDOR" DE PKC (Schwantke y Le Peuch, 1984)

10.1. Cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa)

Se realizó de la misma manera que como está indicado en el apartado 7.1. de este capítulo, con la diferencia que la elución se hizo con un gradiente de 0-0,3 M NaCl en buffer A.

La presencia del inhibidor de PKC en *Trypanosoma cruzi* se determinó sobre la quinasa de proteínas C de cerebro bovino (PKCBb) parcialmente purificada, de acuerdo al apartado 8. de este capítulo, en presencia y en ausencia de las distintas fracciones de la columna en dos condiciones: con 0,5 mM CaCl₂ ± 60 µg/ml fosfatidilserina y 3 µg/ml dioleína.

10.2. Cromatografía de filtración molecular (Ultrogel Aca34)

Las fracciones de la DEAE-celulosa con actividad inhibitoria de PKCBb se concentraron dializando contra sacarosa 2 M y se sembraron en una columna de Ultrogel Aca34 (1,3 x 60 cm) equilibrada con buffer A con 0,1 M NaCl. Se eluyó con el mismo buffer de equilibrio. Se recogieron fracciones de 1 ml cada una.

11. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

11.1. Preparación de los geles

El método empleado es el de Laemmli (1970).

La composición del gel separador fue: 10% acrilamida (p/v), 0,27% bisacrilamida (p/v), 0,1% SDS (p/v), 0,375 M Tris/HCl pH 8,8, 0,03% TEMED (v/v) y 2 mg/ml persulfato de amonio; mientras que la del gel concentrador fue: 5% acrilamida (p/v), 0,14% bisacrilamida (p/v), 0,1% SDS (p/v), 0,125 M Tris/HCl pH 6,8, 0,07% TEMED y 2 mg/ml persulfato de amonio.

11.2. Preparación de las muestras y corrida electroforética

A las muestras (10-100 μg totales de proteína en 25 μl) se les agregó 25 μl de una mezcla desnaturizante compuesta por: 4% SDS (p/v), 10% β -mercaptoetanol (v/v), 40% glicerol (v/v), 60 mM Tris/HCl pH 6,8, y 0,002% de azul bromofenol (p/v), y se calentó durante 3 minutos a 100°C. En el caso de fracciones de membrana, la mezcla desnaturizante contenía también 8 M urea.

El buffer de corrida fue 50 mM Tris/glicina pH 8, conteniendo 0,1% SDS (p/v). La corrida electroforética se realizó a corriente constante (20 mA) para el gel concentrador y 40 mA para el gel separador.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron las siguientes proteínas preteñidas: subunidad de α_2 -macroglobulina (180 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fructosa 6-P-quinasa (84 kDa), piruvato quinasa (58 kDa), fumarasa (48,5 kDa), lactato dehidrogenasa (36,5 kDa) y triosafosfato isomerasa (26,5 kDa).

Luego de la corrida electroforética, los geles fueron teñidos en una solución que contenía 45% metanol (v/v), 10% ácido acético (v/v) y 0,25% azul de Coomasie R250 (p/v), durante 3 horas y finalmente fueron desteñidos en la misma solución sin el colorante.

12. FOSFORILACION EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Los geles fueron preparados de la misma manera que la indicada en el apartado 11.1. de este capítulo.

Las muestras se incubaron a 30°C durante 3 minutos en presencia de 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM MgCl_2 , 10 μM ATP[γ - ^{32}P](actividad específica: 1000 cpm/pmol) con 0,5 mM EGTA o 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fosfatidilserina, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diacilglicerol y 0,5 mM CaCl_2 .

La reacción se terminó con la adición de 25 μ l de mezcla desnaturalizante y las muestras se calentaron a 100°C durante 2 minutos y se sometieron a electroforesis. La corrida se efectuó en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Los geles, una vez fijados y desteñidos, fueron secados al vacío sobre papel Whatman 3MM y con calor en un secador de geles. Luego, se expusieron a películas autorradiográficas de rayos X (Agfa Gevaert CURIX) durante 24 horas a -70°C con una pantalla amplificadora. Finalmente se procedió al revelado de la película.

13. WESTERN BLOT

Una vez terminada la corrida electroforética (como se indica en el apartado 11.2 de este capítulo), el gel se electrotransfirió a nitrocelulosa (Kyhse-Andersen, 1984).

Se realizó la electrotransferencia "en seco" de la siguiente manera: 6 hojas de papel Whatman 3MM embebidas en buffer anódico 1 (0,3 M Tris/HCl pH 10,4, 20% metanol (v/v)), 3 hojas de papel Whatman 3MM embebidas en buffer anódico 2 (0,025 M Tris/HCl pH 10,4, 20% metanol (v/v)), la hoja de nitrocelulosa, el gel y, finalmente, 6 hojas de papel Whatman 3MM embebidas en buffer catódico (0,025 M Tris/HCl pH 9,4, 0,04 M ácido -amino-n-caproico, 20% metanol (v/v)) y se transfirió hacia el ánodo a 0,8 mA/cm² durante 1 hora.

Luego de la transferencia, la membrana se dejó durante 30 minutos en solución bloqueante que contenía 5% de leche descremada y 2% glicina en buffer TBS (50 mM Tris/HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,4).

Después, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal anti-PKC, diluido 1:100 en solución bloqueante con 0,05% (v/v) Tween 20. Los anticuerpos utilizados fue-

ron: anticuerpo RPN.536 (clon MC5) de Amersham que reconoce las isoformas α y β de PKC y un anticuerpo anti PKC- γ donado por el Dr. Peter Parker (Londres).

Se lavó varias veces con TBS-0,05% Tween 20 (TBS-TW) y se dejó incubando con el segundo anticuerpo (IgG caballo anti-ratón biotinilado) diluido 1:200 en TBS-TW durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavó varias veces con TBS-TW.

Posteriormente, se incubó con el sistema VECTA STAIN (avidina-biotina) durante 1 hora y después se lavó varias veces con TBS solo.

Para el revelado se preparó la siguiente solución: 66 μ l de nitrobluetetrazolium (50 mg/ml NBT en 70% de dimetil-formamida) en 10 ml de buffer AP (0,1 M Tris/HCl pH 9,5, 5 mM MgCl₂, 0,1 M NaCl). Se dejó revelando entre 10 y 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y la reacción se paró por dilución con TBS.

14. INMUNOPRECIPITACION CON ANTICUERPOS ESPECIFICOS

Las fracciones se incubaron en un volumen final de 1 ml con el anticuerpo monoclonal diluido 1:100 en una solución de detergentes que contenía 0,15 M NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 0,5% NP40, 50 mM Tris/HCl pH 7,0, durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Se precipitó con 0,5 ml de Proteína A-sefara rosa al 10% (v/v). Se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm y se lavó 4 veces con 1 ml de solución de detergentes.

El sedimento se resuspendió en 50 μ l de mezcla desnaturizante (apartado 11.2. de este capítulo), y se calentó a 100°C durante 10 minutos.

Finalmente, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se sometió a electroforesis.

Terminada la corrida electroforética, el gel se electrotransfirió a nitrocelulosa y se reveló con el anticuerpo correspondiente, como se indicó en el apartado 13. de este capítulo.

Cuando se trabajó con fracciones crudas, antes de la inmunoprecipitación se procedió al clarificado de la muestra, incubando en un volumen final de 1 ml con suero de caballo anti-ratón (dilución 1:200) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se agregó 0,5 ml de Proteína A-sefarosa al 10% (v/v) y se incubó durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos y se utilizó el sobrenadante.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA QUINASA DE PROTEINAS "C" (PKC) EN Trypanosoma cruzi

En las formas epimastigotes de dos cepas del parásito *Trypanosoma cruzi*: una patógena, Tulahuén 2, y otra no patógena, Tulahuén 0, se estudió la presencia de la PKC en fracciones subcelulares (figura 17).

Se encontró actividad de PKC tanto en la fracción citosólica como en la de membranas. El porcentaje de la enzima asociada a membranas es mayor que el de la citosólica.

Debido a que la forma fisiológicamente activa de esta enzima es la de membranas (Nishizuka, 1986), se puede especular que, bajo las condiciones en las cuales se obtienen los epimastigotes, al menos 60% de la PKC total ya se encuentra activada (figura 18).

Por otro lado, las grandes diferencias en las velocidades de fosforilación entre las dos cepas coinciden con las observadas en la actividad de la quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico (Ulloa *et al*, 1988).

La diferencia entre ambas cepas está a nivel de antígenos de superficie; además, Tul 2 es infectiva en ratones, produciendo altas parasitemias, mientras que Tul 0 no lo es. Cuando los minicírculos (del ADN cinetoplástico) son digeridos con enzimas de restricción, los patrones de bandas obtenidos después de una corrida electroforética, son muy diferentes en ambas cepas (Frasch *et al*, 1981). Entonces, esta diferencia a nivel genómico podría reflejarse en una síntesis diferencial de proteínas en Tul 2 y Tul 0.

Para caracterizar la enzima soluble y de membranas de la cepa Tul 2, se procedió a purificarlas.

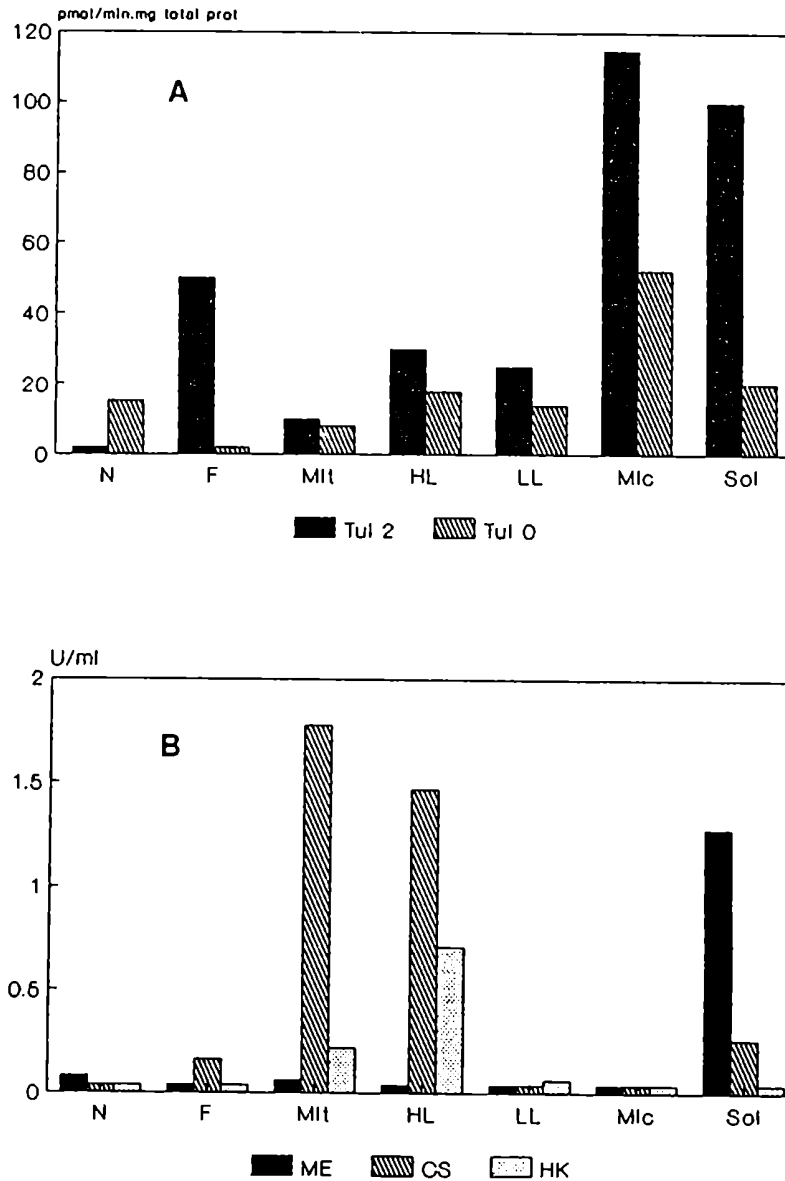
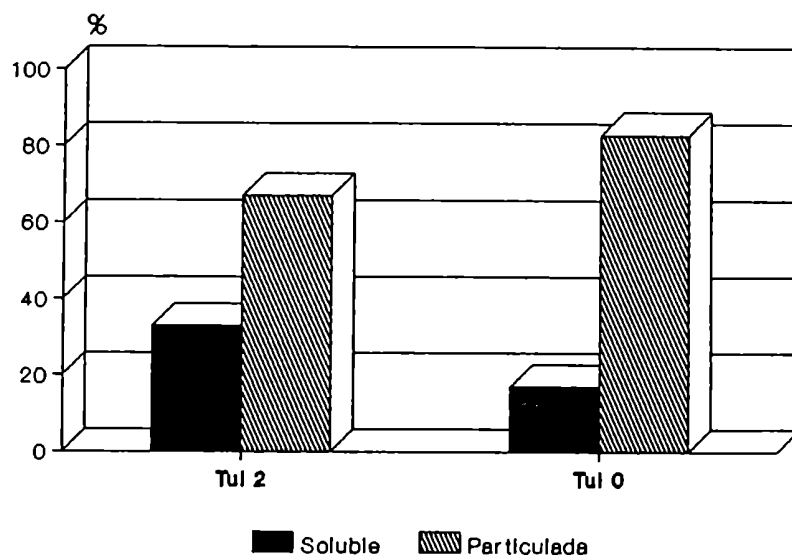


Figura 17: Distribución de PKC y marcadores enzimáticos en fracciones subcelulares de *T. cruzi*

(A) Actividad de PKC en las cepas Tulahuen 2 y Tulahuen 0. (B) Marcadores enzimáticos en Tul 2: ME, enzima málica; CS, citrato sintasa; HK, hexoquinasa. Fracciones enriquecidas: N, nuclear; F, flagelar; Mit, mitocondrial; HL, lisosomal-glicosomal pesada; LL, lisosomal liviana; Mic, microsomal; Sol, fracción citosólica.



Distribución de PKC en *T. cruzi*

	Actividad total (nmoles P/min.mg prot. total)	
	Tul 2	Tul 0
SOLUBLE	0.10	0.02
PARTICULADA	0.20	0.10

Figura 18: Distribución (en porcentaje) de PKC en las cepas Tul2 y Tul0 de *T. cruzi*.

2. PURIFICACION DE LA PKC DE FRACCION CITOSOLICA

2.1. Cromatografía en DEAE-Celulosa

El sobrenadante de 105000 xg de *Trypanosoma cruzi* (cepa Tul 2) se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa y se eluyó con un gradiente salino. Se midió actividad de PKC usando histona H-1 como sustrato.

Como se observa en la figura 19 estos picos eluyen aproximadamente a 0,1 y 0,15 M NaCl. El primer pico de quinasa de proteínas es activado por Ca^{2+} y fosfolípidos, mientras que el segundo fosforila preferencialmente otras histonas y no es activado por Ca^{2+} y fosfolípidos.

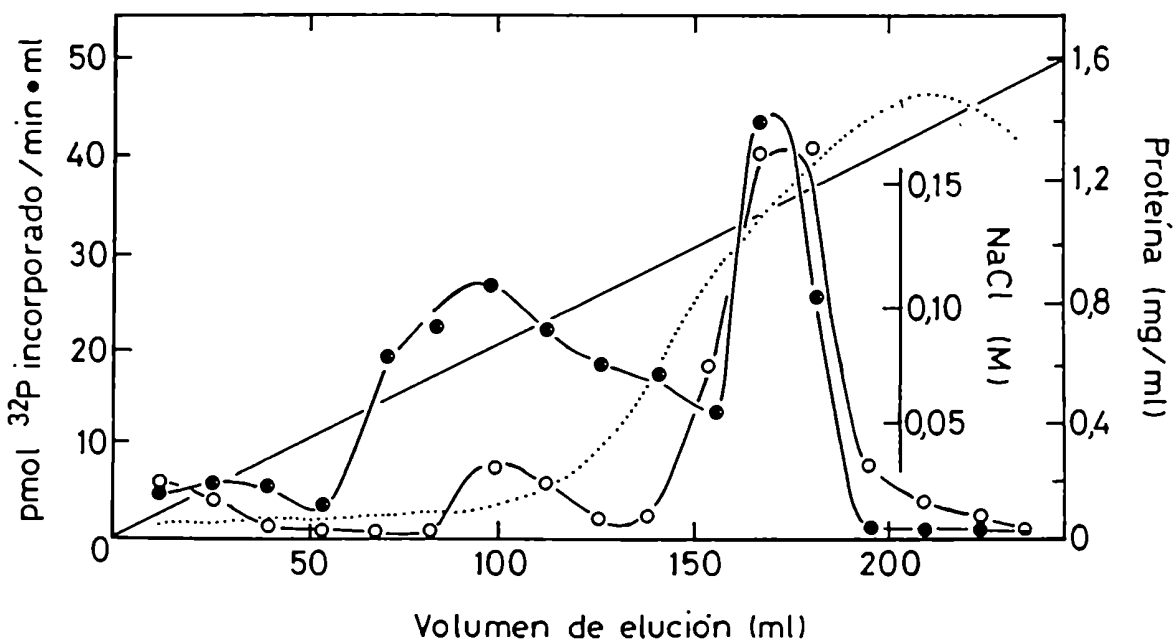


Figura 19: Cromatografía en DEAE-celulosa del S100 de *T. cruzi*

La actividad de PKC se midió con histona H-1 en presencia de EGTA (O) o Ca^{2+} /PS/DG (●); , concentración de proteínas; ———, [NaCl]

También se determinó en la columna la capacidad de unir $[^3\text{H}]\text{PDBu}$. El pico de actividad de quinasas de proteínas coincide con el de unión de $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ (figura 20).

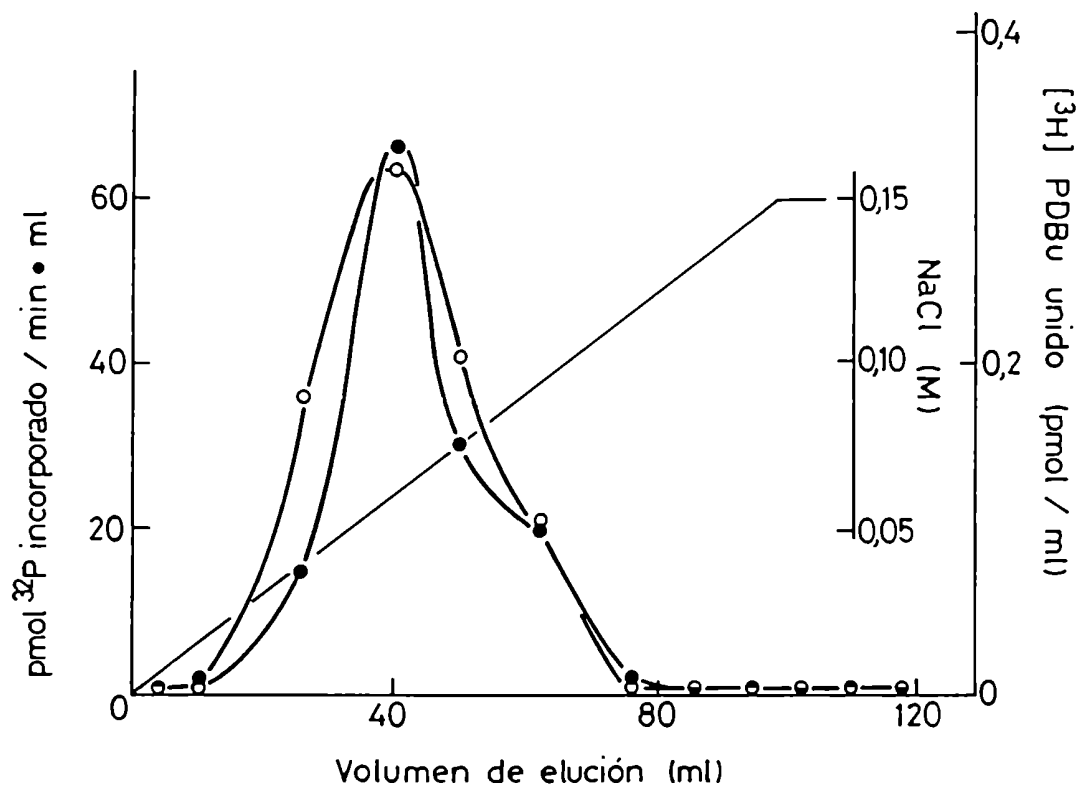


Figura 20: Cromatografía en DEAE-celulosa

Actividad de PKC: diferencia entre la actividad con PS/DG/ Ca^{2+} y la actividad con EGTA (O); unión de $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ (●) medida en presencia de PS/ Ca^{2+} ; ———, [NaCl].

