



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

CAMPUS DE LUGO

**Purificación y caracterización de una isoforma  
Calcio dependiente de proteína quinasa C en  
*Mytilus galloprovincialis* Lmk.**

Martín González Riopedre

Lugo, 2009



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**CAMPUS DE LUGO**

**Purificación y caracterización de una isoforma  
Calcio dependiente de proteína quinasa C en  
*Mytilus galloprovincialis* Lmk.**

**Martín González Riopedre**

Lugo, 2009



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**Universidad de Santiago de Compostela**

**D. Juan Ignacio Ramos Martínez**, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela y, **D. Ramiro Barcia Vieitez**, Profesor Titular del mismo departamento,

**INFORMAN:**

Que la presente memoria con título "**Purificación y caracterización de una isoforma Calcio dependiente de proteína quinasa C en *Mytilus galloprovincialis* Lmk.**" elaborada por el Graduado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos **D. Martín González Riopedre**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el laboratorio del departamento de Bioquímica y Biología Molecular, y autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular.

Lugo, septiembre de 2008.

Fdo. J.I. Ramos Martínez

Fdo. R. Barcia Vieitez

Fdo. M. González Riopedre

## **Agradecimientos**

---

*... y he aquí la parte de la tesis que más me ha costado escribir. Por tres motivos: 1º porque probablemente será la sección más leída. 2º porque creo que escribiendo unas pobres líneas no podrá quedar reflejada toda mi gratitud, y 3º porque seguro que me olvidaré de alguien, y lo lamentare eternamente.*

*Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que durante estos años han estado a mi lado, compartiendo y disfrutando de esta dura experiencia. Sin vuestro soporte científico, económico y/o personal, esta tesis no habría sido posible.*

*Al profesor Dr. Juan Ignacio Ramos Martínez, por ofrecerme la oportunidad de trabajar con su equipo de investigación, por su asesoramiento científico, apoyándome con todos los medios técnicos y materiales disponibles.*

*Al profesor Dr. Ramiro Barcia Vieitez, por dedicarme su tiempo y atención, por ayudarme en la redacción de esta tesis así como su colaboración en los diseños experimentales, por su buen humor y profesionalidad.*

*... a ambos gracias sobretodo por vuestra amistad y confianza a lo largo de este periodo.*

*Al resto de profesores del departamento (Dres. José Antonio Villamarín, Izaskun Iburguren, José Luis Rodríguez y Conchita Sarandeses), gracias por vuestra apoyo y simpatía.*

*A los demás miembros del departamento, Iria, Ricardo y Lucía, a los que ya no están con nosotros (Ana, Sonia, María José y Javier), creo que no hace falta decir por que... sobran las palabras.*

*No podría olvidarme de citar también, a todas las compañeras de laboratorio que he tenido durante estos años (no han sido pocas; Cristina, María, Esther, Marta, Vanesa, Luz, Raquel, Mónica, Marta, Lucía, Ana, M<sup>a</sup> Jesús, Vanesa, María y Rebeka), por los buenos momentos pasados.*

*En especial dar las gracias a toda mi familia y a mis amigos, los cuales no voy a nombrar porque son demasiados y temo olvidarme de alguno (son más que compañeras he tenido, lo cual ya es difícil); sin vuestro apoyo, este trabajo no sería posible.*

*Al Alsa, porque sus chóferes son geniales; uno de ellos (Neira) siempre me dice algo así: "vente para adelante conmigo, que así llegas antes a Navia". A Ángel (el abogado), te admiro, por las palizas que te pegas todas las semanas. "Llevamos tantos años juntos, que somos como una gran familia".*

*Por último, un agradecimiento un tanto peculiar, dedicado a los compañeros del fútbol, (Bioquímica: Ramiro, Antonio y Ricardo; Facultad de Ciencias; Pepe, Duarte, Marcelino, Colmenero, Cobos, Juan Carlos; Escuela Politécnica Superior: José Ramón, Juan Bosco, Adrián, Oscar, Roberto; Magisterio: Fran Candia, etc.), porque lo hemos pasado de miedo en los partidos organizados durante estos años.*

*Como había predicho al inicio, probablemente me olvidaría de alguien, y ese no podía ser otro que el único e inigualable, Jesús Castro (eres un crack), porque nos enseñas otro tipo de investigación (la cerveza y las mujeres), de fútbol no tienes ni idea, "no te vas de nadie, paquete".*

*Para terminar simplemente, citaré una frase con la que habitualmente se despiden las orquestas Asturianas en las fiestas:*

*"Ser español es un orgullo, pero ser asturiano es un título". "Puxe Asturias".*

...ahí queda eso.

"Nunca consideres el estudio como un deber, sino como una oportunidad para penetrar en el maravilloso mundo del saber".

"Quien nunca ha cometido un error nunca ha probado algo nuevo".

"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad".

"Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas".

**Albert Einstein**

"El único sitio donde el éxito llega antes que el trabajo es en el diccionario"

**Vidal Sassoon**

"Nada grande se ha conseguido sin entusiasmo".

**Emerson**

Las oportunidades no son producto de la casualidad, mas bien son resultado del trabajo.

**Tonatihu**

"Nunca me he encontrado con alguien tan ignorante de quien no pudiese aprender algo".

**Galileo Galilei**

"Teoría es conocimiento que no funciona. Práctica es cuando todo funciona y no sabes el porqué"

**Herman Hesse**

"Los investigadores alimentamos el instinto de saber; somos operarios del patrimonio intelectual de la humanidad".

**José María Martín Senovilla**

"Un experto es una persona que ha cometido todos los errores posibles en un determinado terreno".

**Niels Bohr**

"Investigar es dedicarse a la realidad verdadera".

**Xavier Zubiri**

"Ser consciente de la propia ignorancia es un gran paso hacia el saber".

**Benjamin Disraeli**

*"Lo último que uno sabe, es por donde empezar".*

**Blaise Pascal**

Para empezar un gran proyecto, hace falta valentía. Para terminar un gran proyecto, hace falta perseverancia.

- *Esta Tesis Doctoral ha sido realizada dentro del Proyecto de Investigación PGIDIT05PXIB26102PR (Proteína Quinasa C dependiente de Calcio (cPKC) de manto de Mytilus galloprovincialis Lmk.: Purificación y estudio de su implicación en la transducción de señales) financiado por la Secretaría General de Investigación y Desenvolvemento de la Xunta de Galicia.*

- *Don Martín González Riopedre ha disfrutado de un contrato predoctoral financiado por la Vicerrectoría de Investigación e Innovación junto con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela.*





INDICE

**1. Introducción ..... 1**

1.1. Fosforilación de proteínas ..... 1

    1.1.1 Clasificación de las proteína quinasas ..... 1

    1.1.2. Regulación de proteína quinasas .....5

        1.1.2.1. Regulación de la actividad.....5

1.2. La familia de la PKC.....6

    1.2.1. Clasificación de las PKCs .....8

    1.2.2. Estructura de las PKCs ..... 11

        1.2.2.1. Dominio C1..... 12

        1.2.2.2. Dominio C2..... 16

        1.2.2.3. Interacción entre los dominios C1 y C2.....22

        1.2.2.4. El dominio catalítico y la región V5.....26

1.3. Distribución de la PKC .....27

    1.3.1. Distribución tisular de la PKC .....27

    1.3.2. Distribución subcelular de PKC .....29

1.4. Regulación de la PKC .....30

    1.4.1. Activación de la PKC.....31

        1.4.1.1. Activación de la PKC mediante modificaciones post-traduccionales.....34

        1.4.1.2. Activación de la PKC por los efectos del DAG en la membrana .....36

        1.4.1.3. Activación de la PKC por agonistas.....38

    1.4.2. Translocación de la PKC .....43

    1.4.3. Proteólisis de PKC .....44

    1.4.4. Down-regulation .....45

1.5. Proteínas de anclaje de las PKC .....47

    1.5.1. RICKs.....48

    1.5.2. RACKs.....49

1.6. Sustratos de PKC.....50

    1.6.1. Sustratos de PKC “in vitro” .....50

    1.6.2. Sustratos de PKC “in vivo” .....51

1.7. Inhibidores de PKC .....52

## Índice

1.8. PKC en eucariotas inferiores .....	56
1.8.1. PKC en moluscos .....	56
1.8.2. PKC y PKA en <i>M. galloprovincialis</i> .....	57
1.9. El modelo experimental: <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lmk .....	62
1.10. Inmunidad: sistemas y respuestas inmunitarias .....	66
1.11. Células y tejidos del sistema inmune en invertebrados .....	67
1.12. Poblaciones celulares en hemolinfa de moluscos bivalvos .....	68
1.13. El lipopolisacárido bacteriano (LPS) y las citoquinas en la respuesta inmune .....	70
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>75</b>
<b>3. Material y Métodos .....</b>	<b>77</b>
3.1. Material .....	77
3.1.1. Material biológico .....	77
3.2. Reactivos .....	77
3.3. Equipos y aparatos .....	78
3.4. Tampones .....	79
3.5. Electroforesis y Western Blotting .....	81
3.6. Métodos .....	82
3.6.1. Procedimientos generales .....	82
3.6.2. Extracción de hemolinfa y obtención de hemocitos .....	82
3.6.3. Estabilización de hemocitos de mejillón .....	83
3.6.4. Preparación de ALS .....	83
3.6.5. Preparación del medio de cultivo celular .....	84
3.6.6. Preparación de tampones de extracción de proteínas de Citosol y Membrana .....	85
3.6.7. Preparación de lisados de hemocitos .....	85
3.6.8. Obtención de extractos celulares .....	86
3.6.9. Homogenización del manto de mejillón .....	86
3.6.10. Determinación de la concentración proteica .....	86
3.7. Purificación de cPKC .....	86

3.8. Purificación de nPKC .....	87
3.9. Ensayos de actividad PKC.....	88
3.10. Obtención de anticuerpos .....	89
3.10.1. Inmunización y recolección del suero.....	89
3.11. Electroforesis para proteínas en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).....	89
3.11.1. Composición de los geles .....	90
3.11.2. Preparación de los geles.....	91
3.11.3. Tinción de los geles.....	91
3.11.4. Determinación del peso molecular de las proteínas. <i>Electroforesis</i> .....	92
3.12. Western Blotting.....	93
3.13. Cálculo del peso molecular de las proteínas. <i>Cromatografía en Columna Superdex 200 HR 10/30</i> .....	94
3.14. Método estadístico .....	95
<b>4. Resultados .....</b>	<b>97</b>
4.1. Purificación parcial de PKC.....	97
4.2. Actividad Enzimática .....	98
4.2.1. cPKC .....	98
4.2.2. nPKC.....	98
4.3. Purificación y Caracterización Bioquímica de una PKC dependiente de Ca <sup>2+</sup> .....	99
4.3.1. Purificación de cPKC.....	99
4.4. Purificación y Caracterización Bioquímica de una PKC independiente de Ca <sup>2+</sup> .....	102
4.4.1. Purificación de nPKC .....	102
4.5. Cinética Enzimática.....	106
4.5.1. Determinación de la concentración óptima de Ca <sup>2+</sup> en la actividad de p60.....	106
4.5.2. Determinación de K <sub>m</sub> y V <sub>máx</sub> para la cPKC.....	107
4.5.3. Determinación de K <sub>m</sub> y V <sub>máx</sub> para la nPKC.....	113
4.5.4. Inhibición de la actividad de la cPKC .....	119
4.6. Determinación del grado de especificad de anti p105 y anti p60 .....	124
4.7. Estudio del efecto de diversos inductores en hemocitos de <i>M. galloprovincialis</i> .....	126
4.8. Inmunodetecciones frente a anti p105 de células incubadas con IL-2, LPS y PDGF. ....	133

## **Índice**

4.9. Inmunodetecciones frente a anti p60 de células incubadas con IL-2, LPS y PDGF.....	140
4.10. Fosforilación de p105 y p60.....	144
4.11. Distribución Tisular de <i>p60</i> .....	145
4.12. Estudio de la translocación de p105 y p60 en hemocitos.....	147
<b>5. Discusión.....</b>	<b>153</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>169</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>171</b>
<b>8. Abreviaturas .....</b>	<b>215</b>

# Introducción

The composite image illustrates the biochemical signaling pathway of phospholipase C (PLC) and its role in muscle contraction, specifically in the mussel. It includes the following components:

- Top Left Diagram:** A schematic of the PLC signaling pathway. An external stimulus (Estímulo) binds to a G-protein coupled receptor (Receptor), activating a G-protein (Proteína G). This activates Phospholipase C (PLC), which cleaves a membrane phospholipid into Diacylglycerol (DAG) and Phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PIP<sub>2</sub>). PIP<sub>2</sub> is further hydrolyzed by Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) into Phosphatidate (PA) and Inositol (1,4,5) trisphosphate (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> binds to a calcium channel, causing it to open and release calcium from the sarcoplasmic reticulum (Cisterna de liberación de calcio). The released calcium binds to troponin (Tropomiosina), initiating muscle contraction (Contracción).
- Top Middle Diagram:** A detailed view of the PLC signaling pathway. An Estímulo binds to a Receptor, activating a Proteína G. This activates Phospholipase C, which cleaves a substrate into Diacylglycerol and Fostilidil inositol (4,5) P<sub>2</sub>. Fostilidil inositol (4,5) P<sub>2</sub> is converted to Fostato and Inositol (1,4,5) P<sub>3</sub>. The released Fostato (Ca<sup>2+</sup>) binds to PDK-1, which then phosphorylates the substrate.
- Top Right Image:** A photograph of a mussel with anatomical labels: **Mantlo** (mantle), **Hepatopáncreas** (hepatopancreas), **Branquia** (gills), **Biso** (byssus), **Músculo aductor anterior** (anterior adductor muscle), and **Músculo aductor posterior** (posterior adductor muscle).
- Bottom Left Diagram:** A diagram titled "Señales que causan hidrólisis de lípidos" (Signals that cause lipid hydrolysis). It shows a membrane with PLC and a protein de anclaje (anchoring protein). The PLC is activated by signals such as Fosfolipasa C, DAG, and Ca<sup>2+</sup>. The diagram shows the cleavage of a phospholipid into DAG and IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> binds to a calcium channel, causing it to open and release calcium. The released calcium binds to troponin (Tropomiosina), initiating muscle contraction (Contracción). The diagram also shows the activation of PLC by 1. Quinasa de PIP (PIP kinase) and 2. Acetilcolina (Acetylcholine).
- Bottom Middle Diagram:** A schematic of the PLC protein structure. It is divided into two domains: **DOMINIO REGULADOR** (Regulatory Domain) and **DOMINIO CATALÍTICO** (Catalytic Domain). The regulatory domain contains a Pseudosustrato (Pseudo-substrate) and a Bisagra (Hinge) region. The catalytic domain contains a Bisagra (Hinge) region and a Lugar de unión del sustrato (Substrate binding site). The diagram also shows the location of the Hipotético dominio transmembrana (Hypothetical transmembrane domain).
- Bottom Right Image:** A micrograph showing a cross-section of a mussel muscle fiber, with various organelles and structures visible.



## **1. Introducción**

### **1.1. Fosforilación de proteínas**

El desarrollo de organismos eucariotas multicelulares necesita de la interacción de numerosos procesos de proliferación y diferenciación, que tienen lugar de una forma ordenada. Como requisito para que ocurran dichos eventos, las células deben responder a señales extracelulares mediante un conjunto específico de mecanismos, que regulan o modulan la expresión de genes. Entre la señal y el gen, hay un sistema formado por diferentes componentes celulares y moleculares, cuya misión es la de llevar a cabo y garantizar una específica y correcta transducción de la señal.

Con el fin de que estos componentes celulares ejerzan su función adecuadamente, su participación en la transmisión de la señal va a estar regulada. Entre los mecanismos de regulación que intervienen, la fosforilación de proteínas juega un papel principal. En la transmisión de la señal, los procesos de fosforilación de proteínas son reversibles, y por ello no requieren solamente de la intervención de enzimas fosforilantes. Las proteínas dianas son fosforiladas en sitios específicos por una o más proteína quinasa, y estos grupos fosfato son hidrolizados por proteínas fosfatasa específicas. Por lo tanto el grado de fosforilación de un residuo particular puede ser regulado mediante el cambio de la actividad de la respectiva proteína quinasa, proteína fosfatasa o de ambas (Lisbona, 1995).

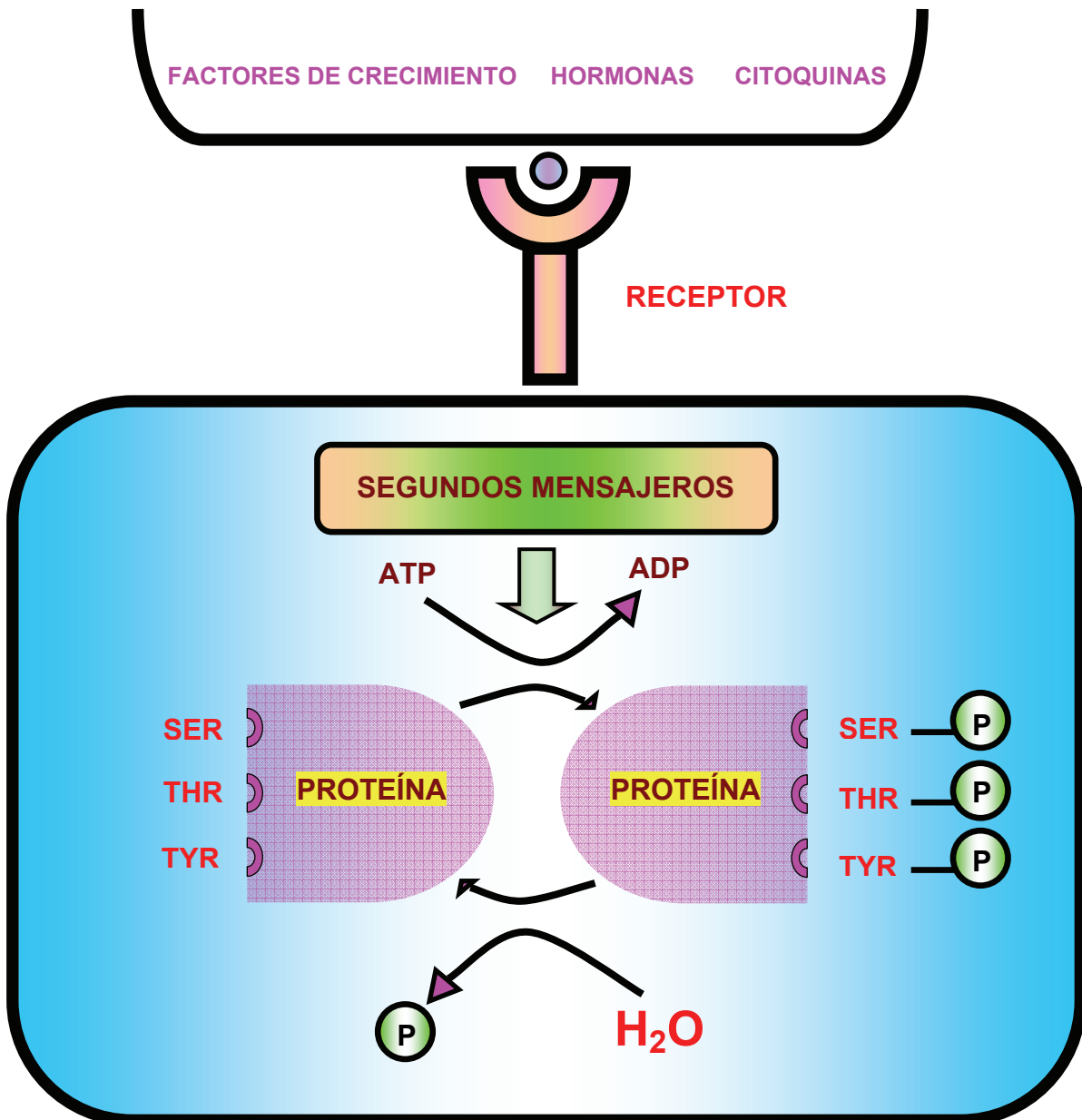
La fosforilación de proteínas es el principal mecanismo en la regulación de la organización del citoesqueleto durante el ciclo y la diferenciación celular. Así, el nivel de fosforilación de cualquier proteína celular en un determinado momento, refleja la actividad relativa de las quinasas y fosfatasas que catalizan esta interconversión (Hanks y Hunter, 1995). El mecanismo general de los procesos de fosforilación en células eucariotas se muestra en la Figura 1.1.

#### **1.1.1 Clasificación de las proteína quinasas**

En células eucariotas, la fosforilación reversible de proteínas es el principal mecanismo de control en la mayoría de los eventos intracelulares (Hunter, 1995). En este proceso de fosforilación reversible están implicadas dos tipos de enzimas: las proteína quinasas y las proteína fosfatasas. (Hunter, 1995). Las primeras catalizan la transferencia de un grupo fosfato desde un nucleósido trifosfato, normalmente adenosina trifosfato (ATP), al grupo hidroxilo de un aminoácido de la

## Introducción

proteína sustrato, generando la formación de un enlace fosfoéster. En sentido contrario, las proteína fosfatasas catalizan la hidrólisis de un enlace fosfoéster en una proteína, liberando el fosfato inorgánico, y por tanto hacen reversibles los efectos de la fosforilación (Cohen, 1989; Vincent *et al.*, 1992; Shenolikar, 1994; Barford, 1996; Fauman y Saper, 1996; Tonks, 2006; Mustelin, 2006).



**Figura 1.1.-** Mecanismo general de los procesos de fosforilación en células eucariotas. La P representa el lugar de unión de los grupos fosfato a las proteínas en los aminoácidos Ser/Thr y/o Tyr. (Adaptado de González, 2000).



En los últimos años, el descifrado de los genomas de varias especies ha permitido identificar el conjunto completo de genes que codifican para proteína quinasas, conocido con el término «quinoma». El quinoma humano, por ejemplo, está constituido por 518 genes (Manning *et al.*, 2002a), la mitad del número que se predijo hace veinte años (Hunter, 1987), pero que aún así constituye aproximadamente el 1,7 % del genoma. Además del quinoma humano se han descifrado los correspondientes a otras especies de mamíferos, invertebrados y eucariotas unicelulares, cuyos genomas también han sido secuenciados. Concretamente, son conocidos los quinomas de ratón (540 genes) (Caenepeel *et al.*, 2004), *Drosophila melanogaster* (239 genes) (Manning *et al.*, 2002b), *Caenorhabditis elegans* (438 genes) (Manning, 2005), erizo de mar (353 genes) (Bradham *et al.*, 2006), *Saccharomyces cerevisiae* (130 genes), (Manning *et al.*, 2002b), *Dictyostelium* (285 genes) (Goldberg *et al.*, 2006) y *Tetrahymena thermophila* (Eisen *et al.*, 2006). En general, el número de genes que codifican proteína quinasas en las diferentes especies estudiadas representa entre el 1,5 y el 2,5 % de su genoma.

El número de proteína quinasas conocidas actualmente es muy elevado. Existen bases de datos que contienen más de 16.000 entradas de secuencias correspondientes a estas enzimas pertenecientes a muchas especies (Niedner *et al.*, 2006). Un buen número de ellas, sin embargo, no han sido purificadas ni caracterizadas bioquímicamente, ni se conocen sus sustratos fisiológicos ni su función. Los criterios de clasificación de los miembros de esta superfamilia de enzimas se han ido modificando con el tiempo (Hunter, 1991).

Las proteína quinasas se han clasificado como proteína quinasas de tirosina (Tyr) o quinasas de serina/treonina (Ser/Thr) aunque existen algunas quinasas dobles (Manning *et al.*, 2002a; Dhanasekaran y Premkumar, 1998; Marshall, 1994; Lindberg *et al.*, 1992).

La gran avalancha de nuevas proteína quinasas identificadas, que tuvo lugar especialmente a partir de 1980, conllevó la necesidad de utilizar nuevos criterios para su clasificación, basados en el grado de homología de determinadas regiones de sus secuencias. A pesar de que entre los miembros de la superfamilia de las proteína quinasas existe una gran diversidad de funciones, formas de regulación y especificidad de sustrato, la comparación de sus secuencias aminoacídicas permitió deducir que todas ellas comparten el denominado «dominio catalítico», una región de aproximadamente 250-300 aminoácidos agrupados en doce subdominios que se pliegan adoptando una estructura terciaria característica (Hanks *et al.*, 1988; Hanks y Quinn, 1991). Dentro de este dominio catalítico se encuentran aminoácidos invariables o muy conservados en todas las proteína quinasas, que están implicados en la unión y correcta orientación de los sustratos, así como en la transferencia del grupo fosfato y del ATP al hidroxilo del aminoácido aceptor en la proteína sustrato.

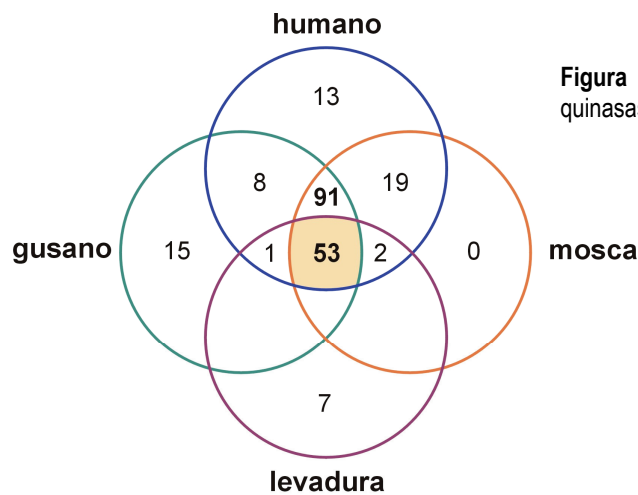
## **Introducción**

En base al alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a los dominios catalíticos, Hunter y colaboradores (1995) establecieron una primera clasificación de la superfamilia de las proteína quinasas en cinco grupos, 44 familias y 51 subfamilias, las cuales contienen enzimas estructuralmente muy relacionadas entre sí. Los miembros de cada una de las subfamilias, generadas por parentescos estructurales, poseen habitualmente propiedades funcionales también muy similares (Hanks y Hunter, 1995).

El descifrado de los quinomas de algunas especies, citadas anteriormente, y la consecuente identificación de nuevas proteína quinasas hasta ese momento desconocidas, conllevó la necesidad de ampliar el número de grupos propuestos inicialmente en la clasificación de Hanks y Hunter. Por ello Manning y colaboradores establecieron una nueva clasificación de las proteína quinasas que constituyen el quinoma humano (Manning et al., 2002a), y también el de otras especies (Manning et al., 2002b; Manning, 2005), basada fundamentalmente en la comparación de las secuencias de los dominios catalíticos, pero teniendo en cuenta también otros parámetros, como la similitud de secuencias en otros dominios distintos al catalítico o la función biológica desempeñada.

De las 518 proteína quinasas codificadas por el genoma humano, 40 corresponden a proteínas que, aunque poseen actividad enzimática proteína quinasa, su secuencia carece de similitud con la secuencia del dominio catalítico típico de las proteína quinasas, y por eso se denominan proteína quinasas atípicas (aPK). La 478 restantes constituyen la superfamilia de las denominadas proteína quinasas eucariotas o típicas (ePK), que se divide, a su vez, en 9 grupos, 120 familias y 179 subfamilias.

La comparación de los quinomas de diferentes organismos, distanciados evolutivamente, y la observación del número de subfamilias compartidas por varias especies permite extraer conclusiones interesantes. Como se muestra en la figura 1.2, existen 53 subfamilias presentes en los quinomas de hombre, gusano, mosca y levadura, lo cual parece lógico teniendo en cuenta que las proteína quinasas regulan una gran variedad de procesos celulares básicos, presentes, por tanto, en todos los organismos. Otras 91 subfamilias son compartidas por hombre, gusano y mosca (metazoos), pero están ausentes en levadura. Entre estas 91 subfamilias se encuentran las pertenecientes al grupo tirosina quinasas (TK) y «tirosin kinases like» (TKL), reguladoras de los procesos de comunicación intercelular más complejos. Otra observación interesante es que el hombre y la mosca comparten bastantes subfamilias de proteína quinasas implicadas en la inmunidad, neurobiología y morfogénesis que están ausentes en el gusano, lo que sugiere que estas funciones surgieron después de la divergencia de los nematodos de la línea principal de los metazoos.



**Figura 1.2.** Distribución de las subfamilias de proteína quinasas entre especies. (Adaptado de Manning, 2005).

### 1.1.2. Regulación de proteína quinasas

Los dominios reguladores de las proteína quinasas difieren significativamente entre ellas, estableciendo diferencias entre los diversos tipos de enzimas. La mayoría poseen segmentos que bloquean su actividad, como pseudosustratos que interactúan con los sitios catalíticos. Estos pueden presentarse como subunidades disociables, es el caso de la proteína dependiente de AMPc (PKA) (Walsh et al., 1968; Krebs, 1993) o como secuencias dentro del mismo péptido como la proteína dependiente de GMPc (PKG) (Vaandrager y de Jonge, 1996). Otras quinasas como la proteína quinasa C (PKC), pueden llegar a presentar tres dominios reguladores (Nishizuka, 1992), asociados a un proceso de translocación que en si mismo es también regulador.

#### 1.1.2.1. Regulación de la actividad

La actividad enzimática de las proteína quinasas está sometida a un estricto control. En general, en las células no cancerosas, las proteína quinasas se encuentran en un estado o conformación inactiva, hasta que en un determinado momento, y de forma transitoria, adquieren una conformación activa, que desencadena, a través de la fosforilación de determinadas proteínas sustrato, una respuesta fisiológica.

## **Introducción**

La activación de las proteína quinasas tiene lugar mediante diversos mecanismos que implican: (i) unión de moléculas efectoras (sustratos o ligandos); (ii) fosforilación por si mismas (autofosforilación) o por otras proteína quinasas; y (iii) interacciones proteína-proteína o interacciones entre dos dominios diferentes de la misma proteína (Johnson et al., 1996; Huse y Kuriyan, 2002; Shi et al., 2006; Gold et al., 2006; Pellicena y Kuriyan, 2006; Taylor y Ghosh, 2006).

### **1.2. La familia de la proteína quinasa C**

La célula eucariota es una entidad altamente organizada que es capaz de responder a los cambios extracelulares e intracelulares de forma muy controlada. Los mecanismos por los que la célula responde a estímulos extracelulares implican inicialmente la transducción de señales a través de la membrana celular. Esta transducción está mediada generalmente por la producción de sustancias bioactivas (segundos mensajeros o mensajeros intracelulares) y por la capacidad de éstas para inducir cambios conformacionales en proteínas reguladoras (Figura 1.3). Muchas de esas proteínas se han identificado como enzimas activadas por mecanismos alostéricos y covalentes. La PKC es una de estas enzimas. Ésta ejerce su acción fosforilando sustratos específicos, una de las formas más extendidas en las células eucariotas para provocar la modificación química de proteínas de forma covalente (Hunter, 1998; Schenk y Snaar-Jagalska, 1999; Hunter., 1995). Existen numerosas referencias en la bibliografía otorgando a esta proteína un papel central en la transducción de señales en la célula. Así, se ha implicado a la PKC en la regulación del crecimiento y diferenciación celular (Parmentier et al., 2003; Carter y Kane, 2004), desarrollo neural, transmisión sináptica, regeneración axonal, contracción y relajación del músculo liso, secreción endocrina y exocrina, desarrollo de tumores, apoptosis y envejecimiento (Griner y Kazanietz, 2007; Martelli, et al., 2006; Liu et al., 2006; Petit et al., 2005; Won et al., 2005; Nagai-Tamai et al., 2002; Coghlan et al., 2000; Dempsey et al., 2000; Musashi et al., 2000; Liu y Heckman, 1998, Mellor y Parker, 1998; Parker y Dekker, 1997; Sontag et al., 1997; Marks y Gschwendt 1997; Newton, 1997; Casabona, 1997; Liu, 1996; Quest., 1996; Newton, 1996; Blobe et al., 1996; Newton, 1995; Nishizuka, 1995; Hug y Sarre, 1993; Hung et al., 1993). Sin embargo, aún no se conocen completamente los mecanismos de regulación de la PKC y tampoco el papel biológico de muchos de sus sustratos.

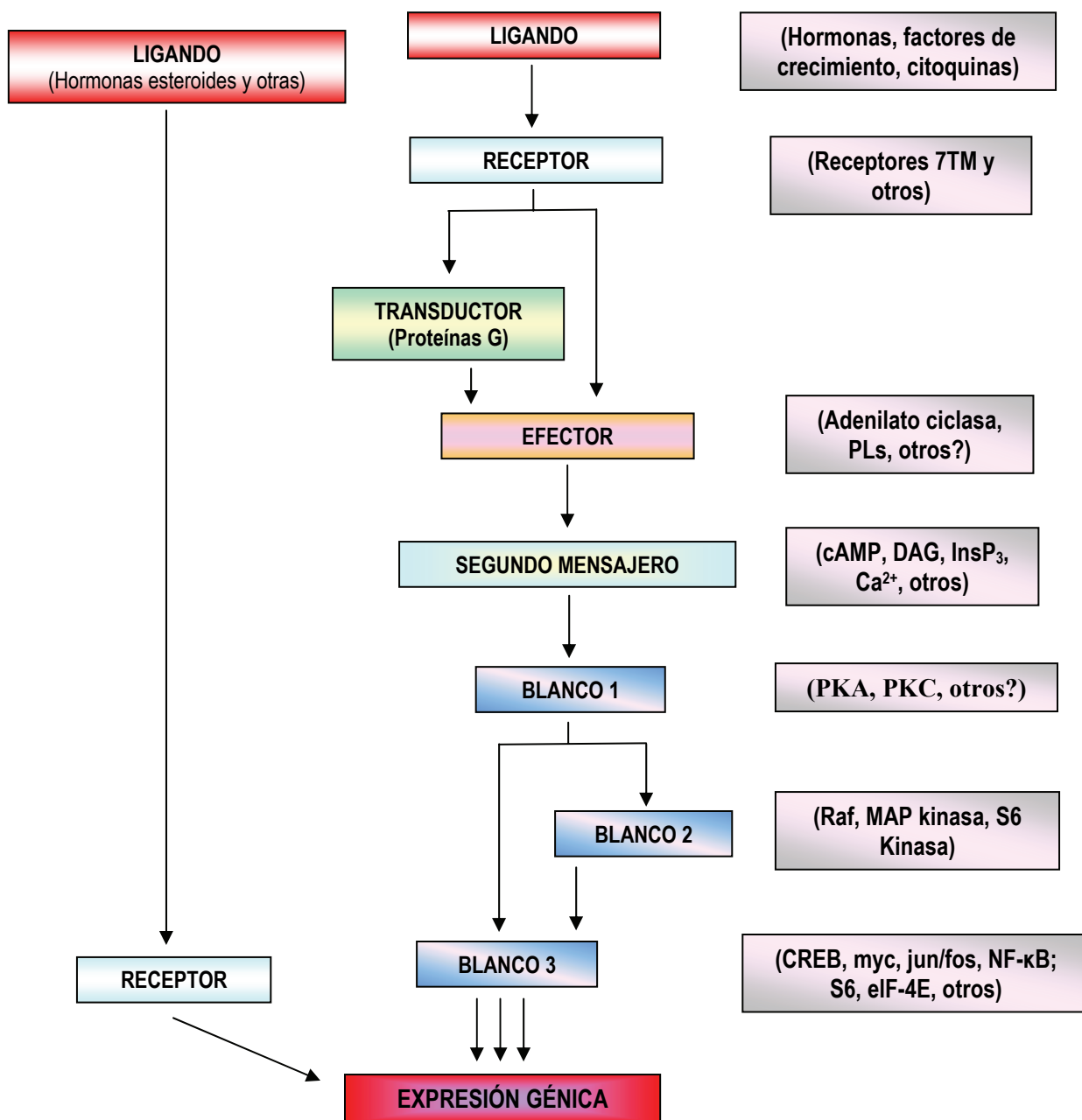


Figura 1.3. Esquema general del mecanismo de transducción de señales. (Adaptado de Hug y Sarre, 1993).

La PKC fue identificada en 1977 y caracterizada inicialmente como una quinasa que se activaba por mecanismos proteolíticos (fue bautizada como *proteína quinasa M*) (Takai et al., 1977) y desde entonces ha suscitado un elevado interés, generándose gran cantidad de información que aparece recogida en numerosas revisiones (Griner y Kazanietz, 2007; Corbalán-García y Gómez-

## **Introducción**

Fernández, 2006; Li y Gobe, 2006; Martelli, et al., 2006; Liu et al., 2006; Becker y Hannun, 2005; Liu y Heckman, 1998; Mellor y Parker, 1998; Casabona, 1997; Newton, 1997; Parker y Dekker, 1997; Marks y Gschwendt, 1997; Newton, 1996; Blobbe et al., 1996; Liu, 1996; Quest., 1996; Newton, 1995; Hug y Sarre, 1993).

Se pensaba que la PKC residía en el citoplasma en una conformación inactiva y que se translocaba a la membrana plasmática o a los orgánulos citoplasmáticos debido a la activación celular por diferentes estímulos. Sin embargo, las evidencias recogidas durante los últimos 20 años han mostrado que la PKC es capaz de translocarse al núcleo. Por otro lado, también existen isoformas de PKC que residen dentro del núcleo. Varios estudios han permitido identificar algunas proteínas nucleares (las cuales son sustratos de PKC) y la caracterización de proteínas de unión a la PKC nuclear, las cuales pueden ser cruciales en la precisa sintonía de la función de la PKC en condiciones micro-celulares (Martelli et al., 2006).

En los 30 años de investigación en el quimoma humano, más de 400 enfermedades humanas se han ligado a aberraciones de quinasas, las cuales intervienen en las rutas de señalización (Manning et al., 2002a;b). La modulación de la actividad quinasa de las proteínas ha sido un objetivo prometedor para el descubrimiento de fármacos, pero se desconoce el efecto de muchos inhibidores de quinasas debido a la alta similitud entre las familias de quinasas lo que ha limitado en gran parte el uso clínico de estas moléculas (Kheifets y Mochly-Rosen, 2007).

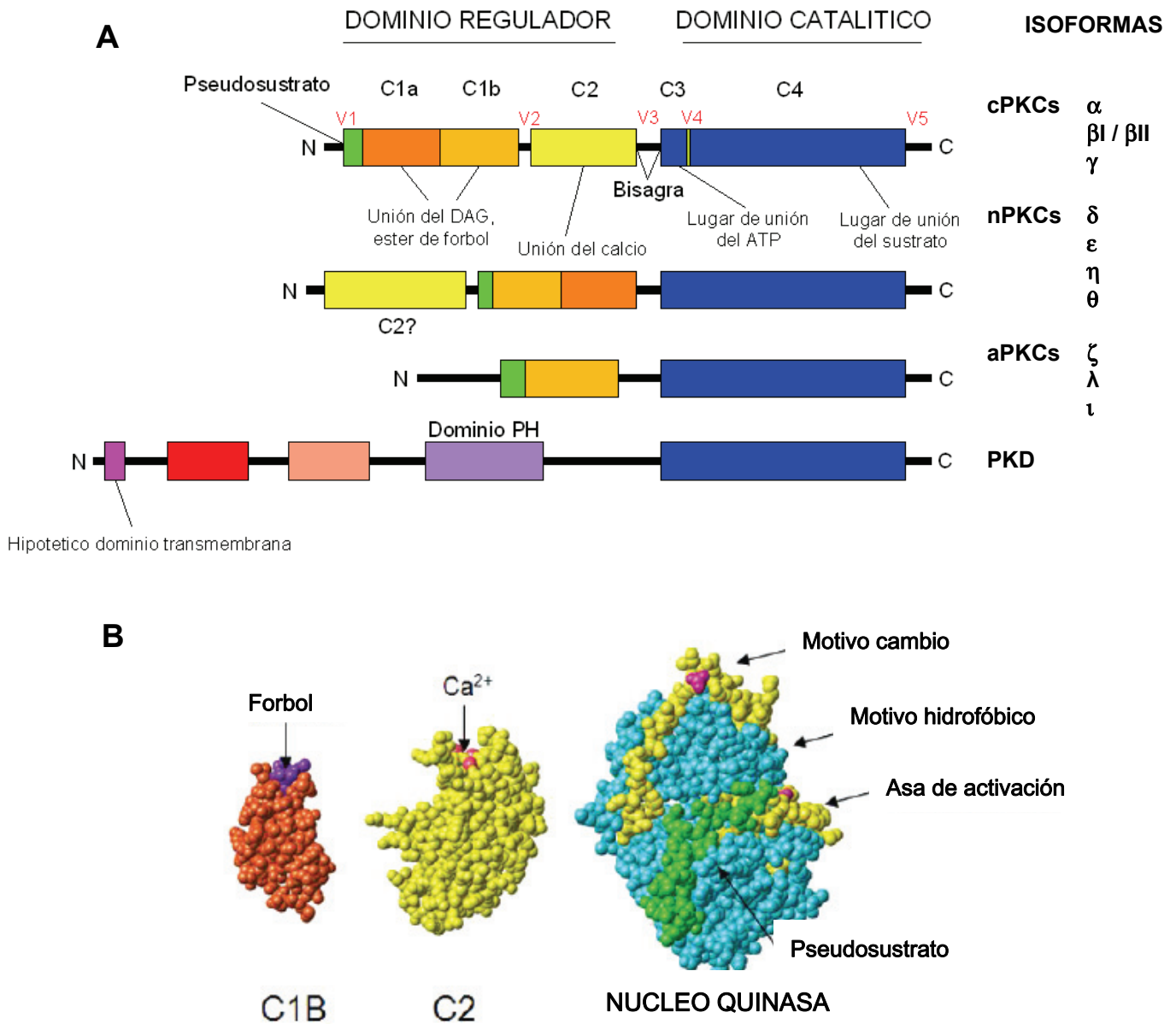
### **1.2.1. Clasificación de las PKCs**

La PKC es una familia de serina/treonina quinasas (Goekjian y Jirousek, 2001), de las que se han identificado hasta la fecha 11 componentes, que difieren en su distribución y nivel de expresión en distintos tejidos, su diferente interacción con lípidos y proteínas, y su distribución intracelular (Liu y Heckman, 1998; Newton, 1995). Estas 11 isoformas se clasifican en tres grupos atendiendo a su estructura y a sus requerimientos alostéricos (Ohno y Nishizuka, 2002; Newton, 2001; Mellor y Parker, 1998; Liu y Heckman, 1998; Newton, 1995) (Figura 1.4). El primer grupo está formado por las **PKCs convencionales** (cPKC:  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\gamma$ ) que dependen de calcio y son activadas por fosfolípidos, diacilglicerol (DAG) y ésteres de forbol. El segundo grupo, o **PKCs nuevas** (nPKC:  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ), se activan por DAG y ésteres de forbol pero son insensibles al calcio. El tercer grupo, o **PKCs atípicas** (aPKC:  $\zeta$ ,  $\lambda$ (I) y  $\mu$ ), también son insensibles al calcio y no responden a DAG o ésteres de forbol como el PMA. Son dependientes de fosfatidilserina (PS) y estas

isoenzimas tan solo tienen una secuencia rica en cisteína en la región C1 (Hirai y Chida, 2003; Newton, 2003; Suzuki et al., 2003; Nishizuka, 2001; Goekjian y Jirousek, 2001; Moscat y Díaz-Meco, 2000; Coghlan et al., 2000; Liu y Heckman, 1998; Newton, 1995; Nishizuka, 1992). La PKC  $\iota$  y la PKC  $\lambda$  fueron identificadas independientemente en humanos y ratones respectivamente, pero presentan una alta homología y actualmente son consideradas la misma proteína (Liu y Heckman, 1998; Newton, 1995; Akimoto et al., 1994). La PKC  $\mu$  es una PKC de alto peso molecular que posee ciertas características diferenciales del resto, como por ejemplo un hipotético dominio transmembrana, que hace difícil encuadrarla en cualquiera de las categorías anteriores (Liu y Heckman, 1998; Newton, 1995; Johannes et al., 1994; Rozengurt et al., 1995).

En el ratón se ha descrito una proteína quinasa D (PKD) que presenta un alto grado de identidad con la PKC  $\mu$  pudiendo ser considerada la misma isoforma (Liu y Heckman, 1998; Newton, 1995; Rozengurt et al., 1995; Valverde et al., 1994).

## Introducción



**Figura 1.4. A. Estructura de las proteína quinasa C.** (Adaptado de Newton, 1995).

**B. La familia de la proteína quinasa C.** Composición del dominio de isoenzimas de proteína quinasa C convencionales (dependientes de diacilglicerol y calcio), nuevas (dependientes de diacilglicerol e independientes de calcio) y atípicas (independientes de diacilglicerol y calcio). La dependencia de diacilglicerol y calcio es conferida por la presencia de los dominios funcionales C1 (naranja) y C2 (amarillo), respectivamente, en el extremo regulador amino-terminal. Los dominios C2 nuevas y C1 atípicas están definidos por una sola homología, y no unen calcio o diacilglicerol. Todas las isoenzimas de la proteína quinasa C contienen un pseudosustrato inhibitor (verde) el cual se une en la cavidad de unión del sustrato en el extremo carboxi-terminal del núcleo quinasa (azul). Adaptado de Violin y Newton (2003).



### **1.2.2. Estructura de las PKCs**

Todas las PKC, tienen en común la presencia en su estructura de dos regiones muy diferenciadas: un **dominio catalítico**, en el extremo C-terminal con actividad quinasa, y un **dominio regulador** N-terminal (Figura 1.4.A). Ambas regiones presentan segmentos altamente conservados (segmentos C) y regiones variables (segmentos V). La región variable V3 situada entre los dos dominios descritos se denomina *región bisagra* y parece ser la zona de la cadena responsable del cambio conformacional que acontece tras la activación (Newton, 1995; Kishimoto et al., 1989). La ruptura en la región V3 tiene como resultado la liberación de un dominio catalítico constitutivamente activo, sugiriendo esto que la mayoría o posiblemente todas las interacciones intra-moleculares inhibitorias ocurren entre el dominio regulador y el dominio catalítico. En PKC  $\delta$ , la ruptura proteolítica de esta región es regulada principalmente por fosforilación (Steinberg, 2004). Aunque la región V3 es más conocida por estos sitios proteolíticos, se ha reconocido su importancia en las interacciones proteína-proteína. La región V3 está implicada en la presentación de PKC  $\alpha$  y  $\epsilon$  en contactos célula-célula (Quittau-Prevostel et al., 2004), en la unión de PKC  $\alpha$  a la  $\beta$ 1-integrina (Parsons et al., 2002) y potencialmente en la presentación de PKC  $\epsilon$  para la destrucción ubiquitina-dependiente (Rechsteiner y Rogers, 1996). Esta región es sensible a rotura proteolítica por tripsina o por proteasas neutras dependientes de calcio, calpaina I y II, originándose una quinasa constitutivamente activa (Schaap y Parker, 1990).

El **dominio catalítico** se extiende desde la región C3 hasta la V5 y es muy similar a dominios catalíticos de otras serina/treonina quinasas.

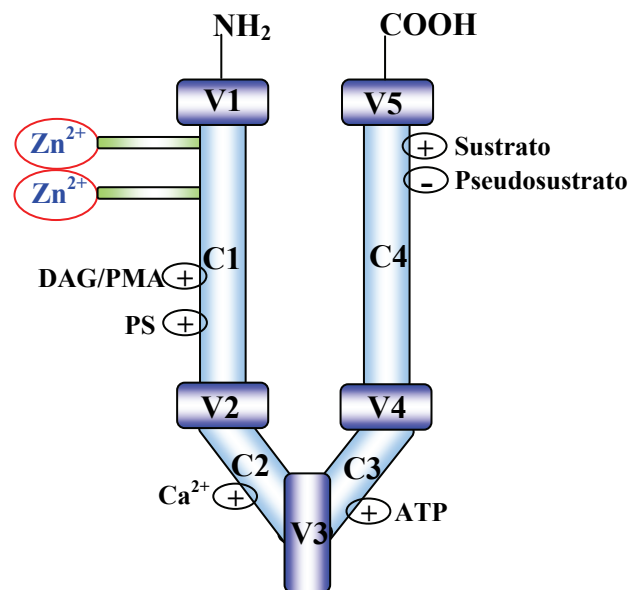
Este dominio contiene secuencias consenso para la unión de ATP (región C3), la región de transferencia del fosfato y el sitio de unión del sustrato (región C4) (Hanks et al., 1988; Azzi et al., 1992; Hug y Sarre, 1993; Newton, 1995; Ron y Kazanietz, 1999) (Figura 1.4.A). El grado de homología en la secuencia de aminoácidos de la región quinasa para todas las PKCs es de al menos el 50%, con la excepción de la PKC  $\mu$  con un grado de homología menor (Newton, 1995; Parker y Dekker, 1997; Valverde et al., 1994).

El **dominio regulador** contiene varias regiones que permiten la interacción de la proteína con lípidos y los cofactores necesarios para su activación (Nishizuka, 1992; Burns y Bell, 1991; Kheifets y Mochly-Rosen, 2007). La región V1 contiene una secuencia considerada como un pseudosustrato que es muy similar a secuencias de fosforilación para PKCs, excepto porque el residuo diana de serina/treonina está sustituido por un aminoácido no fosforilable, generalmente alanina (Hug y Sarre, 1993; House y Kemp, 1990).

## Introducción

### 1.2.2.1. Dominio C1

En la **región C1** (*segmento C1*, Figura 1.5) de las cPKCs y nPKCs se encuentran dos dominios ricos en cisteína implicados en la unión de DAG, el activador fisiológico de las PKCs, y los ésteres de forbol, como el TPA o el forbol dibutirato (PDBu) (Liu y Heckman, 1998; Newton, 1995). Esta región C1 aparece duplicada en la mayoría de las isoenzimas (Klevit, 1991). Figura 1.4.A.



**Figura 1.5.** Esquema de la estructura molecular de PKC. C1-C4: dominios conservados; V1-V5: dominios variables. (Original tomado de Kanashiro y Khalil, 1998).

Los dominios C1 son pequeñas unidades estructurales de aproximadamente 50 aminoácidos. El dominio C1 en las familias de PKC clásicas y nuevas, consiste en dos tandems repetidos C<sub>1A</sub> y C<sub>1B</sub> de dedos de zinc ricos en cisteína (Li y Gobe, 2006); el correcto plegamiento y la función de la PKC dependen de estos iones de zinc (Fukuda et al., 1999), lo que proporciona una estequiometría de cuatro átomos de Zn<sup>2+</sup> por molécula de PKC (Quest et al., 1992; Ono et al., 1989; Ahmed et al., 1991; Burns y Bell, 1991). Originalmente fueron descubiertos como módulos de unión a lípidos en la PKC (Colón-González y Kazanietz, 2006).

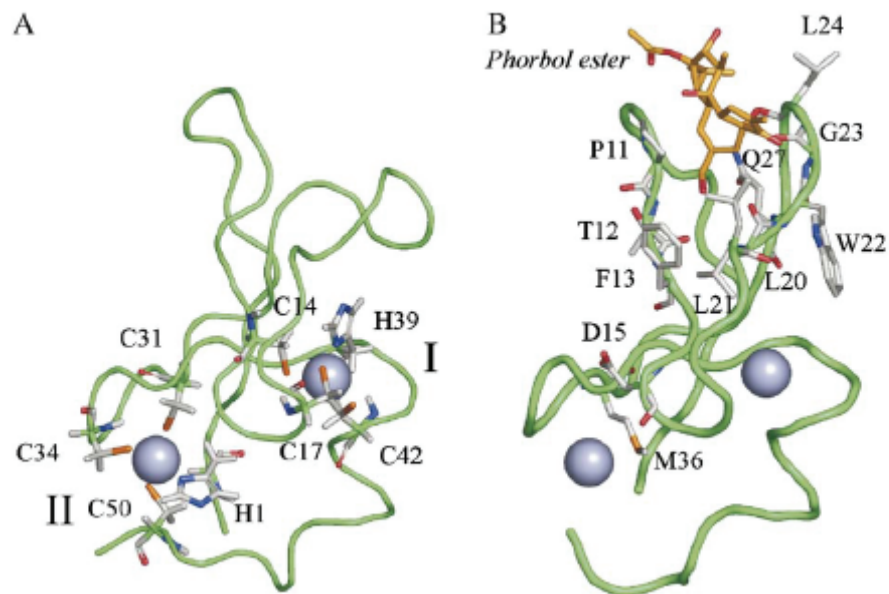
Cada dominio C1 tiene un patrón conservado de residuos de Cys e His, que forman el sitio de coordinación para los dos iones de zinc (HisX<sub>12</sub>CysX<sub>2</sub>CysX<sub>13/14</sub>CysX<sub>2</sub>CysX<sub>4</sub>HisX<sub>2</sub>CysX<sub>7</sub>Cys, donde la X es cualquier otro aminoácido) y forman el sitio de unión del ligando simple para el diacilglicerol o los ésteres de forbol (Ono et al., 1989; Ahmed et al., 1991; Burns y Bell, 1991). Los dos metales propuestos previamente, basándose en la secuencia primaria y en estudios bioquímicos (Ono et al., 1989; Ahmed et al., 1991; Hubbard et al., 1991; Quest et al., 1992), fueron localizados en una terminación

de la lámina que une  $Zn^{2+}$  en una geometría tetraédrica (Figura 1.6.A). Los residuos implicados en la coordinación del zinc fueron la Cys14, Cys17, His39 y Cys42 para el sitio I; e His1, Cys31, Cys34 y Cys50 para el sitio II. Los dos residuos de His fueron localizados en cavidades hidrofóbicas formadas por residuos Leu 21, Tyr 22 y Val 43 para el sitio I, y Phe 3, Met 36 y Val 46 para el sitio II (Hommel et al., 1994).

También se ha visto que los ésteres de forbol se unen entre los residuos Met 9-Thr 12 y Leu 21-Leu 24, que comprende a la mayoría de las láminas  $\beta 2$  y  $\beta 3$  (Figura 1.6.B) (Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006).

La familia de  $\alpha$ PKCs pierde una de las dos regiones de dedos de zinc ricas en cisteína de forma que no pueden unir ésteres de forbol. Los sitios de unión putativos de los activadores lipídicos no han sido identificados definitivamente (Becker y Hannun, 2005; Musashi et al., 2000; Dempsey et al., 2000; Nishizuka, 1995). Aunque ambos C1 repetidos se orientan para interactuar potencialmente con la membrana y pueden unir DAG y éster de forbol, generalmente, sólo uno de estos subdominios C1 se une al DAG (Giorgione et al., 2003). Estos subdominios difieren entre las isoenzimas en su afinidad de unión por el DAG y los ésteres de forbol. Por ejemplo, PKC  $\alpha$  y  $\delta$  unen DAG con una mayor afinidad en el subdominio C1A y ésteres de forbol en el subdominio C1B (Stahelin et al., 2004), mientras que PKC  $\gamma$  une DAG y ésteres de forbol por igual en ambos subdominios. Además, el dominio de PKC  $\gamma$  permite una mayor sensibilidad de la PKC  $\gamma$  ante incrementos de DAG (Ananthanarayanan et al., 2003).

## Introducción

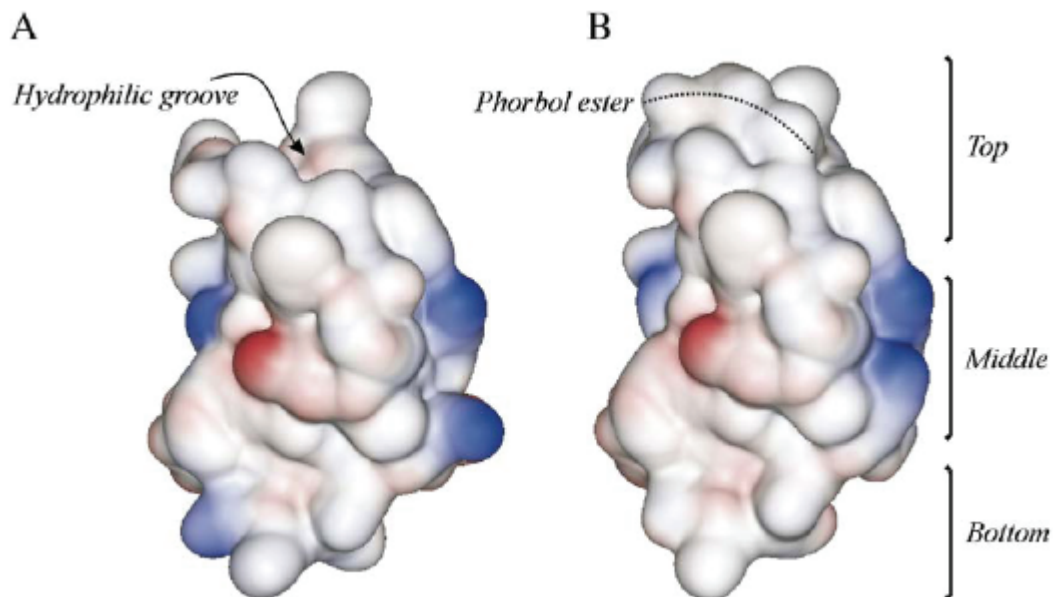


**Figura 1.6.** Estructura global de los dominios C1B de PKC  $\gamma$  y PKC  $\delta$ . (A) Estructura global del dominio C1B de PKC  $\gamma$ . Los átomos de Zinc se representan por grandes bolas púrpuras y los residuos implicados en la coordinación de estos dos iones de Zinc están representados por modelos de sticks con los carbonos en gris, nitrógeno en azul y sulfuro en amarillo. (B) Estructura global del dominio C1B de PKC  $\delta$  con el complejo de forbol 13-acetato. El éster de forbol se representa por un modelo de sticks con los carbonos en amarillo y oxígenos en rojo. Las cadenas laterales de los aminoácidos implicados en la unión de ésteres de forbol se muestran con sticks con los carbonos en gris, nitrógeno en azul y oxígeno en rojo. El número de residuos, comienza con His1, independiente de la posición que ésta ocupe en la enzima completa. D15 y M36 no están implicados en el sitio de unión del éster de forbol, sin embargo se representan en el modelo para facilitar la discusión. (Original tomado de Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006).

De forma semejante, en la familia de PKCs nuevas, los dominios C1 repetidos en PKC  $\epsilon$  son mucho menos restringidos conformacionalmente en comparación con el dominio C1 de PKC  $\delta$ , permitiendo así una mayor sensibilidad a DAG para PKC  $\epsilon$  (Stahelin et al., 2005). De esta manera, isoenzimas de PKC de la misma familia pueden ser activadas de manera preferencial basándose en la amplitud de la señal generada sobre la activación celular. Sin embargo, no todos los ligandos del dominio C1 están activados: resveratrol, una fitoalexina polifenólica encontrada en el vino tinto, y un compuesto anti-tumoral, el AD 198 compiten con los ésteres de forbol por el sitio de unión en C1B, pero, aunque estos causan la asociación de PKC a las membranas, no provocan la activación de la enzima (Roaten et al., 2002). Además de la unión de DAG, el dominio C1 también se ha visto implicado en concentraciones de PKC en diversos sitios subcelulares, así como en interacciones de lípidos y proteínas. PKC  $\alpha$  puede ser activada por alcoholes y anestésicos, los cuales se unen en regiones espacialmente distintas en el dominio C1 para el DAG (Slater et al., 2004). Se ha

determinado que el dominio C1B puede ser importante para la unión subcelular de PKC al Golgi (Schultz et al., 2003), posiblemente por la unión del ácido araquidónico (Kashiwagi et al., 2002).

Además, la zona superior del dominio C1 está compuesto casi por completo de residuos hidrofóbicos, mientras que la zona intermedia está compuesta de cadenas laterales cargadas positivamente (Figura 1.7.A). En ausencia de los ésteres de forbol la cavidad hidrofílica contiene moléculas de agua. Cuando los ésteres de forbol están presentes, estos se insertan en la cavidad, desplazan las moléculas de agua y forman interacciones de hidrógeno con los oxígenos de las cisteínas, de esta forma el activador forma una tapa hidrófoba sobre los grupos polares de las cadenas principales localizados dentro de la cavidad (Fig. 1.7. A y B) (Zhang et al., 1995).



**Figura 1.7.** Dibujo de la superficie molecular del dominio C1B de PKC  $\delta$  en ausencia (A) o presencia (B) del éster de forbol. Las regiones cargadas positiva y negativamente se muestran en azul y rojo, respectivamente, mientras que la superficie hidrofóbica se representa en gris (Tognon et al., 1998). El área ocupada por el éster de forbol ha sido marcada con una línea de puntos para facilitar la interpretación de la figura. (Original tomado de Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006).

Por otro lado, el dominio C1 de PKC  $\epsilon$  contiene un único motivo entre las dos repeticiones ricas en cisteínas, que debido a la activación de PKC  $\epsilon$  une la actina específicamente en los sitios de adhesión de la célula (Prekeris et al., 1996). Este motivo no está disponible para interacciones proteína–proteína cuando PKC  $\epsilon$  esta inactiva, indicando que esos cambios conformacionales ocurren dentro del dominio C1 después de la activación de la PKC. Se observó que la misma región también era crucial para la inducción neural (Ling et al., 2005) y el transbordo de PKCs atípicas del

## **Introducción**

citoplasma al núcleo, las cuales contienen dos secuencias, una secuencia de localización nuclear (NLS) y otra secuencia de exportación nuclear (NES) en el N-terminal y en la parte C-terminal de la región C1 (Perander et al., 2001). Todos estos datos indican la importancia del dominio C1 no sólo uniéndose y respondiendo a la generación del segundo mensajero, sino también en uniones subcelulares de isoenzimas específicas de PKC y en las respuestas de activación.

Además, también se han descrito muchas interacciones proteína-proteína entre la PKC y otras proteínas. Estas incluyen interacciones con adaptadores de proteínas, sustratos y los elementos del citoesqueleto. La regulación de las interacciones entre PKC, pequeñas moléculas y otras proteínas es esencial para que ocurra la transducción de la señal. Por otro lado, se han identificado en PKC varias interacciones auto-inhedoras (Kheifets y Mochly-Rosen, 2007).

A pesar de que la PKC  $\mu$  presenta un dominio catalítico equivalente y dos regiones de cisteína en su dominio regulador, esta isoforma posee características estructurales muy diferentes del resto de PKCs. Entre las características diferenciales más destacables se encuentran: el espacio inusualmente largo entre los dominios de cisteína (74 aa) y su escasa capacidad para unir ésteres de forbol, la presencia de un dominio PH y un hipotético dominio transmembrana en su estructura y, finalmente, la pérdida de la región que actúa como pseudosustrato, lo que podría explicar la actividad quinasa constitutiva que aparentemente presenta en estudios realizados "in vitro". Esta isoforma es dependiente de fosfolípidos e independiente de calcio (Johannes et al., 1994; Johannes et al., 1995).

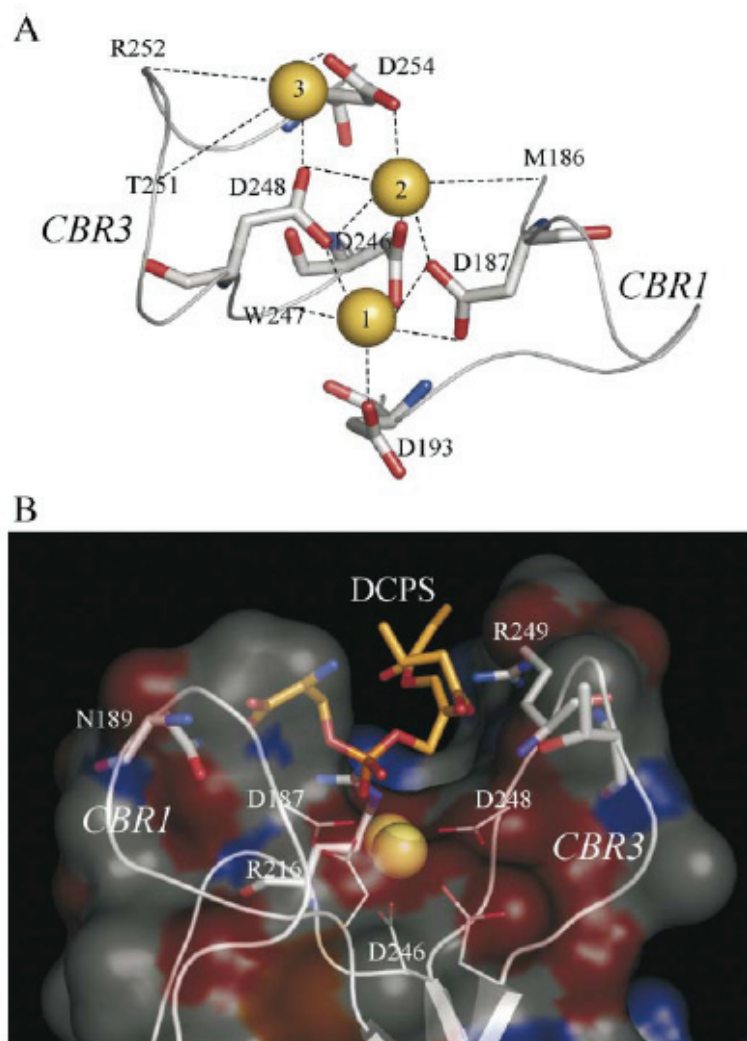
### **1.2.2.2. Dominio C2**

Este dominio (*segmento C2, Figura 1.4*) está presente sólo en las cPKCs y parece ser responsable de la unión con el calcio, un ion necesario para la activación de estas isoformas. Una región similar a C2 ha sido identificada en las nPKCs, pero perdiendo aminoácidos que se supone son esenciales para la unión de cationes divalentes. Esta secuencia (*segmento C2, Figura 1.4*) está presente en el segmento amino terminal de la extensa región V1 de las nPKCs (Newton, 1995; Sossin y Schwartz, 1993). Otros autores indican que además de la región C2, los dominios ricos en cisteína también son importantes para la interacción con lípidos dependiente de cationes (Luo y Weinstein, 1993; Luo et al., 1993). Las aPKCs difieren del resto en que contienen un único dominio rico en cisteína en el dominio regulador y, por tanto, no se activan por DAG o ésteres de forbol (Tapia-García, 2000).

La unión de dos o tres iones de calcio en el dominio C2 de PKCs clásicas induce cambios electrostáticos y conformacionales, además de permitir la unión de fosfatidilserina y la inclusión del dominio en la membrana (Medkova y Cho, 1998). Las isoenzimas clásicas de PKC difieren en las afinidades de unión del calcio, cooperatividad y estequiometría de unión. Por lo tanto, de manera semejante a las diferencias observadas en las respuestas a DAG por los dominios C1 de cada isoenzima de PKC, los dominios C2 de isoenzimas de PKC clásicas son regulados diferencialmente por la cantidad de calcio celular liberado en respuesta a un estímulo de la célula (Kohout et al., 2002). Los dominios C2 de las isoenzimas de PKC nuevas presentan una identidad de la secuencia con los dominios C2 clásicos muy baja (~ 15%) y no tienen un sitio de unión al calcio (Sossin y Schwartz, 1993), haciendo el dominio C2 de isoenzimas de PKC nuevas insensible al calcio. No obstante, ambas isoenzimas clásicas y nuevas tienen el mismo pliegue proteico que consiste en un motivo en guarda griega sencillo y compacto, organizado como un sándwich- $\beta$  formado por ocho hebras anti-paralelas (Pappa et al., 1998). El dominio C2 de isoenzimas de PKC nuevas es regulado por fosforilación, lo que aumenta la afinidad del dominio por las membranas, posiblemente, para sustituir el requerimiento de calcio (Pepio y Sossin, 2001). El dominio C2 se une a la membrana con su  $\beta$ -hoja paralela a la superficie de la membrana (Kohout et al., 2003), y en el caso de la PKC  $\alpha$  sitúa el grupo rico en lisina para unir fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PtdIns<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub>) (Corbalán-García et al., 2003). El ácido retinoico se une a ambos sitios de unión de lípidos del dominio C2: al sitio de unión mediado por el calcio, así como al grupo rico en lisina (Ochoa et al., 2003), por lo tanto, el dominio C2 de PKC  $\alpha$  es regulado por lo menos por dos clases de moléculas de señalización celular, el calcio y los lípidos (Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006).

La producción diferencial de estas moléculas de señalización probablemente regule la activación de diferentes isoenzimas de PKC (Oancea y Meyer, 1998).

## Introducción



**Figura 1.8.** Región de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfatidilserina al dominio C2 de la PKC  $\alpha$ .

- (A) Esquema de coordinación de los iones de calcio en la estructura determinada para la PKC  $\alpha$  en complejo con el  $\text{Ca}^{2+}$  y el 1,2-sn-dicaproyl-fosfatidilserina (DCPS). Las líneas de puntos representan la coordinación establecida entre diferentes grupos carboxilatos y oxígenos, con Ca1, Ca2 y Ca3. La parte superior de la molécula está de cara al lector.
- (B) Vista lateral del modelo en superficie de la región de unión del calcio, los residuos de Asp implicados en la coordinación de  $\text{Ca}^{2+}$  se han representado como modelos de finos sticks con los carbonos en gris, y oxígenos en rojo. Los iones de Calcio se representan como bolas amarillas. Los residuos del dominio C2 directamente implicados en la unión de fosfatidilserina se han representado como modelos de finos sticks y los carbonos han sido representados en gris, nitrógeno en azul y oxígeno en rojo. Adicionalmente, DCPS es representado como un modelo de stick y los carbonos han sido coloreados en amarillo. Se aprecia como los residuos de coordinación del  $\text{Ca}^{2+}$  ocupan el fondo de la hendidura formada por CBR1, 2 y 3. La molécula de DCPS es localizada en la parte superior de esta área contribuyendo a coordinar el Ca1 a través de este grupo fosfato y actúan como tapón de agarre para los residuos del dominio C2 que directamente interactúan con este (N189, R216, R249 y T251). Esta estructura explica la cooperación observada experimentalmente entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y la fosfatidilserina unidos al dominio C2 activando las PKCs convencionales. (Original tomado de Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006).



La unión de varios iones de  $\text{Ca}^{2+}$  al dominio C2 es posible debido al agrupamiento de cinco residuos de Asp altamente conservados de las regiones de unión de calcio CBR1 y CBR3 (Sutton et al., 1995; Shao et al., 1996; Verdaguer et al., 1999; Sutton et al., 1995; Verdaguer et al., 1999). Tres de los residuos de Asp (187, 246 y 248 en la PKC  $\alpha$ ) están coordinados simultáneamente con iones de calcio en los sitios Ca1 y Ca2 (Fig 1.8.A). El residuo de Asp 246 situado en el eje pseudo-axial en PKC  $\alpha$  aporta un oxígeno del carboxilato a cada  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que otros dos residuos de Asp (187 y 248) en PKC  $\alpha$  están relacionados con el otro  $\text{Ca}^{2+}$  por un eje *pseudo-dyad* y muestran interacciones bidentadas con el  $\text{Ca}^{2+}$  en los sitios Ca1 y Ca2, respectivamente (Fig 1.8.A). Cada uno de estos dos residuos de Asp participa en otra unión coordinada con Ca1 (Asp 248) y con Ca2 (Asp 187). Los dos residuos restantes de Asp conservados contribuyen con un oxígeno ligando la coordinación del  $\text{Ca}^{2+}$  en los sitios Ca1 (Asp 193) y Ca2 (Asp 254). Los átomos de oxígeno de la cadena principal de los dos residuos (Met 186 y Trp 247 en la PKC  $\alpha$ ) participan en la coordinación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los sitios Ca2 y Ca1 respectivamente. Para el  $\text{Ca}^{2+}$  del sitio Ca3, los ligandos de la proteína también incluyen átomos de oxígeno de una cadena lateral y una cadena principal de los dos residuos CBR3: Thr 251 y Arg 252 (PKC  $\alpha$ ) (Fig 1.8.A) (Sutton y Sprang, 1998; Ochoa et al., 2002; Verdaguer et al., 1999).

Se han sugerido varios modelos que explican la interacción del dominio C2 de las cPKCs con las membranas, incluyendo aquellos que consideran que el lugar de unión de lípidos no está próximo a la región de unión del  $\text{Ca}^{2+}$ .

Una pieza importante para solucionar este puzzle se obtuvo cuando fue determinada la estructura 3-D de los dominios C2 de PKC  $\alpha$  en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y de una molécula de 1,2-dicaproyl-sn-fosfatidil-L-serina (Verdaguer et al., 1999). Se ha encontrado que uno de los átomos de oxígeno del grupo fosforilo se coordina directamente con el Ca1, mientras que el grupo seril interactúa específicamente con la cadena principal y la cadena lateral de átomos de nitrógeno de Asn 189. Adicionalmente, tres residuos más (Arg 216, Arg 249 y Thr 251) establecen uniones directas de hidrógeno e interacciones hifrofóbicas con los oxígenos sn-carbonil y las cadenas acílicas de los fosfolípidos, respectivamente (Fig 1.8.B). Estas afirmaciones sugieren un nuevo modelo para la interacción del dominio C2 con el  $\text{Ca}^{2+}$  y la fosfatidilserina, en el cual Ca1 es el puente entre la proteína y las moléculas de fosfolípidos; de forma similar a los modos de unión de la fosfolipasa A2 y la anexina V (Huber et al., 1990; Swairjo et al., 1995). Consecuentemente, interacciones directas de los lípidos con otros residuos del dominio C2 pueden bloquear el puente de  $\text{Ca}^{2+}$  entre el lípido y la proteína (Fig 1.8.B), incrementando la aparente afinidad de C2 hacia el  $\text{Ca}^{2+}$  y los fosfolípidos (Shao et al., 1996; Nalefski et al., 1997).

## **Introducción**

Estudios de mutagénesis en el sitio de unión del  $\text{Ca}^{2+}$  demuestran que los iones individuales de  $\text{Ca}^{2+}$  y sus ligandos juegan diferentes papeles en la unión a la membrana y en la activación de la PKC  $\alpha$ . El modelo sugiere que Ca1 está envuelto en el anclaje inicial a la membrana, donde Ca2 y Ca3 están implicados en cambios conformacionales (Medkova y Cho, 1998; Edwards y Newton, 1997; Corbalán-García et al., 1999; García-García et al., 1999; Conesa-Zamora et al., 2000; Bolsover et al., 2003). Adicionalmente, se ha visto que Asn 189 es el sitio de reconocimiento específico para la fosfatidilserina jugando un importante papel en la activación de la enzima. Resultados similares fueron observados cuando la Arg 216 fue mutada a Ala, lo cual sugiere que estos residuos son importantes para estabilizar el complejo membrana-proteína en la superficie de la membrana (Bolsover et al., 2003; Conesa-Zamora et al., 2001). Sin embargo, Arg 249 y Thr 251 juegan un papel más crucial en el proceso de anclaje y consecuentemente, en la activación de la enzima (Bolsover et al., 2003; Conesa-Zamora et al., 2001).

Incluso aunque los tres dominios C2 de cPKCs son idénticos en un 64%, se han encontrado diferencias en la afinidad del  $\text{Ca}^{2+}$ , estequiometría y cooperatividad (Ochoa et al., 2002; Sutton y Sprang, 1998; Nalefski y Newton, 2001; Kohout et al., 2002). Estudios FRET, ITC y DSC han demostrado que las tres isoenzimas pueden unir 2 o 3 iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque PKC  $\gamma$  exhibe una mayor afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  que la PKC  $\alpha$ , y esta segunda mayor que la PKC  $\beta$ . Esto sugiere que un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  puede permitir a la PKC  $\gamma$  responder más eficientemente que la PKC  $\alpha$  y  $\beta$  en el mismo orden de afinidad (Ochoa et al., 2002; Sutton y Sprang, 1998; Kohout et al., 2002; Torrecillas et al., 2004).

Las diferencias observadas entre los tres dominios C2 pueden estar relacionadas con su especialización fisiológica en diferentes compartimentos celulares (Medkova y Cho, 1999; Ochoa et al., 2002; Corbalán-García et al., 1999; García-García et al., 1999; Nalefski y Newton, 2001; Kohout et al., 2002; Johnson et al., 2000; Nalefski y Newton, 2001; Torrecillas et al., 2003; Torrecillas et al., 2004).

La combinación de estos estudios bioquímicos sugiere un modelo secuencial para la unión de las cPKCs a las membranas y su activación. En el primer paso, un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular resulta en la unión de Ca1 y Ca2 cuando la proteína todavía está en el citosol, permitiendo la unión de la enzima a la membrana a través del dominio C2. Ca1 es responsable de la unión de las proteínas con moléculas fosfolípicas, que son también reconocidas con la ayuda de Asn 189 y Arg 216. Ca2 es responsable, de estar en armonía con Ca1, en la localización apropiada y de inducir un cambio conformacional en la PKC, que parcialmente penetra y se acopla con el fosfolípido bilateral por medio de CBR3 (Arg 249 y Thr 251). Un reclutamiento de la membrana,

puede unir un tercer  $\text{Ca}^{2+}$ , estabilizando el complejo membrana-dominio C2. Esto posibilita que la PKC resida en las membranas durante un largo periodo de tiempo, permitiendo al dominio C1 encontrar el diacilglicerol generado tras la estimulación del receptor, y finalmente, permite la completa activación de la enzima (Oancea y Meyer, 1998; Medkova y Cho, 1998; Corbalán-García et al., 1999; Conesa-Zamora et al., 2000; Bolsover et al., 2003; Conesa-Zamora et al., 2001; Nalefski y Newton, 2001; Feng et al., 2000).

La unión a la membrana es sólo una parte de la función del dominio C2, y da idea de la importancia de este dominio en la interacción intra-molecular, la cual ha sido bien documentada (Kirwan et al., 2003). El dominio C2 afecta a la afinidad de los activadores del dominio C1 (Pepio y Sossin, 1998), y la eliminación de este dominio aumenta la sensibilidad de PKC a DAG/ésteres de forbol (Quest y Bell, 1994). La activación del dominio C2 a través de la unión de calcio puede mediar la asociación del dominio C1 con lípidos, tales como el ácido araquidónico (López-Nicolás et al., 2006) y el modelado molecular sugiere que el dominio C1 puede proporcionar los grupos carboxilato o carbonilo de aminoácidos específicos para la unión del calcio al dominio C2 (Sutton y Sprang, 1998). Las interacciones de los dominios C1 y C2 también proporcionan medios para la dimerización de la PKC, una interacción que puede llevar a la regulación cruzada de isoenzimas (Slater et al., 2002). Todos estos datos sugieren que el dominio C2 interviene en la interacción intra-molecular inhibitoria con el dominio C1 que rompe el incremento de calcio intracelular, llevando a un cambio de conformación dentro del dominio C2 y la subsiguiente unión del DAG al dominio C1, dando lugar a la activación adicional de la enzima (Kheifets y Mochly-Rosen, 2007).

Se ha demostrado a través de varios estudios realizados en el laboratorio de Mochly-Rosen y colaboradores que el dominio C2 juega un papel crítico en el anclaje de isoenzimas de PKC individuales a diversos sitios subcelulares. El primer estudio realizado en 1992 sugiere que el dominio C2 juega un papel en el anclaje de proteínas por medio de otras proteínas, en el que el dominio C2 está presente en el aka p65. p65 contiene principalmente dos dominios C2 repetidos y las proteínas se encuentran localizadas en vesículas sinápticas, un sitio donde la PKC no está presente. Por lo tanto se piensa que además de la sensibilidad al calcio y de unir activamente PS, el dominio C2 también debe controlar o intervenir en las interacciones proteína-proteína. Paralelamente se ha demostrado que las uniones del dominio C2 a un receptor para la quinasa C activada (RACK) específico de PKC  $\beta$  poseen una afinidad cerca de 100 veces más baja que para la PKC  $\beta$  (Mochly-Rosen et al., 1992) y que péptidos derivados de la secuencia que son muy homólogos entre los dominios C2 en p65 y en PKC son aquellos que contienen las secuencias de interacción de las proteínas; péptidos derivados de estas regiones en el dominio C2 de PKC  $\beta$

## **Introducción**

inhiben selectivamente la translocación y la función de PKC  $\beta$  (Ron y Mochly-Rosen, 1995). Estudios posteriores que utilizaban los dominios C2 de PKC  $\delta$  y  $\epsilon$  demostraron que el dominio C2 actuaba como un inhibidor selectivo de la translocación y de la función de las correspondientes isoenzimas. Utilizando este fragmento (aminoácidos 2–142) derivado de PKC  $\delta$  y PKC  $\epsilon$  se ha demostrado que las dos isoenzimas tienen papeles opuestos en la regulación de la tasa de contracción de células de músculo cardíaco en cultivo (Johnson et al., 1996). Los subsiguientes estudios han permitido identificar péptidos cortos que corresponden a los sitios de unión de RACK en los dominios C2; péptidos que correspondiendo a estas secuencias actuaron como inhibidores selectivos de las respectivas isoenzimas. Cada dominio C2 de las PKCs contiene también una secuencia corta que es homóloga a una secuencia en su correspondiente RACK. La participación de secuencias de RACK en interacciones intra-moleculares auto-inhedoras se demostró utilizando tres enfoques. Primero, utilizando PKC  $\epsilon$  como ejemplo, se demostró que la mutación de un solo aminoácido en el sitio de RACK alteraba la cinética de la activación de la enzima en las células (Schechtman et al., 2004). El segundo, un péptido diseñado para esta región activaba la isoenzima de PKC de la cual fue derivado, permitiendo así, la modulación específica de la actividad de la isoenzima (Ron y Mochly-Rosen, 1995). Finalmente, una sola sustitución de un aminoácido en la posición cargada de alanina hacía el  $\psi$ -RACK inactivo y una sustitución de la carga encontrada en RACK- $\epsilon$  confería mayor afinidad por el péptido para la PKC  $\epsilon$  y así ese péptido actuaba como un inhibidor competitivo de PKC  $\epsilon$  con su RACK (Liron et al., 2007). Por lo tanto, el sitio de  $\psi$ -RACK toma parte en una interacción auto-inhedoras, semejante al del sitio del pseudosustrato, y la activación de la enzima depende de la interrupción de esta interacción intra-molecular.

Juntas, las interacciones inter- e intra-moleculares del dominio C2 juegan un papel crítico en la activación de la PKC, su translocación, su unión a proteínas sustrato y en su anclaje. Es importante destacar que la inhibición de ambas interacciones (proteína-proteína) intra- e inter-moleculares de las proteínas a través del dominio C2 ha resultado ser una táctica exitosa en la regulación de isoenzimas individuales (Souroujon y Mochly-Rosen, 1998).

### **1.2.2.3. Interacción entre los dominios C1 y C2**

Varios estudios sobre las isoenzimas de PKC sugieren un modelo secuencial de dominios C2–C1 para la activación de la PKC (Pascale et al., 2005). Johnson y colaboradores (2000) encontraron que tanto los dominios C1 como C2 de PKC  $\beta$  poseen elementos para la unión a la membrana (Mochly-Rosen et al., 1995). El laboratorio de Bittova (2001) encontró que el dominio C2

de PKC  $\alpha$  interactúa con lípidos aniónicos en una manera calcio-dependiente y el dominio C1 confiere selectividad para la PS y la unión de ésteres de forbol / DAG (Bittova et al., 2001). Este modelo secuencial propone que el dominio C2 está implicado en la unión inicial del calcio y en la unión electrostática a la membrana dependiente de PS, que es seguida del compromiso de unión del dominio C1 sobre el DAG de la membrana y la penetración en la membrana. Un estudio reveló que la Arg 41 en el dominio C1A de la PKC  $\alpha$  está implicada en la interacción con los fosfolípidos aniónicos antes de la penetración en la membrana. La mutación en Asn 19, otro residuo catiónico en el dominio C1A, confiere una alta afinidad por las vesículas de fosfolípidos y aumenta la penetración en la membrana en ausencia de las condiciones de activación, sugiriendo que este residuo está implicado en el mantenimiento de la proteína en una conformación inactiva (Bittova et al., 2001). López-Nicolás et al. (2006) mostró recientemente que la activación de PKC  $\alpha$  por el ácido araquidónico también sigue el modelo secuencial de dominios C2-C1 y que el dominio C1A está implicado en la localización en la membrana. Johnson y colaboradores (2000) mostraron que el dominio C1B de la PKC  $\delta$  muestra una afinidad más alta por la membrana que el dominio C1B de PKC  $\beta$ II, y que el dominio C2 de PKC  $\delta$  no está implicado en interacciones de membrana ni en la translocación/activación de la enzima en las células. En este modelo la afinidad más alta del dominio C1B de la PKC  $\delta$  por las membranas compensa la falta de contribución del dominio C2 en la interacción de la membrana (Mobarak et al., 2000). La utilización de diferentes dominios por cada miembro de la familia de PKC para su asociación a la membrana aún está por ser determinada. No obstante, está claro basándose en el conocimiento actual, que el modelo propuesto para la activación de la cPKC lo distingue de moléculas en las que la relocalización es controlada por un solo dominio diana. La participación de diferentes dominios muy probablemente tiene implicaciones significativas en la dinámica temporal de translocación de isoenzimas de PKC en respuesta a la activación del receptor y al impacto de respuestas divergentes provocadas por el DAG (Amadio et al., 2006).

La primera interacción descrita en las PKCs fue la de la región pseudosustrato. Este se localiza en el N-terminal del dominio C1 de las cPKCs y contiene una secuencia consenso con la secuencia de unión del sustrato por las quinasas, pero en el sitio de fosforilación, en lugar de una Ser/Thr tiene una Ala (House y Kemp, 1990). Este sitio pseudosustrato mantiene las enzimas en una conformación inactiva por bloqueo estérico del sitio activo localizado en la región catalítica (Fig.1.4) (House y Kemp, 1987; Makowske y Rosen, 1989; Orr et al., 1992).

La activación de las isoenzimas de cPKC por asociación con las membranas depende en último término de un cambio conformacional por la unión de fosfatidilserina/ $\text{Ca}^{2+}$  en el dominio C2

## **Introducción**

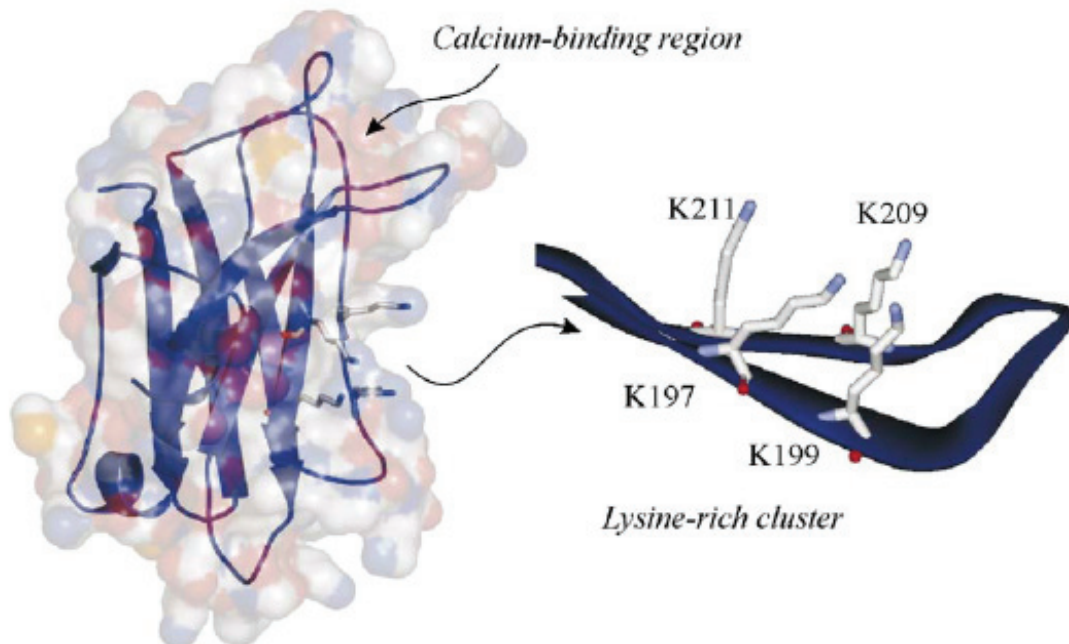
y/o unión de ésteres de forbol/DAG en el dominio C1. En el último paso del proceso de activación, el pseudosustrato tiene que moverse del sitio activo para permitir la unión del sustrato (House y Kemp, 1987; Makowske y Rosen, 1989; Orr et al., 1992). Varios estudios han puntualizado la interacción de unión de esta región polibásica con vesículas lipídicas aniónicas (Mosior y McLaughlin, 1991; McLaughlin et al., 2002), lo que lleva a la hipótesis de que el sitio puede unirse a la membrana plasmática mientras que la proteína está activa (Oancea y Meyer, 1998; Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006). Otros estudios, usando una proteólisis parcial como sensor de cambios conformacionales, sugieren que la unión de ambos dominios C2 y C1 es necesaria para proveer la energía que libere el pseudosustrato de la región catalítica (Johnson et al., 2000).

Más evidencias de interacciones intramoleculares en las PKCs han sido propuestas por el grupo de Mochly-Rosen's basándose en el descubrimiento de la familia de proteínas de anclaje RACKs (Mochly-Rosen, 1995; Mochly-Rosen y Gordon, 1998). Este grupo demostró que los RACKs se unen a un sitio de la PKC, que solo está expuesto cuando la enzima ha sido activada por los cofactores diacilglicerol, fosfatidilserina y  $Ca^{2+}$ . Tales uniones incrementan varias veces la actividad catalítica de PKC, esto sugiere que el complejo PKC-RACK puede ser la forma activa de la enzima "in vivo" (Mochly-Rosen et al., 1991; Ron y Mochly-Rosen, 1994).

Basándose en estudios de mutagénesis, se han detectado interacciones intramoleculares que ayudan a mantener las PKCs en una conformación inactiva. Aquí, la sustitución de un residuo específico induce incrementos en la actividad catalítica de la enzima y, al mismo tiempo, una reducción de la especificidad para fosfolípidos cargados negativamente. Uno de los primeros hallazgos descritos fue que el Asp 55 localizado en el dominio C1A de la PKC  $\alpha$ , se propuso por estar implicado en la unión del subdominio C1A a otra parte de la enzima (probablemente el dominio C2), siendo la fosfatidilserina el ligando que específicamente facilitaba la interacción intramolecular (Bittova et al., 2001).

Varios trabajos han demostrado que el sitio de unión para el diacilglicerol en el dominio C1 de varias isoenzimas de PKC es inaccesible cuando se encuentran en conformación inactiva (Bittova et al., 2001; Stahelin et al., 2004; Bolsover et al., 2003; Corbalán-García et al., 2003; Schechtman et al., 2004; Oancea y Meyer, 1998; 1996; Meyer y Oancea, 2000).

Resultados de Rodríguez-Alfaro et al. (2004) soportan la hipótesis de que el dominio C2 puede ser el área de interacción, quien sustituye Lys197, Lys199 y Lys211 (localizado en el cluster rico en lisina; figura 1.9) con Ala, con lo cual induce la activación constitutiva de la PKC  $\alpha$  y reduce así sus necesidades de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfatidilserina o  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ .



**Figura 1.9.** Localización del cluster rico en Lys en el dominio C2 de PKC  $\alpha$ . Estructura global del dominio C2 de PKC  $\alpha$  representada como el esquema del dibujo por encima de la superficie molecular. Los residuos de lisina implicados en el cluster, el cual está localizado en las hojas  $\beta$ -3 y  $\beta$ -4, están representadas como modelos de sticks con los carbonos en gris y nitrógeno en azul. Las superficies ácidas se representan en rojo y las básicas en azul. Se puede ver como la región de unión del  $\text{Ca}^{2+}$  es un área rica en amino-ácidos cargados negativamente, en los que los clusters ricos en lisina forman una superficie básica. El recuadro muestra una ampliación de las hojas  $\beta$ -3 y  $\beta$ -4 de la PKC  $\alpha$  con los residuos Lys formando el cluster representado por modelos de sticks. (Original tomado de Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006).

Adicionalmente, el reciente modelo del corte computacional de la estructura del dominio C1A y de la estructura cristal del dominio C2 de la PKC  $\alpha$  sugiere dos pares de posibles interacciones electrostáticas entre dominios: Asp 55 (C1A)-Arg 252 (C2) y Arg 42(C1A)-Glu 282 (C2) (Stahelin et al., 2005). La mutación de estos residuos a Ala también incrementa la afinidad por la membrana, la penetración monocapa y la actividad catalítica de la enzima, sugiriendo que, aunque estos residuos están implicados en interacciones intramoleculares, ellos no son directamente responsables de la unión a la membrana (Stahelin et al., 2005).

Estos resultados han proporcionado evidencias que soportan la existencia de las interacciones entre los dominios C1 y C2 en algunas isoenzimas de PKC. Además, todavía está por

## **Introducción**

determinar como se unen los fosfolípidos exactamente, y como el DAG y los RACKs son organizados para regular la localización y activación de estas enzimas (Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006).

### **1.2.2.4. El dominio catalítico y la región V5**

El dominio C3, contiene el sitio de unión de ATP, y el dominio C4, es responsable de la unión del sustrato, formando el centro catalítico de la PKC (Hofmann, 1997). Estos dominios son sumamente homólogos entre muchas quinasas (Parker et al., 1986).

El extremo carboxi-terminal de todas las PKCs contiene los sitios de fosforilación, tales como el motivo cambio, y los motivos hidrofóbicos que son esenciales para el procesamiento, la localización, y para la actividad de la quinasa (Newton, 2003). La regulación de la auto-fosforilación de la región V5 implica la unión de la proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinositol (PDK1), la cual protege la región de la defosforilación y de su degradación (Gao et al., 2001). La estructura de cristal del dominio catalítico muestra como los motivos de fosforilación forman una abrazadera intramolecular con el lóbulo N-terminal de la quinasa y ordenan la estructura del dominio y la activación del loop (Messerschmidt et al., 2005; Yang et al., 2002). De hecho, hay múltiples ejemplos de la participación del dominio V5 en interacciones importantes. Por ejemplo, la región V5 de PKC  $\beta$ II controla la translocación de PKC a las membranas nucleares por la unión al fosfatidilglicerol (Gokmen-Polar y Fields, 1998), y la región V5 de PKC (contiene un dominio de unión denominado PDZ, el cual interactúa con la proteína de interacción con la quinasa C (PICK) para su apropiada localización (Staudinger et al., 1997).

De forma semejante, V5- $\beta$ II contiene un sitio de unión al RACK, y la inhibición de esta interacción bloquea la señalización específica de PKC  $\beta$ II (Stebbins y Mochly-Rosen, 2001). El sitio de unión a RACK en V5 probablemente participa en interacciones intramoleculares inhibitorias con el sitio de  $\psi$ -RACK, localizado en la región C2, mientras que la PKC está en una conformación inactiva (Banci et al., 2002). Los estudios que comparan la velocidad de translocación del dominio regulador, del C2 aislado, y de la holo-enzima sugieren también que el dominio V5 $\alpha$  interactúa directamente con el dominio C2 $\alpha$  (Raghunath et al., 2003). Recientemente se ha demostrado que los dominios V5 y C2 de PKC  $\epsilon$  se unían cada uno al otro "in vitro". Es más, los datos demuestran que la afinidad del dominio V5 $\epsilon$  por C2 es isoenzima-específico: la interacción entre dominios de la misma isoenzima es mayor que entre dos isoenzimas diferentes de la misma familia. Finalmente, además de participar en numerosas interacciones intramoleculares e inter-moleculares, la región V5



contiene una secuencia de localización nuclear (NLS), presente más claramente en PKC  $\delta$ , pero en cierto modo está presente en todas las regiones V5 de isoenzimas de PKC (DeVries et al., 2002). Es probable que la eliminación de la interacción intra-molecular inhibitoria en el caso de la activación de la PKC libere la región V5 para participar en la localización de la PKC por interacciones proteína-proteína. Todos estos datos indican que la región V5 es un buen objetivo para el diseño de moduladores isoenzima-específicos de la actividad de la PKC (Kheifets y Mochly-Rosen, 2007).

### 1.3. Distribución de la PKC

#### 1.3.1. Distribución tisular de la PKC

Se ha determinado mediante análisis por *Northern* o *Western blot* la distribución de las isoenzimas PKC (esta distribución aparece resumida en la Tabla 1.1) (Web et al., 2000; Hug y Sarre, 1993; Wetsel et al., 1992). Las PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  parecen ser isoenzimas ubicuas que aparecen en la mayoría de los tejidos (Hug y Sarre, 1993; Wetsel et al., 1992; Schaap y Parker, 1990; Griner y Kazanietz, 2007), mientras que la expresión de otras PKCs es en gran parte específica del tipo de célula (Griner y Kazanietz, 2007). La presencia de la PKC  $\gamma$  se encuentra restringida al sistema nervioso central y médula espinal (Nishizuka, 1992; Wetsel et al., 1992), mientras que la PKC  $\eta$  se expresa mayoritariamente en la piel, corazón y pulmón y, en menor medida, en el bazo y el cerebro (Osada et al., 1990; Bacher et al., 1991). PKC  $\gamma$ , no se expresa en el corazón, pero se expresa extensamente en los tejidos del ojo (en la retina y el cristalino). Ambos tejidos contienen PKC  $\gamma$  y PKC  $\epsilon$ , las cuales están implicadas en papeles protectores contra el golpe y la isquemia neural (Chou y Messing, 2005). PKC  $\gamma$  también se expresa a niveles relativamente altos en el cerebelo (Sanchez-Perez y Felipo, 2005). PKC  $\epsilon$  se expresa ampliamente en tejidos neurales, en la retina, y en el cristalino y ha sido implicada en muchas rutas de señalización en estos tejidos (Wang et al., 2004). La PKC  $\theta$  está presente fundamentalmente en el músculo esquelético y células hematopoyéticas y, en menor proporción, en el pulmón, el bazo, la piel y el cerebro (Baier et al., 1993; Osada et al., 1992).

La PKC  $\lambda$ /I se ha encontrado en numerosos tejidos, y es muy abundante en una línea celular embrionaria de carcinoma de ratón (Akimoto et al., 1994). Por último, la PKC  $\mu$  también se ha encontrado en numerosos tejidos pero se expresa en mayor medida en timo y pulmón (Rennecke et al., 1996).

## Introducción

Célula/Tejido	PKC $\alpha$	PKC $\beta_1$	PKC $\beta_{II}$	PKC $\gamma$	PKC $\delta$	PKC $\epsilon$	PKC $\eta$	PKC $\xi$	PKC $\theta$	PKC $\lambda/\iota$	PKC $\mu$
Riñón	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
SNC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?
Corazón	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	?
Intestino delgado	?	?	?	-	+	?	?	?	?	+	?
Higado	+	+	+	-	+	+	?	+	+	+	?
Músculo liso aéreo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Pulmón	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Neutrófilo	+	+	+	-	+	?	?	+	?	?	?
Monocitos	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
Macrófagos	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
Eosinófilos	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Plaquetas	+	+	+	-	+	+	?	+	+	?	?
Linfocitos-T	+	+	+	-	+	+	+	+	?	?	?
Linfocitos-B	+	+	+	-	+	+	+	+	?	?	?
Músculo liso vascular	+	+	+	-	+	+	+	?	?	+	?
Retina	+	+	+	-	+	+	?	+	?	?	?
Bazo	+	+	+	-	+	+	+	?	?	+	?
Testículos	+	+	+	-	+	+	?	+	?	+	?
Ovario	+	+	+	-	+	+	?	+	?	+	?
Páncreas	+	+	+	-	?	+	?	?	?	+	?
Timo	+	+	+	-	?	-	?	?	?	?	?

**Tabla 1.1.** Distribución de las isoformas de proteína quinasa C (PKC) en células y tejidos seleccionados de mamíferos. (Original tomado del estudio de Webb et al., 2000).

- La distribución puede variar entre especies.
  - + Isoforma detectada a nivel de la proteína y/o de mRNA.
  - - Isoforma ausente.
  - ? Expresión desconocida.

En varios trabajos se ha relacionado la variación de los niveles de las PKCs en los diferentes tejidos con diferencias en su expresión; sin embargo, este hecho no ha sido demostrado inequívocamente, teniendo en cuenta que no se ha buscado la causa de estas variaciones a nivel de transcripción génica (Liu y Heckman, 1998).

Los tejidos están constituidos por distintos tipos celulares, por tanto, es importante determinar qué isoenzimas están presentes en cada uno de ellos. De igual forma, es interesante establecer el perfil de las isoformas en los cultivos celulares, puesto que pueden existir diferencias

entre las células cultivadas y el tipo celular de procedencia (Liu y Heckman, 1998). En general, las diferentes isoformas de PKC tienen patrones de distribución específicos en la célula, que reflejan los diferentes papeles de cada isoforma (Goodnight et al. 1995; Dorn y Mochly-Rosen 2002).

Esto es aplicable en el intestino, se han localizado isoformas específicas en neuronas entéricas (Poole et al. 2003; Wang et al. 2003; Nguyen et al. 2005), en células intersticiales de Cajal (ICC) (Southwell 2003; Wang et al. 2003; Poole et al. 2004) y en las células epiteliales (Davidson et al. 1994; Klein et al. 2000). En el íleon del conejillo de indias, PKCs  $\lambda$  y  $\epsilon$  estaban presentes en todas las neuronas mientéricas, mientras que las isoformas  $\gamma$ ,  $\eta$  y  $\theta$  sólo fueron detectadas en el subconjunto inmunoreactivo a la calbindina de neuronas aferentes primarias intrínsecas (IPANs) (Poole et al. 2003). Una fuerte inmunoreactividad de PKC  $\alpha$  se observa en células gliales entéricas, con una expresión limitada para neuronas mientéricas. Ambas inmunoreactividades de PKC  $\gamma$  y  $\theta$  fueron localizadas también en las ICC a través del tracto gastrointestinal (Southwell, 2003; Poole et al. 2004).

El perfil de las isoenzimas en el hígado de rata, que incluye a la PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ , es constante, independientemente de que las muestras se obtengan de tejido homogeneizado, de hepatocitos aislados a partir de tejido no cultivado o de células FAO de hepatoma de rata (Sesca et al., 1996; Perletti et al., 1996; Ducher et al., 1995). Su contenido en isoenzimas fue similar al de la línea celular HepG2 de hepatoma humano, a excepción de la PKC  $\delta$ , que no se detectó (Ducher et al., 1995). Estos resultados han sugerido que el estudio de líneas celulares cultivadas puede constituir una buena aproximación para el estudio del perfil de las isoenzimas en los diferentes tipos celulares. Sin embargo, se necesitan bastantes datos sobre el cultivo celular y el tejido de procedencia para determinar si ambos son comparables (Liu y Heckman, 1998).

### 1.3.2. Distribución subcelular de PKC

Las formas inactivas de la PKC se encuentran mayoritariamente en el citosol, mientras que sus activadores, de naturaleza hidrofóbica, están presentes en la membrana. Se ha determinado mediante estudios basados en ultracentrifugaciones la distribución subcelular de algunas isoformas de la PKC (Disatnik et al., 1994; Mochly-Rosen et al., 1991; Liao et al., 1994). Estos estudios demuestran que, tras la estimulación con agonistas, se incrementan los niveles de actividad de la PKC en la fracción particulada mientras que disminuye en el citosol (Mochly-Rosen y Gordon, 1998; Liao et al., 1994). Las formas activas de la PKC se han encontrado asociadas con la membrana plasmática, con elementos del citoesqueleto, con el núcleo y con otros componentes subcelulares (Liu y Heckman, 1998; Liao et al., 1994).

## **Introducción**

Recientemente, se han realizado estudios con técnicas de microscopía confocal, que revelan una localización más compleja y específica de las diferentes isoenzimas de la PKC. Estos estudios demuestran que en células que expresan varias isoformas, la mayoría de ellas se encuentran localizadas en estructuras subcelulares y, tras la activación, mudan su localización a diferentes localizaciones en la célula.

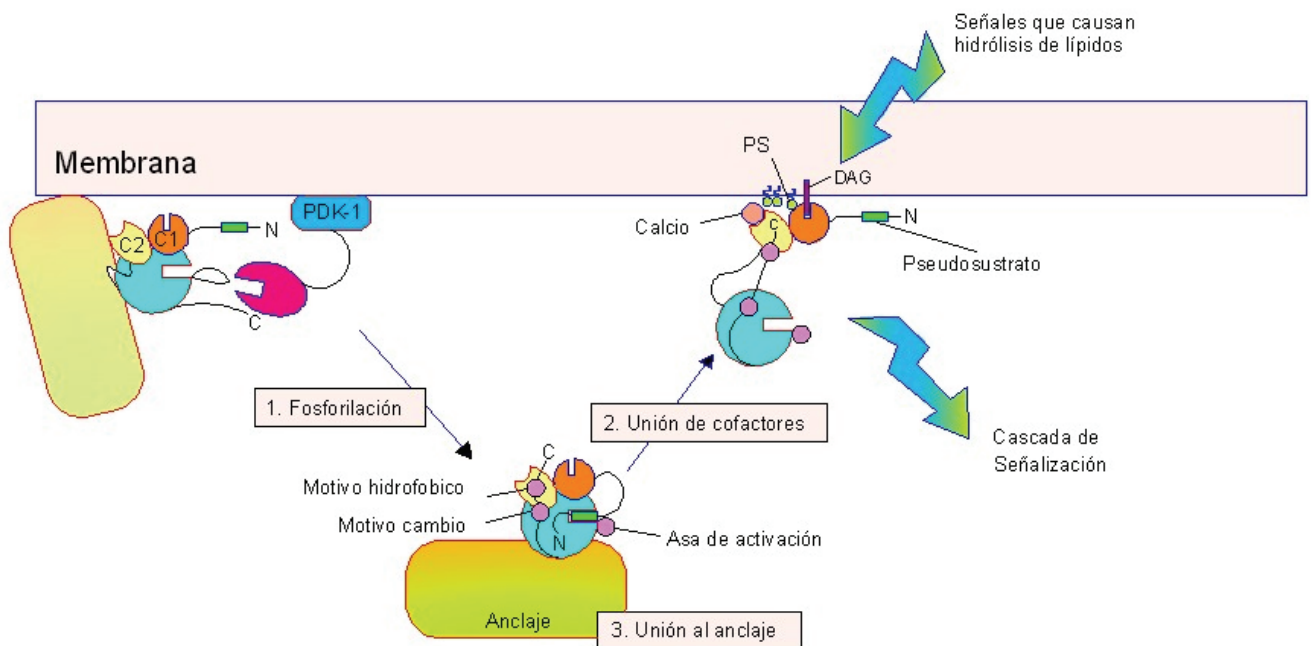
Por ejemplo, la PKC  $\alpha$  se localiza en los contactos focales en fibroblastos REF52 no estimulados y transloca al perinúcleo después de la activación (Liao et al., 1994). La PKC  $\beta$ II está asociada con estructuras fibrilares en miocitos cardiacos no estimulados y transloca al perinúcleo y a la periferia celular cuando se activa (Disatnik et al., 1994; Mochly-Rosen et al., 1991). Por último, la PKC  $\delta$  se encuentra localizada en el área de Golgi en células control y tras la activación transloca al perinúcleo y al núcleo y, en un número reducido de células, también se detecta su distribución difusa por el citoplasma (Mochly-Rosen y Gordon, 1998). Todos estos resultados sugieren en su conjunto que las isoenzimas de PKC se localizan en lugares intracelulares debido a su capacidad de unión con moléculas de anclaje específicas (Mochly-Rosen y Gordon, 1998).

Las isoformas de PKC  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  se localizan principalmente en la fracción citosólica de células no estimuladas y experimentan una translocación a las membranas celulares de células activadas (Salamanca y Khalil, 2005; Mochly-Rosen y Gordon, 1998). PKC  $\delta$  se localiza casi exclusivamente en la fracción particulada tanto de células activadas como de células en reposo, mientras que PKC  $\zeta$  se localiza en la vecindad del núcleo de células maduras activadas y en reposo del músculo liso vascular (VSM) (Khalil y Morgan, 1996), ésta podría tener un papel en la vasoconstricción pulmonar en el período perinatal (Cogolludo et al., 2005).

### **1.4. Regulación de la PKC**

La proteína quinasa C es regulada por dos mecanismos secuenciales e igualmente críticos: fosforilación provocada por la PDK-1, y unión a DAG y/o otros cofactores. Cada mecanismo regula la estructura, localización subcelular y función de la PKC (Figura 1.11). PKCs recién sintetizadas se asocian a un compartimento de membrana en la célula (Sonnenburg et al., 2001) y en una conformación "abierta" en la que la secuencia auto-inhibitoria del pseudo-sustrato es expulsada del sitio activo del dominio catalítico (Dutil y Newton, 2000). La PDK-1 se acopla al C-terminal expuesto (Gao et al., 2001) y el sitio de la PDK-1 en la secuencia del asa de activación queda accesible para su fosforilación (Dutil y Newton, 2000). Tras la fosforilación de la secuencia del asa de activación, PDK-1 es liberada del C-terminal de la PKC, y éste queda expuesto para sufrir dos

fosforilaciones rápidas. En el caso de PKCs convencionales, esta fosforilación ocurre por un mecanismo intramolecular de auto-fosforilación (Behn-Krappa y Newton, 1999). Las especies fosforiladas (maduras) son liberadas al citosol y el pseudosustrato puede acceder al sitio activo, manteniendo la enzima en un estado autoinhibido. La enzima es activada tras la generación de calcio y diacilglicerol mediada por receptores. Estos ligandos reclutan la PKC de la membrana mediante la participación de dos módulos de anclaje en la membrana, un suceso que proporciona la energía necesaria para expulsar al pseudosustrato de la cavidad de unión del sustrato y permite la fosforilación del sustrato (Gao y Newton, 2002).



**Figura 1.11.** Modelo resumen de la regulación espacial, estructural y conformacional de la PKC por 1) fosforilación, 2) unión de cofactores, y 3) interacciones con proteínas de anclaje. (Adaptado de Newton, 2001).

### 1.4.1. Activación de la PKC

La PKC  $\alpha$  es activada por una variedad de estímulos que se originan mediante la activación del receptor, por contacto celular o por estrés físico. El diacilglicerol (DAG) y el Ca<sup>2+</sup> incrementan el estímulo sobre la célula conduciendo sinérgicamente a la liberación de una región pseudosustrato del sitio activo de la PKC, lo que lleva a su activación (Dutil y Newton, 2000).

Hoy se sabe que la PKC, en mamíferos, comprende una familia de isoenzimas, que tienen características bioquímicas diferentes y que responden de distinta manera ante un determinado estímulo en la célula (Dekker y Parker, 1994).



Según este modelo, un éster de forbol, mediante su unión a PKC, imitaría la acción del DAG, y su presencia continuada en la membrana llevaría a la activación prolongada de la PKC (Hug y Sarre, 1993).

En la activación de las cPKCs se piensa que el DAG se necesita como activador y la PS como cofactor de la activación, y que la presencia de ambos reduce el requerimiento de calcio a concentraciones del orden de micromoles. En el caso de la activación por ésteres de forbol no se necesita la presencia de calcio, pero éste reduce la concentración de éster de forbol necesaria para obtener una completa actividad de la PKC (Ryves et al., 1991).

Las nPKCs no necesitan calcio, pero si DAG / PS o ésteres de forbol para activarse. Respecto a las aPKCs, en el caso de la PKC  $\zeta$  presenta actividad quinasa en ausencia de activadores (Liyanage et al., 1992), aunque se ha visto que la presencia de PS o de ácidos grasos insaturados como el ácido araquidónico produce una marcada estimulación de la actividad de dicha isoenzima (Nakanishi y Exton, 1992) (Figura 1.13).

		<b>ACTIVADORES</b>		
		<b>Ca<sup>2</sup></b>	<b>PS</b>	<b>DAG / Ésteres de forbol</b>
<b>cPKCs</b>	$\alpha$ $\beta I / \beta II$ $\gamma$	SI	SI	SI
<b>nPKCs</b>	$\delta$ $\epsilon$ $\eta$ $\theta$	NO	SI	SI
<b>aPKCs</b>	$\zeta$ $\lambda$ $\iota$	NO NO NO	(*) SI N.D.	NO NO NO

**Figura 1.13.** Respuesta de las isoformas de PKC a distintos activadores.  
 N.D. No determinado.  
 (\*) Existen discrepancias entre los datos obtenidos según los autores.

Hay evidencias de que varias PKCs (entre ellas la PKC  $\zeta$  se estimulan por el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (Nakanishi et al., 1993). Esto indica que en las vías de transducción de señal que llevan a la activación de PKC, no sólo están implicadas las que producen una generación de DAG,

## **Introducción**

sino que también podrían participar las que activan la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K). Además, hay datos que muestran una estimulación diferencial de isoenzimas de PKC *in vitro* por ácidos grasos y ácido lisofosfatídico en sinergismo con el DAG (Asaoka et al., 1992).

Aparte de estos activadores se ha descubierto la capacidad de otros componentes del metabolismo de glicerolípidos de ser activadores de la PKC, al menos *in vitro* (Kochs et al., 1993; Lee y Bell, 1991). La cardiolipina activa PKC  $\alpha$  y  $\beta$ I (Kochs et al., 1993). El ácido araquidónico (Ogita et al., 1992), y la lipoxina A (Shearman et al., 1989), otro metabolito de la lipooxigenasa, activan PKC  $\beta$ II y  $\epsilon$ . El PIP2 puede sustituir al DAG como activador de PKC  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  pero no de PKC  $\beta$ II (Lee y Bell, 1991). Estos hallazgos junto con el hecho de que el DAG puede provenir también de fuentes distintas a los lípidos de inositol como, por ejemplo a partir de la fosfatidilcolina (PC) (Huang y Cabot, 1990), sugieren que, al menos, algunas isoenzimas de PKC pueden ser activadas por otros segundos mensajeros. Citoquinas como IFN- $\alpha$ , IL-1 e IL-3, producen la hidrólisis de PC pero no de fosfatidilinositol (PI) (Cataldi et al., 1990; Duronio et al., 1989; Polakis et al., 1990), y se ha visto que PKC  $\beta$  y  $\epsilon$  se activan tras la acción de IFN- $\alpha$  en células Hela y Daudi respectivamente (Pfeffer et al., 1991; Polakis et al., 1990). Entonces, la producción de diferentes segundos mensajeros inducida por una señal podría decidir que isoenzimas de PKC se activan y cuales no.

Hay diferentes datos que sugieren la existencia de fosforilaciones previas a la activación, producidas por una quinasa de eucariotas aún no identificada. Sin esta fosforilación inicial, PKC no es activa y tampoco puede ser activada (Pears et al., 1992).

Tras la activación, las PKCs se translocan de la fracción soluble a las membranas celulares, donde se unen a los fosfolípidos aniónicos (Johnson et al., 2000), y se localizan en diversos sitios subcelulares uniéndose a receptores que se unen a las PKCs activas (RACKs) (Mochly-Rosen, 1995).

### **1.4.1.1. Activación de la PKC mediante modificaciones post-traduccionales**

Las PKCs experimentan una serie de transfosforilaciones serina/treonina y autofosforilaciones que son requeridas para la maduración, activación y estabilidad. Esto es importante para poder interpretar la cantidad de respuestas mediadas por la PKC, no necesariamente envueltas en la activación alostérica por el DAG, y que pueden ocurrir como consecuencia de modificaciones en las proteínas, tales como fosforilación de tirosina o proteólisis (Griner y Kazanietz, 2007).



La proteína quinasa C recuperada de la fracción particulada está completamente fosforilada en las dos posiciones del extremo C-terminal, y aproximadamente la mitad del total también se encuentra fosforilada a nivel del asa de activación (Keranen et al., 1995). Según se producen las sucesivas fosforilaciones, la proteína va incrementando su peso molecular hasta alcanzar unos 80 kDa (para las cPKCs) cuando las fosforilaciones se han completado (Newton, 1997; Cazaubon y Parker, 1993). La proteína quinasa C en la fracción citosólica, contiene especies que migran más rápido correspondiéndose con las enzimas no fosforiladas o las fosforiladas exclusivamente en el asa de activación. Ambas migran con un peso molecular aparente de 76 kDa (para las cPKCs) (Newton, 1997; Cazaubon y Parker, 1993).

Cuando la Thr 500 de la PKC  $\beta$ II se sustituye por un residuo no fosforilable, la enzima resultante es inactiva (Taylor y Radzio-Andzelm, 1994; Orr y Newton, 1994). La permutación de la Thr 495 en la isoforma  $\alpha$  por un residuo ácido produce la expresión de una enzima con actividad catalítica, lo que parece indicar que cualquier carga negativa en el asa de activación es suficiente para alinear correctamente los residuos alrededor de la región catalítica (Cazaubon et al., 1994; Orr y Newton, 1994).

También se ha establecido que las PKC no pueden autofosforilarse en estos residuos equivalentes (Thr 500 y Thr 495), por lo que debe existir otra quinasa que las fosforile en esta posición (Newton, 1997). Recientemente se ha descrito que una de las PKC quinasas responsables de esta fosforilación es la PDK1 (Chou et al., 1998; Le Good et al., 1998; Dutil et al., 1998).

El asa de activación es el primer lugar fosforilado en los mecanismos que convierten a la PKC en una enzima catalíticamente competente; sin embargo, este lugar de fosforilación parece ser inaccesible cuando el pseudosustrato ocupa el sitio activo (Newton, 1997; Tsutakawa et al., 1995).

Todos estos procesos se han caracterizado más extensamente mediante estudios con fosfatasa. Así, recientemente se ha investigado la defosforilación diferencial de la isoenzima  $\beta$ II, por subunidades catalíticas de fosfatasa 1 (PP-1) y 2A (PP-2A) (Keranen et al., 1995). La PP-1 defosforila a los residuos Thr 500, Thr 641 y Ser 660, cerca del extremo carboxilo, produciendo una proteína inactiva. Por su parte, la PP-2A defosforila únicamente a la Thr 500 y a la Ser 660 y produce una proteína que puede autofosforilarse para recuperar su funcionalidad (Keranen et al., 1995). Aparentemente, existe discrepancia entre este último hallazgo y las evidencias que demuestran que la Thr 500 experimenta la fosforilación inicial antes de que la PKC llegue a ser activa y que, además, este residuo no pueda autofosforilarse (Keranen et al., 1995; Tsutakawa et al., 1995).

## **Introducción**

Sin embargo, esta divergencia ha sido resuelta: después de la fosforilación en el asa de activación, la PKC se fosforila en el residuo Thr 641 (en el caso de la PKC  $\beta$ II), probablemente por una reacción de autofosforilación debido a la proximidad del extremo C-terminal con el sitio catalítico (Newton, 1997). Esta fosforilación aparentemente bloquea a la PKC en una conformación catalíticamente competente, posiblemente porque sitúa al extremo C-terminal lejos del sitio activo (Newton, 1997). Por tanto, la defosforilación selectiva del residuo en el asa de activación da lugar a una enzima que retiene la actividad catalítica; por el contrario, la defosforilación en el residuo Thr 641 se corresponde con una enzima no activable (Newton, 1997).

La tercera fosforilación se produce en el residuo Ser 660 y, de nuevo, es una reacción de autofosforilación. Esta fosforilación final se correlaciona con la liberación de la PKC en el citosol, por lo que se le atribuye un papel directo en la localización subcelular de la PKC (Newton, 1997). La PKC  $\alpha$  apenas exhibe actividad sin la fosforilación en estos sitios. La fosforilación de Ser 660 es corrientemente usada como marcador de activación de la PKC  $\alpha$  (Cheng et al., 2001; Bornancin y Parker, 1997; Nakashima, 2002).

Por tanto, a modo de resumen, las dos reacciones de autofosforilación se producen en el extremo C-terminal y son posteriores a la fosforilación en el asa de activación, la cual depende a su vez de una hipotética PKC quinasa (probablemente PDK1) (Le Good et al., 1998). En células no estimuladas, la mayor parte de la PKC presenta esta triple fosforilación, hecho que sugiere que la fosforilación en estos tres lugares conservados está implicado en el procesado o maduración de la enzima, más que en modular su función en respuesta a señales específicas (Newton, 1997). Sin embargo, la localización subcelular de la PKC podría estar regulada por defosforilaciones en estos tres residuos (Newton, 1997).

### **1.4.1.2. Activación de la PKC por los efectos del DAG en la membrana**

Se sabe que el diacilglicerol introduce perturbaciones en las propiedades de las membranas y que estos cambios facilitan la activación de la PKC (Gómez-Fernández et al., 2004). Aunque la concentración de DAGs en membranas normales y en el resto es usualmente bajo, niveles transitorios pueden ascender del 2 al 10 % en diferentes líneas celulares (Preis et al., 1986; Wolfman y Macara, 1987). Se ha descrito que el diacilglicerol se genera en respuesta a la estimulación celular proveniente de diferentes fuentes incluyendo el PtdIns (4,5)P<sub>2</sub> hidrolizado por las isoenzimas de fosfolipasa C y fosfatidilcolina hidrolizada por isoenzimas de fosfolipasa D y sintetas de esfingomielina (Hodgkin et al., 1998; Wakelam, 1998; Huitema et al., 2004). El efecto

producido por diacilglicerol en la activación de PKC también se asocia con la modulación de propiedades superficiales. Esta modulación resulta del reducido tamaño de los grupos de cabezas polares de las moléculas de diacilglicerol, y esto tiene tres efectos principales: (i) una reducción en la tendencia de la membrana a formar fases no bilaterales (Erand, 1985; Goldberg et al., 1994; Stubbs y Slater, 1996); (ii) separación de la cabeza polar, que puede facilitar la inserción en la parte apolar de la membrana (Slater et al., 1994; Goldberg et al., 1994; Das y Rand, 1986; Erand, 1987; Cunningham et al., 1989; Bolen y Sando, 1992); (iii) deshidratación de la superficie de la membrana debido a la relativamente pequeña cantidad de moléculas de agua, unidas al grupo polar del diacilglicerol (López-García et al., 1993; López-García et al., 1994).

En varios estudios, la actividad enzimática de la PKC se ha correlacionado con los efectos producidos por DAGs en la membrana. Por ejemplo, cuando las membranas están en el estado de gel, bajas concentraciones de DAG hacen que se produzca la separación en dos fases con una fase rica en DAG (López-García et al., 1994; Ortiz et al., 1988; Schorn y Marsh, 1996). Esto se ha correlacionado con la activación de la PKC (Dibble et al., 1996; Hinderliter et al., 1997; Micol et al., 1999; Jiménez-Monreal et al., 1999; Torrecillas et al., 2001). Sin embargo con el incremento de la concentración de DAG, la activación de la PKC decrece debido a la coexistencia de diferentes fases o a la aparición de nuevos complejos fosfolípidos / diacilglicerol que no están hechos para soportar la actividad (Hinderliter et al., 1997). Por otra parte, cuando la membrana está en estado fluido, incrementando la concentración de DAG se produce un incremento de la actividad de la PKC, la cual alcanza su máximo nivel y una vez que las fases no-lamelares comienzan a aparecer, la actividad comienza a decrecer (Torrecillas et al., 2001; Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006).

Es interesante resaltar que cuando se estudió la capacidad de activar la PKC mediante una amplia variedad de isómeros de diacilglicerol en sistemas de membrana fluida, la PKC fue activada más extensamente por 1,2-sn-isómeros que por 1,3-sn-isómeros (Boni y Rando, 1985; Nomura et al., 1986; Sánchez-Pinera et al., 1999). Por ejemplo, varios informes han mostrado diferencias entre 1,2-sn-isómeros saturados e insaturados cuando se compararon sus capacidades de activar a la PKC, sugiriendo esto que la composición de ácidos grasos de los DAGs influye en el patrón de activación de la PKC (Takai et al., 1979; Carrasco y Mérida, 2004; Bolen y Sando, 1992; Jiménez-Monreal et al., 1999; Torrecillas et al., 2001; Sánchez-Pinera et al., 1999; Mori et al., 1982; Lapetina et al., 1985; Go et al., 1987; Madani et al., 2001; Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006).

## **Introducción**

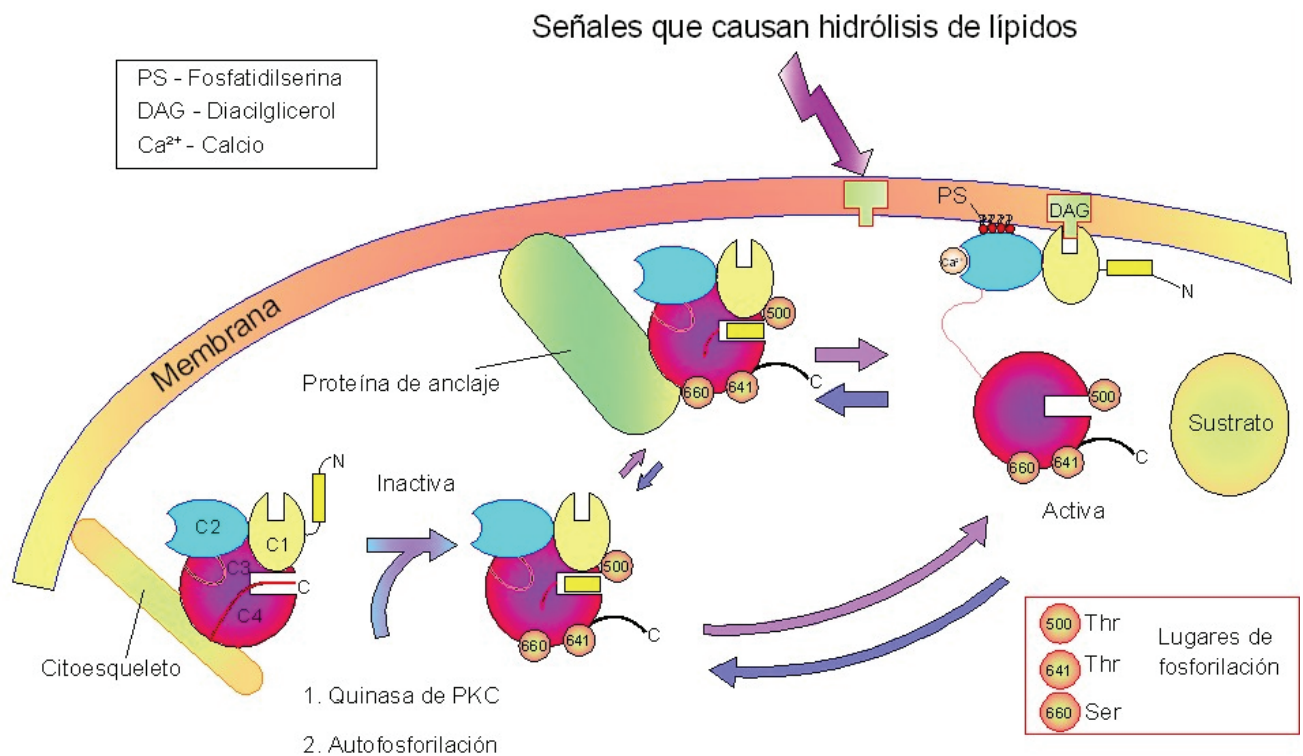
### **1.4.1.3. Activación de la PKC por agonistas**

De todas las PKCs conocidas, los mecanismos de activación de las cPKC son los mejor conocidos, (Becker y Hannun, 2005; Newton, 2003; Newton, 2001; Quest, 1996; Newton, 1997; Liu, 1996; Newton, 1995, Dutil et al., 1998) los cuales parecen implicar complejas interacciones entre la quinasa y sus activadores.

En primer lugar se requiere la asociación de la enzima con fosfolípidos de la membrana plasmática, en particular con la fosfatidilserina (PS). La PKC se une a la PS en ausencia de cationes metálicos mediante interacciones electrostáticas con los dominios catalítico y regulador (Quest, 1996; Newton, 1997; Newton, 1995). La unión resulta ser más eficiente en presencia de calcio, además, este efecto es modulado de forma dependiente de la concentración de calcio (Bazzi y Nelsestuen, 1993). Se cree que el calcio puede participar en el acoplamiento con los fosfolípidos de la PKC formando un puente entre ésta y el lípido (Khan et al., 1993). En ausencia de fosfolípidos, la PKC une un átomo de calcio por molécula, sin embargo, cuando los fosfolípidos están presentes al menos se unen ocho átomos por cada proteína (Liu, 1996). Los lugares de unión del calcio se localizan en la interfase entre la PKC y la membrana plasmática a nivel del dominio C2 (Quest, 1996; Liu, 1996).

Aunque la PKC esté unida al complejo fosfolípido/calcio, solamente demuestra competencia catalítica cuando se asocia con DAG, lo que permite la activación completa de la PKC incrementando su afinidad por la PS y disminuyendo los requerimientos de calcio hasta niveles fisiológicos ( $<1 \mu\text{M}$ ) (Newton, 1997; Liu, 1996; Newton, 1995). En ausencia de DAG, la PKC se puede activar cuando las concentraciones de calcio son muy elevadas (aproximadamente cien veces el valor fisiológico) (Nishizuka, 1986). Además, el DAG incrementa la afinidad de la PKC por el sustrato (Newton, 1997; Liu, 1996; Newton, 1995).

Actualmente se piensa que el mecanismo molecular por el que el DAG activa la PKC se fundamenta en la modificación alostérica de la enzima por lípidos (Newton, 1997; Liu, 1996; Newton, 1995). En presencia de calcio, la unión de la PS y el DAG al dominio regulador N-terminal de la cPKC induce cambios conformacionales que se acompañan de la disociación de la región pseudosustrato y de su localización en el dominio catalítico. En este mecanismo el ligando de C2 (por ejemplo la PS) actuaría como un anclaje electrostático que permite mantener la PKC en la membrana y las interacciones del DAG y del calcio permitirían separar al pseudosustrato del lugar de unión del sustrato, provocando la activación máxima de la enzima (Figura 1.14) (Newton, 1997; Liu, 1996; Newton, 1995).



**Figura 1.14. Modelo de la regulación de la PKC por fosforilación, proteínas específicas y cofactores.** Los dominios (C1-C4) de la proteína quinasa C han sido descritos en el texto y aparecen esquematizados en la Figura 1.4. Según este modelo, la PKC de nueva síntesis se asocia con elementos del citoesqueleto, en una conformación en la que se encuentra expuesta el asa de activación (representada como un espacio entre el dominio C3 y C4), y la región C-terminal se dispone cerca del sitio de activación. (Adaptado de Newton, 1997 y Tapia-García, 2000).

La producción de DAG y la liberación de calcio se estimula de modo transitorio por la hidrólisis del PtdIns (4,5)P<sub>2</sub> cuando se activan las vías de la PLCβ por las subunidades α de las proteínas heterotriméricas G<sub>9</sub> y G<sub>11</sub> (Berne y Levy, 1998; Yule y Williams, 1994).

Por otra parte, la generación del DAG puede tener orígenes alternativos al PtdIns (4,5)P<sub>2</sub>, entre los que se incluyen la hidrólisis de la fosfatidilcolina (PC), de la fosfatidiletanolamina y de glicolípidos que contengan inositol (Berne y Levy, 1998; Yule y Williams, 1994; Liu, 1996).

Estas reacciones, que están catalizadas por otras isoformas de la PLC y por la fosfolipasa D (PLD), producen ácido fosfatídico que a su vez puede ser degradado a DAG por una fosfohidrolasa (Berne y Levy, 1998; Yule y Williams, 1994; Liu, 1996).

## Introducción

Después de la estimulación con agonistas se ha detectado en varios tejidos un rápido incremento en la cantidad de DAG celular, por ejemplo en el páncreas de ratón estimulado con varios secretagogos pancreáticos como colecistoquinina (CCK) y bombesina (Pandol y Schoeffield, 1986). La cantidad de DAG que se produce por la hidrólisis de los lípidos mencionados diferentes del PtdIns (4,5)P<sub>2</sub>, es mucho mayor que la generada por la hidrólisis de este último y, además, su producción se mantiene durante más tiempo (Berne y Levy, 1998; Yule y Williams, 1994; Liu, 1996) (Figura 1.15).

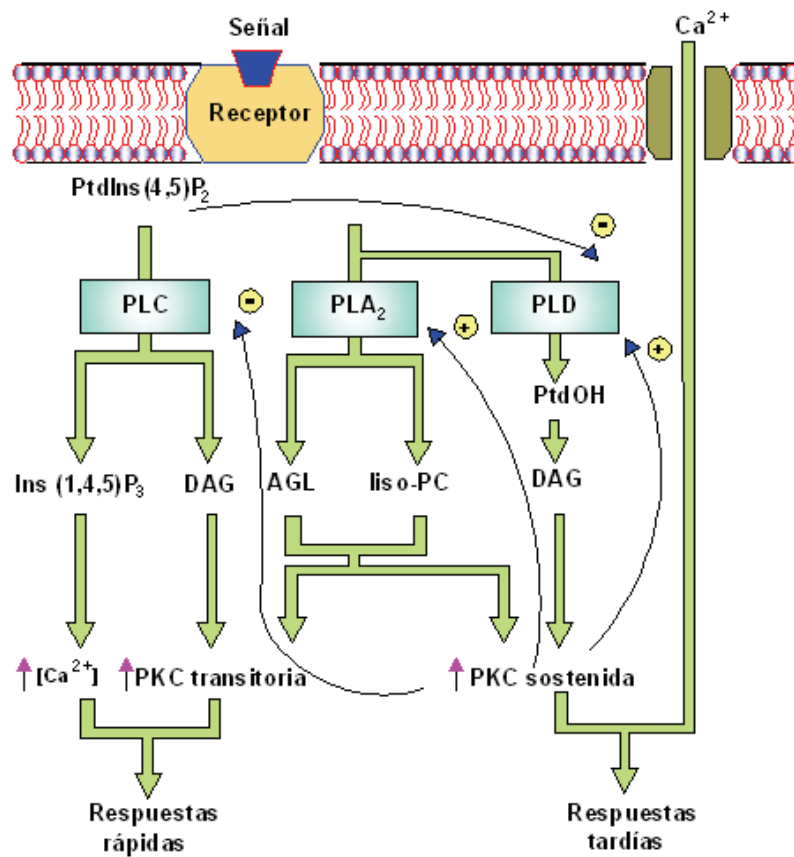


Figura 1.15. Transducción de señales mediadas por las fosfolipasas C, D y A<sub>2</sub>. (Adaptado de Tapia-García, 2000).

Ins (1,4,5)<sub>3</sub> – Inositol trifosfato  
liso-PC – liso-Fosfatidilcolina  
PLC – Fosfolipasa C

PtdIns (4,5)P<sub>2</sub> – Fosfatidilinositol bisfosfato  
DAG – Diacilglicerol  
PLA<sub>2</sub> – Fosfolipasa A<sub>2</sub>

PtdOH – Ácido fosfatídico  
AGL – Ácidos grasos libres  
PLD – Fosfolipasa D

La PLC, la PLA<sub>2</sub> (fosfolipasa A<sub>2</sub>) y la PLD pueden ser activadas por señales que son reconocidas por receptores acoplados a proteínas G, así como por otros tipos de receptores, que promueven respuestas celulares tanto rápidas como lentas. Las primeras pueden ser el resultado de

la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y la rápida activación de la PKC por los mensajeros intracelulares generados por la PLC, y las segundas pueden depender de la activación de la PKC por el DAG formado por la PLD. Los productos de la PLA2 también son activadores de la PKC y pueden participar en la aparición de ambos tipos de respuestas. Además, la modulación de algunas de las fosfolipasas puede ser el resultado de la activación de otras, ya que todas son reguladas por la PKC. La PKC activa la PLD y la PLA2, mientras que la activación por agonistas de la PLC es bloqueada por la PKC. Finalmente, el PtdIns (4,5) P2, sustrato de la PLC, es cofactor de la PLD, por lo que la actividad de esta última puede depender del consumo de dicho lípido por la primera. La importancia de estos efectos dependerá, en cada tejido, de la clase de receptores implicados, así como de la presencia de isoformas específicas de las fosfolipasas, de las proteínas G y de las PKC. Como ejemplo de respuestas rápidas podemos citar la secreción o reacciones de liberación. Algunos ejemplos de respuestas tardías son la proliferación y la diferenciación (Picatoste et al., 1996; Asaoka et al., 1992; Tapia-García, 2000).

La PKC también puede ser activada por fosfoinositoles fosfato como el fosfatidilinositol (PI), el fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP), el fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP2) y el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), en presencia de calcio y PS (Liu, 1996; Kochs et al., 1993). El PIP, PIP2 y PIP3, son sintetizados en una secuencia de fosforilación desde PI por la PI-4 quinasa, PI-5 quinasa y PI-3 quinasa, respectivamente (Liu, 1996; Kochs et al., 1993). La afinidad y potencia de estos fosfoinositoles activando la PKC se incrementa con el grado de fosforilación de cada uno de ellos, por lo tanto:  $\text{PIP} < \text{PIP2} < \text{PIP3}$ . Se ha propuesto que en presencia de calcio el PIP3 se une al dominio C1 mediante puentes de hidrógeno dependientes de sus grupos carbonilo y que interacciona electrostáticamente con el dominio C2 y el calcio mediante sus grupos fosfato; sin embargo, en ausencia de calcio, los grupos fosfato se podrían unir a grupos básicos de la PKC causando su inactivación (Newton, 1997; Liu, 1996; Newton, 1995).

Por otra parte, en contraste con los estudios previos, otros estudios realizados *“in vivo”* han demostrado que los fosfoinositoles PI(3,4)P2 y PI(3,4,5)P3 activan a las nPKCs pero no las cPKC o la PKC  $\zeta$  (Quest, 1996; Toker et al., 1994).

La activación por PI(3,4)P2 y PI(3,4,5)P3 de las nPKCs es fisiológicamente importante puesto que estos productos, que dependen de la actividad de la PI3-K, actúan potencialmente como segundos mensajeros específicos de las nPKCs (Quest, 1996; Liu, 1996). La PI3-K es activada por factores de crecimiento y por productos de oncogenes (Vanhaesebroeck et al., 1997; Leever et al., 1999) y, por lo tanto, la generación de PI(3,4)P2 y el PIP3 representa un mecanismo por el que las

## **Introducción**

nPKCs pueden mediar las señales intracelulares dependientes de factores de crecimiento y oncogenes (Quest, 1996; Liu, 1996).

Adicionalmente, todas las cPKCs, particularmente las isoenzimas  $\gamma$  y  $\beta$ II, pueden ser activadas por ácidos grasos insaturados de isomería *cis* como por ejemplo el ácido araquidónico, oleico y linoleico, que derivan de la membrana en un proceso catalizado por la PLA2 (Newton, 1997; Liu, 1996; Newton, 1995).

Estos ácidos grasos activan las cPKCs con concentraciones de calcio muy bajas ( $<1 \mu\text{M}$ ) o en ausencia de este ion, sin embargo, esta activación está muy facilitada en presencia de zinc. La activación estimulada por ácidos grasos es independiente de PS, este hecho ha sido interpretado por algunos autores como una activación de la PKC independiente de la membrana, indicando que los ácidos grasos solubles activan a la PKC *soluble* para fosforilar diferentes grupos de sustratos. Por otra parte, las nPKCs, particularmente la PKC  $\delta$ , también se activan por ácidos grasos, de hecho se activan a concentraciones menores que las cPKCs (Newton, 1997; Liu, 1996; Newton, 1995). En cualquiera de los casos, el mecanismo de activación por estos ácidos grasos no se conoce completamente (Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006; Newton, 1997; Liu, 1996; Newton, 1995).

Cantidades micromolares de acilos de cadena larga saturados o insaturados unidos al coenzima A (Acil-CoA) también incrementan la actividad de las cPKCs en presencia de DAG, PS y calcio, pero inhiben la actividad cuando las concentraciones son superiores a las fisiológicas ( $> 0.5 \text{ mM}$ ), sugiriéndose que estos Acil-CoAs son importantes moduladores de la actividad de las cPKCs, la cual es estimulada por la vía PLC/PI (Newton, 1997; Liu, 1996; Newton, 1995).

Otro hecho destacable es que el metabolito central de la hormona esteroidea vitamina D3, el 1,25-dihidroxicolecalciferol, estimula las isoformas  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  de la PKC a concentraciones fisiológicas, de forma similar al DAG (Newton, 1997; Liu, 1996; Newton, 1995). Esta activación se ha asociado con el control de la PKC en diversos efectos no genómicos estimulados por la hormona (Newton, 1997; Liu, 1996; Newton, 1995). Finalmente, la ceramida, un metabolito directo de la hidrólisis de la esfingomielina, puede activar la PKC  $\zeta$  tanto "*in vivo*" como "*in vitro*" (Newton, 1997; Liu, 1996; Newton, 1995).



### **1.4.2. Translocación de la PKC**

La PKC ha sido localizada en la fracción citosólica de las células y la activación de esta quinasa está asociada a una redistribución de la enzima desde el citosol hacia ambientes más hidrofóbicos como puede ser la membrana plasmática (Kraft y Anderson, 1983; Kanashiro y Khalil, 1998). La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  y DAG a esta quinasa en presencia de fosfatidil L-serina (PS), provoca un cambio conformacional en la PKC, incrementándose de esta forma, su hidrofobicidad (Kanashiro y Khalil, 1998). La dinámica del movimiento de la quinasa a la membrana plasmática, en respuesta a la activación de receptores de superficie celular, ocurre en tres pasos: la translocación a la membrana, el anclaje y la disociación. Se sabe que estos procesos son regulados por autofosforilaciones, aunque la quinasa se fosforile en el citosol, necesita de varias fosforilaciones para alcanzar la membrana, aún en presencia de calcio. Las fosforilaciones inciden en el aumento de la afinidad por DAG y PS. Finalmente, una vez cesada la estimulación sobre el receptor de superficie, se produce la disociación de la PKC, por un descenso de los niveles de DAG y  $\text{Ca}^{2+}$ , que inducen una autofosforilación de los dominios reguladores (Xiao et al., 2000).

También se ha descrito la capacidad de la PKC para translocarse al núcleo, cuando las células son estimuladas con ésteres de forbol, como por ejemplo, PMA (Hocevar et al., 1993; Goss et al., 1994) que es un potente promotor tumoral (Yeung y Hurta, 2001). Se puede decir que el DAG y el PMA, son homólogos fisiológicamente y pueden unirse al mismo sitio, concretamente al dominio C1 de la quinasa (Sharkey et al., 1984; Kazanietz, 2000; Brose y Rosenmund, 2002; Kazanietz, 2002); de forma que los ésteres de forbol pueden desempeñar la misma función que el DAG y activar tanto "*in vivo*" como "*in vitro*" a la PKC (Castagna et al., 1982; Sano et al., 1983; Yeung y Hurta, 2001). Los ésteres de forbol aumentan la afinidad de la PKC por el  $\text{Ca}^{2+}$  y a diferencia del DAG, el PMA obliga a la enzima a permanecer en la membrana plasmática, favoreciendo el desarrollo de procesos cancerígenos (Buchner et al., 1992; Kazanietz et al., 2001).

Hay evidencias de que la translocación de PKC es dependiente de elementos del citoesqueleto (Schmalz et al., 1996; Dykes et al., 2003); además los estudios que calculan la acumulación de PKC en la membrana sugieren que el proceso de translocación esta limitado por difusión (Saito et al., 2003). Si la translocación de la PKC implica el transporte activo por los elementos del citoesqueleto, un nuevo conjunto de interacciones proteína-proteína podrían estar implicadas en el mecanismo de translocación (Kheifets y Mochly-Rosen, 2007).

## Introducción

### 1.4.3. Proteólisis de PKC

La PKC fue descubierta como una proteína quinasa activada por proteasas (Inoue et al., 1977), aunque posteriormente se vio que la proteólisis seguía a la activación (Kishimoto et al., 1983). Se piensa que las proteasas responsables, "*in vivo*", son las proteasas neutras dependientes de calcio (calpainas I y II) (Inoue et al., 1977; Kishimoto et al., 1983). La activación proteolítica se puede realizar "*in vitro*" mediante tratamiento limitado con tripsina (Huang et al., 1989; Newton y Koshland, 1989; Schaap y Parker, 1990; Kochs et al., 1993) aunque "*in vivo*" se piensa que la activación y translocación a la membrana celular son requisitos previos a la proteólisis. No está claro si la degradación proteolítica sirve como mecanismo para inactivar la quinasa o si el fragmento catalítico liberado de la membrana o del citosol (y posiblemente de otros compartimentos celulares), es capaz de actuar como una quinasa con actividad constitutiva independiente de activadores (Hug y Sarre, 1993).

Se piensa que la región bisagra de las PKCs situada entre el borde de la región V3 y el dominio catalítico es un sitio susceptible de sufrir ruptura proteolítica por tripsina o por las proteasas neutras dependientes de calcio calpainas I y II, generando dos fragmentos distintos: el dominio regulador y el catalítico (Kishimoto et al., 1989; Saido et al., 1992; Emoto et al., 1995; Mizuno et al., 1997; Endo et al., 2000). Esta fragmentación produce una quinasa constitutivamente activa (Emoto et al., 1995; Endo et al., 2000). El fragmento quinasa producido "*in vivo*" podría jugar un papel en el control de las funciones celulares (Emoto et al., 1995; Ghayur et al., 1996) si se tiene en cuenta el hecho de que algunas respuestas celulares que implican el concurso de la PKC pueden ser bloqueadas utilizando leupeptina (inhibidor de proteasas) (Pontremoli, 1990). La especificidad del sustrato de este fragmento catalítico también difiere de la que presenta la enzima completa (Schaap y Parker, 1990; Burns et al., 1990; Dekker y Parker, 1994). Otro lugar de ruptura puede encontrarse entre las regiones del pseudosustrato y los dominios que unen zinc y, finalmente, parece que la PKC puede ser hidrolizada en un lugar dentro del dominio catalítico (Lehel et al., 1995).

Los mecanismos que eliminan la forma activa de la PKC de la célula también implican el concurso de una o más de estas rupturas proteolíticas (Liu y Heckman, 1998; Parker y Dekker, 1997; Kishimoto et al., 1989; Lu et al., 1998). Esta afirmación está fundamentada por el hecho de que las calpainas I y II se activan "*in vivo*" por concentraciones de calcio de orden micromolar y milimolar, respectivamente, y también por el hecho de que la translocación de la PKC a la membrana parece acelerar la ruptura proteolítica. Aunque aún no se ha establecido como este proceso inicia la degradación proteolítica, la translocación parece limitar o finalizar la actividad

quinasa de algún modo. Sin embargo, el fragmento catalítico podría tener actividad quinasa de forma constitutiva, al menos durante algún tiempo, cuando es liberado desde la membrana al citosol o a otros compartimentos subcelulares (Liu y Heckman, 1998; Hug y Sarre, 1993; Lu et al., 1998).

### 1.4.4. Down-regulation

Cuando la célula se expone de forma prolongada a ésteres de forbol se produce la depleción casi completa de algunas isoformas de PKC, probablemente por mecanismos de proteólisis (Hug y Sarre, 1993; Kishimoto et al., 1989). Este proceso, denominado *down-regulation*, ha sido demostrado para la mayoría de las isoformas que unen ésteres de forbol (Hug y Sarre, 1993; Kishimoto et al., 1989) (Figura 1.16). Las proteínas del citosol podrían ser degradadas en los proteosomas, mientras que las asociadas con las membranas lo serían en vacuolas o lisosomas (Pryer et al., 1992). Las isoformas PKC  $\mu$  y  $\zeta$  presentan poca afinidad por los ésteres de forbol y, generalmente, no se ven afectadas por este mecanismo (Rennecke et al., 1996; Parker et al., 1995; Olivier y Parker, 1994). Después del tratamiento con TPA, el nivel inicial de PKC  $\alpha$  se ve reducido mediante un incremento neto de la proteólisis sin variaciones en su nivel de síntesis (Young et al., 1987). Aunque se ha descrito en algunas ocasiones (Greif et al., 1992; Chen, 1993) parece que es difícil inducir una *down-regulation* completa de PKC  $\alpha$  en muchos tipos celulares (Liu, 1996; MacKenzie et al., 1997). Por el contrario, existen muchas referencias que describen una *down-regulation* completa de PKC  $\beta$  en la mayor parte de los tipos celulares (Liu, 1996; Hug y Sarre, 1993).

El efecto de la *down-regulation* en las nPKCs es variable. Las isoformas  $\delta$  y  $\epsilon$  han sido eliminadas utilizando este mecanismo en células Swiss 3T3 y C6 (Chen, 1993; Olivier y Parker, 1992); sin embargo, sólo la isoforma  $\delta$  de las nPKCs desaparece en células 3T3-F442A por *down-regulation* (MacKenzie et al., 1997).

La *down-regulation* de la PKC también puede ser inducida por el activador endógeno de esta proteína, DAG, en muchos tipos celulares. Así, se ha descrito una reducción de la PKC  $\epsilon$  en células GH4C1 después de la estimulación con DAG durante 12 horas (Akita et al., 1990). También se ha observado una *down-regulation* selectiva de PKC  $\delta$  y  $\epsilon$  cuando se induce de manera sostenida unos niveles altos de DAG por la administración de PDGF o bombesina (Olivier y Parker, 1994). La exposición de células Swiss 3T3 a un análogo sintético de DAG (1-oleil-2-acetil-sn-glicerol) también induce la *down-regulation* de PKC  $\delta$  y  $\epsilon$ , mientras que no afecta los niveles de las isoformas  $\alpha$  y  $\zeta$  (Olivier y Parker, 1994). Se necesitan administraciones repetidas de DAG para

## Introducción

causar la depleción de las diferentes isoenzimas, ya que una única dosis se metaboliza rápidamente (Olivier y Parker, 1994).

No se conoce por qué diferentes grupos de isoenzimas sufren la *down-regulation* en distintas líneas celulares, aunque se han apuntado diversas posibilidades. Una de ellas es que ciertas cPKCs pueden estar unidas a las membranas sólo de forma transitoria tras la activación y, por tanto, no ser susceptibles de degradación; es decir, haciéndolo extensible a otras isoformas, éstas pueden localizarse en diferentes estructuras en las que su susceptibilidad a la degradación está limitada (Kiley et al., 1995).

Diversos investigadores han sugerido la existencia de una vía común para la degradación de la PKC (Kishimoto et al., 1989; Freisewinkel et al., 1991; Junco et al., 1994), al demostrar que mutantes de las isoformas PKC  $\alpha$  y  $\gamma$  en las que se ha eliminado la actividad quinasa pueden sufrir *down-regulation* si se expresan en un contexto en el que se encuentra alguna isoforma PKC activa (Freisewinkel et al., 1991; Pears y Parker, 1991).

Otra evidencia que apoya esta teoría es que cuando se expresa en células COS1 una isoforma  $\alpha$  mutada en el dominio V3, no se encuentran diferencias en su cinética de *down-regulation* inducida por TPA, cuando se compara con la proteína nativa (Junco et al., 1994). Por último, aunque la *down-regulation* de las isoformas  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\eta$  transfectadas en *Schizosaccharomyces pombe* es similar a la encontrada en células de mamíferos, parece que el TPA no induce *down-regulation* de PKC  $\epsilon$  en *S. pombe* (Goode et al., 1994); sin embargo, si la PKC  $\epsilon$  se expresa en *S. pombe* junto con la PKC  $\gamma$  o  $\delta$ , entonces sus niveles se reducen marcadamente y de forma paralela a la *down-regulation* de estas últimas (Goode et al., 1995). También se ha descrito que la expresión de una PKC  $\delta$  mutante sin actividad quinasa no experimenta una *down-regulation* de forma eficaz (Parker et al., 1995), pero la coexpresión en la misma célula de la proteína mutante  $\delta$  con la isoforma original, sí que permite la *down-regulation* de la proteína sin actividad quinasa (Parker et al., 1995). Estos datos sugieren que, incluso en ausencia de actividad quinasa, la unión de TPA y la consecuente unión a la membrana y estructuras del citoesqueleto pueden permitir la *down-regulation* de las PKCs (Goode et al., 1995). Además, se ha postulado que el tráfico de vesículas detectado en *S. pombe*, estimulado por PMA, se relacionaría con incrementos en la degradación de las PKCs (Goode et al., 1995). Es evidente, que aún no puede determinarse con exactitud si la *down-regulation* de la PKC está regulada por un mecanismo pasivo o si puede estar inducida por la translocación (Liu y Heckman, 1998; Lu et al., 1998).

En adipocitos marrones de ratas recién nacidas se ha visto que un incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por insulina es dependiente de la IP3 quinasa (Lorenzo

et al., 2002). Por otro lado, se ha visto que el transporte de glucosa inducido por otros medios diferentes a la insulina parece estar implicado en la activación de cPKC por calcio (Khayat et al., 1998). También se ha percibido que la aparente resistencia a insulina está asociada con el incremento de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular, con lo cual presumiblemente se incrementa la actividad de cPKC. En adipocitos y músculo esquelético este incremento de calcio intracelular puede ejercer down-regulation del transporte de glucosa estimulado por la insulina (McCarty, 2006).

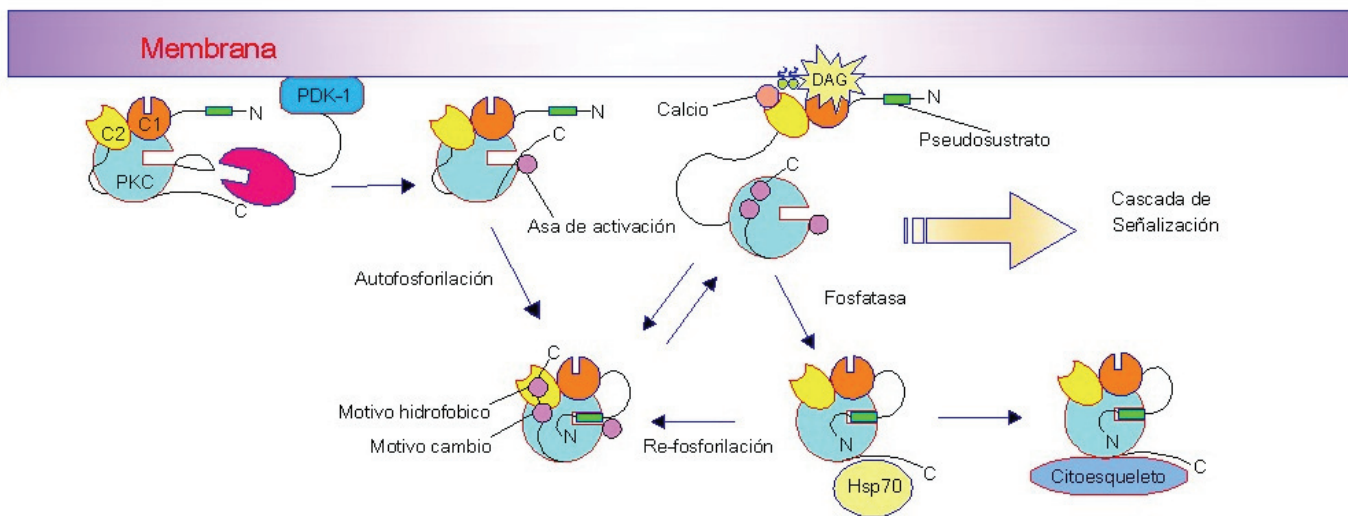


FIGURA 1.16. Modelo que muestra la transición de la PKC, desde su biosíntesis a su eventual “down regulation”. (Imagen adaptada de Newton, 2003).

### 1.5. Proteínas de anclaje de las PKC

Las proteínas que interactúan con isoformas específicas de PKC para la localización en los compartimentos especializados de la célula son llamadas proteínas de anclaje (o de corte) (Mochly-Rosen, 1995). En ausencia de estas isoformas-específicas (y probablemente tejido-específicas) anclando proteínas, la translocación puede que no sea estrictamente definida y puede depender de las variaciones de DAG y de las concentraciones de  $Ca^{2+}$ . RACK1, que fue la primera proteína de anclaje en ser aislada para PKC  $\beta$ II reveló la unión de varias isoformas de PKC inclusive PKC  $\epsilon$  y PKC  $\alpha$  (Ron et al., 1994). Vinculina y Talina, dos proteínas responsables de la localización de PKC  $\alpha$  en contactos focales, fueron aisladas por ensayos de cobertura en células REF52 (Hyatt et al., 1994). La  $\beta$ 1-integrina co-sedimentó con la PKC  $\alpha$  en un gradiente de sacarosa en células MCF-7 (Ng et al., 2001). Caveolina fue identificada como una proteína de unión de PKC  $\alpha$  a las caveolas

## **Introducción**

(Oka et al., 1997). Sin embargo, todavía se desconocen las proteínas implicadas en la localización de PKC  $\alpha$  en el núcleo (Nakashima, 2002).

Las proteínas de anclaje para las isoenzimas de la PKC activas se han denominado como receptores para quinasa C activas (RACK). Mochly-Rosen y Gordon (1998) han propuesto la existencia de otro grupo de proteínas de anclaje para las formas inactivas de la PKC que han sido denominadas receptores para quinasa C inactivas (RICK).

Se ha propuesto que las funciones únicas de la PKC están determinadas por la unión de las diferentes isoenzimas a proteínas de anclaje específicas, en una estrecha relación con un grupo particular de sustratos e independiente de otros (Mochly-Rosen y Gordon, 1998).

### **1.5.1. RICKs**

Se han identificado proteínas adicionales de unión a la PKC, todas ellas son sustrato de la PKC y unen directamente PS. La unión de PS es común en este tipo de proteínas de unión, la cual parece actuar de puente entre la PKC y dichas proteínas (Liao et al., 1994; Jaken, 1996). Entre éstas se incluyen la talina, la vinculina, sustrato de la quinasa C rico en alanina miristoilada (MARCK), AKAP79, y algunas otras (Liao et al., 1994; Jaken, 1996; Klauck et al., 1996).

Debido a que la activación de la PKC es dependiente de PS y DAG (además de calcio en algunas isoformas), el hallazgo de que la PS sola es suficiente para unir la PKC a esas proteínas sugiere que no es necesaria una activación completa de la PKC para que se produzca dicha unión (Mochly-Rosen y Gordon, 1998; Liao et al., 1994; Jaken, 1996). Esta hipótesis parece confirmarse por algunos resultados en los que se ha descrito que la PKC  $\alpha$  se localiza, en situación basal, unida a la talina de los contactos focales en fibroblastos y células renales; tras la estimulación con ésteres de forbol se produce la translocación de esta isoforma (Dong et al., 1993). La tirosina quinasa de Bruton (BTK) también une todas las isoformas de la PKC de un modo dependiente de lípidos, sin embargo, estudios "*in vitro*" han demostrado que esta unión está inhibida por ésteres de forbol (Lehel et al., 1995), sugiriendo que la BTK sólo une a la PKC en estado inactivo o no completamente activo (Mochly-Rosen y Gordon, 1998).

En su conjunto, los resultados descritos sugieren que la relación sustrato/proteína supeditada a la PS, podría ser considerada dependiente de proteínas de unión para PKC inactivas (RICK) (Mochly-Rosen y Gordon, 1998).

Entre algunas de las características predichas para estos RICK se encuentran las siguientes: no necesariamente son sustratos de la PKC, deben demostrar preferencia de unión por

formas inactivas de este enzima y, finalmente, los ésteres de forbol u otros activadores de la PKC deben inducir la separación del complejo RICK/PKC (Mochly-Rosen y Gordon, 1998).

### 1.5.2. RACKs

Se ha descrito la existencia de varias proteínas que unen sólo la forma activa de la PKC, cumpliendo una serie de criterios, y que se denominan como proteínas receptoras para quinasa C activa (RACK) (Mochly-Rosen et al., 1991).

Estas proteínas están presentes en la fracción celular particulada y unen la quinasa C activa de forma selectiva y saturable. En estos casos, un puente de PS parece no ser suficiente para establecer la unión (Mochly-Rosen y Gordon, 1998; Mochly-Rosen et al., 1991), sino que se requieren interacciones proteína-proteína directas (Mochly-Rosen et al., 1995; Mochly-Rosen y Gordon, 1998). Otra propiedad de esta interacción es que la unión de la PKC al RACK no está inhibida por péptidos sustrato, indicando que el anclaje no se produce en el lugar catalítico o lugares de fosforilación de la PKC (Mochly-Rosen et al., 1991).