2.2. Cromatografía en Fenil-Sefarosa

Las fracciones con actividad de PKC provenientes de la columna de DEAE-celulosa, se reunieron y se sembraron en una columna de fenil-sefarosa equilibrada con CaCl_2 y se eluyeron con EGTA (figura 21), en base a la adsorción específica de la enzima en presencia de iones de calcio (Walsh *et al*, 1984).

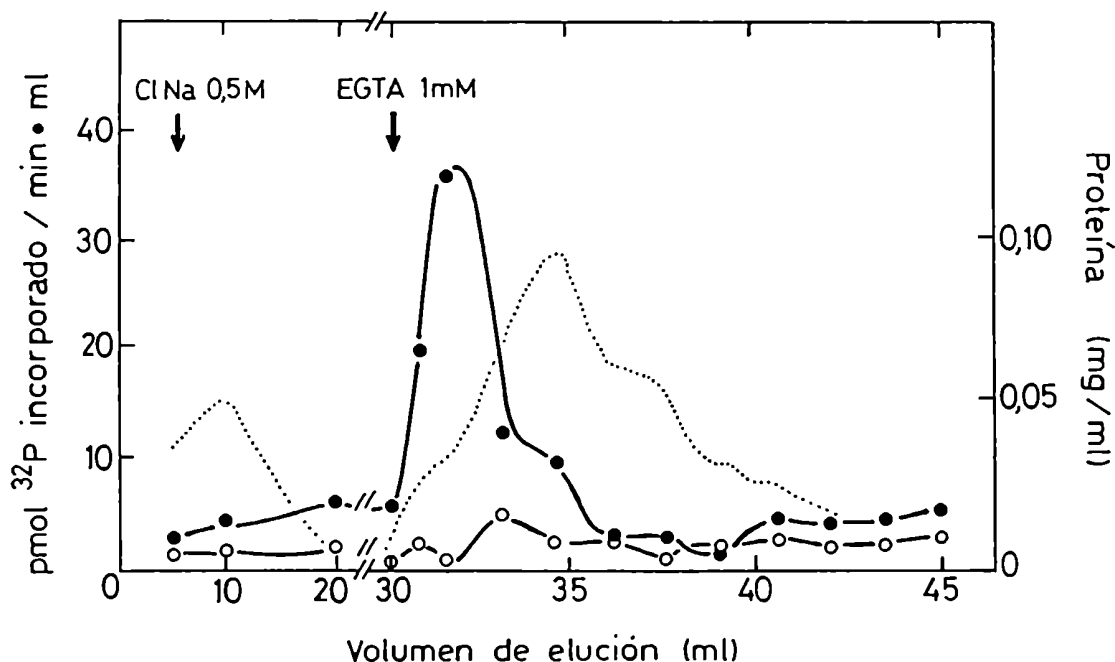


Figura 21: Cromatografía de PKC en fenil-sefarosa (Elución con EGTA)

Los símbolos son iguales a los de la figura 19. Las condiciones se describen en Materiales y Métodos.

Alternativamente se usó una columna de fenil-sefarosa equilibrada con alta concentración salina (1,5 M NaCl), en la cual se sembraron las fracciones de la DEAE-celulosa. Al ser hidrofóbica, la

enzima se pega fuertemente en presencia de alta concentración salina y se despega al disminuir la concentración de sales (Wolf *et al*, 1985). En esas condiciones, la enzima eluye a una concentración de 0,25 M NaCl (figura 22).

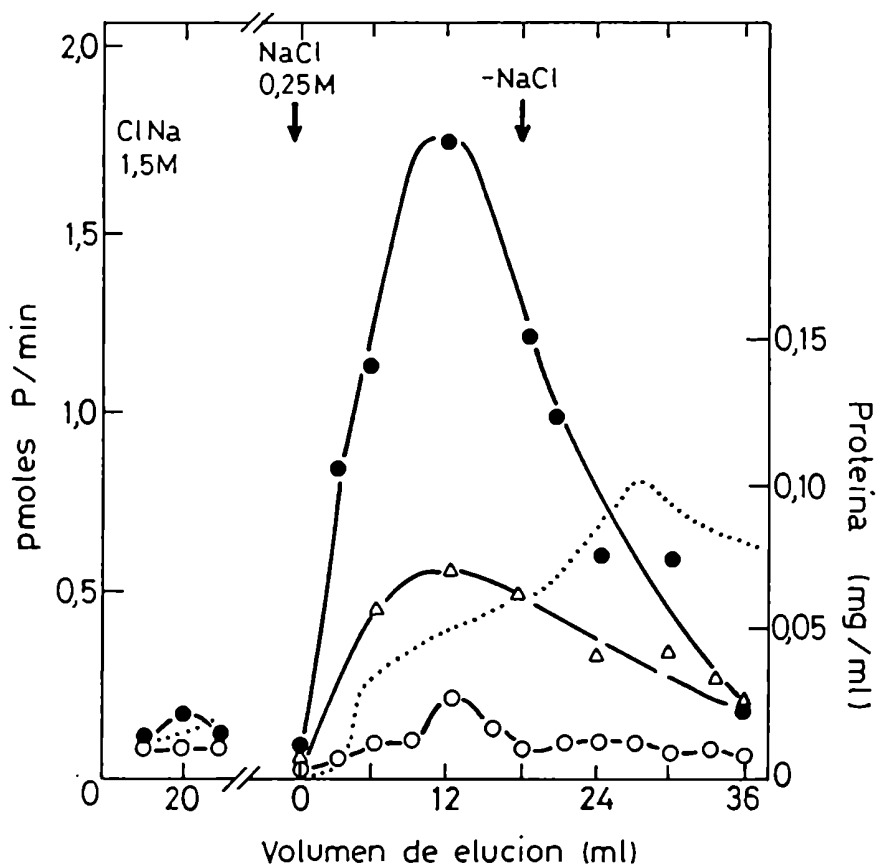


Figura 22: Cromatografía de PKC en fenil-sefarosa (Elución con baja sal)

La actividad de PKC se determinó con EGTA (○); con Ca²⁺ (Δ) o con PS/DG/Ca²⁺ (●); concentración de proteínas.

2.3. Cromatografía de afinidad en anticuerpo anti-PKC-sefarosa

Las fracciones provenientes de la columna de fenil-sefarosa se cromatografiaron en la columna anti-PKC-sefarosa. La enzima se pegó a la columna y se eluyó con un gradiente salino a una concentración de entre 0,25 y 0,5 M NaCl. Esto sería una evidencia indirecta de que la enzima de *Trypanosoma cruzi* tendría cierta homología con la enzima de cerebro bovino, ya que fue reconocida por un anticuerpo preparado contra la PKC de cerebro bovino (figura 23a).

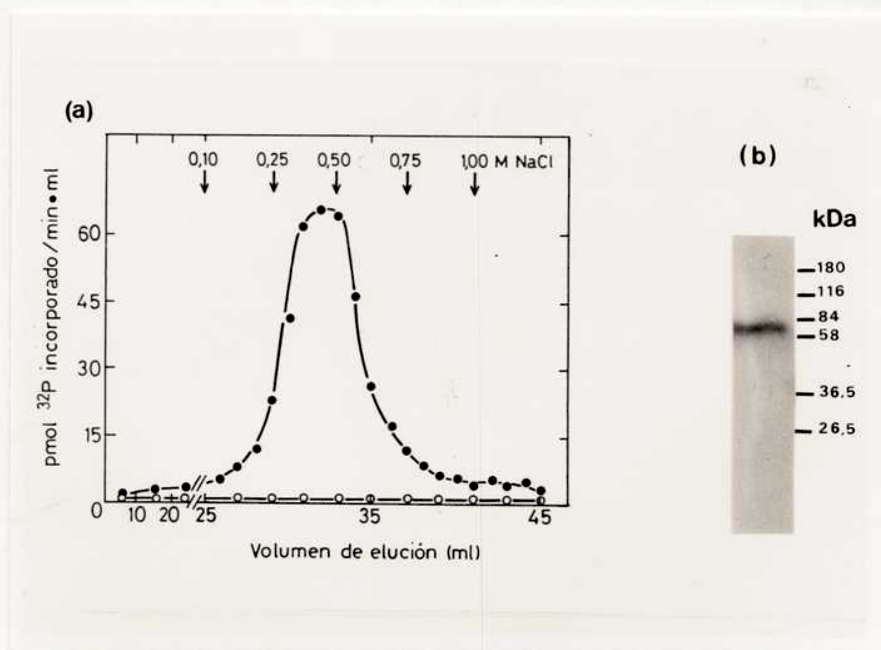


Figura 23: Cromatografía de PKC en columna de afinidad (anticuerpo anti-PKC-sefarosa)

(a) La actividad se midió con histona H-1 como sustrato, en presencia de EGTA (O) o en presencia de PS/DG/Ca²⁺ (●); (b) Autofosforilación de PKC.

Las fracciones con actividad de PKC se reunieron y se concentraron. Esta fracción se incubó en presencia de ATP[γ -³²P] y CaCl₂/

PS/DG y se corrió en un gel de poliacrilamida con SDS. Finalmente, se expuso a película autorradiográfica de rayos X. Se reveló una sola banda de 78 kDa, correspondiente a la autofosforilación de la PKC (figura 23b).

3. CARACTERIZACION DE LA PKC SOLUBLE DE Trypanosoma cruzi

Para la caracterización bioquímica de la PKC se utilizó enzima proveniente de la columna de fenil-sefarosa. En todos los ensayos (salvo indicación contraria) se utilizó histona H-1 como sustrato.

3.1. Activación de la enzima

La actividad enzimática en presencia de Ca^{2+} /PS fue proporcional al tiempo de incubación hasta los 10 minutos. La adición de EGTA inhibe totalmente la actividad de la PKC (figura 24).

Como se observa en la figura 25, la actividad de PKC fue dependiente de Ca^{2+} y fosfatidilserina. El diacilglicerol y el PMA, dos bien conocidos activadores de la PKC de mamíferos, aumentan la actividad de la enzima determinada en presencia de Ca^{2+} y PS. Bajo estas condiciones, la actividad de la quinasa es proporcional a la cantidad de proteína (figura 26).

3.1.1. Activación por Ca^{2+}

En la figura 27 se observa la dependencia de Ca^{2+} de la PKC de *T. cruzi*. En presencia de PS y DG la concentración óptima del catión fue de 0.5 mM. Según el gráfico de Lineweaver-Burk (figura 28) el $K_a[\text{Ca}^{2+}]$ fue de 0,16 mM, mientras que la velocidad máxima fue de 2,4 nmoles ^{32}P incorporados/min.mg proteína.

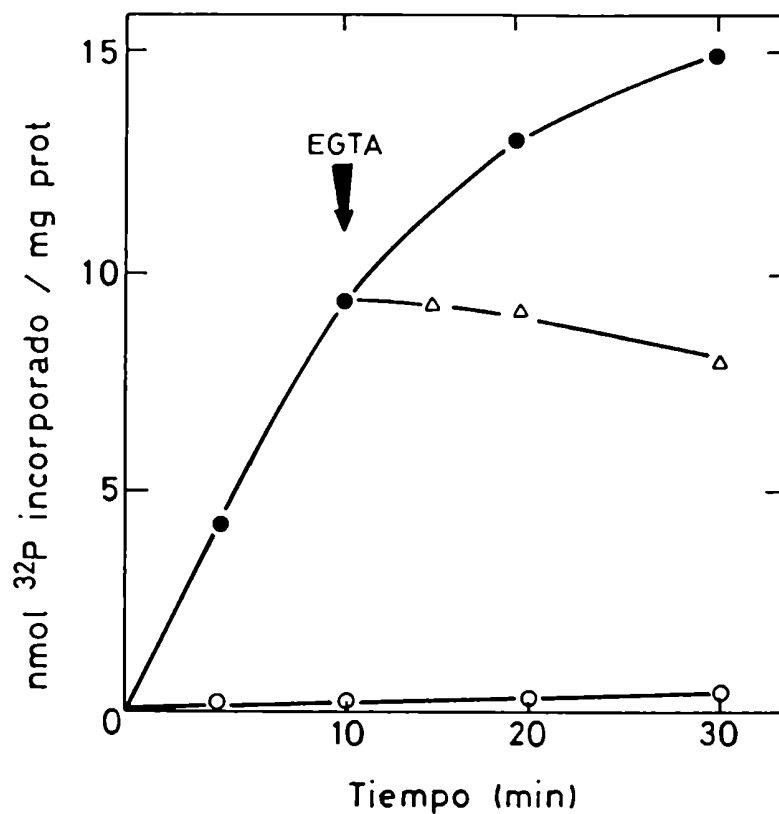


Figura 24: Actividad de PKC en función del tiempo

La PKC se midió con histona H-1 como sustrato con EGTA (○) o con PS/DG/Ca²⁺ (●). También se midió el efecto de EGTA en la actividad de PKC medida con PS/DG/Ca²⁺ (Δ).

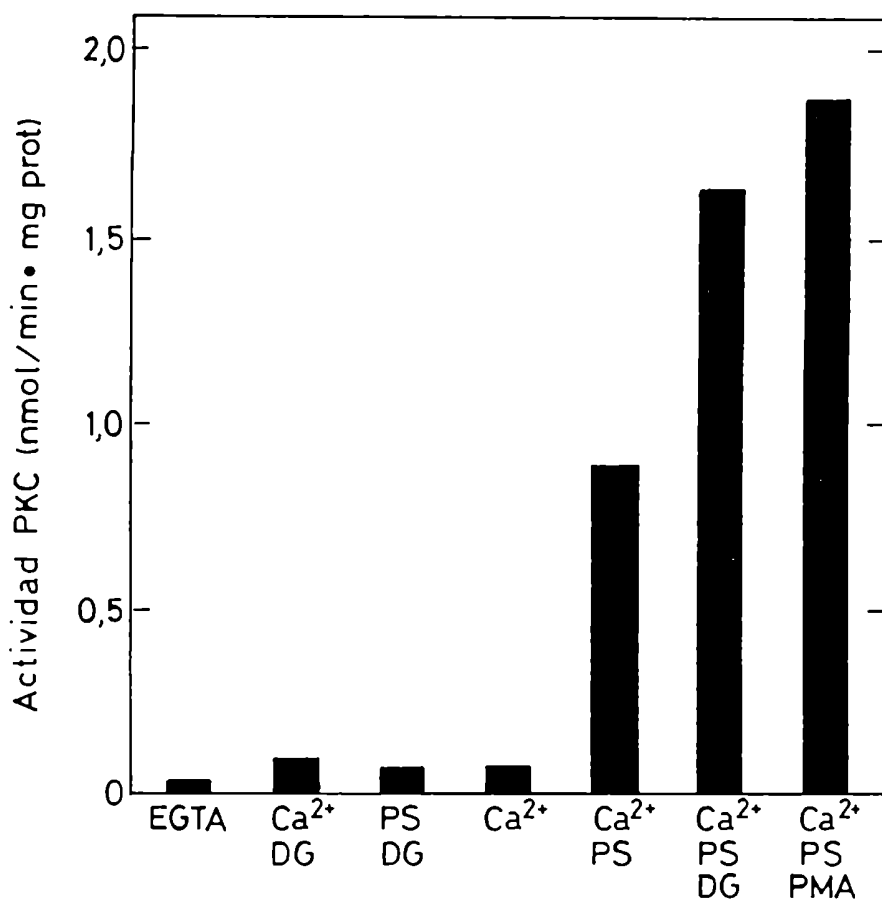


Figura 25: Efecto de lípidos, Ca²⁺, PMA y EGTA en la actividad de PKC de T. cruzi

La actividad se midió en presencia de histona H-1 como sustrato. Las condiciones se describen en Materiales y Métodos.

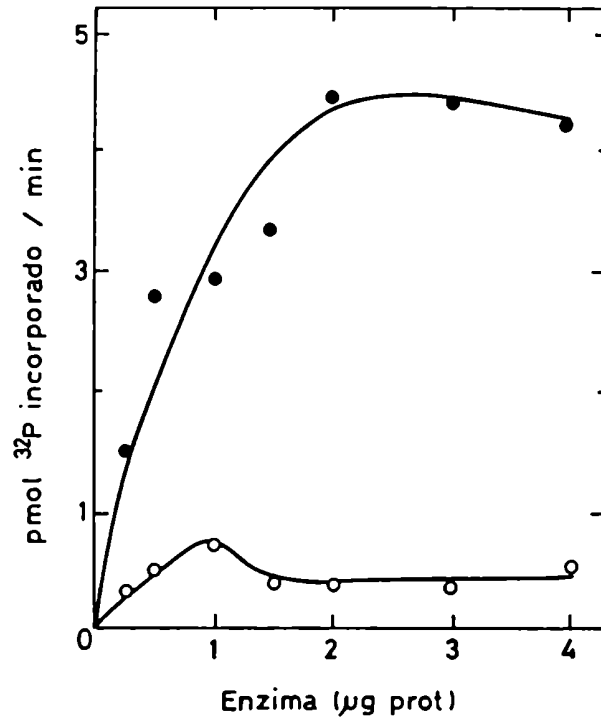


Figura 26: Curva de concentración de enzima

Actividad de PKC medida con EGTA (○) y con PS/DG/Ca²⁺ (●), con histona H-1 como sustrato

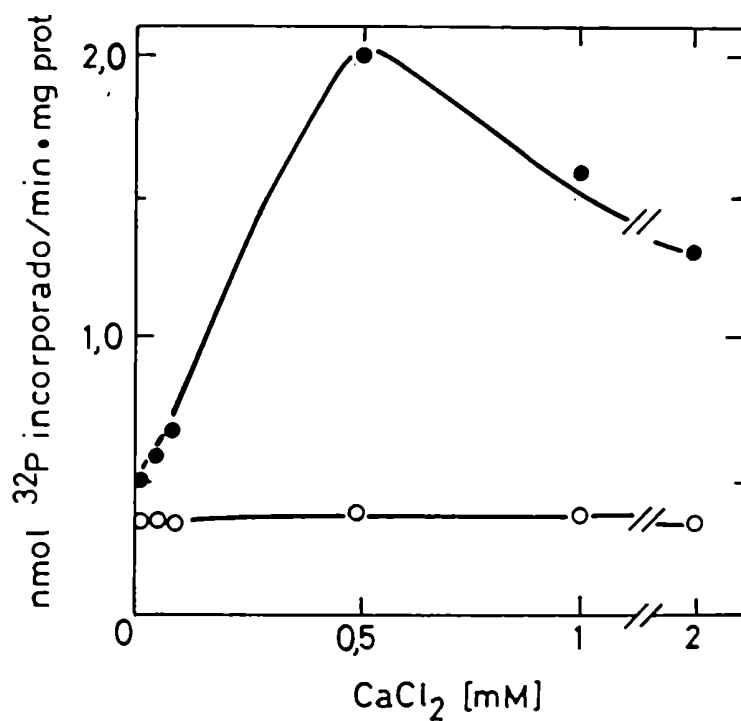


Figura 27: Actividad de PKC en función de la concentración de Ca²⁺

La actividad de PKC se ensayó en presencia de Ca²⁺ (○) o de PS/DG/Ca²⁺ (●), con histona H-1 como sustrato.

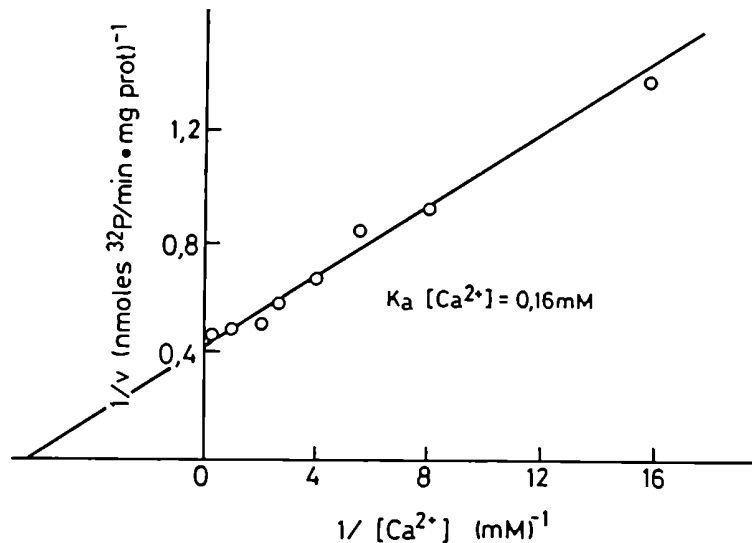


Figura 28: Gráfico de Lineweaver-Burk (Actividad de PKC en función de la concentración de Ca^{2+})

Como fuente de enzima se utilizó 5 μg de PKC proveniente de una columna de fenil-sefarosa (figura 21).

3.1.2. Activación por PS y DG

Los requerimientos para PS y DG se muestran en la figura 29. En presencia de 3 $\mu g/ml$ DG y 0,5 mM Ca^{2+} , el 50% de activación de la PKC se observa a una concentración de 50 $\mu g/ml$ PS, y en presencia de 60 $\mu g/ml$ PS y 0,5 mM Ca^{2+} , el 50% de activación se obtuvo a una concentración de 3 $\mu g/ml$ DG.

De acuerdo a los gráficos de Lineweaver-Burk (figuras 30 y 31), se obtuvieron los siguientes valores de velocidad máxima y de afinidad de la PKC por sus activadores, para DG: $K_a=3,2 \mu g/ml$ y $V_{m\acute{a}x}=4,03$ nmoles ^{32}P incorporados/min.mg de proteína, y para PS: $K_a=26 \mu g/ml$ y $V_{m\acute{a}x}=2,03$ nmoles ^{32}P incorporados/min.mg proteína.

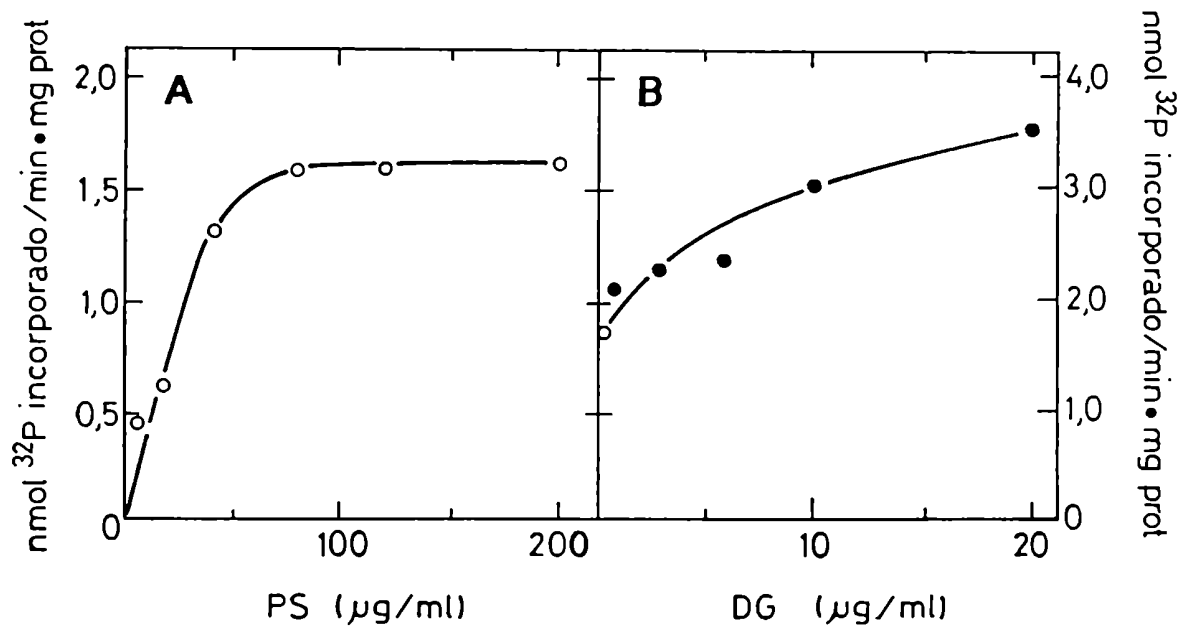


Figura 29: Actividad de PKC en función de las concentraciones de PS y DG

- (A) Curva de concentración de PS, con DG y Ca²⁺
- (B) Curva de concentración de DG, con PS y Ca²⁺

En ambos casos se utilizó histona H-1 como sustrato

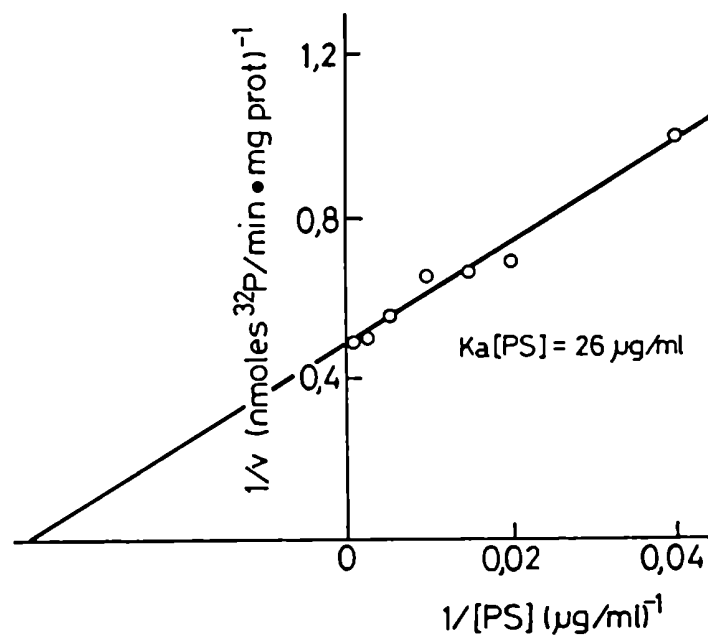


Figura 30: Gráfico de Lineweaver-Burk (Actividad de PKC en función de la concentración de fosfatidilserina)

Se utilizaron 5 μg de PKC de *T. cruzi* e histona H-1 como sustrato, en presencia de DG/ Ca^{2+}

rilación en ausencia de sustrato exógeno. Esta fosforilación podría deberse a la existencia de un aceptor de fosfato exógeno, o a la autofosforilación de la enzima.

TABLA 3. Actividad de PKC con distintos aceptores de fosfato

Aceptor	Concentración (mg/ml)	Actividad de PKC (pmol/min.mg prot.)	
		EGTA	Ca ²⁺ /PS/DG
Ninguno	-	30	430
Histona H1	0,1	20	2510
	1,0	15	1700
Histona IIAS	0,1	20	430
	1,0	25	220
Histona VIS	0,1	20	135
	1,0	10	130
Histona VIIS	0,1	20	90
	1,0	50	155
Histona VIII-S	0,1	10	70
	1,0	50	165
Protamina	0,1	60	70
	1,0	100	130
Fosvitina	1,0	30	110
Caseína	1,0	35	135

En presencia de Ca²⁺, PS y DG, la concentración óptima de histona H-1 fue de aproximadamente 0,1 mg/ml, mientras que concentraciones mayores llevaron a la inhibición de la enzima (figura 32).

Utilizando dos concentraciones distintas de fosfatidilserina, 60 y 120 µg/ml, se obtuvo el gráfico de Lineweaver-Burk para histona H-1 (figura 33). Para 60 µg/ml PS: Km=0,016 mg/ml y Vmáx=0,57 nmoles ³²P incorporado/min.mg proteína, y para 120 µg/ml PS: Km=0,02 mg/ml y Vmáx=2,2 nmoles ³²P incorporado/min.mg proteína.

También se utilizó como sustrato de la enzima, el péptido sintético GS (1-2) cuya secuencia aminoacídica es la siguiente: PLSRTL

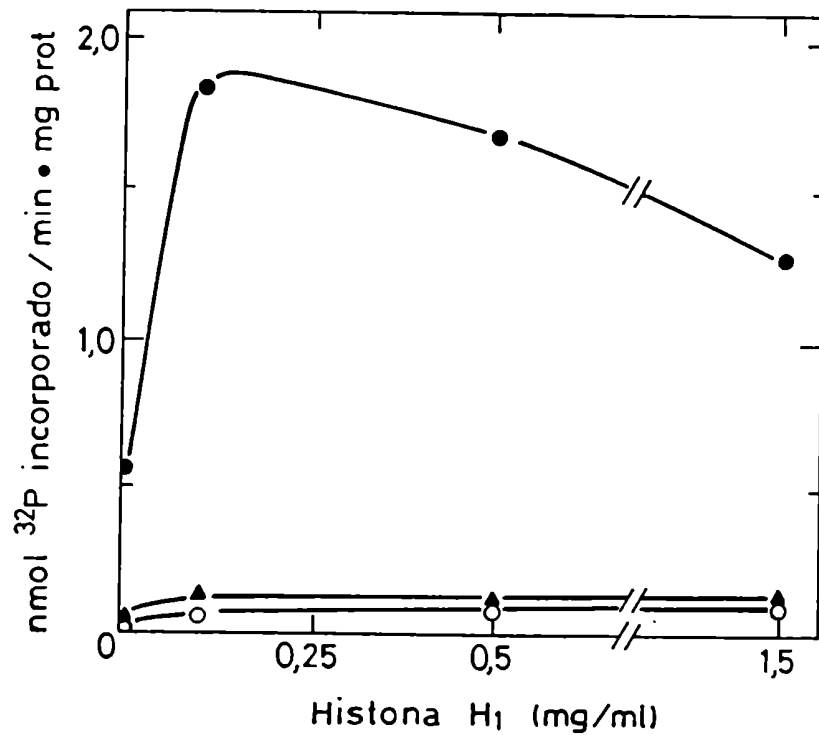


Figura 32: Actividad de PKC en función de la concentración de histona H-1

La medición de la actividad de PKC se realizó en presencia de EGTA (○), Ca²⁺ (▲) o PS/DG/Ca²⁺ (●)

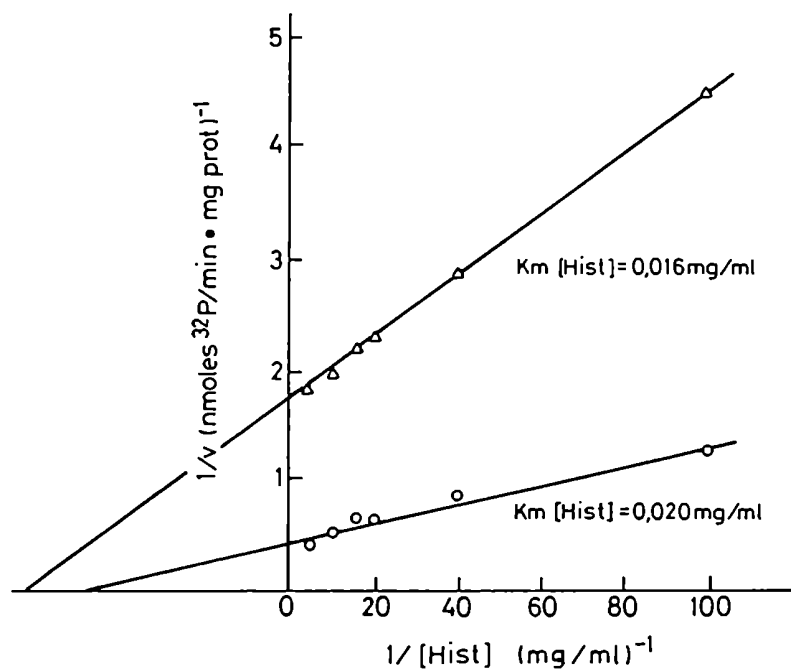


Figura 33: Gráfico de Lineweaver-Burk

Se utilizaron 5 μg de PKC de *T. cruzi* y Ca^{2+} /60 $\mu\text{g/ml}$ PS (Δ) o Ca^{2+} /120 $\mu\text{g/ml}$ PS (O)

SVAAKK (House *et al*, 1987). Para este péptido (figura 34) se obtuvo un $K_m=20 \mu\text{M}$ y $V_{m\acute{a}x}=3,6 \text{ nmoles } ^{32}\text{P incorporado/min.mg prote\i}na$.

3.3. Curva de Mg^{2+}

La actividad de PKC, en presencia de Ca^{2+} /PS/DG y 0,1 mg/ml histona H-1 o 25 μM del péptido GS(1-2) como sustrato, se determinó con cantidades crecientes de MgCl_2 . La concentración óptima de Mg^{2+} fue 5 mM. El K_m obtenido fue de 0,63 mM y la $V_{m\acute{a}x}=15,6 \text{ nmoles } ^{32}\text{P incorporado/min.mg prote\i}na$ (figura 35).

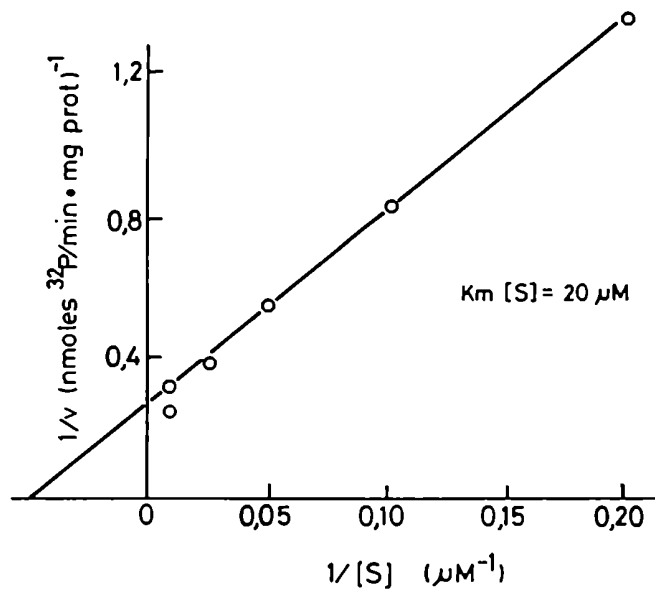


Figura 34: Gráfico de Lineweaver-Burk (en función de la concentración de péptido sintético GS (1-12))

La actividad de PKC se midió en presencia de $\text{Ca}^{2+}/\text{PS}/\text{DG}$ y se utilizó $5 \mu\text{g}$ PKC de *T. cruzi*

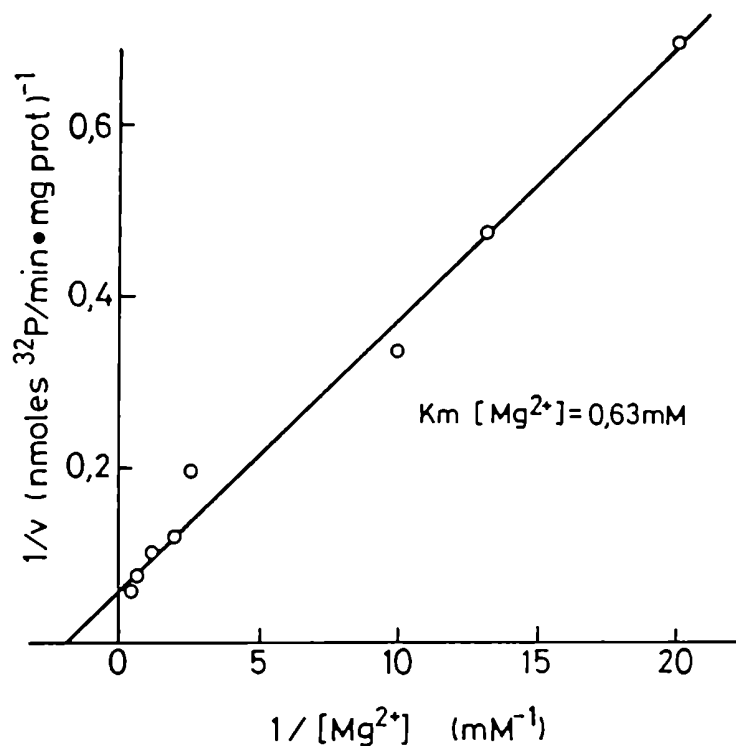


Figura 35: Gráfico de Lineweaver-Burk (Actividad de PKC en función de la concentración de Mg^{2+})

Se midió en presencia de Ca^{2+} /PS/DG e histona H-1 o péptido GS (1-12) como sustrato, y 5 μg de PKC de *T. cruzi* por ensayo.

3.4. Curva de ATP

La enzima se ensayó con distintas concentraciones de ATP y manteniendo constantes las concentraciones de $MgCl_2$ (5 mM) y de sustrato (0,1 mg/ml histona H-1 o 25 μM del péptido sintético GS (1-12)), en presencia de PS/DG/ Ca^{2+} .

Como se observa en la figura 36, el $K_m = 62,5 \mu M$ y la velocidad máxima fue de 9,4 nmoles ^{32}P incorporado/min.mg proteína.

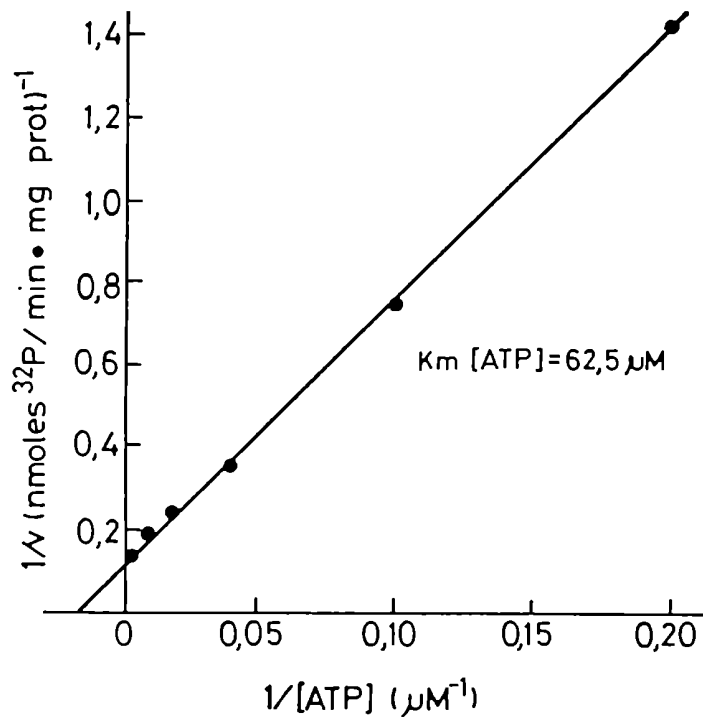


Figura 36: Gráfico de Lineweaver-Burk (Actividad de PKC en función de la concentración de ATP)

Las condiciones son las mismas que en la figura 35.

3.5. Inhibidores de PKC

Se estudió el efecto de tres inhibidores de la PKC de cerebro bovino: sulfato de polimixina B, staurosporina y H-7 (1-(5-isoquinolinilsulfonil)-2-metilpiperazina). Como se observa en las figuras 37 y 38, los efectos máximos de la polimixina B, staurosporina y H-7 sobre la PKC se obtienen a concentraciones de 12 μM , 3 nM y 17 μM , respectivamente. Tanto la staurosporina como el H-7 se comportan como inhibidores parciales de la enzima.