La primera proteína identificada que cumplía todos estos criterios fue denominada RACK1 (Mochly-Rosen et al., 1991). Esta proteína, de 46 kDa, no es un sustrato de la PKC y, sin embargo, en su presencia la fosforilación de sustratos realizada por la quinasa se incrementa varias veces, sugiriendo que el complejo PKC/RACK1 debe corresponderse con la forma activa de la enzima "*in vivo*" (Mochly-Rosen y Gordon, 1998; Mochly-Rosen et al., 1991). Este RACK1 se co-localiza con la forma activa de la PKC  $\beta$ II en el perinúcleo de miocitos cardiacos (Ron et al., 1995), por lo que se considera que es el RACK específico de esta isoforma (Mochly-Rosen y Gordon, 1998).

Se han descrito otros RACKs para las isoformas PKC  $\epsilon$  (Csukai y Mochly-Rosen, 1999; Mochly-Rosen y Gordon, 1998) y PKC  $\alpha$  (Staudinger et al., 1995). Este último, que se denomina PICK1, es un sustrato de la PKC  $\alpha$  que une el fragmento catalítico de esta isoforma (aa. 302–672) y que está localizado en el perinúcleo celular de modo similar a la forma activa de la PKC  $\alpha$  (Staudinger et al., 1995).

## **Introducción**

### **1.6. Sustratos de PKC**

#### **1.6.1. Sustratos de PKC “in vitro”.**

Durante cierto tiempo se observó que, al menos, “*in vitro*” las cPKCs eran serina / treonina quinasas no específicas. Por tanto, cualquier proteína básica, como histona HI, HIIS, proteína básica de mielina (MBP), protamina u otros péptidos podrían utilizarse como sustratos, siempre y cuando tuvieran la secuencia XRXXS/TXRX; siendo este rasgo muy distinto de la especificidad de sustrato que presentaban muchas de las quinasas estudiadas hasta entonces. Sin embargo, una comparación de las isoenzimas de PKC y sus actividades hacia distintos sustratos, “*in vitro*”, ha mostrado diferencias que pueden indicar una cierta especificidad hacia los sustratos naturales bajo condiciones fisiológicas.

Las nPKCs presentan grandes diferencias respecto a las cPKCs ya que muestran una actividad quinasa pobre hacia histona HIIS, MBP, protamina o protamina sulfato (Dekker et al., 1992; McGlynn et al., 1992; Ono et al., 1989; Schaap y Parker, 1990). Por tanto, ha sido necesaria la utilización de péptidos sintéticos derivados de la secuencia del pseudo-sustrato, o del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) o de MBP, para ensayar la actividad quinasa de las nPKCs (Ogita et al., 1992; Saido et al., 1992).

Varias observaciones muestran que la especificidad de sustrato podría ser más compleja de lo esperado. Se cree que esta especificidad está determinada por el dominio regulador de la quinasa, ya que, por ejemplo, la activación proteolítica de PKC  $\epsilon$  hace que ésta aumente su actividad sobre histona (Schaap y Parker, 1990). Además, PKC  $\zeta$  es capaz de fosforilar al receptor de EGF cuando es proteolizada por quimotripsina, pero no cuando la enzima está intacta (Hug y Sarre, 1993). También varía el requerimiento de activador dependiendo del sustrato, así para fosforilar protamina las cPKCs y las nPKCs no necesitan de ningún activador (Bazzi y Nelsestuen, 1987; Liyanage et al., 1992).

Los isotipos de PKC muestran especificidad por la fosforilación del sustrato. Mientras PKC  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  son poderosas quinasas de histona; PKC  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\eta$  tienen una pobre capacidad de fosforilar la Histona HIIS (Kanashiro y Khalil, 1998; Salamanca y Khalil, 2005).

Por otro lado, una proteína purificada, obtenida por cromatografía en DEAE-celulosa seguida de una cromatografía de exclusión molecular, demostró poseer actividad quinasa “*in vitro*” cuando se usó la histona HIIS como sustrato, la cual fue dependiente de los cofactores requeridos para PKCs convencionales, por ejemplo fosfolípidos y calcio (Bazán-Tejeda et al., 2007).



En estudios recientes se ha visto que la formación anormal de mielina podría ser un defecto que contribuye al desarrollo de la neuropatología asociada con el síndrome de alcohol fetal. Utilizando líneas celulares CG-4 se ha demostrado previamente que etanol (EtOH) 25–75 mM provoca down-regulation en la expresión de la proteína básica de mielina (MBP) en la diferenciación de oligodendrocitos (OLGs) sin afectar el desarrollo morfológico (Bichenkov y Ellingson, 2001). Se ha demostrado que una concentración relativamente baja de PMA mimetiza la inhibición de la expresión de la MBP causada por el EtOH sin afectar a la morfología. La inhibición de la expresión de MBP por EtOH 100 mM o 1nM de PMA fue completamente contrarrestada por tres inhibidores de la PKC, la bisindolilmaleimida I, cloruro de cleveritina, y calfofina C, indicando esto que el EtOH provoca down-regulation en la expresión de MBP por la activación de la PKC. Los efectos similares producidos por PMA y EtOH indican que el EtOH demora la expresión de la MBP debido a la activación de al menos una isoenzima de PKC sensible al éster de forbol en oligodendrocitos (Bichenkov y Ellingson, 2002).

Este hallazgo sugiere que el comienzo de la expresión de la MBP requiere un control estricto, dependiente del estado de la actividad de la enzima y/o localización de la isoenzima(s) de PKC sensible al éster de forbol (Stubbs y Slater, 1999).

### 1.6.2. Sustratos de PKC “in vivo”

Mediante el marcaje de células con  $^{32}\text{P}$  y estimulación de las mismas con ésteres de forbol u otros agonistas que estimulan la PKC, se han descubierto muchos posibles sustratos fisiológicos (Hug y Sarre, 1993).

Hay tres sustratos importantes en el control de la proliferación celular: a) MARKS su fosforilación lleva a una redistribución de los filamentos de actina desde la membrana al citoplasma (Hartwig et al., 1992); b) y c) DNA topoisomerasa (Pommier et al., 1990) y lamina B (Hornbeck et al., 1988), que son proteínas nucleares implicadas en el control de la síntesis de DNA, y que darían relevancia a la translocación de la PKC al núcleo.

Las proteínas MARCKS (sustratos de la quinasa C ricos en alanina miristoilada) y proteínas relacionadas con MARCKS (MRP) están distribuidas extensamente como proteínas unidas a las membranas, son los principales sustratos de las PKCs y están implicadas en la propagación de las células, la activación de la integrina y la exocitosis (van de Bout et al., 2007). MARCKS, se une a la F-actina y puede funcionar como un puente cruzado entre la actina del citoesqueleto y la membrana plasmática (Hartwig et al., 1992).

## **Introducción**

Su importancia es debida al hallazgo de que MARCKS están implicadas directamente en la hipersecreción de mucus que ocurre durante enfermedades tales como el asma, y la bronquitis o fibrosis cística crónicas (Li et al., 2001 Song et al., 1999). Se ha demostrado que MARCKS puede estimular la secreción exocitótica uniéndose a las membranas de gránulos intracelulares de mucina.

Un fragmento N-terminal de MARCKS bloquea la exocitosis, proporcionando un posible enfoque para el control de estas enfermedades (Singer et al., 2004). En otros estudios se ha observado que la sobreexpresión de MARCKS disminuyó la adhesión celular independientemente de su posición de fosforilación (Spizz y Blackshear, 2001).

### **1.7. Inhibidores de PKC**

Se denomina inhibidor a toda sustancia que se une a una enzima y reduce la velocidad de la reacción que cataliza. La inhibición de algunas enzimas por inhibidores específicos constituye un importante sistema de regulación de las reacciones que ocurren en las células y en ciertos casos tiene aplicaciones clínicas.

La heterogeneidad de PKC y el complejo número de cofactores requeridos por esta enzima ofrecen varios mecanismos diferentes para su inhibición. Los inhibidores del dominio catalítico se pueden unir en el sitio de unión del sustrato o en el sitio de unión del ATP (Evcimen y King, 2007). Los inhibidores de PKC que actúan en el sitio catalítico compiten con el ATP y por lo tanto pueden ser no específicos. Los inhibidores que actúan en el dominio regulador compiten con el DAG/ésteres de forbol o el sitio de unión de la fosfatidilserina y pueden ser más específicos. La exposición prolongada a ésteres de forbol puede producir específicamente la down-regulation de la PKC  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ , pero las propiedades de promoción de tumores de los forboles hace que su uso este limitado (Salamanca y Khalil, 2005).

Entre los inhibidores más potentes están los que actúan por inhibición competitiva de la unión de ATP. Estos serían, bisindolilmaleimidias e indolcarbazoles, son derivados de la estaurosporina, y adicionalmente pueden mostrar selectividad sobre isotipos de PKC (Martiny-Baron et al., 1993; Wilkinson et al., 1993; Evcimen y King, 2007), preferentemente inhibiendo a las isoformas  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes ( $\alpha$  y  $\beta$ ) sobre las isoformas  $\text{Ca}^{2+}$  independientes ( $\delta$  y  $\epsilon$ ). En contraste, se ha demostrado que la estaurosporina provoca la translocación selectiva de PKC  $\delta$  y  $\epsilon$  de la fracción soluble a la fracción particulada en células GH4C1 (Kiley et al., 1992), inhibiendo la actividad catalítica de todos los isotipos de PKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) presentes en estas células. Estos datos sugieren que la translocación a la fracción de membrana puede ser inducida en ausencia de actividad catalítica (Ryves et al., 1991). Una posible explicación para estos efectos puede ser la

existencia de receptores intracelulares para la PKC activa (RACKS) (Ron et al., 1994); es posible que activando la PKC puedan unirse a estos receptores intracelulares, mientras que la enzima catalíticamente no activa (o inhibida) puede ser incapaz de unir estos receptores y ejercer sus efectos en cascada.

La familia de PKC es sin duda un blanco atractivo para la intervención terapéutica dado su papel en la tumorigénesis y el potencial para incrementar la citotoxicidad de las drogas existentes. La existencia de diferentes isoenzimas proporciona una oportunidad para desarrollar agentes farmacológicos que tengan como objetivo las funciones específicas de la PKC. Sin embargo, la complejidad natural de muchos sistemas de segundos mensajeros que implican a la PKC hace difícil la acción selectiva de las drogas. De los actuales agentes farmacológicos disponibles hay pocos que exhiban un alto grado de selectividad para isoformas de PKC específicas, y la mayoría también actúan sobre otras PKs.

La estaurosporina, alcaloide microbiana, fue identificada hace 20 años como un agente antiproliferativo y un potente inhibidor de la PKC. Ésta probablemente actúe por competición del sitio de unión del ATP conservado. Además la especificidad por isoformas de PKC es escasa, la estaurosporina ha permitido desarrollar algunos inhibidores para las nPKCs (Way et al., 2000).

Drogas tales como la N-benzoil-estaurosporina (PKC412) y 7-hidroxiestaurosporina (UNC01) exhiben una buena selectividad, con un efecto "in vivo" potencialmente mejor y han sido utilizadas contra el aumento de los efectos provocados por otros agentes citotóxicos (Mackay y Twelves, 2003).

El papel de la PKC en la tumorigénesis y la apoptosis sugiere que la combinación de inhibidores de la PKC con citotóxicos convencionales puede ser efectiva. Evidencias en datos de líneas celulares y en las fases tempranas de procesos clínicos sugieren resultados prometedores para la combinación de citotóxicos convencionales con la existencia de inhibidores de PKC (Alkan et al. 1993, Bunch y Eastman 1996, Wang et al. 1998, Ilson et al. 2001).

Hay varios inhibidores de PKC que actúan en la región C1 del dominio regulador. Estos inhibidores afectan a la unión del éster de forbol. En la actualidad hay varios inhibidores que actúan en la región C1, que contienen la secuencia de unión del pseudosustrato (House y Kemp, 1987) y el dominio de unión del éster de forbol a PKC (Quest y Bell, 1994). La Calphostina C fue el primer inhibidor de PKC potente (50-500 nM) y selectivo que actuaba en el sitio de unión del éster de forbol (Kobayashi et al., 1989; Tamaoki, 1991; Cabell y Audesirk, 1993).

También se conocen diferentes inhibidores que afectan a la interacción PKC fosfolípido, y estos inhibidores tienen varios mecanismos de acción (Gordge y Ryves, 1994). Se ha determinado

## **Introducción**

que el propanolol es un inhibidor competitivo de la unión de fosfatidilserina a la PKC (pero también inhibe competitivamente la unión del éster de forbol y no competitivamente inhibe la unión del ATP) (Sozzani et al., 1992).

La curcumina según parece ha mostrado modular la actividad de proteínas emparentadas tales como las proteína quinasas (Liu et al., 1993; Hasmeda y Polya, 1996), ATPasas de membrana (Zheng y Ramirez, 2000; Logan-Smith et al., 2001; Sumbilla et al., 2002; Mahmmoud, 2005) y factores de transcripción (Singh y Aggarwal, 1995; Choi et al., 2006). Esta amplia especificidad sugiere que la curcumina interactúa con dominio/s comunes en las proteínas diana. Los mecanismos moleculares que están detrás de los efectos fisiológicos de la curcumina aún no se conocen por completo. En particular, una de las principales controversias ha sido conocer si el consumo de curcumina puede proporcionar un camino seguro para el tratamiento de la fibrosis quística (Egan et al., 2002, 2004; Song et al., 2004; Mall y Kunzelmann, 2005; Grubb et al., 2006). La curcumina, el activo constitutivo de *Curcuma longa*, es uno de los componentes naturales mejor estudiados. La curcumina ha sido usada como especia y agente colorante durante cientos de años, pero ha sido recientemente cuando se ha comenzado a usar como anti-inflamatorio, antiviral, anti-infeccioso y con efectos anti-cancerígenos (Surh, 2003; Joe et al., 2004; Singh y Khar, 2006). Adicionalmente, los efectos farmacológicos de la curcumina han sido comprobados recientemente por estudios epidemiológicos (Ng et al., 2006). La interferencia positiva de la curcumina con los efectos de promoción de tumores de los ésteres de forbol ha sido atribuida presumiblemente a efectos inhibitorios directos de la curcumina en el receptor del éster de forbol, la PKC (Lin et al., 1997). Se ha observado que la adición de curcumina en ensayos de fosforilación de la PKC resulta en la estimulación, y no en la inhibición, de la PKC catalizadora de la fosforilación del sustrato unido a la membrana (Mahmmoud, 2007). Esto, sin embargo está en desacuerdo con trabajos previos que documentan la inhibición de la actividad de la PKC por la curcumina “*in vivo*” (Liu et al., 1993) e “*in vitro*” usando sistemas libres de membrana (Reddy y Aggarwal, 1994). Por ello, también se han investigado los efectos de la curcumina en la PKC en un sistema de membrana reconstituido bien definido y en membranas plasmáticas nativas aisladas. Se ha concluido que los efectos de la curcumina en la PKC y posiblemente en otros blancos de la curcumina pueden ser cambiados de la inhibición a la estimulación por la concentración de  $Ca^{2+}$  (Mahmmoud, 2007).

Se ha conseguido demostrar que la curcumina compite con el calcio por el dominio regulador de la PKC. Este efecto es dependiente de una interacción entre la quinasa y el polifenol. Se requieren más análisis del sitio de interacción de la curcumina en algunas de estas dianas para

conseguir más información sobre los requerimientos mínimos para la interacción con la curcumina (Mahmmoud, 2007).

Otro tipo de inhibidores serían los agentes disruptivos de membrana, es poco probable que estos inhibidores que actúan alterando la membrana celular sean específicos de PKC, y entonces se precisa de otros mecanismos de señalización que requieren alguna forma de asociación a la membrana (Ozer et al., 1993; Slater et al., 1993; Takeuchi et al., 1992).

Agentes disruptivos de membrana también pueden producir una modulación uniéndose a la región C1. Trasladar estos efectos (y el efecto selectivo de inhibidores de PKC en diferentes isotipos de PKC *“in vitro”*) a células en cultivo y situaciones *“in vivo”* puede ser problemático. Además la expresión de isotipos específicos de PKC, y la compartimentación y localización subcelular, son factores que ayudan en la designación y explicación de inhibidores específicos de isotipos *“in vivo”* (Gordge y Ryves, 1994).

Las proteínas inhibidoras de PKC representan otra clase de inhibidores específicos de PKC. Estas proteínas incluyen varios péptidos tóxicos aislados de gusanos marinos y de cobra venenosa, recientemente se ha demostrado que existen diferentes isoformas que inhiben competitivamente la PKC con respecto a la fosfatidilserina y de manera mixta con respecto al DAG (Chiou et al., 1993). Varias proteínas inhibidoras de PKC (KCIP-1) han sido aisladas de cerebro bovino y ovino (Mc Donald y Walsh, 1985), las cuales unen calcio y son termolábiles (Fraser y Walsh, 1991; Toker et al., 1992). Estas proteínas pueden contribuir a la regulación celular y permitir la realización de un análisis más exhaustivo de los procesos regulados por PKC, si bien ya se ha propuesto que en tejido de miocardio la fosfatasa 2a es el mayor regulador de efectos mediados por PKC (Braconi et al., 1992).

Péptidos inhibidores de pseudo-sustrato constituyen otra clase de inhibidores que también son específicos de PKC, e indudablemente son usados en el estudio de eventos mediados por PKC. Se ha demostrado que un número de drogas usadas clínicamente inhiben la actividad de PKC. Entre estas se incluyen suramina, adriamicina, dibucaina, etc. Ninguno de estos agentes son inhibidores selectivos de PKC.

## **Introducción**

### **1.8. PKC en eucariotas inferiores**

Además de en mamíferos, PKC o proteínas relacionadas con la PKC se han encontrado en eucariotas inferiores tales como levaduras (Levin et al., 1990; Ogita et al., 1990; Simon et al., 1991; Iwai et al., 1992); en otros organismos como *Drosophila* (Rosenthal et al., 1987; Schaeffer et al., 1989; Choi et al., 1991), *Caenorhabditis elegans* (Tabuse et al., 1989); *Dictyostelium* (Jiménez et al., 1989; Luderus et al., 1989) y oocitos de *Xenopus laevis* (Chen et al., 1988; Otte et al., 1988; 1991; Domínguez et al., 1992; Otte y Moon, 1992; Sahara et al., 1992).

En *Saccharomyces cerevisiae* se han encontrado tres isoformas similares a las PKCs del grupo de las clásicas; estas isoformas fueron activadas por  $Ca^{2+}$ , PS y DAG o PMA, utilizando la histona III-S como sustrato (Simon et al., 1991). Por el contrario, Ogita y sus colaboradores (1990) aislaron una PKC a partir de *S. cerevisiae*, que fue activada por  $Ca^{2+}$ , PS y DAG, pero no por PMA. En *Drosophila* se han encontrado tres isoformas de la PKC, dos son similares a las PKCs clásicas de mamíferos y la tercera es homóloga a la PKC  $\delta$  (Schaeffer et al., 1989).

#### **1.8.1. PKC en moluscos**

Por clonaje molecular Kruger y sus colaboradores (1991) obtuvieron evidencias acerca de la existencia de dos isoformas de PKC en el molusco marino *Aplysia californica*, Apl I y Apl II, las cuales se expresan abundantemente en el sistema nervioso.

En las neuronas de *Aplysia*, la activación de la PKC está implicada en la modulación neuronal (Strong et al., 1987; Conn et al., 1989; Sawada et al., 1989; Taussing et al., 1989; Sacktor y Schwartz, 1990), que incluye la facilitación presináptica entre las neuronas sensoriales y las motoras; un proceso celular que está implicado en la sensibilización o deshabitación (Gingrich y Byrne, 1985; Hochner et al., 1986; Braha et al., 1990).

La quinasa Apl I es fuertemente activada por los ácidos grasos de configuración cis, pero sólo en presencia de  $Ca^{2+}$ . Además, funcionalmente Apl I es más parecida a las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de vertebrados que a la isoforma  $\gamma$  neural de vertebrados. La quinasa Apl II es  $Ca^{2+}$  independiente y se parece a la PKC  $\epsilon$  de vertebrados (Sossin et al., 1993; Sossin y Schwartz, 1992).

### **1.8.2. PKC y PKA en *M. galloprovincialis***

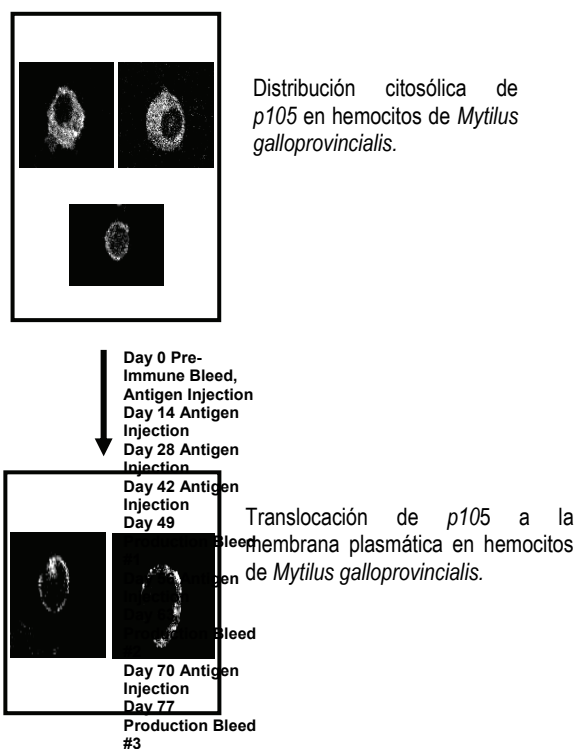
Nuestro grupo de trabajo ha abordado como objetivo durante los últimos años el estudio de las proteínas quinasas. Así se ha purificado una proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) de manto de *M. galloprovincialis* (Cao et al., 1995; Cao et al., 1998) que se ha visto involucrada en la fosforilación de la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) de manto de la misma especie (Fernández et al., 1998). Además se ha podido correlacionar los índices de actividad quinasa con los niveles de AMPc, en el mismo tejido (Díaz-Enrich et al., 1998).

Por otra parte en *M. galloprovincialis* (*Lmk*) han sido identificadas en manto, branquias y pie, 3 isoformas de PKC, que fueron reconocidas como PKC  $\alpha$ , PKC  $\beta$  y PKC  $\delta$ , mediante la utilización de anticuerpos contra las respectivas isoenzimas de mamífero (Barcia et al., 1997).

Más recientemente nuestro grupo de trabajo ha purificado y caracterizado bioquímicamente una nPKC en el manto de mejillón con un peso molecular de 105 kDa, la cual se ha denominado como p105 (Mercado et al., 2001), presenta actividad quinasa dependiente de fosfatidil L-serina y PMA e independiente de  $Ca^{2+}$ . Se comprobó que la **p105**, estaba presente en manto, branquias, pie, músculo aductor posterior, hepatopráncreas y hemocitos de *M. galloprovincialis*. “*In vitro*”, la proteína **p105** es capaz de autofosforilarse sin la presencia de cofactores lipídicos (Mercado et al., 2002a; 2002b), los parámetros cinéticos de esta proteína, la asemejan a una isoforma nPKC de mamíferos.

Mediante análisis con microscopía confocal, se detectó que **p105** tenía una distribución citoplasmática homogénea y que no estaba presente en el núcleo (Figura 1.17). Debido al conocimiento de la susceptibilidad que presentan las isoformas de PKC frente a la estimulación con ésteres de forbol, se estudió el comportamiento de la enzima (*p105*) en cultivos de hemocitos expuestos a un tipo de forbol, concretamente el PMA. En la figura 1.16, se aprecia la translocación que sufre *p105* a la membrana cuando los hemocitos son expuestos a PMA (Mercado et al., 2003).

## Introducción



**Figura 1.17.** Distribución citosólica y translocación de p105 en hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* (Mercado et al., 2003).

A lo largo de los últimos años, diversos grupos de investigación enfocaron sus trabajos sobre el estudio de la generación de NO (óxido nítrico) por hemocitos de diferentes especies de invertebrados como por ejemplo *M. edulis* (Conte y Ottaviani, 1995; Franchini *et al.*, 1995), *M. galloprovincialis* (Arumugan *et al.*, 2000a; 2000b; Gourdon *et al.*, 2001; Torreilles y Guèrin, 2001), *Ruditapes decussatus* y *Crassostrea gigas* (Arumugan *et al.*, 2000a; 2000b), debido a la implicación de esta molécula en la respuesta del sistema inmune. Sin embargo, a diferencia del trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, todos estos estudios sobre la producción de NO, se realizaron con hemocitos extraídos directamente del animal, sin estabilizar las células en un medio celular. En nuestro laboratorio, el medio empleado para el cultivo primario de hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* interfiere en la cuantificación del NO realizado por el método de Griess (Schulz *et al.*, 1999), por lo que se adaptó un medio alternativo, denominado ALS suplementado, en el cual las células se mantuvieron en fase estable durante 3 días. Incubando los hemocitos durante tres días previamente a la estimulación se consigue el óptimo en la respuesta (Cao *et al.*, 2003), así como minimizar el efecto de cualquier manipulación del mejillón antes de la extracción de los hemocitos. De hecho, a pesar del estado del mejillón o de la temporada de colección, los hemocitos que son



incubados no liberan catecolaminas si no son estimulados (Lacoste et al., 2002; Malham et al., 2003; Cao et al., 2004a,b).

En hemocitos de moluscos marinos, citoquinas de mamíferos, factores de crecimiento y hormonas inducen una respuesta al estrés consistente en la modulación de la fagocitosis, el incremento de la movilidad celular o la síntesis de catecolaminas y liberación de radicales libres (Ottaviani y Franceschi, 1996; Ottaviani, 2004). La síntesis de NO en invertebrados marinos es inducido por sistemas de señalización celular que son parcialmente conocidos (Palumbo, 2005; Conte y Ottaviani, 1995). En hemocitos de mejillón, algunos intermediarios pueden relacionar la síntesis de este gas con procesos relacionados con el estrés (Ottaviani et al., 2001; Cao et al., 2004a) y, en este sentido la IL-2 está implicada en la síntesis de catecolaminas y en la síntesis de NO (Ottaviani et al., 1994; Ottaviani et al., 1997; Ottaviani et al., 1998; Cao et al., 2004b; Novás et al., 2004).

Al igual que sucede con los diferentes tipos celulares de vertebrados, la respuesta de hemocitos de *M. galloprovincialis* varía según el inductor utilizado. El ejemplo más evidente lo representa el LPS, dado que diversos trabajos apoyan la consideración del lipopolisacárido como uno de los mejores inductores de respuestas del sistema inmune (Lowenstein et al., 1993; Xie et al., 1993; Weiss et al., 1994; Alley et al., 1995; St-Denis et al., 1998; Eun et al., 2000; Yamate et al., 2001; Zinyama et al., 2001).

Aunque el LPS no induce la síntesis directa de NO, en hemocitos se conoce la implicación de esta molécula en la liberación de catecolaminas (Cao et al., 2004a), las cuales ya habían sido detectadas anteriormente en varios tejidos de moluscos (Sloley et al., 1990; Voronezhskaya et al., 1999) y en la hemolinfa de moluscos gasterópodos (Manger et al., 1996; Pani y Croll, 2000; Santhanagopalan y Yoshino, 2000).

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la PKA y p105 están implicadas en mecanismos de señalización en hemocitos estimulados con IL-2 y LPS. Estos datos implican una probable intervención de PKA y p105 en la liberación de catecolaminas inducida por LPS o IL-2 en los hemocitos de mejillón (Cao et al., 2004b).

De hecho, PKA y p105 tienen un papel opuesto en la regulación de la producción de noradrenalina inducida por IL-2 en hemocitos de mejillón, la inhibición de PKA coincide con un decrecimiento en la producción de noradrenalina, mientras que la inhibición de p105 causa un incremento significativo en la liberación de esta catecolamina. Este resultado coincide con el obtenido por Choi et al. (1999) en células bovinas cromafines, lo que indica el diferente papel de

## **Introducción**

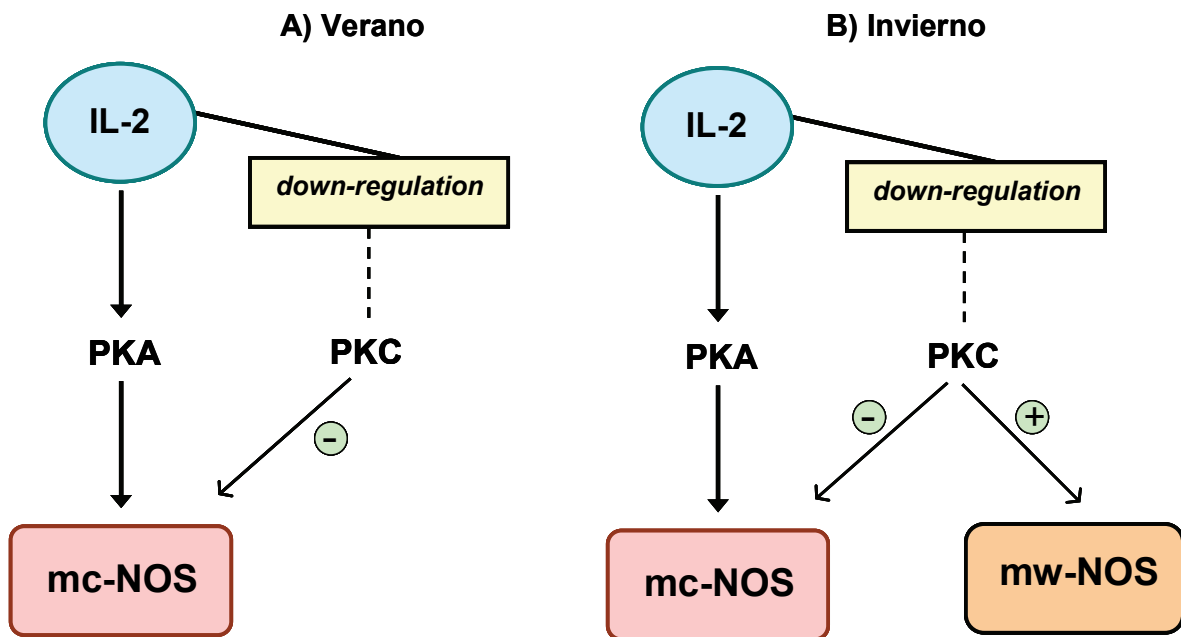
PKA y PKC en la regulación de genes implicados en la síntesis de enzimas responsables de la producción de catecolaminas (Cao et al., 2004b).

En diferentes tejidos de *Mytilus*, muchos balances metabólicos muestran variaciones estacionales, y la habilidad de llevar a cabo la respuesta inmune difiere especialmente entre hemocitos extraídos en diferentes estaciones (Cao et al., 2007a,b; Novás et al., 2007a).

Durante el invierno, se observó que los hemocitos producían una elevada concentración de NO al ser incubadas las células con IL-2, pero esta producción se bloqueaba al emplear en las incubaciones un inhibidor de la PKA. Durante el verano, aunque la producción era menor que la observada durante el invierno, la incubación de hemocitos con un inhibidor de la PKA, suponía un descenso en la síntesis de NO, aunque no tan brusco como en invierno. Estos resultados, obtenidos durante el período invernal y estival, permitieron relacionar la PKA con la producción de NO.

El empleo de un inhibidor de la PKC provocó efectos diferentes a los observados en las incubaciones realizadas con un inhibidor de la PKA. Así, aunque durante el invierno se apreció un descenso en la producción de NO al emplear un inhibidor de la PKC, resulta llamativo el hecho de que en verano aún incubando las células con este inhibidor, se produjese un incremento en la síntesis de NO. Estos datos sugirieron que en la producción de NO por hemocitos de *Mytilus galloprovincialis*, la PKC podría estar implicada al menos en dos rutas (figura 1.18).

Una relacionada directamente con la síntesis de NO, dado que durante el invierno, se observa una disminución de la síntesis de NO al inhibir la PKC. Y otra en la que la PKC podría regular a la PKA, tal como sucede en células musculares de vertebrados (Graves *et al.*, 1996), puesto que durante el verano se incrementa la producción de NO, aunque esté inhibida la PKC (Novás et al., 2007b). Es decir, en presencia de IL-2, PKA activa la síntesis de NO a través de la enzima constitutiva mc-NOS. En invierno, la acción de la PKC sobre la nueva forma inducible mw-NOS permitiría incrementar la síntesis de NO inducida por IL-2 (Barcia y Ramos-Martínez, 2008).



**Figura 1.18.** Diagrama esquemático que ilustra la hipotética implicación de la PKA y PKC en dos mecanismos estacionales de síntesis de NO inducidos por IL-2. **A.** Modelo para el verano. **B.** Modelo para el invierno.

Las líneas discontinuas representan el efecto inhibitorio de la down-regulation. **mc-NOS:** Isoforma constitutiva; **mw-NOS:** Isoforma inducible. (Imagen tomada de Barcia y Ramos-Martínez, 2008).

Durante los años 2003 y 2004, curiosamente años posteriores a uno de los mayores desastres ecológicos ocurridos en las costas gallegas (vertido de fuel por el *Prestige* en noviembre de 2002), se apreciaron cambios en el comportamiento de los hemocitos en relación al observado durante los dos años anteriores, en los que se detectó producción de NO.

Los resultados de los ensayos en la producción basal de NO, y principalmente, la respuesta de los hemocitos contra la IL-2 indican la utilidad de *Mytilus* como biosensor, a juzgar por las consecuencias del vertido de fuel sobre la respuesta inmune de los moluscos (Ruiz-Villareal et al., 2006; Soriano et al., 2006). La polución inactiva la producción basal de NO, y también cancela el mecanismo de producción de NO inducido por IL-2 durante los ensayos realizados (Novás et al., 2007a), y es compatible con la situación de inmunodepresión (Laffon et al., 2006).

Diversos estudios realizados con *M. galloprovincialis*, han confirmado que la existencia de determinados aceites y/o hidrocarburos en agua de mar provocan cambios en la expresión de determinadas proteínas en esta especie (Middaugh et al., 1996, 1998; Shelton et al., 1999; Snyder et al., 2001) y por otra parte se ha comprobado que la presencia de p.p.m. de hidrocarburos en

## **Introducción**

agua marina, provoca la inhibición del desarrollo embrionario de varias especies de invertebrados, como las estrellas de mar (Spies y Davis, 1982).

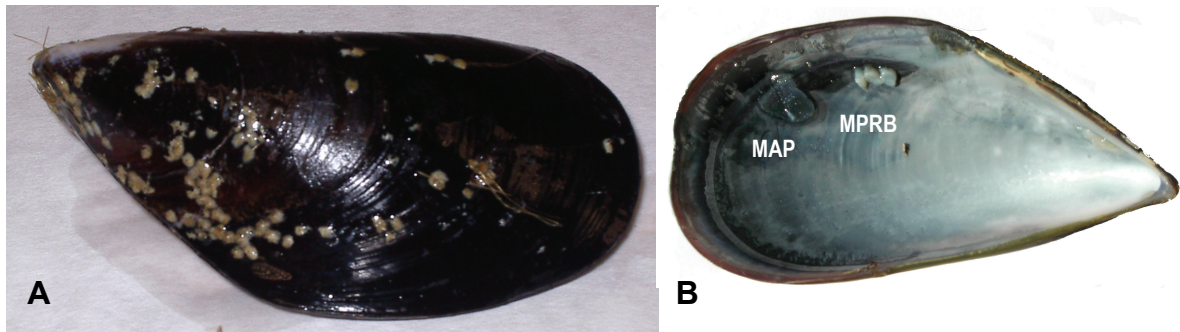
### **1.9. El modelo experimental: *Mytilus galloprovincialis* Lmk**

En las costas europeas está comprobada la existencia de tres especies diferentes de mejillón (*M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*). En contra de lo que se creía hasta hace unos años, cuando se identificaba al mejillón gallego como *Mytilus edulis*, estudios morfológicos y genéticos han confirmado que los mejillones presentes en las costas de Galicia pertenecen al Phylum Mollusca, Clase Bivalvia, Orden Mytiloidea, Género *Mytilus*, Especie *galloprovincialis* (Sanjuan *et al.*, 1986; 1990; 1994; Sanjuán, 1992).

Los mejillones del género *Mytilus* se localizan en aguas litorales y sublitorales poco profundas, tanto en litoral abierto como en estuarios de aguas salobres. Preferentemente se asientan en lugares de aguas movidas y viven de forma sésil adheridos por medio del biso a sustratos resistentes, como rocas, guijarros y arenas de mar compactas. El tipo de vida, así como su localización litoral lo exponen a las condiciones típicas de la vida intermareal, en la cual uno de los principales condicionantes es la exposición periódica al aire durante la marea baja. El límite superior de supervivencia de esta zona viene impuesto por la duración del período de exposición al aire y por el grado de humedad disponible durante ese tiempo.

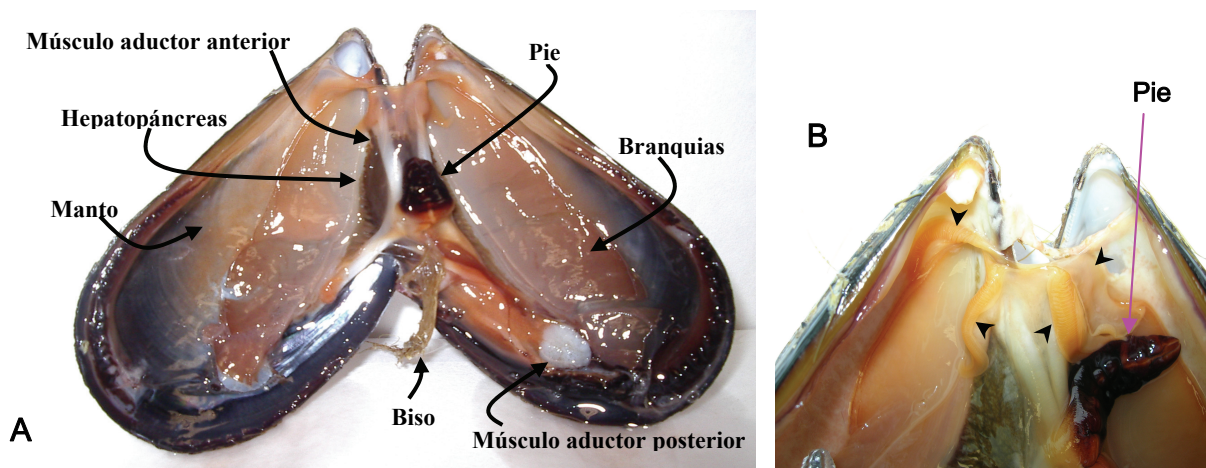
Los moluscos bivalvos son animales protóstomos celomados, con simetría bilateral (o secundariamente asimétricos) y no segmentados. Presentan una concha que se encuentra formada por dos valvas iguales, unidas dorsalmente y entre las cuales se dispone el cuerpo y la cavidad paleal (Brusca y Brusca, 2005). Aunque las valvas se mantienen unidas mediante una bisagra situada en la parte antero dorsal, formada por una banda estrecha y elástica de naturaleza proteica, denominada ligamento, se articulan por medio de la charnela, una estructura de 3-4 pequeños dientecillos, en la región bisagra de cada valva, que encajan con los de la valva contraria (Bardales, 2008).

Las valvas están constituidas por un delgado periostraco de naturaleza orgánica, la conquiolina, que recubre una serie de dos a cuatro capas calcáreas, que a su vez, suelen estar formadas por aragonito o una mezcla de aragonito y calcita. Cada valva presenta una protuberancia dorsal denominada umbo, a partir de la que se pueden apreciar líneas de crecimiento concéntricas (Brusca y Brusca, 2005) (Figura 1.19).



**Figura 1.19.** A. Ejemplar de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. B. Morfología de la concha de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. MAP: Músculo aductor posterior; MPRB: Músculo retractor del biso posterior.

La musculatura se encuentra adherida a la concha y son los músculos aductores, anterior (MAA) y posterior (MAP), los más destacados. Estos músculos están constituidos por dos tipos de fibras, estriadas y lisas, lo que les permite cerrar las valvas rápidamente y durante largos períodos de tiempo (Durán *et al.*, 1990; Brusca y Brusca, 2005; Bardales, 2008) (Figura 1.20).

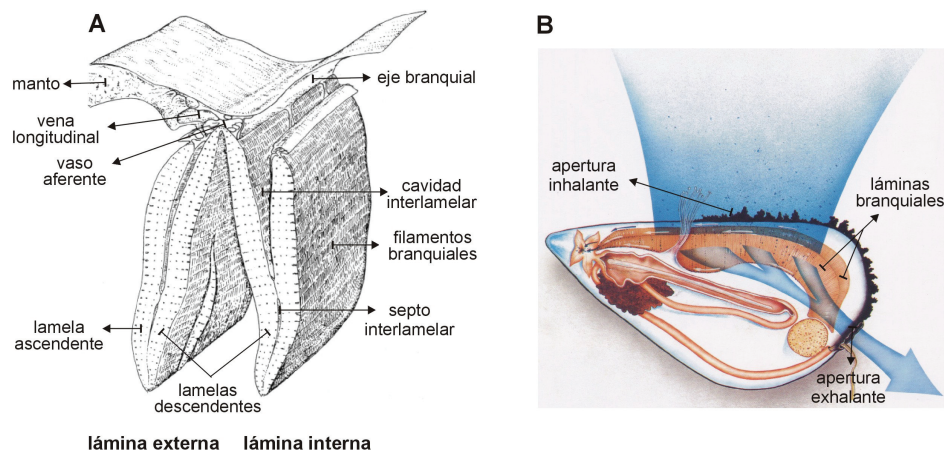


**Figura 1.20.** A. Morfología de un individuo de la especie *Mytilus galloprovincialis*. B. Localización de los palpos labiales (cuatro flechas).

En la cavidad paleal sobresalen las branquias, que además de actuar como órgano respiratorio, colaboran en la alimentación. Las branquias o “ctenidia” son unas estructuras laminares de color marrón, situadas entre el manto y la masa visceral (Morton, 1992; Le Penneec *et al.*, 2003a). Cada una de las dos branquias está formada por dos láminas: una externa -más próxima al manto- y otra interna. A su vez cada lámina branquial está formada por dos lamelas: la lamela descendente, interior, que se dirige hacia la parte ventral, y que continúa con la lamela ascendente, exterior que se dirige hacia la parte dorsal (Bardales, 2008) (Figura 1.21). Los bivalvos y concretamente *M. galloprovincialis* son animales filtradores que adquieren el alimento suspendido en el agua del mar

## Introducción

por un mecanismo de tamizado por medio de cilios. El agua es arrastrada a través de los poros que hay en las branquias y las partículas alimentarias quedan pegadas a una capa de mucus.



**Figura 1.21.** (A) Estructura de las láminas branquiales en corte transversal. (B) Esquema de entrada y salida del agua de mar portando partículas alimenticias a través del cuerpo del mejillón.

Los palpos labiales son unas estructuras delgadas y alargadas, con forma triangular, que rodean la boca. Su función es seleccionar y conducir la entrada de alimento, captado por las branquias, al aparato digestivo (Morton, 1992; Le Pennec et al., 2003b). Las partículas recogidas por las branquias y no aptas para ser ingeridas son envueltas en mucus y expulsadas al exterior constituyendo las pseudoheces (Bardales, 2008).

El aparato digestivo de este organismo está diferenciado en boca (rodeada de palpos labiales), esófago, estómago e intestino, rodeado de glándula digestiva o hepatopáncreas. La mayor parte de los procesos digestivos tienen lugar en los divertículos digestivos, que comunican el estómago con el hepatopáncreas (Brusca y Brusca, 2005). La glándula digestiva, también conocida como hepatopáncreas, es una gran masa compacta, de color marrón, que rodea el estómago y una parte del intestino. Se compone de numerosos divertículos digestivos que desembocan en un ducto secundario, no ciliado. Los ductos secundarios, a su vez confluyen en los ductos primarios, ciliados, que desembocan en el estómago (Bardales, 2008).

Los divertículos digestivos están formados por dos tipos de células, las células digestivas o acidófilas y las piramidales (secretoras) o basófilas, caracterizadas por poseer un extenso retículo endoplasmático, abundancia de ribosomas, aparato de Golgi muy activo y numerosas vesículas apicales, rasgos típicos de células que sintetizan y secretan proteínas (Bardales, 2008; Owen, 1966).

El manto es el principal tejido de reserva del molusco y permanece adherido a la concha por unas fibras musculares que constituyen la línea o seno paleal. El borde del manto presenta tres pliegues: externo, medio e interno (Morton, 1992). El pliegue externo se relaciona con la secreción de la concha; el medio desempeña la función sensorial, mientras que el pliegue interno contiene músculos radiales y circulares, involucrados en el movimiento del agua dentro de la cavidad del manto (Bardales, 2008; Brusca y Brusca, 2005).

Los mejillones son moluscos bivalvos de sexos separados (especie gonocórica), (Skibinski *et al.*, 1994; Zouros *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 1995), con una baja incidencia de hermafroditismo (Seed y Suchanek, 1992; Beaumont y Abdul-Martin, 1994). No existe dimorfismo sexual; externamente los dos sexos son iguales, por lo que es necesario realizar un examen macroscópico o microscópico del tejido del manto para poner de manifiesto el sexo del individuo (Mikhailov *et al.*, 1996) Figura 1.22.



**Imagen 1.22.** Determinación del sexo del mejillón por observación del color de la vianda. Naranja rojiza en las hembras y blanco cremoso en los machos.

El sistema reproductor en *Mytilus edulis* fue descrito en detalle por White (1937). Las gónadas están alrededor de las asas intestinales, y aunque son pares, se hallan tan próximas que aparentan una sola, conociéndose más como «joroba o glándula de polichinela» que forma parte de la masa visceral. En estos moluscos, la gónada no es un órgano diferenciado sino que se desarrolla invadiendo el tejido del manto durante el ciclo reproductor. Por tanto su volumen y aspecto externo varía a lo largo de la gametogénesis (Bardales, 2008).

El pie es un órgano musculoso, con forma de hoja y comprimido lateralmente, cuyos movimientos se consiguen por una combinación de acciones musculares y de presión hidráulica.

## **Introducción**

Secreta gránulos de naturaleza proteica, que posteriormente se endurecen en forma de filamentos, constituyendo el biso, cuya función es el anclaje del molusco (Marshall y Williams, 1980; Durán *et al.*, 1990; Brusca y Brusca, 2005). El pie y el biso se mueven con respecto al cuerpo por acción de una serie de músculos extrínsecos, en forma de cuerda y en número par, que se unen por uno de sus extremos a la concha y por el otro se insertan en la base del pie o a nivel de la glándula del biso. Se denominan músculos retractores del biso, anteriores y posteriores (MARB, MPRB), y músculo posterior retractor del pie, y son responsables de la retracción del pie y de que el molusco pueda modular la tensión del biso y ajustar su proximidad a un sustrato (Bardales, 2008).

Los moluscos presentan un sistema circulatorio abierto y la hemolinfa desempeña diversas funciones, entre las que destacan el transporte de un pigmento respiratorio (la hemocianina), la defensa del organismo frente a patógenos y el soporte corporal, puesto que el hemocele funciona como un esqueleto hidrostático (Marshall y Williams, 1980; Durán *et al.*, 1990; Brusca y Brusca, 2005). Las células sanguíneas o hemocitos son células multifuncionales implicadas en: (i) regeneración de tejidos blandos y de la concha (Ruddell, 1971; Cheng, 1984); (ii) digestión y transporte de nutrientes y procesos de excreción (Feng *et al.*, 1977; Narain, 1973); (iii) función defensiva, gracias a su capacidad para fagocitar partículas externas y patógenos (Moore y Lowe, 1977; Cheng, 1981; Bayne, 1990; Cao *et al.*, 2004); (iv) reconocimiento y degradación de agentes externos mediante la secreción extra o intracelular de lectinas y enzimas, o la producción de radicales libres (Moore y Gelder, 1985; Nappi y Ottaviani, 2000; Novas *et al.*, 2004).

### **1.10. Inmunidad: sistemas y respuestas inmunitarias**

La respuesta inmune ha sido definida tradicionalmente, como un sistema antimicrobiano no específico para autolimitar la respuesta inflamatoria (Miyajima *et al.*, 1992). El sistema inmune en todos los animales comprende elementos celulares y humorales que interaccionan para proteger al organismo de patógenos, parásitos y células neoplásicas (Ratcliffe *et al.*, 1985; Smith, 1991), de forma que todos los organismos manifiestan una capacidad determinada genéticamente para distinguir entre lo propio y lo extraño. Las bases moleculares para los mecanismos de reconocimiento y respuesta del efector varían según los niveles de organización biológica (Nappi y Ottaviani, 2000; Nappi y Vass, 2000; Nappi y Vass, 1993; Carton y Nappi, 1997).

Los organismos multicelulares poco evolucionados sólo presentan un tipo de inmunidad, denominada innata que es exclusivamente celular y filogenéticamente más antigua que la



inmunidad adquirida, que está presente en organismos como peces (cartilagosos y óseos), anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Thompson, 1995).

### 1.11. Células y tejidos del sistema inmune en invertebrados

En el sistema circulatorio de invertebrados, se detecta una gran variedad de tipos de células sanguíneas (Ratcliffe y Rowley, 1979; 1981), las cuales, aparentemente, desempeñan funciones variadas como son transporte, almacenamiento, reparación de heridas y pigmentación, así como defensa del organismo. De acuerdo con su papel biológico poseen especializaciones estructurales, bioquímicas y de comportamiento.

La inmunidad humoral incluye la activación de cascadas proteolíticas que finalizan en la opsonización y la síntesis de varios péptidos antimicrobianos (Meister *et al.*, 1997, Hoffman *et al.*, 1999; Bulet *et al.*, 1999; Engstrom, 1999).

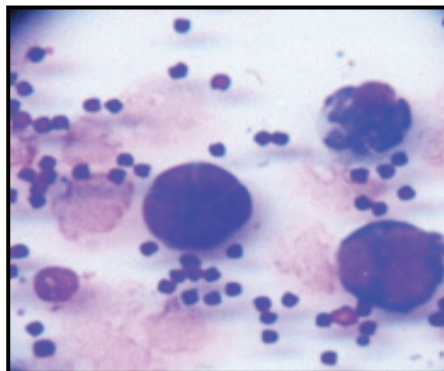
Las respuestas celulares son realizadas por hemocitos (Söderhäll y Smith, 1983, Smith y Söderhäll, 1983; 1991), los cuales poseen la capacidad de fagocitar patógenos y desarrollar el proceso de encapsulación de metazoos (Nappi y Vass, 1993; Carton y Nappi, 1997; Nappi y Ottaviani, 2000; Nappi y Vass, 2000).

El análisis microscópico y funcional de los hemocitos sugiere fundamentalmente la presencia de tres tipos celulares: células hialinas, células semigranulares y células granulares (Söderhäll y Smith, 1983, Smith y Söderhäll, 1983; 1991). Las células hialinas carecen de grandes gránulos distintivos, presentando una gran actividad fagocítica (Bauchau, 1981; Smith y Söderhäll, 1983). Son células pequeñas, con forma oval, sin pseudópodos, con escasa representación (sólo el 25% del total) y con actividad de defensa citotóxica en la hemolinfa (Soares da Silva *et al.*, 2002). Otros autores, afirman que en el citoplasma de este tipo celular aparecen algunos pequeños gránulos basófilos. Las células granulares y semigranulares son de mayor tamaño que las hialinas, presentando numerosos gránulos acidófilos, basófilos o incluso de ambos tipos (Carballal *et al.*, 1997). Estos gránulos intracelulares pueden descargarse al exponer a la célula frente a materiales no propios (Smith y Söderhäll, 1983). También presentan un núcleo excéntrico, pseudópodos, mitocondrias abundantes, y además son la población que aparece en mayor número, concretamente un 75% del total. La actividad peroxidasa desarrollada por las mitocondrias y la movilidad desempeñada por los pseudópodos, encontrada sólo en esta población celular de hemocitos, indica su supuesta implicación en la fagocitosis (Lanz *et al.*, 1993; Gliński y Jarosz, 1997; Soares da Silva *et al.*, 2002).

## Introducción

### 1.12. Poblaciones celulares en hemolinfa de moluscos bivalvos

Los hemocitos en invertebrados tienen una importancia clave en las reacciones de defensa de estos organismos (Pipe *et al.*, 1997). Existen diferentes opiniones en relación al número y tipo de hemocitos en moluscos bivalvos, así como en su clasificación celular. La existencia de diversos tipos de clasificación se debe a la variabilidad de técnicas empleadas, que abarcan desde las morfológicas hasta la citometría de flujo (Soares da Silva *et al.*, 2002) (Figura 1.23).

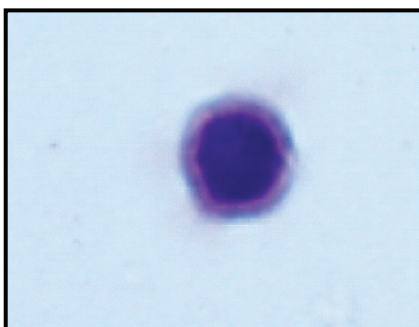


**Figura 1.23.** Poblaciones celulares en hemolinfa de moluscos bivalvos (Barcia *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2003, 2004a).

La clasificación de hemocitos en *Mytilus edulis*, ha recibido históricamente considerable atención (Jones, 1846; Williams, 1852; Sabatier, 1877; Flemming, 1878; Kollmann, 1980; Feng *et al.*, 1977; Moore y Lowe, 1977; Rasmussen *et al.*, 1985; Pipe, 1990a; Koehn, 1991; Noël *et al.*, 1994). En estudios iniciales, se clasificaron varias fases de su desarrollo incluyendo estados granulares finos y gruesos, así como células nucleadas, incluyéndose descripciones de aglomeraciones y la formación de pseudópodos (Jones, 1846). Una de las clasificaciones, describe la caracterización antigénica de dos subpoblaciones con anticuerpos monoclonales y reconoce tres clases de hemocitos (Pipe *et al.*, 1997).

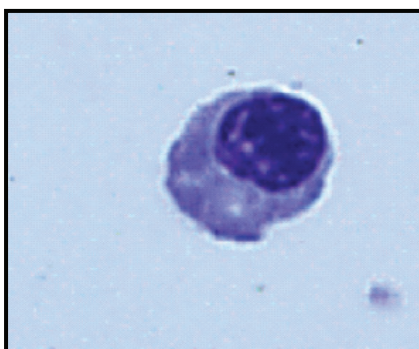
Los hemocitos de *M. edulis* pueden dividirse en dos grupos, basófilos y eosinófilos; en el primer grupo se incluyen células hialinas y granulares, mientras que en el grupo de los eosinófilos sólo se encuentran células granulares (Friebel y Renwranz, 1995; Pipe *et al.*, 1994). A su vez, los hemocitos granulares de *M. edulis* contienen dos tipos distintos de gránulos, que se diferencian en tamaño, contenido enzimático y características de tinción con lectinas (Pipe, 1990b; 1992; Dyrzynda *et al.*, 1997).

En la hemolinfa de *M. galloprovincialis* han sido detectados dos tipos diferentes de células (Barcia *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2003, 2004a). En primer lugar, un grupo de células pequeñas redondeadas, denominadas células RH, con un núcleo que ocupa casi la totalidad de la célula y un pequeño volumen de citoplasma, que a veces es tan sólo un halo alrededor del núcleo (Figura 1.24). Esta morfología recuerda a las células RH aisladas a partir de hemolinfa de *P. corneus* (Ottaviani *et al.*, 1993a) o los hialinocitos aislados de la hemolinfa de *M. edulis* (Pipe *et al.*, 1997).



**Figura 1.24.** Células RH de hemolinfa de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Barcia *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2003, 2004a).

El segundo tipo celular encontrado en hemolinfa de *M. galloprovincialis*, presenta un mayor tamaño y un citoplasma expandido (células SH) (Figura 1.25), siendo similares a las SH aisladas en *P. corneus* (Ottaviani *et al.*, 1993a), recordando a su vez la estructura de macrófagos de vertebrados y eosinófilos detectados en *M. edulis* (Pipe *et al.*, 1997).



**Figura 1.25.** Células SH de hemolinfa de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Barcia *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2003, 2004a).

## **Introducción**

### **1.13. El lipopolisacárido bacteriano (LPS) y las citoquinas en la respuesta inmune**

La respuesta inmune está regulada por múltiples y complejas interacciones entre moléculas, las cuales desencadenan señales de transducción intercelulares. Algunas de estas moléculas importantes en la respuesta inmunitaria son el lipopolisacárido bacteriano y las citoquinas (Gómez *et al.*, 1998).

Al activar macrófagos, se desencadena la secreción, entre otros, de óxido nítrico (Ottaviani *et al.*, 1997), citoquinas (Weiss *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005) y la activación de múltiples señales de transducción en las que están implicadas fosfolipasas, proteínas G, proteína quinasas, etc. (Liu *et al.*, 1994; Sweet y Hume, 1996; von Knethen *et al.*, 2005). Al igual que en vertebrados, los hemocitos de invertebrados responden a la acción del LPS mediante cambios conformacionales, incremento de la movilidad y liberación de óxido nítrico (Hughes *et al.*, 1991a; 1991b; Lowenstein *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1993).

El lipopolisacárido o LPS es el principal componente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas (Pipe *et al.*, 1997; Lien *et al.*, 2000) y posee la capacidad para activar macrófagos de vertebrados (Celada y Nathan, 1994; Chen *et al.*, 2003; Khadaroo *et al.*, 2003; Stout *et al.*, 2005) y hemocitos de invertebrados (Ottaviani *et al.*, 1995).

La membrana externa de las bacterias Gram-negativas (figura 1.26) es asimétrica. Las caras interna y externa son diferentes y constan principalmente de lípidos y proteínas (Nikaid y Vaara., 1987; Hayashi y Wu, 1990; Dmitriev *et al.*, 1999). Los lipopolisacáridos son componentes integrales de la membrana externa de estas bacterias y contienen un dominio hidrofóbico conocido como lípido A (Ulevitch y Tobias., 1995).

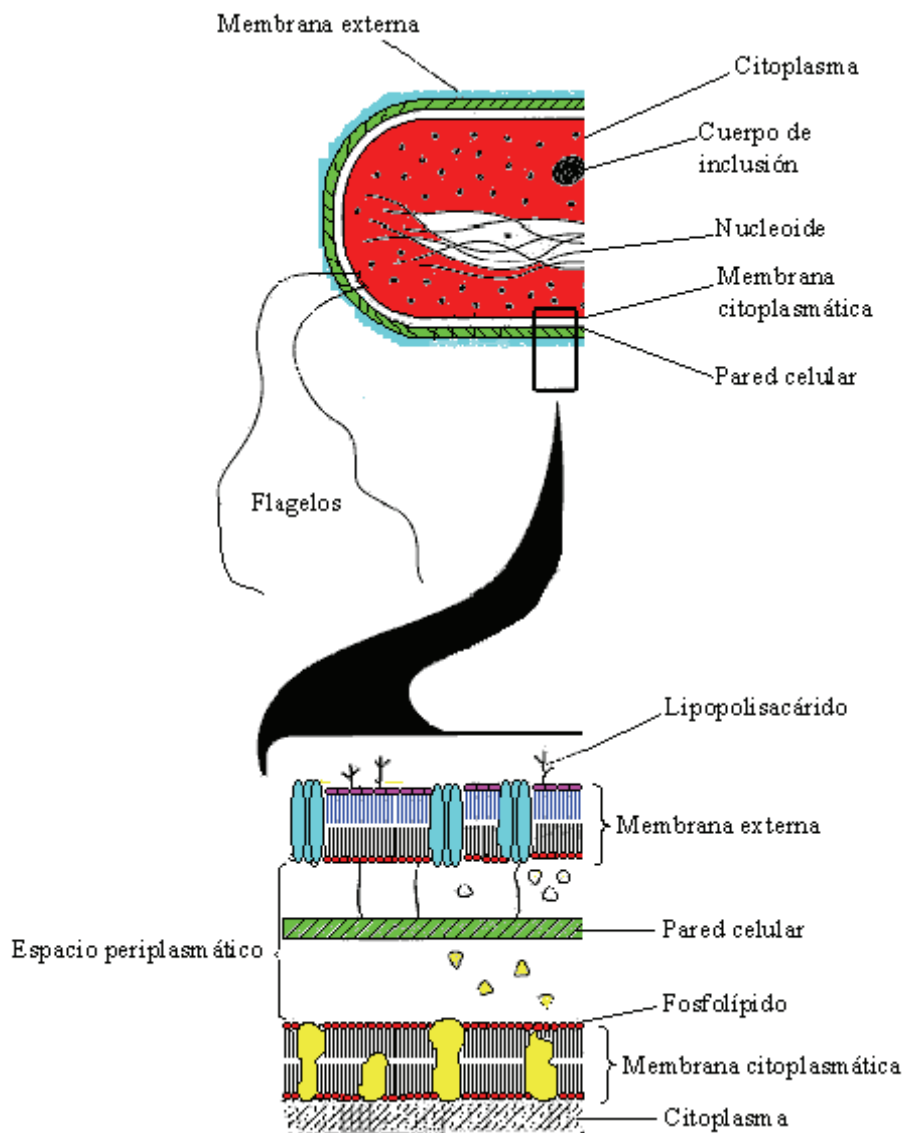


Figura 1.26.- Membrana externa de las bacterias Gram-negativas. (Tomada de Cao, 2002).

La capa de lipopolisacáridos de la membrana externa está estabilizada por la asociación de cationes divalentes y representa una barrera permeable frente a factores de estrés externos (Vaara, 1992).

El lípido A representa el centro inmunoreactivo del LPS debido al reconocimiento altamente sensible de la estructura lipídica por numerosos componentes celulares y humorales de la inmunidad innata (Medzhitov y Janeway, 1998; Hoffmann *et al.*, 1999; Medzhitov y Janeway, 2000).

El LPS induce un amplio espectro de efectos biológicos en varios organismos eucarióticos. El blanco celular primario del LPS en mamíferos son los fagocitos de la inmunidad innata o natural,

## **Introducción**

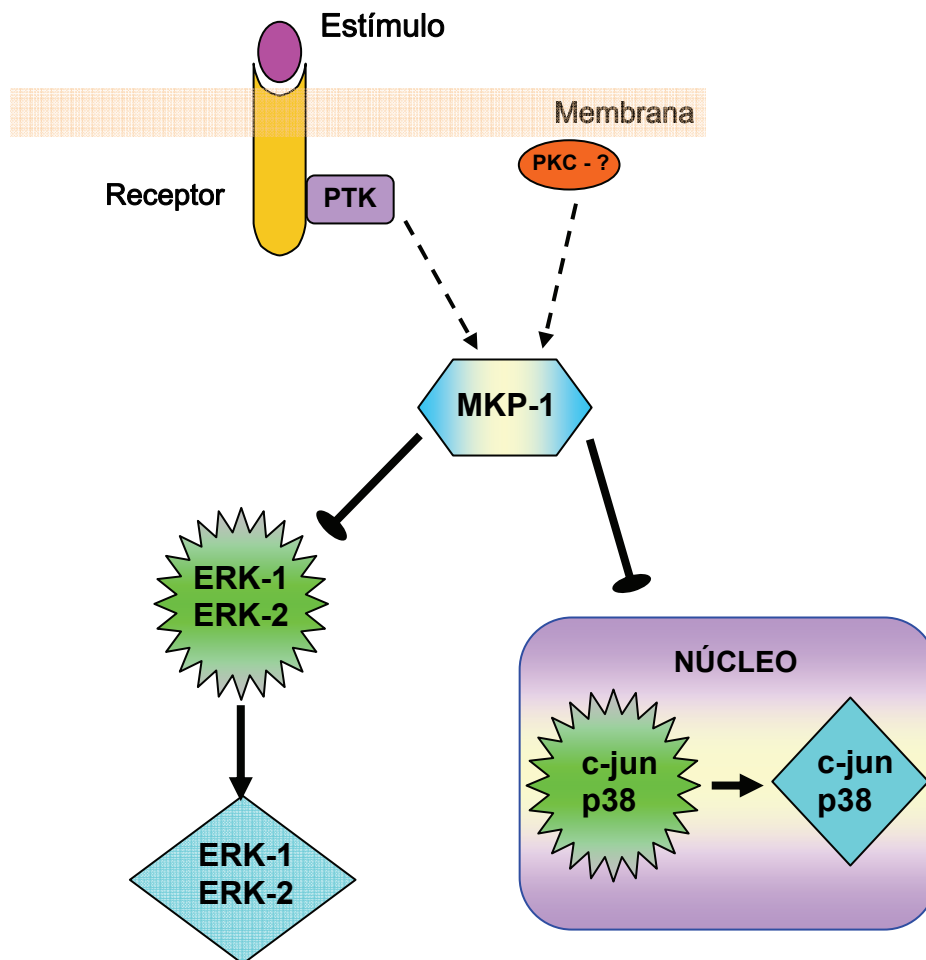
monocitos periféricos, macrófagos y neutrófilos, los cuales expresan el antígeno CD 14 así como TRL4 (Haziot *et al.*, 1988; Kitchens., 2000; Zhanf *et al.*, 1999; Muzio *et al.*, 2000).

Los macrófagos llevan a cabo funciones críticas en el sistema inmune. Actúan como reguladores de la homeostasis y como células efectoras en la infección e intervienen en la curación de heridas (Celada y Nalhan, 1993). A diferencia de otras células del sistema inmune, los macrófagos muestran una pronunciada dualidad en su respuesta biológica; se hacen activos o no proliferan (Lari *et al.*, 2007; Ferret-Bernard *et al.*, 2004; Vairo *et al.*, 1992). El LPS activa macrófagos e induce la secreción de metabolitos de ácido araquidónico, intermediarios del nitrógeno y citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-1 e IL-6 (Adams y Hamilton, 1984; Morrison y Ryan, 1987), las cuales juegan un papel importante en la respuesta inmune.

En macrófagos, el LPS desencadena la activación de varios caminos de transducción de señales en los que están implicados proteínas G, tirosina-quinasas, fosfolipasa C (PLC), proteína quinasa A (PKA) y proteína quinasa C (PKC) (Sweet y Hume, 1996; Fujihara *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1994, Shapira *et al.*, 1994).

EL LPS también activa diferentes cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), incluyendo las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) (Reimann *et al.*, 1994; Weinstein *et al.*, 1992). Para la actividad de MAPK es necesaria la fosforilación de residuos de tirosina y treonina (Boulton *et al.*, 1991). ERK activa, fosforila y regula varias proteínas quinasas adicionales, componentes del citoesqueleto, fosfolipasa A2, y factores de transcripción nuclear (c-Jun) (Treisman, 1996).

MAPK fosfatasa-1 (MKP-1) es un miembro inducible de doble especificidad (Charles *et al.*, 1993; Keyse y Emslie, 1992; Noguchi *et al.*, 1993). MKP-1 defosforila residuos de tirosina y treonina en ERK1/2 (Alesi *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 1993), de este modo permite la inactivación de estas quinasas. MKP-1 defosforila e inactiva c-Jun y p38 (Chun *et al.*, 1996). La expresión de MKP-1 no es dependiente de la activación de MAPKs y ERK 1/2 en respuesta al LPS. En cambio, la inducción de esta fosfatasa necesita la activación de tirosina quinasas y de la isoforma  $\epsilon$  de la PKC. Esto sugiere que, en macrófagos, la PKC  $\epsilon$  juega un papel importante en el control negativo de la actividad de MAPK a través de la inducción de la fosfatasa MKP-1 (figura 1.27) (Valledor *et al.*, 2000).



**Figura 1.27.** Control negativo de la actividad de MAPK a través de la inducción de la fosfatasa MKP-1. Las líneas sólidas representan interacción directa y las discontinuas representan la presencia de pasos intermedios. Las flechas en forma de T representan inhibición. Las estrellas representan formas activas y los rombos formas inactivas.

El LPS estimula la actividad de la PKC en macrófagos de dos maneras. La primera, es rápida y ocurre sólo a altas concentraciones de LPS. La segunda manera es más lenta y tiene lugar tanto a dosis bajas como altas del efector. Además, hay una fuerte evidencia que sugiere que la PKC  $\epsilon$  es la principal isoforma implicada en la respuesta de los macrófagos a la estimulación por LPS (Shapira *et al.*, 1997).

A su vez, las citoquinas representan un grupo diverso de moléculas que participan en la transducción de señales (Leonard y Lin, 2000) y estas señales, pueden ser de dos tipos, autocrinas y/o paracrinas (Gómez *et al.*, 1998; Leonard y Lin, 2000).

## **Introducción**

Tradicionalmente, han sido clasificadas según su origen o función y desde un punto de vista funcional, las citoquinas son:

1. **Redundantes**, distintas citoquinas provocan la misma respuesta.
2. **Pleiotrópicas**, la misma citoquina provoca diferentes respuestas.
3. **Sinérgicas**, la combinación de dos o más citoquinas potencian su respuesta al actuar sobre un mismo tipo celular (Chyczewska y Mroz, 1997; Badovinac *et al.*, 1998; Wald *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003).

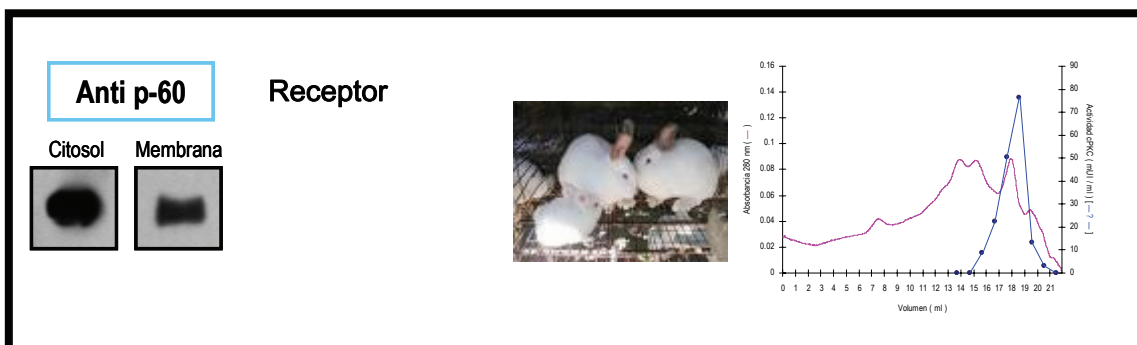
En animales superiores, las citoquinas están relacionadas con la inmunidad, la inflamación, el estrés y la regulación de la expresión de diversas proteínas (Arai *et al.*, 1990; Blach-Olszewka, 2005; Gobert *et al.*, 2005).

En invertebrados se han detectado moléculas similares a las citoquinas (Hughes *et al.*, 1992; Stefano *et al.*, 1991; Ottaviani *et al.*, 1993a; Granath *et al.*, 1994), pero los hemocitos responden también a las citoquinas de vertebrados (Hughes *et al.*, 1992; Ottaviani *et al.*, 2004).

El empleo de TNF- $\alpha$ , IL-2, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta_1$ ) provoca cambios en la forma de los hemocitos, modifica la movilidad de estas células, incrementa la fagocitosis, promueve la síntesis de aminas biógenas (Hughes *et al.*, 1991a; 1992; Ottaviani *et al.*, 1994; Ottaviani *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 2004a,b; 2007a,b), induce las enzimas responsables de la síntesis de óxido nítrico (Novás *et al.*, 2004; 2007a,b,c) y es conocida la implicación del PDGF y del TGF- $\beta_1$  en rutas de transducción de señales a través del fosfatidilinositol y AMPc (Ottaviani *et al.*, 2004). Además, se ha detectado que un tipo celular presente en *Mytilus galloprovincialis*, concretamente, las células SH, expresan la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (Barcia *et al.*, 1999); mientras que en la membrana plasmática de hemocitos de algunas especies de insectos y de moluscos, han sido detectadas moléculas similares a los receptores de PDGF y TGF- $\beta_1$  de vertebrados (Kletsas *et al.*, 1998; Ottaviani *et al.*, 2001).



# Objetivos





En los sistemas biológicos la fosforilación de proteínas es un mecanismo de regulación de las funciones celulares ampliamente extendido. En proteínas regulables, la fosforilación y defosforilación de residuos de serina, treonina y tirosina provocan cambios conformacionales y variaciones en sus propiedades biológicas (Hanks y Hunter, 1995). La proteína quinasa C ha sido descrita en diferentes especies de invertebrados, con características que las asemejan a isoformas presentes en mamíferos. Las mejores caracterizadas han sido Apl-I y Apl-II del gasterópodo *Aplysia*, que respectivamente serían isoformas de PKC  $\beta$ II,  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente, y PKC  $\epsilon$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  independiente (Kruger et al., 1991; Sossin et al., 1993).

En el presente trabajo se propone como objetivo global, el estudio en manto de mejillón *M. galloprovincialis* de alguna isoforma de las cPKCs descritas en otros organismos.

Este objetivo general puede dividirse en varios subobjetivos:

- 1) Determinar la presencia de actividad cPKC en el manto del mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk.
- 2) Purificar y caracterizar bioquímicamente dicha isoforma de cPKC.
- 3) Estudiar la distribución tisular de la isoforma cPKC purificada del mejillón *M. galloprovincialis* Lmk. y determinar su ubicación predominante en las fracciones citosólica y de membrana.
- 4) Obtener anticuerpos policlonales específicos contra la isoforma cPKC purificada, como herramienta para el estudio de la enzima.
- 5) Determinar la presencia de la isoforma cPKC purificada en los hemocitos del mejillón y estudiar el efecto de diferentes inductores (IL-2, PDGF y LPS) sobre la expresión de esta cPKC en los hemocitos de *M. galloprovincialis* Lmk.
- 6) Realizar un estudio comparativo de los resultados obtenidos para la forma dependiente de calcio (cPKC) y los obtenidos para la forma independiente de calcio (**p105**). Para alcanzar este objetivo previamente es necesario completar los siguientes pasos.

## **Objetivos**

- 6.1. Purificar la isoforma nPKC (**p105**).
- 6.2. Completar el estudio cinético realizado por Mercado, (2001), para la enzima **p105** utilizando otros péptidos sustratos.
- 6.3. Estudiar el efecto producido por diferentes inductores (IL-2, PDGF y LPS) sobre la expresión de **p105** en hemocitos de *M. galloprovincialis* Lmk.

# ***Material y Métodos***





### **3.1. Material**

#### **3.1.1. Material biológico**

Mejillones de la especie *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fueron recogidos en la planta depuradora de la Ría de Betanzos, Galicia. Los moluscos fueron transportados al laboratorio en contenedores con agua de mar aireada. De los mejillones fueron diseccionados los tejidos de manto, branquias, hepatopáncreas, pie y músculo aductor posterior, que luego fueron congelados a -80°C hasta su utilización.

### **3.2. Reactivos**

Los reactivos químicos generales fueron obtenidos de MERCK (Alemania), Prolabo, Sigma Chemical CO (St Louis, USA), Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania); Probus, Analema, SERVA FEINBIOCHEMICA GmbH & CO.KG y Vorquímica (España).

Protamina sulfato, Histona III-S, MBP, péptido comercial KRTLRRRL, PMA, L- $\alpha$ -fosfatidil-L-Serina, Tris (hidroximetil) aminometano, Curcumina, Estaurosporina, SDS, EGTA, EDTA, BSA,  $\beta$ -mercaptoetanol, penicilina G, anfotericina B, leupeptina, benzamidina, isopropanol, Azul de Coomassie R-250, marcadores de peso molecular preteñidos, fueron de Sigma Chemical Co, (St. Louis, USA).

La bisindolilmaleimida fue obtenida de Calbiochem (Canadá).

DE-cellulose intercambiador aniónico microgranular prehidratado (DE-52) fue obtenido de Whatman Scientific Ltda.

PMSF, HEPES, y ATP, fueron obtenidos en Boehringer Mannheim Bioproductos.

El medio de cultivo Leibovitz L-15 sin glutamina se obtuvo de la firma Biochrom KG (Berlín, Alemania).

Los reactivos de electroforesis, hidroxilapatito (Biogel HTP) y marcadores de peso molecular preteñidos, fueron obtenidos de Bio Rad.

La columna para la cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200 HR 10/30) y el Kit actividad PKC BIOTRAK, fueron obtenidos de Amersham, Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden).

Membranas ultrafiltración PM30 y filtros Millex (0,45 y 0,22  $\mu$ m) fueron de Millipore.

La membrana Immobilon™-P (PVDF) empleada para transferencia de proteínas se obtuvo de la firma Millipore [Bedford, MA, USA].

## **Material y Métodos**

Los anticuerpos monoclonales anti P-Serina y anti P-Tirosina desarrollados en ratón, anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) desarrollado en cabra y anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) desarrollado en cabra fueron de Sigma Chemical CO. (St Louis, USA). Los anticuerpos policlonales, desarrollados en conejo y purificados por afinidad contra las isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) y ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ) de PKC fueron obtenidos de Sigma Chemical CO y Gibco BRL respectivamente.

El ( $\gamma^{32P}$ ) ATP fue obtenido de Hartmann Analytic.

El kit ECL<sup>®</sup> plus para la detección por quimioluminiscencia empleado en el Western-blotting fue proporcionado por Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont Buckinghamshire, England); también se usó otro reactivo similar; Millipore Immobilon<sup>™</sup> Western, Chemiluminiscent HRP Substrate.

El material fotográfico empleado fue de la firma Agfa (Curix R2).

Líquido de centelleo LS-275 de Ecocinth, Atlanta, Georgia.

Los anticuerpos anti p105 de mejillón fueron sintetizados a partir de ratón en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria (Mercado et al., 2002a).

### **3.3. Equipos y aparatos**

- Cromatografías: FPLC<sup>®</sup> System, monitor de conductividad, UV-MII, bomba peristáltica y colector de fracciones Frac-100 de Pharmacia Biotech.

- Electroforesis: mini Protean III<sup>®</sup>, fuentes de alimentación PAC 3000, secador de geles MO 543 y capturadores de imágenes Gel Doc 1000 y Versa Doc Imaging System MO 2000, todos de BIO RAD.

- Centrifugación de tejidos: Rotor modelo JA-20, Centrifuga Beckman modelo J2-21.

- Tratamiento de hemocitos:

El esterilizador de sólidos empleado fue de la casa Matachana, serie 500.

Para la manipulación celular y del material en condiciones estériles se utilizaron dos campanas de flujo laminar modelos Telstar AH-100 y Uniflow UVUB 1200 BIOHAZARD respectivamente.

Las centrifugaciones para el lavado de hemocitos así como para la obtención de lisados celulares se realizaron en centrífugas Centromix, Heraeus spatech/Biofuge A, Denver Instrument y BHG-Hermle Z229.

La osmolaridad de las disoluciones se comprobó en un osmómetro de la casa Gonotec, modelo Osmomat 030.



Los microscopios utilizados en las observaciones celulares fueron Olympus CX40 y un microscopio invertido de la casa comercial Lan Optics.

Las incubaciones de los anticuerpos a 4°C y en movimiento continuo se realizaron en un mixing Rotor de la casa Renner GmbH.

El incubador de CO<sub>2</sub> empleado para la estabilización de los cultivos de hemocitos fue de la marca Sanyo, modelo MCO-20AIC.

• Otros: Espectrofotómetro PU UV/VIS Philips, Contador de centelleo Beckman LS6000TA, Agitador Rotamax 120 Heidolph y revelador automático de la firma Agfa-Gevaert AG, modelo Gevamic 60.