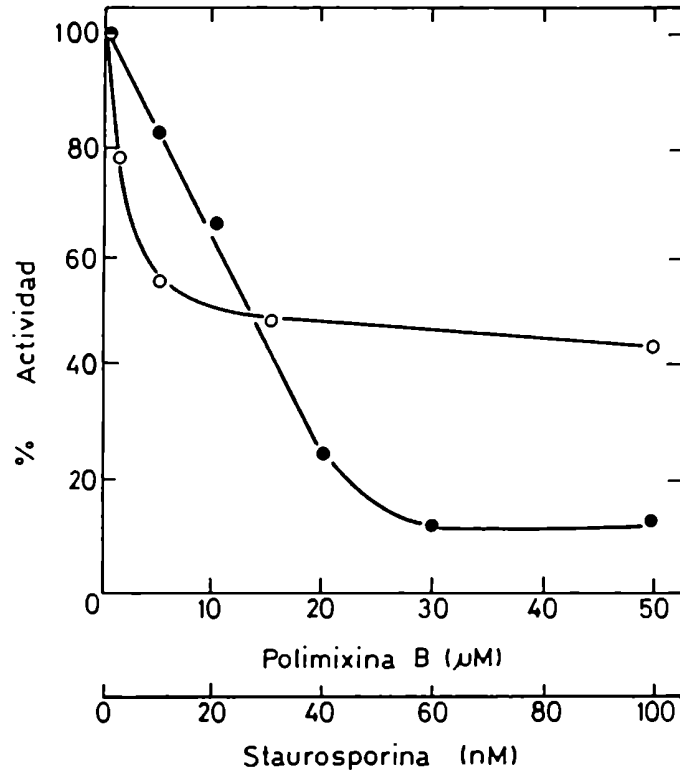


Figura 37: Efecto de polixina B (●) y staurosporina (○) en la actividad de PKC

La actividad de PKC se midió en presencia de PS/DG/Ca²⁺ e histona H-1 como sustrato.

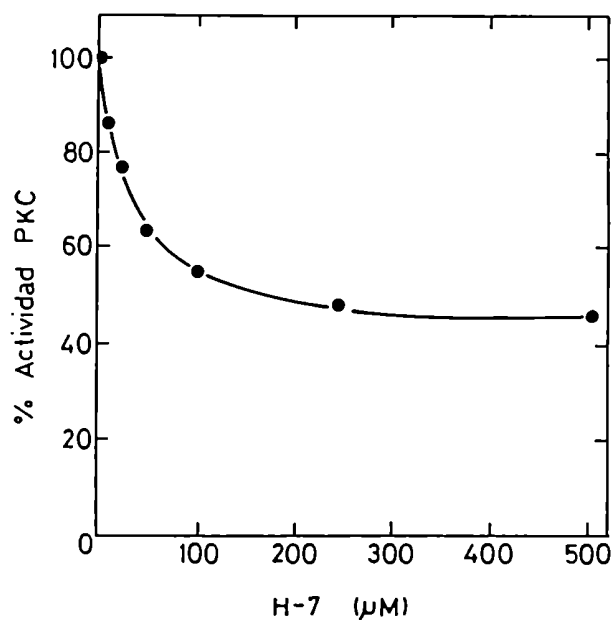


Figura 38: Efecto de H-7 en la actividad de PKC

Las condiciones del ensayo fueron las mismas que en la figura 37.

El sulfato de polimixina B es un antibiótico peptídico policatiónico cíclico, que inhibe el crecimiento de bacterias gram negativas. Su efecto se atribuye a la capacidad de interactuar electrostáticamente con los fosfolípidos cargados negativamente (Galla y Trudell, 1980; Sixel y Galla, 1981). En el caso de la PKC de *T. cruzi*, la inhibe en un 90%; cuando se probó este inhibidor en ausencia de fosfolípidos (datos no mostrados), no inhibe a la PKC, con lo que se demuestra que inhibe competitivamente respecto de la fosfatidilserina.

3.6. Activación de la PKC por proteólisis

Es bien sabido que la activación proteolítica de la PKC de mamíferos genera un fragmento con actividad de quinasa, que ya no de-

pende de Ca^{2+} y fosfolípidos para su actividad (Inoue *et al*, 1977). Por esta razón se quiso determinar si la PKC de *T. cruzi* se activaba proteolíticamente.

Se preincubó la enzima a 0°C, a distintos tiempos, en presencia de 10 µg/ml de tripsina. Después de la preincubación se determinó actividad de PKC en ausencia de activadores y en presencia de 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 ng/ml leupeptina, 1 µg/ml antipaina y 25 U/ml trasylol.

La enzima de *T. cruzi*, a diferencia de la PKC de cerebro bovino, no se activó por proteólisis parcial (figura 39). Después de 30 minutos de preincubación con tripsina, se inactivó aproximadamente un 50%.

Probablemente esto sugiere que la enzima de *T. cruzi* posea mayor número de sitios de clivaje para la tripsina.

4. PURIFICACION DE PKC DE FRACCION PARTICULADA DE Trypanosoma cruzi

Como se observa en la figura 18, entre un 60 y 70% de la actividad de PKC de epimastigotes de *T. cruzi*, Tul 2 está asociado a fracciones particuladas.

Por este motivo se procedió a purificar la enzima de fracciones particuladas. En primer término se trató de solubilizar la enzima y se probaron distintos detergentes y EGTA: NP-40, Tritón X-100, octilglucósido, Lubrol, Tween 80, Digitonina al 1% y colato al 0,5% o 5 mM EGTA.

Finalmente se eligió 1% de Tritón X-100, debido a que con este detergente se obtuvo una mejor extracción y una menor inactivación de la PKC (datos no mostrados).

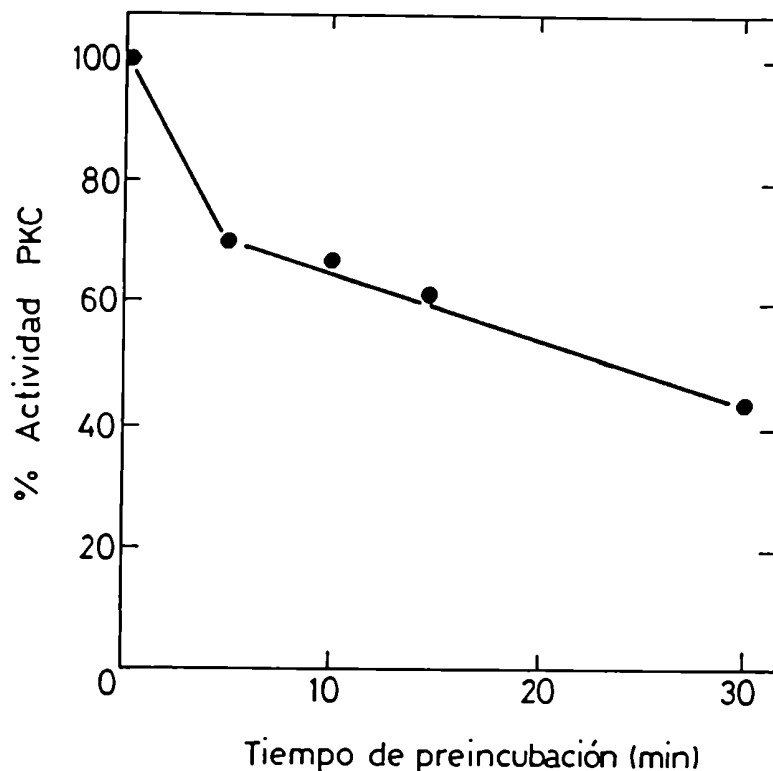


Figura 39: Efecto de la proteólisis en la actividad de PKC

Se preincubó la PKC a distintos tiempos, con tripsina y luego se midió la actividad en presencia de EGTA e histona H-1 como sustrato.

El sobrenadante obtenido se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa, la enzima eluyó a una concentración de 0,1 M NaCl y se activó con Ca^{2+} /PS/DG. En presencia de EGTA, la actividad enzimática fue despreciable (figura 40).

Otras propiedades cinéticas fueron idénticas a las de la forma soluble.

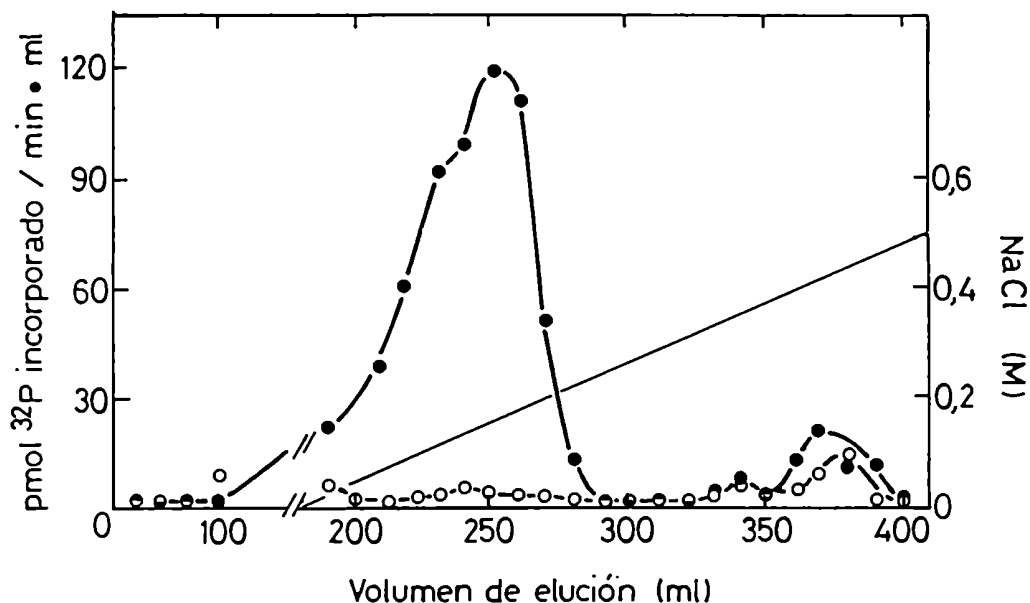


FIGURA 40: Cromatografía en DEAE-celulosa de fracciones particuladas

Los símbolos son iguales a los de la figura 19. Las condiciones del ensayo se describen en Materiales y Métodos.

5. UNION DE ESTERES DE FORBOL A FRACCIONES PARTICULADAS DE T. cruzi

Se puso a punto la técnica de unión de ésteres de forbol, utilizando 20 μg de PKC de cerebro bovino parcialmente purificada a través de 4 pasos (cromatografía en DEAE-celulosa, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y cromatografías en fenil-sefarosa y en treonina-agarosa). Cuando se utilizó $[^3\text{H}]\text{PMA}$ (figura 41) en presencia de fosfolípidos, se observa la unión de éste a la enzima, desplazable por el agregado de 30 μM PMA no radioactivo. Se obtuvo un $K_d = 6,2 \times 10^{-8}$ M.

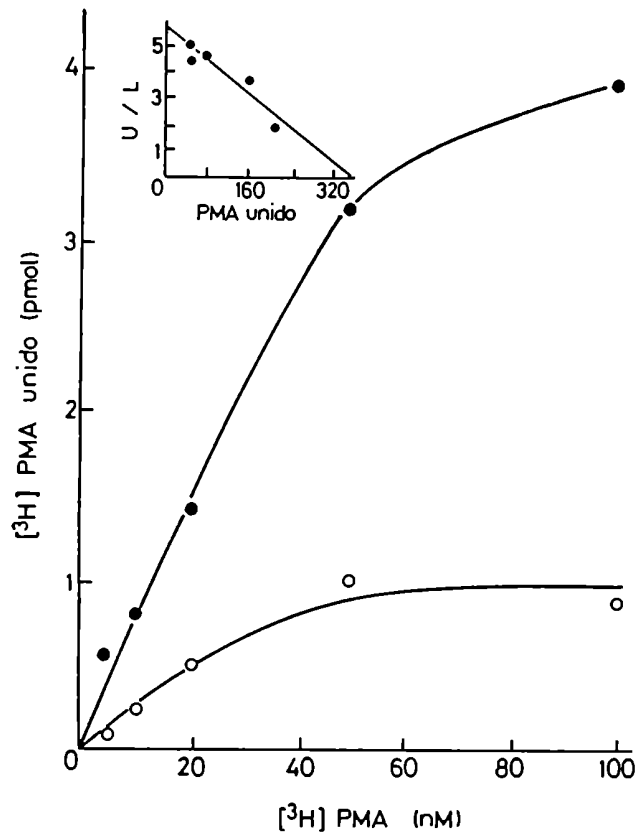


Figura 41: Unión de [³H]PMA a PKC de cerebro bovino.

El ensayo se realizó en presencia de PS/Ca²⁺, se utilizaron 20 µg de PKC de cerebro bovino. Se desplazó con 30 µM PMA no radioactivo.

Cuando se trabajó con fracciones particuladas de epimastigotes de *T. cruzi*, se utilizaron entre 50 y 100 µg de proteína por ensayo, y se probó unión a dos ésteres de forbol: PMA y PDBu. Cantidades mayores de fracción particulada resultaban en el aumento inespecífico de la unión a los ésteres de forbol.

En la figura 42 se muestra el ensayo de unión de PMA a fracción particulada de *T. cruzi*. En este caso se obtuvo un K_d de 9x10⁻⁸ M, siendo la unión del [³H]PMA desplazable por el agregado de PMA no radioactivo.

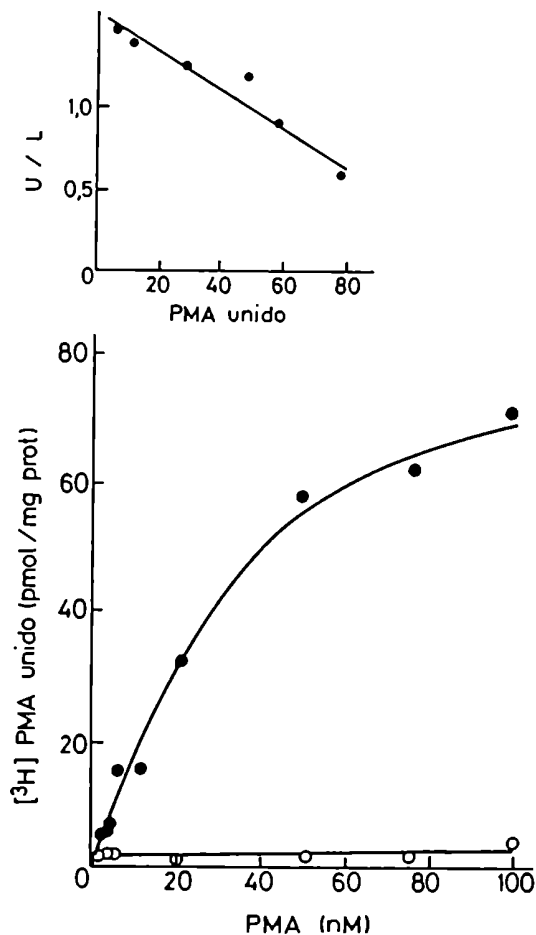


Figura 42: Unión de [³H]PMA a fracciones particuladas de *T. cruzi*

El ensayo se realizó en presencia de Ca²⁺ solamente y se utilizaron entre 50 y 100 µg de fracciones particuladas de *T. cruzi*. Se desplazó con el agregado de 30 µM PMA no radioactivo.

La unión de ésteres de forbol a la PKC es dependiente de Ca²⁺ y fosfolípidos. En este caso, como se trabajó con fracciones particuladas, el ensayo se realizó solamente en presencia de Ca²⁺.

Cuando se utilizó [³H]PDBu se obtuvo una cinética bifásica de las fracciones particuladas.

En fracciones particuladas de cerebro de ratón han sido descrip-

tas cinéticas de este tipo (Dunphy *et al*, 1981). Esto se debería a la existencia de dos clases de receptores o de uno solo capaz de existir en múltiples estados. Posteriormente se demostró que lípidos diferentes son capaces de reconstituir la actividad de unión a ésteres de forbol de la PKC citosólica (Leach *et al*, 1983). Entonces, esta heterogeneidad se podría explicar por la interacción de la PKC con distintos lípidos de membrana.

Con el objeto de determinar si se podía reconstituir la actividad de unión a [³H]PDBu, se agregó fosfatidilserina en el ensayo. De esta manera se obtuvo una cinética monofásica, con un $K_d=11,3 \times 10^{-8}$ M (figura 43).

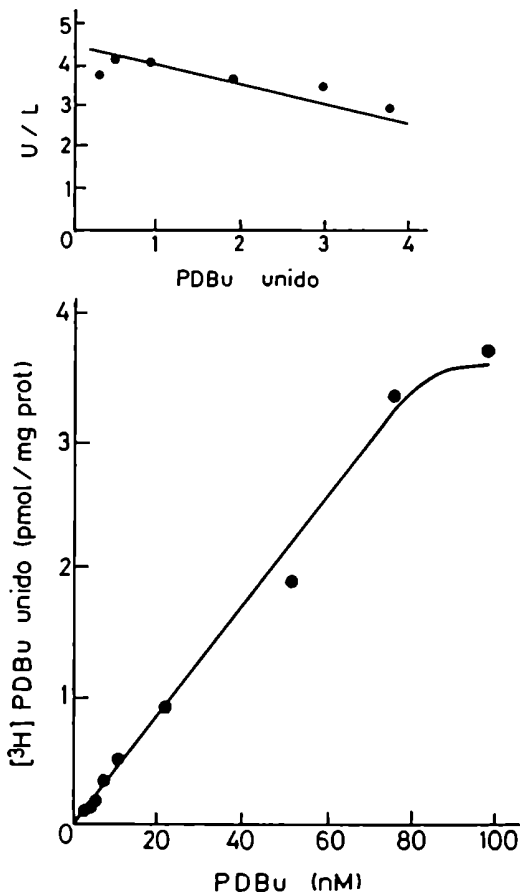


Figura 43: Unión de [³H]PDBu a fracciones particuladas de T. cruzi

El ensayo se realizó en presencia de Ca²⁺/PS, el resto de las condiciones fueron las mismas de la figura 42.

Se ha podido entonces, demostrar que en fracciones particuladas de *T. cruzi* existe actividad de unión a ésteres de forbol, con un K_d del orden del que se obtiene para la PKC de mamíferos.

6. CROMATOGRAFIA EN HIDROXILAPATITA

Con el objeto de determinar si en *Trypanosoma cruzi* existía más de una isoforma de la PKC (Huang *et al*, 1986), la enzima proveniente de una DEAE-celulosa se cromatografió en una columna de hidroxilapatita equilibrada con 20 mM *buffer* Na_2HPO_4 y se eluyó con un gradiente salino del mismo *buffer* de equilibrio.

Se observan 3 picos de actividad de quinasa de proteínas dependiente de Ca^{2+} /fosfolípidos; el primero eluye a 40 mM, el segundo a 90 mM y el último a 150 mM Na_2HPO_4 (figura 44). Estos 3 picos corresponderían a las 3 isoformas principales de PKC de mamíferos, tipo I, tipo II y tipo III, respectivamente (Huang *et al*, 1986).

7. CARACTERIZACION DE LAS ISOFORMAS DE PKC DE Trypanosoma cruzi

Cuando una preparación de PKC de cerebro de rata aparentemente homogénea se la cromatografía en una columna de hidroxilapatita, se resuelven tres subfracciones: las PKCs tipo I, II y III (Huang *et al*, 1986).

A pesar de que las tres isoformas comparten características estructurales y genéticas, poseen modos diferentes de activación, distintas propiedades cinéticas y especificidades de sustrato.