### 3.4. Tampones

#### • Tampón de homogenización de tejidos (THT) para cPKC

Tris – HCl	<b>50 mM</b>	<b>pH 7.4</b>
EGTA	<b>10 mM</b>	
EDTA	<b>2 mM</b>	
Sacarosa	<b>250 mM</b>	
β- mercaptoetanol	<b>10 mM</b>	
Glicerol	<b>10 %</b>	

#### Purificación cPKC -Tampón A

Tris – HCl	<b>50 mM</b>	<b>pH 7.5</b>
EGTA	<b>0,5 mM</b>	
EDTA	<b>0,5 mM</b>	
β- mercaptoetanol	<b>10 mM</b>	
Glicerol	<b>10 %</b>	

#### Purificación cPKC -Tampón B

Tris – HCl	<b>50 mM</b>	<b>pH 7.5</b>
EGTA	<b>0,5 mM</b>	
EDTA	<b>0,5 mM</b>	
β- mercaptoetanol	<b>10 mM</b>	
Glicerol	<b>10 %</b>	
NaCl	<b>25 mM</b>	

## **Material y Métodos**

### **Purificación cPKC -Tampón C**

Tris – HCl	50 mM	pH 7.5
EGTA	0,5 mM	
EDTA	0,5 mM	
β- mercaptoetanol	10 mM	
Glicerol	10 %	
NaCl	400 mM	

### **Purificación cPKC -Tampón D**

Tris – HCl	50 mM	pH 7.5
EGTA	0,5 mM	
EDTA	0,5 mM	
β- mercaptoetanol	10 mM	
NaCl	25 mM	

### **•Tampón de homogenización de tejidos (THT') para nPKC**

Tris – HCl	50 mM	pH 8.0
EGTA	10 mM	
EDTA	2 mM	
Sacarosa	250 mM	
β- mercaptoetanol	10 mM	
Glicerol	10 %	

### **Purificación nPKC - Tampón A'**

Tris – HCl	50 mM	pH 8.0
EGTA	0,5 mM	
EDTA	0,5 mM	
β- mercaptoetanol	10 mM	
Glicerol	10 %	

### **Purificación nPKC - Tampón B'**

Tris – HCl	50 mM	pH 8.0
EGTA	0,5 mM	
EDTA	0,5 mM	
β- mercaptoetanol	10 mM	
Glicerol	10 %	
NaCl	25 mM	

### **Purificación nPKC - Tampón C'**

Tris – HCl	50 mM	pH 8.0
EGTA	0,5 mM	
EDTA	0,5 mM	
β- mercaptoetanol	10 mM	
Glicerol	10 %	
NaCl	400 mM	

### **Purificación nPKC - Tampón D'**

Tris – HCl	50 mM	pH 8.0
EGTA	0,5 mM	
EDTA	0,5 mM	
β- mercaptoetanol	10 mM	
NaCl	25 mM	

**Purificación nPKC - Tampón E'**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<b>50 mM</b>	<b>pH 7.5</b>
EDTA	<b>0,5 mM</b>	
EGTA	<b>0,5 mM</b>	
β -mercaptoetanol	<b>10 mM</b>	
Glicerol	<b>10 %</b>	

**Purificación nPKC - Tampón F'**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<b>300 mM</b>	<b>pH 7.5</b>
EDTA	<b>0,5 mM</b>	
EGTA	<b>0,5 mM</b>	
β -mercaptoetanol	<b>10 mM</b>	
Glicerol	<b>10 %</b>	

**3.5. Electroforesis y Western Blotting**

Para elaborar los geles de poliacrilamida se emplearon las siguientes soluciones:

- Solución A: 30 % acrilamida/bis 37,5/1 (2,6 % C). Mezcla comercial de Bio Rad.
- Solución B: Tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8
- Solución C: Tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8
- Solución D: SDS 10 % (p/v)
- Solución E: Persulfato Amónico 10 % (p/v)
- Solución F: Temed (0,05%)

**• Tampón electroforesis (5x) (running buffer)**

Tris/HCl	124 mM	pH 8.3
Glicina	960 mM	
SDS	17 mM	

**• Tampón de muestra**

Agua milli-Q®	1,5 ml
Tris / HCl 0,5 M pH 6.8	2,5 ml
SDS 10%	0,8 g
Glicerol	4,0 ml
β -mercaptoetanol	2,0 ml
Azul de bromofenol	0,2g

**• Tampón de transferencia**

Tris /HCl	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	10%

**• TTBS** pH 7.5

Tris/HCl	20 mM
NaCl	0,15 mM
Tween 20	0,5ml

## **Material y Métodos**

• <u>PBS</u>	pH 7.4
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
NaCl	136 mM
KCl	3 mM

### **3.6. Métodos**

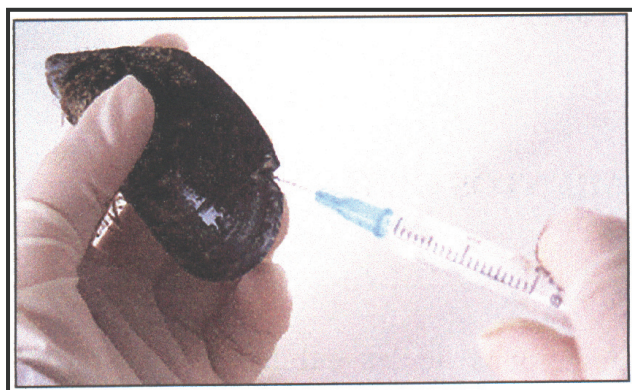
#### **3.6.1. Procedimientos generales**

Todas las manipulaciones de las células se realizaron en condiciones estériles. La esterilización de la solución antiagregante de Alsever (ALS) (Nöel et al., 1993) se hizo por filtración a través de membranas Millipore de 0,22 µm.

#### **3.6.2. Extracción de hemolinfa y obtención de hemocitos**

Se limaron las valvas del mejillón de forma que se permitiese la entrada de una aguja directamente hasta el músculo aductor.

La hemolinfa fue extraída del músculo aductor con una aguja y una jeringa de 2 ml que contenía 1 ml de ALS (ver figura 3.1).



**Figura 3.1.** Imagen en la que se representa el proceso de extracción de hemolinfa del mejillón mediante la incisión en el músculo aductor tras el limado de las valvas.

Esta operación se repitió el número de veces necesario hasta extraer el volumen máximo posible de hemolinfa. Se realizaron extracciones hasta obtener aproximadamente  $1 \times 10^6$  hemocitos para cada uno de los ensayos realizados. Cada ensayo se realizó por duplicado y los experimentos se repitieron tres veces. Para la extracción  $1 \times 10^6$  de células se requieren entre 3 y 5 mejillones. El recuento de dichas células se realizó en una cámara de Neubauer empleando Trypan Blue como colorante vital.

### **3.6.3. Estabilización de hemocitos de mejillón**

La hemolinfa extraída fue centrifugada durante 10 minutos a 2000 r.p.m., recogándose el precipitado para ser tratado con ALS y eliminar posibles impurezas de las muestras. Se repitió el procedimiento una vez, eliminándose el sobrenadante.

Posteriormente, se añadió medio Leibovitz suplementado con L-glutamina y FCS a los hemocitos (por cada 500.000 células se añadió 1ml de medio Leibovitz). Las células se estabilizaron durante 3 días a una temperatura constante de 20°C (Cao et al., 2003).

### **3.6.4. Preparación de ALS (pH 7.0; Osmolaridad 1000 mOs)**

Glucosa	20.8 g / l
Citrato sódico	8 g / l
EDTA	3.36 g / l
Cloruro sódico	22.5 g / l

Esta disolución se guardó a 4°C en un frasco estéril y para tomar alícuotas de éste se tomaron las precauciones oportunas para mantener las condiciones estériles.

## Material y Métodos

### 3.6.5. Preparación del medio de cultivo celular (pH 7.0, Osmolaridad 1000 mOs)

#### Medio Leibovitz L-15 sin L-glutamina y FCS

NaCl	20.2 g / l
KCl	0.54 g / l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.6 g / l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g / l
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3.9 g / l
Glucosa	20.8 g / l
Penicilina G	100 unidades / ml
Estreptomina	100 µg / ml
Gentamicina	40 mg / ml
Anfotericina B	0.1 µg / ml

Suplementado con:

Suero bovino fetal (FCS)	10%
L-glutamina	1%

Esta disolución se guardó a 4°C en un frasco estéril y para tomar alícuotas de este se tomaron las precauciones oportunas para mantener las condiciones estériles.

Este medio fue el que se empleó para mantener en cultivo los hemocitos en los diferentes ensayos realizados en este proyecto.

### **3.6.6. Preparación de tampones de extracción de proteínas de Citosol y Membrana**

En un erlenmeyer se prepararon las siguientes disoluciones (100 ml):

<u>Citosol</u>		<u>Membrana</u>	
20 mM Hepes	pH = 7.4	20 mM Mes	pH = 6.5
5 mM EDTA		2 mM EDTA	
20 mM Pirofosfato sodico		10 mM EGTA	
30 mM NaF		250 mM Sacarosa	
0,5 % Triton X-100		10 mM β-mercaptoetanol	
		10% Glicerol	
		1% Triton X-100	

Estas disoluciones se guardaron a 4°C para su posterior utilización en los distintos experimentos.

### **3.6.7. Preparación de lisados de hemocitos**

Las suspensiones celulares de hemocitos obtenidos tal como se han descrito anteriormente fueron lavadas con ALS centrifugándose durante 10 min a 2000 r.p.m. a temperatura ambiente. Esta operación se repitió dos veces.

A los hemocitos resultantes, se les añadieron 100 µl de tampón de lisis citosólico y un cóctel de inhibidores de proteasas (PMSF, Benzamidina, Aprotinina, Pepstatina A) y se agitaron en el mixing rotor durante 20 minutos.

Transcurrido dicho tiempo, se centrifugaron las muestras durante 6-10 min a 10.000 r.p.m. y se recogió el sobrenadante. Este último se mezcló con tampón de muestra en la proporción 1:4 (v:v). Para 100 µl de sobrenadante recogido se añaden 300 µl de tampón de muestra.

Las muestras tratadas con tampón de muestra, se calentaron en un baño a 90°C durante 5 min, fueron enfriadas en hielo de forma inmediata y se congelaron hasta su uso.

En cuanto al precipitado, se le añadió 100 µl de tampón de lisis de membrana y se realizaron las mismas operaciones descritas anteriormente para la solución citosólica (agitación en

## **Material y Métodos**

el mixing rotor, centrifugación, recogida del sobrenadante, mezcla con tampón de muestra 1:4 (v/v), calentamiento en un baño 90°C – 5 minutos y congelación hasta su utilización.

### **3.6.8. Obtención de extractos celulares**

Todos los procesos de homogenización de tejidos se llevaron a cabo utilizando un potter de vidrio y émbolo de teflón, a 4°C.

### **3.6.9. Homogenización del manto de mejillón**

El tejido de manto se homogenizó en tampón THT 1:1 (p/v). Posteriormente el homogenado fue centrifugado a 20.000 x g durante 20 minutos y a 4°C. El sobrenadante así obtenido fue pasado por lana de vidrio y filtrado, al que se denominó como extracto crudo (EC). Éste se utilizó para la purificación de la enzima, descartando el precipitado.

### **3.6.10. Determinación de la concentración proteica**

Se usó el método de Bradford (1976), basado en la fijación sobre las proteínas del colorante Azul de Coomassie. Se preparó una solución del colorante al 0,01 % en 50 ml de etanol al 95 %, a la que se añadió 100 ml de una solución de ácido fosfórico al 85 % (p/v), que finalmente se aforó a un litro con agua destilada. El reactivo se conservó a temperatura ambiente y antes de cada uso fue filtrado a través de papel de filtro Wathman N°1.

Para cada medición de concentración de proteínas en muestra, se hizo una escala de calibrado con BSA.

## **3.7. Purificación de cPKC**

Durante todo el proceso de purificación, las columnas de cromatografía se usaron conectadas a un sistema FPLC® (*FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY*) (Pharmacia).

El extracto crudo fue cargado en una columna de intercambio iónico DE52 (Volumen = 0,5 litros) que había sido previamente equilibrada con tampón A. La columna fue lavada con 2,2 litros de tampón A. Posteriormente se pasaron 400 ml de tampón B (25 mM de NaCl). Finalmente las



proteínas fueron eluidas con 400 ml de tampón (B, C) en un gradiente lineal entre 25-400 mM. El flujo de elución fue de 1 ml/min y el volumen de las fracciones fue de 5 ml.

Se midió la absorbancia a 280 nm de todas las fracciones y se midió actividad cPKC en las mismas. Las fracciones que mostraron actividad fosforilante Ca-dependiente sobre el péptido (VRKRTLRL) fueron reunidas y concentradas hasta 10 ml en celdas de ultrafiltración con filtros PM30 (Amicon).

El concentrado fue inyectado en una columna de filtración en gel Superdex 200 HR 10/30 previamente equilibrada con tampón D. Se usó un flujo de 0,5 ml/min y el volumen de las fracciones fue de 0,5 ml. En los eluidos se registró la absorbancia a 280 nm y se midió la actividad cPKC. Aquellas fracciones con actividad quinasa fueron reunidas y concentradas a 2 ml, mediante un sistema de ultrafiltración similar al citado anteriormente.

Las fracciones con actividad cPKC, fueron sometidas a SDS-PAGE 10%, para comprobar la pureza de la muestra. Posteriormente fueron concentradas y congeladas a -20°C.

### 3.8. Purificación de nPKC

Al igual que en el caso anterior, las columnas de cromatografía se usaron conectadas a un sistema FPLC® (*FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY*) (Pharmacia).

El extracto crudo fue cargado en una columna de intercambio iónico DE52 (Volumen = 0,5 litros) previamente equilibrada con tampón A'. La columna fue lavada con 2,2 litros de tampón A'. Posteriormente se pasaron 400 ml de tampón B' (NaCl 25 mM). Finalmente las proteínas fueron eluidas con 400 ml (tampón B', C') en un gradiente lineal de NaCl entre 25-400 mM. El flujo de elución fue de 1 ml/min y el volumen de las fracciones fue de 5ml.

Se midió la absorbancia a 280 nm de todas las fracciones y se midió la actividad nPKC en las mismas. Las fracciones que mostraron actividad fosforilante Ca<sup>2+</sup>-independiente sobre el péptido (VRKRTLRL), fueron reunidas y dializadas contra tampón B' durante toda la noche a 4°C. El dializado fue concentrado hasta 10 ml, en celdas de ultrafiltración con filtros PM30 (Amicon).

El concentrado fue inyectado en una columna de exclusión molecular Superdex 200 HR 10/30 previamente equilibrada con tampón D'. Se usó un flujo de 0,5 ml/min y el volumen de las fracciones fue de 0,5 ml. En los eluidos se registró la absorbancia a 280 nm y se midió la actividad nPKC. Aquellas con actividad quinasa fueron reunidas y concentradas a 2 ml, mediante un sistema de ultrafiltración similar al citado anteriormente.

## Material y Métodos

El concentrado obtenido a partir de los eluidos en la cromatografía de filtración en gel fue llevado a una columna de cromatografía de hidroxilapatito (HTP) previamente equilibrada con dos volúmenes de tampón E'. La columna fue lavada con 15 ml de tampón E' y posteriormente se aplicaron 30 ml de un gradiente lineal de fosfato de potasio entre 50-300 mM (tampones E', F'). Para terminar se lavó la columna con 20 ml con un gradiente 300-600 mM de tampón fosfato pH: 7.5. Las fracciones con actividad nPKC, fueron sometidas a SDS-PAGE 10 %, para comprobar la pureza de las muestras. Posteriormente fueron concentradas y congeladas a -20°C.

### 3.9. Ensayos de actividad PKC

La actividad enzimática fue medida mediante la incorporación de ( $\gamma^{32}\text{P}$ ) desde ( $\gamma^{32}\text{P}$ )-ATP al sustrato proteico. Durante la purificación de la enzima se usó el péptido (VRKRTLRL), que resultó ser el mejor sustrato en una purificación parcial previa. Luego en los ensayos de cinética enzimática y otros, fueron utilizados: Péptido (VRKRTLRL), Protamina sulfato, Histona III-S, MBP, péptido [KRTLRR]. La mezcla de reacción en un volumen de 55  $\mu\text{l}$  en Tris/HCl 50 mM (pH 7,5) a 4°C, contenía: acetato de calcio 1,2 mM, fosfatidil L-serina 34  $\mu\text{g/ml}$ , PMA 2,7  $\mu\text{g/ml}$ , DTT 3,4 mM, péptido sustrato 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  0,31 mM, ATP 0,11 mM, ( $\gamma^{32}\text{P}$ ) ATP (3,6  $\mu\text{Ci/ml}$ ) y 25  $\mu\text{l}$  de la muestra. La reacción se incubó durante 15 minutos a 37°C y se paró con 10  $\mu\text{l}$  de ácido ortofosfórico 300 mM. Los tubos fueron centrifugados 3 segundos a 2.500 rpm y 35  $\mu\text{l}$  de muestra fueron pipeteados en discos de fosfocelulosa (p81). Los discos fueron lavados 3 veces durante 5 minutos con 10 ml, por disco, de ácido ortofosfórico 75 mM, secados 5 minutos y depositados en viales. Se les añadió 4 ml de líquido de centelleo, y se obtuvieron las cuentas por minuto (cpm) en el contador de partículas  $\beta$ .

La actividad cPKC se obtuvo por la diferencia entre las cpm (Muestra con  $\text{Ca}^{2+}$ ) - cpm (Muestra sin  $\text{Ca}^{2+}$ ). Para determinar la actividad específica de tipo nPKC se reemplazó en la mezcla de reacción el acetato de  $\text{Ca}^{2+}$  por EGTA 10 mM. La actividad nPKC se obtiene directamente.

La miliunidad (mUI) de actividad PKC se definió como la cantidad de enzima capaz de transferir un pmol de fosfato, desde ATP, al péptido sustrato bajo las condiciones de ensayo que se indican en cada caso (Barcia et al., 1997).

Para el cálculo de actividad enzimática se utilizó la fórmula:

$$\text{Actividad} = \frac{(Cpm_{\text{muestra}} - Cpm_{\text{control}}) 40^*}{\text{Act.Esp.}(\gamma^{32}\text{P})\text{ATP} \times \text{cpm} / \text{pmol}^{**} \times 15 \text{ min}^{***}}$$

\* Relación entre el volumen pipeteado (25  $\mu$ l) y el utilizado como unidad internacional (1ml).

\* \* La actividad específica se valoró en cada medición. Este valor corresponde al promedio de las cpm para 300, 600 y 900 pmol de ATP. Se trabajó normalmente con valores entre 75-150 cpm/pmol.

\* \* \* Tiempo de reacción.

### **3.10. Obtención de anticuerpos**

#### **3.10.1. Inmunización y recolección del suero**

Con el fin de obtener anticuerpos contra la enzima **p60**, la proteína pura se inyectó subcutáneamente en dos conejos blancos de Nueva Zelanda. La inmunización inicial se realizó con el adyuvante de Freund's completo (CFA) y las subsiguientes inmunizaciones se realizaron con el adyuvante de Freund's incompleto (IFA). Se realizó un presangrado inicial en cada animal que fue tomado como control. Los conejos se inmunizaron los días 0, 14, 28, 42, 56 y 70. En la primera inmunización se utilizaron 200  $\mu$ g de antígeno y en las siguientes 100  $\mu$ g. Se realizaron 4 sangrados de 5 ml cada uno de ellos en los días 0, 49, 63 y 77. El último día se procedió al sangrado completo de los dos conejos obteniéndose 65 y 67 ml de suero respectivamente. El suero obtenido es impuro y contiene un número diferente de isotipos (IgG, IgM y IgA). Se realizaron diversas pruebas con el suero obtenido siendo los resultados satisfactorios por lo que no se procedió a la separación de los diferentes isotipos de IgGs.

#### **3.11. Electroforesis para proteínas en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)**

Todas las muestras de proteínas fueron analizadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (1970).

Este método se basa en la exposición de la mezcla de proteínas a un campo eléctrico, de forma que las moléculas cargadas migrarán al electrodo de polaridad opuesta. La movilidad de las moléculas dependerá de la viscosidad del medio, del tamaño, de la forma y de la carga de la molécula. La velocidad de desplazamiento electroforético de una partícula dependerá principalmente de los grupos ionizables que existan sobre superficie, y naturalmente, del signo y

## **Material y Métodos**

magnitud de la carga de dichos grupos, lo que a su vez dependerá de la fuerza iónica y del pH del medio (Nakai y Wayne, 1996).

La muestra de proteínas se trata con  $\beta$  - mercaptoetanol, que asegura la separación de las cadenas proteicas.

Además se añade otro reactivo -el SDS: dodecil sulfato sódico-, un detergente que rodea la proteína en una cantidad proporcional a su masa molecular y le confiere carga negativa. Con ello se consigue que la proteína migre hacia el ánodo, de forma inversamente proporcional a su masa y sin depender de su carga intrínseca (Lozano y Tudela, 1988).

Se usó tampón de muestra para electroforesis 4x. Las muestras antes de ser cargadas en el gel fueron hervidas a 90°C durante 5 min, fueron enfriadas en hielo de forma inmediata y se congelaron hasta su uso.

### **3.11.1. Composición de los geles**

<b><u>Gel separador (10%)</u></b>		<b><u>Gel concentrador (4%)</u></b>	
Agua milli Q <sup>®</sup>	4,05 ml	Agua milli Q <sup>®</sup>	6,1 ml
Tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 ml	Tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 ml
Acrilamida 30 %	3,3 ml	Acrilamida 30 %	1,3 ml
SDS 10 %	100 $\mu$ l	SDS 10 %	100 $\mu$ l
Temed 0,05 %	5 $\mu$ l	Temed 0,05 %	10 $\mu$ l
Persulfato Amónico 10 %	50 $\mu$ l	Persulfato Amónico 10 %	50 $\mu$ l

El gel separador es el que se encuentra en mayor proporción, y que sirve para separar las proteínas de las muestras, según su tamaño. En función del porcentaje de acrilamida / bisacrilamida presente en la mezcla, se puede modificar el tamaño del poro del gel, del cual dependerá la dificultad de desplazamiento que encuentren las moléculas de muestra sometidas a electroforesis.

En general, a menor porcentaje de acrilamida / bis, mayor porosidad del gel, y en consecuencia, menor dificultad de desplazamiento de las moléculas a su través.

El gel concentrador es el de menor proporción de acrilamida. Se añade para concentrar las proteínas en un mismo frente, desde el cual se pueda medir la distancia recorrida por cada una.

### **3.11.2. Preparación de los geles**

Todo el material debe ser limpiado cuidadosamente con alcohol etílico. Una vez montados los cristales de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se depositó la mezcla correspondiente al gel de poli(acrilamida) de la mayor proporción o gel separador.

El depósito se realizó con cuidado para evitar la formación de burbujas. Se añadieron 100 µl de isopropanol y una capa de agua destilada para evitar la formación del menisco.

Una vez polimerizado el gel, se retiró el isopropanol y se lavó con agua destilada para eliminar posibles restos de alcohol. Se depositó el gel concentrador. En ese momento, se introdujo el peine entre los cristales para formar los pocillos de muestras y se dejó polimerizar. Una vez equilibrado el gel, se cargaron las muestras y los marcadores de peso molecular. La carga se ajustó a 30-50 µl de muestra por pocillo. Se rellenaron las cubetas con tampón de electroforesis y se conectó al alimentador de corriente.

La electroforesis se realizó unos 70 min con un voltaje de 150 V y a temperatura ambiente.

Cuando el marcador de la electroforesis llega a unos 2 mm del extremo inferior del gel se corta el paso de corriente y se extrae el gel.

### **3.11.3. Tinción de los geles**

#### **a) Tinción con solución de Coomassie**

Las soluciones utilizadas para la tinción y el desarrollo de los geles son las siguientes:

<b><u>Solucion de tinción</u></b>		<b><u>Solución de desteñido</u></b>	
Coomasie R-250	10 %	Metanol	40 %
Metanol	20 %	Ácido acético	10 %
Ácido acético	7 %		

Tras extraerse el gel, se procede a su tinción con una solución de Coomasie al 10 %. Es conveniente agitar para facilitar la buena penetración de la solución en el gel.

Una vez teñido, se aplica sobre el gel una solución de desteñido, compuesta de 40 % metanol y 10 % ácido acético. El desteñido se realiza durante 3 horas aproximadamente. Realizándose sucesivos lavados del gel durante el proceso.

## **Material y Métodos**

### **b) Tinción con solución de Plata**

Una vez ha concluida la electroforesis, se retiran los geles y se lavan con una solución fijadora durante 20 minutos, la solución para dos mini-geles sería la siguiente:

Metanol	<b>200 ml</b>
Ácido acético	<b>40 ml</b>
Concentrado reforzador del fijador	<b>40ml</b>
Agua milli-Q	<b>120 ml</b>

Transcurridos los 20 minutos se retira la solución fijadora y se hacen cuatro lavados con agua milli-Q. Posteriormente se prepara la siguiente mezcla:

Agua milli-Q	<b>35 ml</b>
Solución de Plata	<b>5 ml</b>
Solución Reductora	<b>5 ml</b>
Solución para el revelado de la imagen	<b>5 ml</b>

Inmediatamente después se añaden a la mezcla 50 ml de solución aceleradora del desarrollo. Esta solución debe añadirse rápidamente a los geles y estos se mantienen en agitación permanente durante unos 20 minutos. A los 15 minutos las bandas comienzan a ser visibles, aunque esto dependerá de la cantidad de muestra cargada. Una vez que las bandas buscadas se ven completamente nítidas se añade la solución de parada de la reacción (5% de ácido acético), y se mantienen en agitación permanente durante 15 minutos como mínimo. Finalmente se quita esta solución de parada y se añade agua milli-Q para lavar los posibles restos.

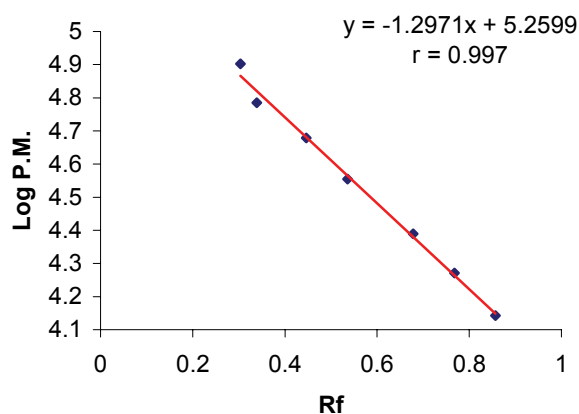
#### **3.11.4. Determinación del peso molecular de las proteínas. Electroforesis**

Se puede estimar el peso molecular de las proteínas que componen las muestras a partir de una curva de calibrado representando el logaritmo del peso molecular de los marcadores frente a su Rf.

El valor de Rf de dichas moléculas proteicas se determinó por el cociente entre la distancia de migración de cada proteína y la distancia recorrida por el frente de la electroforesis.

Como proteínas de peso molecular conocido se utilizaron proteínas preteñidas de la firma Sigma.

Una vez calculados los valores de Rf correspondientes a los marcadores, se efectuó la presentación del logaritmo del peso molecular frente a los Rf, obteniéndose una recta de pendiente negativa, sobre la cual se pueden interpolar los valores obtenidos de Rf de las proteínas de las muestras, estimando de esta forma su peso molecular.



### 3.12. Western Blotting

Para los ensayos, los polipéptidos presentes en geles de poliacrilamida, fueron electrotransferidos (Towbin et al., 1979) a membranas de PVDF®, previamente hidratadas y acondicionadas con metanol, agua Mili-Q y tampón de transferencia. Las transferencias se realizaron a 60 v, 250 mAmp, durante 6 horas a 4°C o durante toda la noche a 30 v. Las membranas se bloquearon con gelatina 2,5% en TTBS, durante 4 horas.

## Material y Métodos

Las diluciones de los anticuerpos específicos utilizados fueron las siguientes:

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Anti p 105	1:1.000	Anti-IgG de ratón- HRP	1:1.000
Anti p 60	1:10.000	Anti-IgG de conejo-HRP	1:10.000
Anti P-Serina	1:500	Anti-IgG de conejo-HRP	1:10.000
Anti P-Tirosina	1:500	Anti-IgG de conejo-HRP	1:10.000

Después de cada incubación con anticuerpos se lavó con abundante TTBS en agitación 4 x 10 min a 4°C.

Se reveló la presencia de bandas reactivas con el kit de luminiscencia ECL®.

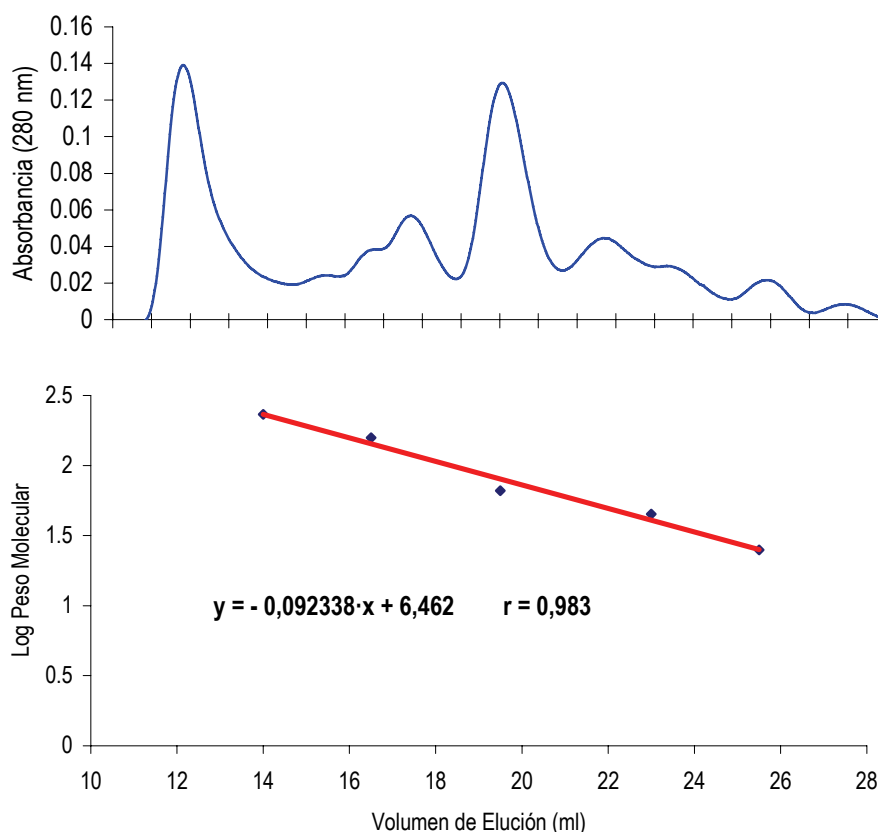
### 3.13. Cálculo del peso molecular de las proteínas. Cromatografía en Columna Superdex 200 HR 10/30

Se realizaron varios calibrados con marcadores de peso molecular conocido, como paso previo a la purificación de las proteínas cPKC y nPKC para calibrar la columna y comparar el resultado obtenido con los pesos calculados a partir de las electroforesis.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Blue Dextrano	2000 kDa
Catalasa	232 kDa
Aldolasa	158 kDa
Albumina Bovina	66 kDa
Ovoalbumina	43 kDa
Quimotripsinogeno	25 kDa





### 3.14. Método estadístico

El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico InStat™ GraphPad Software, Inc, San Diego, U. S.A. El programa utilizó el test de Student ó test t.

Este test fue desarrollado por William Gosset en 1908, y perfeccionado por Sir R. Fisher en 1926, siendo Gosset quien firmaba algunos artículos con el seudónimo de Student y por eso el nombre con que se conoce (test de Student ó test t). Este test nos permite, basándonos en la desviación estándar, determinar si existen diferencias significativas en la variable que analizamos en dos grupos, con individuos o muestras distintas para cada grupo (test t no pareado) o cuando tenemos el mismo grupo, evaluado con un antes y después (test t pareado). Es un test que permite decidir si dos variables aleatorias normales (gaussianas) y con la misma varianza tienen medias diferentes. Dada la ubicuidad de la distribución normal o gaussiana el test puede aplicarse en numerosos contextos, para comprobar si la modificación en las condiciones de un proceso (humano o natural) esencialmente aleatorio producen una elevación o disminución

## Material y Métodos

de la media poblacional. El test opera decidiendo si una diferencia en la media muestral entre dos muestras es estadísticamente significativa, para poder afirmar que las dos muestras corresponden a distribuciones de probabilidad de media poblacional distinta, o por el contrario afirmar que la diferencia de medias puede deberse a oscilaciones estadísticas azarosas.

La eficacia del test aumenta con el número de datos del que constan las dos muestras, en concreto con el número de grados de libertad conjunto de las dos muestras, este número viene dado por  $GL = N_1 + N_2 - 2$  (siendo  $N_i$  el tamaño muestral, es decir, el número de datos en cada muestra  $i$ ). La prueba consiste en examinar el estadístico  $t$  obtenido a partir de las dos muestras como:

$$t = \frac{\bar{X}_A - \bar{X}_B}{S_{X_A - X_B}} \quad S_{X_A - X_B} := \sqrt{\frac{(N_1 - 1)s_1^2 + (N_2 - 1)s_2^2}{N_1 + N_2 - 2} \left( \frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}$$

$\bar{x}$  = Media

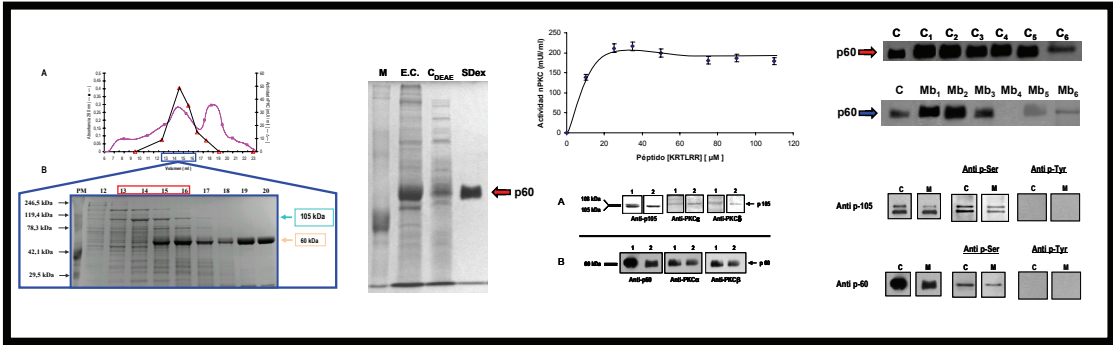
$S$  = Desviación estándar

$N$  = Número de datos

Y este valor se compara con un valor de referencia basado en el número de grados de libertad y el nivel de significación. Dicho valor de referencia se obtiene a partir de la distribución  $t$  de Student.

Al comparar las 2 medias, frecuentemente se supone que el nivel de significación  $\alpha$  sea menor que 0,05.

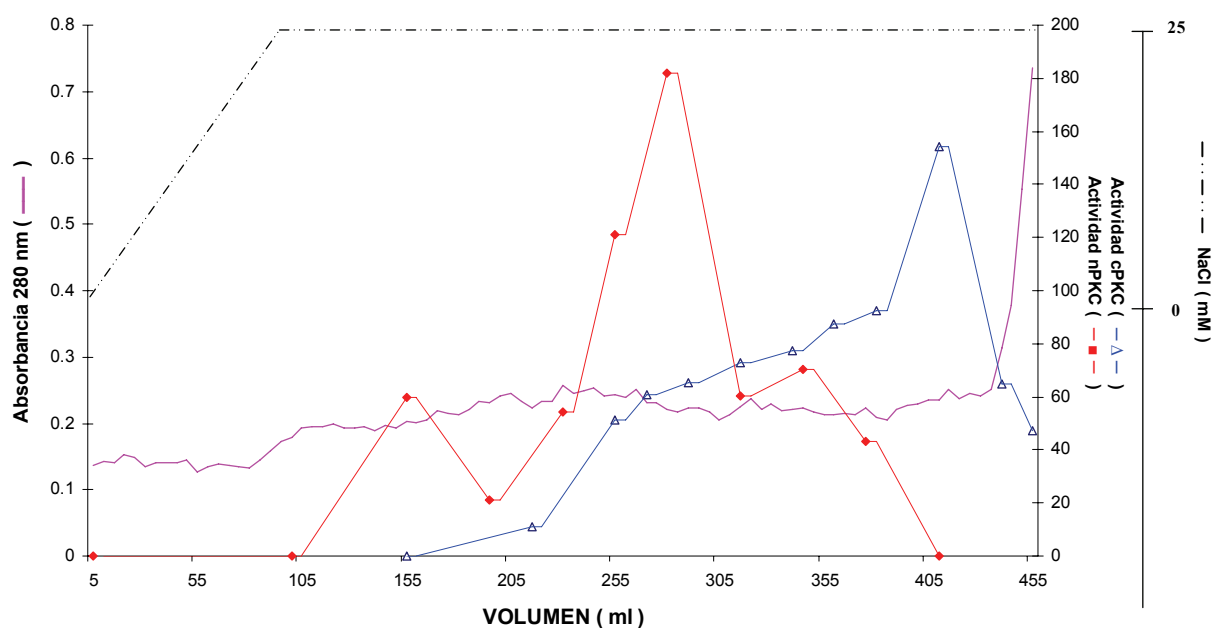
# Resultados





#### 4.1. Purificación parcial de PKC

La realización de una purificación parcial de la PKC de manto de *M. galloprovincialis*, permitió establecer los primeros parámetros para la purificación de las enzimas. La cromatografía de intercambio iónico que se utilizó en la purificación fue DE52 (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Cromatografía sobre DE-52 del extracto crudo (EC) de manto de *M. galloprovincialis*. La actividad quinasa se midió utilizando el péptido sustrato (VRKRTLRL).

## Resultados

### 4.2. Actividad Enzimática

#### 4.2.1. cPKC

Los valores de cinética enzimática recogidos en la tabla 4.1, muestran que el péptido (VRKRTLRL) es el mejor sustrato para la enzima cPKC, parcialmente purificada, por lo que se usó posteriormente en los ensayos de purificación. El valor de  $K_m$  obtenido para la cPKC utilizando MBP resulta cercano al obtenido usando el péptido (VRKRTLRL), sin embargo con el péptido (VRKRTLRL) la cPKC puede trabajar en condiciones de mayor velocidad máxima. Utilizando protamina sulfato se obtuvo el valor de  $K_m$  más bajo y por tanto es el sustrato por el que la enzima muestra la mayor afinidad, sin embargo la velocidad máxima obtenida con este sustrato es casi 100 veces más baja que la obtenida con el péptido VRKRTLRL.

<i>SUSTRATO</i>	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{m\acute{a}x}$ ( <i>mUI / ml</i> )
HISTONA III S	<b>237,98</b>	46,948
MBP	<b>69,413</b>	19,047
PROTAMINA SULFATO	<b>13,46</b>	4,58
PÉPTIDO ( KRTLRR )	<b>841,9</b>	500
PÉPTIDO ( VRKRTLRL )	<b>68,12</b>	400

**Tabla 4.1.** Parámetros de cinética enzimática, medidos en eluidos de DE52, para diferentes sustratos de PKC. Los valores corresponden a la enzima parcialmente purificada y en condiciones de ensayo para cPKC.

#### 4.2.2. nPKC

El mejor sustrato para la nPKC fue la protamina sulfato y el peor la MBP. Los valores de  $K_m$  obtenidos con el péptido KRTLRR y con la Histona III S están próximos al obtenido si se utiliza protamina sulfato como sustrato, pero ésta última permite que la nPKC desarrolle una mayor velocidad máxima (tabla 4.2). Con el péptido VRKRTLRL la nPKC desarrolla unas buenas condiciones de velocidad máxima pero el valor de  $K_m$  es mucho mayor que el obtenido para los otros sustratos ensayados, es decir, la nPKC muestra poca afinidad hacia éste.

SUSTRATO	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{m\acute{a}x}$ ( $mUI / ml$ )
HISTONA III S	77,44	400
MBP	21,55	11,09
PROTAMINA SULFATO	34,5	1250
PÉPTIDO ( KRTLRR )	39,62	270,27
PÉPTIDO ( VRKRTLRRRL )	2244,5	5000

**Tabla 4.2.** Parámetros de cinética enzimática, medidos en eluidos de DE52, para diferentes sustratos de PKC. Los valores corresponden a la enzima parcialmente purificada y en condiciones de ensayo para nPKC.

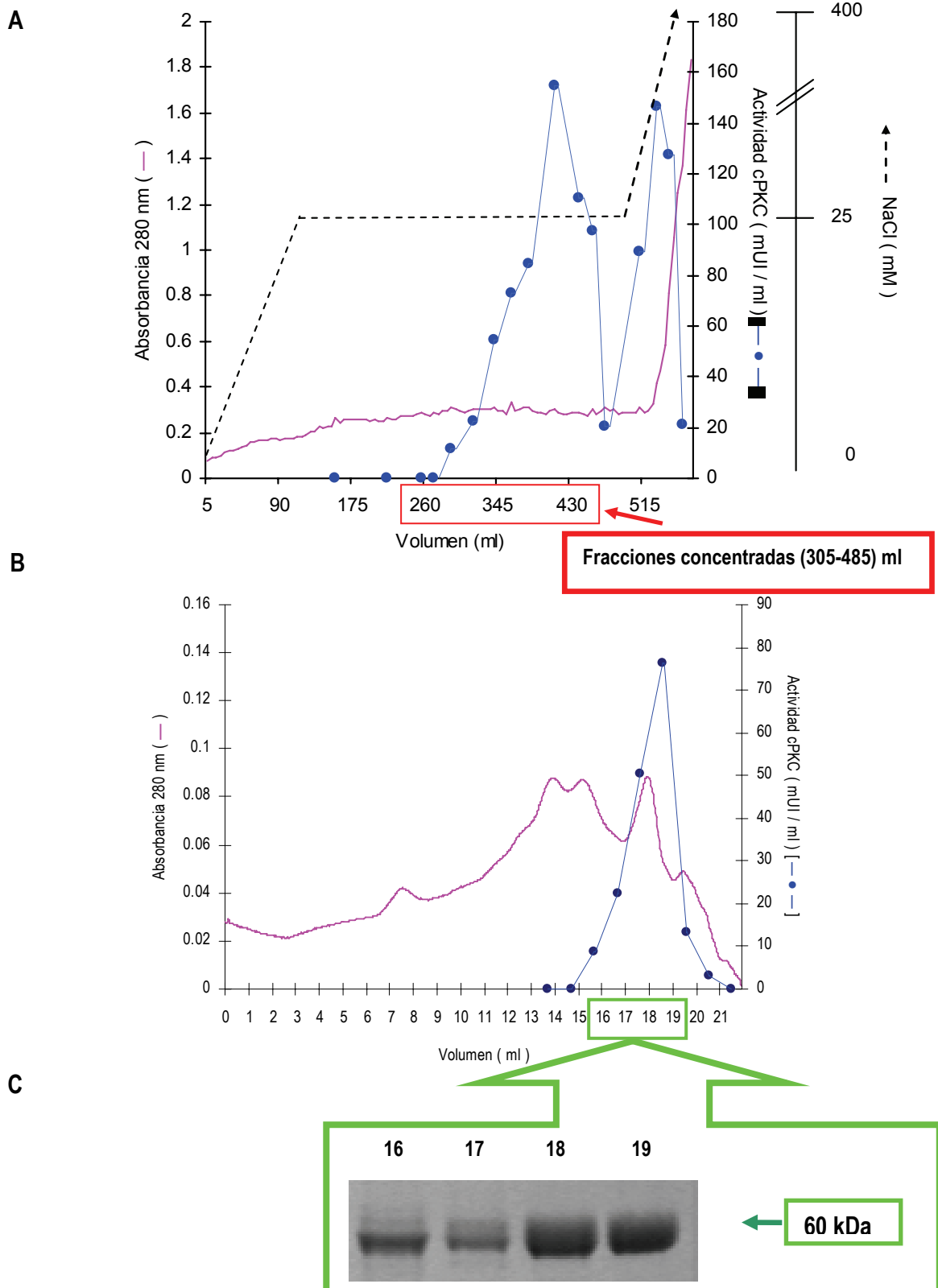
### 4.3. Purificación y Caracterización Bioquímica de una PKC dependiente de $Ca^{2+}$

#### 4.3.1. Purificación de cPKC

Mediante dos cromatografías, se purificó a partir de manto de *M. galloprovincialis*, una proteína con actividad quinasa sobre el péptido (VRKRTLRRRL), dependiente de  $Ca^{2+}$  y activada por la presencia de fosfatidil L-serina y PMA.

En la cromatografía con DE52 (figura 4.2.A.) se observa 1 pico activo de cPKC, cuando se pasa una solución de NaCl 25 mM. Las fracciones activas fueron concentradas y sometidas a una cromatografía de exclusión molecular con la columna superdex 200, en la que se detectó nuevamente un pico con actividad cPKC (figura 4.2.B.); en cuatro de las fracciones recogidas: 16, 17, 18 y 19, se detectó una única banda de proteínas.

## Resultados



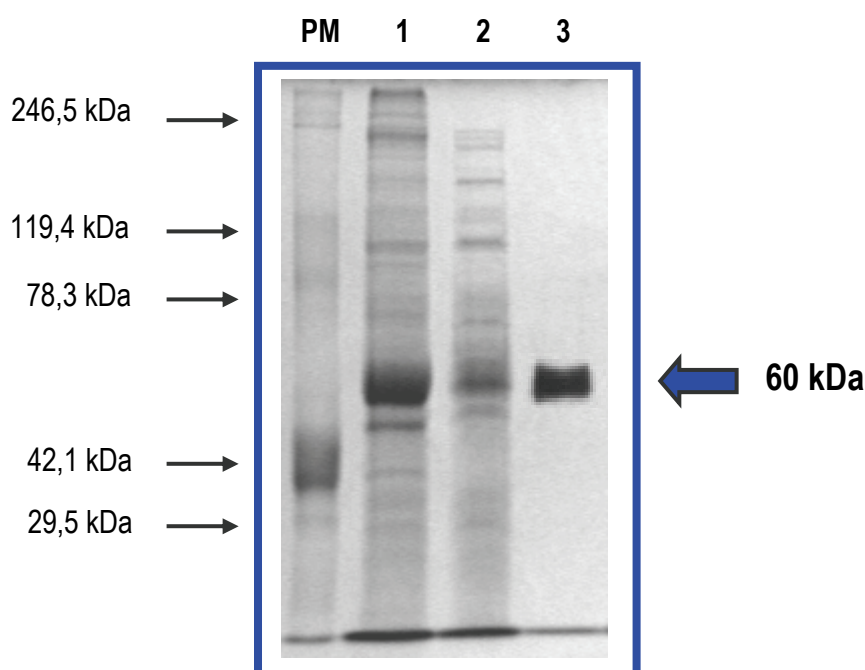
**Figura 4.2.** Purificación de la isoforma de cPKC, activada por lípidos y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . El sustrato para la quinasa fue el péptido (VRKRTLRL). **A.** Cromatografía de intercambio iónico, sobre DE-52, del EC obtenido del manto de mejillón *M. galloprovincialis*. **B.** Cromatografía de exclusión molecular con la columna Superdex 200 HR 10 / 30. **C.** SDS / PAGE 10%, teñido con azul de Coomassie, se cargaron 15  $\mu\text{g}$  proteína / calle.



## Resultados

La electroforesis de las fracciones recogidas en la cromatografía de exclusión molecular realizada con la Superdex 200, muestra claramente cómo va apareciendo en la fracción 16 un polipéptido de aproximadamente 60 kDa, que luego es muy notorio en las fracciones 18 y 19, éstas últimas son también las que presentan mayor actividad cPKC (Figura 4.2.B y C).

La figura 4.3 evidencia como al realizar dos pasos cromatográficos sucesivos: columna de intercambio iónico (DE52) y gel filtración (Superdex 200) se consigue purificar un polipéptido de unos 60 kDa a partir del extracto crudo de manto del mejillón. En el eluido, obtenido de la cromatografía de exclusión molecular con la Superdex 200, solo se observa una banda.



**Figura 4.3.** SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie. Pasos de purificación de la isoforma de cPKC de manto de *Mytilus galloprovincialis*. **PM.** Marcadores de peso molecular, **1.** EC, **2.** DE52, **3.** Superdex 200. Se cargaron 15 µg de proteína / calle.

Además de la tinción con Coomassie, los geles fueron teñidos con una solución de nitrato de plata (imágenes no mostradas), observándose una única banda en la calle 3 correspondiente al eluido de la Superdex 200. El método de purificación descrito ha permitido obtener una proteína con actividad quinasa dependiente de lípidos / PMA y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Mediante los dos pasos cromatográficos descritos se obtuvo la enzima purificada 1555,52 veces (Tabla 4.3).

## Resultados

<b>EXTRACTOS ENZIMATICOS</b>	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Proteínas totales (mg)</b>	<b>Actividad total (mUI)</b>	<b>Actividad específica (mUI / mg)</b>	<b>Purificación</b>
EC	320	19484,8	716,8	0,036	<b>1</b>
DE52	9,5	8,3163	110,618	13,3013	<b>369,5</b>
SUPERDEX 200	<b>4</b>	<b>0,3262</b>	<b>18,267</b>	<b>55,999</b>	<b>1555,52</b>

Tabla 4.3. Purificación de cPKC de manto de *Mytilus galloprovincialis*.

Del análisis de la electroforesis (figura 4.3) y de la cromatografía de exclusión molecular realizada con la columna Superdex 200 de la proteína purificada se obtuvo el valor del peso molecular aproximado de la enzima, que correspondió a 60 kDa. La proteína quinasa cPKC purificada, en adelante será considerada como p60.

### 4.4. Purificación y Caracterización Bioquímica de una PKC independiente de Ca<sup>2+</sup>

#### 4.4.1. Purificación de nPKC

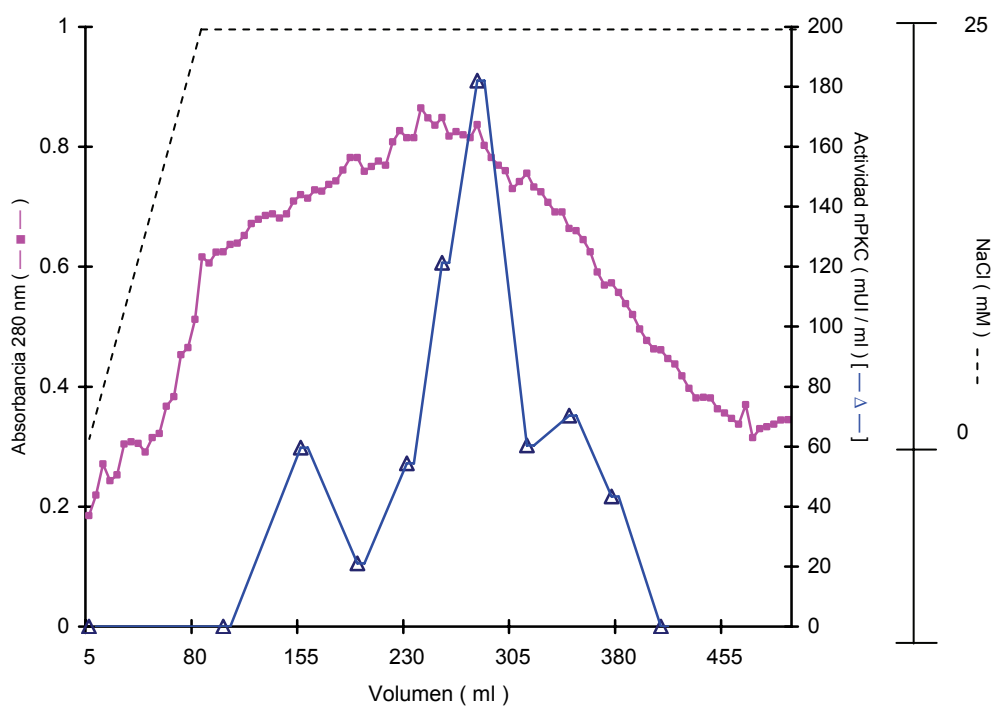
Mediante tres cromatografías, se purificó, a partir de manto de *M. galloprovincialis*, una proteína con actividad quinasa sobre el péptido (VRKRTLRL), que requiere la presencia de fosfatidil L-serina, estimulada por PMA e independiente de Ca<sup>2+</sup>.

En la cromatografía con DE52 (figura 4.4) se observa 1 pico con actividad nPKC, cuando se pasa una solución de NaCl 25 mM. Las fracciones activas fueron concentradas y sometidas a una cromatografía de exclusión molecular con la columna Superdex 200, en la que se detectó nuevamente, un pico con actividad quinasa (figura 4.5.A); las fracciones 13 y 14 fueron recogidas y concentradas mediante ultra-filtración.

## Resultados

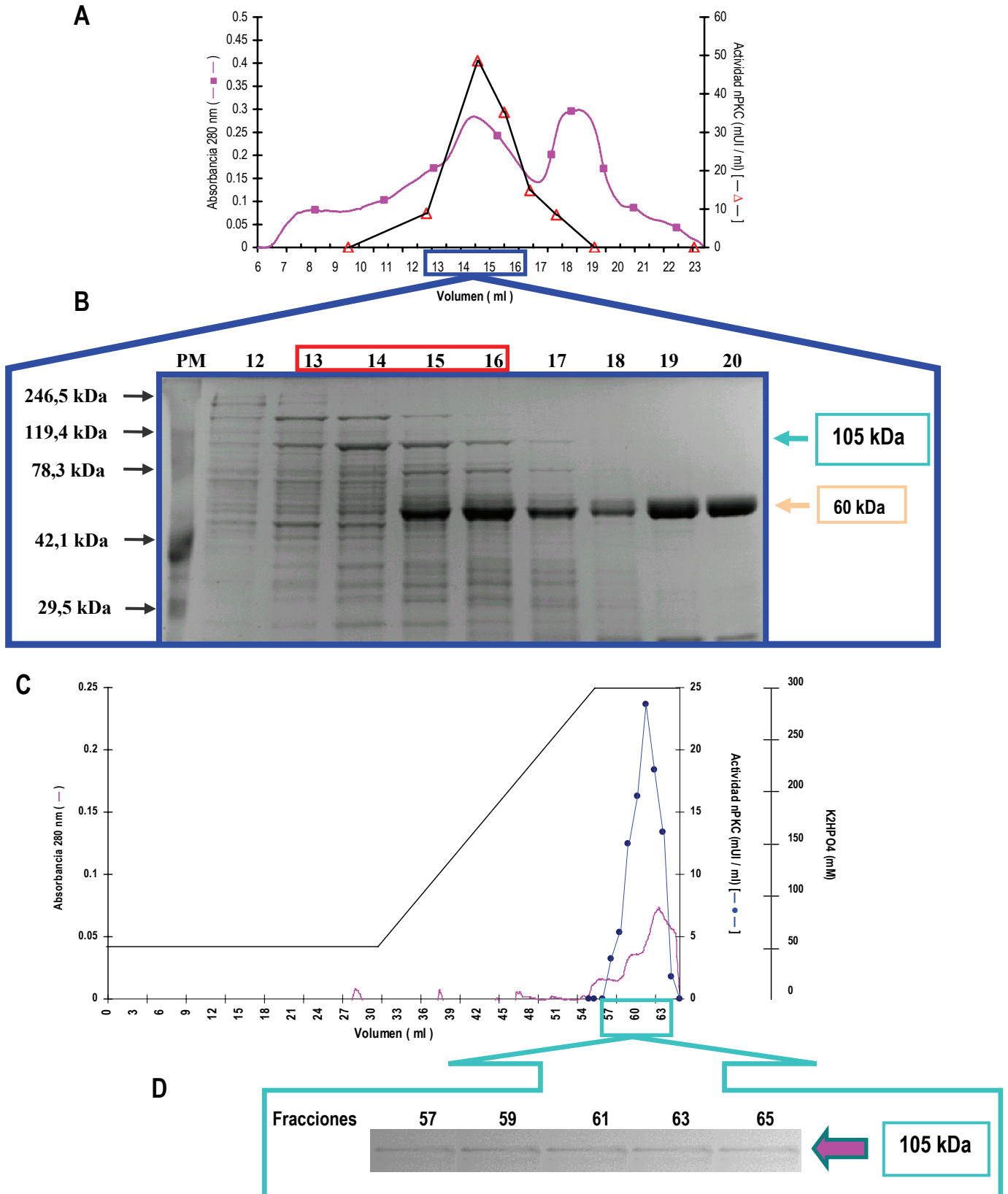
La muestra concentrada fue cargada sobre hidroxilapatito (HTP). Se eluyó un pico de actividad nPKC cuando la concentración de fosfato de potasio se incrementó de 50 mM hasta 300 mM (Figura 4.5.C).

La electroforesis de las fracciones recogidas en la Superdex 200, muestra claramente cómo va apareciendo en la fracción nº 12 un polipéptido de aproximadamente 105 kDa, que luego es más notorio en las fracciones 13, 14, 15 y 16; la fracción nº 14 es la que presenta mayor actividad nPKC (Figura 4.5.B). En las electroforesis de las fracciones recogidas en la cromatografía de hidroxilapatito para el pico activo de nPKC se detectó una única banda de proteínas con un peso de 105 kDa (Figura 4.5.D).



**Figura 4.4.** Purificación de la isoforma nPKC, activada por lípidos e independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . El sustrato para la quinasa fue (VRKRTLRL). Cromatografía de intercambio iónico, sobre DE52, del EC obtenido del manto de mejillón *M. galloprovincialis*.

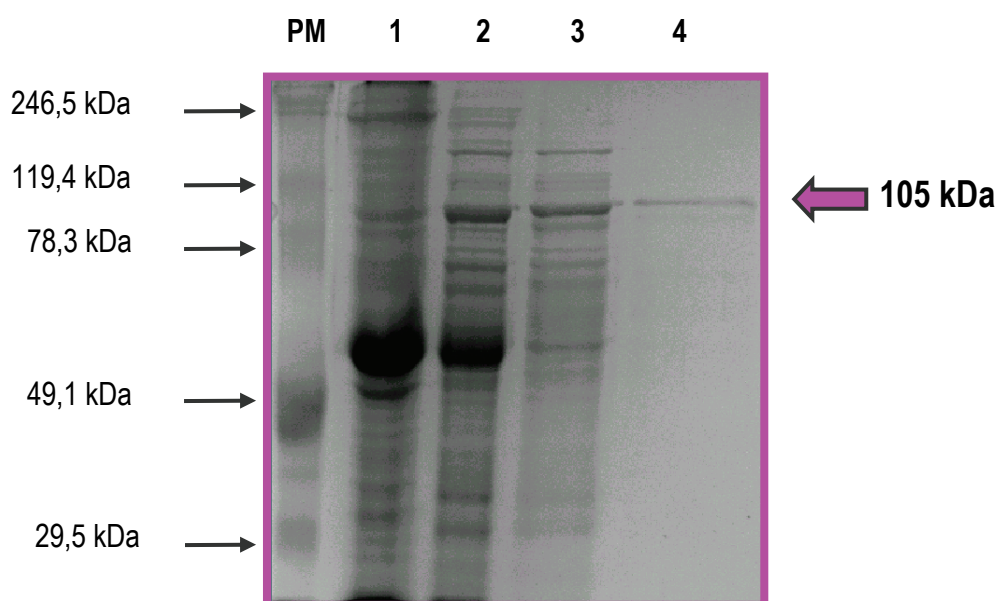
## Resultados



**Figura 4.5.** Proceso de purificación de una isoforma PKC, activada por lípidos e independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . El sustrato para la quinasa fue (VRKRTLRL). **A.** Cromatografía de exclusión molecular con la columna Superdex 200 HR 10 / 30. **B.** SDS / PAGE 10%, eluidos Superdex 200, teñido con azul de Coomassie. **C.** Cromatografía de adsorción, sobre hidroxilapatito. **D.** SDS / PAGE 10%, eluidos hidroxilapatito, teñido con azul de Coomassie.

## Resultados

La figura 4.6 evidencia claramente como en cada paso cromatográfico se reduce el número de bandas hasta que solo queda una banda que migra a nivel de 105 kDa, que no es notoria en el EC, pero la cual se observa más nítida con cada paso de purificación. En las electroforesis realizadas para el eluido de la HTP se observó una única banda de proteínas. Además de la tinción con Coomassie, los geles realizados fueron teñidos con una solución de nitrato de plata (imágenes no mostradas), observándose una única banda en la calle 4 correspondiente al eluido de la columna de hidroxilapatito.



**Figura 4.6.** SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie. Pasos de purificación de la isoforma de nPKC de manto de *Mytilus galloprovincialis*. PM. Marcadores de peso molecular, 1. EC, 2. DE52, 3. Cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200). 4. Cromatografía de hidroxilapatito. Se cargaron 15 µg de proteína / calle.

El método de purificación descrito ha permitido obtener una proteína pura con actividad quinasa dependiente de lípidos / PMA e independiente de  $Ca^{2+}$ .

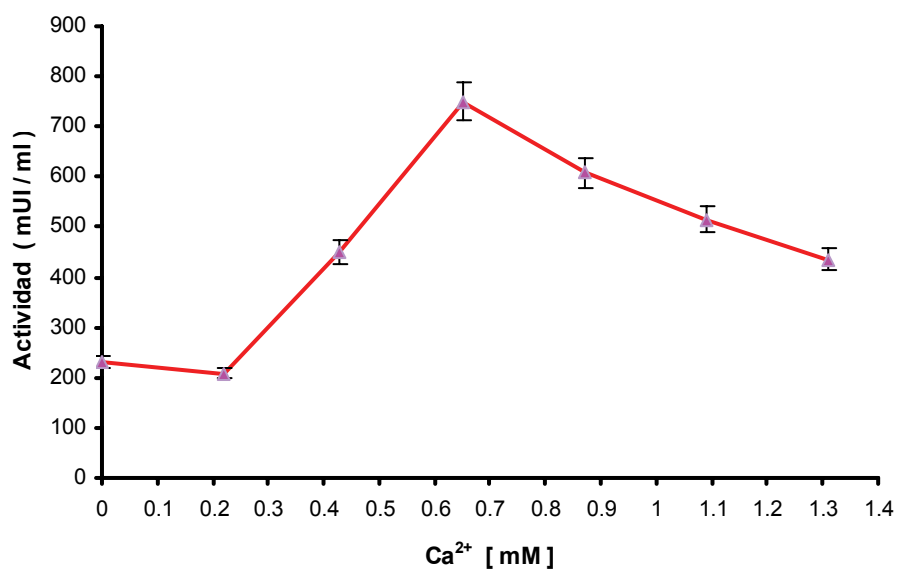
Del análisis de la electroforesis (figura 4.6) y de la cromatografía de exclusión molecular con la Superdex 200 de la proteína pura se obtuvo el valor del peso molecular aproximado de la enzima, que correspondió a 105 kDa. La PKC independiente de calcio, en adelante será considerada como p105.

## Resultados

### 4.5. Cinética Enzimática

#### 4.5.1. Determinación de la concentración óptima de $\text{Ca}^{2+}$ en la actividad de p60.

Inicialmente, se decidió estudiar la actividad enzimática mostrada con los diferentes sustratos de PKC valorando la variación de la actividad enzimática, para la misma concentración de péptido sustrato en presencia de diferentes concentraciones de calcio (Figura 4.7).



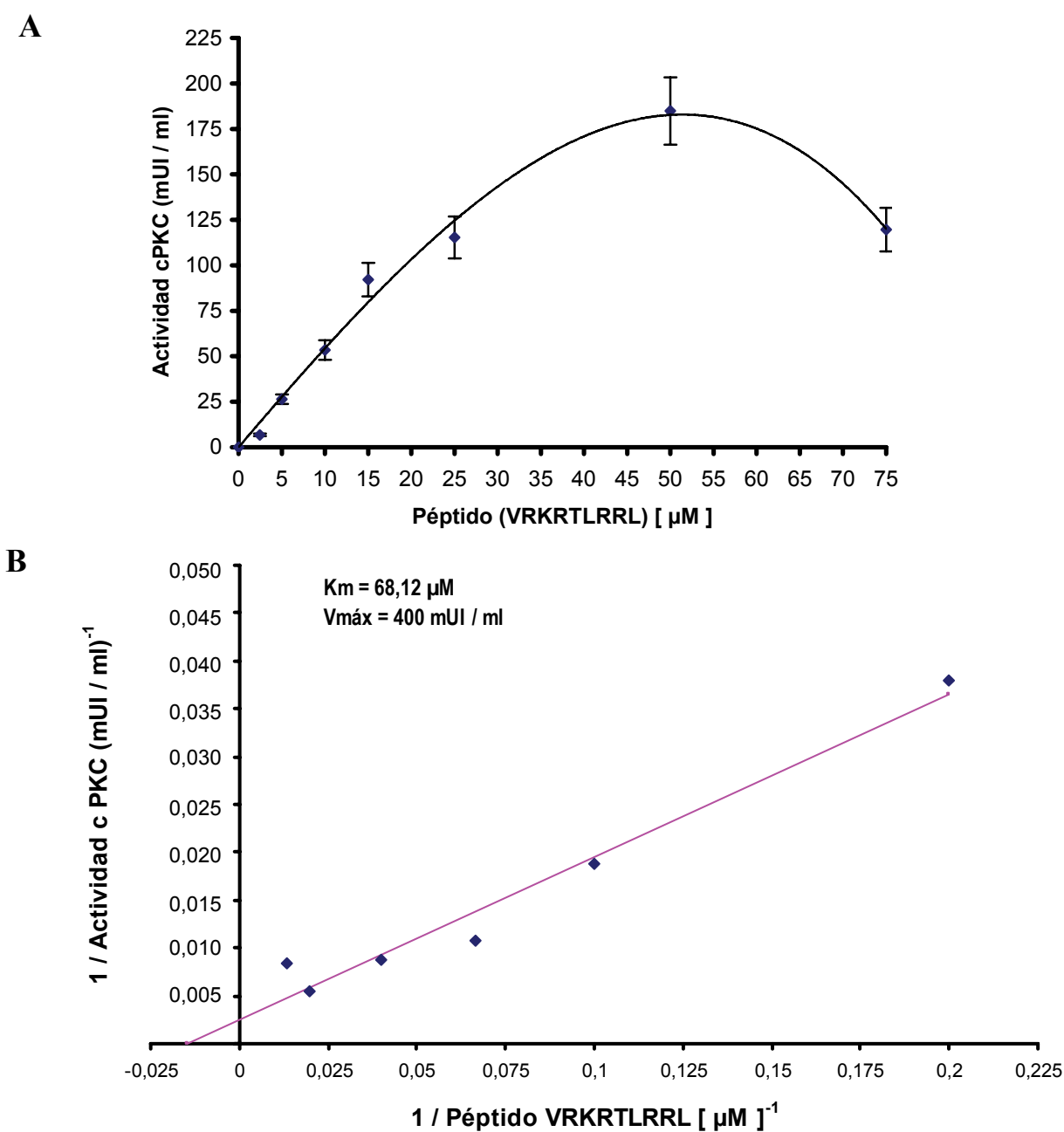
**Figura 4.7.** Efecto de las diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la actividad quinasa de p60 respecto a una concentración fija de péptido (VRKRTLRL). Los valores representados, son la media y la desviación estándar para los valores obtenidos en cinco ensayos.

Basándonos en estos resultados podemos decir que la concentración de calcio óptima para la actividad de p60 es 0,65 mM.

#### 4.5.2. Determinación de $K_m$ y $V_{m\acute{a}x}$ para la cPKC

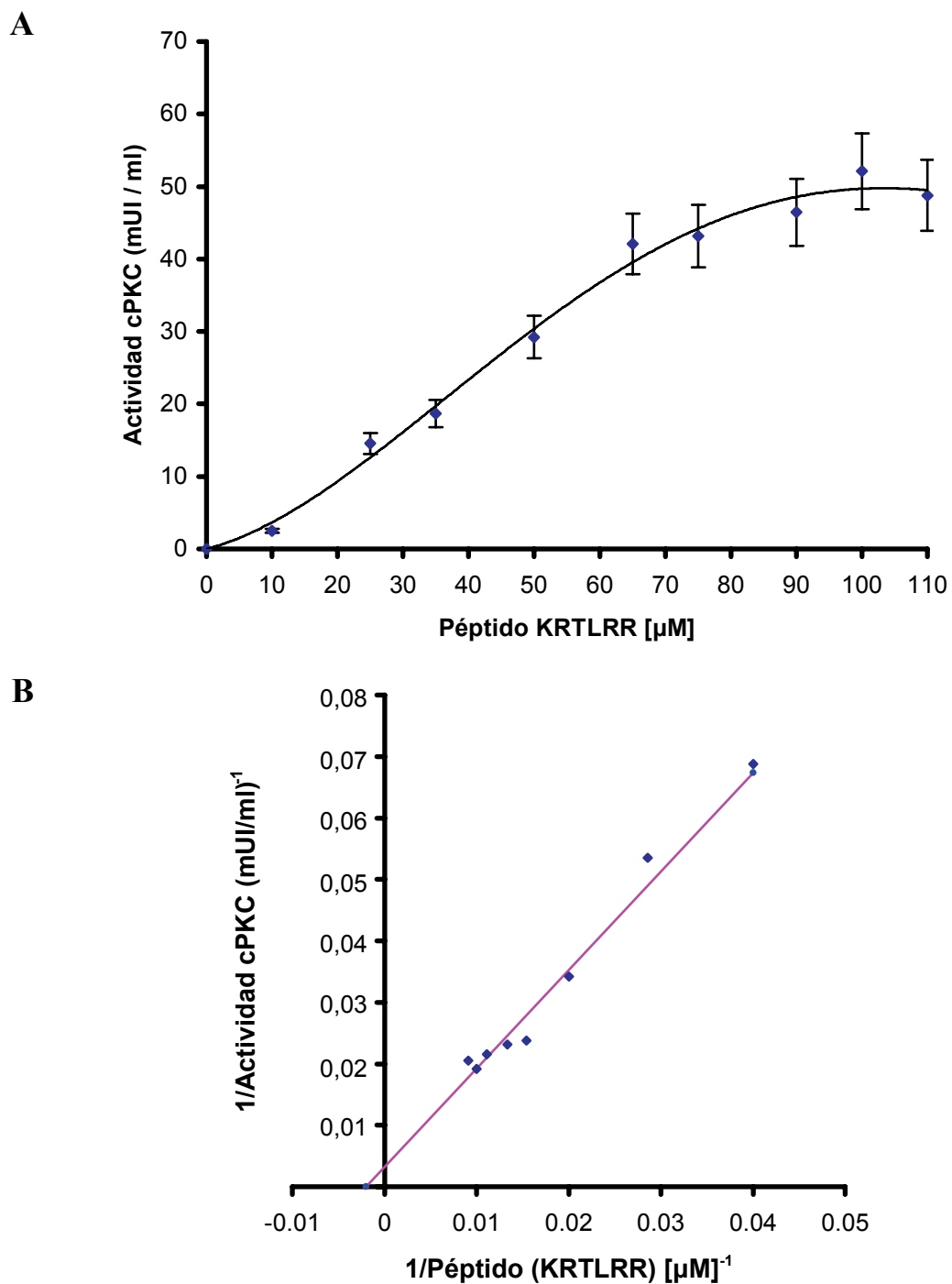
Se estudió la cinética de la proteína quinasa, p60, frente a los siguientes sustratos: el péptido (VRKRTLRL), Histona tipo III S, MBP, protamina sulfato y el péptido (KRTLRR).

Para los cinco sustratos probados se obtuvieron curvas de tipo hiperbólico (Figuras 4.8A á 4.12A). Las representaciones directas y de Lineweaver-Burk permitieron obtener los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ , para cada sustrato (Figuras 4.8 B á 4.12 B).



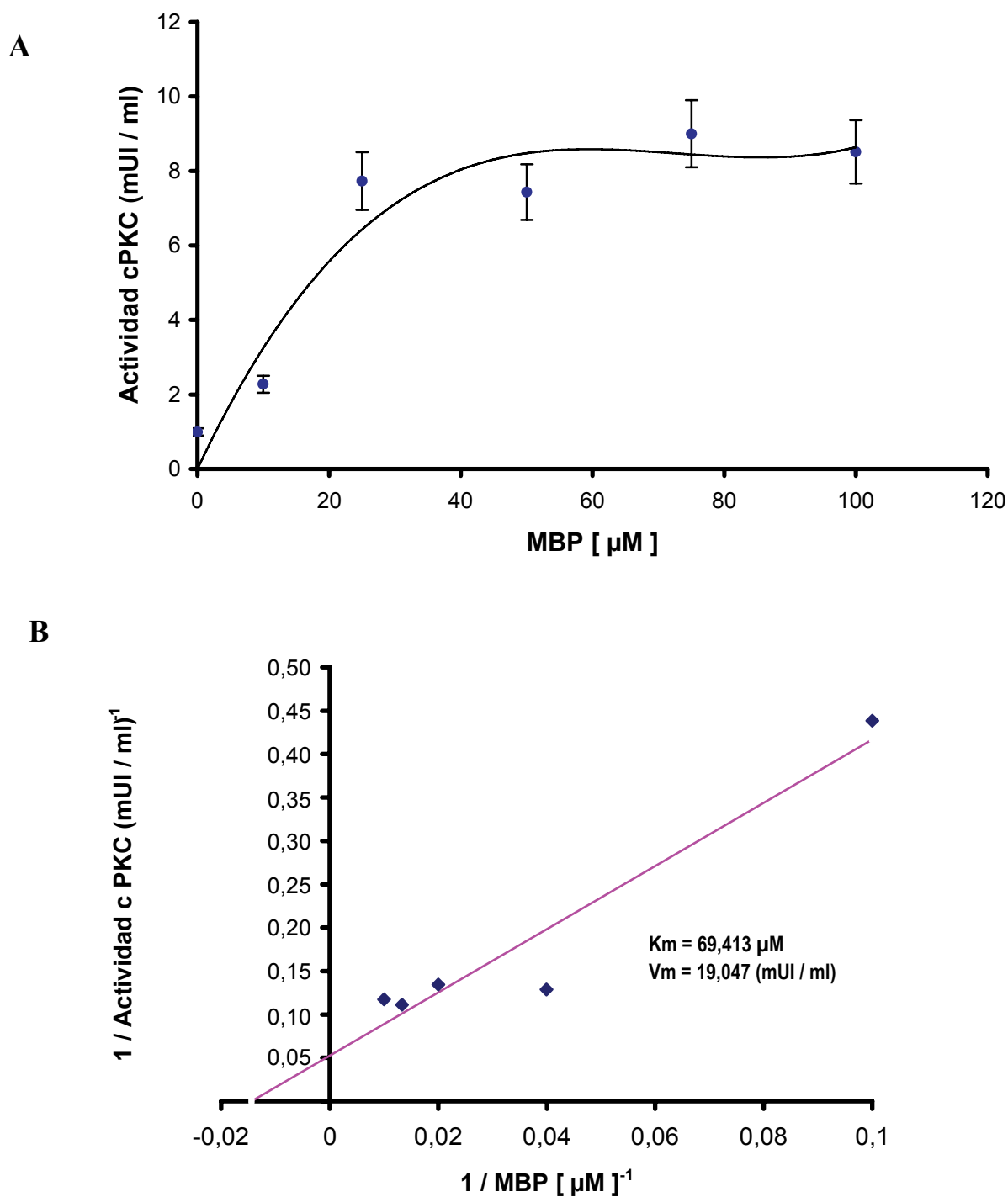
**Figura 4.8. A.** Variación de la actividad quinasa de p60 con la concentración del péptido (VRKRTLRL). Los valores representados, son la media y la desviación estándar, para los valores obtenidos en cinco ensayos. **B.** Representación de Lineweaver-Burk de la variación de la actividad quinasa de p60 con la concentración del péptido (VRKRTLRL).

## Resultados



**Figura 4.9. A.** Variación de la actividad quinasa de p60 con la concentración del péptido [KRTLRR]. Los valores representados, son la media y la desviación estándar, para los valores obtenidos en cinco ensayos. **B.** Representación de Lineweaver-Burk de la variación de la actividad quinasa de p60 con la concentración del péptido [KRTLRR].

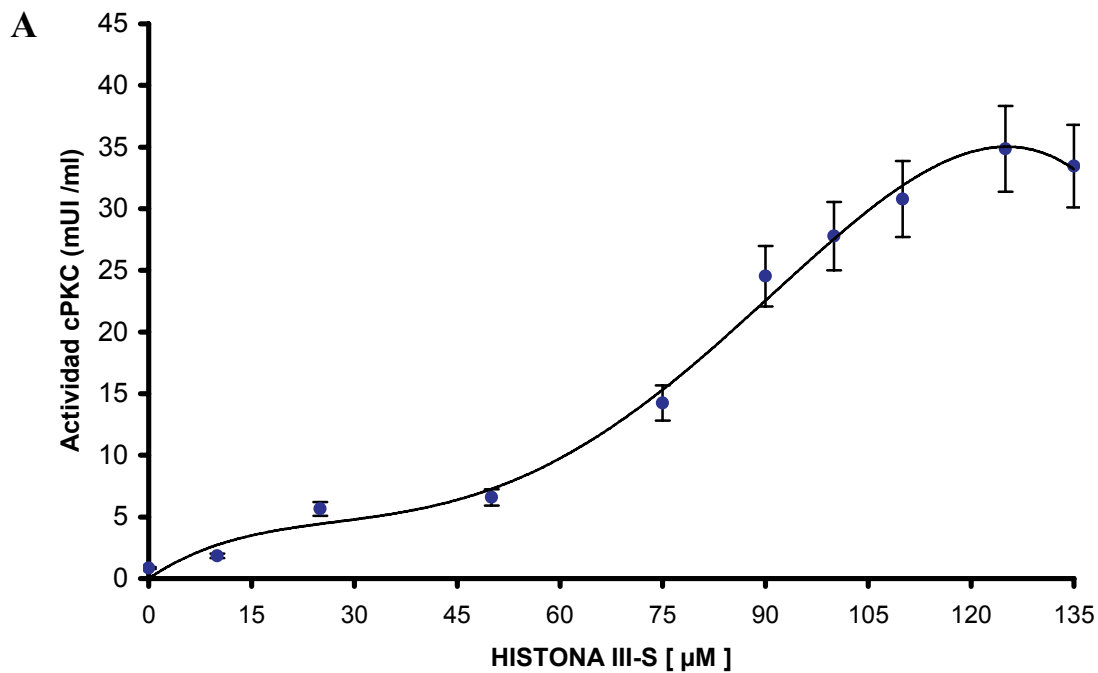




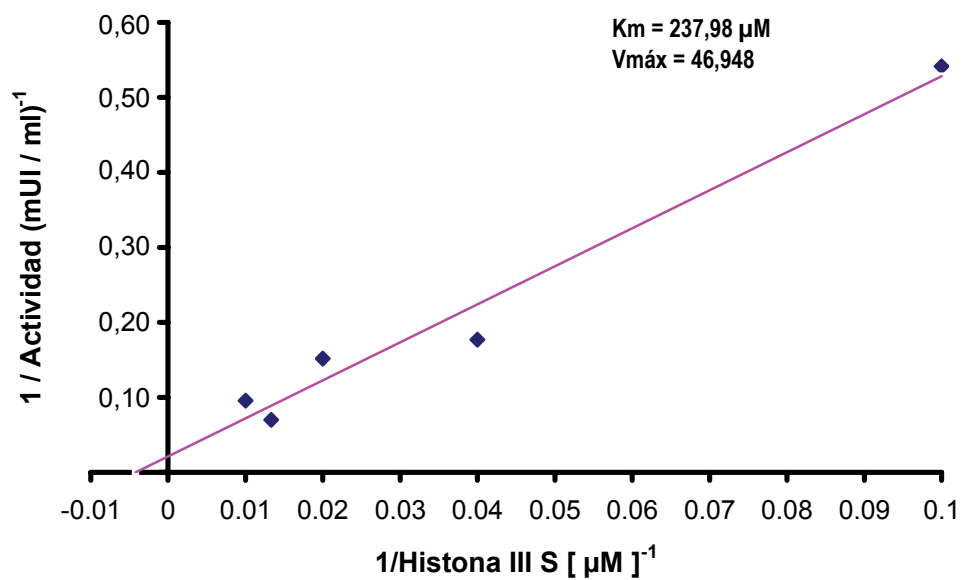
**Figura 4.10. A.** Variación de la actividad quinasa de p60 con la concentración de MBP. Los valores representados son la media y la desviación estándar para los valores obtenidos en cinco ensayos.

**B.** Representación de Lineweaver- Burk de la variación de la actividad quinasa de p60 con la concentración de MBP.

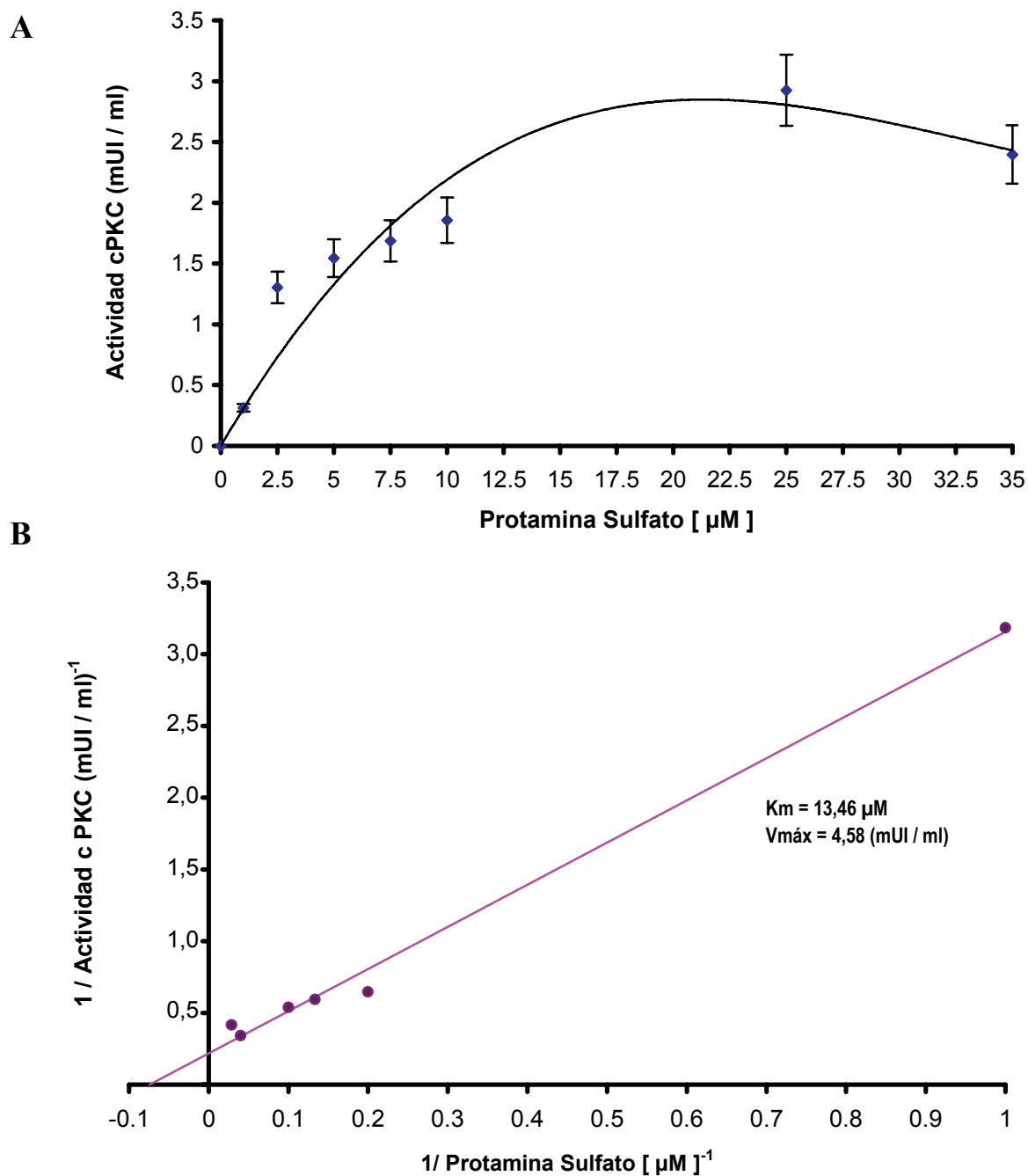
## Resultados



**B**



**Figura 4.11. A.** Variación de la actividad quinasa de p60 con la concentración de Histona III S. Los valores representados, son la media y la desviación estándar para los valores obtenidos en cinco ensayos.  
**B.** Representación de Lineweaver-Burk de la variación de la actividad quinasa de p60 con la concentración de Histona III S.



**Figura 4.12. A.** Variación de la actividad quinasa de p60 con la concentración de Protamina Sulfato. Los valores representados, son la media y la desviación estándar para los valores obtenidos en cinco ensayos.

**B.** Representación de Lineweaver-Burk de la variación de la actividad quinasa de p60 con la concentración de Protamina Sulfato.

## Resultados

Los valores obtenidos en cuanto a  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  para la enzima pura fueron idénticos a los obtenidos para la enzima semi-pura (tabla 4.1).

A la vista de estos resultados, la menor afinidad de p60 fue para el péptido (KRTLRR), con un valor de  $K_m$  de 841,9  $\mu\text{M}$ , mientras que la mayor afinidad se obtuvo para la protamina sulfato, ( $K_m = 13,46 \mu\text{M}$ ). Con el péptido (VRKRTLRR) se obtuvo un valor de  $K_m$  (68,12  $\mu\text{M}$ ) mayor que utilizando protamina, pero en cambio su velocidad máxima es también mucho más alta (400 mUI / ml) si se compara con la  $V_{m\acute{a}x}$  de la protamina sulfato (4,58 mUI / ml) o con la de los otros péptidos sustratos (ver tabla 4.1). La mayor velocidad correspondió al péptido (KRTLRR) (500 mUI / ml) pero también es el sustrato por el que la enzima muestra la menor afinidad.

Si se calcula la eficiencia catalítica (relación  $\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m}$ ) para los distintos péptidos, se obtienen los siguientes datos:

Péptidos Sustrato		Eficiencia Catalítica $\left[ \frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m} \right]$
(1)	HISTONA III S	0,197
(2)	MBP	0,274
(3)	Protamina Sulfato	0,340
(4)	Péptido [KRTLRR]	1,686
(5)	<b>Péptido (VRKRTLRR)</b>	<b>5,872</b>

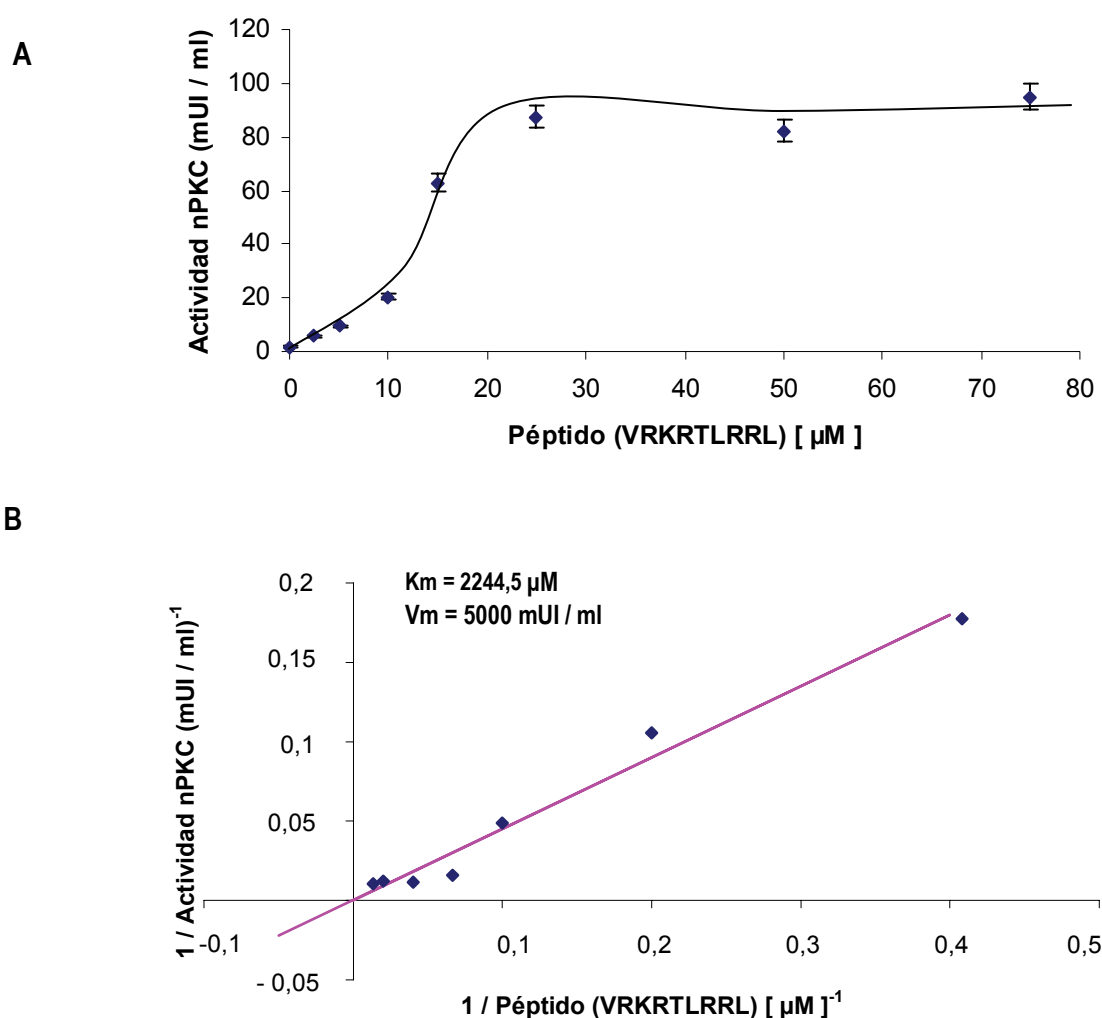
Tabla 4.4. Relación  $V_{m\acute{a}x} / K_m$  para los diferentes sustratos ensayados con p60.

La mayor eficiencia catalítica para la proteína p60 se obtiene utilizando el péptido n° (5).

### 4.5.3. Determinación de $K_m$ y $V_{m\acute{a}x}$ para la nPKC

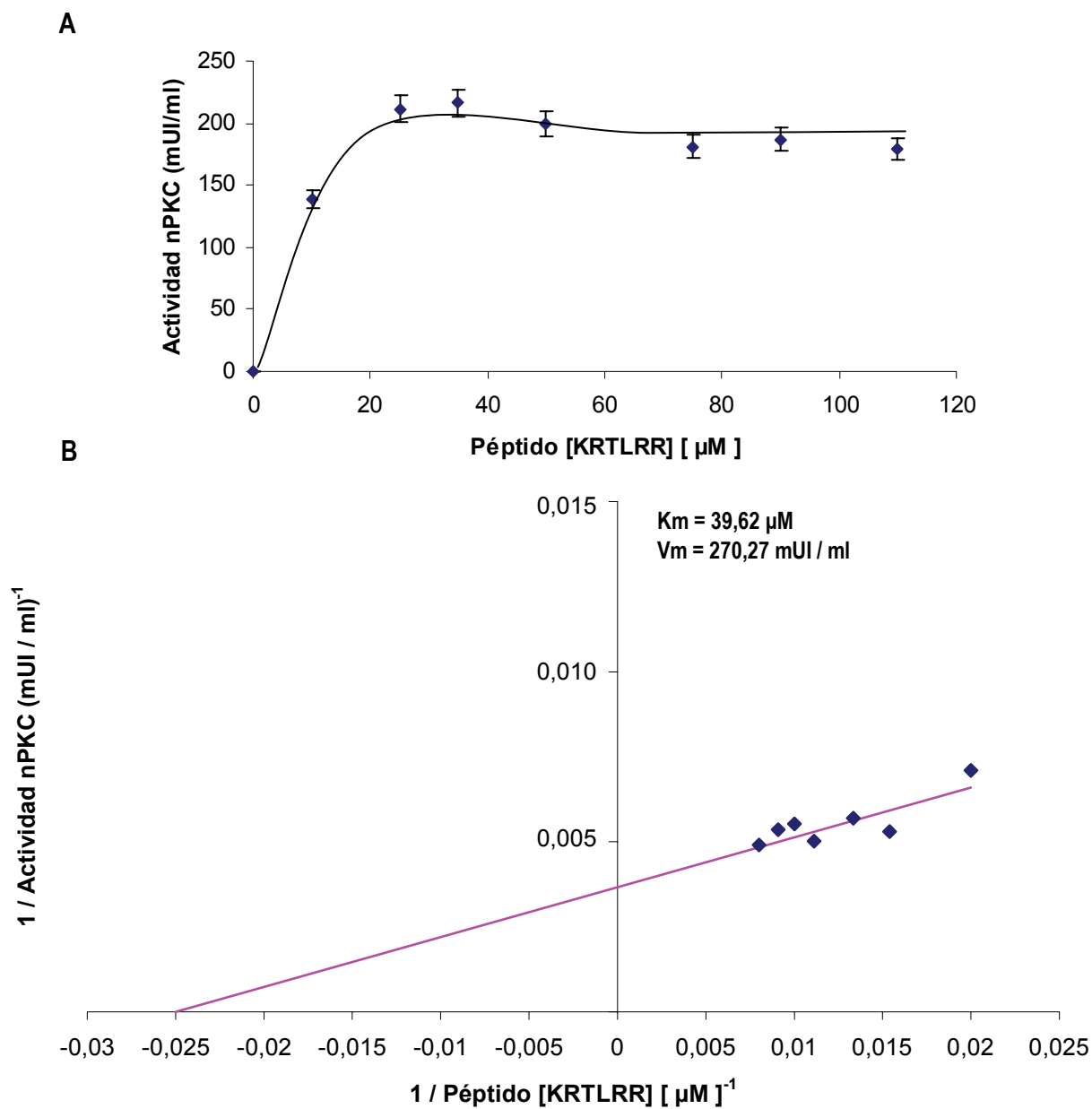
Se estudió la cinética de la proteína quinasa, p105, frente a los siguientes sustratos: el péptido (VRKRTLRL), Histona tipo III S, la proteína mielínica básica, protamina sulfato y el péptido (KRTLRR).

Para los cinco sustratos probados se obtuvieron curvas de tipo hiperbólico (Figuras 4.13A á 4.17 A). Las representaciones directas y de Lineweaver-Burk permitieron obtener los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ , para cada sustrato (Figuras 4.13 B á 4.17 B).

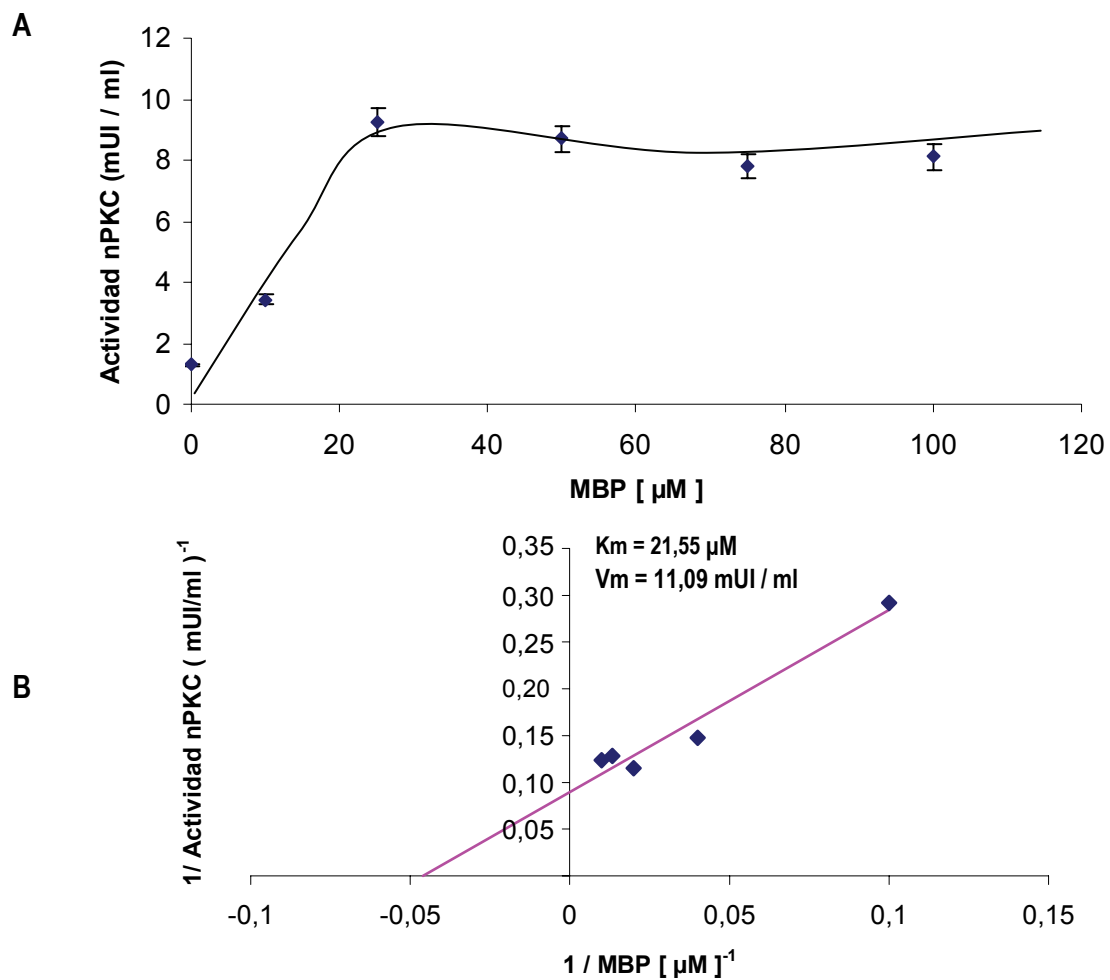


**Figura 4.13. A.** Variación de la actividad quinasa de p105 con la concentración del péptido (VRKRTLRL). Los valores representados, son la media y la desviación estándar para los valores obtenidos en cinco ensayos. **B.** Representación de Lineweaver-Burk de la variación de la actividad quinasa de p105 con la concentración del péptido (VRKRTLRL).

## Resultados



**Figura 4.14. A.** Variación de la actividad quinasa de p105 con la concentración del péptido (KRTLRR). Los valores representados, son la media y la desviación estándar para los valores obtenidos en cinco ensayos. **B.** Representación de Lineweaver-Burk de la variación de la actividad quinasa de p105 con la concentración del péptido (KRTLRR).

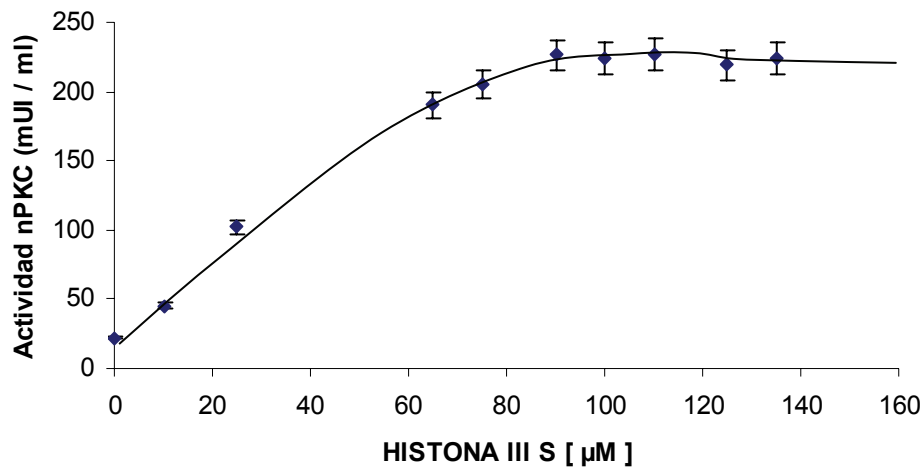


**Figura 4.15. A.** Variación de la actividad quinasa de p105 con la concentración de MBP. Los valores representados, son la media y la desviación estándar, para los valores obtenidos en cinco ensayos.

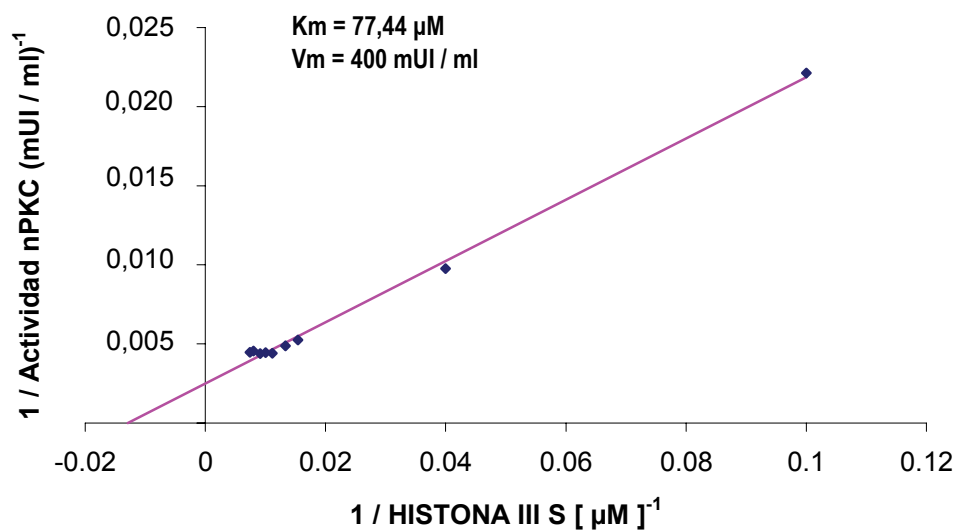
**B.** Representación de Lineweaver- Burk de la variación de la actividad quinasa de p105 con la concentración de MBP.

## Resultados

A



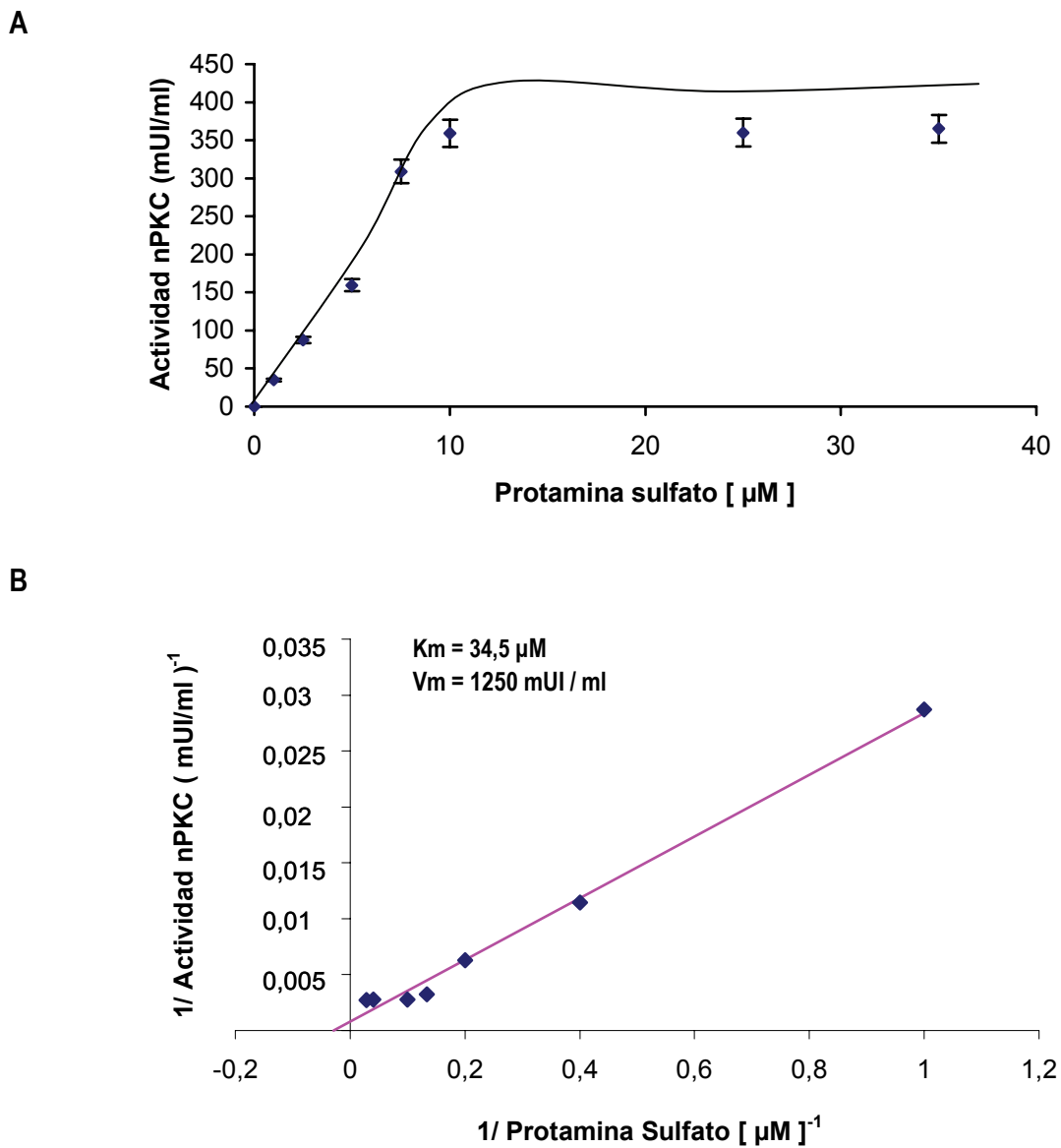
B



**Figura 4.16. A.** Variación de la actividad quinasa de p105 con la concentración de Histona III S. Los valores representados, son la media y la desviación estándar para los valores obtenidos en cinco ensayos.

**B.** Representación de Lineweaver-Burk de la variación de la actividad quinasa de p105 con la concentración de Histona III S.





**Figura 4.17. A.** Variación de la actividad quinasa de p105 con la concentración de Protamina Sulfato. Los valores representados, son la media y la desviación estándar para los valores obtenidos en cinco ensayos.

**B.** Representación de Lineweaver-Burk de la variación de la actividad quinasa de p105 con la concentración de Protamina Sulfato.

## Resultados

Analizando los resultados obtenidos, la menor afinidad de p105 fue para el péptido (VRKRTLRL) con un valor de  $K_m = 2244,5 \mu\text{M}$ , mientras que la mayor afinidad se obtuvo usando MBP como sustrato, con un valor de  $K_m = 21,55 \mu\text{M}$ , aunque también fue el sustrato con el que se obtuvo la  $V_{m\acute{a}x}$  más baja (11,09 mUI / ml). Con la protamina sulfato se obtuvo un valor de  $K_m$  (34,5  $\mu\text{M}$ ) un poco más alto que para la MBP, sin embargo la velocidad máxima (1250 mUI / ml) es la más alta después de la  $V_{m\acute{a}x}$  obtenida para el péptido (VRKRTLRL) con un valor de 5000 mUI / ml. Utilizando el péptido (KRTLRR) se observó un valor de  $K_m$  (39,62  $\mu\text{M}$ ) un poco más alto que para la protamina pero la velocidad máxima (270,27 mUI / ml) fue mucho menor a la de la protamina (ver tabla 4.2). Lo mismo ocurrió para la Histona III S, se obtuvo un valor de  $K_m = 77,44 \mu\text{M}$  y una  $V_{m\acute{a}x} = 400$  mUI / ml.

Si se calcula la eficiencia catalítica (relación  $\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m}$ ) para los distintos péptidos, se obtienen los siguientes datos:

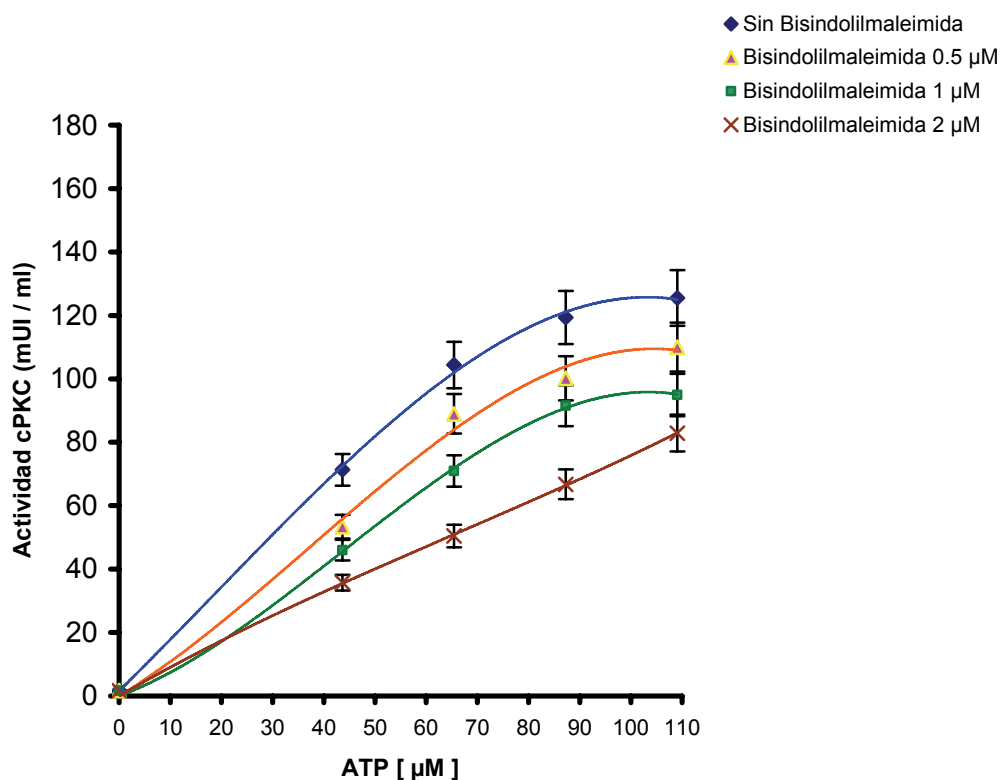
Péptidos Sustrato		Eficiencia Catalítica $[\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m}]$
(1)	HISTONA III S	5,165
(2)	MBP	0,515
(3)	<b>Protamina Sulfato</b>	<b>36,231</b>
(4)	Péptido [KRTLRR]	6,821
(5)	Péptido (VRKRTLRL)	2,227

Tabla 4.5. Relación  $V_{m\acute{a}x} / K_m$  para los diferentes sustratos ensayados con p105.

La mayor eficiencia catalítica para la proteína p105 se obtiene con el péptido n° (3).

#### 4.5.4. Inhibición de la actividad de la cPKC

Se estudió la variación de la actividad enzimática, utilizando como sustrato el péptido VRKRTLRL para diferentes concentraciones de inhibidores de PKC como la bisindolilmaleimida, la estaurosporina (inhibidores con respecto a la unión de ATP), y la curcumina (inhibidor de la interacción con el fosfolípido) (Figuras 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19). Todas las curvas resultantes fueron de tipo hiperbólico y conforme aumentó la concentración del inhibidor, disminuyó el valor de actividad de cPKC en condiciones de saturación de la enzima.

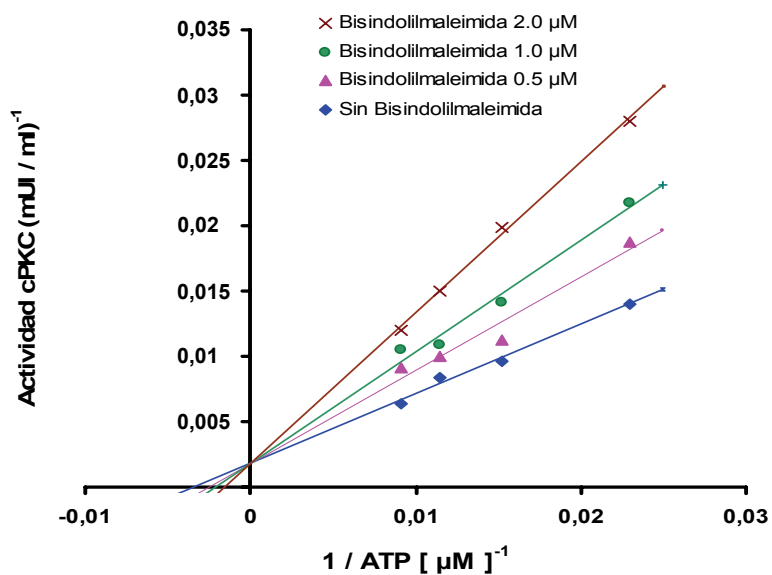


**Figura 4.13.** Efecto de diferentes concentraciones de bisindolilmaleimida sobre la actividad quinasa de p60 respecto a la concentración de ATP. Los valores representados, son la media y la desviación estándar para los valores obtenidos en cinco ensayos.

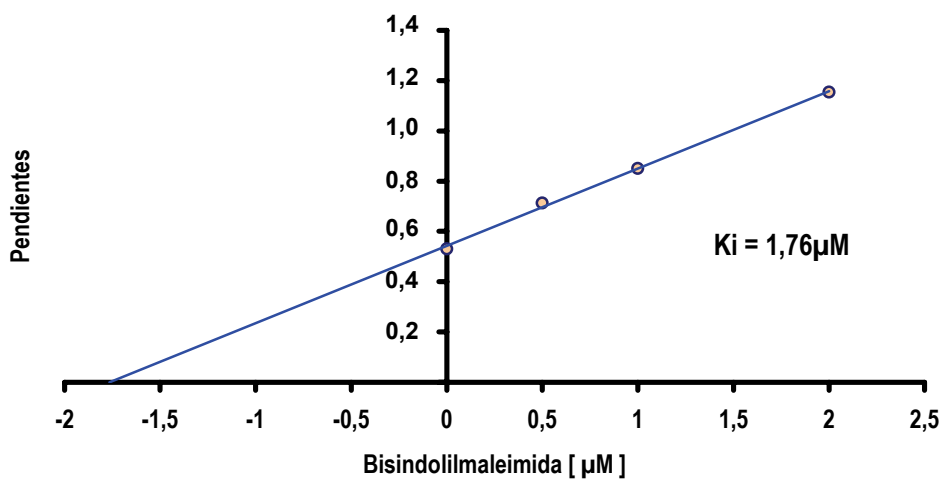
## Resultados

Con el fin de conocer el tipo de inhibición producida por la bisindolilmaleimida sobre la actividad quinasa, se representaron los dobles inversos de los datos de la figura 4.13 (Figura 4.14).

A



B



**Figura 4.14. A.** Representación de Lineweaver-Burk de la variación de la actividad quinasa de p60 con la concentración de ATP en presencia de distintas concentraciones de bisindolilmaleimida.

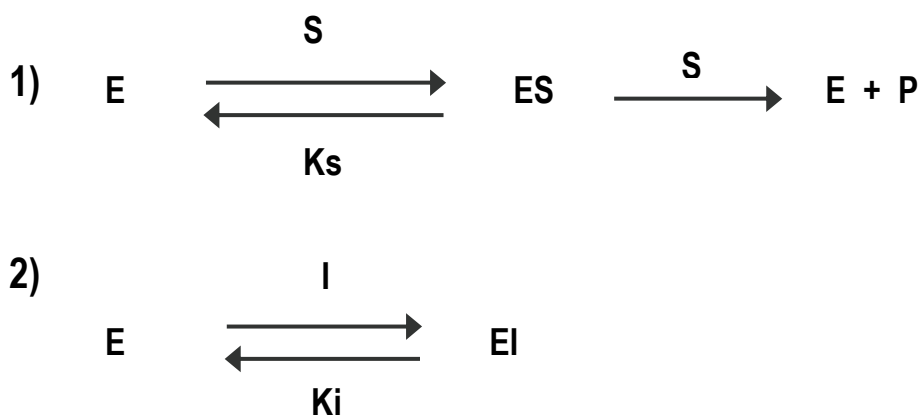
**B.** Gráfica de los valores de las pendientes de la representación de Lineweaver-Burk frente a la concentración de bisindolilmaleimida.

## Resultados

La representación de Lineweaver-Burk (Figura 4.14A) muestra una serie de rectas convergentes, en las que se puede apreciar que, el valor de  $K_m$  de la enzima, disminuye al incrementarse la concentración de bisindolilmaleimida, mientras que  $V_{m\acute{a}x}$  es constante. De esta forma coincide la intersección de todas las rectas en el eje de abscisas ( $1 / \text{velocidad}$ ), y por tanto estos datos se ajustan a una inhibición de tipo competitivo (Figura 4.15).

La representación de las pendientes de las rectas de la figura 4.14A, frente a la concentración de bisindolilmaleimida (Figura 4.14B), permitió calcular la constante de inhibición  $K_i$  para la bisindolilmaleimida que fue de  $1,76 \mu\text{M}$ . Este valor representa la afinidad de la enzima libre por la bisindolilmaleimida (Dixon and Webb, 1979).

Para la estaurosporina y la curcumina se realizaron las mismas determinaciones, obteniéndose resultados similares (ambas se ajustan a una inhibición de tipo competitivo). La constante de inhibición  $K_i$  para la estaurosporina fue  $K_i = 20,3 \mu\text{M}$  y para la curcumina  $K_i = 13,16 \mu\text{M}$ .



**Figura 4.15.** Esquema de reacción para una inhibición de tipo competitivo (Dixon and Web, 1979).  
E enzima, S sustrato, I inhibidor,  $K_s$  constante de disociación,  $K_i$  constante de inhibición,  
P producto.

## Resultados

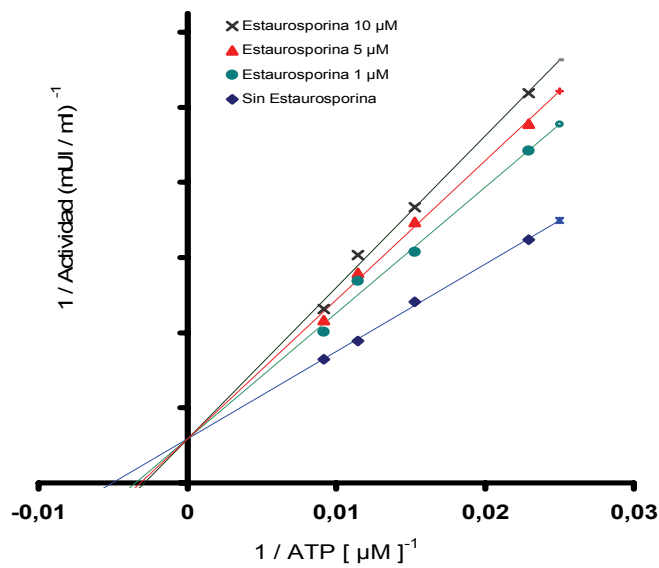


Figura 4.16. Efecto de diferentes concentraciones de estaurosporina sobre la actividad quinasa de p60 respecto a la concentración de ATP. Los valores representados, son la media y la desviación estándar para los valores obtenidos en cinco ensayos.

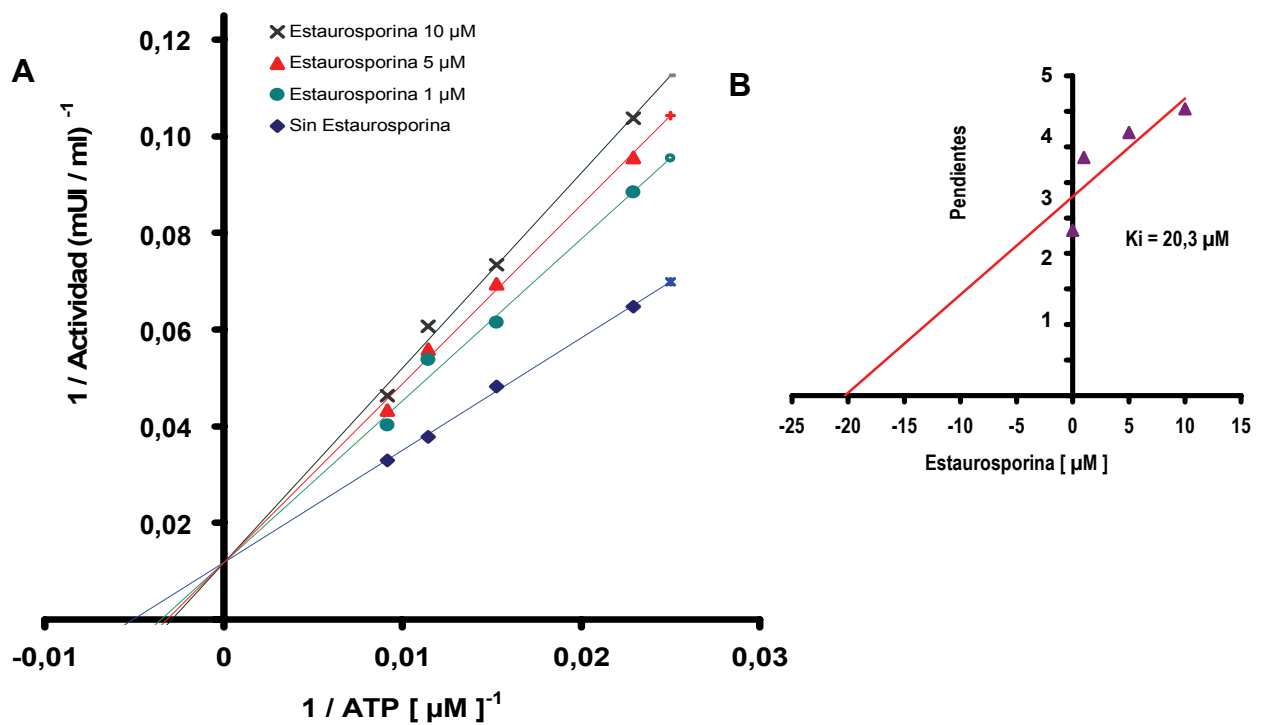
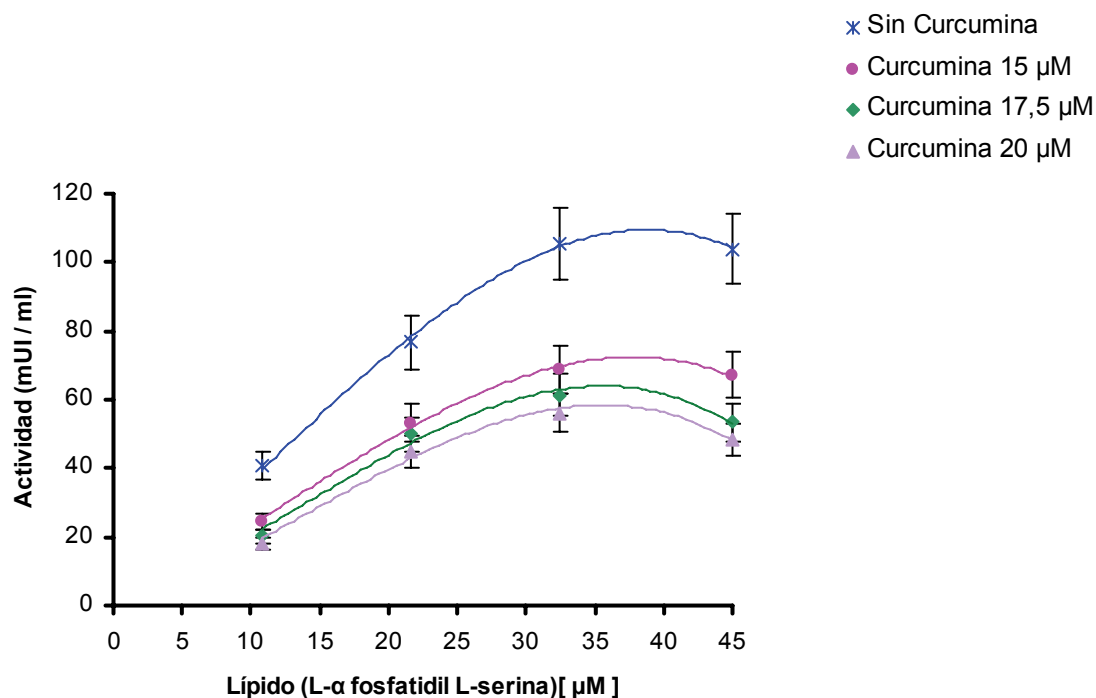
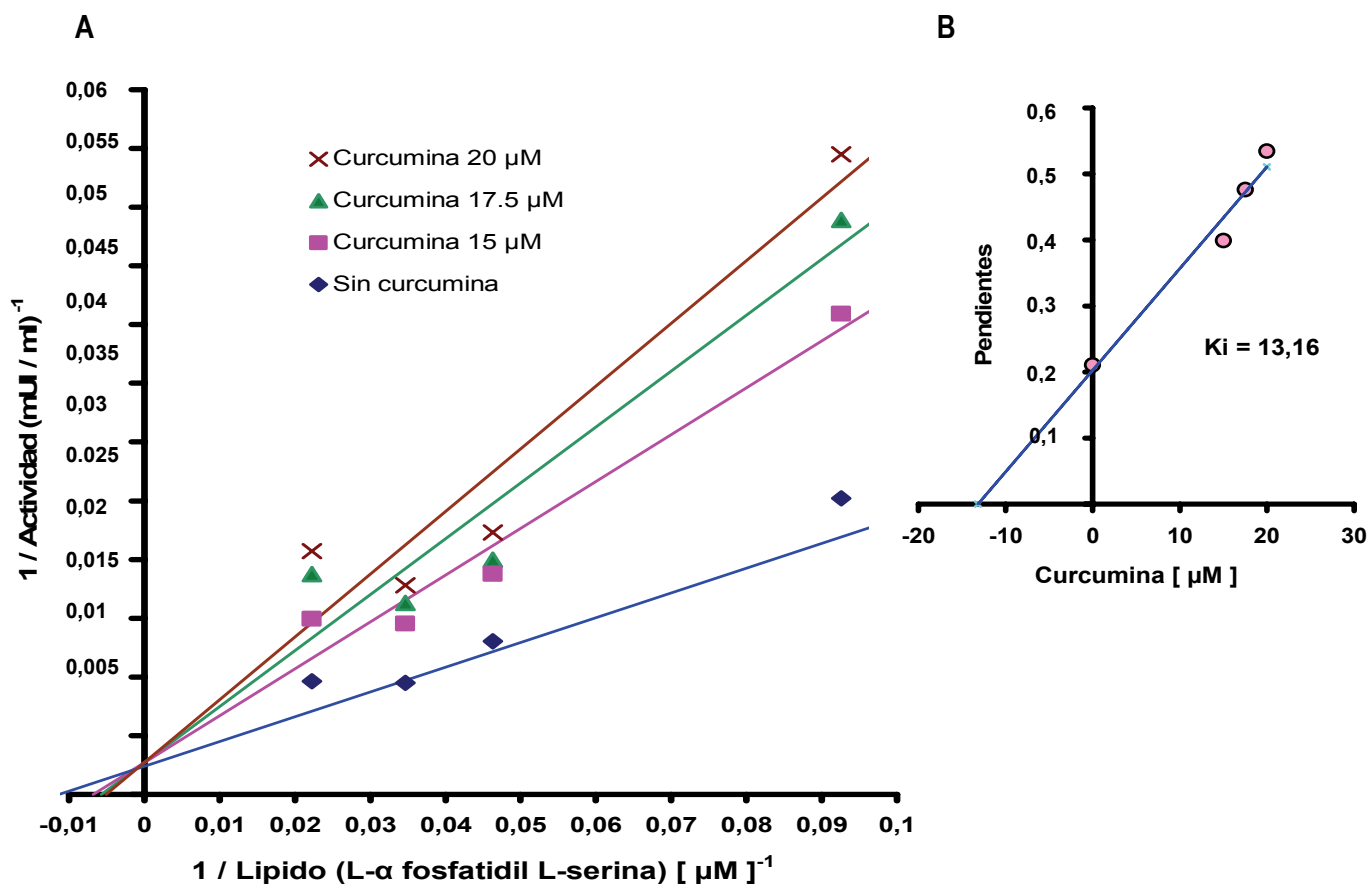


Figura 4.17. A. Representación de Lineweaver-Burk de la variación de la actividad quinasa de p60 con la concentración de ATP en presencia de distintas concentraciones de estaurosporina. B. Gráfica de los valores de las pendientes de la representación de Lineweaver-Burk frente a la concentración de estaurosporina.

## Resultados



**Figura 4.18.** Efecto de diferentes concentraciones de curcumina sobre la actividad quinasa de p60 respecto a la concentración de lípido. Los valores representados, son la media y la desviación estándar para los valores obtenidos en cinco ensayos.



**Figura 4.19. A.** Representación de Lineweaver-Burk de la variación de la actividad quinasa de p60 con la concentración de lípido (L-α fosfatidil L-serina) en presencia de distintas concentraciones de curcumina. **B.** Gráfica de los valores de las pendientes de la representación de Lineweaver-Burk frente a la concentración de curcumina.

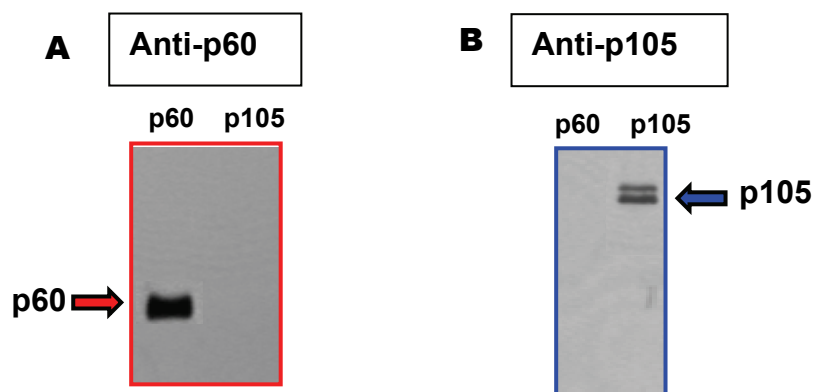
## Resultados

### 4.6. Determinación del grado de especificidad de anti p105 y anti p60

A partir de las enzimas **p105** y **p60** purificadas de manto de mejillón *M. galloprovincialis*, se obtuvieron anticuerpos policlonales contra ambas isoenzimas, en ratón y conejo respectivamente.

Los anticuerpos contra las respectivas isoformas de nPKC y cPKC, fueron utilizados para determinar el grado de especificidad que poseían, y ver si existía reacción cruzada entre ambos.

Como se observa en la figura 4.20 los anticuerpos obtenidos son específicos para las proteínas puras, y no se observa reacción cruzada en las inmunodetecciones realizadas para las dos isoformas purificadas frente a los respectivos anticuerpos.



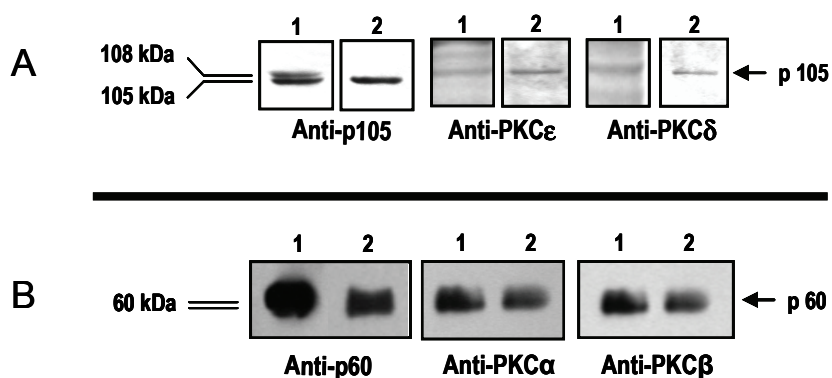
**Figura 4.20.** Inmunodetección de las enzimas **p60** y **p105** puras con los anticuerpos específicos anti p60 y anti p105. **A.** Anticuerpos específicos: 1º) Anti p60 (1:10.000) 2º) Anti IgG conejo (1:10.000). **B.** 1º) Anti p105 (1:1.000) 2º) Anti IgG-ratón (1:1.000). Se cargaron 15 µg de proteína pura en cada calle.

También se estudió la capacidad de reconocimiento de p105 y p60 por anticuerpos contra isoformas de cPKC ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y nPKC ( $\epsilon$  y  $\delta$ ) de mamíferos (figura 4.21).

**p105** fue reconocida por su anticuerpo como una doble banda, mientras que en el eluido de HTP aparece como una única banda. La especificidad del anticuerpo en comparación a los desarrollados contra isoformas de mamíferos, es mucho mayor, las bandas se distinguen nítidas. La proteína **p105** es reconocida por anti PKC  $\epsilon$  y anti PKC  $\delta$  de mamíferos, tanto en el EC como en el eluido de HTP. La banda, en ambos casos, es fácilmente identificable en HTP y menos aparente en EC, además anti PKC  $\epsilon$  reconoce con mayor intensidad la banda que anti PKC  $\delta$  (figura 4.21.A).



Por otro lado **p60** fue reconocida por su anticuerpo como una única banda en todas las condiciones ensayadas (figura 4.21.B). La especificidad del anticuerpo en comparación a los desarrollados contra isoformas de mamíferos también fue mayor. La proteína **p60** fue reconocida por anti PKC  $\alpha$  y anti PKC  $\beta$  tanto en el concentrado del DEAE como en el eluido de la cromatografía de exclusión molecular con la Superdex 200.



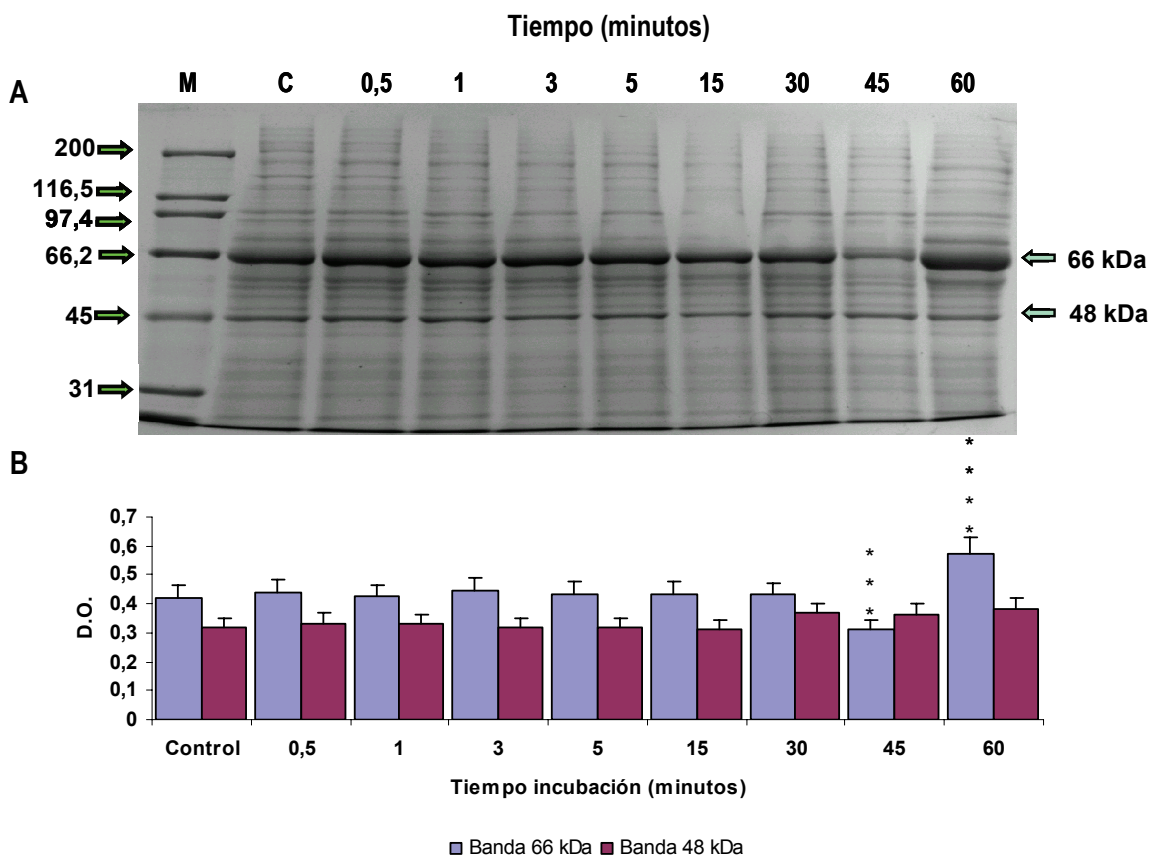
**Figura 4.21. A.** Imagen tomada de Mercado, 2001. Inmunocaracterización de **p105**. 1: EC, 20  $\mu$ g / Ensayo, 2: HTP, 20  $\mu$ g / Ensayo. Reacción cruzada de anticuerpos contra isoformas de mamíferos.  
**B.** Inmunocaracterización de **p60**. 1: DEAE, 15  $\mu$ g / Ensayo, 2: Superdex 200, 15  $\mu$ g / Ensayo. Reacción cruzada de anticuerpos contra isoformas de mamíferos.

## Resultados

### 4.7. Estudio del efecto de diversos inductores en hemocitos de *M. galloprovincialis*

Se estudió el patrón electroforético en citosol y membrana en hemocitos incubados con distintos inductores, (el LPS, lipopolisacárido asociado a la membrana de bacterias Gram-negativas) y dos citoquinas (IL-2 y PDGF).

A continuación se muestra la imagen de la electroforesis para la fracción citosólica en hemocitos cultivados e incubados con IL-2 (0,01 µg/ml) para distintos tiempos (Figura 4.22). Se observa la expresión de múltiples bandas de proteínas, de las cuales podemos destacar las dos bandas más intensas cuyos pesos moleculares se representan a la derecha de la figura. Tras 45' de estimulación con IL-2 la banda de 66 kDa presenta una intensidad menor que en el resto de tiempos ensayados. A los 60' de incubación ocurre lo contrario, ya que la banda de 66 kDa detectada presenta la intensidad más alta.

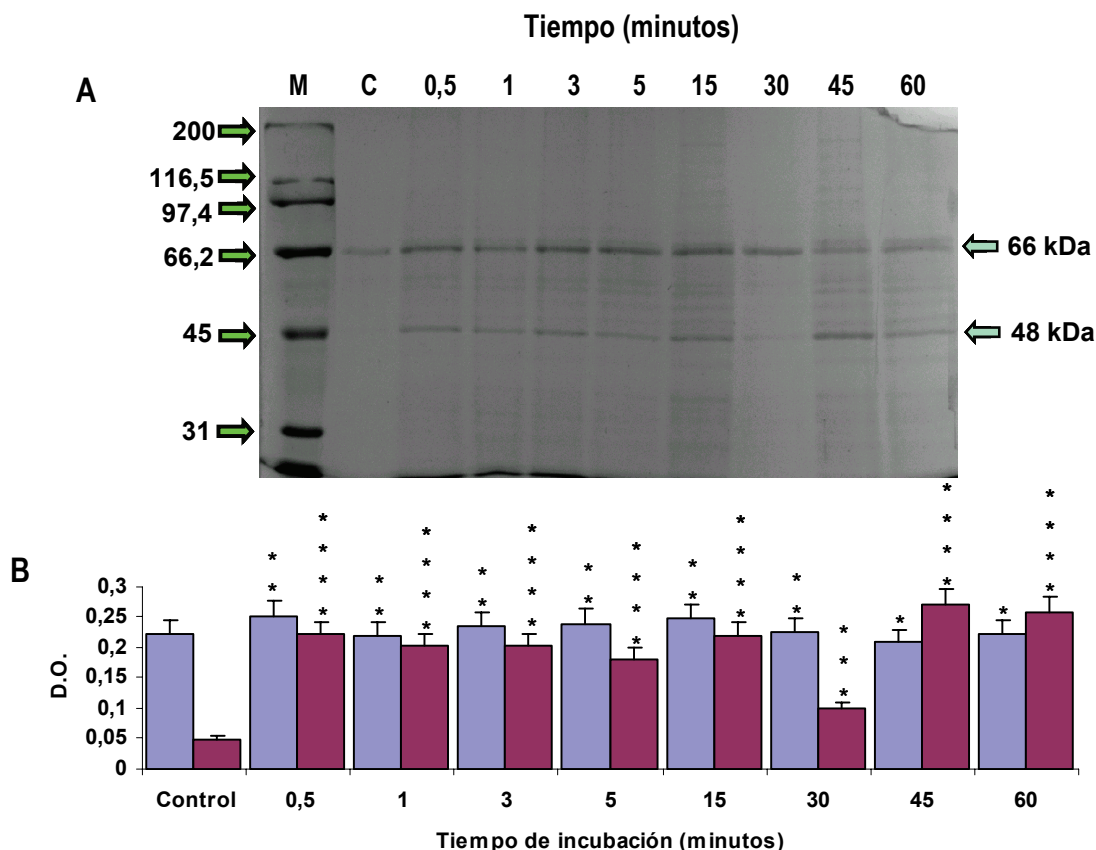


**Figura 4.22. A.** SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie de los extractos citosólicos obtenidos a partir de células activadas con IL-2 (0,01 µg/ml). **M.** Marcadores de peso molecular. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de las bandas de proteínas de 66 y 48 kDa.

**N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control.**

En el patrón electroforético obtenido en la fracción de membrana (Figura 4.23) se observa un menor número de bandas detectadas que en el caso del citosol, aunque al igual que en el citosol se observan nítidamente dos bandas de 66 y 48 kDa. Tanto en el control como a los 30' de incubación con IL-2 se observa que la banda de 48 kDa es menos intensa que en las otras calles.



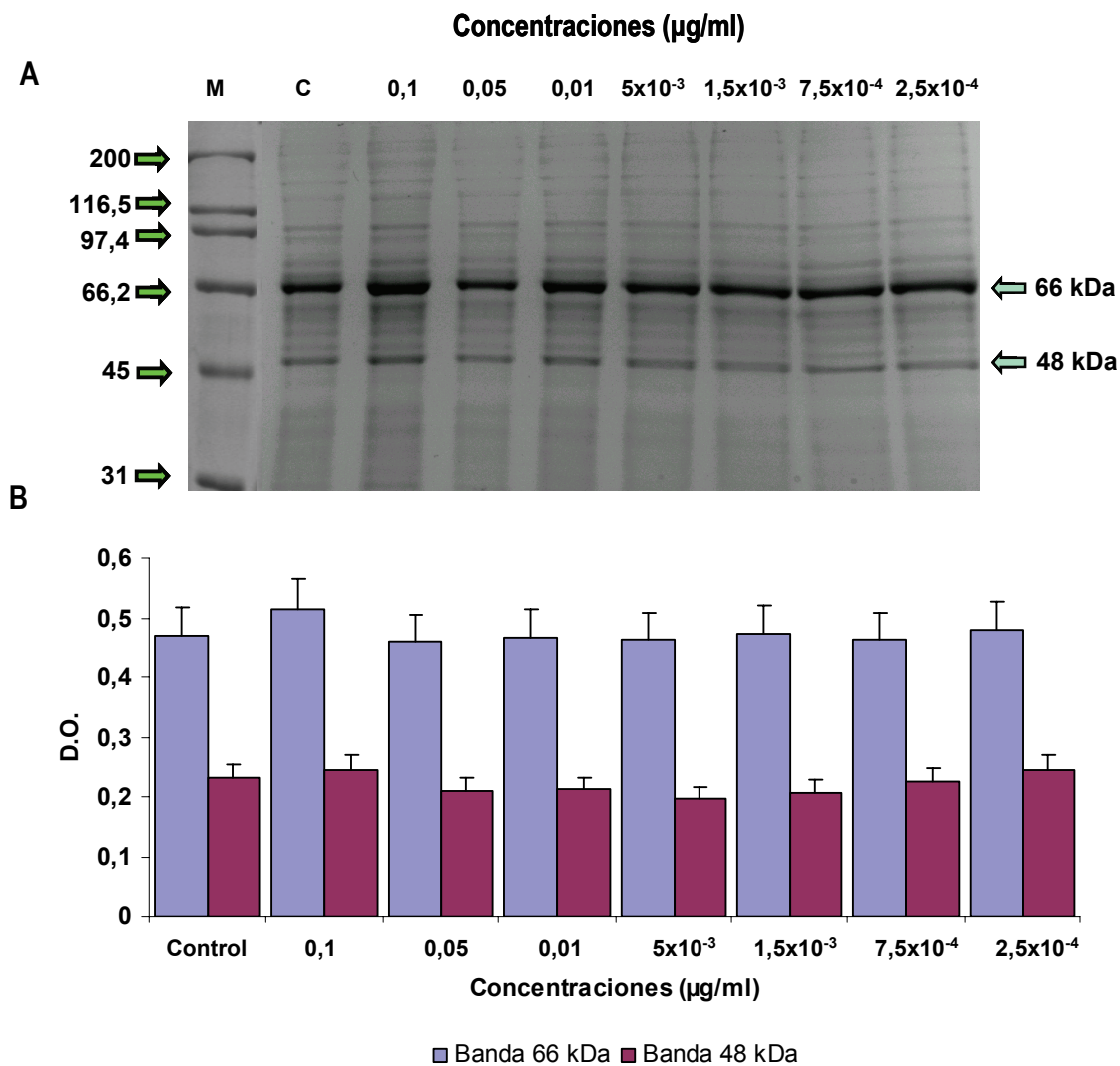
**Figura 4.23. A.** SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie de los extractos de membrana obtenidos a partir de células activadas con IL-2 (0,01 µg/ml). **M.** Marcadores de peso molecular. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de las bandas de proteínas de 66 y 48 kDa.

N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control; \*\* P < 0,01 valor significativo vs células control; \* P > 0,01 valor no muy significativo vs células control.

En la siguiente figura (4.24) se muestra la imagen del patrón electroforético obtenido para la electroforesis (10% de acrilamida) en la fracción citosólica de hemocitos cultivados e incubados combinando distintas concentraciones de IL-2 y manteniendo el tiempo de incubación constante (24 horas). Al igual que en el caso anterior se observa la expresión de múltiples bandas siendo las más intensas las de 66 y 48 kDa. No se observan diferencias significativas al comparar las bandas detectadas para diferentes concentraciones de IL-2 con el control.

## Resultados

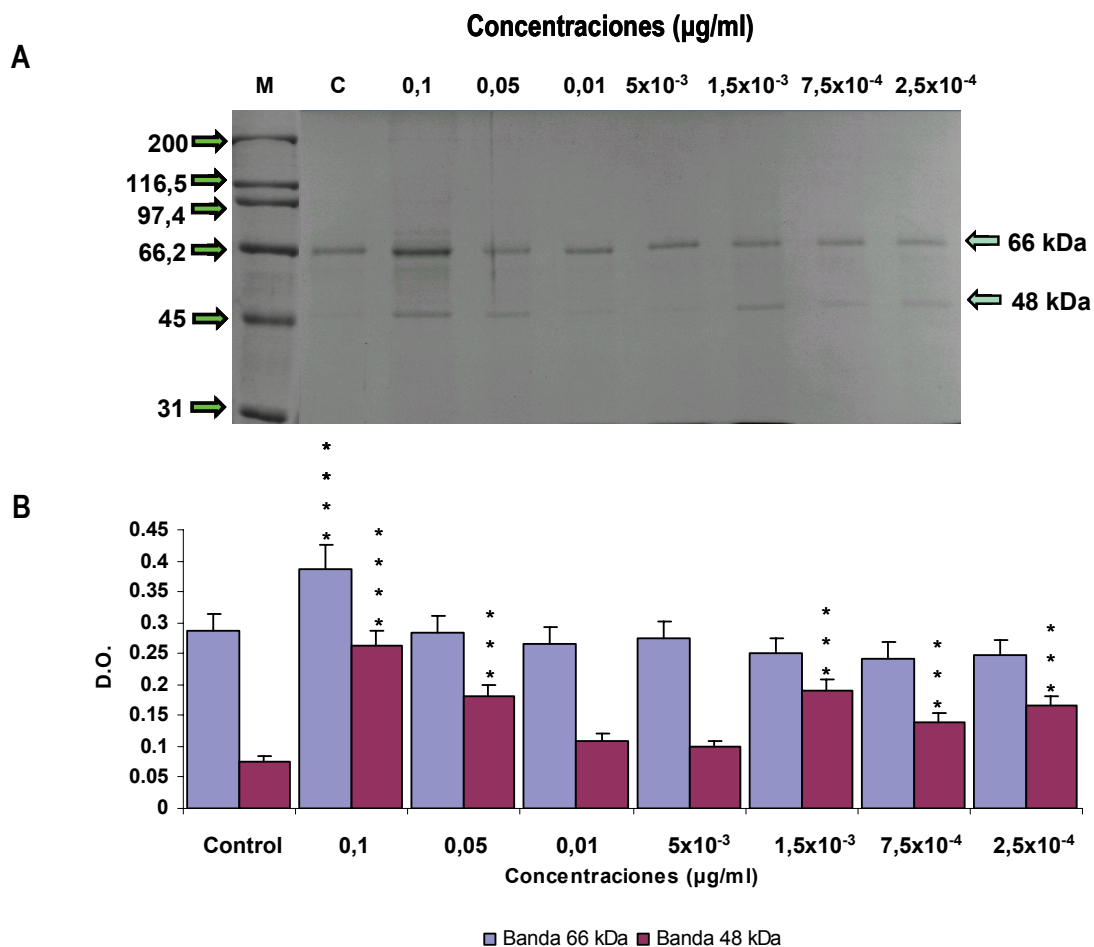


**Figura 4.24. A.** SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie de los extractos citosólicos obtenidos a partir de células activadas durante 24 horas a diferentes concentraciones de IL-2. **M.** Marcadores de peso molecular. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15  $\mu\text{g}$  de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de las bandas de 66 y 48 kDa.

**N=3,  $p < 0,1$ ; Valores no significativos vs células control.**

Por otro lado, en la figura 4.25 se muestra la imagen del gel obtenido para la electroforesis (10% de acrilamida) en la fracción de membrana de hemocitos cultivados e incubados combinando distintas concentraciones de IL-2 y manteniendo el tiempo de incubación constante (24 horas) para las diversas concentraciones. Al igual que ocurría en el citosol las dos bandas más intensas de todas las que fueron expresadas son las que presentan un peso molecular de 66 y 48 kDa. La banda de 66 kDa es más intensa para una concentración de IL-2 de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . La banda de 48 kDa es poco intensa tanto en el control como en algunas de las concentraciones de IL-2 ensayadas.



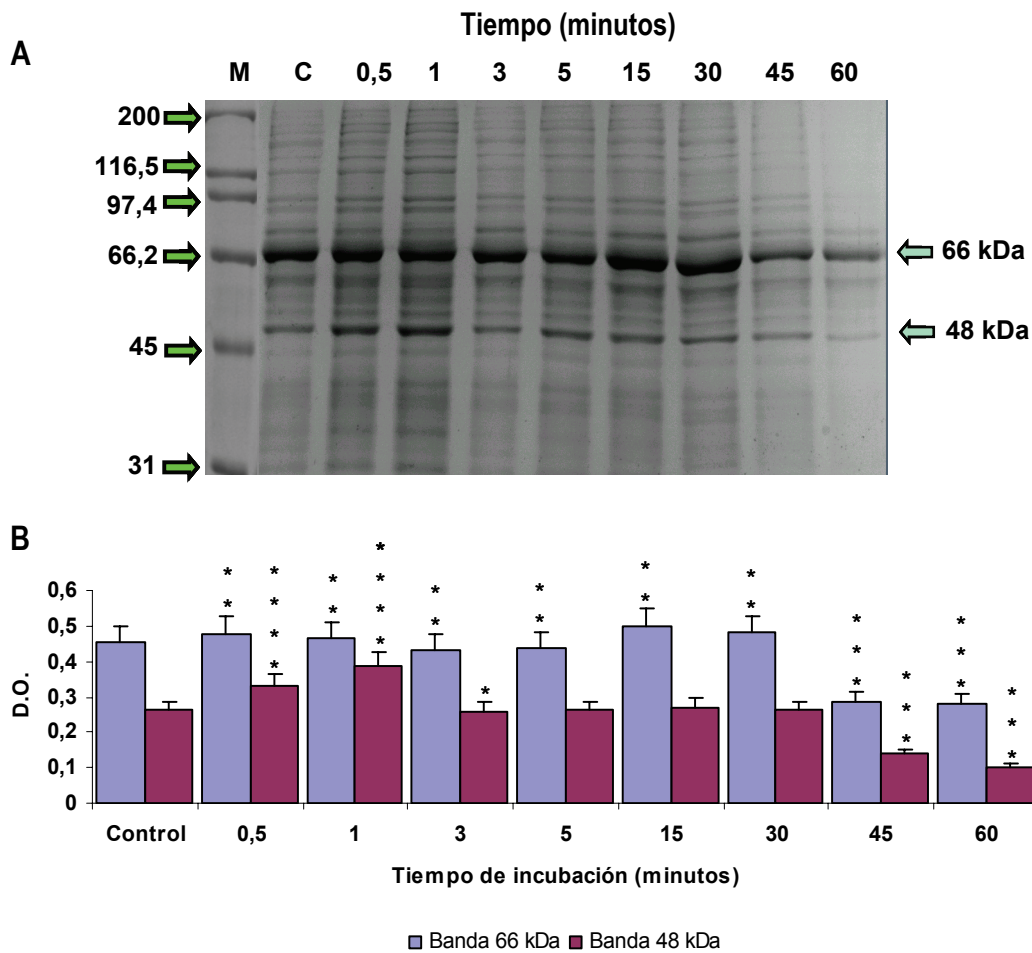
**Figura 4.25. A.** SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie de los extractos de membrana obtenidos a partir de células activadas durante 24 horas a diferentes concentraciones de IL-2. **M.** Marcadores de peso molecular. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15  $\mu\text{g}$  de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de las bandas de 66 y 48 kDa.

**N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control.**

En la figura 4.26 se muestra el patrón electroforético de los extractos de proteínas citosólicas en hemocitos incubados con LPS (5  $\mu\text{g/ml}$ ) para los diferentes tiempos de incubación ensayados. La electroforesis muestra la expresión de múltiples bandas de proteínas, siendo dos bandas de 66 y 48 kDa las más intensas. Las bandas de 66 y 48 kDa presentan una intensidad menor para tiempos de estimulación con LPS elevados (45' y 60'). Por otro lado la banda de 48 kDa es más intensa para tiempos de estimulación cortos (30'' y 1').

## Resultados

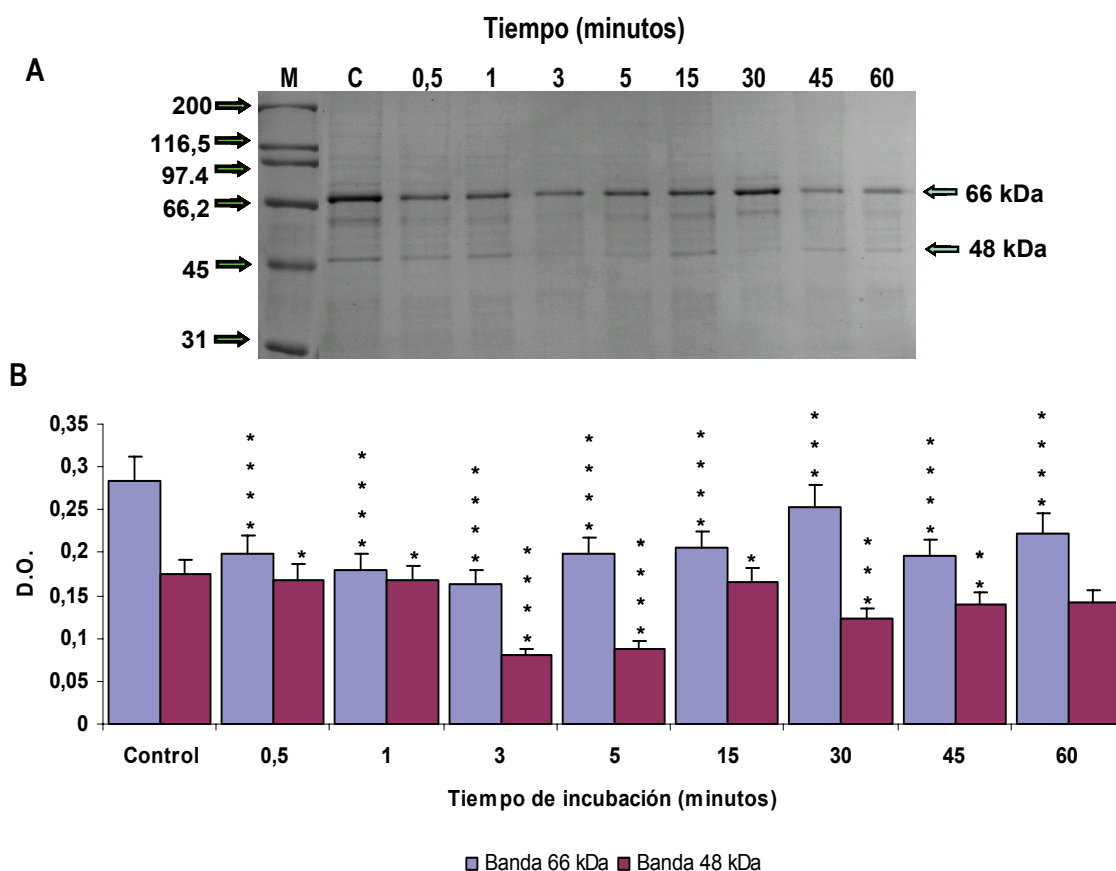


**Figura 4.26. A.** SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie de los extractos citosólicos obtenidos a partir de células activadas con LPS (5 µg/ml). **M.** Marcadores de peso molecular. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de las bandas de proteínas de 66 y 48 kDa.

**N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control; \*\* P < 0,01 valor significativo vs células control; \* P > 0,01 valor no muy significativo vs células control.**

Sin embargo, tal y como se observa en la figura 4.27 el número de bandas expresadas en las electroforesis de los extractos de membrana obtenidos a partir de hemocitos incubados con LPS (5 µg/ml) para los diversos tiempos ensayados fue mucho menor que en el caso del citosol; aunque al igual que ocurría en el citosol las bandas de 66 y 48 kDa se expresaron con mayor intensidad que el resto de bandas detectadas. Se observan fluctuaciones en la intensidad de las bandas para los distintos tiempos de incubación.



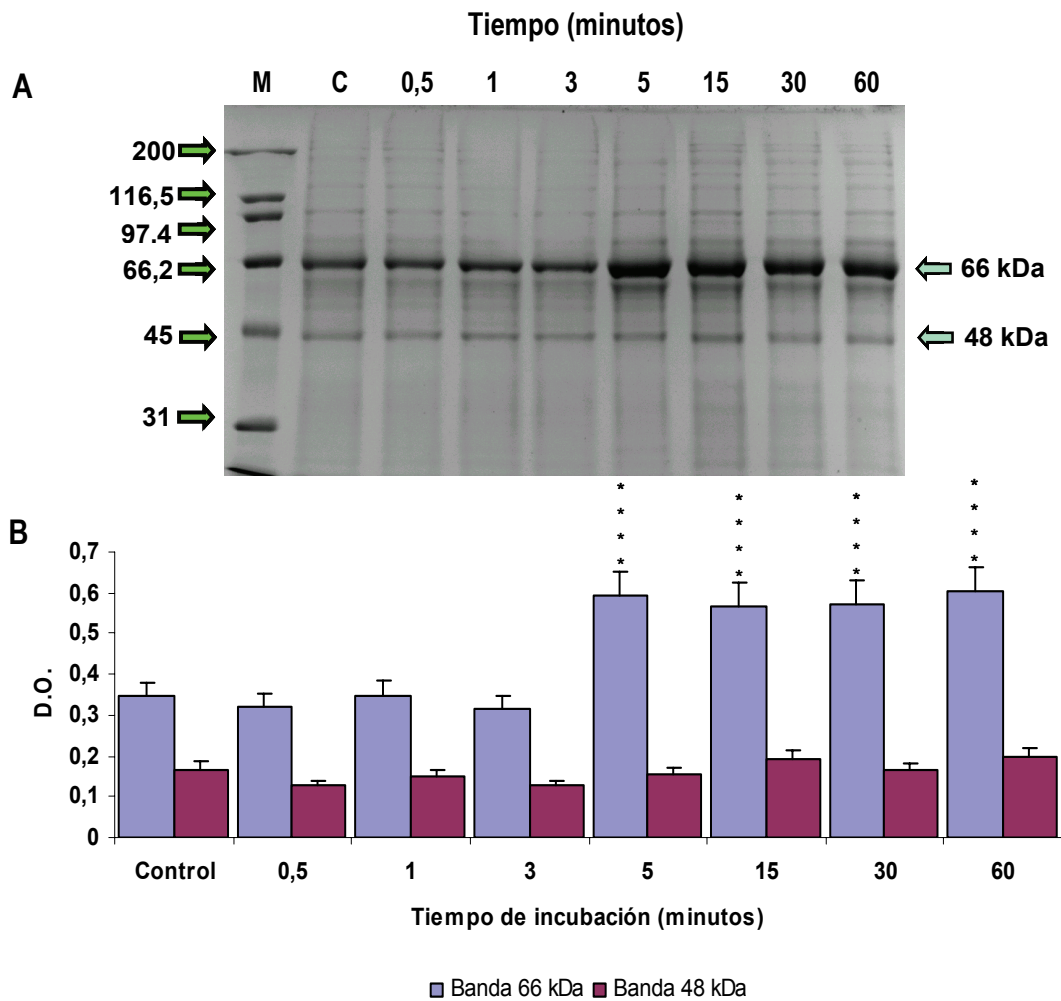
**Figura 4.27. A.** SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie de los extractos de membrana obtenidos a partir de células activadas con LPS (5 µg/ml). **M.** Marcadores de peso molecular. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de las bandas de 66 y 48 kDa.