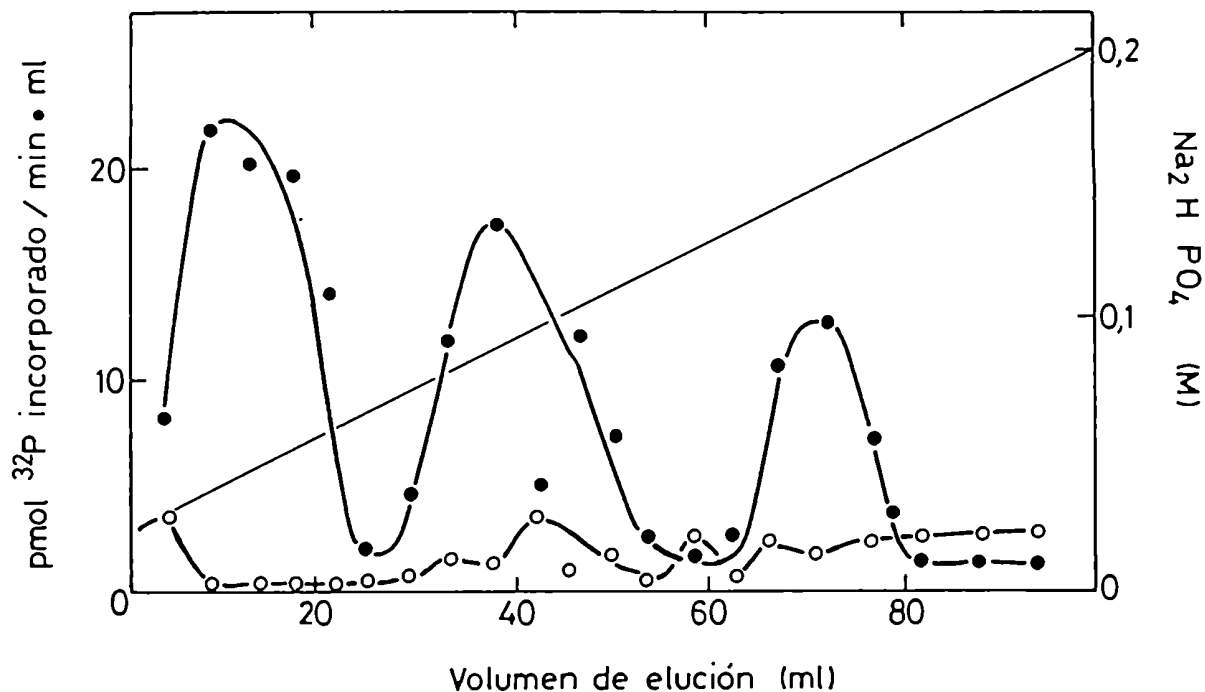


Figura 44: Cromatografía en columna de hidroxilapatita

La actividad de PKC se midió con histona H-1 como sustrato, en presencia de EGTA (O) o PS/DG/Ca²⁺ (●); — [NaCl]

7.1. Activación por ácido araquidónico

Los tres picos de PKC de *T. cruzi* obtenidos de la columna de hidroxilapatita se concentraron. Cada uno de estos picos y la PKC de cerebro bovino parcialmente purificada, se estudiaron en presencia de ácido araquidónico, con 0,5 mM CaCl₂ y 40 μM del péptido GS(1-12) como sustrato.

La mezcla de las distintas isoformas de PKC de cerebro bovino se activan en presencia de ácido araquidónico (figura 45). Las isoformas I y III de *T. cruzi* no se activan con ácido araquidónico; mientras que la isoforma II se activa parcialmente a altas concentraciones del mismo (figura 46).

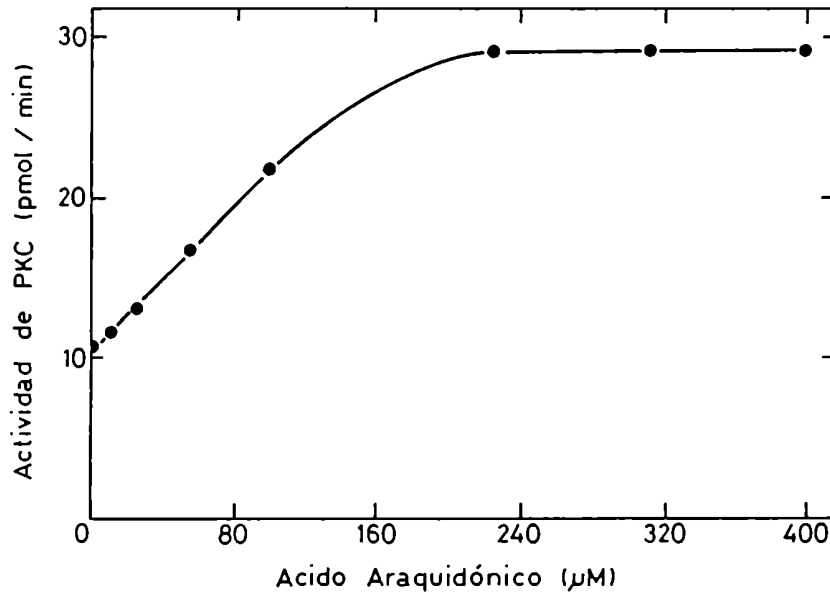


Figura 45: Actividad de PKC de cerebro bovino en función de la concentración de ácido araquidónico

La actividad se midió en presencia de Ca^{2+} y se utilizó el péptido GS (1-2) como sustrato.

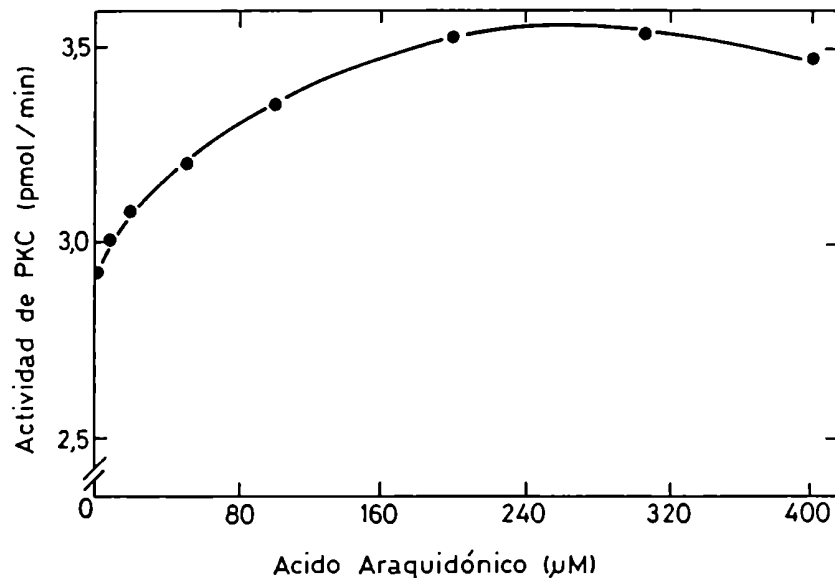


Figura 46: Actividad de PKC de *T. cruzi* en función de la concentración de ácido araquidónico

Se utilizó la PKC tipo II de *T. cruzi* purificada de la columna de hidroxilapatita. El ensayo se realizó en presencia de Ca^{2+} y con péptido GS (1-12) como sustrato.

7.2. Autofosforilación

Con las tres isoformas de PKC de *T. cruzi* y con PKC de cerebro bovino se hizo un ensayo de autofosforilación y fosforilación del péptido GS(1-2) simultáneos. En todos los casos se realizó una preincubación con o sin ATP no radioactivo.

La fosforilación del péptido GS(1-2) por las PKCs de *T. cruzi* y bovina es mayor cuando la preincubación se realiza en presencia de ATP (figura 47). Se ha demostrado que la PKC de mamíferos es capaz de autofosforilarse (Kikkawa *et al*, 1982; Huang *et al*, 1986). El efecto de esta modificación sería activar a la enzima,

aumentando la velocidad de fosforilación del sustrato (Mochly-Rosen y Koshland, 1987). Entonces la preincubación de las enzimas con ATP no radioactivo resultaría en la autofosforilación de las mismas, con el consecuente aumento de la fosforilación del sustrato. En la figura 47 se observa que, en el caso de las tres isoformas de PKC de *T. cruzi*, cuando se preincubaban en ausencia de ATP, existe un *lag* de aproximadamente 2 minutos, en la fosforilación del sustrato. Probablemente las PKCs de *T. cruzi* necesiten autofosforilarse para activarse y, de esa manera, fosforilar el sustrato.

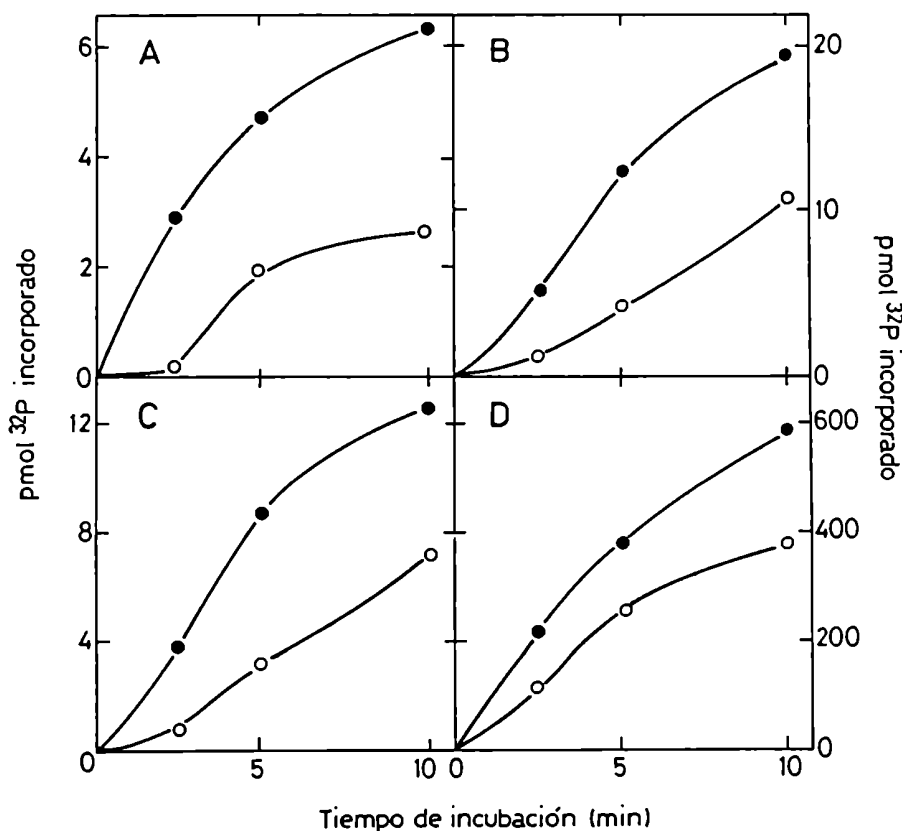


Figura 47: Fosforilación de péptido GS (1-12) por PKC

Se realizó una preincubación con (●) o sin ATP no radioactivo (○). Luego se incubó a distintos tiempos en presencia de PS/DG/Ca²⁺ y se midió en el sobrenadante la fosforilación del péptido. A, B y C, picos I, II y III de PKC de *T. cruzi* de una columna de hidroxilapatita; D, PKC de cerebro bovino.

En la figura 47 se observa que la isoforma II tiene mayor actividad de fosforilación de sustrato exógeno y ésta es, a su vez, la única isoforma que se activa, aunque parcialmente con ácido araquidónico.

En la figura 48 se muestra la cinética de autofosforilación. La preincubación con ATP no modifica los niveles de autofosforilación observados a 5 y 10 minutos.

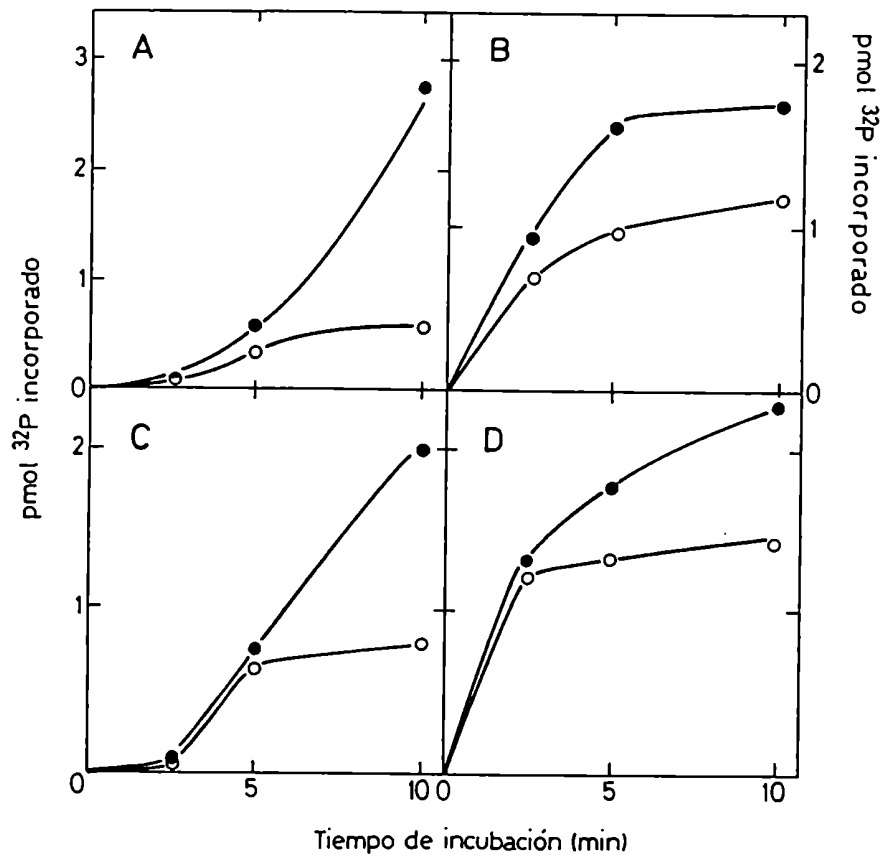


Figura 48: Autofosforilación de PKC

Todas las condiciones son igual a las de la figura 47. En este caso, la autofosforilación de la enzima se midió en el precipitado.

La PKC de *T. cruzi* proveniente de la columna de DEAE celulosa, el *pellet* de 105.000 xg de *T. cruzi* y el PKC de cerebro bovino, como control, se ensayaron en presencia de ATP[γ - 32 P] y en ausencia de sustrato. Luego se corrieron en un gel de poliacrilamida con SDS. El gel, finalmente se expuso a película de rayos X y se reveló.

En la figura 49 se muestra el resultado de la autofosforilación. Tanto en la enzima de *T. cruzi* (DEAE-celulosa) como en la PKC de cerebro bovino, se observa una banda de autofosforilación de aproximadamente 78 kDa. En el *pellet* de 105.000 xg de *T. cruzi* también se observa una banda de 78 kDa, probablemente de autofosforilación de la PKC, además de muchas otras bandas. Estas otras bandas serían fosforilaciones de sustratos o autofosforilaciones de otras quinasas de proteínas.

8. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LA PKC

Las fracciones particuladas de *T. cruzi* (105.000 xg) se purificaron a través de un gradiente de sacarosa discontinuo, y se obtuvieron las siguientes fracciones: M1, M2 y M3 que sedimentan a 1,3; 1,6 y 1,9 M sacarosa, respectivamente.

Las fracciones M1, M2, M3 y citosólica de *T. cruzi* y PKC de cerebro bovino se analizaron en un gel de poliacrilamida disociante. Luego se transfirió el gel a membrana de nitrocelulosa y, finalmente, se reveló con el anticuerpo monoclonal RPN-536, anti-PKC de cerebro bovino, que reconoce las isoformas α y β de PKC. En la figura 50 se observa en todas las fracciones de *T. cruzi* y en PKC de cerebro bovino, una banda específica de aproximadamente 78 kDa. Como control, en lugar del anticuerpo anti-PKC se utilizó suero preinmune de ratón o IgG purificada de ratón.

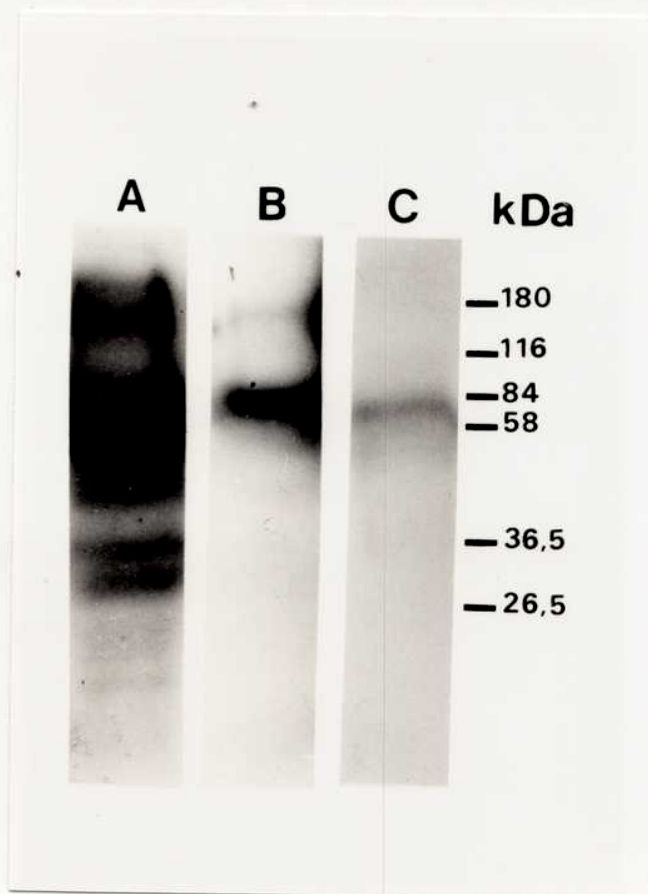


Figura 49: Autofosforilación de PKC (gel de poliacrilamida con SDS)

A: Fracciones particuladas de *T. cruzi*; B: PKC citosólica de *T. cruzi* proveniente de una DEAE-celulosa; C: PKC de cerebro bovino. Las muestras se incubaron 3 minutos con $10 \mu\text{M}$ $\text{ATP}[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ (1000 cpm/pmol) y 10 mM MgCl_2 . Las condiciones del ensayo están descritas en Materiales y Métodos.

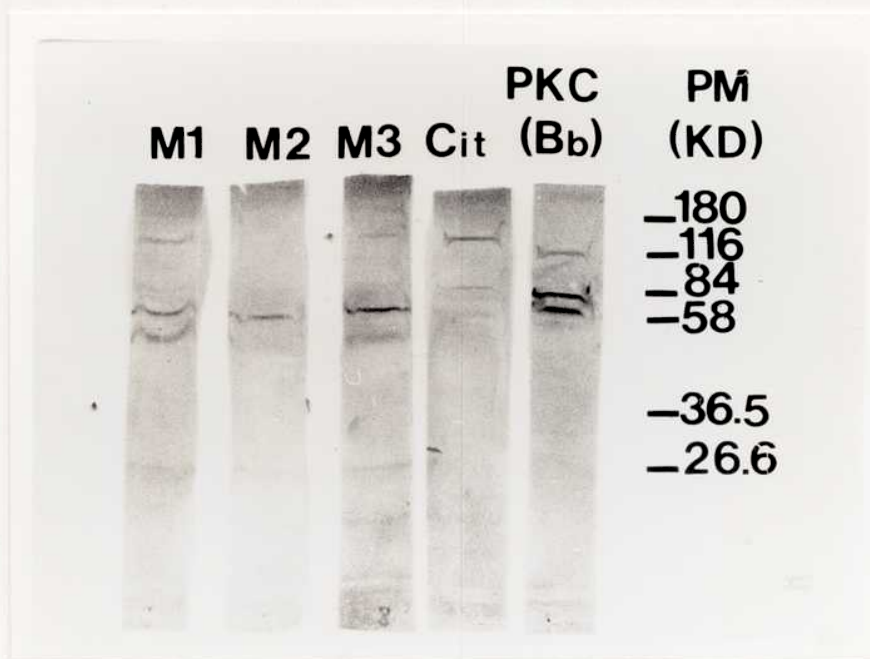


Figura 50: Transferencia a nitrocelulosa e inmunoprecipitación *in situ* con el anticuerpo anti-PKC- α

Las fracciones fueron sometidas a electroforesis en condiciones disociantes. M1, M2 y M3: fracciones provenientes de un gradiente de sacarosa de *T. cruzi*, que sedimentan a 1,3, 1,6 y 1,9 M sacarosa, respectivamente. Cit.: fracción citosólica de *T. cruzi*; PKC Bb: PKC de cerebro bovino.