**N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control; \*\* P < 0,01 valor significativo vs células control; \* P > 0,01 valor no muy significativo vs células control.**

A continuación se muestra la imagen de los geles (10% de acrilamida) obtenidos a partir de las fracciones citosólica (Figura 4.28) y de membrana (Figura 4.29) para hemocitos cultivados e incubados con PDGF (5 ng/ml) durante diferentes tiempos. En la fracción citosólica se detectaron múltiples bandas, y al igual que en los casos anteriores las bandas con un peso de 66 y 48 kDa fueron las que mostraron una intensidad mayor. Se puede observar que para estimulaciones con PDGF superiores a 5' la banda de 66 kDa es más intensa que en periodos de incubación más cortos. Para la banda de 48 kDa no se aprecian cambios significativos.

## Resultados



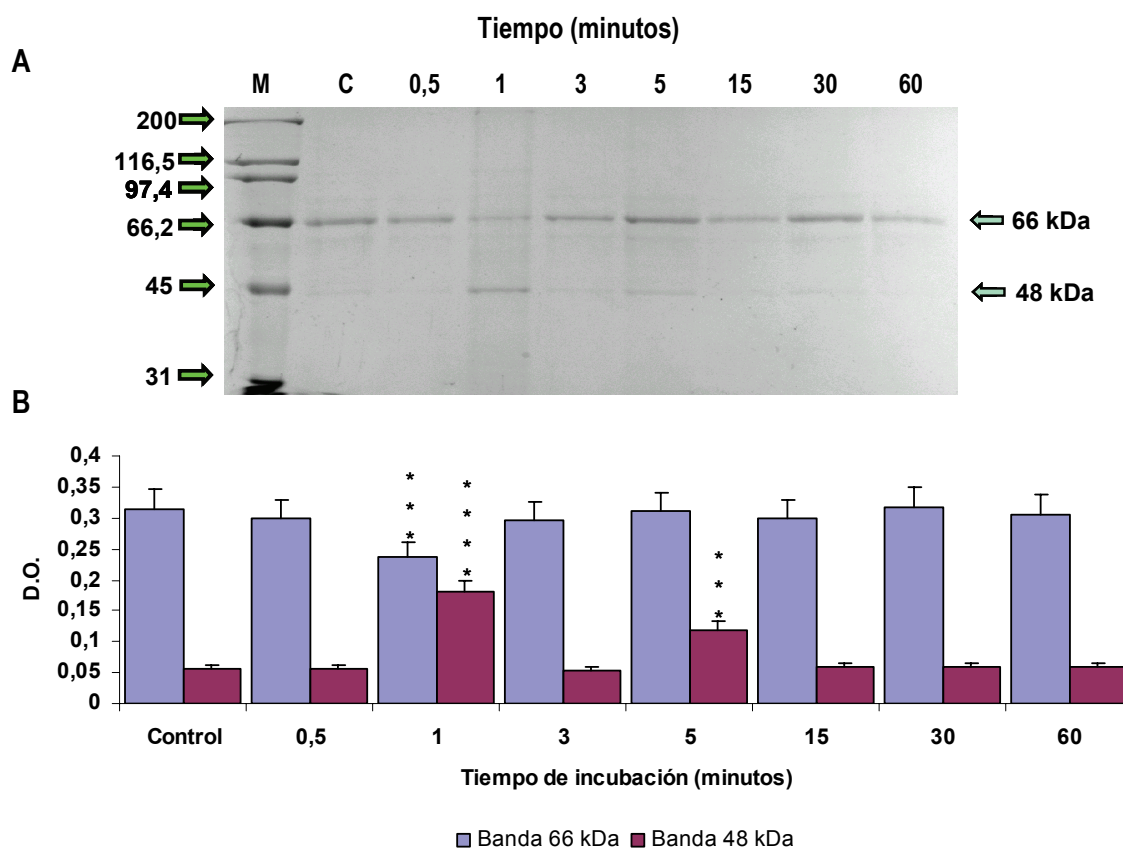
**Figura 4.28. A.** SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie de los extractos citosólicos obtenidos a partir de células activadas con PDGF (5 ng/ml). **M.** Marcadores de peso molecular. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de las bandas de 66 y 48 kDa.

**N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control.**

En la siguiente figura (4.29) podemos apreciar como en la fracción de membrana, las electroforesis realizadas para hemocitos cultivados e incubados con PDGF (5 ng/ml) expuestos a diversos tiempos de incubación, al igual que en los ensayos realizados para otros inductores se detecta la expresión de dos bandas de proteínas mayoritarias con pesos moleculares de 66 y 48 kDa respectivamente. No se observan cambios significativos en la banda de 66 kDa, excepto para un 1' de incubación con PDGF donde se aprecia una disminución en la intensidad de la banda. Por otro lado, la banda de 48 kDa se detecta principalmente en las incubaciones de 1' y 5'.





**Figura 4.29. A.** SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie de los extractos de membrana obtenidos a partir de células activadas con PDGF (5 ng/ml). **M.** Marcadores de peso molecular. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

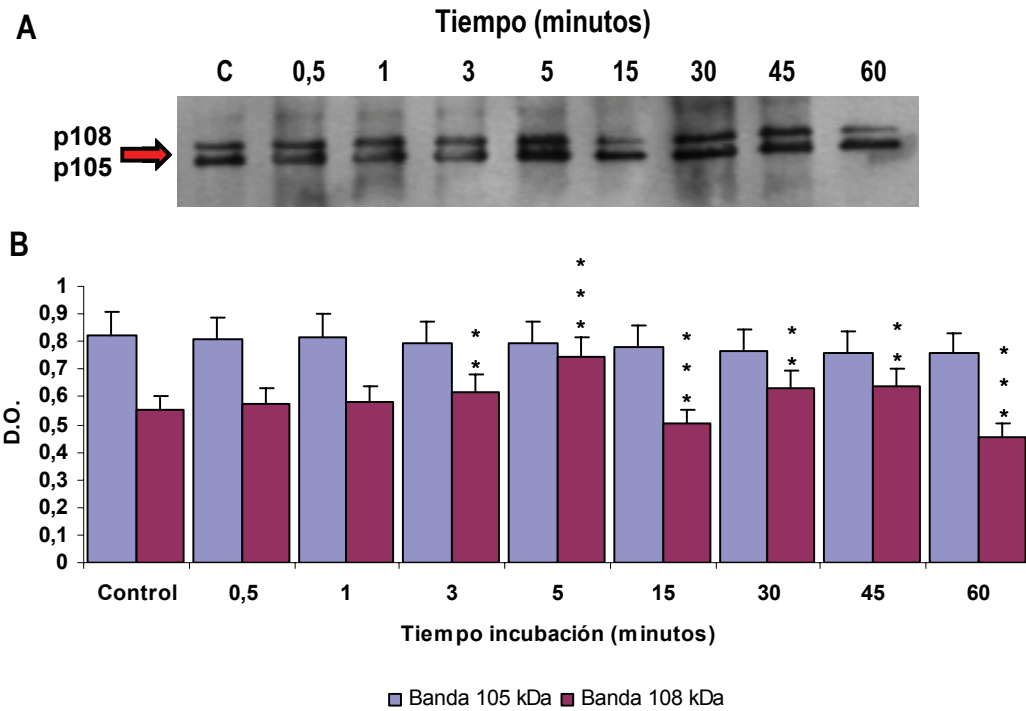
**B.** Análisis densitométrico de las bandas de 66 y 48 kDa.

**N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control.**

#### 4.8. Inmunodetecciones frente a anti p105 de células incubadas con IL-2, LPS y PDGF.

Al exponer las células a una concentración de IL-2 (0,01 µg/ml) durante distintos tiempos la inmunodetección realizada con el anticuerpo anti p105 reveló la presencia de dos bandas de 105 y 108 kDa. Como puede apreciarse, en el citosol la banda de 105 kDa aparece con la misma intensidad en todos los casos estudiados (figura 4.30). Para la banda de 108 kDa se observan cambios en la expresión a medida que se incrementa el tiempo de incubación. En el caso de la membrana (figura 4.31) se observan variaciones en cuanto al grado de fosforilación de la enzima y también se observa como las bandas de 105 y 108 kDa desaparecen al incubar las células con IL-2 (0,01 µg/ml) durante 1 hora.

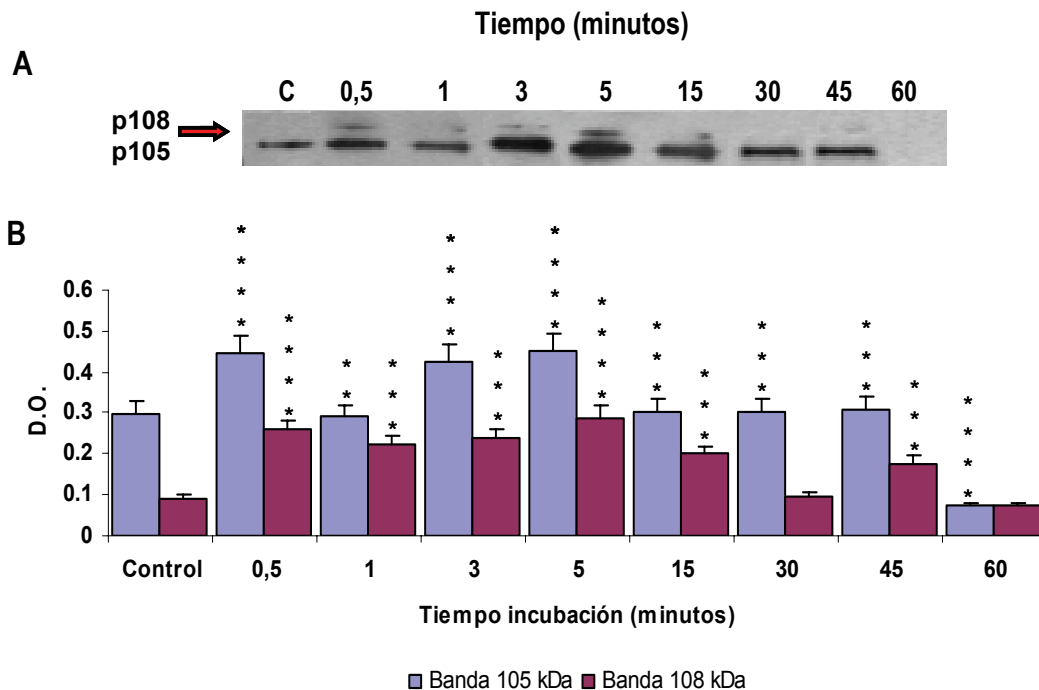
## Resultados



**Figura 4.30. A.** Inmunodetección de p105 en la fracción citosólica de hemocitos activados con IL-2 (0,01 µg/ml) a diferentes tiempos e incubados con anti p105. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de las bandas de 105 y 108 kDa.

N=3, \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control; \*\* P < 0,01 valor significativo vs células control.

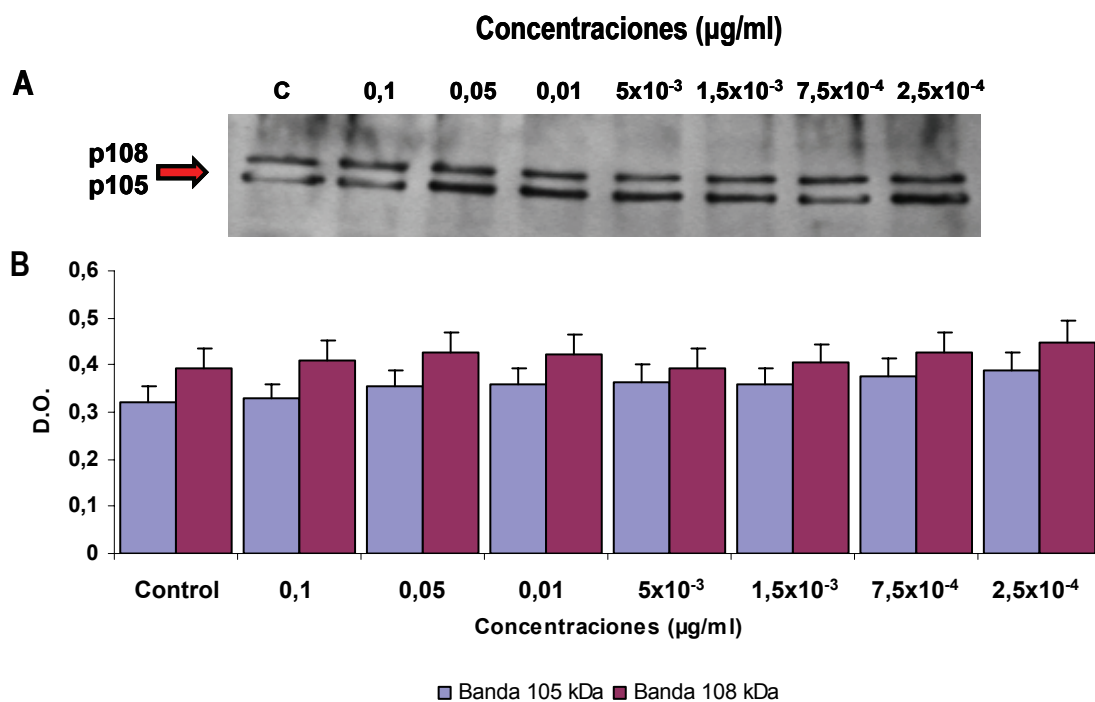


**Figura 4.31. A.** Inmunodetección de p105 en la fracción de membrana de hemocitos activados con IL-2 (0,01 µg/ml) a diferentes tiempos e incubados con anti p105. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de las bandas de 105 y 108 kDa.

N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control; \*\* P < 0,01 valor significativo vs células control.

Posteriormente, se realizaron ensayos manteniendo constante el tiempo de incubación (24 horas) y empleando distintas concentraciones de IL-2. Al igual que en el caso anterior en las inmunodetecciones realizadas se detectó la presencia de dos bandas de 105 y 108 kDa. En el citosol (figura 4.32) no se observan diferencias significativas para las distintas concentraciones ensayadas, mientras que en la membrana (figura 4.33) se observaron diferencias en el estado de fosforilación de p105. Además se observa que en el citosol p105 presenta una doble banda (de 105 y 108 kDa) muy notoria, mientras que en la membrana, estas bandas tan solo se detectan de forma nítida para una concentración de IL-2 de 0,1 µg/ml. Después la intensidad de las bandas comienza a descender según lo hace la concentración y tras alcanzar el mínimo de intensidad para una concentración de IL-2 =  $1,5 \times 10^{-4}$  µg/ml, ambas bandas comienzan a recuperar la intensidad que tenían en las calles con una concentración de IL-2 más elevada.

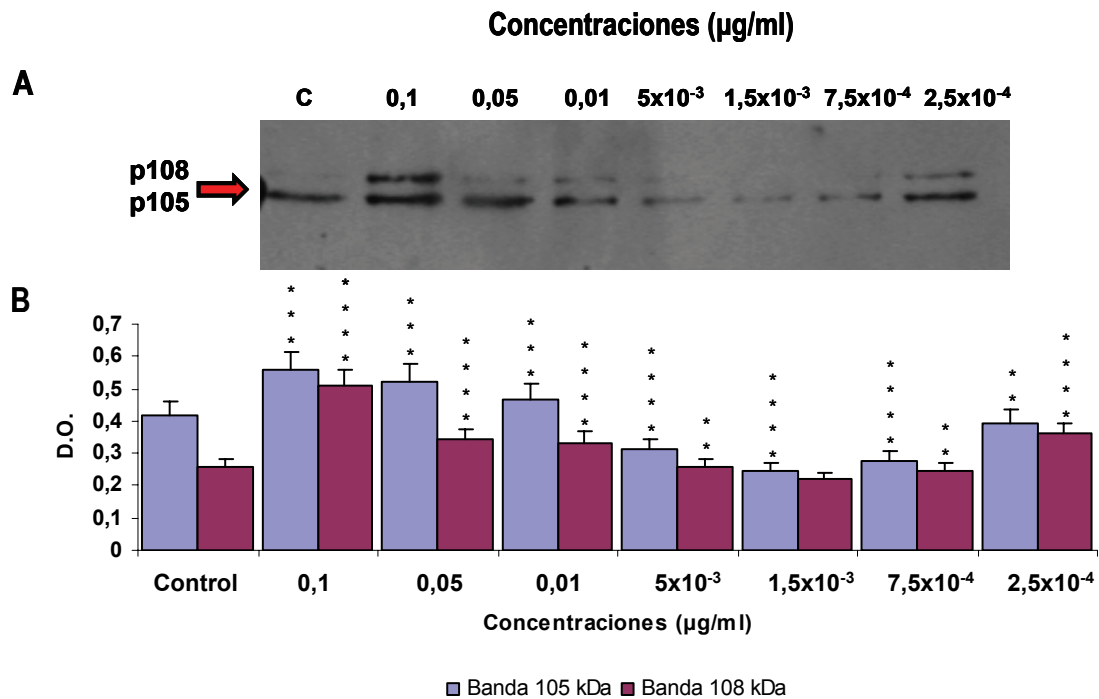


**Figura 4.32. A.** Inmunodetección de p105 en la fracción citosólica de hemocitos activados durante 24 horas a diferentes concentraciones de IL-2 e incubados con anti p105. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de las bandas de 105 y 108 kDa.

**N=3, p<0,1; Valores no significativos vs células control.**

## Resultados

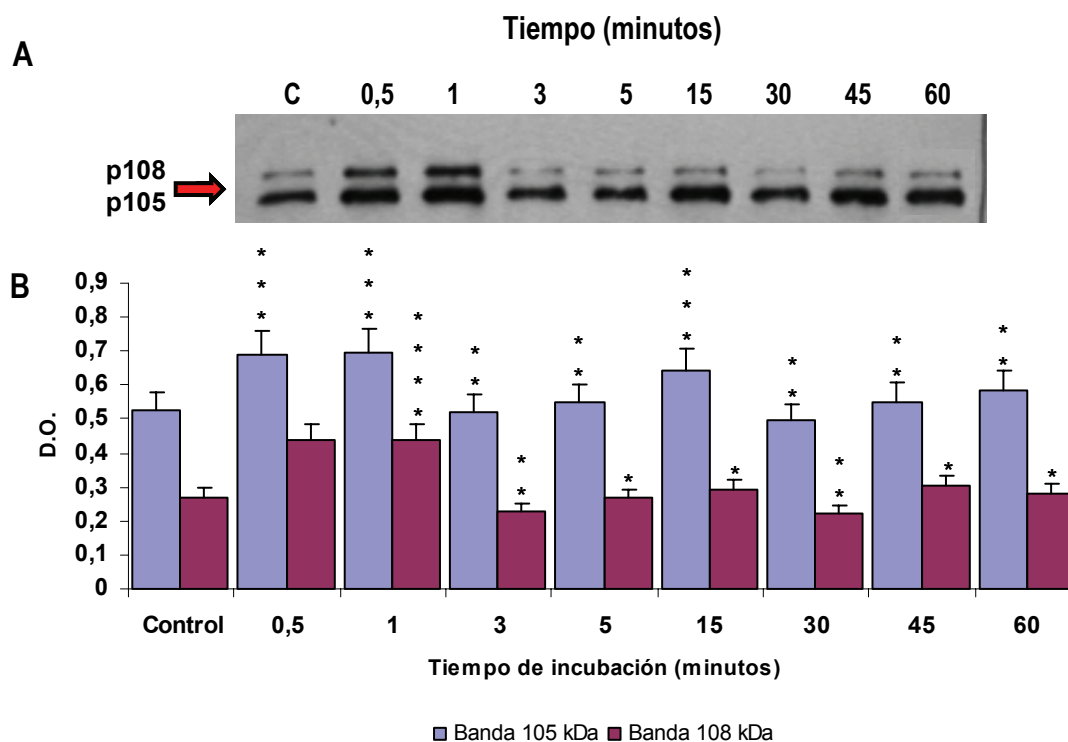


**Figura 4.33. A.** Inmunodetección de p105 en la fracción de membrana de hemocitos activados durante 24 horas a diferentes concentraciones de IL-2 e incubados con anti p105. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15  $\mu\text{g}$  de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de las bandas de 105 y 108 kDa.

N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control; \*\* P < 0,01 valor significativo vs células control.

Al igual que en los casos anteriores tras incubación de los hemocitos mantenidos en cultivo con LPS (5  $\mu\text{g/ml}$ ) se detectaron dos bandas de 105 y 108 kDa. En el citosol (figura 4.34) aparecen las dos bandas para todas las condiciones ensayadas, la banda de 108 kDa es más intensa cuando la incubación de los hemocitos con el LPS se realiza durante periodos de tiempo muy cortos (30' y 1').



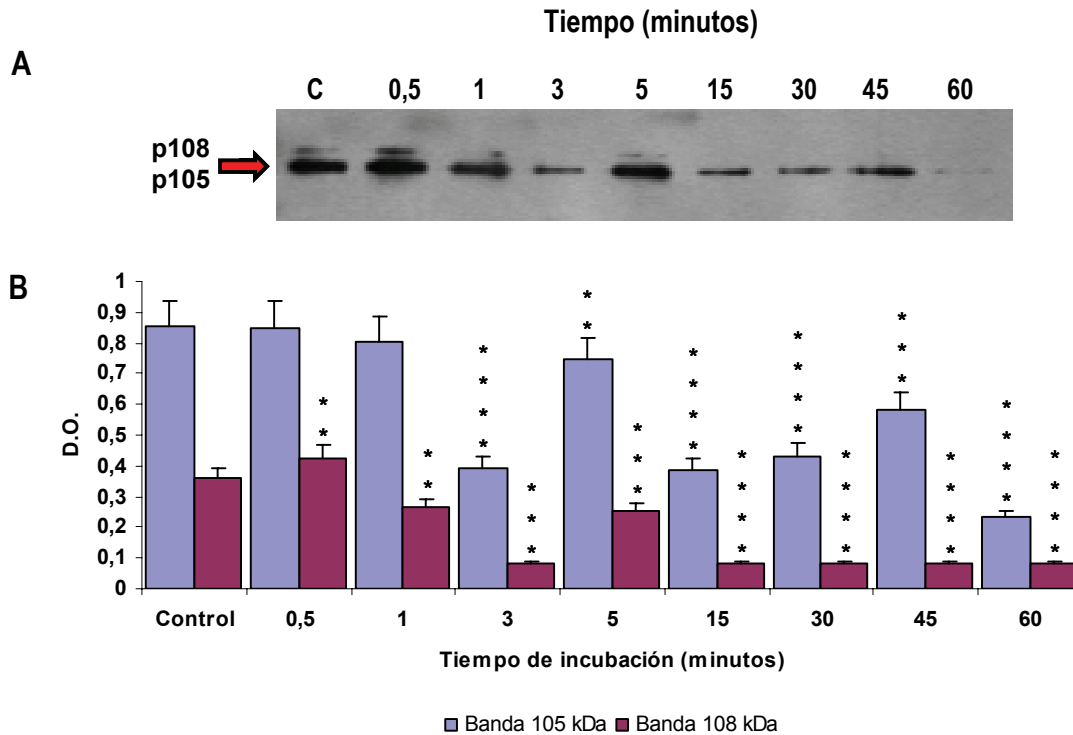
**Figura 4.34. A.** Inmunodetección de p105 en la fracción citosólica de hemocitos activados con LPS (5 µg/ml) a diferentes tiempos e incubados con anti p105. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de las bandas de 105 y 108 kDa.

N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control; \*\* P < 0,01 valor significativo vs células control; \* P > 0,01 valor no muy significativo vs células control.

En la membrana (figura 4.35) se observan distintos niveles de fosforilación para p105, siendo muy notorio que para 60 minutos de incubación la intensidad de la banda de 105 kDa es mucho menor que en el resto de condiciones ensayadas. La banda de 108 kDa es menos intensa que la banda de 105 kDa para las diferentes condiciones ensayadas y a partir de los 15' de incubación no se detecta.

## Resultados

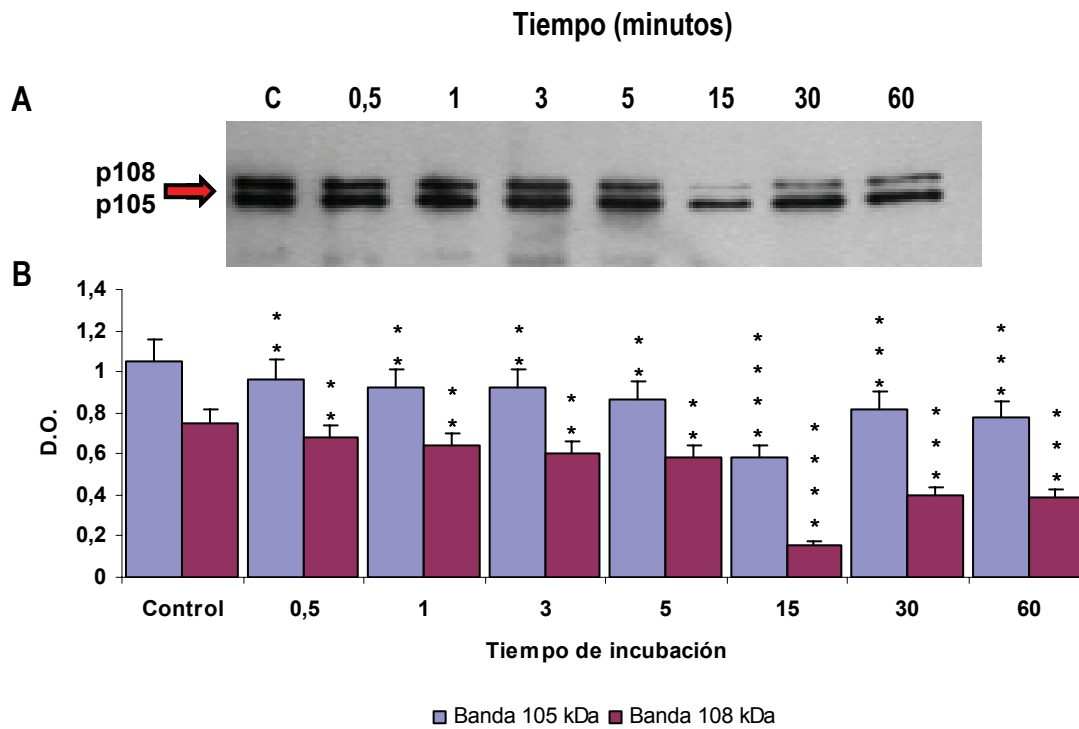


**Figura 4.35. A.** Inmunodetección de p105 en la fracción de membrana de hemocitos activados con LPS (5 µg/ml) a diferentes tiempos e incubados con anti p105. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

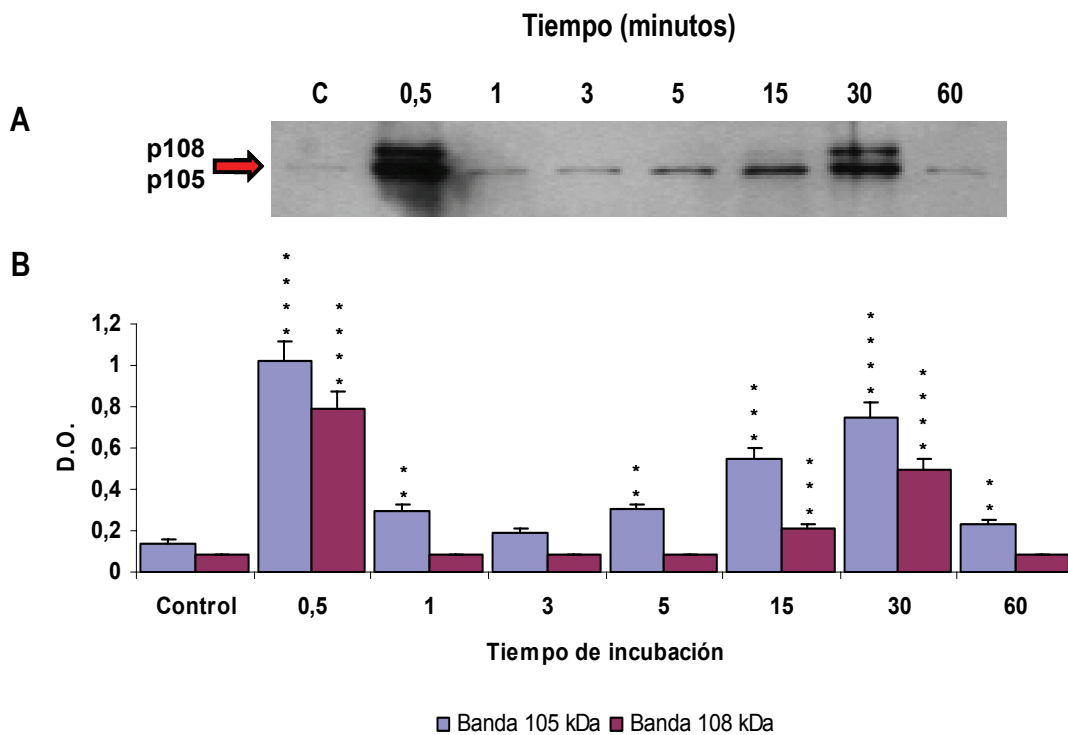
**B.** Análisis densitométrico de las bandas de 105 y 108 kDa.

**N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control; \*\* P < 0,01 valor significativo vs células control.**

Por otro lado, para hemocitos incubados con PDGF (5 ng/ml), en el citosol (figura 4.36) se detectaron dos bandas de 105 y 108 kDa para todas las condiciones ensayadas. Lo más destacable es que en la fracción de membrana (figura 4.37) se detectó una única banda de 105 kDa salvo para los tiempos de incubación de 30'' y 30' en las que se detectaron claramente las dos bandas.



**Figura 4.36. A.** Inmunodetección de p105 en la fracción citosólica de hemocitos activados con PDGF (5 ng/ml) a diferentes tiempos e incubados con anti p105. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos. **B.** Análisis densitométrico de las bandas de 105 y 108 kDa. N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control; \*\* P < 0,01 valor significativo vs células control.

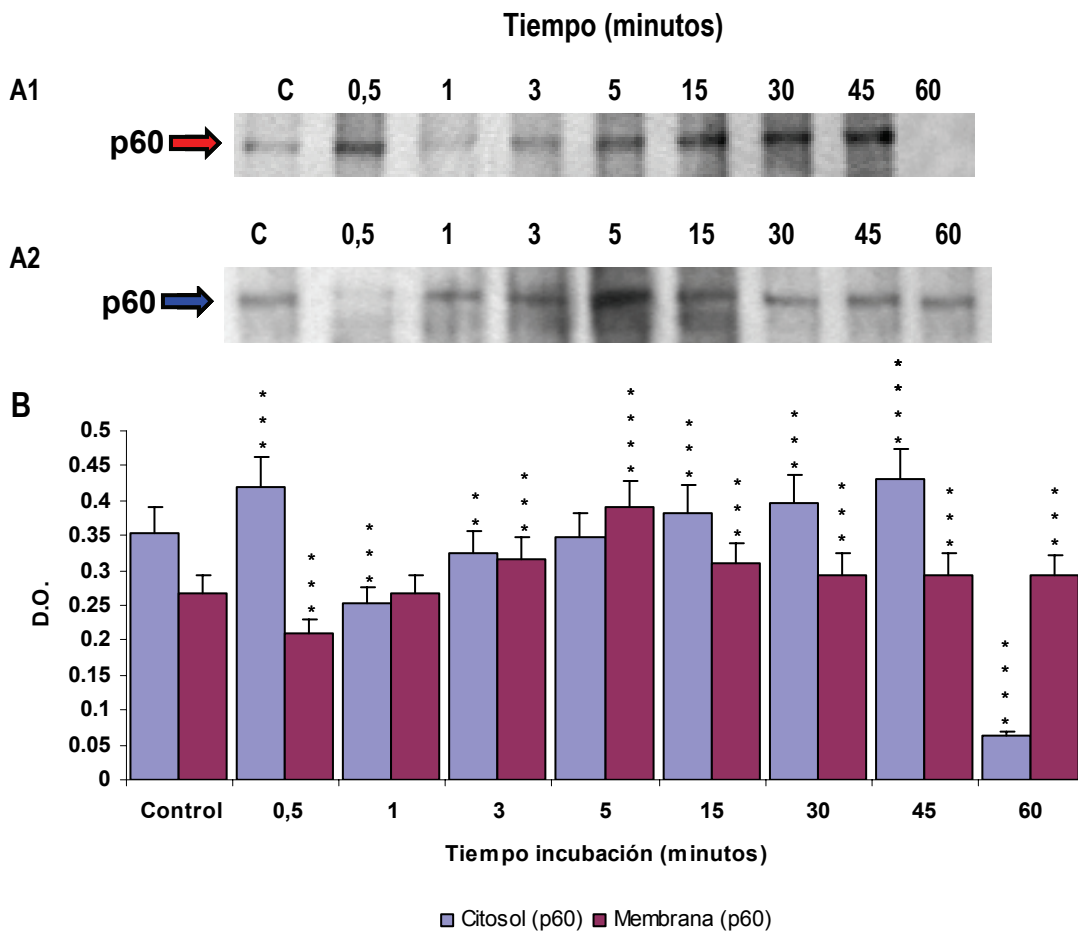


**Figura 4.37. A.** Inmunodetección de p105 en la fracción de membrana de hemocitos activados con PDGF (5 ng/ml) a diferentes tiempos e incubados con anti p105. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos. **B.** Análisis densitométrico de las bandas de 105 y 108 kDa. N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control; \*\* P < 0,01 valor significativo vs células control.

## Resultados

### 4.9. Inmunodetecciones frente a anti p60 de células incubadas con IL-2, LPS y PDGF.

En las inmunodetecciones realizadas con anti p60 en hemocitos cultivados e incubados con una concentración fija de IL-2 (0,01  $\mu\text{g/ml}$ ) durante distintos tiempos se detectó una única banda de 60 kDa para las diferentes condiciones de ensayo. En el citosol (figura 4.38.A1) a los 30'' de incubación la banda detectada presenta una intensidad elevada. En el periodo de incubación comprendido desde 1' hasta el 45', se observa un aumento progresivo en la intensidad de la banda detectada. Finalmente a los 60' de incubación la banda detectada desaparece. En la fracción de membrana (figura 4.38.A2) podemos observar que la intensidad de la banda se incrementa a partir de 1' de incubación con la IL-2 de forma gradual hasta que se alcanzan los 5' de incubación, a partir de este tiempo la banda detectada disminuye su intensidad ligeramente, manteniéndose constante para los tiempos de incubación mayores.



**Figura 4.38. A1.** Inmunodetección de **p60** en la fracción citosólica de hemocitos activados con IL-2 (0,01  $\mu\text{g/ml}$ ) a diferentes tiempos e incubados con anti p60. **A2.** Inmunodetección de **p60** en la fracción de membrana de hemocitos activados con IL-2 (0,01  $\mu\text{g/ml}$ ) a diferentes tiempos e incubados con anti p60. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15  $\mu\text{g}$  de extractos proteicos.

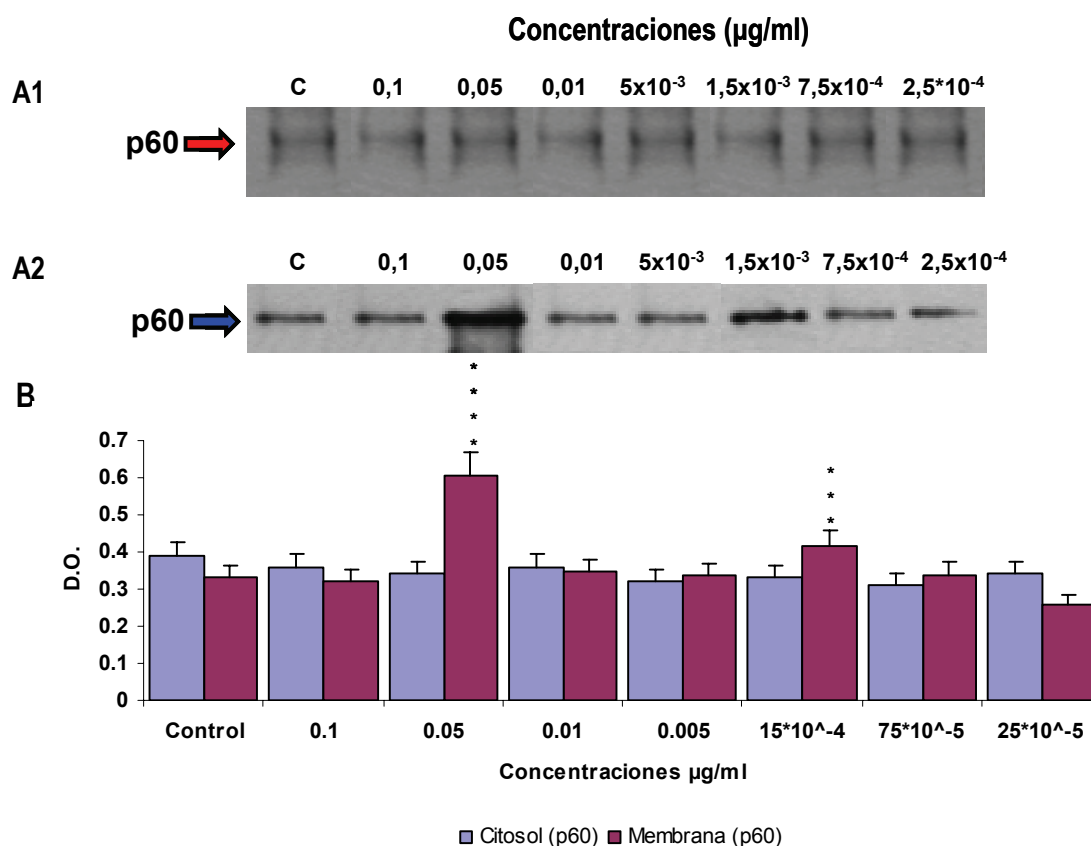
**B.** Análisis densitométrico de la banda de 60 kDa.

**N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control; \*\* P < 0,01 valor significativo vs células control.**



## Resultados

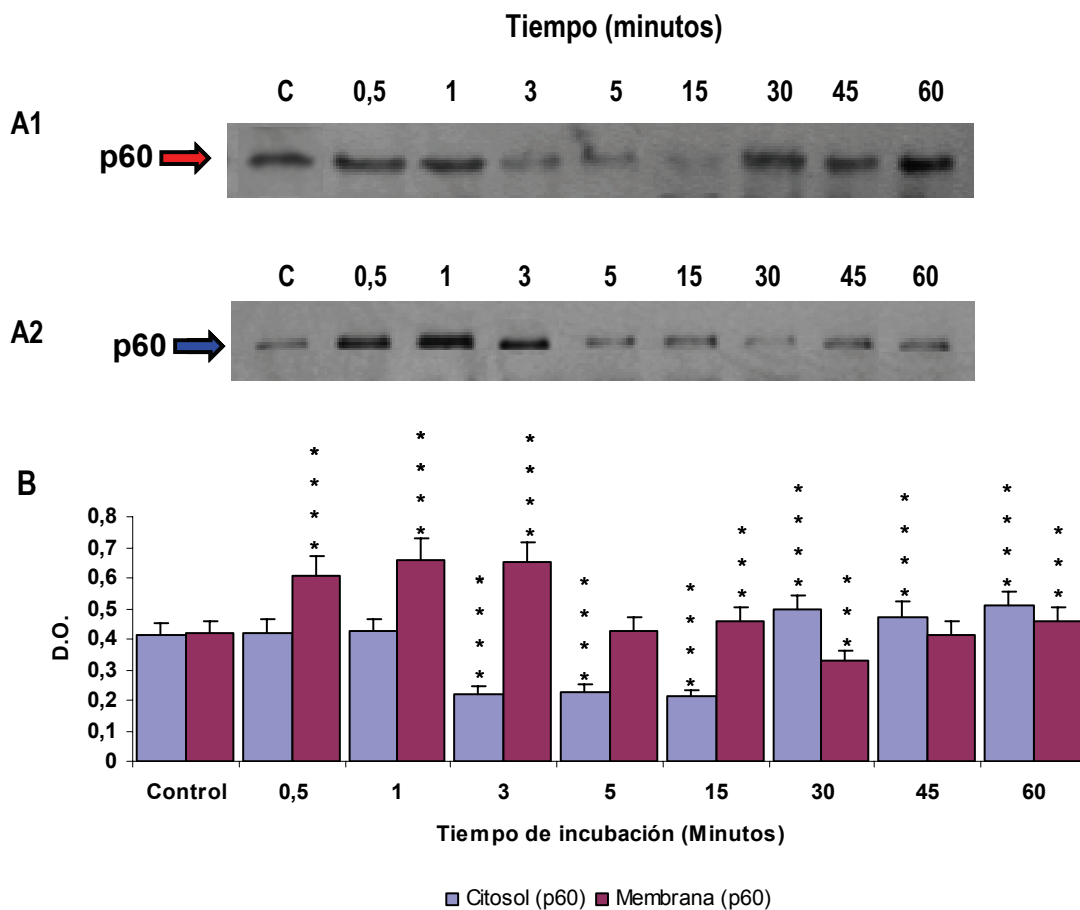
Posteriormente se realizaron ensayos combinando distintas concentraciones de IL-2 y manteniendo constante el tiempo de incubación (24 horas). Tanto en citosol (figura 4.39.A1) como en membrana (figura 4.39.A2) se detectó una banda de 60 kDa para todas las condiciones ensayadas. En el citosol no existen diferencias en la intensidad de la banda detectada, mientras que en membrana se detectó una banda mucho más intensa para una concentración de IL-2 de 0,05  $\mu\text{g/ml}$  que para el resto de concentraciones ensayadas.



**Figura 4.39. A1.** Inmunodetección de **p60** en la fracción citosólica de hemocitos activados durante 24 horas a diferentes concentraciones de IL-2 e incubados con anti p60. **A2.** Inmunodetección de **p60** en la fracción de membrana de hemocitos activados durante 24 horas a diferentes concentraciones de IL-2 e incubados con anti p60. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15  $\mu\text{g}$  de extractos proteicos. **B.** Análisis densitométrico de la banda de 60 kDa. **N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control.**

## Resultados

Por otro lado tras incubar los hemocitos cultivados con LPS (5 µg/ml) se detectó una única banda de 60 kDa en todas las condiciones ensayadas tanto en citosol (figura 4.40.A1) como en membrana (figura 4.40.A2). La respuesta en el citosol es compleja, inicialmente no existen cambios en la intensidad de la banda detectada; a partir de 1' de incubación se produce un descenso en la intensidad de la banda detectada y finalmente a los 30 minutos de incubación tiene lugar un incremento en la intensidad de la banda, que llega a superar los niveles de detección iniciales. A diferencia del citosol, en la fracción de membrana se observa una mayor intensidad de la banda detectada para periodos de incubación con el inductor cortos; a partir de 5' de incubación la banda detectada es mucho menos intensa.

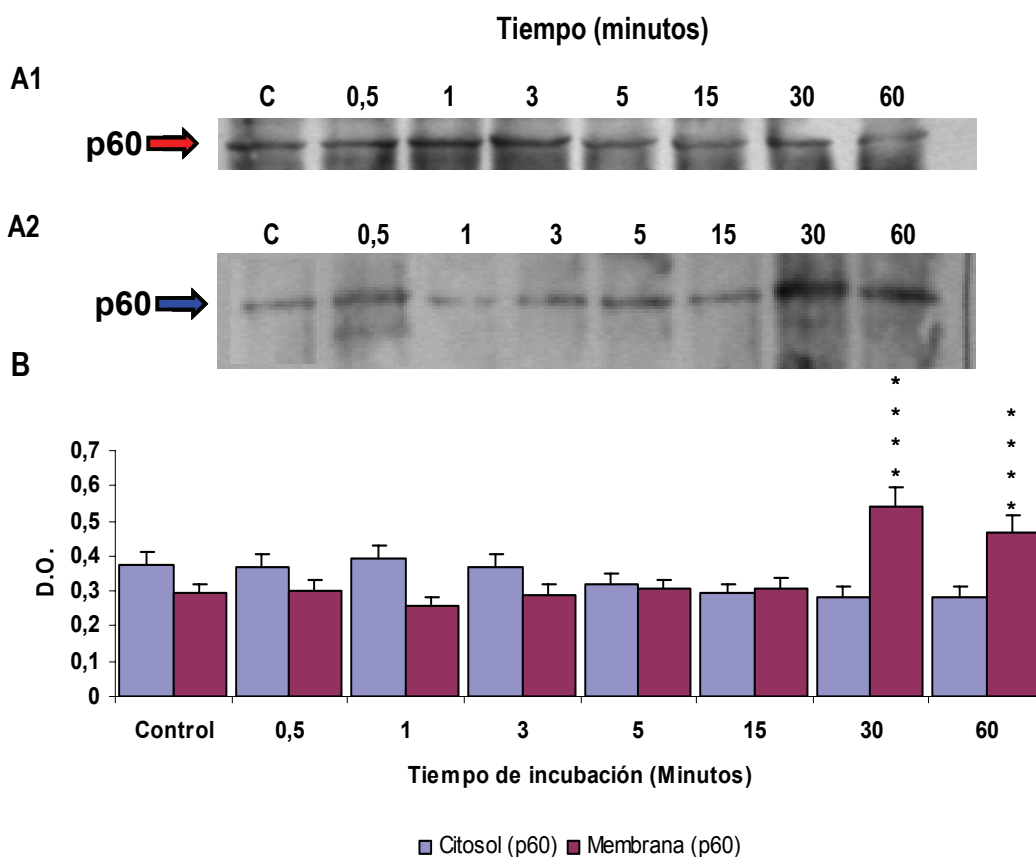


**Figura 4.40. A1.** Inmunodetección de p60 en la fracción citosólica de hemocitos activados con LPS (5 µg/ml) a diferentes tiempos e incubados con anti p60. **A2.** Inmunodetección de p60 en la fracción de membrana de hemocitos activados con LPS (5 µg/ml) a diferentes tiempos e incubados con anti p60. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos. **B.** Análisis densitométrico de la banda de 60 kDa.

N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control.

## Resultados

Por último, cuando los hemocitos cultivados se incubaron con PDGF (5 ng/ml), para las inmunodetecciones realizadas con anti p60 se obtuvo una única banda de 60 kDa tanto en el citosol como en la membrana al igual que ensayos anteriores realizados con otros inductores. En el citosol (figura 4.41.A1) no se observan diferencias para las diferentes condiciones del ensayo mientras que en membrana (figura 4.41.A2) para periodos de incubación con PDGF de 30' y 60' se observa una mayor intensidad en la banda detectada.



**Figura 4.41. A1.** Inmunodetección de p60 en la fracción citosólica de hemocitos activados con PDGF (5 ng/ml) a diferentes tiempos e incubados con anti p60. **A2.** Inmunodetección de p60 en la fracción de membrana de hemocitos activados con PDGF (5 ng/ml) a diferentes tiempos e incubados con anti p60. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de la banda de 60 kDa.

N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\* P < 0,01 valor significativo vs células control.

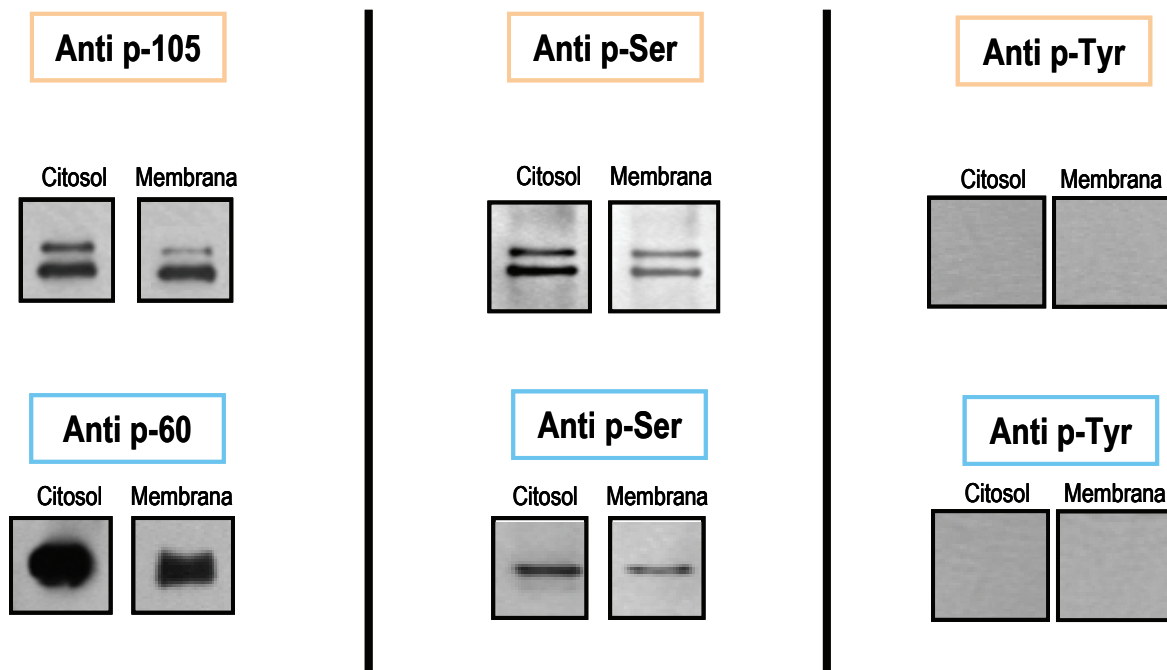
## Resultados

### 4.10. Fosforilación de p105 y p60

En estudios anteriores realizados por nuestro grupo de investigación, se demostró que **p105** era capaz de autofosforilarse en condiciones de ensayo, sin mediar la presencia de cofactores lipídicos y que la enzima se fosforila en los residuos de serina que posee, por lo que se decidió plantear la realización de un estudio comparativo acerca del grado de fosforilación de **p60** y **p105** cuando los hemocitos incubados se estimulaban con distintos inductores.

En el presente trabajo, para las inmunodetecciones realizadas con anti P-Serina en las fracciones citosol y de membrana en hemocitos cultivados e incubados con diferentes efectores: IL-2 (0,01 µg/ml), LPS (5 µg/ml), PDGF (5 ng/ml) durante distintos tiempos o bien empleando distintas concentraciones de IL-2 con un tiempo de incubación de 24 horas, se detectaron dos bandas de 105 y 108 kDa y una única banda de 60 kDa tanto en el citosol como en la membrana (figura 4.42).

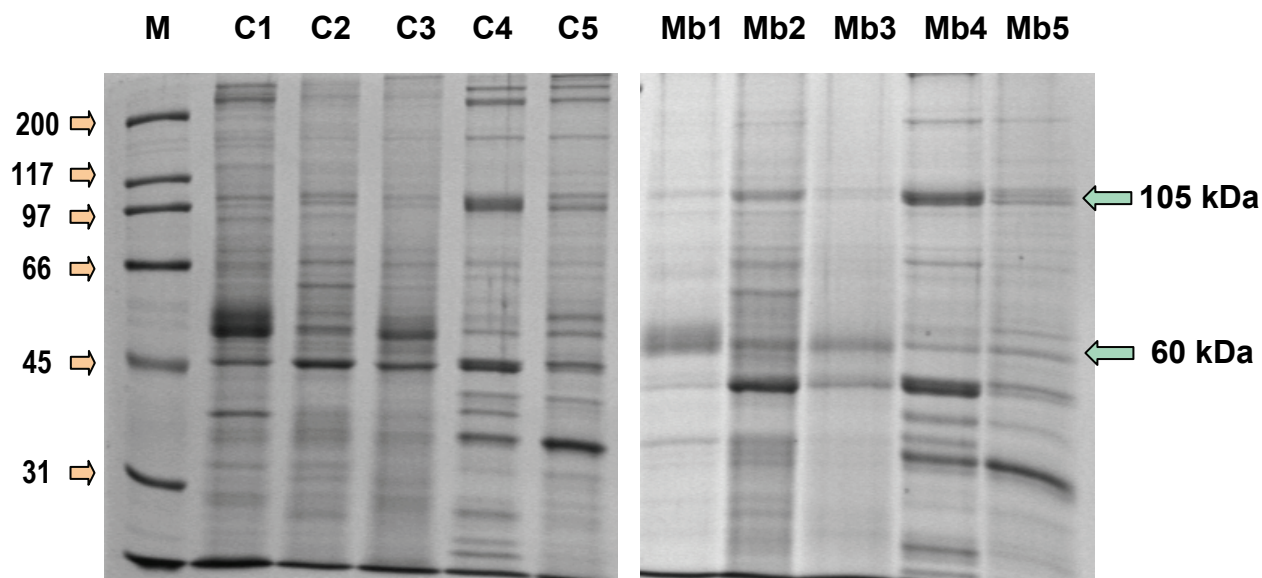
Posteriormente, se realizaron ensayos empleando anticuerpos anti P-Tirosina, a diferencia del caso anterior en estas inmunodetecciones no se detectó la presencia de p105 y p60.



**Figura 4.42.** Inmunodetecciones en la fracción citosólica y de membrana de hemocitos con los anticuerpos anti p105, anti p60, anti pSer y anti pTyr. Las células fueron cultivadas en medio L-15 con FCS. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

#### 4.11. Distribución Tisular de p60

A continuación podemos observar el patrón electroforético obtenido en los diferentes tejidos del mejillón tanto para la fracción citosólica como de membrana (figura 4.43). Puede verse que existen diferencias significativas en la expresión de varias bandas de proteínas tanto en el citosol como en la membrana para los diferentes tejidos del mejillón.



**Figura 4.43.** SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie de los extractos citosólicos y de membrana obtenidos a partir de los tejidos del mejillón. Se cargaron 15 µg de proteína/calle.

**M.** Marcadores de peso molecular.

**Citosol:** C1. Manto. C2. Branquias. C3. Hepatopáncreas. C4. Músculo aductor posterior. C5. Pie.

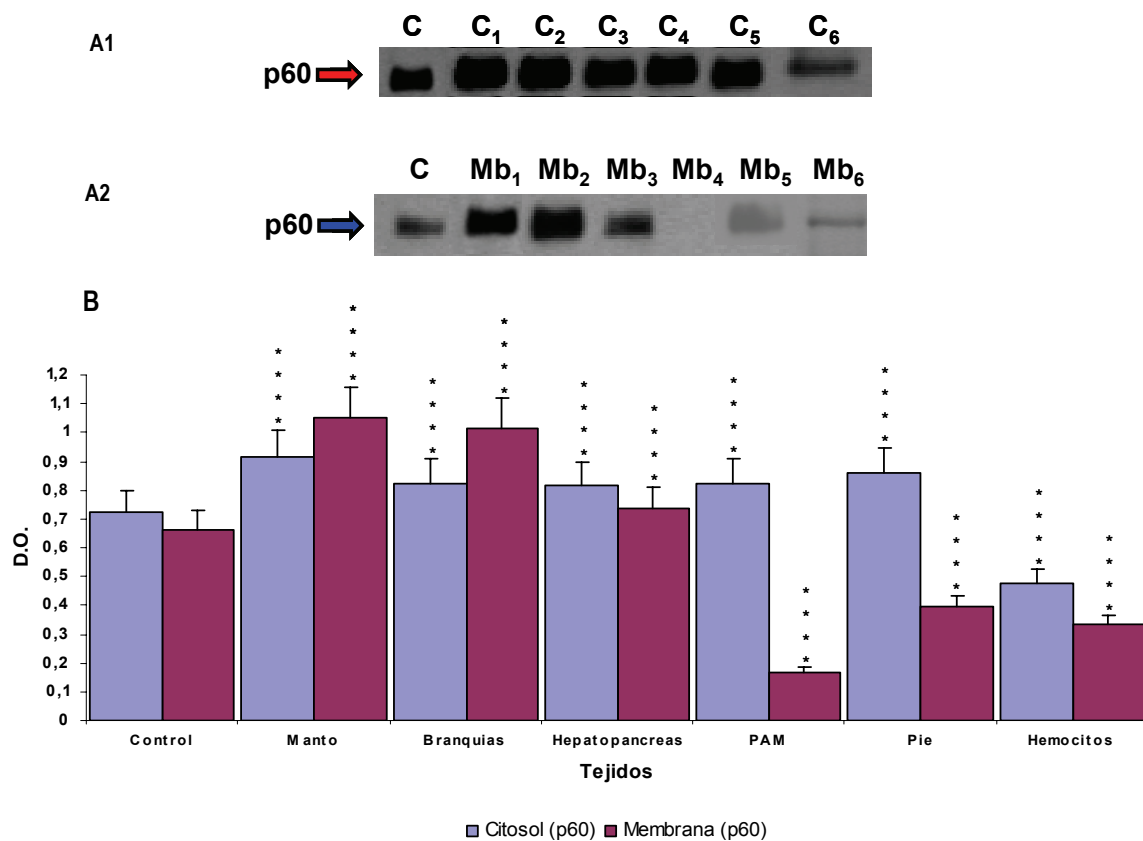
**Membrana:** Mb1. Manto. Mb2. Branquias. Mb3. Hepatopáncreas. Mb4. Músculo aductor posterior. Mb5. Pie.

En el presente trabajo se observó que la enzima **p60** no presentaba diferencias en el estado de fosforilación, pero parece presentar una preferente localización citosólica (Figura 4.44.A1). **p60** es abundante en manto y branquias, apareciendo menos expresada en el resto de tejidos estudiados.

No se observó expresión de **p60** en la membrana (4.44.A2) del músculo aductor posterior (PAM) y fue mucho más reducida en el músculo del pie que en los otros tejidos del molusco.

En hemocitos la banda detectada fue más intensa en el citosol que en la fracción de membrana y en ambos casos las bandas detectadas presentaron una intensidad menor que en el resto de tejidos del mejillón.

## Resultados

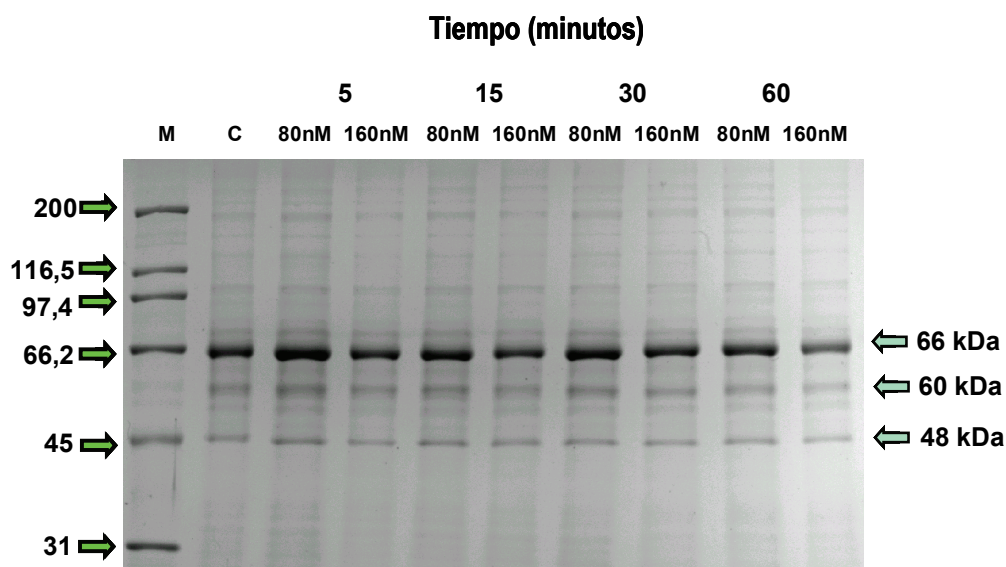


**Figura 4.44. A1.** Inmunodetección de p60 en la fracción citosólica de diferentes tejidos de *Mytilus galloprovincialis*. C. Control (p60 pura). C<sub>1</sub>. Manto. C<sub>2</sub>. Branquias. C<sub>3</sub>. Hepatopáncreas. C<sub>4</sub>. Músculo aductor posterior. C<sub>5</sub>. Pie. C<sub>6</sub>. Hemocitos. **A2.** Western blotting p60 en la fracción de membrana de diferentes tejidos de *Mytilus galloprovincialis*. C. Control (p60 pura). Mb<sub>1</sub>. Manto. Mb<sub>2</sub>. Branquias. Mb<sub>3</sub>. Hepatopáncreas. Mb<sub>4</sub>. Músculo aductor posterior. Mb<sub>5</sub>. Pie. Mb<sub>6</sub>. Hemocitos. En todos los casos se cargaron 15 µg de proteína / ensayo. **B.** Análisis densitométrico de la banda de 60 kDa. N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control.

#### 4.12. Estudio de la translocación de p105 y p60 en hemocitos

Una vez caracterizadas **p105** y **p60** como quinasas ampliamente extendidas en tejidos de *Mytilus galloprovincialis*, se abordó el estudio de las enzimas en un modelo celular aislado, presente en el molusco.

En la figura (4.45) se observa el patrón electroforético de hemocitos estimulados con PMA (80nM y 160nM) desde 5' hasta 60'. Se detectaron múltiples bandas, de las cuales podemos destacar tres bandas que presentan mayor intensidad en las electroforesis realizadas. Estas poseen unos pesos aproximados de 66, 60 y 48 kDa respectivamente.

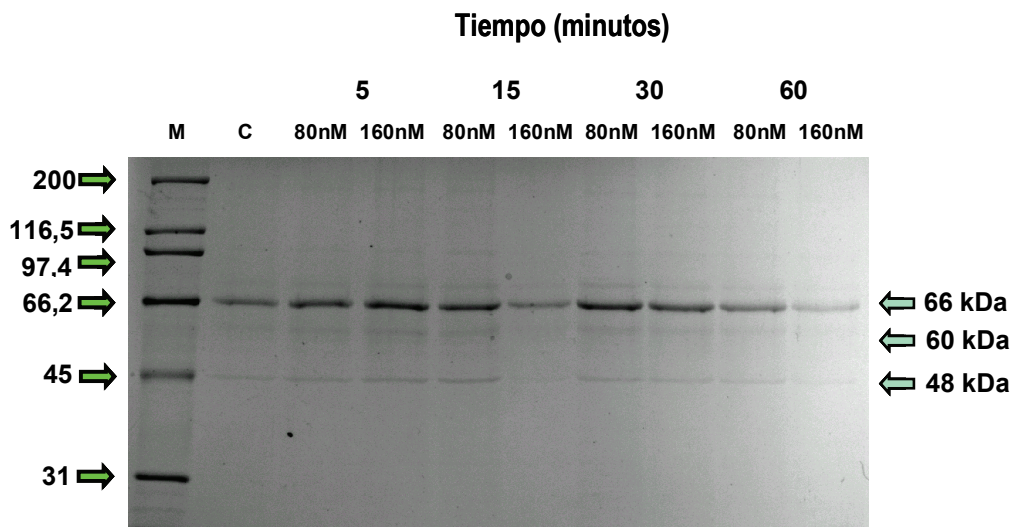


**Figura 4.45.** SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie de los extractos citosólicos obtenidos a partir de hemocitos estimulados con PMA (80 y 160 nM) durante diferentes tiempos. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

**M.** Marcadores de peso molecular. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS.

En cambio, en la fracción de membrana el número de bandas detectadas fue mucho menor que en el citosol, pero al igual que en la imagen anterior las tres bandas mayoritarias presentaron un peso de 66, 60 y 48 kDa (figura 4.46).

## Resultados



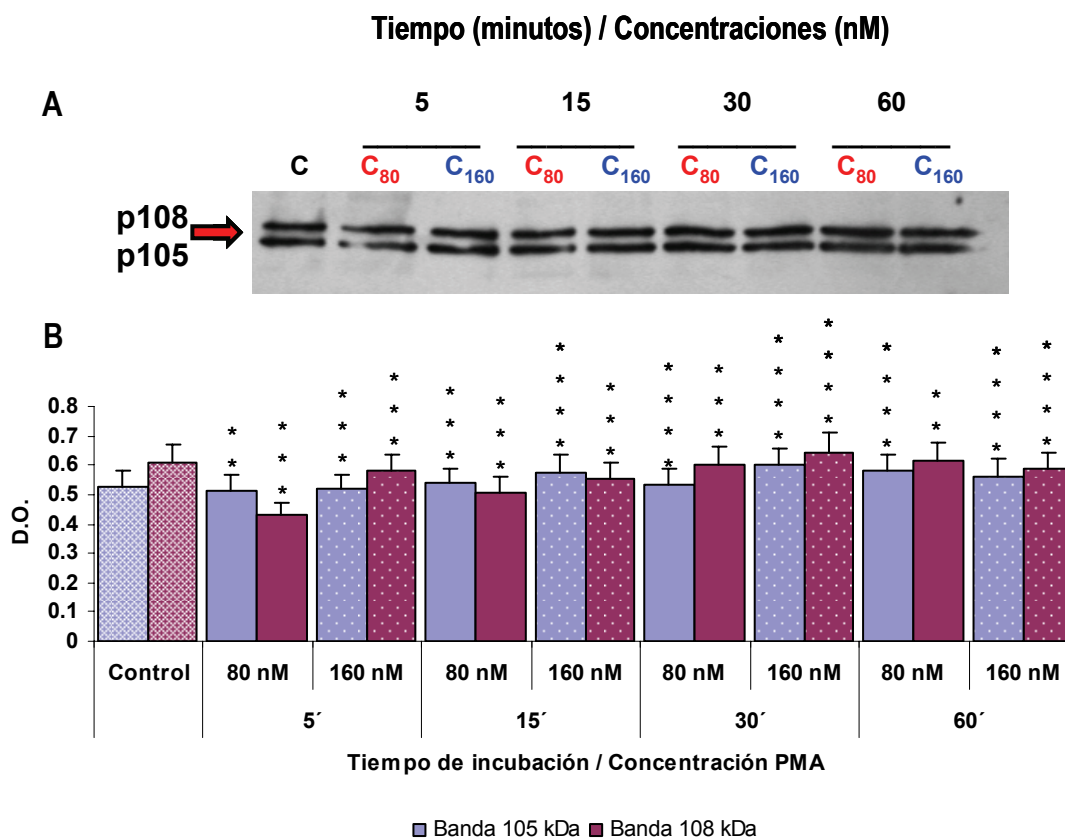
**Figura 4.46.** SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie de los extractos de membrana obtenidos a partir de hemocitos estimulados con PMA (80 y 160 nM) durante diferentes tiempos. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

**M.** Marcadores de peso molecular. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS.

Sabiendo que las isoformas de PKC son muy susceptibles a la estimulación por ésteres de forbol, se estudió el comportamiento de ambas isoformas, **p60** y **p105**, en cultivos de hemocitos expuestos a PMA.

Cuando estos hemocitos que han sido previamente estabilizados, son expuestos a PMA, el éster de forbol induce la translocación de **p105** a la membrana. Lo que se ve claramente en las figuras 4.47 y 4.48. En la Figura 4.47 el control presenta una doble banda característica muy notoria en el citosol, pero no en la membrana plasmática (figura 4.48). Transcurridos 60 minutos de estimulación, con PMA 80 nM, **p105** presenta una intensidad muy baja, y la banda de 108 kDa apenas se distingue. Al incrementar la concentración de PMA, 160 nM, tras 30' de incubación la intensidad de **p105** comienza a disminuir, de tal manera que tras 60 minutos de estimulación **p105** apenas aparece en la membrana para esta concentración de PMA (figura 4.48).



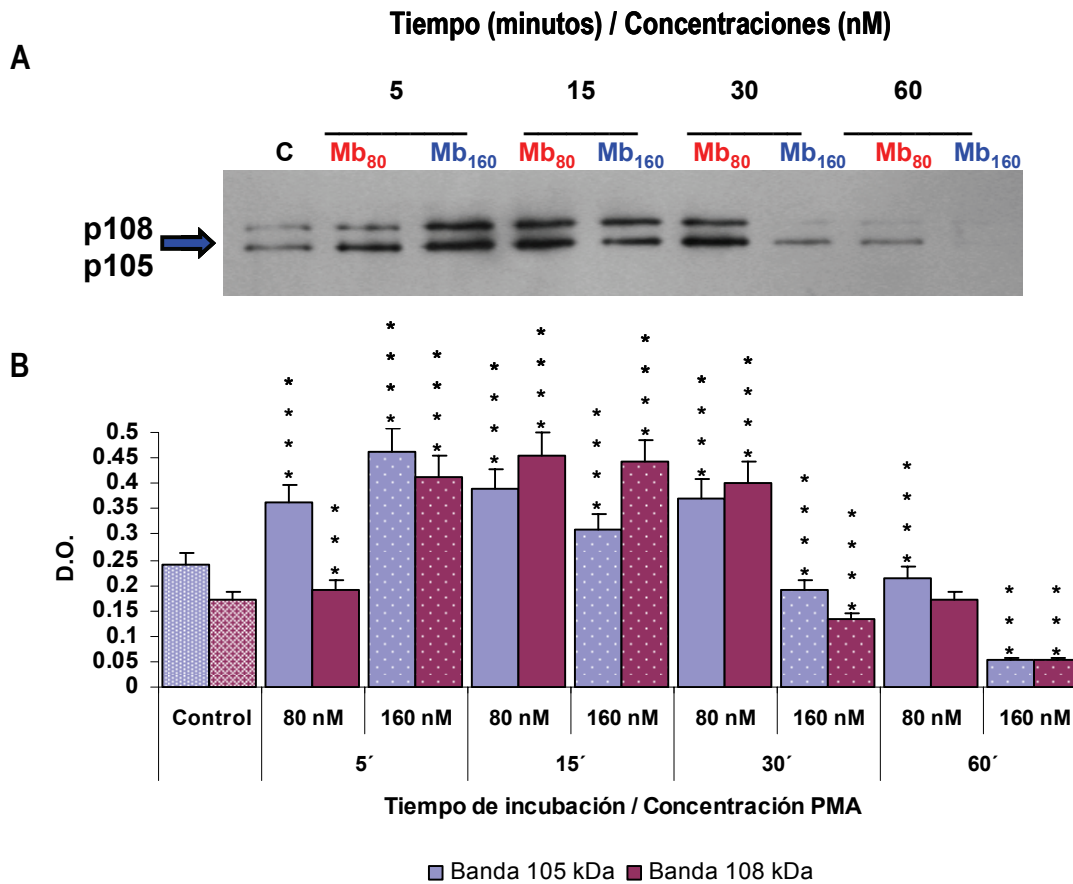


**Figura 4.47. A.** Inmunodetección de **p105** en la fracción citosólica de hemocitos estimulados con PMA (80 y 160 nM) durante diferentes tiempos. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. **C<sub>80</sub>**. Citosol de hemocitos incubados con PMA 80 nM. **C<sub>160</sub>**. Citosol de hemocitos incubados con PMA 160 nM. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de las bandas de 108 y 105 kDa.

N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control; \*\* P < 0,01 valor significativo vs células control.

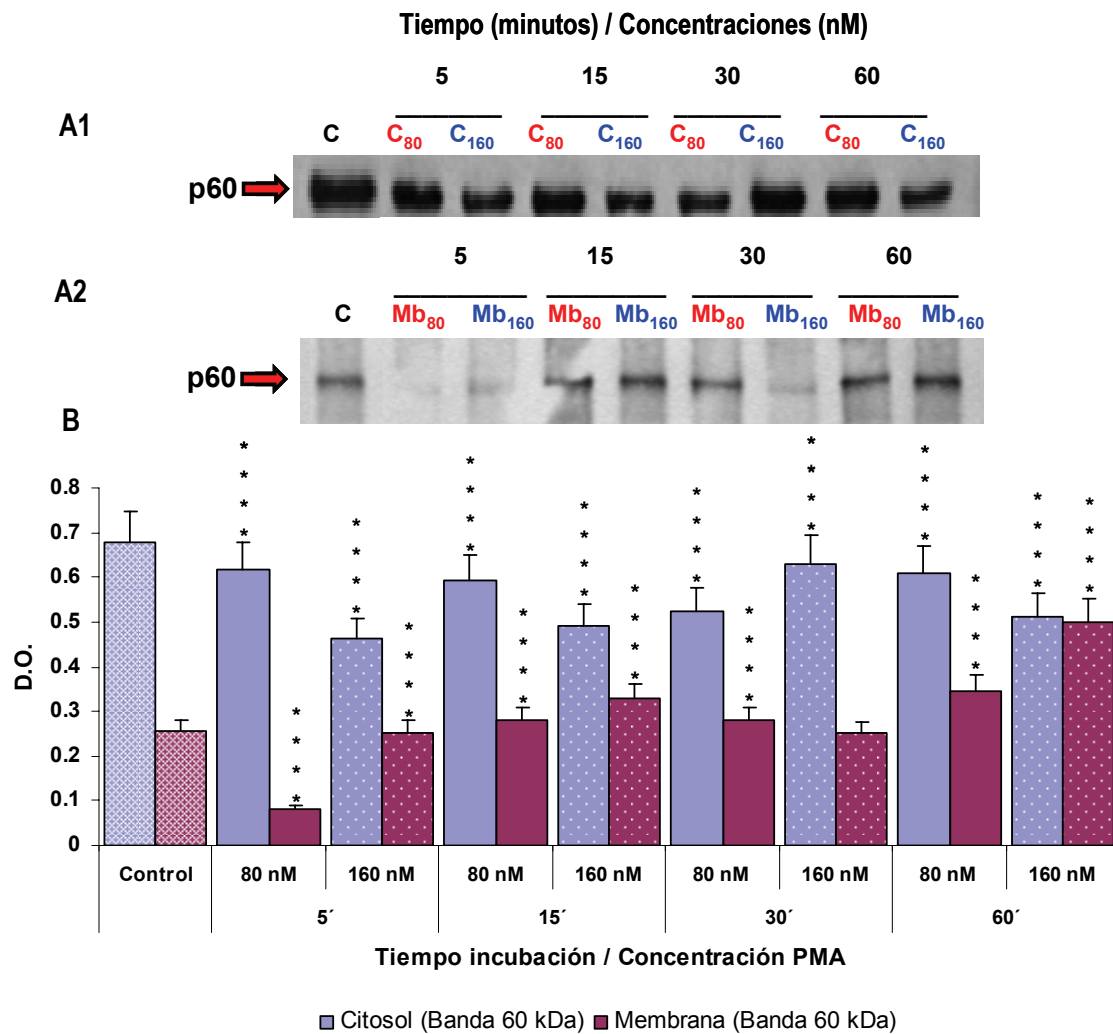
## Resultados



**Figura 4.48. A.** Inmuno-detección de **p105** en la fracción de membrana de hemocitos estimulados con PMA (80 y 160 nM) durante diferentes tiempos. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. **Mb<sub>80</sub>**. Membrana de hemocitos incubados con PMA 80 nM. **Mb<sub>160</sub>**. Membrana de hemocitos incubados con PMA 160 nM. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos. **B.** Análisis densitométrico de las bandas de 108 y 105 kDa. **N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control; \*\*\* P < 0,001 valor muy significativo vs células control.**

Por otro lado para la enzima **p60** se detectó la presencia de una única banda de 60 kDa para todas las condiciones estudiadas en la fracción citosólica. En el control se detectó una banda muy notoria tanto en citosol (figura 4.49.A1) como en la membrana (figura 4.49.A2). Si se estimulan los hemocitos con PMA 80 nM durante 5', **p60** prácticamente desaparece de la fracción de membrana. A partir de 15' de incubación con el forbol **p60** se recupera y la banda detectada presenta intensidades semejantes o superiores a la obtenida en el control.

En cambio, incrementando la concentración de PMA a 160 nM, se observan diferencias con respecto a la incubación anterior. Como ocurría con concentraciones de forbol más bajas, transcurridos 5 minutos de incubación, **p60** apenas se detecta en la membrana. Sin embargo a los 15 minutos de incubación con PMA, **p60** se recupera detectándose con una intensidad similar a la del control (Figura 4.49.A2). A los 30 minutos de incubación la intensidad de la banda detectada sufre un nuevo descenso pero ésta se recupera de nuevo a los 60 minutos de incubación.

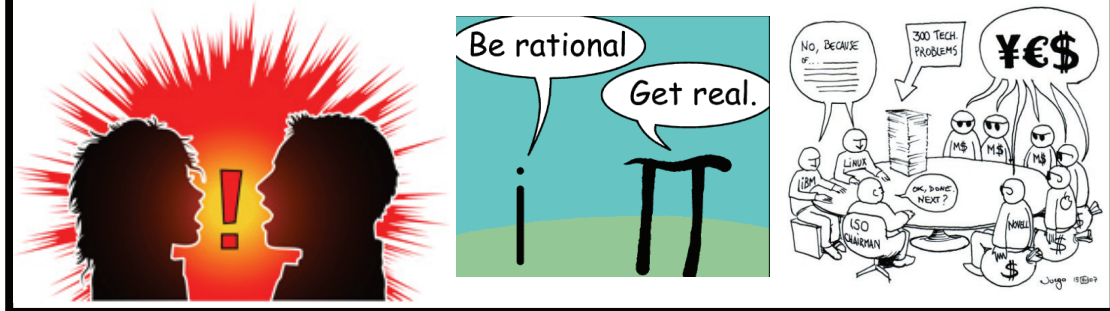


**Figura 4.49. A1.** Inmunodetección de **p60** en la fracción citosólica de hemocitos estimulados con PMA (80 y 160 nM) incubados a diferentes tiempos. **A2.** Inmunodetección de **p60** en la fracción de membrana de hemocitos estimulados con PMA (80 y 160 nM) incubados a diferentes tiempos. **C.** Control, células cultivadas 3 días en medio L-15 con FCS. **C<sub>80</sub>.** Citosol de hemocitos incubados con PMA 80 nM. **C<sub>160</sub>.** Citosol de hemocitos incubados con PMA 160 nM. **Mb<sub>80</sub>.** Membrana de hemocitos incubados con PMA 80 nM. **Mb<sub>160</sub>.** Membrana de hemocitos incubados con PMA 160 nM. En todas las calles se cargaron 15 µg de extractos proteicos.

**B.** Análisis densitométrico de la banda 60 kDa. Citosol en azul y membrana en rojo. **N=3, \*\*\*\* P < 0,0001 valor extremadamente significativo vs células control.**

# Discusión

*“La mayoría de las ideas fundamentales la ciencia son esencialmente sencillas y, por regla general pueden ser expresadas en un lenguaje comprensible para todos”  
Albert Einstein.*



La proteína quinasa C es reconocida como una familia de serina/treonina quinasas que ha sido identificada como el receptor celular para el lípido DAG; es una enzima que fosforila una amplia variedad de sustratos celulares y es clave en los mecanismos de transducción de señales, involucrados en la activación de receptores acoplados a fosfolipasas (Chauhan et al., 1990; Khan et al., 1995; Ron y Kazanietz, 1999).

Por este motivo nuestro grupo de investigación ha estudiado la expresión de la PKC en hemocitos de mejillón estimulados con diversos efectores en diferentes épocas del año (Cao, 2002; Novás, 2005).