Cuando se hizo el mismo ensayo con fracciones de *T. cruzi* provenientes de una columna de hidroxilapatita no se revelaron bandas con este anticuerpo ni con otro anticuerpo monoclonal anti-PKC- γ . Lo mismo ocurrió cuando se hizo inmunoprecipitación de esas fracciones con el anticuerpo anti-PKC α . Una explicación de estos resultados negativos es que la enzima en *T. cruzi* es muy minoritaria y nunca se pudo obtener suficiente cantidad de las isoformas para poder ser reconocidas por los anticuerpos. Además, la enzima se proteoliza muy rápidamente y los anticuerpos no la reconocen cuando se encuentra proteolizada, dado que estos anticuerpos re-

conocen la zona bisagra de la PKC que se encuentra entre los dominios catalítico y regulatorio, y que es el sitio primario de clivaje por proteasas (Parker *et al*, 1986).

9. PURIFICACION DE UNA PROTEASA DEPENDIENTE DE Ca²⁺

Cuando se comenzó a trabajar en la purificación de la PKC citosólica de *T. cruzi*, se vio que en el primer paso (cromatografía en DEAE-celulosa) se obtenía un grado de purificación mucho mayor que el teórico. Entonces, se pensó que en la fracción citosólica habría algún inhibidor de la PKC, que en la DEAE-celulosa se separaba de la actividad de PKC.

Se probó la actividad del "inhibidor" usando PKC de cerebro bovino como sustrato. Todos los ensayos se realizaron en presencia de PS/DG/Ca²⁺ que son los activadores de PKC. En la columna de DEAE-celulosa, este "inhibidor" eluía a una concentración de 0,2 M NaCl (figura 51). Posteriormente se lo purificó por una columna de filtración molecular en Ultrogel AcA34 (figura 52). Este "inhibidor" tenía un peso molecular de 55 kDa, un radio de Stokes de 3,5 nm y era termolábil.

En un principio se pensó que era un inhibidor porque la actividad de PKC de cerebro bovino disminuía, medida en presencia de Ca²⁺ y fosfolípidos. El cálculo de la actividad de PKC es el siguiente:

$$\text{Actividad PKC} = \text{Actividad PS/Ca}^{2+} - \text{Actividad Ca}^{2+}$$

Los resultados mostraron que la actividad basal en presencia de Ca²⁺ aumentaba.

Se efectuó un ensayo preincubando a distintos tiempos la PKC de cerebro bovino, con Ca²⁺, en presencia o ausencia de la proteasa. Se observó que la actividad de la PKC aumentaba en función del tiempo de preincubación, en presencia de la proteasa (figura 53).

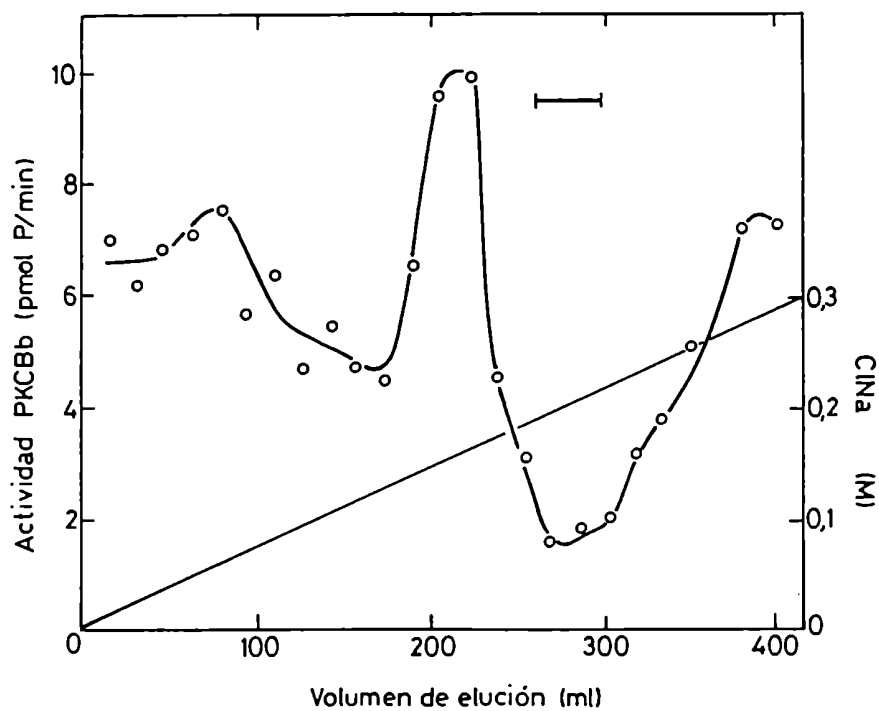


Figura 51: Purificación de la proteasa dependiente de Ca^{2+} por DEAE-celulosa

Se midió actividad de la proteasa utilizando PKC de cerebro bovino como sustrato; — [NaCl]

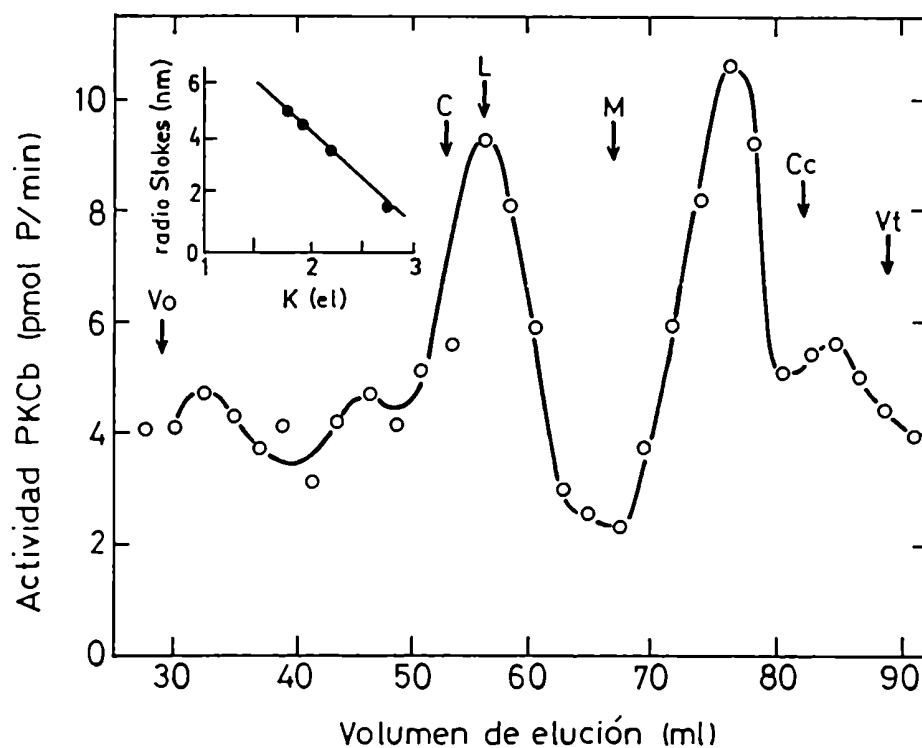


Figura 52: Cromatografía de filtración molecular (Ultrogel AcA34)

Las fracciones de la DEAE-celulosa con actividad de proteasa se cromatografiaron en Ultrogel AcA34. Se midió actividad de proteasa usando PKC de cerebro bovino como sustrato. Se utilizaron los siguientes marcadores: C, catalasa; L, lactato deshidrogenasa; M, malato deshidrogenasa; Cc, citocromo C; V₀ y V_t se determinaron con Azul dextrano y CoCl₂, respectivamente.

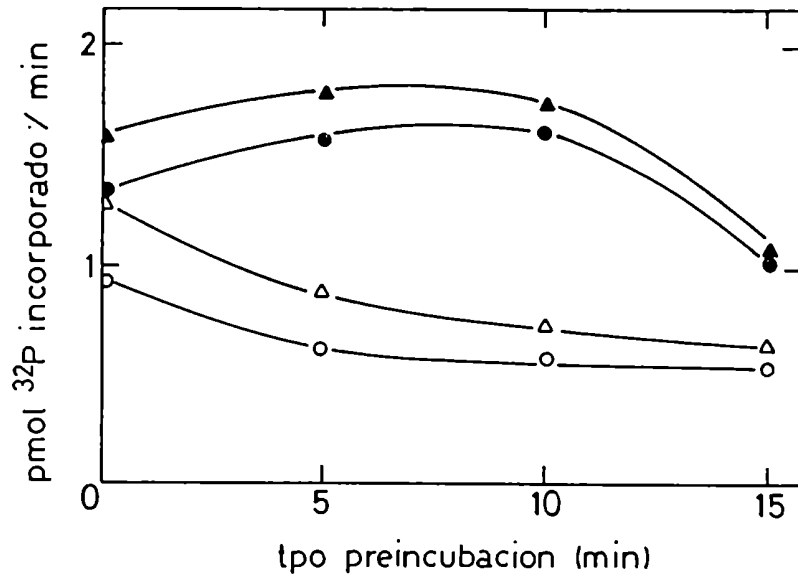


Figura 53: Actividad de la proteasa en función del tiempo de preincubación

Se preincubó a distintos tiempos la PKC de cerebro bovino, con Ca^{2+} en presencia y en ausencia de la proteasa y de cada tiempo de preincubación se midió actividad de PKC durante 10 (Δ, \blacktriangle) o 20 minutos (\circ, \bullet); (Δ, \circ) PKC sola; (\blacktriangle, \bullet) PKC en presencia de proteasa.

Esto demostraría que el supuesto "inhibidor" se comporta como una proteasa dependiente de Ca^{2+} . Esta proteasa aumentaba la actividad de la PKC en ausencia del activador (fosfatidilserina), siendo éste uno de los mecanismos de activación de la PKC (Kishimoto *et al*, 1983).

Estos resultados necesitan una comprobación posterior.

CONCLUSIONES

Se ha demostrado en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* la existencia de una quinasa de proteínas tipo C (PKC).

Tanto en la cepa patógena (Tul2), como en la no patógena (Tul0), la PKC se halla en fracciones citosólica y de membranas. En ambas cepas, el porcentaje (65-80%) de PKC en fracciones de membranas es mucho mayor que en fracción citosólica.

La PKC purificada a partir de fracción citosólica de epimastigotes de la cepa Tul2 es dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos, se activa en presencia de diacilglicerol y un ésteres de forbol. La enzima es reconocida por anticuerpos policlonales anti-PKC de cerebro bovino, debido a que se purifica por una columna de anticuerpo anti-PKC-sefarosa. Algunas fracciones son reconocidas por un anticuerpo monoclonal anti-PKC- α . La enzima es capaz de autofosforilarse en presencia de fosfatidilserina y Ca^{2+} . De los sustratos probados, la histona H-1 es fosforilada eficientemente.

También puede fosforilar con alta especificidad al péptido sintético GS(1-12). Todas estas características las comparte con la PKC de mamíferos.

A partir de fracciones particuladas se pudo purificar PKC, con las mismas características que la citosólica.

Por otro lado, las fracciones particuladas del parásito son capaces de unir ésteres de forbol, PMA y PDBu con K_d de 9×10^{-8} y $11,3 \times 10^{-8}$ M, respectivamente, semejantes a los de PKC de mamíferos.

En *T. cruzi*, al igual que en mamíferos, existe más de una isoforma de PKC, como se demuestra por purificación en columna de hidroxilapatita. Hasta el momento no se ha podido determinar si alguna de las tres isoformas de *T. cruzi* es homóloga a alguna de las ocho isoformas halladas en mamíferos.

La existencia en *T. cruzi* de una quinasa de proteínas tipo PKC, muestra que el parásito posee un sistema de quinasas de proteínas

complejo como el de mamíferos. Además, la presencia de una actividad de fosfolipasa C (Schenckman *et al*, 1988) y de un camino de hidrólisis de fosfoinosítidos activado por Ca^{2+} (Docampo y Pignataro, 1991), demostraría que en tripanosomátidos esta vía de regulación es semejante a la de mamíferos.

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Latif, A.A., Akhtar, R.A. y Hawthorne, J.N. *Biochem. J.* 162, 61 (1977).
- Adelstein, R.S. y Klee, C.B. *J. Biol. Chem.* 256, 7501 (1981).
- Aderem, A.A., Albert, K.A., Keum, M.M., Wang, J.K.T., Greengard, P. y Cohn, Z.A. *Nature (London)* 332, 362 (1988).
- Agranoff, B.W., Murthy, P. y Seguin, E.B. *J. Biol. Chem.* 258, 2076 (1983).
- Ahmad, Z., DePaoli-Roach, A.A. y Roach, P.J. *J. Biol. Chem.* 257, 8348 (1982).
- Ahmad, Z., Lee, F.-T., DePaoli-Roach, A.A. y Roach, P.J. *J. Biol. Chem.* 259, 8743 (1984).
- Ahmed, S., Kozma, R., Monfries, C., Hall, C., Lim, H.H., Smith, P. y Lim, L. *Biochem. J.* 272, 767 (1990).
- Akers, R.F., Lovinger, D.M., Colley, P.A., Linden, D.J. y Routenberg, A. *Science* 231, 587 (1986).
- Albert, K.A., Walaas, S.I., Wang, J.K.T. y Greengard, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2822 (1986).
- Albert, K.A., Nairn, A.C. y Greengard, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7046 (1987).
- Alper, S.L., Palfrey, H.C., De Riemer, S.A. y Greengard, P. *J. Biol. Chem.* 255, 11029 (1980).
- Altin, J.G. y Bygrave, F.L. *Biochem. J.* 232, 911 (1985).
- Amtmann, E. y Sauer, G. *Nature (London)* 296, 675 (1982).
- Anderson, R.A. y Marchesi, V.T. *Nature (London)* 318, 295 (1985).
- Andreasen, T.J., Leutje, C.W., Heideman, W. y Storm, D.R. *Biochemistry* 22, 4615 (1983).

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. y Karin, M. *Cell* 49, 729 (1987).

Asoaka, Y., Kikkawa, U. Sekiguchi, K., Shearman, M.S., Kosaka, Y., Nakano, Y., Satoh, T. y Nishizuka, Y. *FEBS Lett.* 231 (1988).

Bacher, N., Zisman, Y., Berent, E. y Livneh, E. *Mol. Cell. Biol.* 11, 126 (1991).

Ballester, R. y Rosen, O.M. *J. Biol. Chem.* 260, 15194 (1985).

Baraban, J.M., Snyder, S.A. y Alger, B.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 2538 (1985).

Barrandon, Y. y Green, H. *Cell* 50, 1131 (1987).

Bartelt, D.C., Fidel, S., Farber, L.H., Wolff, D.J. y Hammel, R.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3279 (1988).

Basi, G.S., Jacobson, R.D., Virag, I., Schilling, J. y Skene, J.H.P. *Cell* 49, 785 (1985).

Baukal, A.J., Balla, T., Hunyady, L., Hausdorff, W., Guillemette, G. y Catt, K.J. *J. Biol. Chem.* 263, 6087 (1988).

Bazzi, M.D. y Nelsestuen, G.L. *Biochemistry* 26, 115 (1987a).

Bazzi, M.D. y Nelsestuen, G.L. *Biochemistry* 26, 1974 (1987).

Bell, R.L. y Majerus, P.W. *J. Biol. Chem.* 255, 1790 (1980).

Bennett, C.F., Balcarek, J.M., Varrichio, A. y Crooke, S.T. *Nature (London)* 334, 268 (1988).

Berg, J.M. *Science* 232, 485 (1986).

Berg, J.M. *J. Biol. Chem.* 265, 6513 (1990).

- Berridge, M.J. *Mol. Cell. Endocrinol.* 24, 115 (1981).
- Berridge, M.J. *Biochem. J.* 220, 345 (1984).
- Berridge, M.J. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 159 (1987).
- Berridge, M.J. e Irvine, R.F. *Nature (London)* 341, 197 (1989).
- Berridge, M.J., Downes, P. y Hanley, M.R. *Biochem. J.* 206, 587 (1982).
- Berridge, M.J., Dawson, M.C., Downes, C.P., Heslop, R. e Irvine, F. *Biochem. J.* 212, 473 (1983).
- Besterman, J., Duronio, V. y Cuatrecasas, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6785 (1986).
- Biden, T.J., Prentki, M., Irvine, R.F., Berridge, M.J. y Wollheim, C.B. *Biochem. J.* 223, 467 (1984).
- Biden, T.J., Wollheim, C.B. y Schlegel, W. *J. Biol. Chem.* 261, 7223 (1986).
- Bishop, R., Martínez, R., Nakamura, K.D. y Weber, M.J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 536 (1983).
- Bishop, R., Martínez, R., Weber, M.J., Blackshear, P.J., Beatty, S., Lim, R. y Herschman, H.R. *Mol. Cell Biol.* 5, 2231 (1985).
- Blackshear, P.J., Witters, L.A., Girard, P.R., Kuo, J.F. y Quamo, S.N. *J. Biol. Chem.* 260, 13304 (1985).
- Bloomquist, B.T., Shortridge, R.R., Schnewley, S., Perdew, M., Montell, C., Steller, H., Rubin, G. y Pak, W.L. *Cell* 54, 723 (1988).
- Bocckino, S.B., Blackmore, P.F., Wilson, P.B. y Exton, J.H. *J. Biol. Chem.* 262, 15309 (1987).

- Bollag, G.E., Roth, R.A., Beaudoin, J., Mochly-Rosen, D. y Koshland, D.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5822 (1986).
- Brandt, S.J., Dougherty, R.W., Lapetina, E.G. y Niedel, J.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3277 (1985).
- Brandt, S.J., Niedel, J.E., Bell, R.M. y Young, W.S. III *Cell* 49, 57 (1987).
- Browning, M.D., Bureau, M., Dudek, E.M. y Olsen, R.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1315 (1990).
- Burch, R.M., Luini, A. y Axelrod, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7201 (1986).
- Burgess, G.M., Godfrey, P.P., McKinney, J.S., Berridge, M.J., Irvine, R.F. y Putney Jr, J.W. *Nature (London)* 309, 63 (1984).
- Burridge, K. y Feramisco, J.R. *Cell* 19, 587 (1980).
- Cabot, M.C., Welsh, C.J., Cao, H. y Chabbott, H. *FEBS Lett.* 233, 153 (1988).
- Camici, M., Ahmad, Z., DePaoli-Roach, A.A. y Roach, P.J. *J. Biol. Chem.* 259, 2466 (1984).
- Cannata, J.J.B., Frasc, A.A.C., Cataldi de Flombaum, M.A., Segura, E. y Cazzulo, J.J. *Biochem. J.* 184, 409 (1979).
- Cannata, J.J.B., Valle, E., Docampo, R. y Cazzulo, J.J. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 151 (1982).
- Carlson, G., Bechtel, P.J. y Graves, D.J. *Adv. Enzymol.* 50, 41 (1979).
- Carstem, M.E. y Miller, J.D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130, 1027 (1985).

- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. *J. Biol. Chem.* 257, 7847 (1982).
- Chagas, C. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 159 (1909).
- Chiang, T.M., Kang, E.S. y Kang, A.H. *Arch. Biochem. Biophys.* 252, 15 (1987).
- Cimler, B.M., Giebelhaus, D.H., Wakim, B.T., Storm, D.R. y Moon, R.T. *J. Biol. Chem.* 262, 12158 (1987).
- Cochet, C., Gill, G.N., Meisenhelder, J., Cooper, J.A. y Hunter T. *J. Biol. Chem.* 259, 2553 (1984).
- Cockcroft, S. *Trends Biochem. Sci.* 12, 75 (1987).
- Coffey, R.J., Derynck, R., Wilcox, J.N., Bringman, T.S., Goustin, A.S., Moses, H.L. y Pittelkow, M.R. *Nature (London)* 328, 817 (1987).
- Cohen, P. *Nature (London)* 296, 613 (1982).
- Colburn, N.H. en *Mechanisms of Environmental Carcinogenesis* (Barrett, J.C., ed) pág, 81, CRC Press, Boca Raton, FL (1987).
- Collett, M.S., Erikson, E., Purchio, A.F., Brugge, J.S. y Erikson, R.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3159 (1979).
- Collins, M.K.L. y Rozengurt, E. *J. Cell. Physiol.* 112, 42 (1982).
- Colodzin, M. y Kennedy, E.P. *J. Biol. Chem.* 240, 3771 (1965).
- Connolly, T.M., Lawing, W.J. Jr., y Majerus, P.W. *Cell* 46, 951 (1986).
- Cooper, J.A., Sefton, B.M. y Hunter, T. *Mol. Cell. Biol.* 4, 30 (1984).
- Cornell, R. y Vance, D.E. *Biochim. Biophys. Acta* 919, 26 (1987).

- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.-C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Liberman, T.A., Schlessinger, J., Francke, U., Levison, A. y Ullrich, A. *Science* 230, 1132 (1985).
- Coussens, L., Parker, P.J., Rhee, L., Yang-Feng, T.L., Chen, E., Waterfield, M.D., Francke, U. y Ullrich, A. *Science* 233, 859 (1986).
- Cross, F.R. y Hanafusa, H. *Cell* 34, 597 (1983).
- da Silveira, F.J., Zingales, B. y Colli, W. *Biochem. Biophys. Acta* 481, 722 (1977).
- Davis, R.J. y Czech, M.P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1974 (1985).
- Denis, G.V., Toyoshima, S. y Osawa, T. *Biochim. Biophys. Acta* 885, 136 (1986).
- Dittmer, J. y Dawson, R.M.C. *Biochem. J.* 81, 535 (1961).
- Docampo, R. y Pignataro, O.P. *Biochem. J.* 275, 407 (1991).
- Dotto, G.P., Parada, L.F. y Weinberg, R.A. *Nature (London)* 318, 472 (1985).
- Downes, C.P., Mussat, M.C. y Michell, R.H. *Biochem. J.* 203, 169 (1982).
- Dunphy, W.G., Kochenburger, R.J., Castagna, M. y Blumberg, P.M. *Cancer Res.* 41, 2640 (1981).
- Eichberg, J. y Hauser, G. *Biochem. Biophys. Acta* 144, 415 (1967).
- Eisenchlos, C.D., Flawiá, M.M., Torruela, M. y Torres, H.N. *Biochem. J.* 236, 185 (1986a).
- Eisenchlos, C.D., Paladini, A.A., Molina y Vedia, L., Torres, H.N. y Flawiá, M.M. *Biochem. J.* 237, 913 (1986b).

- Emori, Y., Homma, Y., Sarimachi, H., Kawasaki, H., Nakanishi, O., Suzuki, K. y Takenawa, T. *J. Biol. Chem.* 264, 21885 (1989).
- Endo, T., Naka, M. e Hidaka, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 942 (1982).
- Fain, J.N. y Berridge, M.J. *Biochem. J.* 178, 45 (1979a).
- Fain, J.N. y Berridge, M.J. *Biochem. J.* 180, 655 (1979b).
- Favre, B. y Turian, G. *Plant Science* 49, 15 (1987).
- Fisher, P.B., Weinstein, I.B., Eisenberg, D. y Ginsberg, H.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2311 (1978).
- Fisher, S.F., Van Rooijen, L.A.A. y Agranoff, B.W. *Trends Biochem. Sci.* 9, 53 (1984).
- Flint, A.J., Paladini, R.D. y Koshland, D.E. Jr. *Science* 249, 408 (1990).
- Folch, J. *J. Biol. Chem.* 177, 505 (1949).
- Fong, H.K.W., Yoshimoto, K.K., Eversole-Cire, P. y Simon, M.I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3066 (1988).
- Frasch, A.C., Goijman, S.C., Cazzulo, J.J. y Stopanni, A.O.M. *Mol. Biochem. Parasitol.* 4, 163 (1981).
- Friedman, B., Frackelton, A.R., Ross, A.H., Connors, J.M., Fujiki, H., Sugimura, T. y Rosner, M.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3034 (1984).
- Fürstenberger, G., Schweizer, J. y Marks, F. *Carcinogenesis* 6, 289 (1985).
- Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N. y Mikoshiba, K. *Nature (London)* 342, 32 (1989).

- Galla, H.-J. y Trudell, J.R. *Biochim. Biophys. Acta* 602, 522 (1980).
- Ganong, B.R., Loomis, C.R., Hannun, Y.A. y Bell, R.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1184 (1985).
- Geiger, G. *Cell* 18, 193 (1979).
- Gilmore, T. y Martin, G.S. *Nature (London)* 306, 487 (1983).
- Gilmour, D.S., Pflugfelder, G., Wang, J.C. y Lis, J.T. *Cell* 44, 401 (1986).
- Glass, D.B. y Krebs, E.G. *J. Biol. Chem.* 257, 1196 (1982).
- Glenney, J. *J. Biol. Chem.* 261, 7247 (1986).
- Gómez, M.L., Erijman, L., Arauzo, S., Torres, H.N. y Téllez-Iñón, M.T. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36, 101 (1989).
- Gonçalves, M.F., Zingales, B. y Colli, W. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1, 107 (1980).
- Gould, K.L., Woodgett, J.R., Cooper, J.A., Buss, J.E., Shalloway, D. y Hunter, T. *Cell* 42, 849 (1985).
- Graff, J.M., Young, T.N., Johnson, J.D. y Blackshear, P.J. *J. Biol. Chem.* 264, 21818 (1989).
- Groswald, D.E. y Kelly, P.T. *J. Neurochem.* 42, 534 (1984).
- Gschwendt, M., Kittstein, W. y Marks, F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 766 (1986a).
- Gschwendt, M., Fürstenberger, G., Kittstein, W., Besemfelder, E., Hull, W.E., Hagedorn, H., Opferkuch, H.J. y Marks, F. *Carcinogenesis* 7, 449 (1986b).
- Gschwendt, M., Leibersperger, H. y Marks, F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 974 (1989).

- Gschwendt, M., Kittstein, W. y Marks, F. *Trends Biochem. Sci* 16, 167 (1991).
- Gundersen, R.E. y Nelson, D.L. *J. Biol. Chem.* 262, 4602 (1987).
- Gupa, R.C., Vijayaraj, R. y Randerath, K. *Carcinogenesis* 9, 1081 (1982).
- Hall, A. *Science* 249, 635 (1990).
- Hallcher, L.M. y Sherman, W.R. *J. Biol. Chem.* 255, 10896 (1980).
- Hannun, Y.A., Loomis, C.R. y Bell, R.M. *J. Biol. Chem.* 260, 10039 (1985).
- Hannun, Y.A., Loomis, C.R. y Bell, R.M. *J. Biol. Chem.* 261, 7184 (1986).
- Hansson, A., Serhan, C.N., Haeggström, J., Ingelman-Sundberg, M. y Samuelson, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134, 1215 (1986).
- Haslam, R.J. y Davidson, M.M.L. *FEBS Lett.* 174, 90 (1984).
- Haslam, R.J. y Lynham, J.A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 714 (1977).
- Hathaway, D.R. y Adelstein, R.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1653 (1979).
- Hawkins, P.T., Michell, R.H. y Kirk, C.J. *Biochem. J.* 218, 785 (1984).
- Henner, D.J., Yang, M., Chen, E., Hellmiss, R., Rodríguez, H. y Low, M.G. *Nucleic Acid Res.* 16, 10383 (1988).
- Hide, G., Gray, A., Harrison, C.M. y Tait, A. *Mol. Biochem. Parasitol* 36, 51 (1989).
- Higashida, H. y Brown, D.A. *Nature (London)* 323, 333 (1986).

- Hincke, M.T. y Tolnai, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 559 (1986).
- Ho, A.K. y Klein, D.C. *J. Biol. Chem.* 262, 11764 (1987).
- Ho, A.K.S., Ling, Q.-L., Duffield, R., Lam, P.H. y Wang, J.H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 911 (1987).
- Hoare, C.A. Blackwell Scientific Publications. Oxford & Edinburgh 88, 60 (1972).
- Hokin, M.R. y Hokin, L.E. *J. Biol. Chem.* 203, 967 (1953).
- Hokin, M.R. y Hokin, L.E. en *Metabolism and Physiological Significance of Lipids*, p. 423, ed. by R.M.C. Dawson and D.N. Rhodes, New York: Wiley (1964).
- Holwill, M.E.J. y McGregor, J.L. *Nature (London)* 255, 157 (1975).
- House, C. y Kemp, B.E. *Science* 238, 1726 (1987).
- House, C., Wettenhall, R.E.H. y Kemp, B.E. *J. Biol. Chem.* 262, 772 (1987).
- Hsiao, L.-L.W., Gattoni-Celli, S. y Weinstein, I.B. *Science* 226, 552 (1984).
- Huang, K.-P., Chan, K.-F.J., Singh, T.J., Nakabayashi, H. y Huang, F.L. *J. Biol. Chem.* 261, 12134 (1986a).
- Huang, K.-P., Nakabayashi, H. y Huang, F.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8535 (1986b).
- Huang, F.L., Yoshida, Y., Nakabayashi, H. y Huang, K.-P. *J. Biol. Chem.* 262, 15714 (1987).
- Huang, K.-P., Huang, F.L., Nakabayashi, H. y Yoshida, Y. *J. Biol. Chem.* 263, 14839 (1988).

- Huang, K.-P., Huang, F.L., Nakabayashi, H. y Yoshida, Y. *Acta Endocrinologica (Copenh.)* 121, 307 (1989).
- Hunter, T. y Cooper, J.A. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 897 (1985).
- Ido, M., Sekiguchi, K., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. *FEBS Lett.* 219, 215 (1987).
- Ieyasu, H., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sawamura, M. y Nishizuka, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108, 1701 (1982).
- Ikebe, M., Harthshorne, D.J. y Elzinga, M. *J. Biol. Chem.* 262, 9569 (1987).
- Imboden, J.B., Shoback, D.M., Pattison, G. y Stobo, J.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5673 (1986).
- Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y. y Nishizuka, Y. *J. Biol. Chem.* 252, 7610 (1977).
- Irvine, R.F. *Cell Calcium* 3, 295 (1982).
- Irving, H.R. y Exton, J.H. *J. Biol. Chem.* 262, 3440 (1987).
- Iwashita, S. y Fox, C.F. *J. Biol. Chem.* 259, 2559 (1984).
- Jaken, S. y Kiley, S.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4418 (1987).
- Johnson, R.A. y Walseth, T.F. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 10, 135 (1979).
- Joseph, S.K., Thomas, A.P., Williams, R.J., Irvine, R.F. y Williamson, J.R. *J. Biol. Chem.* 259, 3077 (1984).
- Kai, M., Salway, J.G., Michell, R.H. y Hawthorne, J.N. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 22, 370 (1966).
- Kaibuchi, K., Takai, Y. y Nishizuka, Y. *J. Biol. Chem.* 256, 7146 (1981).

Kaibuchi, K., Takai, Y., Sawamura, M., Hoshijima, M., Fujikura, T. y Nishizuka, Y. *J. Biol. Chem.* 258, 6701 (1983).

Kamps, M.P., Taylor, S.S. y Sefton, B.M. *Nature (London)* 310, 589 (1984).

Karess, R.E. y Hanafusa, H. *Cell* 24, 155 (1981).

Katan, M., Kriz, R.W., Totty, N., Philp, R., Meldrum, E., Aldape, R.A., Knopf, J.L. y Parker, P.J. *Cell* 54, 171 (1988).

Katoh, N., Wise, B.C. y Kuo, J.F. *Biochem. J.* 209, 189 (1983).

Kawahara, Y., Takai, Y., Minakuchi, R., Sano, K. y Nishizuka, Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 309 (1980).

Kawamoto, S. e Hidaka, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 736 (1984).

Keith, K., Hide, G. y Tait, A. *Mol. Biochem. Parasitol* 43, 107 (1990).

Kemp, B.E., Pearson, R.B. y House, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7471 (1983).

Kennedy, M.B. y Greengard, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1293 (1981).

Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S. y Nishizuka, Y. *J. Biol. Chem.* 257, 13341 (1982).

Kikkawa, U., Go, M., Koumoto, J. y Nishizuka, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 636 (1986).

Kikkawa, U., Ono, Y., Ogita, K., Fujii, T., Asoaka, Y., Sekiguchi, K., Kosaka, Y., Igarashi, K. y Nishizuka, Y. *FEBS Lett.* 217, 227 (1987b).

- Kikkawa, U., Ogita, K., Ono, Y., Asoaka, Y., Shearman, M.S., Fujii, T., Ase, K., Sekiguchi, K., Igarashi, K. y Nishizuka, Y. *FEBS Lett.* 223, 212 (1987a).
- Kikkawa, U., Ogita, K., Shearman, M.S., Ase, K., Sekiguchi, K., Naor, Z., Ido, M., Nishizuka, Y., Saito, N., Tanaka, C., Ono, Y., Fujii, T. y Igarashi, K. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B320, 313 (1988).
- Kim, J.W., Sim, S.S., Kim, U.-H., Nishibe, S., Wahl, M.I., Carpenter, G. y Rhee, S.G. *J. Biol. Chem.* 265, 3940 (1990).
- Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. *J. Biol. Chem.* 255, 2273 (1980).
- Kishimoto, A., Kajikawa, N., Shiota, M. y Nishizuka, Y. *J. Biol. Chem.* 258, 1156 (1983).
- Kishimoto, A., Mikawa, K., Hashimoto, K., Yasuda, I., Tanaka, S., Tominaga, M., Kuroda, T. y Nishizuka, Y. *J. Biol. Chem.* 264, 4088 (1989).
- Kitano, T., Hashimoto, T., Kikkawa, U., Ase, K., Saito, N., Tanaka, C., Ichimori, Y., Tsukamoto, K. y Nishizuka, Y. *J. Neurosci.* 7, 1520 (1987).
- Klee, C.B., Crouch, T.H. y Richman, P.G. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 489 (1980).
- Knopf, J.L., Lee, M.-H., Sultzman, L.A., Kriz, R.W., Loomis, C.R., Hewick, R.M. y Bell, R.M. *Cell* 46, 491 (1986).
- Kolesnick, R.N. *J. Biol. Chem.* 262, 14525 (1987).
- Konno, Y., Ohno, S., Akita, Y., Kawasaki, H. y Suzuki, K. *J. Biochem.* 106, 673 (1989).
- Koreh, K. y Monaco, M.E. *J. Biol. Chem.* 261, 88 (1986).

- Kosaka, Y., Ogita, K., Ase, K., Nomura, H., Kikkawa, Y. y Nishizuka, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 973 (1988).
- Kraft, A.S. y Anderson, W.B. *Nature (London)* 301, 621 (1983).
- Kraft, A.S., Anderson, W.B., Cooper, H.L. y Sando, J.J. *J. Biol. Chem.* 257, 13193 (1982).
- Krebs, E.G. y Beavo, J.A. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 923 (1979).
- Kubo, K., Ohno, S. y Suzuki, K. *FEBS Lett.* 223, 138 (1987b).
- Kubo, K., Ohno, S. y Suzuki, K. *Nucleic Acid Res.* 15, 7179 (1987a).
- Kumjian, D.A., Wahl, M.I., Rhee, S.G. y Daniel, T.O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8232 (1989).
- Kuo, J.F., Andersson, R.G., Wise, B.C., Mackerlova, L., Salomons-son, I., Brackett, N.L., Katoh, N., Shoji, M. y Wrenn, R.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7039 (1980).
- Kuppe, A., Evans, L.M., McMillen, D.A. y Griffith, O.H. *J. Bacteriol.* 171, 6077 (1989).
- Kyhse-Andersen, J. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203 (1984).
- Laemmli, U.K. *Nature (London)* 227, 680 (1970).
- Landt, M. y McDonald, M.J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93, 881 (1980).
- Lapetina, E.G. *Biochim. Biophys. Acta* 884, 219 (1986).
- Laskin, J.D., Mufson, R.A., Piccinini, L., Engelhardt, D.L. y Weinstein, I.B. *Cell* 25, 441 (1981).
- Leach, K.L., James, M.L. y Blumberg, P.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4208 (1983).

- Leach, K.L., Powers, E.A., Ruff, V.A., Jaken, S. y Kaufmann, S. J. Cell Biol. 109, 685 (1989).
- Lee, W., Mitchell, P. y Tjian, R. Cell 49, 741 (1987).
- Leibersperger, H., Gschwendt, M. y Marks, F. J. Biol. Chem. 265, 16108 (1990).
- Leibersperger, H., Gschwendt, M., Gernold, M. y Marks, F. J. Biol. Chem. 266, 14778 (1991).
- Levin, D.E., Fields, F.O., Kunisawa, R., Bishop, J.M. y Thorner, J. Cell 62, 213 (1990).
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.H., Leedale, G.F., Loeblich, A.R.III, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vaura, J. y Wallace, F.G. J. Protozool 27, 37 (1980).
- Lim, M.S., Sutherland, C. y Walsh, M.P. Biochem. Biophys. Res. Commun. 132, 1187 (1985).
- Ling, E., Gardner, K. y Bennett, V. J. Biol. Chem. 261, 13875 (1986).
- Litchfield, D.W. y Ball, E.H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 134, 1276 (1986).
- Litosch, I. y Fain, J.N. Life Sci. 39, 187 (1986).
- Liu, L.F. y Miller, K.G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3487 (1981).
- Lnyedi, P., Mucsi, I., Hunyady, L., Catt, K.J. y Spat, A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 140, 941 (1986).
- Londesborough, J. y Nuutinen, M. FEBS Lett. 219, 249 (1987).

- Lovinger, D.M., Colley, P.A., Aker, R.F., Nelson, R.B. y Routtenberg, A. *Brain Res.* 399, 205 (1986).
- Lowndes, J.M., Hokin-Neaverson, M. y Bertics, P.J. *Biochim. Biophys. Acta* 1052, 143 (1990).
- Lowry, O.H., Rosenborough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
- Ludérus, M.E.E., Van der Most, R.G., Otte, A.P. y Van Driel, R. *FEBS Lett.* 253, 71 (1989).
- Madison, D.V., Malenka, R.C. y Nicoll, R.A. *Nature (London)* 321, 695 (1986).
- Mahadevan, L.C., Aitken, A., Heath, J. y Foulkes, J.G. *EMBO J.* 6, 921 (1987).
- Mahoney, C.W., Luthy, R. y Azzi, A. *Membrane Proteins*, p. 56, ed. by Azzi. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (1986).
- Malenka, R.C., Madison, D.V. y Nicoll, R.A. *Nature (London)* 321, 175 (1986).
- Mancini, P.E. y Patton, C.L. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3, 19 (1981).
- Marais, R.M. y Parker, P.J. *Eur. J. Biochem.* 182, 129 (1989).
- Margolis, B., Rhee, S.G., Felder, S., Meruic, M., Lyall, A., Levitzki, A., Ullrich, A., Zilberstein, A. y Schlessinger, J. *Cell* 57, 1101 (1989).
- Masmoudi, A., Labourdette, G., Mersel, M., Huang, F.L., Huang, K.-P., Vincendon, G. y Malviya, A.N. *J. Biol. Chem.* 264, 1172 (1989).
- Matsuoka, M., Itoh, H., Kozasa, T. y Kaziro, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5384 (1988).

- McCaffrey, P.G., Rosner, M.R., Kikkawa, U., Sekiguchi, K., Ogita, K., Ase, K. y Nishizuka, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146, 140 (1987).
- McDonald, J.R. y Walsh, M.P. *Biochem. J.* 232, 559 (1985a).
- McDonald, J.R. y Walsh, M.P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129, 603 (1985b).
- McDonald, J.R. y Walsh, M.P. *Biochem. Soc. Trans.* 14, 585 (1986).
- McDonald, J.R., Gröschel-Steward, U. y Walsh, M.P. *Biochem. J.* 242, 695 (1987).
- Means, A.R. y Chafouleas, J.G. *Ann. Rev. Physiol.* 44, 667 (1982).
- Meisenhelder, J., Suh, P.-G., Rhee, S.G. y Hunter, T. *Cell* 57, 1109 (1989).
- Melloni, E., Pontremoli, S., Micchetti, M., Sacco, O., Sparatore, B. y Horecker, B.L. *J. Biol. Chem.* 261, 4101 (1986).
- Michell, R.H. *Biochim. Biophys. Acta* 415, 81 (1975).
- Michell, R.H. y Hawthorne, J.N. *Biochim. Biophys. Acta* 21, 333 (1965).
- Minakuchi, R., Takai, Y., Yu, B. y Nishizuka, Y. *J. Biochem.* 89, 1651 (1981).
- Misra, U.K. y Sahyoun, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 760 (1987).
- Mitchell, F.E., Marais, R.M. y Parker, P.J. *Biochem. J.* 261, 131 (1989).
- Mochly-Rosen, D. y Koshland, D.E. Jr. *J. Biol. Chem.* 262, 2291 (1987).