Estudios previos de Barcia et al., (1997), determinaron la existencia de proteínas en el manto, que son inmunorreactivas con anticuerpos contra las isoformas humanas de PKC  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\beta$ . En estudios posteriores de Mercado (2001), además de las isoformas descritas se detectó en extracto crudo de manto la presencia de una proteína que es reconocida por anti PKC  $\epsilon$  humana.

El manto, por su organización tisular, es un tejido diverso (Zwaan y Mathieu, 1992). Es un tejido de reserva que a lo largo del año presenta variaciones estacionales en su composición bioquímica, determinadas tanto por el desarrollo gametogénico, como por las variaciones de su disponibilidad alimentaria (Ibarguren et al., 1990; Díaz-Enrich et al., 2000). En el presente trabajo se ha utilizado el manto para la purificación de enzimas y la caracterización de éstas.

Nuestra investigación se centró en el diseño de un método eficaz para la purificación de una proteína tipo cPKC de manto de mejillón y comparar los resultados obtenidos para ésta con los resultados previos obtenidos por Mercado et al., (2002a, b; 2003) para una isoforma del tipo nPKC.

A partir de manto de mejillón *Mytilus galloprovincialis* se han purificado dos proteínas quinasas, una de estas proteínas es una cPKC que requiere cofactores enzimáticos, PS,  $\text{Ca}^{2+}$  y DAG para su actividad. Además se purificó también una nPKC, proteína quinasa que tiene los mismos requerimientos que la cPKC, pero a diferencia de la anterior es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . El peso molecular de estas PKCs fue de 60 kDa para la cPKC (por lo que fue nombrada **p60**) y de 105 kDa para la nPKC (por lo que se denominó **p105**).

Al ser las PKCs enzimas translocables (Rybin y Steinberg, 1994) se pueden encontrar tanto asociadas a la fracción citosólica como a la membrana plasmática. Aunque algunos autores han utilizado, preferentemente la fracción de membrana para la purificación de nPKCs tanto en vertebrados (Leibersperger et al., 1990) como en invertebrados (Huang y Chuang, 1995), su purificación puede ser más eficiente a partir de la fracción citosólica, tal como han demostrado en este laboratorio Mercado et al., (2002a, b).

## Discusión

El primer paso cromatográfico es común a otras purificaciones de cPKCs y nPKCs. Las isoformas de cPKCs de vertebrados se eluyen de DEAE Sepharose con una baja fuerza iónica. En hígado de rata se obtiene un pico de actividad PKC cuando la concentración de NaCl es aproximadamente 100 mM (Perletti, 1994). Las proteínas con actividad cPKC y nPKC que hemos purificado a partir de manto de *M. galloprovincialis*, requieren en ambos casos de una fuerza iónica menor para su elución, NaCl 25 mM (Figuras 4.2.A y 4.4).

La cromatografía de exclusión molecular con la columna Superdex 200 HR 10/30 permitió purificar a homogeneidad la cPKC de 60 kDa que denominamos como **p60** (figuras 4.2.B,C) y también se puede observar como la otra proteína purificada de 105 kDa que denominamos como **p105** se va separando de **p60** a medida que progresa la cromatografía (figuras 4.5.A,B). Mientras que **p60** se obtuvo totalmente pura con esta columna, para purificar **p105** a homogeneidad fue preciso realizar una nueva cromatografía, eligiendo en este caso la cromatografía de adsorción y utilizando como adsorbente el HTP (hidroxilapatito).

La cromatografía de adsorción sobre HTP, suele ser la mejor para la eliminación de contaminantes (Sossin et al., 1993; Mercado, 2001). En nuestro caso ha permitido obtener la enzima **p105** pura, cuando se eluye con fosfato de potasio 300 mM (figuras 4.5.C,D). En la purificación de isoformas de PKC en el molusco *Aplysia*, también se utiliza la cromatografía sobre HTP como último paso de purificación, obteniéndose dos picos de actividad PKC, uno cuando el fosfato de potasio alcanza una concentración de 180 mM, y otro se recoge con una concentración de 400 mM (Sossin et al., 1993). Este segundo pico es coincidente con el que se obtiene con la enzima **p105** de mejillón.

La purificación por métodos convencionales de isoformas de PKC de invertebrados no es un tema profundamente estudiado. Existen algunas isoformas caracterizadas en levaduras, nematodos, *Drosophila*, erizo de mar y *Xenopus*. Éstas han sido caracterizadas molecularmente, sin establecer analogías con isoformas de PKC típicas de mamíferos. Sin embargo, en otras especies se han establecido relaciones, en cuanto al reconocimiento por anticuerpos desarrollados contra isoformas humanas, que han incluido también purificaciones parciales o totales. Es el caso del camarón *Penaeus monodon*, de cuyo hepatopáncreas se purificó una isoforma similar a PKC  $\delta$ , con un peso molecular entre 62 y 58 kDa (Huang y Chuang, 1995). Debido a la utilización del molusco *Aplysia* como modelo para el estudio de las bases neurológicas del aprendizaje (Sossin et al., 1994), es en esta especie donde se han caracterizado con mayor detalle las isoformas existentes de PKC. De ganglios neuronales de este molusco se han purificado dos PKCs de las cuales la llamada Apl II posee una masa molecular de 87 kDa, mientras que la forma dependiente de calcio o Apl I, posee

una masa molecular de 74 kDa. En ambos casos menor que la de **p105** (figura 4.6) y mayor que la de **p60** (figura 4.3).

La purificación de PKC  $\delta$  de la membrana plasmática de hepatopáncreas de camarón dio lugar a 3 proteínas diferentes con masas moleculares de 66, 62 y 58 kDa, estas isoformas son más pequeñas que las encontradas en mamíferos, las cuales oscilan entre 76 y 84 kDa (Nishizuka, 1988). En este estudio se determinó que PKC  $\delta$  de la membrana plasmática de diferentes tejidos del camarón se fosforilaba en los residuos tirosina y tal vez en los residuos Ser/Thr. Es posible que la proteína **p60** purificada en el presente trabajo sea similar a las isoformas purificadas por Nishizuka.

Por la cercanía filogenética entre *Aplysia* y el mejillón *M. galloprovincialis* es probable que Apl-II y **p105** sean isoformas similares, aún a pesar de la diferencia de peso molecular (Mercado, 2001). En cuanto a la relación que existe entre estas proteínas y las isoformas de mamíferos solo se puede señalar que los estudios más avanzados en *Aplysia*, han permitido su clonación y se ha constatado una analogía en su secuencia con PKC  $\epsilon$  de mamíferos (Pepio y Sossin, 1998). Con respecto a la actividad quinasa de las proteínas **p60** y **p105**, los parámetros cinéticos que hemos obtenido coinciden con los antecedentes descritos para nPKCs de mamíferos, las cuales fosforilan débilmente la Histona III-S y la MBP, mientras que tienen una alta afinidad por la protamina sulfato (Schaap et al., 1989, Saido et al., 1992, Mercado, 2001). Las nPKCs presentan grandes diferencias respecto a las cPKCs ya que muestran una actividad quinasa reducida con Histona III-S (Chakravarthy et al., 1991), MBP, protamina o protamina sulfato. (Dekker, et al., 1992; Mc Glynn et al., 1992; Ohno et al., 1989; Schaap y Parker, 1990).

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio para nPKC por Mercado et al., (2002a, b; 2003) así como los obtenidos para cPKC en el presente trabajo muestran que las cPKC presentan una actividad con los diferentes péptidos sustratos ensayados del orden de 10–20 veces más alta que los valores obtenidos por Mercado para las nPKC. En los resultados obtenidos en el presente trabajo también se estudió la actividad de la nPKC frente a varios sustratos y no se observaron esas diferencias comparando los valores obtenidos para **p105** y **p60**.

La alta actividad fosforilante que **p60** y **p105** desarrollan con la protamina sulfato (tabla 4.1), podría deberse a que presenta dos sitios de fosforilación en su secuencia, PRRRRSSSRPVRRRRRPRVSRRRRRRGGRRR, en S6 y S20, en comparación con los otros sustratos probados que solo presentan un sitio de fosforilación (CBS, base de datos; Phosphobase). Las actividades enzimáticas sugieren que **p105** podría catalizar las reacciones de fosforilación de una manera similar a PKC  $\epsilon$  (Mercado, 2001). Los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  obtenidos para el péptido sustrato comercial VRKRTLRRL (T-5) y el péptido sustrato para PKC  $\epsilon$ , ERMRPRKRQGSVRRRV

## Discusión

(S-11), son similares a los que se obtienen con la PKC  $\epsilon$  de mamíferos (Kazanietz et al., 1993). La proteína **p105** no solo es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , sino que además es inhibida por él (Mercado, 2001). Esta característica ya ha sido descrita en isoformas de nPKC de mamíferos, en un tipo descrito simplemente como nPKC (Ohno et al., 1988) y en PKC  $\theta$  (Chang et al., 1993). Para la enzima **p105** de manto de mejillón, la inhibición con el calcio es de tipo mixta. Siendo la enzima libre más afín por este,  $K_i$  0,6 mM que el complejo enzima-sustrato,  $K_i$  2 mM (Mercado, 2001). Newton, (1995) afirma que las nPKCs conservan una región C2-like que no une  $\text{Ca}^{2+}$ , pero que sí está involucrada en la unión y regulación de la actividad por lípidos. Sin embargo Mercado, (2001) cree que **p105** probablemente una el catión y esta asociación en vez de facilitar la asociación a lípidos ácidos, provoque cambios conformacionales del sitio activo, impidiendo la fosforilación eficiente del sustrato.

En la mayoría de células estimuladas, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se incrementa solo transitoriamente, mientras que las respuestas fisiológicas persisten durante un largo periodo de tiempo una vez que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ya retornó a concentraciones basales. La prolongada activación de PKC parece ser responsable del mantenimiento en la respuesta celular (Woods et al., 1986). La movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  y la activación de PKC actúan sinérgicamente causando una variedad de respuestas celulares, pero el mecanismo bioquímico de este sinergismo no está completamente estudiado (Nishizuka, 1986). La movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  y la degradación del fosfolípido están íntimamente relacionadas, y en ocasiones son complementarias entre sí. En presencia de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , la activación de PKC requiere de una pequeña degradación fosfolipídica, así como en presencia de una intensa degradación fosfolipídica se requiere de una pequeña cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  para activar la enzima (Nishizuka et al., 1986, Watson y Lapetina., 1985).

Por otra parte en este estudio, hemos determinado que **p60** es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , y que la concentración óptima de  $\text{Ca}^{2+}$  para esta enzima es de 0,65 mM (figura 4.7).

En el nematodo *Caenorhabditis elegans*, la actividad de PKC fue inhibida por H7 y estaurosporina. Se obtuvo una inhibición máxima para concentraciones de 9  $\mu\text{M}$  y 8 nM respectivamente (Sassa y Miwa, 1992). Se ha confirmado que, el inhibidor H7 (Kawamoto y Hikada, 1984) y el péptido inhibidor específico de la PKC (RFARKGALRQKNVHEVKN) (House y Kemp, 1987) inhiben la fosforilación del péptido FKSFKL-NH<sub>2</sub> (sustrato específico para la PKC) estimulada por el  $\text{Ca}^{2+}$  / fosfolípido en más de un 98%.

En este trabajo, también hemos estudiado los efectos de inhibición provocados sobre **p60** por inhibidores que compiten por la unión del ATP (como la estaurosporina  $K_i$  = 20,3  $\mu\text{M}$  y la



bisindolilmaleimida  $K_i = 1,765 \mu\text{M}$ ) (figuras 4.13, 4.14A y B, 4.16 y 4.17A y B), así como por inhibidores de la interacción PKC/fosfolípido (curcumina  $K_i = 13,16 \mu\text{M}$ ) (figuras 4.18 y 4.19 A y B) observándose que para los tres casos se obtiene un inhibición de tipo competitiva.

Para profundizar en la caracterización de las enzimas se obtuvieron anticuerpos policlonales contra **p60** y **p105**. Los anticuerpos obtenidos son específicos para las proteínas puras, y no se observó reacción cruzada en las inmunodetecciones realizadas para las dos isoformas purificadas frente a los respectivos anticuerpos (figura 4.20).

El análisis de **p105**, evidenció una característica que la proteína comparte con otras nPKCs descritas en mamíferos, PKC  $\epsilon$  (Davidson et al., 1994), PKC  $\delta$  (Leibersperger et al., 1991) y PKC  $\eta$  (Zang et al., 1994). Todas estas isoformas presentan una doble banda, detectada mediante Western blotting, que es habitualmente un indicador de un estado diferencial de fosforilación, detectable en extractos crudos de tejidos (Dutil et al., 1998).

Con respecto a las inmunodetecciones, **p105** presentó fosforilaciones en Ser, no presenta fosforilaciones en Tyr y fue reconocida por anti PKC  $\delta$  y con mayor nitidez por anti PKC  $\epsilon$  (Mercado, 2001)(Figuras 4.21 y 4.42). Esto último nuevamente refuerza la idea de que existe una similitud entre **p105** y la isoforma PKC  $\epsilon$  de mamíferos, y se podría decir que aparentemente existen secuencias aminoacídicas comunes entre ambas proteínas.

Por otro lado, como se ve en las Figuras 4.21 y 4.42, a diferencia de **p105** para **p60** solo se detectó una banda y al igual que **p105**, presentó fosforilaciones en Ser, no presentó fosforilaciones en Tyr y fue reconocida por anticuerpos contra isoformas cPKC ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de mamíferos.

Al ser considerados los hemocitos de invertebrados semejantes a los macrófagos de vertebrados se cree que, deben de comportarse de forma similar a ellos (Franchini *et al.*, 1995; Aktan, 2004). De modo que en las incubaciones se emplearon tres moléculas que poseen la capacidad de inducir la síntesis y la liberación de óxido nítrico en diversos tipos celulares de vertebrados como macrófagos, células alveolares, monocitos, astrocitos, células T, etc. (Ottaviani et al., 1993b; Liew, 1994; Renè y Spitzer, 1997; Kwak et al., 2000; Tepperman et al., 2000; Pham et al., 2003).

Los inductores utilizados en hemocitos fueron un antígeno (LPS, lipopolisacárido asociado a la membrana de bacterias Gram-negativas) y dos citoquinas (interleuquina 2 y PDGF o factor de crecimiento derivado de plaquetas).

Tanto las concentraciones como los rangos de tiempo utilizados en las incubaciones con los tres inductores se eligieron basándose en estudios previos, en los cuales para dichos parámetros se

## **Discusión**

había conseguido la mayor liberación de catecolaminas y síntesis de óxido nítrico por los hemocitos (Novás, 2005; Cao, 2002).

Estas moléculas parecen activar a los hemocitos induciendo un aumento de la motilidad y superficie celular e incrementando la síntesis de aminas biógenas (Morgan et al., 1976).

Al igual que sucede con los diferentes tipos celulares de vertebrados, la respuesta de hemocitos de *M. galloprovincialis* varía según el inductor utilizado. El estudio de la expresión proteica de hemocitos incubados con los inductores (LPS, IL-2 y PDGF) refleja cierta diversidad en los patrones electroforéticos (Resultados, figuras 4.22 a 4.29).

En las electroforesis realizadas con los diferentes inductores ensayados se detectaron múltiples bandas de proteínas en la fracción citosólica, siendo dos proteínas con un peso de 66 y 48 kDa respectivamente, las que mostraron una mayor expresión. Estas dos bandas de proteínas también fueron las que presentaron la mayor intensidad en la fracción de membrana.

En la fracción citosólica la banda de 48 kDa no presentó variaciones significativas excepto cuando los hemocitos se incubaron con LPS, donde se observó que para tiempos de incubación muy cortos (30 segundos y 1 minuto) la banda detectada fue más intensa, mientras que para tiempos de incubación más prolongados (45 minutos y 60 minutos) la banda detectada mostró una intensidad más baja. En cuanto a la banda de 66 kDa, su expresión reflejó cambios para los distintos inductores empleados; lo más destacado fue que en el caso del LPS para tiempos de incubación largos (45 minutos y 60 minutos) la banda mostró una intensidad más baja que en el resto de condiciones ensayadas y en las incubaciones con PDGF a partir de los 5 minutos de incubación se produce un aumento en la intensidad de la banda. En cambio, Novás, (2005) había obtenido una mayor expresión para tres bandas de proteínas cuyos pesos moleculares eran de 108, 85 y 71 kDa respectivamente, tanto en invierno como en verano. Novás, (2005) también observó durante los dos años posteriores al desastre ecológico (*vertido de fuel por el Prestige*) ocurrido en las costas gallegas un cambio en la expresión proteica de los hemocitos en las inmunodetecciones realizadas con anti iNOS humana y anti eNOS bovina. Además comprobó que la producción de óxido nítrico se anulaba durante estos años (2003 y 2004).

Aunque el LPS no induce la síntesis directa de óxido nítrico, en hemocitos se conoce la implicación de esta molécula en la liberación de catecolaminas (Cao, 2002; Cao et al., 2004a,b), las cuales ya habían sido detectadas anteriormente en varios tejidos de moluscos (Sloley et al., 1990; Voronezhskaya et al., 1999) y en hemolinfa de moluscos gasterópodos (Manger et al., 1996; Pani y Croll, 2000; Santhanagopalan y Yoshino, 2000). Incluso existen diversos estudios que afirman que las catecolaminas de invertebrados poseen las mismas características que las presentes en

vertebrados (Osada y Nomura, 1989; Pani y Croll, 2000; Lacoste *et al.*, 2001). Cao (2002), observó en hemocitos de mejillón *M. galloprovincialis*, un incremento en la producción de catecolaminas después de la incubación de estas células con LPS, PDGF, ACTH 1-24, ACTH, IL-2, TGF- $\beta$  1 y CRF en diferentes épocas del año.

La IL-2 modula la actividad fagocítica de los hemocitos (Franceschi, *et al.* 1991), y junto con IL-1 $\alpha$  y  $\beta$  y TNF- $\alpha$  y  $\beta$  está implicada en la liberación de aminas biógenas, un fenómeno considerado como un tipo ancestral de respuesta al estrés (Ottaviani, *et al.*, 1991; 1992; 1994b; 1995).

En vertebrados la IL-2 desempeña un papel fundamental en la proliferación de las células T al unirse a un receptor específico que se expresa en la superficie celular (Smith, 1988). Además la IL-2 modula las funciones inmunológicas de células T, B y NK (Waldman y Golmand, 1989) con lo que podemos concluir que desempeña un papel fundamental en la fisiología del sistema inmune. En invertebrados, la IL-2 induce activaciones en células de la hemolinfa, aunque las activaciones son menos potentes que las inducidas por IL-1 o CRF (Hughes, *et al.*, 1991b), ésto es particularmente notorio en el caso de la síntesis de aminas biógenas promovidas por citoquinas. Novás (2005), determinó en experimentos realizados en nuestro laboratorio que la mayor producción de NO se produce cuando los hemocitos se incubaban con IL-2 (0,1  $\mu$ g/ml) durante 24 horas.

Las inmunodetecciones realizadas con anti p105 en hemocitos incubados con IL-2 (0,01  $\mu$ g/ml) (Resultados, figura 4.30 y 4.31) revelaron la presencia en el citosol de una doble banda (105 y 108 kDa) para todos los casos estudiados, mientras que en la membrana se observó que la doble banda desaparecía al cabo de una hora de incubación con IL-2. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Novás *et al.*, (2007a) para las diferentes épocas del año y con los obtenidos por Cao (2002) en el periodo estival (abril-agosto), aunque son opuestos a los que Cao obtuvo para el periodo invernal (septiembre-marzo) cuando la estimulación con el inductor fue de 30 minutos de duración. Lu y Durkin (1997) llegaron a la conclusión de que la estimulación con este efector no conducía a una translocación de la PKC a la membrana. Cabe mencionar que todos los hemocitos con los que se ha trabajado en el presente trabajo se obtuvieron durante el periodo invernal. Además recientes patrones meteorológicos apuntan a que el cambio climático global ya está teniendo un impacto en España y es probable que las artes de pesca destructivas, el deterioro progresivo del litoral, la contaminación marina y el imparable cambio climático estén provocando cambios en la respuesta de los seres que componen los ecosistemas marinos, y probablemente por ello existe una gran variabilidad en la respuesta de los hemocitos del mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk. durante los últimos años.

## **Discusión**

Cuando los hemocitos se incubaron con diferentes concentraciones de IL-2 durante 24 horas, en el citosol se detectaron dos bandas para las diferentes condiciones ensayadas (Figura 4.32). En la membrana se observa como la doble banda detectada presenta una intensidad más elevada con la concentración más elevada de las ensayadas (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ); posteriormente la intensidad de las dos bandas disminuye de forma paralela a la concentración, y una vez se alcanza el mínimo en la intensidad para una concentración de  $1,5 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$ , la intensidad de las bandas comienza a recuperarse a pesar de que la concentración del inductor continua descendiendo (Figura 4.33).

Con respecto a las inmunodetecciones realizadas con anti p105 en hemocitos incubados con LPS (Resultados, figura 4.34) se observó que la doble banda detectada en la fracción citosólica presentaba diversas fluctuaciones en su intensidad. Lo más destacado es que la banda de 108 kDa presentaba una intensidad mucho más elevada cuando se empleaban tiempos de incubación muy cortos (30 segundos y 1 minuto) que en el resto de los casos. Por otro lado en la fracción de membrana se observa como la banda de 105 kDa es mucho menos intensa cuando el tiempo de incubación fue de 60 minutos y la banda de 108 kDa disminuyó su intensidad a partir de 1 minuto de incubación con LPS (Figura 4.35). Los resultados obtenidos en la fracción de membrana difieren de los obtenidos por Cao et al., (2004b) tanto en invierno como en verano puesto que en los ensayos que realizaron no se detectó la expresión de bandas, y en cambio se asemejarían a los obtenidos por Novás et al., (2007a) durante el periodo invernal, ya que tan solo detectó la presencia de una banda de 105 kDa en esta fracción.

Por último, cuando se utilizó PDGF como inductor en las inmunodetecciones realizadas con anti p105 podemos destacar que en la fracción de membrana la doble banda tan solo se detectó para tiempos de incubación de 30 segundos y 30 minutos, resultados coincidentes con los de Novás et al., (2007a) al emplear 15 minutos de incubación (Figura 4.37). En el citosol existe una gran variación en cuanto a la intensidad de la banda detectada y lo más reseñable es que a los 15 minutos de incubación la banda de 108 kDa presenta una menor intensidad (Figura 4.36). Los resultados obtenidos en la fracción citosólica son idénticos a los obtenidos por Cao et al., (2004a) y Novás et al., (2007a) durante el periodo invernal, mientras que para la membrana difieren de los obtenidos por Cao et al., (2004a) en el mismo periodo, puesto que se encontró que la estimulación de hemocitos con PDGF bloqueaba la translocación de **p105** a la membrana, al igual que ocurría para el LPS.

Analizando estos resultados podemos destacar dos aspectos importantes en la respuesta de los hemocitos:

1) En la fracción citosólica (figuras 4.30, 4.32, 4.34 y 4.36), se detectaron dos bandas de 105 y 108 kDa para todos los controles, mientras que en la fracción de membrana (figuras 4.31, 4.33, 4.35 y 4.37) tan solo se detectó la banda de 105 kDa. Como se comentará más adelante esto es coherente con los resultados obtenidos en otros trabajos puesto que en esta fracción se encuentran preferentemente las especies de PKC defosforiladas o fosforiladas en el asa de activación.

2) Cuando los hemocitos fueron estimulados con diferentes inductores (IL-2, LPS y PDGF) en la fracción de membrana se obtuvo una respuesta muy variable que fue dependiente del tiempo de incubación y en el caso de la IL-2 también fue dependiente de la concentración utilizada.

La inmunidad varía entre diferentes grupos de animales pero siempre va a actuar rápida y eficazmente contra un amplio rango de patógenos diferentes (ejemplo: virus, bacterias, hongos, y parásitos eucarióticos) (Müller et al., 2008). Los invertebrados carecen de respuestas inmunes adaptadas que son características de mamíferos, pero poseen una respuesta inmune innata que incluye la acción de componentes humorales y celulares (González et al., 2007; Tincu y Taylor, 2004; Nappi y Vass, 1993; Carton y Nappi, 1997; Nappi y Ottaviani, 2000; Nappi y Vass, 2000).

Las defensas del sistema inmune innato no son específicas, lo cual significa que estos sistemas reconocen y responden a los patógenos en una forma genérica (Alberts et al., 2002). El sistema inmune innato es el sistema dominante de protección en la gran mayoría de los organismos (Mayer, 2006). Este sistema no confiere una inmunidad duradera contra los patógenos.

Existen al menos dos razones pertinentes para analizar el sistema inmune innato de invertebrados. En primer lugar, mediante el estudio de este sistema en invertebrados podemos aprender más acerca de este tipo de inmunidad que protege a millones de metazoos. En segundo lugar, porque los productos humorales derivados de estos organismos por lo general son potentes antibacterianos (Hubert et al., 1997).

El papel de las PKCs en la respuesta inmune innata de los mamíferos ha sido el centro de gran parte de investigaciones y, en los macrófagos, se ha demostrado que esta familia de enzimas regula procesos tales como la adhesión y la difusión celular (Clarke y Brugge, 1995), la fagocitosis (Allen y Aderem, 1995), y la producción de especies reactivas de oxígeno e intermediarias de nitrógeno (Larsen et al., 2000; Castrillo et al., 2001).

Parece que la estimulación de los hemocitos también provocó al menos dos tipos de respuestas. Los hemocitos estimulados con diferentes inductores, en primer lugar presentaron una respuesta inmediata, dando lugar a la expresión de dos bandas de 105 y 108 kDa a los 30

## **Discusión**

segundos de incubación, como ocurrió cuando se estimularon los hemocitos con LPS o PDGF. Posteriormente la respuesta tiende a regularizarse apareciendo expresada únicamente una banda de 105 kDa. Finalmente, se produce una respuesta tardía que en el caso de la estimulación con PDGF se produjo a los 30 minutos de incubación con el inductor, detectándose de nuevo dos bandas de 105 y 108 kDa.

En el caso de estimulaciones con IL-2 y LPS tras 60 minutos de estimulación la doble banda no se detectó probablemente debido a una down-regulation. Se ensayaron diferentes concentraciones de IL-2 y se observó que la mejor respuesta se obtenía para la misma concentración de IL-2 con la que Novás, (2005) había obtenido una mayor producción de NO (0,1 µg/ml) por los hemocitos, mientras que Cao et al., (2002) observó que la mayor producción de adrenalina y noradrenalina se producía para una concentración diez veces más baja (0,01 µg/ml). En este trabajo, también se observó una buena respuesta para la concentración de IL-2 más pequeña de las ensayadas ( $2,5 \times 10^{-4}$  µg/ml).

Parece que los hemocitos tendrían al menos dos sitios de unión para la IL-2. Uno de estos lugares tendría una afinidad por la IL-2 muy elevada y el otro una afinidad menor. De este modo, una exposición a IL-2 durante un tiempo prolongado implicaría el reconocimiento del inductor por ambos sitios de unión, como ocurriría también al emplear altas concentraciones del inductor; mientras que la exposición de los hemocitos frente a la IL-2 durante un tiempo limitado supondría que el inductor tan solo podría unirse al lugar de mayor afinidad, al igual que ocurre cuando se utilizan bajas concentraciones de IL-2.

Por otra parte en las inmunodetecciones realizadas con el anticuerpo anti p60, (Resultados, figuras 4.38 a 4.41) se observó una expresión bastante compleja para los diferentes inductores empleados. Cuando los hemocitos se incubaron con IL-2 (0,01 µg/ml) en la fracción citosólica se observó la presencia de una única banda de 60 kDa cuya intensidad aumentó progresivamente desde el minuto 1 de incubación hasta el minuto 45; a los 60 minutos se produjo un descenso en la intensidad de la proteína. Por tanto, cuando los hemocitos se estimulan durante 60 minutos con IL-2 se produce una depleción de **p60** en la fracción citosólica, pasando a detectarse únicamente en la fracción de membrana. En cambio, para la fracción de membrana el aumento en la intensidad fue progresivo desde el minuto 1 hasta el minuto 5, a partir de aquí la intensidad disminuye y cuando se alcanzan tiempos de incubación mayores (45 y 60 minutos) la intensidad de la banda se mantiene constante (Figura 4.38).

Cuando se realizaron inmunodetecciones con anti p60 en hemocitos estimulados con IL-2 durante 24 horas no se apreciaron cambios en la expresión de la enzima en la fracción citosólica.

En la fracción de membrana podemos destacar la presencia de un aumento importante en la banda detectada para una concentración de IL-2 de 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que para las concentraciones con las que previamente Novás et al., (2005) y Cao et al., (2002) habían obtenido una mayor producción de NO y una mayor síntesis de catecolaminas no se observan cambios con respecto al control (Figura 4.39).

En las inmunodetecciones realizadas con anti p60 para hemocitos incubados con LPS la respuesta obtenida es bastante compleja. Así, en la fracción citosólica inicialmente no se observan cambios, entre los 3 y los 15 minutos de incubación se produce un descenso en la intensidad de la banda detectada y a partir del minuto 30 de incubación la intensidad aumenta llegando a superar los niveles de intensidad iniciales.

En la fracción de membrana para periodos de incubación cortos se observa un aumento de la intensidad de la banda con respecto al control, mientras que a partir de los 5 minutos la intensidad de la banda detectada es bastante menor (Figura 4.40). Posiblemente a partir de los 3 minutos de estimulación con LPS se produzca una down regulation de la enzima, que produzca una disminución de p60 en la membrana y su aumento en la fracción citosólica.

Con respecto a los hemocitos incubados con PDGF, las inmunodetecciones con anti p60 no reflejaron cambios en la expresión de la banda de 60 kDa para la fracción citosólica. En la membrana en cambio se observó un aumento de la intensidad para las incubaciones de 30 y 60 minutos (Figura 4.41).

Además, tampoco se encontraron diferencias en el estado de fosforilación de las bandas de 105 y 108 kDa al realizar las inmunodetecciones con el anticuerpo anti P-Serina tras estimular los hemocitos con los diferentes inductores ensayados (Figuras 4.42). Se detectaron fosforilaciones en los residuos de serina de las proteínas estudiadas para todas las condiciones ensayadas. La banda de 105 kDa aparece prácticamente en todos los ensayos realizados con los distintos inductores (IL-2, PDGF, LPS) tanto en citosol como en membrana con el anticuerpo anti p105, mientras que en la fracción de membrana en algunos casos la banda de 108 kDa no se detecta. Además la banda de 105 kDa aparece en todos los pasos de purificación al igual que ocurría en los resultados de Mercado (2001) y sin embargo la banda de 108 kDa en la cromatografía con HTP no aparece. Modificaciones post-traduccionales de residuos Ser/Thr por fosforilación han sido reconocidas como un importante mecanismo modulador de la actividad de la PKC (Robles-Flores et al., 2008; Shirai y Saito, 2002; Parekh et al., 2000; Hansra et al., 1999). Las modificaciones pueden ser diferentes para cada isoenzima de PKC. Se ha visto que la proteína quinasa C es fosforilada "in vivo" en tres posiciones del núcleo quinasa, tanto en extractos de tejido de mamíferos como en células de

## **Discusión**

insectos (Tsutakawa et al., 1995; Keranen et al., 1995). En la proteína quinasa C  $\beta$ II, estos residuos corresponden a la Thr 500 en el asa de activación, Thr 641 y Ser 660 en el carboxilo terminal (Newton, 1997), mientras que para PKC  $\delta$  de rata los residuos homólogos serían Thr 505, Ser 643 y Ser 662 (Welman et al., 2007). Cada residuo fosforilable tiene su análogo en otras proteínas quinasas: Thr 500 se alinea con el residuo fosforilable del asa de activación encontrada en proteínas quinasas (como por ejemplo Thr 197 en la PKA (Taylor y Radzio-Andzelm, 1994), Thr 641 tiene su sitio análogo en la PKA (Ser 338) (Yonemoto et al., 1997), y Ser 660 es parte del motivo hidrofóbico de fosforilación presente en quinasas como la S6-quinasa y la proteína quinasa B (Akt quinasa) las cuales poseen la secuencia consenso FXXF (S/T) (F/Y) (Pearson et al., 1995; Alessi et al., 1995).

Específicamente, la enzima es primero fosforilada en el asa de activación por otra quinasa (PDK-1), seguida de dos autofosforilaciones ordenadas en el carboxilo terminal, una en el motivo cambio y la segunda en el conservado motivo de fosforilación hidrofóbico (Shirai y Saito, 2002; Newton, 2003). Tales proteínas contienen un segmento cerca del sitio activo que puede ser fosforilado para ordenar los residuos correctamente para la catálisis. Aunque algunas quinasas (ejemplo: PKA) son capaces de activarse libremente por autofosforilación en el asa de activación (Yonemoto et al., 1993), la mayor parte de las quinasas dependen de la fosforilación del asa de activación por otra quinasa (Yonemoto et al., 1993). La fosforilación realizada por la PDK-1 iniciaría la cascada de fosforilaciones de la PKC (Newton, 1997).

Seguidamente a la fosforilación en el asa de activación, la proteína quinasa C comienza a fosforilarse en la Thr 641. La fosforilación aparentemente bloquea la PKC en una conformación catalíticamente competente tal vez por anclaje del carboxilo terminal fuera del sitio activo. La tercera fosforilación "in vivo" ocurre en la Ser 660 y al igual que la anterior es una reacción de autofosforilación (Keranen et al., 1995). Esta fosforilación final se correlaciona con la liberación de la PKC en el citosol, por lo que tiene una implicación directa en la localización subcelular de la PKC. Las dos reacciones de autofosforilación en el carboxilo terminal aparentemente son desencadenadas por la fosforilación en el asa de activación (Newton, 1997).

Análisis de espectrometría de masas, junto con análisis de fosforilación en sitios mutantes y el uso de anticuerpos fosfo-específicos, ha permitido establecer que las bandas que migran más rápido representan a la PKC no fosforilada o fosforilada exclusivamente en el asa de activación (en nuestro caso sería la banda de 105 kDa), en ocasiones aparece una banda intermedia que representa a la proteína fosforilada en la Thr 641 pero no en Ser 660, y las especies que migraron menos representan a la enzima madura, es decir, fosforilada en ambos residuos del extremo carboxilo terminal, Thr 641 y Ser 660 (Keranen et al., 1995; Edwards y Newton, 1997; Edwards et



al., 1999), como ocurre con la banda de 108 kDa. Aproximadamente la mitad de las especies maduras están fosforiladas en el asa de activación Thr 500, una modificación que no afecta a la movilidad electroforética de la enzima (Keränen et al., 1995).

Mercado, (2001) había obtenido la expresión de una única banda de 105 kDa para la enzima **p105** tras su paso por la columna de HTP así como para las incubaciones realizadas con el anticuerpo anti P-serina. Por ello afirmaba que p105 era capaz de autofosforilarse en residuos Ser. Además creía que la banda de 108 kDa correspondería a la forma no fosforilada de la enzima, puesto que no había encontrado fosforilaciones en Ser en las inmunodetecciones realizadas con el anticuerpo anti P-Serina. Por ello, creía que la presencia de esta banda de 108 kDa se debería probablemente a una defosforilación de la banda de 105 kDa.

En cambio, los resultados obtenidos con el anticuerpo anti P-serina en el presente trabajo son contrarios a los obtenidos por Mercado, 2001 pero coincidentes con los obtenidos en trabajos realizados por otros investigadores (Keränen et al., 1995; Edwards y Newton, 1997; Shirai y Saito, 2002; Parekh et al., 2000; Hansra et al., 1999; Newton, 1997; Edwards et al., 1999). Por tanto, la banda de 105 kDa correspondería a la fracción de la población de enzima que estaría defosforilada o fosforilada exclusivamente en el asa de activación. Por otro lado, la banda de 108 kDa correspondería a las especies de esta enzima que se encuentran fosforiladas en ambos residuos del extremo carboxilo terminal y en un 50% de los casos fosforiladas también en el asa de activación.

Con respecto a **p60**, se detectaron fosforilaciones a nivel de residuos de serina en las incubaciones realizadas con los distintos inductores y no se observaron diferencias en el grado de fosforilación.

En cuanto a la distribución tisular de **p105**, ésta se encontró en todos los tejidos estudiados, tanto en la fracción citosólica como en la fracción de membrana. Se observó que **p105** es mayoritaria en la fracción citosólica (Mercado, 2001).

**p60**, al igual que **p105** también se encontró en todos los tejidos estudiados. Sin embargo en la fracción de membrana de músculo aductor posterior (PAM) **p60** no fue detectada y en el músculo del pie su expresión fue menor a la de otros tejidos (Figuras 4.43 y 4.44). Al igual que para **p105** (Mercado, 2001), la presencia de **p60** fue mayoritaria en la fracción citosólica (Figuras 4.43 y 4.44), y en esta fracción prácticamente no hay diferencias de expresión entre los diferentes tejidos estudiados. En la fracción de membrana, **p60** fue mayoritaria en manto y branquias. También podemos subrayar que en el caso de los hemocitos, la banda de 60 kDa detectada fue más intensa

## **Discusión**

en el citosol que en la membrana, y que las bandas son más tenues que en el resto de tejidos estudiados.

Como última aproximación a la caracterización de las enzimas, se estableció otro parámetro de comparación, que fue el estudio de la respuesta de **p105** y **p60** a ésteres de forbol.

Para ello se trabajó con un modelo celular aislado del propio mejillón, los hemocitos, los efectores celulares de la inmunidad en invertebrados, con funciones primitivas, tales como la fagocitosis o el ataque lítico u oxidativo ante patógenos (Hendengren et al., 1999; Lee et al., 2000; Mercado et al., 2002).

PMA es una molécula capaz de unirse a las PKCs, de una manera prácticamente selectiva, e inducir la translocación de la enzima (Castagna et al., 1982; Sharkey et al., 1984; Ron y Kazanietz, 1999).

Al observar el patrón electroforético de hemocitos estimulados con PMA se observa la expresión de múltiples bandas de proteínas en la fracción citosólica, siendo tres bandas con pesos de 66, 60 y 48 kDa respectivamente las que presentaron una expresión más notoria tanto en el citosol como en la membrana. En la fracción de membrana las bandas de 60 y 48 kDa aparecen con una intensidad muy tenue (Figuras 4.45 y 4.46). Una vez comprobado el patrón de distribución electroforética de hemocitos estimulados con PMA se procedió a estudiar la respuesta que presentaban frente a los anticuerpos anti p105 y anti p60 obtenidos para las dos proteínas purificadas.

En hemocitos del molusco bivalvo *M. galloprovincialis* estimulados con PMA, la proteína **p105** aparece para todas las condiciones ensayadas en la fracción citosólica, mientras que en la fracción de membrana su expresión disminuye o incluso llega a desaparecer cuando se incrementa el tiempo de incubación o la concentración de PMA (Figuras 4.47 y 4.48). Por tanto en la membrana, cuando los hemocitos se estimulan con PMA 160 nM durante 60 minutos posiblemente se produzca una regulación por degradación o down regulation de **p105**, resultado similar al encontrado por Mercado, (2001) para incubaciones de PMA 80 nM durante 60 minutos y también es un proceso común en células de mamíferos (Liu, 1996). En monocitos humanos, tras 30 minutos de estimulación con PMA 1 nM, la situación se invierte, PKC  $\delta$  aparece mayoritariamente en el citosol (Kontny et al., 2000), al igual que ocurre con **p60** a los 30 minutos en hemocitos estimulados con PMA 160 nM (Figura 4.49). En hemocitos estimulados con PMA, la proteína **p60** se transloca a la membrana plasmática, tal como ocurre con las PKCs en células de mamíferos. En monocitos humanos, PKC  $\alpha$ , PKC  $\beta$ II y PKC  $\delta$  aparecen translocadas a la membrana plasmática, a los 15

minutos de estimulación con PMA 1 nM (Konny et al., 2000), tal como ocurre con **p60** (Figura 4.49).



# Conclusiones

*Si tenemos conclusiones probablemente tenemos algo que decir. Por tanto, debemos empezar la escritura de un artículo por las conclusiones.*



The composite image consists of four distinct parts. On the left is a two-panel cartoon. The first panel, titled 'THE SCIENTIFIC METHOD', shows a scientist in a lab coat looking at a beaker and asking, 'HERE ARE THE FACTS. WHAT CONCLUSIONS CAN WE DRAW FROM THEM?'. The second panel, titled 'THE CREATIONIST METHOD', shows a man in a suit holding a book and asking, 'HERE'S THE CONCLUSION. WHAT FACTS CAN WE FIND TO SUPPORT IT?'. In the center is a piece of torn, textured paper with the word 'CONCLUSION' written on it. To the right of the paper is a black and white illustration of a man in a top hat sitting at a desk, writing. On the far right is a photograph of a stack of books, a black graduation cap, and a rolled-up diploma tied with a red ribbon.



- 1 A partir del manto del mejillón *Mytilus galloprovincialis* se han purificado dos proteínas; la primera con un peso aproximado de 60 kDa (**p60**), presenta actividad quinasa dependiente de fosfatidil L-serina, PMA y calcio. La segunda con un peso de 105 kDa (**p105**), presenta actividad quinasa dependiente de fosfatidil L-serina, PMA y es independiente de calcio.
- 2 De los diferentes sustratos ensayados, la protamina sulfato fue el péptido sustrato por el que la enzima **p60** mostró la mayor afinidad; sin embargo, el péptido (VRKRTLRL) fue el mejor sustrato en los ensayos de actividad enzimática puesto que presentó la mejor eficiencia catalítica ( $V_{m\acute{a}x}/K_m$ ). A diferencia de **p60**, el sustrato por el que la enzima **p105** mostró la mayor afinidad fue la MBP, aunque el mejor sustrato en los ensayos de actividad enzimática fue la protamina sulfato al presentar la mejor eficiencia catalítica.
- 3 Los tres inhibidores ensayados con la enzima **p60** de manto de mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk, Bisindolilmaleimida y estaurosporina (inhibidores con respecto a la unión a ATP) y curcumina (inhibidor con respecto a la unión de L- $\alpha$  fosfatidilserina) ejercieron una inhibición de tipo competitivo.
- 4 Tras estudiar la distribución tisular de **p60** hemos comprobado que la enzima está presente en la fracción citosólica de manto, branquias, hepatopáncreas, pie, músculo aductor y hemocitos de *Mytilus galloprovincialis*. Sin embargo en la fracción de membrana del músculo aductor posterior (PAM) **p60** no fue detectada y en el músculo del pie su expresión fue menor a la de otros tejidos. Parece que en la fracción de membrana **p60** se encuentra predominantemente en tejidos no musculares como el manto y las branquias, mientras que **p105** se encuentra mayoritariamente en las branquias y en el resto de tejidos se encuentra distribuida por igual.
- 5 En las inmunodetecciones con anti p105 se ha visto que al estimular los hemocitos con diferentes inductores, pueden presentar dos tipos de respuesta; una respuesta inmediata y otra más tardía. En las estimulaciones con IL-2 se ha comprobado que los hemocitos parecen poseer dos sitios de unión para la IL-2, uno con alta afinidad por el inductor y otro con baja afinidad.

## **Conclusiones**

- 6** En las inmunodetecciones con anti p60 la respuesta de los hemocitos frente a los distintos inductores empleados (IL-2, PDGF y LPS) conduce a cambios en la distribución de **p60** tanto en la fracción citosólica como de membrana.
- 7** Se ha comprobado que **p60** y **p105** presentan residuos fosforilables en P-Ser. Hemos probado que **p105** se fosforila en las dos bandas de 105 y 108 kDa.
- 8** La estimulación de hemocitos con PMA induce la translocación de **p60** a la membrana plasmática y se regula por degradación en función del tiempo de exposición.



# Bibliografía





- Adams, D.O. and Hamilton, T.A. (1984). The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2: 283-318.
- Ahmed, S., Kozma, R., Lee, J., Monfries, C., Harden, N. and Lim, L. (1991). The cysteine-rich domain of human proteins, neuronal chimaerin, protein kinase C and diacylglycerol kinase binds zinc. Evidence for the involvement of a zinc-dependent structure in phorbol ester binding. *Biochem. J.* 280: 233–241.
- Akimoto, K., Mizuno, K., Osada, S., Hirai, S., Tanuma, S., Suzuki, K., and Ohno, S. (1994). A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *J. Biol. Chem.* 269(17): 12677–12683.
- Akita, Y., Ohno, S., Yajima, Y., and Suzuki, K. (1990). Possible role of Ca<sup>2+</sup>-independent protein kinase C isozyme, nPKC epsilon, in thyrotropinreleasing hormone-stimulated signal transduction: differential downregulation of nPKC epsilon in GH4C1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 172(1): 184–189.
- Aktan, F. (2004). iNOS mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences.* 75: 639-653.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walters, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*; Fourth Edition. New York and London: *Garland Science*. ISBN 0-8153-3218-1.
- Alesi, D.R., Smythe, C. and Keyse, S.M. (1993). The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in *Xenopus* oocyte extracts. *Oncogene.* 8: 2015-2020.
- Alessi, D.R., Gomez, N., Moorhead, G., Lewis, T., Keyne, S.M. and Cohen, P. (1995). Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr. Biol.* 5: 283-295.
- Alkan, S.S., Rutschmann, S., Grogg, D. and Erb, P. (1993). Effects of a new protein kinase C inhibitor CGP41251 on T cell functions: inhibition of activation, growth and target cell killing. *Cell. Immunol.* 150: 137–148.
- Allen, L.H. y Aderem, A.A., (1995). A role for MARCKS, the  $\alpha$ -isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J. Exp. Med.* 182: 829–840.
- Alley, E.W., Murphy, W.J. and Russel, S.W. (1995). A classical enhancer element responsive to both lipopolysaccharide and interferon gamma augmente induction of the iNOS gene in mouse macrophages. *Gene.* 158: 247-251.
- Amadio, M., Battaini, F. and Pascale, A. (2006). The different facets of protein kinases C: old and new players in neuronal signal transduction pathways. *Pharmacol. Res.* 54: 317–325.
- Ananthanarayanan, B., Stahelin, R.V., Digman, M.A. and Cho, W. (2003). Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are determined by the ligand affinity and conformational flexibility of their C1 domains. *J. Biol. Chem.* 278(47): 46886–94.
- Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. and Yokota, T. (1990) Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 783-836.
- Arumugan, M., Romestamd, B., Torreilles, J. and Roch, P. (2000a). “*In vitro*” production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur. J. Cell. Biol.* 79: 513-519.

## **Bibliografía**

Arumugan, M., Romestamd, B. and Torreilles, J. (2000b). Nitrite released haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Cassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquat. Living. Resour.* 13: 173-177.

Asaoka, Y., Nakamura, S., Yoshida, K., and Nishizuka, Y. (1992). Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends Biochem. Sci.* 17: 414-417.

Azzi, A., Boscoboinik, D. and Hensey, C. (1992). The protein kinase C family. *Eur. J. Biochem.* 228: 547-557.

Bacher, N., Zisman, Y., Berent, E., and Livneh, E. (1991). Isolation and characterization of PKC eta, a new member of the protein kinase C-related gene family specifically expressed in lung, skin, and heart. *Mol. Cell Biol.* 11(1): 126-133.

Badovinac, V., Mostarica-Stojkovic, M., Dinarello, C.A. and Stosic-Grujicic, S. (1998). Interleukin-1 receptor antagonist suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in rats by influencing the activation and proliferation of encephalitogenic cells. *J. Neuroimmunol.* 85: 87-95.

Baier, G., Telford, D., Giampa, L., Coggeshall, K.M., Baier-Bitterlich, G., Isakov, N., and Altman, A. (1993). Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 268(7): 4997-5004.

Banci, L., Cavallaro, G., Kheifets, V. and Mochly-Rosen, D. (2002). Molecular dynamics characterization of the C2 domain of protein kinase Cbeta. *J. Biol. Chem.* 277(15): 12988-97.

Barcia, R. and Ramos-Martínez, J.I. (1992). Fructosa-1,6- bisphosphatase in mantle of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Lmk II*: regulation by its effectors. *Comp. Biochem. Physiol.* 1001B: 69-72.

Barcia, R. and Ramos-Martínez, J.I. (2008). Effects of interleukin-2 on nitric oxide production in molluscan innate immunity. *ISJ.* 5: 43-49.

Barcia, R., Cao, A., Arbeteta, J. and Ramos-Martinez, J.I. (1999). The IL-2 receptor in hemocytes of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* *Lmk*. *IUBMB Life.* 48: 419-423.

Barcia, R., López-García, J., Girardini, J. and Ramos-Martínez J.I. (1997). Identification of protein kinase C isoforms in marine mussels. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42: 1241-1248.

Bardales, J.R. (2008). Isoformas de la proteína quinasa dependiente de AMPc en el molusco bivalvo *Mytilus galloprovincialis*. Purificación, caracterización funcional y distribución tisular. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, España.

Barford, D. (1996). Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends. Biochem. Sci.* 21:407-412.

Bauchau, A.G. (1981). In: Invertebrate Blood Cells, volumen 2. *Academic Press*, New York. pp.385-420.

Bayne, C.J. (1990). Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *Biosci.* 40: 723-731.

Bazán-Tejeda, M.L., Argüello-García, R., Bermúdez-Cruz, R.M., Robles-Flores, M. and Ortega-Pierres, G. (2007). Protein kinase C isoforms from *Giardia duodenalis*: identification and functional characterization of a  $\beta$ -like molecule during encystment. *Arch. Microbiol.* 187: 55-66.

Bazzi, M.D. and Nelsestuen, G.L. (1987). Role of substrate in imparting calcium and phospholipid requirements to protein kinase C activation. *Biochemistry.* 26: 1974-1982.

- Bazzi, M.D. and Nelsestuen, G.L. (1993). Protein kinase C and annexins: unusual calcium response elements in the cell. *Cell Signal*. 5(4): 357–365.
- Beaumont, A.R. and Abdul-Martin, A.K.M. (1994). Differences in morphology, survival and size between self and cross fertilized larvae of *Mytilus galloprovincialis*. *J. Mar. Biol.* 74: 445-448.
- Becker, K.P. and Hannun, Y.A. (2005). Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signalling. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:1448-1461.
- Behn-Krappa, A. and Newton, A.C. (1999). The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation. *Curr. Biol.* 9:728–37.
- Berne, R.M. and Levy, M.N. (1998). Receptores de membrana, segundos mensajeros y vías de transducción de señal, en *Fisiología celular*, 2ª ed. pp. 59–73. Harcourt-Brace (Div. Interamericana), Madrid.
- Bichenkov, E. and Ellingson, J.S. (2001). Ethanol exerts different effects on myelin basic protein and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase expression in differentiating CG-4 oligodendrocytes. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 31: 128(1):9-16.
- Bichenkov, E. and Ellingson, J.S. (2002). Protein kinase C inhibitors counteract the ethanol effects on myelin basic protein expression in differentiating CG-4 oligodendrocytes. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 139(1): 29-38.
- Bittova, L., Stahelin, R.V. and Cho, W. (2001). Roles of ionic residues of the C1 domain in protein kinase C- $\alpha$  activation and the origin of phosphatidylserine specificity. *J. Biol. Chem.* 276: 4218–4226.
- Blach-Olszewska, Z. (2005). Innate immunity: cells, receptors and signaling pathways. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 53: 245-253.
- Blobe, G.C., Stribling, S., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (1996). Protein kinase C isoenzymes: regulation and function. *Cancer Surv.* 27:213–248.
- Bolen, E.J. and Sando, J.J. (1992). Effect of phospholipid unsaturation on protein kinase C activation. *Biochemistry.* 31:5945–5951.
- Bolsover, S., Gomez-Fernandez, J. and Corbalan-Garcia, S. (2003). Role of the Ca<sup>2+</sup>/phosphatidylserine binding region of the C2 domain in the translocation of protein kinase C $\alpha$  to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 278:10282–10290.
- Boni, L.T. and Rando, R.R. (1985). The nature of protein kinase C activation by physically defined phospholipid vesicles and diacylglycerols. *J. Biol. Chem.* 260:10819–10825.
- Bornancin, F. and Parker, P.J. (1997). Phosphorylation of protein kinase C- $\alpha$  on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state. *J. Biol. Chem.* 272: 3544-3549.
- Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., Delinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H. and Yancopoulos, D.G. (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell.* 65: 663-675.
- Braconi, S., Church, D.J., Vallotton, M.B. and Lang, U. (1992). Functional inhibition of protein kinase C-mediated effects in myocardial tissue is due to the phosphatase 2A. *Biochem. J.* 286: 851-855.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

## **Bibliografía**

- Bradham, C.A., Foltz, K.R., Beane, W.S., Armone, M.I., Rizzo, F., Coffman, J.A., Mushegian, A., Goel, M., Morales, J., Genevriere, A.M., Lapraz, F., Robertson, A.J., Kelkar, H., Loza-Coll, M., Townley, I.K., Raisch, M., Roux, M.M., Lepage, T., Gache, C., McClay, D.R. and Manning, G. (2006). The sea urchin kinome: A first look. *Dev. Biol.* 300: 180-193.
- Braha, O., Dale, N., Hochner, B., Klein, M., Abrams, T.W. and Kandel, E.R. (1990). Second messengers involved in the two processes of presynaptic facilitation that contribute to sensitization and dishabituation in *Aplysia* sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2040-2044.
- Brose, N. and Rosenmund, C. (2002). Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J. Cell Sci.* 115: 4399-4411.
- Brusca, R.C. and Brusca, G.J. (2005). *Filo Moluscos (Mollusca)* En: Invertebrados, 2ª Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, pp 757-833.
- Buchner, K., Otto, H., Hilbert, R., Lindschau, C., Haller, H. and Hucho F. (1992). Properties of protein kinase C associated with nuclear membranes. *Biochem. J.* 286: 369-375.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L. and Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects: Structures and function. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 329-344.
- Bunch, R.T. and Eastman, A. (1996). Enhancement of cisplatin-induced cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01), a new G2-checkpoint inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2: 791-7.
- Burns, D.J. and Bell, R.M. (1991). Protein Kinase C contains two phorbol ester binding domains. *J. Biol. Chem.* 266: 18330-18338.
- Burns, D.J., Bloomenthal, J., Lee, M.H., and Bell, R.M. (1990). Expression of the alpha, beta II, and gamma protein kinase C isozymes in the baculovirusinsect cell expression system. Purification and characterization of the individual isoforms. *J. Biol. Chem.* 265(20): 12044-12051.
- Cabell, L. and Audesirk, G. (1993). Effects of selective inhibition of protein kinase C, cyclic AMP-dependent protein kinase, and Ca<sup>(2+)</sup>-calmodulin-dependent protein kinase on neurite development in cultured rat hippocampal neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 11: 357-368.
- Caenepeel, S., Charydczak, G., Sudarsanam, S., Hunter, T. and Manning, G. (2004). The mouse kinome: discover and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 11707-11712.
- Cao, A. (2002). Tesis: Aportaciones al estudio de la respuesta inmune en hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Veterinaria. Campus de Lugo.
- Cao, A., Mercado, L.A., Ramos, J.I. and Barcia, R. (2003). The primary cultures of hemocytes from the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: The expression of the IL-2R $\alpha$  subunit. *Aquaculture* 216: 1-8.
- Cao, A., Ramos-Martínez, J.I. and Barcia, R. (2004a). Implication of PKA and PKC in the activation of the haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk by LPS and IL-2. *Mol. Immunol.* 41(1): 45-52.
- Cao, A., Ramos-Martínez, J.I. and Barcia, R. (2004b). "In vitro" effects of LPS, IL-2, PDGF and CRF on haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Fish Shellfish Immunol.* 16(2): 215-25.

- Cao, A., Ramos-Martínez, J.I. and Barcia, R. (2007a). In hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk., treatment with corticotropin or growth factors conditions catecholamine release. *Int. Immunopharmacol.* 11: 1395-402.
- Cao, A., Novás, A., Ramos-Martínez J.I. and Barcia, R. (2007b). Seasonal variations in haemocyte response in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Aquaculture.* 263: 310-319.
- Cao, J., Fernández M. and Villamarín J.A. (1998). A methods for the purification of cAMP-dependent protein kinase using immunoaffinity chromatography. *Prot. Express. Purif.* 14: 418-424.
- Cao, J., Ramos-Martínez, J. and Villamarín, J.A. (1995). Characterization of a cAMP-binding protein from the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.* 232: 664-670.
- Carballal, M.J., López, M.C., Azevedo, C. and Villalba, A. (1997). Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.* 29: 127-135.
- Carrasco, S. and Merida, I. (2004). Diacylglycerol-dependent binding recruits PKC theta and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes. *Mol. Biol. Cell.* 15: 2932-2942.
- Carter, C.A. and Kane, C.J.M. (2004). Therapeutic potential of natural compounds that regulate the activity of protein kinase C. *Curr. Med. Chem.* 11: 2883-2902.
- Carton, Y. and Nappi, A.J. (1997). *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitol. Today* 13:218-227.
- Casabona, G. (1997) Intracellular signal modulation: a pivotal role for protein kinase C. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 21(3): 407-425.
- Castagna, M., Takai, Y.K., Kalbuchi, K., Sano, U., Kikkawa, U. and Nishizuka Y. (1982). Direct activation of calcium activated phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257: 7847-7851.
- Castrillo, A., Pennington, D.J., Otto, F., Parker, P.J., Owen, M.J. and Boscá, L. (2001). Protein kinase C is required for macrophage activation and defence against bacterial infection. *J. Exp. Med.* 194: 1231-1242.
- Cataldi, A., Miscla, S., Lislo, R., Rana, R. and Cocco, L. (1990). Transient shift of diacylglycerol and inositol lipids induced by interferon in Daudi cells. *FEBS Lett.* 269: 465-468.
- Cazaubon, S., Bornancin, F., and Parker, P.J. (1994). Threonine-497 is a critical site for permissive activation of protein kinase C alpha. *Biochem. J.* 301(Pt 2): 443-448.
- Cazaubon, S.M. and Parker, P.J. (1993). Identification of the phosphorylated region responsible for the permissive activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 268(23): 17559-17563.
- Celada, A. and Nathan, C. (1993). Macrophage activation revisited. *Immunol. Today.* 15: 100-102.
- Chakravarthy, B.R., Bussey, A., Whitfield, J.F., Sikorska, M., Williams, R.E, Durkin, I.P. (1991). The direct measurement of protein kinase C (PKC) activity in isolated membranes using a selective peptide substrate. *Anal. Biochem.* 196(1):144-50.
- Chang, J., Xu, Y., Raychowdhury, M. and Ware, J. (1993). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a novel isoenzyme of protein kinase c (nPKC). A new member of the nPKC family expressed in skeletal muscle, megakaryoblastic cells, and platelets. *J. Biol. Chem.* 268: 14208-14214.

## **Bibliografia**

- Charles, C.H., Sun, H., Lau, L.F. and Tonks, N.K. (1993). The growth factor-inducible immediate-early gene 3CH 134 encodes a protein-tyrosine-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 5292-5296. *Chemistry.* 268(5): 3715–3719.
- Chauhan, V., Chauhan, A., Deshumkh, D. and Brockerhoff, H. (1990). Lipid activators of protein kinase C. *Life Sci.* 47: 981-986.
- Chen, C.C. (1993). Protein kinase C alpha, delta, epsilon and zeta in C6 glioma cells. TPA induces translocation and down-regulation of conventional and new PKC isoforms but not atypical PKC zeta. *FEBS Letters.* 332(1-2): 169–173.
- Chen, K.H., Peng, Z.G., Lavu, S. and Kung, H.F. (1988). Molecular cloning and sequence analysis of two distinct types of *Xenopus laevis* protein kinase C. *Sec. Mess. Phosphoprot. Res.* 12: 251-260.
- Chen, Z.T., Li, S.L., Cai, E.Q., Wu, W.L., Jin, J.S. and Zhu, B. (2003). LPS induces pulmonary intravascular macrophages producing inflammatory mediators via activating NF-kappaB. *J. Cell Biochem.* 89: 1206-1214.
- Cheng, J.J., Wung, B-S., Chao, Y.J. and Wang, D.L. (2001). Sequential activation of protein kinase C (PKC  $\alpha$  and PKC  $\epsilon$ ) contributes to sustained RafERK1/2 activation in endothelial cells under mechanical strain. *J. Biol. Chem.* 276: 31368-31375.
- Cheng, T.C. (1981). Bivalves. En: *Invertebrate Blood Cells* (Eds. Ratcliffe, N.A. and Rowley, A.F.), pp. 231-300. *Academic Press, Londres.*
- Cheng, T.C. (1984). A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences. En: *Comparative Pathobiology, Invertebrate Blood Cells and Serum Factors*, vol. 6 :(Ed. Cheng, T.C.) pp. 111-146. *Plenum, New York.*
- Chiou, S.H., Raynor, R.L., Zheng, B., Chambers, T.C. and Kuo, J.F. (1993). Cobra venom cardiotoxin (cytotoxin) isoforms and neurotoxin: comparative potency of protein kinase C inhibition and cancer cell cytotoxicity and modes of enzyme inhibition. *Biochemistry.* 32: 2062-2067.
- Choi, H., Chun, Y-S., Kim, S-W., Kim, M-S. and Park, J-W. (2006). Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: A mechanism of tumor growth inhibition. *Mol. Pharmacol.* 70: 1664–1671.
- Choi, H.J., Park, S.Y. and Hwang, O. (1999). Differential involvement of PKA and PKC in regulation of catecholamine enzyme genes by PACAP. *Peptides.* 20: 817–822.
- Choi, K.W., Smith, R.F., Buratowski, R.M. and Quinn W.G. (1991). Deficient protein kinase C activity in turnip, a *Drosophila* learning mutant. *J. Biol. Chem.* 266: 15999-16006.
- Chou, M.M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L.K., Lee, M.H., Chen, C.S., Newton, A.C., Schaffhausen, B.S., and Toker, A. (1998). Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.* 8(19): 1069–1077.
- Chou, W.H. and Messing, R.O. (2005). Protein kinase C isozymes in stroke. *Trends. Cardiovasc. Med.* 15(2): 47-51.
- Chun, Y., Solski, P.A., Khosravi-Far, R., Der, C.J. and Kelly, K. (1996). The mitogenactivated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1 and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity “*in vivo*” toward the ERK 2 seenmarker mutation. *J. Biol. Chem.* 271: 6497-6500.
- Chyczewska, E. and Mroz, R.M. (1997). Cytokines and cancer. *Rocz. Akad. Med. Białymst.* 42: 8-22.



- Clarke, E.A., Brugge, J.S., (1995). Integrins and signal-transduction pathways – the road taken. *Science*. 268: 233–239.
- Coghlan, M., Chou, M. and Carpenter, C. (2000). Atypical protein kinase C lambda and zeta associate with the GTP-binding protein Cdc42 and mediate stress fiber loss. *Mol. Cell. Biol.* 20: 2880-2889.
- Cogolludo, A., Moreno, L., Lodi, F., Tamargo, J. and Perez-Vizcaino, F. (2005). Postnatal maturational shift from PKC zeta and voltage-gated K<sup>+</sup> channels to RhoA/Rho kinase in pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc. Res.* 66(1): 84–93.
- Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58:453-508.
- Colón-González, F. and Kazaniet, M.G. (2006). C1 domains exposed: From diacylglycerol binding to protein–protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 827–837.
- Conesa-Zamora, P. Gómez-Fernández, J. and Corbalán-García, S. (2000). The C2 domain of protein kinase Calpha is directly involved in the diacylglycerol-dependent binding of the C1 domain to the membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1487: 246–254.
- Conesa-Zamora, P., Lopez-Andreo, M., Gomez-Fernandez, J. and Corbalan-Garcia, S. (2001). Identification of the phosphatidylserine binding site in the C2 domain that is important for PKC alpha activation and “*in vivo*” cell localization. *Biochemistry.* 40: 13898–13905.
- Conn, P.J., Strong, J.A., Azhdertian, E.M., Nairn, A.C., Greengard, P. and Kaczmarek, L.K. (1989). Protein kinase inhibitors selectively block phorbol ester -or forskolin- induced changes in excitability of *Aplysia* neurons. *J. Neuroscience.* 9: 473-479.
- Conte, A. and Ottaviani, E. (1995). Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. *FEBS. Lett.* 365: 120-124.
- Corbalán-García, S. and Gómez-Fernández, J. (2006). Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 633-654.
- Corbalán-García, S., García-García, J., Rodríguez-Alfaro, J.A. and Gómez-Fernández, J.C. (2003). A new phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding site located in the C2 domain of protein kinase Calpha. *J. Biol. Chem.* 278(7): 4972–80.
- Corbalán-García, S., Rodríguez-Alfaro, J. and Gómez-Fernández, J. (1999). Determination of the calcium-binding sites of the C2 domain of protein kinase Calpha that are critical for its translocation to the plasma membrane. *Biochem. J.* 337: 387–395.
- Csukai, M. and Mochly-Rosen, D. (1999). Pharmacologic modulation of protein kinase C isozymes: the role of RACKS and subcellular localisation. *Pharmacol. Res.* 39: 253-259.
- Cunningham, B.A., Tsujita, T. and Brockman, H.L. (1989). Enzymatic and physical characterization of diacylglycerol–phosphatidylcholine interactions in bilayers and monolayers. *Biochemistry.* 28: 32–40.
- Das, S. and Rand, R.P. (1986) Modification by diacylglycerol of the structure and interaction of various phospholipid bilayer membranes. *Biochemistry.* 25: 2882–2889.
- Davidson, L.A., Jiang, Y.H., Derr, J.N., Aukema, H.M., Lupton, J.R., and Chapkin, R.S. (1994). Protein kinase C isoforms in human and rat colonic mucosa. *Arch. Biochem. Biophys.* 312: 547–553.

## **Bibliografía**

- Dekker, L.V. and Parker, P.J. (1994). Protein Kinase C-a question of specificity. *Trends. Biochem. Sci.* 19: 73-77.
- Dekker, L.V., Parker, P.J. and McIntyre, P. (1992). Biochemical properties of rat protein kinase C- $\epsilon$  expressed in COS cells. *FEBS Lett.* 312: 195-199.
- Dempsey E.C., Newton A.C., Mochly-Rosen D., Fields A.P., Reyland M.E., Insel P.A. and Messing R.O. (2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol.* 279: L429-L438.
- DeVries, T.A., Neville, M.C. and Reyland, M.E. (2002). Nuclear import of PKC delta is required for apoptosis: identification of a novel nuclear import sequence. *Embo. J.* 21(22): 6050-60.
- Dhanasekaran, N. and Premkumar, R.E. (1998). Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene.* 17: 1447-1455.
- Díaz-Enrich, M.J., Villamarín, J., Ramos-Martínez, J. and Ibarguren, I. (2000). Measurement of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Anal. Biochem.* 285: 105-112.
- Díaz-Enrich, M.J., Ibarguren, I., Rodríguez, J., Villamarín, J., Barcia, R. and Ramos-Martínez, J. (1998). The regulation of the fructosa-6-phosphate fructosa-1,6-bisphosphate cycle in marine mussel. Effects of environmental hypoxia. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 4: 247-254.
- Dibble, A.R., Hinderliter, A.K., Sando, J.J. and Biltonen, R.L. (1996). Lipid lateral heterogeneity in phosphatidylcholine/phosphatidylserine/diacylglycerol vesicles and its influence on protein kinase C activation. *Biophys. J.* 71: 1877-1890.
- Disatnik, M.H., Buraggi, G., and Mochly-Rosen, D. (1994). Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp. Cell Res.* 210(2): 287-297.
- Dixon, M. and Webb, E. (1979). Enzyme inhibition and activation. In "The Enzymes". Longman group Limited. Academic Press. Inc. New York. pp: 332-467.
- Dmitriev, B.A., Ehlers, S. and Rietschel, E.T. (1999). Layered murein revisited: a fundamentally new concept of bacterial cell wall structure. Biogenesis and function. *Med. Microbiol. Immunol.* (berl) 187: 173-181.
- Domínguez, I., Díaz-Meco, M.T., Municio, M.M., Berra, E., García de Herreros, A., Cornet, M.E., Sanz, L. and Moscat, J. (1992). Evidence for a role of a protein kinase C  $\zeta$  subspecies in maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Molec. Cell. Biol.* 12: 3776-3783.
- Dong L., Stevens J.L., and Jaken S. (1993). Transformation-sensitive localization of alpha-protein kinase C at cell-cell contacts in rat renal proximal tubule epithelial cells. *Cell. Growth. Differ.* 4(10): 793-798.
- Dorn, G.W. second, and Mochly-Rosen, D. (2002). Intracellular transport mechanisms of signal transducers. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 407-429.
- Ducher, L., Croquet, F., Gil, S., Davy, J., Feger, J., and Brehier, A. (1995). Differential expression of five protein kinase C isoenzymes in FAO and HepG2 hepatoma cell lines compared with normal rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 217(2): 546-553.
- Durán, C., Acuña, R. and Santiago, J. (1990). El Mejillón. Biología, Cultivo and Comercialización. Centro de Investigaciones Submarinas (CIS) Fundación Caixa Galicia.

- Duronio, V., Nip, L., and Pelech, S.L. (1989). Interleukin- 3 stimulates phosphatidylcholine turnover in a mast/megakaryocyte cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 804-808.
- Dutil, E.M. and Newton, A.C. (2000). Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 275: 10697-701.
- Dutil, E.M., Toker, A., and Newton, A.C. (1998). Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr. Biol.* 8(25): 1366–1375.
- Dykes, A.C., Fultz, M.E., Norton, M.L. and Wright, G.L. (2003). Microtubule-dependent PKC alpha localization in A7r5 smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 285(1): C76–87.
- Dyrynda, E.A., Pipe, R.K. and Ratcliffe, N.A. (1997). Sub-populations of haemocyte in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal antibodies. *Cell. Tissue. Res.* 289: 527-536.
- Edwards, A.S. Faux, M.C., Scott, J.D. and Newton, A.C. (1999). Carboxyl-terminal phosphorylation regulates the function and subcellular localization of protein kinase C- $\beta$ II. *J. Biol. Chem.* 274: 6461-6468.
- Edwards, A.S. and Newton, A.C. (1997). Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 272(29): 18382–90.
- Egan, M.E., Glockner-Pagel, J., Ambrose, C., Cahill, P.A., Pappoe, L., Balamuth, N., Cho, E., Canny, S., Wagner, C.A., Geibel, J. and Caplan, M.J. (2002). Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of Delta F508-CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells. *Nat. Med.* 8: 485–492.
- Egan, M.E., Pearson, M., Weiner, S.A., Rajendran, V., Rubin, D., Glockner-Pagel, J. Cho, E., Canny, S., Wagner, C.A., Geibel, J. and Caplan, M.J. (2004). Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science.* 304: 600–602.
- Eisen, J.A., Coyne, R.S., Wu, M., Wu, D., Thiagarajan, M., Wortman, J.R., Badger, J.H., Ren, Q., Amedeo, P., Jones, K.M., Tallon, L.J., Delcher, A.L., Salzberg, S.L., Silva, J.C., Haas, B.J., Majoros, W.H., Farzad, M., Carlton, J.M., Smith, R.K. Jr., Garg, J., Pearlman, R.E., Karrer, K.M., Sun, L., Manning, G., Elde, N.C., Turkewitz, A.P., Asai, D.J., Wilkes, D.E., Wang, Y., Cai, H., Collins, K., Stewart, B.A., Lee, S.R., Wilamowska, K., Weinberg, Z., Ruzzo, W.L., Wloga, D., Gaertig, J., Frankel, J., Tsao, C.C., Gorovsky, M.A., Keeling, P.J., Waller, R.F., Patron, N.J., Cherry, J.M., Stover, N.A., Krieger, C.J., del Toro, C., Ryder, H.F., Williamson, S.C., Barbeau, R.A., Hamilton, E.P. and Orias, E. (2006). Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS. Biol.* 4(9): e286.
- Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W.W., Kamen, R., and Weichselbaum, R. (1995). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J.* 14(24): 6148–6156.
- Endo, K., Oki, E., Biedermann, V., Kojima, H., Yoshida, K., Johannes, F.J., Kufe, D., and Datta, R. (2000). Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C micro by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta - D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents. *J. Biol. Chem.* 275(24): 18476–18481.
- Engstrom, Y. (1999). Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophila*. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 345-358.
- Epand, R.M. (1985). Diacylglycerols, lysolecithin, or hydrocarbons markedly alter the bilayer to hexagonal phase transition temperature of phosphatidylethanolamines. *Biochemistry.* 24: 7092–7095.

## **Bibliografía**

- Epand, R.M. (1987). The relationship between the effects of drugs on bilayer stability and on protein kinase C activity. *Chem. Biol. Interact.* 63: 239–247.
- Eun, J.S., Suh, Y.H., Kim, D.K. and Jeon, H. (2000). Regulation of cytokine production by exogenous nitric oxide in murine splenocyte and peritoneal macrophage. *Arch. Pharm. Res.* 23: 531-534.
- Evcimen, N.D. and King, G.L. (2007). The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol. Res.* 55: 498–510.
- Fauman, E.B. and Saper, M.A. (1996). Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends. Biochem. Sci.* 21: 413-417.
- Feng, S.Y., Fene, J.S. and Yasmasn, T. (1977). Roles of *Mytilus coruscus* and *Crassostrea gigas* blood cells in defense and nutrition. *Comp. Pathobiol.* 3: 31-61.
- Feng, X., Becker, K.P., Stribling, S.D., Peters, K.G. and Hannun, Y.A. (2000). Regulation of receptor-mediated protein kinase C membrane trafficking by autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275: 17024-17034.
- Fernández, M., Cao, J. and Villamarín, J.A. (1994). “*In vivo*” phosphorylation of phosphofructokinase from the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 353: 251-256.
- Fernández, M., Cao, J., Vázquez, M., Ramos-Martínez, J.I. and Villamarín, J. (1998). “*In vivo*” phosphorylation of phosphofructokinase from the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 353: 251-256.
- Ferret-Bernard, S., Saï, P. and Bach, J.M. (2004). “*In vitro*” induction of inhibitory macrophage differentiation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, stem cell factor and interferon-gamma from lineage phenotypes-negative c-kit-positive murine hematopoietic progenitor cells. *Immunol. Lett.* 91(2-3): 221-7.
- Fleming, W. (1878). Veber die Blutzellen der Acephlen und bermerkunges iiber cleren Blutbath. *Arch. Mikro. Anat.* 15: 243-252.
- Franceschi, C., Cossarizza, A., Monti, D. and Ottaviani, E. (1991). Cytotoxicity and immunocyte markers in cells from the fresh water snail *Planorbium corneum* (L) (Gastropoda pulmonata): implications for the evolution of natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 21: 489-493.
- Franchini, A., Conte, A. and Ottaviani, E. (1995). Nitric oxide: An ancestral immunocyte effector molecule. *Adv. Neuroimmunol.* 5: 463-478.
- Fraser, E.D. and Walsh, M.P. (1991). The major endogenous bovine brain protein kinase C inhibitor is a heat-labile protein. *FEBS Lett.* 294: 285-289.
- Freisewinkel, I., Riethmacher, D., and Stabel, S. (1991). Downregulation of protein kinase C-gamma is independent of a functional kinase domain. *FEBS Letters.* 280(2): 262–266.
- Friebel, B. and Renwantz, L. (1995). Application of density gradient centrifugation for separation of eosinophilic and basophilic haemocytes from *Mytilus edulis* and characterization of both cell groups. *Comp. Biochem. Physiol.* 112: 81-90.
- Fujihara, M., Conolly, N., Ito, N. and Suzuki, T. (1994). Properties of protein kinase C isoforms (beta II, epsilon and zeta) in a macrophage cell line (J774) and their role in LPS-induced nitric oxide production. *J. Immunol.* 152: 1898-1910.

- Fukuda, H., Irie, K., Nakahara A, Ohigashi H, Wender P.A. (1999). Solid-phase synthesis, mass spectrometric analysis of the zinc-folding, and phorbol ester-binding studies of the 116-mer peptide containing the tandem cysteine-rich C1 domains of protein kinase C gamma. *Bioorg. Med. Chem.* 7(6): 1213–21.
- Gao, T. and Newton, A.C. (2002). The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of hsp70 to protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 277: 31585-31592.
- Gao, T., Toker, A. and Newton, A.C. (2001). The carboxyl terminus of protein kinase C provides a switch to regulate its interaction with the phosphoinositidedependent kinase, PDK-1. *J. Biol. Chem.* 276(22): 19588–96.
- Garcia-Garcia, J., Corbalan-Garcia, S. and Gomez-Fernandez, J. (1999). Effect of calcium and phosphatidic acid binding on the C2 domain of PKC alpha as studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry.* 38: 9667–9675.
- Genot, E.M., Parker, P.J., and Cantrell, D.A. (1995). Analysis of the role of protein kinase C -alpha, epsilon, and -zeta in the T cell activation. *J. Biol. Chem.* 270: 9833-9839.
- Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R.V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W., and Kufe, D. (1996). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J. Exp. Med.* 184(6): 2399–2404.
- Gingrich, K.J. and Byrne, J.H. (1985). Stimulation of synaptic depression, posttetanic potentiation, and presynaptic facilitation of synaptic potentials from sensory neurons mediating the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 53: 652-669.
- Giorgione, J., Hysell, M., Harvey, D.F. and Newton, A.C. (2003). Contribution of the C1A and C1B domains to the membrane interaction of protein kinase C. *Biochemistry.* 42(38): 11194–202.
- Glinski, Z. and Jarosz, J. (1997) Molluscan immune defenses. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warz)* 45: 149-155.
- Go, M., Sekiguchi, K., Nomura, H., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1987). Further studies on the specificity of diacylglycerol for protein kinase C activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144: 598–605.
- Gobert, A.P., Wilson, K.T. and Martin, C. (2005). Cellular responses to attaching and effacing bacteria: activation and implication of the innate immune system. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 53: 234-244.
- Goekjian, P.G. and Jirousek, M.R. (2001). Protein kinase C inhibitors as novel anticancer drugs. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 10: 2117– 40.
- Gokmen-Polar, Y. and Fields, A.P. (1998). Mapping of a molecular determinant for protein kinase C betall isozyme function. *J. Biol. Chem.* 273(32): 20261–6.
- Gold, M.G., Barford, D. and Komander, D. (2006). Lining the pockets of kinases and phosphatases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16: 693-701.
- Goldberg, E.M., Lester, D.S., Borchardt, D.B. and Zidovetzki, R. (1994). Effects of diacylglycerols and Ca<sup>2+</sup> on structure of phosphatidylcholine/phosphatidylserine bilayers. *Biophys. J.* 66: 382–393.
- Goldberg, J.M., Manning, G., Liu, A., Fey, P., Pilcher., K.E., Xu, Y. and Smith, J.L. (2006). The dictyostelium kinome--analysis of the protein kinases from a simple model organism. *PLoS. Genet.* 2, e38.
- Gómez, J., González, A., Martínez, C. and Rebollo, A. (1998). IL-2 induced cellular events. *Crit. Rev. Immunol.* 18: 185-220.