- Morrison, D.K., Kaplan, D.R., Rhee, S.G. y Williams, L.T. **Mol. Cell. Biol.** 10, 2359 (1990).
- Muir, J.G. y Murray, A.W. **J. Cell. Physiol.** 130, 382 (1987).
- Muller, E.H., Hegewald, H., Jaroszewicz, K., Cumme, G.A., Hoppe, H. y Frunder, H. **Biochem. J.** 235, 775 (1986).
- Murakami, K., Chan, S.Y. y Routtemberg, A. **J. Biol. Chem.** 261, 15424 (1986).
- Muscarella, D.E., Vogt, V.M. y Bloom, S.E. **J. Cell. Biol.** 105, 1501 (1987).
- Naitoh, Y. y Kaneko, H. **Science** 176, 523 (1972).
- Naka, M., Nishikawa, M., Adelstein, R.S. y Hidaka, H. **Nature (London)** 306, 490 (1983).
- Nakamura, T. y Ui, M. **J. Biol. Chem.** 260, 3584 (1985).
- Negishi, M., Ito, S., Tanaka, T., Yokohama, H., Hayaishi, H., Katada, T., Ui, M. y Hayaishi, O. **J. Biol. Chem.** 262, 12077 (1987).
- Nelsestuen, G.L. y Bazzi, M.D. **J. Bioenerg. Biomemb.** 23, 43 (1991).
- Ness, P.J., Koller, T. y Thoma, F. **J. Mol. Biol.** 200, 127 (1988).
- Newton, A.C. y Koshland, D.E. Jr. **J. Biol. Chem.** 262, 10185 (1987).
- Nishizuka, Y. **Mol. Biol. Biochem. Biophys.** 32, 113 (1980).
- Nishizuka, Y. **Nature (London)** 308, 693 (1984).
- Nishizuka, Y. **Science** 233, 305 (1986).

- Nishizuka, Y. *Nature (London)* 334, 661 (1988).
- Nishizuka, Y. y Takai, Y. *Protein Phosphorylation (Rosen/Krebs) Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation*, vol. 8 (1982).
- Nunn, D.L. y Watson, S.P. *Biochem. J.* 234, 809 (1987).
- O'Brien, C.A., Lawrence, D.S., Kaiser, E.T. y Weinstein, I.B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124, 296 (1984).
- O'Callaghan, J.P., Dunn, L.A. y Lovenberg, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5812 (1980).
- O'Rourke, F.A., Halenda, S.P., Zavoico, G.B. y Feinstein, M.B. *J. Biol. Chem.* 260, 956 (1985).
- Oetting, M., Leboff, M., Swiston, L., Preston, J. y Brown, E. *FEBS Lett.* 208, 99 (1986).
- Ogita, K., Miyamoto, S.-I., Koide, H., Iwai, T., Oka, M., Ando, K., Kishimoto, A., Ideda, K., Fukami, Y. y Nishizuka, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5011 (1990).
- Ohno, S., Kawasaki, H., Imajoh, S., Suzuki, K., Inagaki, M., Yokokura, H., Sakoh, T. y Hidaka, H. *Nature (London)* 325, 161 (1987).
- Ohno, S., Akita, Y., Konno, Y., Imajoh, S. y Suzuki, K. *Cell* 53, 731 (1988).
- Ohno, S., Konno, Y., Akita, Y., Yano, A. y Suzuki, K. *J. Biol. Chem.* 265, 6296 (1990).
- Okajima, F., Katada, T. y Ui, M. *J. Biol. Chem.* 260, 6761 (1985).
- Oláh, Z. y Kiss, Z. *FEBS Lett.* 195, 33 (1986).

- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. y Nishizuka, Y. *FEBS Lett.* 226, 125 (1987a).
- Ono, Y., Kikkawa, U., Ogita, K., Fujii, T., Kurokawa, T., Asoaka, Y., Sekiguchi, K., Ase, K., Igarashi, K. y Nishizuka, Y. *Science* 236, 1116 (1987b).
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. y Nishizuka, Y. *J. Biol. Chem.* 263, 6927 (1988a).
- Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kikkawa, U., Ogita, K. y Nishizuka, Y. *Nucleic Acid Res.* 16, 5199 (1988b).
- Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4868 (1989a).
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. y Nishizuka, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3099 (1989b).
- Osada, S., Mizuno, K., Saido, T.C., Akita, Y., Suzuki, K., Kuroki, T. y Ohno, S. *J. Biol. Chem.* 265, 22434 (1990).
- Pang, L.H. y Sternweis, P.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 86, 7814 (1989).
- Pang, L.H. y Sternweis, P.C. *J. Biol. Chem.* 265, 18707 (1990).
- Parker, P.J., Katan, M., Waterfield, M.D. y Leader, D.P. *Eur. J. Biochem.* 148, 579 (1985).
- Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D. y Ullrich, A. *Science* 233, 853 (1986).
- Parker, P.J., Kour, G., Marais, R.M., Mitchell, F., Pears, C., Schaap, D., Stabel, S. y Webster, C. *Mol. Cell. Endocrinol.* 65, 1 (1989b).

- Pears, C.J., Kour, G., House, C., Kemp, B.E. y Parker, P.J. *Eur. J. Biochem.* 194, 89 (1990).
- Pears, C., Schaap, D. y Parker, P.J. *Biochem. J.* 276, 257 (1991).
- Pelech, S.L. y Vance, D.E. *Biochim. Biophys. Acta* 779, 217 (1984).
- Pelosin, J.-M., Vilgrain, I. y Chambaz, E.M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147, 382 (1987).
- Pizzi, T. *Biológica, Santiago* 3, 53 (1945).
- Putney, J.W., Jr. *Pharmacol. Rev.* 30, 209 (1978).
- Qu, Y., Torchia, J., Phan, T.D. y Sen, A.K. *Mol. Cell. Biochem.* 103, 171 (1991).
- Raben, D.M., Yasuda, K.M. y Cunningham, D.D. *J. Cell. Physiol.* 130, 466 (1987).
- Raick, A.N. *Cancer Res.* 33, 269 (1973).
- Rangel-Aldao, R. y Opperdoes, F.R. *Mol. Biochem. Parasitol.* 10, 231 (1984).
- Rangel-Aldao, R., Allende, O. y Cayama, E. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14, 75 (1985).
- Rangel-Aldao, R., Tovar, G. y Ledezma de Ruiz, M. *J. Biol. Chem.* 258, 6979 (1983).
- Rasmussen, H. *Physiol Rev.* 64, 938 (1984).
- Rasmussen, H. y Barrett, P.Q. *Physiol. Rev.* 64, 938 (1984).
- Reynolds, J.A. y Tanford, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66, 1002 (1970).

- Rhee, S.G., Suh, P.G., Ryu, S.H. y Lee, S.Y. *Science* 244, 546 (1989).
- Rifkin, D.B., Crowe, R.M. y Pollack, R. *Cell* 18, 361 (1979).
- Rink, T.J., Sánchez, A. y Hallam, T. *Nature (London)* 305, 317 (1983).
- Roach, P.J. y Goldman, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7170 (1983).
- Rodríguez-Pena, A. y Rozengurt, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 1053 (1984).
- Rodríguez-Pena, A. y Rozengurt, E. *EMBO J.* 5, 77 (1986).
- Rodríguez-Pena, A., Zachary, I. y Rozengurt, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140, 379 (1986).
- Roscoff, P.M., Savage, N. y Dinarello, C.A. *Cell* 54, 73 (1988).
- Rosenthal, A., Rhee, L., Yadegari, R., Paro, R., Ullrich, A. y Goeddel, D.V. *EMBO J.* 6, 433 (1987).
- Ross, C.A., Meldolesi, J., Milner, T.A., Satoh, T., Supattapone, S. y Snyder, S.H. *Nature (London)* 339, 468 (1989).
- Rozengurt, E. *Science* 234, 161 (1986).
- Rozengurt, E., Rodríguez-Pena, M. y Smith, K.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7244 (1983).
- Rozengurt, E., Rodríguez-Pena, A., Coombs, M. y Sinnett-Smith, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5748 (1984).
- Ruben, L. Egwuagu, C. y Patton, C.L. *Biochim. Biophys. Acta* 758, 104 (1983).
- Rubin, R.P. *Federation Proc.* 41, 2181 (1982).

- Saito, N., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. y Tanaka, C. J. *Neurosci.* 8, 369 (1988).
- Salter, R.S., Krinks, M.H., Klee, C.B. y Neer, E.J. *J. Biol. Chem.* 256, 9830 (1981).
- Samuels, D.S., Shimizu, Y. y Shimizu, N. *FEBS Lett.* 259, 57 (1989).
- Sano, K., Takai, Y., Yamanishi, J. y Nishizuka, Y. *J. Biol. Chem.* 258, 2010 (1983).
- Sasaguri, T., Hirata, M., Itoh, T., Koga, T. y Kuriyama, H. *Biochem. J.* 239, 567 (1987).
- Sato, C., Nishazawa, K., Nakayama, T. y Kabayashi, T. *J. Cell Biol.* 100, 748 (1985).
- Schaap, D. y Parker, P.J. *J. Biol. Chem.* 265, 7301 (1990).
- Schaap, D., Parker, P.J., Bristol, A., Kriz, R. y Knopf, J. *FEBS Lett.* 243, 351 (1989).
- Schaap, D., Hsuan, J., Totty, N. y Parker, P.J. *Eur. J. Biochem.* 191, 431 (1990).
- Schafer, A., Bygrave, F., Matzenauer, S. y Marmé, D. *FEBS Lett.* 187, 25 (1985).
- Schenckman, S., Yoshida, N. y Cardoso de Almeida, M.L. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29, 141 (1988).
- Schlaepfer, D.D. y Haigler, H.T. *J. Biol. Chem.* 262, 6931 (1987).
- Schmidt, J.A. y Eckert, R. *Nature (London)* 262, 713 (1976).
- Schulman, H. y Greengard, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5432 (1978).

- Schulz, I. y Stolze, H.H. *Annu. Rev. Physiol.* 42, 127 (1980).
- Schwantke, N. y Le Peuch, C.J. *FEBS Lett.* 177, 36 (1984).
- Seif, R. *J. Virol.* 36, 421 (1980).
- Sekiguchi, K., Tsukuda, M., Ogita, K., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 797 (1987).
- Seyfred, M.A., Farrell, L.E. y Wells, W.W. *J. Biol. Chem.* 259, 13204 (1984).
- Sharma, R.K., Wang, T.H., Wirch, E. y Wang, J.H. *J. Biol. Chem.* 255, 5916 (1980).
- Shearman, M.S., Naor, Z., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147, 911 (1987).
- Sixel, F. y Galla, H.-J. *Biochim. Biophys. Acta* 643, 626 (1981).
- Smrcka, A.V., Hepler, J.R., Brown, K.O. y Sternweiss, P.C. *Science* 251, 804 (1991).
- Stabel, S., Rodríguez-Pena, A., Young, S., Rozengurt, E. y Parker, P.J. *J. Cell Physiol.* 130, 111 (1987).
- Stahl, M.L., Ferez, C.R., Kelleher, K.L., Driz, R.W. y Knopf, J.L. *Nature (London)* 332, 269 (1988).
- Stavis, R.L. y Hirschberg, R. *J. Cell. Biol.* 59, 367 (1973).
- Steimberg, S.F., Chow, Y.K., Robinson, R.B. y Bilezikian, J.P. *Endocrinology* 120, 1889 (1987).
- Strathmann, M. y Simon, M.I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9113 (1990).
- Strathmann, M., Wilkie, T.M. y Simon, M.I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7407 (1989).

- Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J. y Schulz, I. **Nature (London)** 306, 67 (1983).
- Streb, H., Bayerdorffer, E., Hasse, W., Irvine, R.F. y Schulz, I. **J. Membrane Biol.** 81, 241 (1984).
- Strickler, J.E. y Patton, C.L. **Science** 190, 1110 (1975).
- Stumpo, D.J., Graff, J.M., Albert, K.A., Greengard, P. y Blackshear, P.J. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86, 4012 (1989).
- Suh, P.-G., Ryu, S.H., Moon, K.H., Suh, H.W. y Rhee, S.G. **Cell** 54, 161 (1988).
- Supattapone, S., Worley, P.F., Baraban, J.M. y Snyder, S.H. **J. Biol. Chem.** 263, 1530 (1988).
- Tabuse, U. y Mirva, J. **Carcinogenesis** 4, 783 (1983).
- Tabuse, Y., Nishikawa, K. y Miwa, J. **Science** 243, 1713 (1989).
- Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. y Nishizuka, Y. **J. Biol. Chem.** 252, 7603 (1977).
- Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T. y Nishizuka, Y. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 91, 1218 (1979).
- Takai, Y., Kishimoto, A. y Nishizuka, Y. en **Calcium and Cell Function** vol. 2 (ed. Cheung, W.Y.) 385 (Academic, New York) (1982).
- Takai, Y., Kikkawa, U., Kaibuchi, K. y Nishizuka, Y. **Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.** 18, 119 (1984).
- Tamura, T., Friis, R.R. y Bauer, H. **FEBS Lett.** 177, 151 (1984).
- Tanaka, C., Taniyama, K. y Kusunoki, M. **FEBS Lett.** 175, 165 (1984).

- Tapley, P.M. y Murray, A.W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 158 (1984).
- Tapley, P.M. y Murray, A.W. *Eur. J. Biochem.* 151, 419 (1985).
- Téllez-Iñón, M.T., Ulloa de la Serna, R.M., Torruela, M. y Torres, H.N. *J. Protozool.* 31, 30a (1984).
- Téllez-Iñón, M.T., Ulloa, R.M., Torruela, M. y Torres, H.N. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17, 143 (1985).
- Terenzi, H.F., Roselino, E. y Passeron, S. *Eur. J. Biochem.* 18, 342 (1971).
- Thomas, G.M.H., Geny, B. y Cockcroft, S. *EMBO J.* 10, 2507 (1991).
- Tricoli, J.V., Sahai, B.M., McCormick, P.J., Jarlinski, S.J., Bertram, J.S. y Kowalski, D. *Exp. Cell Res.* 158, 1 (1985).
- Tsuda, T., Kaibuchi, K., Kawahara, Y., Fukuzaki, H. y Takai, Y. *FEBS Lett.* 191, 205 (1985).
- Turner, R.S., Kemp, B.E., Su, H. y Kuo, J.F. *J. Biol. Chem.* 260, 11503 (1985).
- Tyers, M., Rachubinski, R.A., Stewart, M.I., Varrichio, A.M., Shorr, R.G.L., Haslam, R.J. y Harley, C.B. *Nature (London)* 333, 470 (1988).
- Ui, M. en *Receptor Biochemistry and Methodology. Phosphoinositides and Receptor Mechanisms*, Vol 7, p 163, ed by J.W. Putney, Jr., New York: Liss (1986).
- Ulloa, R.M., Mesri, E., Esteva, M., Torres, H.N. y Téllez-Iñón, M.T. *Biochem. J.* 255, 319 (1988).
- Ulloa, R.M., Torres, H.N., Ochatt, C.M. y Téllez-Iñón, M.T. *Mol. Cell. Biochem.* (1991, en prensa).

- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E.L.V., Whittle, N., Waterfield, M.D. y Seeburg, P.H. *Nature (London)* 309, 418 (1984).
- Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.-C., Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P.H., Grunfeld, C., Rosen, O.M. y Ramachandran, J. *Nature (London)* 313, 756 (1985).
- van Eldik, L.J., Zendoqui, J.G., Marshak, D.R. y Watterson, D.M. *Int. Rev. Cytol.* 77, 1 (1982).
- Vance, D.E. y Pelech, S.L. *Trends Biochem. Sci.* 9, 17 (1984).
- Verghese, M.W., Uhing, R.J. y Snyderman, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138, 887 (1986).
- Voorheis, P.H. y Martin, R.B. *Eur. J. Biochem.* 113, 223 (1980).
- Voorheis, P.H. y Martin, R.B. *Eur. J. Biochem.* 116, 471 (1981).
- Voorheis, P.H. y Martin, R.B. *Eur. J. Biochem.* 123, 371 (1982).
- Wahl, M.I., Nishibe, S., Kim, J.W., Kim, H., Rhee, S.G. y Carpenter, G. *J. Biol. Chem.* 265, 3944 (1990).
- Wahl, M.I., Nishibe, S., Suh, Pi-G., Rhee, S.G. y Carpenter, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1568 (1989).
- Walaas, S.I., Nairn, A.C. y Greengard, P. *J. Neurosci.* 3, 291 (1983).
- Walaas, S.I., Nairn, A.C. y Greengard, P. *J. Neurosci.* 6, 954 (1986).
- Walsh, D.A., Ashby, C.D., González, C., Calkins, D., Fisher, E.H. y Krebs, E.G. *J. Biol. Chem.* 247, 1977 (1971).

- Walsh, M.P., Valentine, K.A., Nga, P.K., Carruthers, C.A. y Hollenberg, M. *Biochem. J.* 224, 117 (1984).
- Walter, R.D. y Hoppe-Seyler's, *Z. Physiol. Chem.* 355, 1443 (1974).
- Walter, R.D. y Opperdoes, F.R. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 287 (1982).
- Wang, J.C. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 665 (1985).
- Warden, C.H. y Friedkin, M. *J. Biol. Chem.* 260, 6006 (1985).
- Weinstein, I.B., Gattoni-Celli, S., Kirschmeier, P., Lambert, M., Hsiao, W., Backer, J. y Jeffrey, A. *Cancer Cells 1. Transformed Phenotype*, pág, 229, Cold Spring Harbor Laboratory (1985).
- Wolf, M., Cuatrecasas, P. y Sahyoun, N. *J. Biol. Chem.* 260, 15718 (1985a).
- Wolf, M., Levine, H., May, S., Cuatrecasas, P. y Sahyoun, N. *Nature (London)* 317, 564 (1985b).
- Wood, J.G., Girard, P.R., Mazzei, G.J. y Kuo, J.F. *J. Neurosci.* 6, 2571 (1986).
- Woodgett, J.R. y Hunter, T. *Eur. J. Biochem.* 161, 177 (1986).
- Worley, P.F., Baraban, J.M. y Snyder, S.H. *J. Neurosci.* 6, 199 (1986).
- Worthington Enzyme Manual, Worthington Biochemical Corporation, p. 7., Free Hold (1972).
- Wu, W.C.-S., Walaas, S.I., Nairn, A.C. y Greengard, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5249 (1982).
- Yamanishi, J., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Castagna, M. y Nishizuka, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112, 778 (1983).

Yamauchi, T. y Fujisawa, H. **FEBS Lett.** 116, 141 (1980).

Yang, J.C., Chang, P.C., Fujitaki, J.M., Chui, K.C. y Smith, R.A. **Biochemistry** 25, 2677 (1986).

Yoshida, Y., Huang, F.L., Nakabayashi, H. y Huang, K.-P. **J. Biol. Chem.** 263, 9868 (1988).

Young, S., Parker, P.J., Ullrich, A. y Stabel, S. **Biochem. J.** 244, 775 (1987).

Young, S., Rothbard, J. y Parker, P.J. **Eur. J. Biochem.** 173, 247 (1988).

Yuspa, S.H., Hennings, H. y Lichti, U. **J. Biol. Biochem.** 17, 245 (1981).

Zachary, I., Sinnet-Smith, J.W. y Rozengurt, E. **J. Cell Biol.** 102, 2211 (1986).

Zhang, H., Wang, J.C. y Liu, L.F. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85, 1060 (1988).

Zurgil, N. y Zisapel, N. **FEBS Lett.** 185, 257 (1985).

Abelardo León

Marichaura Gómez