## **Bibliografía**

- Gómez-Fernández, J., Torrecillas, A. and Corbalan-García, S. (2004). Diacylglycerols as activators of protein kinase C. *Mol. Membr. Biol.* 21: 339-349.
- González, J. (2000). Fosforilación en células eucarióticas. Papel de fosfatasa and quinasas en la Biología, patología y control de protozoosis tisulares y sanguíneas. *Rev. Méd. Chile.* 128: 1150-1160.
- González, M., Gueguen, Y., Desserre, G., de Lorgeril, J., Romestand, B. and Bachère, E. (2007). Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 31: 332–339.
- Goode, N.T., Hajibagheri, M.A., Warren, G., and Parker, P.J. (1994). Expression of mammalian protein kinase C in *Schizosaccharomyces pombe*: isotype-specific induction of growth arrest, vesicle formation, and endocytosis. *Mol. Biol. Cell.* 5(8): 907–920.
- Goode, N.T., Hajibagheri, M.A., and Parker, P.J. (1995). Protein kinase C (PKC)-induced PKC down-regulation. Association with up-regulation of vesicle traffic. *J. Biol. Chem.* 270(6): 2669–2673.
- Goodnight, J., Mischak, H., Kolch, W. and Mushinski, J.F. (1995). Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 Wbroblasts. *J. Biol. Chem.* 270: 9991–10001.
- Gordge, P.C. and Ryves, W.J. (1994). Inhibitors of protein kinase C. *Cellular Signalling*. Vol. 6: No. 8, pp.871-882.
- Goss, V., Hocesvar, B., Thompson, L., Stratton, C., Burns, D. and Fields, A. (1994). Identification of nuclear beta II protein kinase C as a mitotic lamin kinase. *J. Biol. Chem.* 269: 19074-19080.
- Gourdon, I., Guérin, M.C., Torreilles, J. and Roch, P. (2001). Nitric oxide generation by the hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric. Oxide.* 5: 1-6.
- Granath, W.O.Jr., Connors, V. and Tartelon, R. (1994). Interleukine-1 activity in hemolymph from strains of the snail *Biomphalaria glabata* varying in susceptibility to the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*: presence, differential expression and biological function. *Cytokines.* 6: 21-27.
- Graves, L.M., Bornfeldt, K.E., Sidhu, J.S., Argast, G.M., Raines, E.W., Ross, R., Leslie, C.C. and Krebs, E.G. (1996). Platelet derived growth factor stimulates protein kinase A through a mitogen activated protein kinase dependent pathway in human arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 271: 505-511.
- Greif, H., Ben Chaim, J., Shimon, T., Bechor, E., Eldar, H., and Livneh, E. (1992). The protein kinase C-related PKC eta gene product is localized in the cell nucleus. *Mol. Cell Biol.* 12(3):1304–1311.
- Griner, E.M. and Kazanietz, G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature.* 7: 281-294.
- Grubb, B.R., Gabriel, S.E., Mengos, A., Gentsch, M., Randell, S.H. and Van Heeckeren, A.M., Knowles, M.R., Drumm, M.L., Riordan, J.R. and Boucher, R.C. (2006). SERCA pump inhibitors do not correct biosynthetic arrest of deltaF508 CFTR in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 34: 355–363.
- Hanks, S. and Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9: 576-596.
- Hanks, S.K. and Quinn, A.M. (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods. Enzymol.* 200: 38-62.

- Hanks, S.K., Quinn, A.M. and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*. 241: 42-52.
- Hansra, G., Garcia-Paramio, P., Prevostel, C, Whelan, R.D.H., Bornancin, F, and Parker, P.J. (1999). Multiple dephosphorylation and desensitization of conventional protein kinase C isotypes. *Biochem. J.* 342: 337-344.
- Hartwig, J.H., Thelem, M., Rosen, A., Janmey, P.A., Nairn, A.C. and Aderem, A. (1992). MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature*. 356: 618-622.
- Hasmeda, M. and Polya, G.M. (1996). Inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by curcumin. *Phytochemistry*. 42: 599-605.
- Hayashi, S. and Wu, H.C. (1990). Lipoproteins in bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22: 451-471.
- Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M.G., Silber, R. and Goyert, S.M. (1988). The monocyte differentiation antigen, CD 14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J. Immunol.* 144: 547-552.
- Hendengren, M., Asling, B., Dushay, M., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M. and Hultmark, D. (1999). Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol. Cell.* 4: 827-37.
- Hinderliter, A.K., Dibble, A.R., Biltonen, R.L. and Sando, J.J. (1997). Activation of protein kinase C by coexisting diacylglycerol-enriched and diacylglycerol-poor lipid domains. *Biochemistry*. 36: 6141-6148.
- Hirai, T. and Chida, K. (2003). Protein kinase C zeta (PKC  $\zeta$ ): activation mechanisms and cellular functions. *J. Biochem. (Tokyo)* 133: 1-7.
- Hocevar, B.A., Burns, D.J. and Fields, A.P. (1993). Identification of protein kinase C (PKC) phosphorylation sites on human lamin B. potential role of PKC in nuclear lamin structural dynamics. *J. Biol. Chem.* 268: 7545-7552.
- Hochner, B., Klein, M., Schacher, S. and Kandel, E.R. (1986). Additional components in the cellular mechanism of presynaptic facilitation contributes to behavioral dishabituation in *Aplysia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 8794-8798.
- Hodgkin, M.N., Pettitt, T.R., Martin, A., Michell, R.H., Pemberton, A.J. and Wakelam, M.J. (1998). Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends. Biochem. Sci.* 23: 200-204.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Jr. and Ezekowitz, R.A.B. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 284: 1313-1318.
- Hofmann, J. (1997). The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *Faseb J.* 11(8): 649-69.
- Hommel, U., Zurini, M. and Luyten, M. (1994). Solution structure of a cysteine rich domain of rat protein kinase C. *Nat. Struct. Biol.* 1: 383-387.
- Hornbeck, P., Huang, K.P. and Paul, W.E. (1988). Lamin B is rapidly phosphorylated in lymphocytes after activation of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 2279-2283.
- House, C. and Kemp, B. (1987). Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science*. 238: 1726-1728.

## **Bibliografia**

- House, C. and Kemp, B.E. (1990). Protein kinase C pseudosubstrate prototope: structure-function relationships. *Cell. Signal.* 2(2): 187–190.
- Hoyos B., Ballard D.W., Bohnlein E., Siekevitz M. and Greene W.C. (1989). Kappa B- specific DNA binding proteins: Role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science.* 244: 457-460.
- Huang, C. and Chuang, N. (1995). Purification of the  $\delta$  isoenzyme of protein kinase C from the hepatopancreas of the shrimp *Peaneus monodon* with phosphorylation on tyrosine residues. *J. Exp. Zool.* 272: 258-265.
- Huang, C. and Cabot, M.C. (1990). Phorbol diesters stimulate the accumulation of phosphatidate, phosphatidylathanol, and diacylglycerol in the three cell types. *J. Biol. Chem.* 265: 14858-14863.
- Huang, F.L., Yoshida, Y., Cunha-Melos, J.R., Beaven, M.A. and Huang, K.P. (1989). Differential down-regulation of protein kinase C isoenzymes. *J. Biol. Chem.* 264: 4238-4243.
- Hubbard, S.R., Bishop, W.R., Kirschmeier, P., George, S.J., Cramer, S.P. and Hendrickson, W.A. (1991). Identification and characterization of zinc binding sites in protein kinase C. *Science.* 254: 1776–1779.
- Huber, R., Schneider, M., Mayr, I., Romisch, J. and Paques, E.P. (1990). The calcium binding sites in human annexin V by cristal structure analysis at 2.0 a resolution. Implications for membrane binding and calcium channel activity. *FEBS. Lett.* 275:15-21.
- Hubert, F., Cooper, E.L. and Roch, P. (1997). Structure and differential of the stimuable cytotoxic complex from hemolymph of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1361: 29-41.
- Hug, H. and Sarre, T.F. (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem. J.* 291(Pt 2):329–343.
- Hughes, T.K., Smith, E.M., Barnett, J.A., Charles, R. and Stefano, G.B. (1991b). Lipopolysaccharide and opioids activate distintct populations of *Mytilus edulis* immunocytes. *Cell. Tissue. Res.* 264: 317-320.
- Hughes, T.K., Smith, E.M., Barnett, J.A., Charles, R. and Stefano, G.B. (1991a). LPS stimulated invertebrate hemocytes: a role for immunoreactive TNf and IL-1. *Dev. Comp. Immunol.* 15: 117-122.
- Hughes, T.K., Smith, E.M., Leung, M.K. and Stefano, G.B. (1992). Immunoreactive cytokines in *Mytilus edulis* nervous and immune interactions. *Acta. Biol. Hung.* 43: 269-273.
- Huitema, K., Van, D.D., Joep, J.F.H.M. and J.C.M. (2004). Holthuis Brouwers, Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* 23: 33–44.
- Hung, A.Y., Haass, C., Nitsch, R.M., Qiu, W.Q., Citron, M., Wurtman, R.J., Growdon, J.H. and Selkoe, D.J. (1993). Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J. Biol. Chem.* 268(31): 22959-62.
- Hunter, T. (1987). A thousand and one protein kinases. *Cell.* 50:823-829.
- Hunter, T. (1991). Protein kinase classification. *Methods Enzymol.* 200: 3-37.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* 80: 225–236.



- Hunter, T. (1998). The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 353(1368): 583–605.
- Huse, M. and Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell.* 109: 275-282.
- Hyatt, S.L., Liao, L., Chapline, C. and Jaken, S. (1994). Identification and characterization of alpha-protein kinase C binding proteins in normal and transformed REF52 cells. *Biochemistry.* 33: 1223-1228.
- Ibarguren, I., Díaz, M., Cao, J., Fernández, M., Barcia, R., Villamarín, J. and Ramos-Martínez, J.I. (2000). Regulation of the futile cycle of fructosa phosphate in sea mussel. *Comp. Biochem. Physiol.* 126B: 495-501.
- Ibarguren, I., Vázquez-Illanes, M. and Ramos-Martínez, J. (1990). Seasonal variations in glycolysis in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 97B: 279-283.
- Iison, D., Shah, E., O'Reilly, D., Kelsen, M., Welch, M., Kaubish, A. and Schwartz, G.K. (2001). A phase II trial of weekly one hour paclitaxel followed by bryostatin-1 in patients with advanced oesophageal cancer: an active new drug combination. *Proc. Am. Soc. Clin. Onc.* 20 Abstract 633.
- Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y. and Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat liver. *J. Biol. Chem.* 252: 7610-7615.
- Iwai, T., Fujisawa, N., Ogita, K. and Kikkawa, U. (1992). Catalytic properties of yeast protein kinase C: difference between the yeast and mammalian enzymes. *J. Biochem.* 112: 7-10.
- Jaken, S. (1996). Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8(2): 168–173.
- Jiménez, B., Pestana, A. and Fernández-Renart, M. (1989). A phospholipid-stimulated protein kinase from *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. J.* 260: 557-561.
- Jiménez-Monreal, A.M., Aranda, F.J., Micol, V., Sánchez-Pinera, P., De, G., A. and Gomez-Fernandez, J.C. (1999). Influence of the physical state of the membrane on the enzymatic activity and energy of activation of protein kinase C alpha. *Biochemistry.* 38: 7747–7754.
- Joe, B., Vijaykumar, M. and Lokesh, B.R. (2004). Biological properties of curcumin – cellular and molecular mechanisms of action. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 44: 97–111.
- Johannes, F.J., Prestle, J., Dieterich, S., Oberhagemann, P., Link, G., and Pfizenmaier, K. (1995). Characterization of activators and inhibitors of protein kinase C mu. *Eur. J. Biochem.* 227(1-2): 303–307.
- Johannes, F.J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P., and Pfizenmaier, K. (1994). PKC u is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* 269(8): 6140–6148.
- Johnson J.A. Gray M.O. Chen C.H. Mochly-Rosen D. (1996). A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function. *J. Biol. Chem.* 271(40): 24962–6.
- Johnson, J.E., Giorgione, J. and Newton, A.C. (2000). The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry.* 39(37): 11360–9.
- Jones, T.W. (1846). The blood corpuscles considered in its different phases of development in the animal series. Memoir II. Invertebrata. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 136: 89-106.

## **Bibliografía**

- Junco, M., Webster, C., Crawford, C., Boscá, L., and Parker, P.J. (1994). Protein kinase C V3 domain mutants with differential sensitivities to mcalpain are not resistant to phorbol-ester-induced down-regulation. *Eur. J. Biochem.* 223(1): 259–263.
- Kanashiro, A.C. and Khalil, R.A. (1998). Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 25: 974-985.
- Kashiwagi, K., Shirai, Y., Kuriyama, M., Sakai, N. and Saito, N. (2002). Importance of C1B domain for lipid messenger-induced targeting of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 277(20): 18037–45.
- Kawamoto, S. and Hikada, H. (1984). 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125(1): 258-64.
- Kazanietz, M., Areces, L., Bahador, A., Mischak, H., Goodnight, J. Mushinski, J. and Blumberg, M. (1993). Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C isoenzymes. *Mol. Pharmacol.* 44: 298-307.
- Kazanietz, M.G. (2000). Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters. *Mol. Carcinog.* 28(1): 5–11.
- Kazanietz, M.G. (2002). Novel “nonkinase” phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol. Pharmacol.* 61: 759-767.
- Kazanietz, M.G., Caloca, M.J., Aizman, O. and Nowicki, S. (2001). Phosphorylation of the catalytic subunit of rat renal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase by classical PKC isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.* 1:388(1): 74-80.
- Keranen, L.M., Dutil, E.M., and Newton, AC (1995). Protein kinase C is regulated “*in vivo*” by three functionally distinct phosphorylations. *Curr. Biol.* 5(12): 1394–1403.
- Keyse, S.M. and Emslie, E.A. (1992). Oxidative stress and heart shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature.* 359: 644-647.
- Khadaroo, R.G., Kapues, A., Powers, K.A., Cybulsky, M.I., Marshall, J.C. and Rotstein, O.D. (2003). Oxidative stress reprograms lipopolysaccharide signalling via Src kinase dependent pathway in RAW 264.7 macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 278: 47834-47841.
- Khalil, R.A. and Morgan, K.G. (1996). Enzyme translocations during smooth muscle activation. In: Barany M, editor. Biochemistry of smooth muscle contraction. New York: Academic Press. p. 307–18.
- Khan, W., Blobel, G. and Hannun, Y. (1995). Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. *Cell. Signal.* 7: 171-184.
- Khan, W.A., Blobel, G., Halpern, A., Taylor, W., Wetsel, W.C., Burns, D., Loomis, C., and Hannun, Y.A. (1993). Selective regulation of protein kinase C isoenzymes by oleic acid in human platelets. *J. Biol. Chem.* 268(7):5063–5068.
- Khayat, Z.A., Tsakiridis, T., Ueyama, A., Somwar, R., Ebina, Y. and Klip, A. (1998). Rapid stimulation of glucose transport by mitochondrial uncoupling depends in part on cytosolic Ca<sup>2+</sup> and cPKC. *Am. J. Physiol.* 275: C1487–C1497.
- Kheifets, V. and Mochly-Rosen, D. (2007). Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: Design of specific modulators of kinase function. *Pharmacol. Res.* 55: 467–476.

- Kiley, S.C., Jaken, S., Whelan, R., and Parker, P.J. (1995). Intracellular targeting of protein kinase C isoenzymes: functional implications. *Biochem. Soc. Trans.* 23(3): 601–605.
- Kiley, S.C., Parker, P.J., Fabbro, D. and Jaken, S. (1992). Hormone- and phorbol ester-activated protein kinase C isoenzymes mediate a reorganization of the actin cytoskeleton associated with prolactin secretion in GH4C1 cells. *Mol. Endocrinol.* 6(1): 120-31.
- Kirwan, A.F., Bibby, A.C., Mvilongo, T., Riedel, H., Burke, T., Millis, S.Z. and Parissenti, A.M. (2003). Inhibition of protein kinase C catalytic activity by additional regions within the human protein kinase C alpha-regulatory domain lying outside of the pseudosubstrate sequence. *Biochem. J.* 373(Pt 2): 571–81.
- Kishimoto, A., Kajikawa, N., Shiota, M., and Nishizuka, Y. (1983). Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium dependent neutral protease. *J. Biol. Chem.* 258: 1156-1164.
- Kishimoto, A., Mikawa, K., Hashimoto, K., Yasuda, I., Tanaka, S., Tominaga, M., Kuroda, T. and Nishizuka, Y. (1989). Limited proteolysis of protein kinase C by calcium-dependent neutral protease (calpain). *J. Biol. Chem.* 264: 4088-4092.
- Kitcheus, R.L. (2000). Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *Chem. Immunol.* 74: 61-82.
- Klauck, T.M., Faux, M.C., Labudda, K., Langeberg, L.K., Jaken, S., and Scott, J.D. (1996). Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science.* 271(5255): 1589–1592.
- Klein, I.K., Ritland, S.R., Burgart, L.J., Ziesmer, S.C., Roche, P.C., Gendler, S.J., and Karnes, W.E. Jr. (2000). Adenoma-specific alterations of protein kinase C isozyme expression in *Apc*MIN mice. *Cancer. Res.* 60: 2077–2080.
- Kletsas, D., Sessa, D., Franchini, A. and Ottaviani, E. (1998) PDGF and TGF- $\beta$  induce cell shape changes in invertebrates immunocytes via specific cell surface receptors. *Eur. J. Cell. Biol.* 75: 362-366.
- Klevit, R. (1991) Recognition of DNA by Cys2, His2 zinc fingers. *Science.* 253: 1367-1393.
- Kobayashi, E., Nakano, H., Morimoto, M. and Tamaoka, T. (1989). Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159(2): 548-53.
- Kochs, G., Hummel, R., Fiebich, B., Sarre, T.F., Marmé, D. and Hug H. (1993). Activation of purified human protein kinase C alpha and beta isoenzymes “*in vitro*” by  $Ca^{2+}$ , phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochem. J.* 291: 627-633.
- Koehn, R.K. (1991) The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*. *Aquaculture.* 94: 125-145.
- Kohout, S.C., Corbalán-García, S., Gómez-Fernández, J.C. and Falke, J.J. (2003). C2 domain of protein kinase C alpha: elucidation of the membrane docking surface by site-directed fluorescence and spin labeling. *Biochemistry.* 42(5): 1254–65.
- Kohout, S.C., Corbalán-García, S., Torrecillas, A., Gómez-Fernández, J.C. and Falke, J.J. (2002). C2 domains of protein kinase C isoforms alpha, beta, and gamma: activation parameters and calcium stoichiometries of the membrane-bound state. *Biochemistry.* 41(38): 11411–24.
- Kollmann, M. (1980) Recherches sur les leucocytes et le tissu lymphoide des invertébrés. *Ann. Sci. Nat.* 8:1-240.

## **Bibliografia**

Kontny, E., Kurowska, M., Szczepanska, K. And Maslinski, W. (2000). Rottlerin, a PKC isozyme-selective inhibitor, affect signaling events and cytokine production in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 67: 249-258.

Kraft, A.S. and Anderson, W.B. (1983) Phorbol esters increase the amount of Ca<sup>2+</sup>, phospholipids-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature.* 301: 621-623.

Krebs, E.G. (1993) Novel Lecture. Protein phosphorylation and cellular regulation I. *Biosci. Rep.* 13: 127-142.

Kruger, K., Sossin, W., Sacktor, T., Bergold, P., Beushausen, S. and Schwartz J. (1991). Cloning and characterization of Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent PKCs expressed in *Aplysia* sensory cells. *J. Neurosc.* 11: 2303-2313.

Kwak, J., Han, M.K., Choi, K.S., Park, I.H., Park, S.Y., Sohn, M.H., Kim, U.H., McGregor, J.R., Samlowski, W.E. and Yim, C.Y. (2000). Cytokines secreted by lymphokine-activated killer cells induce endogenous nitric oxide synthesis and apoptosis in DLD-1 colon cancer cells. *Cell. Immunol.* 203: 84-94.

Lacoste, A., Malham, S.K., Cueff, A. and Poulet, S.A. (2001). Stress induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Cassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 122: 181-8.

Lacoste, A., Malham, S.K., Gélébart, F., Cueff, A. and Poulet, S.A. (2002). Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 26: 1-9.

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

Laffon, B., Rábade, T., Pasaro E. and Méndez, J. (2006). Monitoring of the impact of *Prestige* oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galicia coast. *Env. Int.* 32: 342-348.

Lanz, H., Tsutsumi, V. and Arechiga, A. (1993). Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarki* blood cells. *Dev. Comp. Immunol.* 17: 389-397.

Lapetina, E.G., Reep, B., Ganong, B.R. and Bell, R.M. (1985). Exogenous Sn-1,2-diacylglycerols containing saturated fatty acids function as bioregulators of protein kinase C in human platelets. *J. Biol. Chem.* 260: 1358–1361.

Lari, R., Fleetwood, A.J., Kitchener, P.D., Cook, A.D., Pavasovic, D., Hertzog, P.J. and Hamilton, J.A. (2007). Macrophage lineage phenotypes and osteoclastogenesis--complexity in the control by GM-CSF and TGF-beta. *Bone.* 40(2): 323-36.

Larsen, E.C., DiGennaro, J.A., Saito, N., Mehta, S., Loegering, D.J., Mazurkiewicz, J.E. and Lennartz, M.R. (2000). Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. *J. Immunol.* 165: 2809–2817.

Le Good, J.A., Ziegler, W.H., Parekh, D.B., Alessi, D.R., Cohen, P., and Parker, P.J. (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science.* 281(5385): 2042–2045.

Le Pennec, M., Barillé, L. and Grizel, H. (2003a). The gills. En: *Atlas d'histologie et de cytologie des mollusques bivalves marins* (Ed. Grizel, H.), pp. 35-52, Ifremer, Plouzané.

Le Pennec, M., Grizel, H. and Barillé, L.Y. (2003b). The labial palps. En: *Atlas d'histologie et de cytologie des mollusques bivalves marins* (Ed. Grizel, H.), pp. 53-64, Ifremer, Plouzané.

- Lee, M.H. and Bell, R.M. (1991). Mechanism of protein kinase C activation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry*. 30: 1041-1049.
- Lee, S., Wang, R. and Soderhall, K. (2000). A lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 275: 1337-43.
- Leevers, S.J., Vanhaesebroeck, B., and Waterfield, M.D. (1999). Signalling through phosphoinositide 3-kinase: the lipids take the central stage. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 219-225.
- Lehel, C., Olah, Z., Jakab, G., Szallasi, Z., Petrovics, G., Harta, G., Blumberg, P.M., and Anderson, W.B. (1995). Protein kinase C epsilon subcellular localization domains and proteolytic degradation sites. A model for protein kinase C conformational changes. *J. Biol. Chem.* 270(33): 19651-19658.
- Leibersperger, H., Gschendt, M. and Mark, F. (1990). Purification and characterization of a calcium-unresponsive, phorbol ester / phospholipids-activates protein kinase from porcine spleen. *J. Biol. Chem.* 265: 16108-16115.
- Leibersperger, H., Gschwendt, M., Gernold, M. and Mark, F. (1991). Immunological demonstration of a calcium unresponsive protein kinase C of the  $\delta$ -type in different species and murine tissues. *J. Biol. Chem.* 266: 14778-14784.
- Leonard, W.J. and Lin, J.X. (2000) Cytokine receptor signalling pathways. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 105: 877-888.
- Levin, D.E., Fields, F.O., Kunisawa, R., Bishop, J.M. and Thorner, J. (1990). A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell.* 62: 213-224.
- Li, J. and Gobe, G. (2006). Protein kinase C activation and its role in kidney disease. *Nephrology.* 11: 428-434.
- Li, Y., Martin, L.D., Spizz, G., and Adler, K.B. (2001). MARCKS protein is a key molecule regulating mucin secretion by human airway epithelial cells "in vitro". *J. Biol. Chem.* 276: 40982-40990.
- Liao, L., Hyatt, S.L., Chapline, C., and Jaken, S. (1994). Protein kinase C domains involved in interactions with other proteins. *Biochemistry.* 33(5): 1229-1233.
- Lien, E., Means, T.K., Heine, H., Yoshimura, A., Kusumoto, S., Fukase, K., Fenton, M.J., Oikawa, M., Qureshi, N., Monks, B., Finberg, R.W., Ingalls, R.R. and Golenbock, D.T. (2000). Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 105: 497-504.
- Liew, F.Y. (1994). Biology of nitric oxide in neuroimmunoregulation. *Ann. Acad. Sci.* 741: 39-45.
- Lin, J.K., Chen, Y.C., Huang, Y.T. and Lin-Shiau, S.Y. (1997). Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer. *J. Cell. Biochem.* 28-29:39-48.
- Lindberg, R.A., Quinn, A.M. Hunter, T. (1992). Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do?. *Trends. Biochem. Sci.* 17: 114-119.
- Ling, M., Troller, U., Zeidman, R., Stensman, H., Schultz, A. and Larsson, C. (2005). Identification of conserved amino acids N-terminal of the PKC epsilon C1b domain crucial for protein kinase C epsilon-mediated induction of neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 280: (18)17910-9.

## **Bibliografía**

- Liron, T., Seraya, C.B., Ish-Shalom, M., Souroujon, M.C. and Neumann, D. (2007). Overexpression of amyloid precursor protein reduces epsilon protein kinase C levels. *Neuroscience*. 146(1): 152-9.
- Lisbona, C. (1995). Tesis: Papel de las proteína quinasas PKC, Raf-1, ERK2 en la proliferación de linfocitos T. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.
- Liu, J.P. (1996). Protein kinase C and its substrates. *Mol. Cell. Endocrinol.* 116(1): 1–29.
- Liu, J.Y., Lin, S.J. and Lin, J.K. (1993). Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells. *Carcinogenesis*. 14: 857–861.
- Liu, M.K., Herrera-Velitz, R., Browsey, W. and Reiner, N.E. (1994). CD14 dependent activation of protein kinase C and mitogen activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 153: 2642-2652.
- Liu, W.S. and Heckman, C.A. (1998). The sevenfold way of PKC regulation. *Cell. Signal.* 10(8): 529–542.
- Liu, X.J., He, A.B., Chang, Y.S. and Fang, F.D. (2006). Atypical protein kinase C in glucose metabolism. *Celular Signaling. Cell. Signal.* 18(12): 2071-6.
- Liyanage, M., Frith, D., Livneh, E. and Stabel, S. (1992). Protein kinase C group B members PKC delta, -epsilon, -zeta and PKC L(eta) Comparison of properties of recombinant proteins “*in vitro*” and “*in vivo*”. *Biochem. J.* 283: 781-787.
- Logan-Smith, M.L., Lockyer, P.J., East, J.M. and Lee, A.G. (2001). Curcumin, a molecule that inhibits the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum but increases the rate of accumulation of Ca<sup>2+</sup>. *J. Biol. Chem.* 276: 46905–46911.
- López-García, F., Micol, V., Villalain J. and Gómez-Fernández, J.C. (1993). Infrared spectroscopic study of the interaction of diacylglycerol with phosphatidylserine in the presence of calcium. *Biochim. Biophys. Acta.* 1169:264–272.
- López-García, F., Villalain, J., and Gómez-Fernández, J.C. (1994). Diacylglycerol, phosphatidylserine and Ca<sup>2+</sup>: a phase behavior study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1190:264–272.
- López-Nicolas, R., López-Andreo, M.J., Marín-Vicente, C., Gómez-Fernández, J.C. and Corbalan-Garcia, S. (2006). Molecular mechanisms of PKC alpha localization and activation by arachidonic acid. The C2 domain also plays a role. *J. Mol. Biol.* 357(4): 1105–20.
- Lorenzo, M., Teruel, T., Hernandez, R., Kayali, A.G. and Webster, N.J. (2002). PLCgamma participates in insulin stimulation of glucose uptake through activation of PKC zeta in brown adipocytes. *Exp. Cell Res.* (Aug) 278: 15146–15157.
- Lowenstein, C.J., Alley, E.E., Raval, P., Snowman, A.M., Snyder, S.H., Russell, S.W. and Murphy, W.J. (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 9730-9734.
- Lozano, J.A. y Tudela, J. (1988). “Prácticas de Bioquímica”. Ed. Síntesis. Madrid.
- Lu, Y. and Durkin, J.P. (1997). Protein kinase C in IL-2 signal transduction. *Immunologic. Research.* 16: 355-374.
- Lu, Z., Liu, D., Hornia, A., Devonish, W., Pagano, M., and Foster, D.A. (1998). Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biol.* 18(2): 839–845.

- Luderus, M., Van der Most, R., Otte, A. and Van Driel, R. (1989). A protein kinase C-related enzyme activity in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* 253: 71-75.
- Luo, J.H. and Weinstein, I.B. (1993). Calcium-dependent activation of protein kinase C. The role of the C2 domain in divalent cation selectivity. *J. Biol. Chem.* 268(31): 23580–23584.
- Luo, J.H., Kahn, S., O'Driscoll, K., and Weinstein, I.B. (1993). The regulatory domain of protein kinase C beta 1 contains phosphatidylserine- and phorbol ester-dependent calcium binding activity. *J. Biol.* 268 (5): 3715-9.
- Mackay, H.J. and Twelves, C.J. (2003). Protein kinase C: a target for anticancer drugs? *Endocr. Relat. Cancer.* 10: 389–96.
- MacKenzie, S., Fleming, I., Houslay, M.D., Anderson, N.G., and Kilgour, E. (1997). Growth hormone and phorbol esters require specific protein kinase C isoforms to activate mitogen-activated protein kinases in 3T3-F442A cells. *Biochem. J.* 324(Pt 1): 159–165.
- Madani, S., Hichami, A., Legrand, A., Belleville, J. and Khan, N.A. (2001). Implication of acyl chain of diacylglycerols in activation of different isoforms of protein kinase C. *FASEB J.* 15: 2595–2601.
- Mahmoud, Y.A. (2005). Curcumin modulation of Na,K-ATPase: phosphoenzyme accumulation, decreased K<sup>+</sup> occlusion, and inhibition of hydrolytic activity. *Br. J. Pharmacol.* 145: 236–245.
- Mahmoud, Y.A. (2007). Modulation of protein kinase C by curcumin; inhibition and activation switched by calcium ions. *Br. J. Pharmacol.* 150: 200–208.
- Makowske, M. and Rosen, O. (1989). Complete activation of protein kinase C by an antipeptide antibody directed against pseudosubstrate prototope. *J. Biol. Chem.* 264:16155-16159.
- Malham, S.K., Lacoste, A., Gélébart, F., Cueff, A. and Poulet, S.A. (2003). Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. *J. Exp. Zool.* 295A: 136-144.
- Mall, M. and Kunzelmann, K. (2005). Correction of the CF defect by curcumin: hopes and disappointments. *Bioassays.* 27: 9–13.
- Manger, P., Li, J., Christensen, B.M. and Yoshino, T.P. (1996). Biogenic monoamines in the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*: influence of infection by the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem. Physiol.* 114A: 227-234.
- Manning, G. Genomic overview of protein kinases (December 13, 2005). WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, Wormbook, doi/10.1895/wormbook.1.60.1, <http://www.wormbook.org>.
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002b). Evolution of protein kinase signalling from yeast to man. *Trends. Biochem. Sci.* 27: 514-520.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002a). The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298: 1919-1934.
- Marshall, C.J. (1994) MAP kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 4: 82-89.
- Marks, F. and Gschwendt, M. (1997). Protein kinase C, en *Protein Phosphorylation* (Marks F, eds.) pp. 81–116. VCH. Weinheim.

## **Bibliografía**

- Marshall, A.J. and Williams, W.D. (1980). *Tipo Moluscos*. En: Zoología. Invertebrados, volumen I. Ed. Reverté. Barcelona, pp 683-823.
- Martelli, A.M., Evangelisti, C., Nyakern, M. and Manzoli, F.A. (2006). Nuclear protein kinase C. *Biochim Biophys. Acta*. 1761: 542–51.
- Martiny-Baron, G., Kazanietz, M.G., Mischak, H., Blumberg, P.M., Kochs, G., Hug, H., and Marme, D. (1993). Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go6976. *J. Biol. Chem.* 268: 9194–9197.
- Mayer, G. (2006). Immunology - Chapter One: Innate (non-specific) Immunity. Microbiology and Immunology On-Line Textbook. USC School of Medicine.
- McCarty, M.F. (2006). PKC mediated modulation of L-type calcium channels may contribute to fat-induced insulin resistance. *Med. Hypotheses*. 66: 824–831.
- McDonald, J.R. and Walsh, M.P. (1985). Inhibition of the Ca<sup>2+</sup>- and phospholipid-dependent protein kinase by a novel Mr 17,000 Ca<sup>2+</sup>-binding protein. *Biochem. J.* 14:129 (2): 603-610.
- McGlynn, E., Liebetanz, J., Reutener, S., Wood, J., Lydon, N.B., Hofstetter, H., Vanek, M., Meyer, T. and Fabbro, D. (1992). Expression and partial characterization of rat protein kinase C-delta and protein kinase C-zeta in insect cells using recombinant baculovirus. *J. Cell. Biochem.* 49: 239-250.
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir., A. and Murray D. (2002). PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31: 51–175.
- Medkova, M. and Cho, W. (1998). Mutagenesis of the C2 domain of protein kinase C $\alpha$ . Differential roles of Ca<sup>2+</sup> ligands and membrane binding residues. *J. Biol. Chem.* 273(28): 17544–52.
- Medkova, M. and Cho, W. (1999). Interplay of C1 and C2 domains of protein kinase C- $\alpha$  in its membrane binding and activation. *J. Biol. Chem.* 274: 19852–19861.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A. Jr. (1998). Self-defense: the fruit fly style. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 429-430.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A. Jr. (2000). Innate immune recognition, mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 173: 89-97.
- Meister, M., Lemaitre, B. and Hoffmann, J.A. (1997). Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bioessays*. 19: 1019-1026.
- Mellor, H. and Parker, P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332 (Pt 2):281–292.
- Mercado, L.A. (2001). Purificación y caracterización de una isoforma de proteína quinasa C de manto de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Mercado, L.A., Cao, A., Barcia, R. and Ramos-Martínez, J.I. (2002a). Purification of a lipid activated and Ca<sup>2+</sup> independent protein kinase from the mantle of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Mol. Cell. Biochem.* 233: 99-105.
- Mercado, L.A., Cao, A., Barcia, R. and Ramos-Martínez, J.I. (2002b). Regulatory properties of p105: a novel PKC isoenzyme in mantle tissue from marine mussels. *Biochem. Cell. Biol.* 80: 771-775.



- Mercado, L.A., Cao, A., Barcia, R. and Ramos-Martínez, J.I. (2003). Phorbol esters induce translocation of the nPKC p105 to membrana in mussels hemocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 250: 41-45.
- Messerschmidt, A., Macieira, S. and Velarde, M., Bädeker, M., Benda, C., Jestel, A., Brandstetter, H., Neuefeind, T. and Blaesse, M. (2005). Crystal structure of the catalytic domain of human atypical protein kinase C- $\iota$  reveals interaction mode of phosphorylation site in turn motif. *J. Mol. Biol.* 352(4): 918–31.
- Meyer, T. and Oancea, E. (2000). Studies of signal transduction events using chimeras to green fluorescent protein. *Methods. Enzymol.* 327:500-13.
- Micol, V., Sánchez-Pinera, P., Villalain, J., De, G., A. and Gómez-Fernández, J.C. (1999). Correlation between protein kinase C alpha activity and membrane phase behaviour. *Biophys. J.* 76:916–927.
- Middaugh, D.P., Chapman, P.J. and Shelton, M.E. (1996). Response of embryonic and larval inland silversides, *Menidia beryllina*, to a water soluble fraction formed during biodegradation of artificially weathered Alaska North slope crude oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 410-419.
- Middaugh, D.P., Shelton, M.E., McKenney, C.L., Cherr, G., Chapman, P.J. and Courtney, L.A. (1998). Preliminary observations on responses of embryonic and larval pacific herring, *Clupea pallasii*, to neutral fraction biodegradation products of weathered Alaska North slope oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 188-196.
- Mikhailov, A.T., Torrado, M., Méndez, J. and López, M.J. (1996). Annual cycle of expression of the connective tissue polypeptide markers in the mantle of the mussel, *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Mar. Biol.* (Berlin). 126: 77-90.
- Miyajima, A., Kitamura, T., Harada, N., Yokota, T. and Arai, K. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 295-331.
- Mizuno, K., Noda, K., Araki, T., Imaoka, T., Kobayashi, Y., Akita, Y., Shimonaka, M., Kishi, S., and Ohno, S. (1997). The proteolytic cleavage of protein kinase C isotypes, which generates kinase and regulatory fragments, correlates with Fas-mediated and 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 250(1): 7–18.
- Mobarak, C.D., Anderson, K.D., Morin, M., Beckel-Mitchener, A., Rogers, S.L., Furneaux, H., King, P., Perrone-Bizzozero, N.I. (2000). The RNA-binding protein HuD is required for GAP-43 mRNA stability, GAP-43 gene expression, and PKC dependent neurite outgrowth in PC12 cells. *Mol. Biol. Cell.* 11: 3191–203.
- Mochly-Rosen, D. (1995). Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science.* 268: 247±251.
- Mochly-Rosen, D. and Gordon, A.S. (1998). Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J.* 12(1):35–42.
- Mochly-Rosen, D., Miller, K., Scheller, R., Khaner, H., López, J. and Smith, B.L. (1991). Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(9): 3997-4000.
- Mochly-Rosen, D., Miller, K.G., Scheller, R.H., Khaner, H., López, J. and Smith B.L. (1992). p65 fragments, homologous to the C2 region of protein kinase C, bind to the intracellular receptors for protein kinase C. *Biochemistry.* 31(35): 8120–4.
- Mochly-Rosen, D., Smith, B.L., Chen, C.H., Disatnik, M.H., and Ron, D. (1995). Interaction of protein kinase C with RACK1, a receptor for activated Ckinase: a role in beta protein kinase C mediated signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* 23(3):596–600.

## **Bibliografía**

- Moore, M.N. and Gelder, S.R. (1985). Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca: Bivalvia). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 104: 242-249.
- Moore, M.N. and Lowe, D.M. (1977). The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. *J. Invertebr. Pathol.* 29: 18-30.
- Morgan, D.A., Ruscetti, F.W. and Gallo, R. (1976). Selective "in vitro" growth of T lymphocytes from normal human narrows. *Science.* 193: 1007-1008.
- Mori, T., Takai, Y., Yu, B., Takahashi, J., Nishizuka, Y. and Fujikura, T. (1982). Specificity of the fatty acyl moieties of diacylglycerol for the activation of calciumactivated, phospholipid-dependent protein kinase. *J. Biochem.* (Tokyo) 91: 427-431.
- Morrison, D.C. and Ryan, J.L. (1987). Endotoxins and disease mechanisms. *Annu. Rev. Med.* 38: 417-432.
- Morton, B. (1992). The evolution and success of the heteromyarian form in the mytiloidea. En: *The mussel Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture* (Ed. Gosling, E.), pp. 21-52, Elsevier, Amsterdam.
- Moscat, J. and Diaz-Meco, M. (2000). The atypical PKCs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep.* 1: 399-403.
- Mosior, M. and McLaughlin, S. (1991). Peptides that mimic the pseudosubstrate region of protein kinase C bind to acidic lipids in membranes. *Biophys. J.* 60(1): 149-59.
- Müller, U., Vogel, P., Alber, G. and Schaub, G.A. (2008). The innate immune system of mammals and insects. *Contrib. Microbiol.* 15:21-44.
- Musashi, M., Ota, S. and Shiroshita, N. (2000). The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int. J. hematol.* 72: 12-19.
- Mustelin, T. (2006) A brief introduction to the protein phosphatase families. *Methods. Mol. Biol.* 365: 9-22.
- Muzio, M., Bosisio, D. and Polentarutti, N. (2000). Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TRL) in human leukocytes: selective expression of TLR 3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164: 5998-6004.
- Nagai-Tamai, Y., Mizuno, K., Hirose, T., Suzuki, A. and Ohno S. (2002). Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells.* 7(11): 1161-71.
- Nakai, S. and Wayne, M.H. (1996). "Food proteins." VCH Publisners, Inc, United States of America.
- Nakanishi, H. and Exton, J.H. (1992). Purification and characterization of the z isoform of Protein kinase C from bovine kidney. *J. Biol. Chem.* 267: 16347-16354.
- Nakanishi, H., Brewer, K.A., and Exton, J.H. (1993). Activation of the isoenzyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5,-triphosphate. *J. Biol. Chem.* 268:13-16.
- Nakashima, S. (2002). Protein Kinase Ca (PKCa): Regulation and Biological Function. *J. Biochem.* 132: 669-675.
- Nalefski, E.A. and Newton, A.C. (2001). Membrane binding kinetics of protein kinase C betall mediated by the C2 domain. *Biochemistry.* 40:13216-13229.

- Nalefski, E.A., Slazas, M.M. and Falke, J.J. (1997). Ca<sup>2+</sup>-signaling cycle of a membrane-docking C2 domain. *Biochemistry*. 36: 12011–12018.
- Nappi, A.J. and Ottaviani, E. (2000). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays*. 22: 469-480.
- Nappi, A.J. and Vass, E. (1993). Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment. Cell. Res.* 6:117-126.
- Nappi, A.J. and Vass, E. (2000). *Cytotoxic reactions associated with insect immunity: Signaling pathways and killing molecules*. En *Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 329-348.
- Narain, A.S. (1973). The amoebocytes of lamellibranch molluscs with special reference to the circulating amoebocytes. *Malacol. Rev.* 6: 1-12.
- Newton, A.C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 270(48):28495–28498.
- Newton, A.C. (1996). Protein kinase C: ports of anchor in the cell. *Curr. Biol.* 6(7): 806–809.
- Newton, A.C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 161-167.
- Newton, A.C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.* 101: 2353-2364.
- Newton, A.C. (2004). Diacylglycerol's affair with protein kinase C turns 25. *Trends. Pharmacol. Sci.* 25: 175-7.
- Newton, A.C. and Koshland, D.E. Jr. (1989) High cooperativity, specificity, and multiplicity in the protein kinase C-lipid interaction. *J. Biol. Chem.* 264:14909-14915.
- Newton, AC. (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.* 370(Pt 2): 361–71.
- Ng, T.P., Parsons, M., Hughes, W.E., Monypenny, J., Zicha, D., Gautreau, A., Arpin, M., Gschmeissner, S. Verveer, P.J., Bastiaens, P.I.H. and Parker, P.J. (2001). Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC integrin complexes involved in the control of cell motility. *EMBO J.* 20: 2723-2741.
- Ng, T.P., Chiam, P.C., Lee, T., Chua, H.C., Lim, L. and Kua, E.H. (2006). Curry consumption and cognitive function in the elderly. *Am. J. Epidemiol.* 164: 898–906.
- Nguyen, T.V., Poole, D.P., Harvey, J.R., Stebbing, M.J. and Furness, J.B. (2005). Investigation of PKC isoform-specific translocation and targeting of the current of the late after hyperpolarising potential of myenteric AH neurons. *Eur. J. Neurosci.* 21: 905–913.
- Niedner, R.H., Buzko, O.V., Haste, N.M., Taylor, A., Gribskov, M. and Taylor, S.S. (2006). Protein Kinase resource: an integrated environment for phosphorylation research. *Proteins*. 63: 78-86.
- Nikaid, H. and Vaara, M. (1987). Outer membrane. In: Neidhardt FC. (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimarium*. Washington. DC: Am. Soc. Microbiol. 7-22.
- Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*. 233: 305-312.

## **Bibliografía**

- Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*. 344: 661-665.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signalling by hidrolisis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. 258: 607-614.
- Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J*. 9: 484-496.
- Nishizuka, Y. (2001). The protein kinase C family and lipid mediators for trans-membrane signalling and cell regulation. *Alcohol clin. Exp. Res.* 25:(5 Suppl. ISBRA):3S-7S.
- Nöel, S., Bacherère, E. y Mialhe, E. (1993). Phagocytosis associated chemiluminiscence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Dev. Comp. Immunol.* 17, 483-493.
- Nöel, D., Pipe, R.K., Elston, R. and Barchér, E. (1994). Antigenic characterization of haemocyte sub-populations in the mussel *Mytilus edulis* by jeans of monoclonal antibodies. *Mar. Biol.* 119: 549-556.
- Noguchi, T., Metz, R., Chem, L., Mattéi, M-G, Carrasco, D. and Bravo, R. (1993). Structure, mapping, and expression of erp, a growth factor-inducible gene encoding a nontransmembrane protein tyrosine phosphatase, and effect of ERP on cell growth. *Moll. Cell. Biol.* 13: 5195-5200.
- Nomura, H., Ase, K., Sekiguchi, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y., Nakano, Y. and Satoh, T. (1986). Stereospecificity of diacylglycerol for stimulus-response coupling in platelets. *Biochem. Biophys. Res.* 140: 1143-1151.
- Novás, A. (2005). Tesis: Estudio de la respuesta inmune en hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Universidad de santiago de Compostela. Facultad de Veterinaria. Campus de Lugo.
- Novás, A., Barcia, R. and Ramos-Martínez, J.I. (2007a). Nitric oxide production by haemocytes from *Mytilus galloprovincialis* shows seasonal variations. *Fish Shellfish Immunol.* 23(4): 886-91.
- Novás, A., Barcia, R. and Ramos-Martínez, J.I. (2007b). Implication of PKC in the seasonal variation of the immune response of the hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its role in interleukin-2-induced nitric oxide synthesis. *IUBMB Life.* 59(10): 659-63.
- Novás, A., Barcia, R. and Ramos-Martínez, J.I. (2007c). After the Prestige oil spill modifications in NO production and other parameters related to the immune response were detected in hemocytes of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology.* 85: 285-290.
- Novás, A., Cao, A., Barcia, R. and Ramos-Martínez, J.I. (2004). Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36: 390-394.
- Oancea, E. and Meyer, T (1996). Reversible desensitization of inositol trisphosphate-induced calcium release provides a mechanism for repetitive calcium spikes. *J. Biol. Chem.* 271(29): 17253-60.
- Oancea, E. and Meyer, T. (1998). Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell.* 95(3): 307-18.
- Ochoa, W., Corbalán-García, S., Eritja, R., Rodríguez-Alfaro, J., Gómez-Fernández, J., Fita, I. and Verdager, N. (2002). Additional .binding sites for anionic phospholipids and calcium ions in the crystal structures of complexes of the C2 domain of protein kinase C alpha. *J. Mol. Biol.* 320: 277-291.

- Ochoa, W.F., Torrecillas, A., Fita, I., Verdaguer, N., Corbalán-García, S. and Gómez-Fernández, J.C. (2003). Retinoic acid binds to the C2-domain of protein kinase C (alpha). *Biochemistry*. 42(29): 8774–9.
- Ogita, K., Miyamoto, S., Yamaguchi, K., Koide, H., Fujisawa, N., Kikkawa, U., Sahara, S., Fukami, Y. and Nishizuka, Y. (1992). Isolation and characterization of delta-subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 1592-1596.
- Ogita, K., Miyamoto, S.I., Koide, H., Iwai, T., Oka, M., Ando, K., Kishimoto, A., Ikeda, K., Fukami, Y. and Nishizuka, Y. (1990). Protein kinase C in *Sacharomyces cerevisiae*: comparison with the mammalian enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 5011-5015.
- Ohno, S. and Nishizuka, Y. (2002). Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue, *J. Biochem. (Tokyo)* 132:509–511.
- Ohno, S., Akita, Y., Konno, Y., Imajoh, S. and Suzuki, K. (1988). A novel protein phorbol ester receptor / protein kinase, nPKC, distantly related to the protein kinase C family. *Cell.* 53: 731-741.
- Ohno, S., Migita, S. and Murakami, S. (1989). C-myc-S mu rearrangement in a murine plasmacytoma without visible chromosomal translocations. *Oncogene.* 4(12): 1513-7.
- Oka, N., Yamamoto, M., Schwencke, C., Kawabe, J., Ebina, T., Ohno, S., Couet, J., Lisanti, M.P., and Ishikawa, Y. (1997). Caveolin interaction with protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 272: 33416-33421.
- Olivier, A.R. and Parker, P.J. (1994). Bombesin, platelet-derived growth factor, and diacylglycerol induce selective membrane association and down-regulation of protein kinase C isotypes in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 269(4): 2758–2763.
- Olivier, A.R. and Parker, P.J. (1992). Identification of multiple PKC isoforms in Swiss 3T3 cells: differential down-regulation by phorbol ester. *J. Cell. Physiol.* 152(2):240–244.
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. and Nishizuka Y. (1989). Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: Its structure, expresión and properties. *Proc. Natl. Acad. Csi.* 86: 3099-3103.
- Orr, J. W., Keranen, L. M., and Newton, A. C. (1992). Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 267: 15263–15266.
- Orr, J.W. and Newton, A.C. (1994). Requirement for negative charge on "activation loop" of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 269(44): 27715–27718.
- Ortiz, A., Villalaín, J. and Gómez-Fernández, J.C. (1988). Interaction of diacylglycerols with phosphatidylcholine vesicles as studied by differential scanning calorimetry and fluorescence probe depolarization. *Biochemistry.* 27: 9030–9036.
- Osada, M. and Nomura, T. (1989). Seasonal variations of catecholamine levels in the tissues of the japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 93: 171-173.
- Osada, S., Mizuno, K., Saido, T.C., Akita, Y., Suzuki, K., Kuroki, T., and Ohno, S. (1990). A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J. Biol. Chem.* 265(36): 22434–22440.
- Osada, S., Mizuno, K., Saido, T.C., Suzuki, K., Kuroki, T., and Ohno, S. (1992). A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* 12(9): 3930–3938.

## **Bibliografia**

- Ottaviani, E. (2004). The mollusc as a suitable model for mammalian immune-neuroendocrine investigations. *Inv. Survival. J.* 1: 2-4.
- Ottaviani, E. and Franceschi, C. (1996). The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. *Progr. Neurobiology.* 48: 421-440.
- Ottaviani, E., Caselgrandi, E. and Kletsas, D. (1997). Effect of PDGF and TGF- $\beta$  on the release of biogenic amines from invertebrate immunocytes and their possible role in the stress response. *FEBS. Lett.* 403: 236-238.
- Ottaviani, E., Caselgrandi, E. and Kletsas, D. (1998). The CRH-ACTH-biogenic amines axis in invertebrate immunocytes activated by PDGF and TGF- $\beta$ 1. *FEBS Lett.* 427: 255-258.
- Ottaviani, E., Cossarizza, A., Ortolani, C., Monti, D. and Franceschi, C. (1991). ACTH-like molecules in gastropod mollusc: a possible role in ancestral immune response and stress. *Proc. R. Soc., Lond. B, Biol. Sci.* 245: 215-218.
- Ottaviani, E., Caselgrandi, E., Petraglia, F. and Franceschi, C. (1992). Stress response in the fresh water snail *Planorbarius corneus* (L) (*Gastropoda pulmonada*): interaction between CRF-ACTH and biogenic amines. *Gen. Comp. Endocrinol.* 87: 354-360.
- Ottaviani, E., Franchini, A. and Franceschi, C. (1993a). Presence of several cytokine-like molecules in mollusc haemocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195: 984-988.
- Ottaviani, E., Franchini, A. and Kletsas, D. (2001). PDGF and TGF- $\beta$  in invertebrate immune and neuroendocrine interactions: another sign of conservation in evolution. *Comp. Biochem. Physiol.* 129C: 295-306.
- Ottaviani, E., Franchini, A., Casanelli, S. and Genedani, S. (1995). Cytokines and invertebrate immune responses. *Biol. Cell.* 85: 87-91.
- Ottaviani, E., Franchini, A., Caselgrandi, E., Cossarizza, A., and Franceschi, C. (1994). Relationship between corticotropin-releasing factor and interleukin-2: evolutionary evidence. *FEBS. Lett.* 351:19-21.
- Ottaviani, E., Malagoli, D. and Franchini, A. (2004). Invertebrate humoral factors: cytokines as mediators of cell survival. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 34: 1-25.
- Ottaviani, E., Paemen, L.R. and Stefano, G.B. (1993b). Evidence for nitric oxide production and utilization as a bactericidal agent by invertebrate immunocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 248: 319-324.
- Otte, A.P. and Moon, R.T. (1992). Protein kinase C isoenzymes have distinct roles in neuronal induction and competence in *Xenopus*. *Cell.* 68: 1021-1029.
- Otte, A.P., Koster, C.H., Snoek, C.T. and Durston, A.J. (1988). Protein kinase C mediates induction in *Xenopus laevis*. *Nature.* 334: 618-620.
- Otte, A.P., Kramer, I.M. and Durston, A.J. (1991). Protein kinase C and regulation of the local competence of *Xenopus ectoderm*. *Science.* 251: 570-573.
- Owen, G. (1966). *Digestion*. En: *Physiology of Mollusca*, volumen 2. Ed. K.M. Wilbur and C.M. Yonge. *Academic Press*. New York, pp 53-59.

- Ozer, N.K., Palozza, P., Boscoboinik, D. and Azzi, A. (1993). d-alpha-Tocopherol inhibits low density lipoprotein induced proliferation and protein kinase C activity in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 322: 307-310.
- Palumbo, A. (2005). Nitric oxide in marine invertebrates: a comparative perspective. *Comp. Biochem. Physiol.* 142A:241-248.
- Pandol, S.J. and Schoeffield, M.S. (1986). 1,2-Diacylglycerol, protein kinase C, and pancreatic enzyme secretion. *J. Biol. Chem.* 261:4438-4444.
- Pani, A.K. and Croll, R.P. (2000). Catecholamine concentrations in the hemolymph of the scallop, *Placopecten magellanicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 118: 48-56.
- Pappa, H., Murray-Rust, J., Dekker, L.V., Parker, P.J. and McDonald, N.Q. (1998). Crystal structure of the C2 domain from protein kinase C-delta. *Structure.* 6(7): 885-94.
- Parekh, D., Ziegler, W. and Parker P. (2000). Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO. J.* 19:496-503.
- Parker, P.J. and Dekker, L.V. (1997). *Protein kinase C*. Springer, London.
- Parker, P.J., Bosca, L., Dekker, L., Goode, N.T., Hajibagheri, N., and Hansra, G. (1995). Protein kinase C (PKC)-induced PKC degradation: a model for down-regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 23(1): 153-155.
- Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D. and Ullrich, A. (1986). The complete primary structure of protein kinase C- the major phorbol ester receptor. *Science.* 233(4766): 853-9.
- Parmentier, J.H., Smelcer, P., Pavicevic, Z., Basic, E., Idrizovic, A., Estes, A., and Malik, K.U. (2003). PKC zeta mediates norepinephrine-induced phospholipase D activation and cell proliferation in VSMC. *Hypertension.* 41: 794-800.
- Parsons, M. Keppler, M.D. Kline, A. Messent, A., Humphries, M.J., Gilchrist, R., Hart, I.R., Quittau-Prevostel, C., Hughes, W.E., Parker, P.J. and Ng, T.P. (2002). Site-directed perturbation of protein kinase C- integrin interaction blocks carcinoma cell chemotaxis. *Mol. Cell. Biol.* 22(16): 5897-911.
- Pascale, A., Amadio, M., Scapagnini, G., Lanni, C., Racchi, M., Provenzani, A., Govoni, S., Alkon, D.L. and Quattrone, A. (2005). Neuronal ELAV proteins enhance mRNA stability by a PKC alpha-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 12065-70.
- Pears, C. and Parker, P.J. (1991). Down-regulation of a kinase defective PKC alpha. *FEBS. Letters.* 284(1): 120-122.
- Pears, C., Stabel, S., Cazaubon, S., and Parker P.J. (1992). Studies on the phosphorylation of protein kinase C-a. *Biochem. J.* 283: 515-518.
- Pearson, R.B., Dennis, P.B., Han, J-W., Williamson, N.A., Kozma, S.C., Wettenhall, R.E.H., and Thomas, G. (1995). The principal target of rapamycin-induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *EMBO J.* 14: 5279-5287.
- Pellicena, P. and Kuriyan, J. (2006). Protein-protein interaction in the allosteric regulation of protein kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16:702-709.
- Pepio, A. and Sossin, W. (1998). The C2 domain of the Ca<sup>2+</sup>-independent protein kinase c Apl-II inhibits phorbol ester binding to the C1 domain in a phosphatidic acid-sensitive manner. *Biochemistry.* 37: 1256-1263.

## **Bibliografía**

- Perander, M., Bjorkoy, G. and Johansen, T. (2001). Nuclear import and export signals enable rapid nucleocytoplasmic shuttling of the atypical protein kinase C lambda. *J. Biol. Chem.* 276: (16)13015–24.
- Perletti, G. (1994). Partial purification of protein kinase C isoenzymes from rat liver. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 28: 195-204.
- Perletti, G., Tessitore, L., Sesca, E., Pani, P., Dianzani, M.U., and Piccinini, F. (1996). Epsilon PKC acts like a marker of progressive malignancy in rat liver, but fails to enhance tumorigenesis in rat hepatoma cells in culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 221(3): 688–691.
- Petit, I., Goichberg, P., Spiegel, A., Peled, A., Brodie, C., Seger, R. Nagler, A., Alon, R., Lapidot, T. and Clin, J. (2005). Atypical PKC zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells. *J. Clin. Invest.* 115(1): 168-76.
- Pfeffer, L.M., Eisenkraft, B.L., Reich, N.C., Improta, T., Baxter, G., Daniel-Issakaml, S. and Strulovici B. (1991). Transmembrane signalling by interferon a involves diacylglycerol production and activation of the isoform of protein kinase C in Daudi cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7988-7992.
- Pham, T.N.Q., Brown, B.L., Dobson, P.R.M. and Richardson, V.J. (2003). Protein kinase C-eta (PKC  $\eta$ ) is required for the development of inducible nitric oxide synthetase (iNOS) positive phenotype in human monocytic cells. *Nitric Oxide.* 9: 123-134.
- Picatoste, F., Sarri, E. and Claro, E. (1996). Proteínas G: fosfolipasas, en Receptores para neurotransmisores. Métodos en estructuras moleculares and función, vol. 7 (García JA, eds.) pp. 345–362. Citran-Ediciones en Neurociencia, Barcelona.
- Pipe, R.K. (1990a). Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell. Tissue. Res.* 261: 261-268.
- Pipe, R.K. (1990b). Hidrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* 22: 595-603.
- Pipe, R.K. (1992). Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* 16:111-122.
- Pipe, R.K., Farley, R.S. and Coles, A.J. (1997). The separation and characterization of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell. Tissue. Res.* 289: 537-545.
- Pipe, R.K., Holden, J.A. and Farley, S.R. (1994). The separation and characterization of haemocytes from the marine mussels *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* 1851: 5113-5115.
- Polakis, L.M., Strulovici, B. and Saltiel, A.R. (1990). Interferon-a selectively activates the beta isoform of protein kinase C through phosphatidylcholine hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 6537-6541.
- Pommier, Y., Kerrigan, D., Hartmann, K.D. and Glazer, R.T. (1990). Phosphorylation of mammalian DNA topoisomerase I and activation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 265:9418-9422.
- Pontremoli, S., Michetti, M., Melloni, E., Sparatore, B., Salamino, F., and Horecker, B.L. (1990). Identification of the proteolytically activated form of protein kinase C in stimulated human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(10): 3705–3707.
- Poole, D.P., Hunne, B., Robbins, H.L. and Furness, J.B. (2003). Protein kinase C isoforms in the enteric nervous system. *Histochem. Cell. Biol.* 120: 151–161.



- Poole, D.P., Nguyen, T.V., Kawai, M. and Furness, J.B. (2004). Protein kinases expressed by interstitial cells of Cajal. *Histochem. Cell. Biol.* 121: 21 – 30.
- Preiss, J., Loomis, C.R., Bishop, W.R., Stein, R., Niedel, J.E. and Bell, R.M. (1986). Quantitative measurement of Sn-1,2-diacylglycerols present in platelets, hepatocytes, and Ras- and Sis-transformed normal rat kidney cells. *J. Biol. Chem.* 261: 8597–8600.
- Prekeris, R., Mayhew, M.W., Cooper, J.B. and Terrian, D.M. (1996). Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J. Cell. Biol.* 132: (1–2)77–90.
- Pryer, N.K., Wuestehube, L.J., and Schekman, R. (1992). Vesicle-mediated protein sorting. *Annu. Rev. Biochem.* 61:471-516:471–516.
- Quest, A.F., Bloomenthal, J., Bardes, E.S. and Bell R.M. (1992). The regulatory domain of protein kinase C coordinates four atoms of zinc. *J. Biol. Chem.* 267: 10193-10197.
- Quest, A.F. (1996) Regulation of protein kinase C: a tale of lipids and proteins. *Enzyme Protein* 49(5-6): 231–261.
- Quest, A.F. and Bell, R.M. (1994). The regulatory region of protein kinase C $\lambda$ . Studies of phorbol ester binding to individual and combined functional segments expressed as glutathione S-transferase fusion proteins indicate a complex mechanism of regulation by phospholipids, phorbol esters, and divalent cations. *J. Biol. Chem.* 269: 20000–20012.
- Quittau-Prevostel, C., Delaunay, N., Collazos, A., Vallentin, A. and Joubert D. (2004). Targeting of PKC alpha and epsilon in the pituitary: a highly regulated mechanism involving a GD(E)E motif of the V3 region. *J. Cell. Sci.* 117(Pt1): 63–72.
- Raghunath, A., Ling, M. and Larsson, C. (2003). The catalytic domain limits the translocation of protein kinase C alpha in response to increases in Ca<sup>2+</sup> and diacylglycerol. *Biochem. J.* 370(Pt 3): 901–12.
- Ramos-Martínez, J.I., Villamarín, J., Barcia, R., Vázquez, M. and Ibarguren, I. (1993). The role of fructosa-2,6-bisphosphate in the regulation of marine mussels glycolysis / gluconeogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.* 104B: 641-647.
- Rasmussen, L.P.D., Hage, E. and Karlog, O. (1985). An electron microscope study of the circulating leucocytes of the marine mussels *Mytilus edulis*. *J. Invertebr. Pathol.* 45: 158-167.
- Ratcliffe, N.A. and Rowley, A.F. (1979). A comparative synopsis of the structure and function of the blood cells of insects and other invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 3: 189-221.
- Ratcliffe, N.A. and Rowley, A.F. (1981). Invertebrate blood cells, vol I and vol II. *Academic Press*, New York.
- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. and Rhodes, C.P. (1985). Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.* 97: 183-350.
- Rechsteiner, M. and Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci.* 21(7): 267–71.
- Reddy, S. and Aggarwal, B.B. (1994). Curcumin is a non-competitive and selective inhibitor of phosphorylase kinase. *FEBS Lett.* 341:19–22.

## **Bibliografía**

- Reimann, T., Büsher, D., Hipskind, R.A., Krautwald, S., Lohmann-Mathes, M.L. and Baccarini, M. (1994). Lipopolysaccharide induces activation of the Raf-1/MAP Kinase pathway: a putative role for Raf-1 in the induction of the IL-1 beta and the TNF-alpha genes. *J. Immunol.* 153: 5740-5750.
- Renè, R. and Spitzer, J.A. (1997). Effects of female hormones (17 $\beta$ -Estradiol and progesterone) on nitric oxide production by alveolar macrophages in rats. *Nitric Oxide.* 1: 453-462.
- Rennecke, J., Johannes, F.J., Richter, K.H., Kittstein, W., Marks, F., and Gschwendt, M. (1996). Immunological demonstration of protein kinase C mu in murine tissues and various cell lines. Differential recognition of phosphorylated forms and lack of down-regulation upon 12-Otetradecanoylphosphol-13-acetate treatment of cells. *Eur. J. Biochem.* 242(2): 428-432.
- Roaten, J.B., Kazanietz, M.G., Caloca, M.J., Bertics, P.J., Lothstein, L., Parrill, A.L., Israel, M. and Sweatman, T.W. (2002). Interaction of the novel anthracycline antitumor agent N-benzyladriamycin-14-valerate with the C1-regulatory domain of protein kinase C: structural requirements, isoform specificity, and correlation with drug cytotoxicity. *Mol. Cancer. Ther.* 1(7): 483-92.
- Robles-Flores, M., Meléndez, L., García, W., Mendoza-Hernández, G., Lam, T.K., Castañeda-Patlán, C. and González-Aguilar, H. (2008). Posttraslational modifications on protein kinase c isoenzymes. Effects of epinephrine and phorbol esters. *Biochim. Biohys. Acta.* 1783: 695-712.
- Rodriguez-Alfaro, J., Gomez-Fernandez, J. and Corbalan-Garcia, S. (2004). Role of the lysine-rich cluster of the C2 domain in the phosphatidylserinedependent activation of PKC alpha. *J. Mol. Biol.* 335:1117-1129.
- Ron, D. and Kazanietz, M. (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* 13:1658-1676.
- Ron, D. and Mochly-Rosen, D. (1994). Agonists and antagonists of protein kinase C function, derived from its binding proteins. *J. Biol. Chem.* 269: 21395-21398.
- Ron, D. and Mochly-Rosen, D. (1995). An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudoanchoring site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92(2): 492-6.
- Ron, D., Chen, C., Caldwell, J., Jamieson, I., Orr, E. and Mochly-Rosen, D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of C proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 839-843.
- Ron, D., Luo, J., and Mochly-Rosen, D. (1995). C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C "in vivo". *J. Biol. Chem.* 270(41): 24180-24187.
- Rosenthal, A., Rhee, L., Yadegari, L., Paro, R., Ulrich, A. and Goeddel, D.V. (1987). The structure and nucleotide sequence of a *Drosophila melanogaster* protein kinase C gene. *EMBO J.* 6: 433-441.
- Rozengurt, E., Sinnott-Smith, J., Van Lint, J., and Valverde, A.M. (1995). Protein kinase D (PKD): a novel target for diacylglycerol and phorbol esters. *Mutat. Res.* 333(1-2):153-160.
- Ruddell, C.L. (1971). The fine structure of oyster agranular amoebocytes from regenerating mantle wounds in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 18: 260-268.
- Ruiz-Villarreal, M., González-Pola, C., Díaz del Rio, G., Lavin, A., Otero, P. and Piedracoba, S. (2006). Oceanographic conditions in North and Northwest Iberia and their influence on the *Prestige* oil spill. *Mar. Pollut. Bull.* 53: 220-238.
- Rybin, V. and Steinberg, S. (1994). Protein kinase C isoforma expression and regulation in the developing rat heart. *Circ. Res.* 74: 299-309.

- Ryves, W.J., Evans, A.T., Olivier, A.R., Parker, P.J., and Evans, F.J. (1991). Activation of the PKC isotypes alpha, beta 1, gamma, delta and epsilon by phorbol esters of different Biological activities. *FEBS. Lett.* 288: 5-9.
- Sabatier, A. (1877). Etudes sur la moule commune (*Mytilus edulis*), Première partie. *Men. Ac. Sc. Lett. Montpellier.* 8: 129.
- Sacktor, T.C. and Schwartz, J. H. (1990). Sensitizing stimuli cause translocation of protein kinase C in *Aplysia* sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2036-2039.
- Sahara, S., Sato, K.I., Aoto, M., Ohnishi, T., Kaise, H., Koide, H., Ogita, K. and Fukami, Y. (1992). Characterization of protein kinase C in *Xenopus oocytes*. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 182: 105-114.
- Saido, T.C., Mizuno, Y. Cono, S., Osada, S., Ohno, K., and Suzuki, K. (1992). Purification and characterization of protein kinase C  $\theta$  from rabbit brain. *Biochemistry.* 31: 482-490.
- Saito, K., Ito, E., Takakuwa, Y., Tamura, M. and Finjo, M. (2003). In situ observation of mobility and anchoring of PKC beta1 in plasma membrane. *FEBS Lett.* 541(1-3):126-31.
- Salamanca, D.A. and Khalil, R.A. (2005). Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochem. Pharmacol.* 70: 1537-1547.
- Sánchez-Pérez, A.M. and Felipo, V. (2005). Serines 890 and 896 of the NMDA receptor subunit NR1 are differentially phosphorylated by protein kinase C isoforms. *Neurochem. Int.* 47(1-2): 84-91.
- Sánchez-Pinera, P., Micol, V., Corbalán-García, S. and Gómez-Fernández, J.C. (1999). A comparative study of the activation of protein kinase C alpha by different diacylglycerol isomers. *Biochem. J.* 337: 387-395.
- Sanjuan, A. (1992). La identificación del mejillón de la Península Ibérica: variabilidad morfológica y polimorfismos alozímicos. *Tesis Doctoral.* Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Sanjuan, A., Quesada, C., Zapata, C. and Álvarez, G. (1986). Identificación del mejillón del NO. de la Península Ibérica como *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Acta. Cient. Compostel.* 23: 35-79.
- Sanjuan, A., Quesada, H., Zapata, C. and Álvarez, G. (1990). On the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. On NW coasts of the Iberica Peninsula . *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 143: 1-14.
- Sanjuan, A., Zapata, C. and Álvarez, G. (1994). *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus edulis* on the coasts of the Iberica Peninsula. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 13: 131-146.
- Sano, K., Takai, Y., Yamanishi, J. and Nishizuka, Y. (1983). A role of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in human platelet activation. Comparison of thrombin and collagen actions. *J. Biol. Chem.* 258: 2010-2013.
- Santhanagopalan, V. and Yoshino, T.P. (2000). Monoamines and their metabolitos in the freshwater snail *Biomphalaria glabatra*. *Comp. Biochem. Physiol.* 125: 469-478.
- Sassa, T. and Miwa, J. (1992). Purification and characterization of protein kinase C from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* 282: 219-223.
- Sawada, M., Cleary, L.J. and Byrne, J.H. (1989). Inositol trisphosphate and activators of protein kinase C modulate membrane currents in tail motor neurons of *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 61: 302-310.

## **Bibliografia**

- Schaap, D. and Parker, P.J. (1990). Expression, purification, and characterization of protein kinase C-epsilon. *Journal of Biological Chemistry*. 265(13): 7301–7307.
- Schaap, D., Parker, P.J., Bristol, A., Kriz, R. and Knopf, J. (1989). Unique substrate specificity and regulatory properties of PKC epsilon: a rationale for diversity. *FEBS Lett.* 243(2): 351-357.
- Schaeffer, E., Smith, D., Mardon, G., Quinn, W. and Zucker, C. (1989). Isolation and characterization of two new *Drosophila* protein kinase C genes, including one specifically expressed in photoreceptor cells. *Cell*. 57: 403-412.
- Schechtman, D., Craske, M.L., Kheifets, V., Meyer, T., Schechtman, J. and Mochly-Rosen, D. (2004). A critical intramolecular interaction for protein kinase Cepsilon translocation. *J. Biol. Chem.* 279(16): 15831–40.
- Schenk, P.W. and Snaar-Jagalska, B.E. (1999). Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1449(1): 1–24.
- Schmalz, D., Kalkbrenner, F., Hucho, F. and Buchner, K. (1996). Transport of protein kinase C alpha into the nucleus requires intact cytoskeleton while the transport of a protein containing a canonical nuclear localization signal does not. *J. Cell. Sci.* 109(Pt 9): 2401–6.
- Schorn, K. and Marsh, D. (1996). Lipid chain dynamics and molecular location of diacylglycerol in hydrated binary mixtures with phosphatidylcholine: spin label ESR studies. *Biochemistry*. 35: 3831–3836.
- Schultz, A., Jonsson, J.I. and Larsson, C. (2003). The regulatory domain of protein kinase Ctheta localises to the Golgi complex and induces apoptosis in neuroblastoma and Jurkat cells. *Cell. Death. Differ.* 10(6): 662–75.
- Schulz, K., Kerber, S. and Kelm, M. (1999). Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO<sub>2</sub> in aqueous and protein-containing samples. *Nitric. Oxide*. 3: 225-234.
- Seed, R. and Suchanek, T.H. (1992). Population and community ecology of *Mytilus*. En: The mussel *Mytilus*: Ecology, physiology, genetics and culture (Ed. Gosling, E.), pp. 87-169, *Elsevier*, Amsterdam.
- Sesca, E., Perletti, G.P., Binasco, V., Chiara, M., and Tessitore, L. (1996). Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase 2 and CTPphosphocholine cytidyltransferase expressions are related with protein kinase C isozymes in developmental liver growth. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 229(1): 158–162.
- Shao, X., Davletov, B.A., Sutton, R.B., Sudhof, T.C. and Rizo, J. (1996). Bipartite Ca<sup>2+</sup>-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science*. 273: 248–251.
- Shapira, L., Sylvia, L.V., Halabi, A., Soskolne, W.A., Van Dyke, T.E., Dean, D.D., Boyan, D.B. and Schwartz, Z. (1997). Bacterial lipopolysaccharide induces early and late activation of protein kinase C in inflammatory macrophages by selective activation of PKC epsilon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240: 629-634.
- Shapira, L., Takashita, S., Champagne, C., Amar, S. and Van Dyke, T.E. (1994). Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF-α and IL-1β production by human monocytes. *J. Immunol.* 153: 1818-1825.
- Sharkey, N.A., Leach, K.L. and Blumberg, P.M. (1984). Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 607–610.
- Shearman, M.S., Naor, Z., Seiguchi, K., Kishimoto, A., and Nishizuka, Y. (1989). Selective activation of the gamma-subspecies of protein kinase C from bovine cerebellum by arachidonic acid and its lipoxigenase metabolites. *FEBS. Lett.* 243:177-182.

- Shelton, M.E., Chapman, P.J., Foss, S.S. and Fisher, W.S. (1999). Degradation of weathered oil by mixed marine bacteria and the toxicity of accumulated water soluble material to two marine crustacean. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 13-20.
- Shenolikar, S. (1994). Protein serine/Threonine phosphatase--new avenues for cell regulation. *Annu.Rev. Cell. Biol.* 10: 55-86.
- Shi, Z., Resing, K.A. and Ahn, N.G. (2006). Networks for the allosteric control of protein kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16: 686-692.
- Shirai, Y. and Saito, N. (2002). Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation and targeting. *J. Biochem.* 132: 663-668.
- Simon, A.J., Milner, Y., Saville, S.P., Dvir, A., Mochly-Rosen, D. and Orr, E. (1991). The identification and purification of a mammalian-like protein kinase C in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. R. Soc. London (Biol)* 243:165-171.
- Singer, M., Martin, L.D., Vargaftig, B.B., Park, J., Gruber, A.D., Li, Y. and Adler, K.B. (2004). A MARCKS-related peptide blocks mucus hypersecretion in a mouse model of asthma. *Nat. Med.* 10: 193-196.
- Singh, S. and Aggarwal, B.B. (1995). Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J. Biol. Chem.* 270: 24995-25000.
- Singh, S. and Khar, A. (2006). Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy. *Anticancer Agents Med. Chem.* 6: 259-270.
- Skibinski, D.O.F., Gallagher, C. and Beynon, C.M. (1994). Sex limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics.* 138: 801-809.
- Slater, S.J., Cox, K.J., Lombardi, J.V., Ho, C., Kelly, M.B., Rubin, E. and Stubbs, C.D. (1993). Inhibition of protein kinase C by alcohols and anaesthetics. *Nature.* (London) 364: 82-84.
- Slater, S.J., Kelly, M.B., Taddeo, F.J., Ho, C., Rubin, E. and Stubbs, C.D. (1994). The modulation of protein kinase C activity by membrane lipid bilayer structure. *J. Biol. Chem.* 269: 4866-4871.
- Slater, S.J., Malinowski, S.A. and Stubbs, C.D. (2004). The nature of the hydrophobic *n*-alkanol binding site within the C1 domains of protein kinase Calpha. *Biochemistry.* 43(23): 7601-9.
- Slater, S.J., Seiz, J.L., Cook, A.C., Buzas, C.J., Malinowski, S.A., Kershner, J.L., Stagliano, B.A. and Stubbs, C.D. (2002). Regulation of PKC alpha activity by C1-C2 domain interactions. *J. Biol. Chem.* 277(18):15277-85.
- Sloley, B.D., Juorio, A.V. and Durden, D.A. (1990). High-performance liquid chromatographic analysis of monoamines and some of their  $\gamma$ -glutamyl conjugates produced by the brain and other tissues of *Helix aspersa* (Gastropoda). *Cell. Mol. Neurobiol.* 10: 175-191.
- Smith, K.A. (1988). Interleukin-2: inception, impact and implications. *Science.* 240: 1169-1176.
- Smith, V.J. (1991). Invertebrate Immunology: Phylogenetic, Ecotoxicological and Biomedical. *Comp. Haematol. Int.* 1: 61-76.
- Smith, V.J. and Söderhäll, K. (1983). Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system "in vitro". *Cell. Tissue Res.* 233: 295-303.

## **Bibliografía**

- Smith, V.J. and Söderhäll, K. (1991). A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 15: 251-261.
- Snyder, M.J., Girvetz, W. and Mulder, E.P. (2001). Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41: 22-29.
- Soares da Silva, I.M., Vilanova, M., Bleher, R. and Machado, J. (2002). Cytometric, morphologic and enzymatic characterisation of haemocytes in *Anadonta cygnea*. *Comp. Biochem. Physiol.* 132A: 541-553.
- Söderhäll, K. and Smith, V.J. (1983). Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods and prophenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* 7: 229-239.
- Song, J.C., Hrnjez, B.J., Farokhzad, O.C. and Matthews, J.B. (1999). PKC epsilon regulates basolateral endocytosis in human T84 intestinal epithelia: role of F-actin and MARCKS. *Am. J. Physiol.* 277: C1239-C1249.
- Song, Y., Sonawane, N.D., Salinas, D., Qian, L., Pedemonte, N., Galiotta, L.J. and Verkman, A.S. (2004). Evidence against the rescue of defective DeltaF508-CFTR cellular processing by curcumin in cell culture and mouse models. *J. Biol. Chem.* 279: 40629-40633.
- Sonnenburg, E.D., Gao, T. and Newton, A.C. (2001). The phosphoinositide dependent kinase, PDK-1, phosphorylates conventional protein kinase C isozymes by a mechanism that is independent of phosphoinositide-3-kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 45289-97.
- Sontag, E., Sontag, J.M., and Garcia, A. (1997). Protein phosphatase 2A is a critical regulator of protein kinase C zeta signaling targeted by SV40 small t to promote cell growth and NF- $\kappa$ B activation. *EMBO J.* 16: 5662-5671.
- Soriano, J.A., Viñas, L., Franco, M.A., González, J.J., Ortiz, L. and Bayona, J.M. (2006). Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galicia coast (NW Spain) affected by the *Prestige* oil spill. *Sci. Total Environ.* 370: 80-90.
- Sossin W.S. and Schwartz, J.H. (1993). Ca<sup>2+</sup>-independent protein kinase Cs contain an amino-terminal domain similar to the C2 consensus sequence. *Trends. Biochem. Sci.* 18(6): 207-208.
- Sossin, W., Díaz-Arrastia, R. and Schwartz, J. (1993). Characterization of two isoforms of protein kinase C in the nervous system of *Aplysia californica*. *J. Biol. Chem.* 268: 5763-5768.
- Sossin, W., Sacktor, T. and Schwartz, J. (1994). Persistent activation of protein kinase C during the development of long-term facilitation in *Aplysia*. *Learning Memory.* 1:189-202.
- Sossin, W.S. and Schwartz, J.H. (1992). Selective activation of Ca<sup>2+</sup>-activated PKCs in *Aplysia* neurons by 5-HT. *J. Neuroscience.* 12:1160-1168.
- Souroujon, M.C. and Mochly-Rosen, D. (1998). Peptide modulators of protein-protein interactions in intracellular signaling. *Nat. Biotechnol.* 16(10): 919-24.
- Southwell, B.R. (2003). Localization of protein kinase C theta immunoreactivity to interstitial cells of Cajal in guinea-pig gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol. Motil.* 15: 139-147.
- Sozzani, S., Agwu, D.E., McCall, C.E., O'Flaherty, J.T., Schmitt, J.D., Kent, J.D. and McPhail, L.C. (1992). Propranolol, a phosphatidate phosphohydrolase inhibitor, also inhibits protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 267: 20481-20488.

- Spies, R.B. and Davis, P.H. (1982). Toxicity of Santa Barbara Seoop oil to starfish embryos. Part3. Influence of parental exposure and the effects of other curde oils. *Mar. Environ. Res.* 6: 3-12.
- Spizz, G. and Blackshear, P.J. (2001). Overexpression of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate inhibits cell adhesion to extracellular matrix components. *J. Biol. Chem.* 276: 32264–32273.
- Stahelin, R.V., Digman, M.A., Medkova, M., Ananthanarayanan, B., Rafter, J.D., Melowic, H.R. and Cho, W. (2004). Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Cdelta. *J. Biol. Chem.* 279: 29501–29512.
- Stahelin, R.V., Digman, M.A., Medkova, M., Ananthanarayanan, B., Melowic, H.R., Rafter, J.D., and Cho, W. (2005). Diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Cepsilon: mechanistic differences between protein kinases C-delta and C-epsilon. *J. Biol. Chem.* 280: 19784–19793.
- Staudinger, J., Lu, J. and Olson, E.N. (1997). Specific interaction of the PDZ domain protein PICK1 with the COOH terminus of protein kinase C-alpha. *J. Biol. Chem.* 272(51): 32019–24.
- Staudinger, J., Zhou, J., Burgess, R., Elledge, S.J., and Olson, E.N. (1995). PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system. *J. Cell Biol.* 128(3): 263–271.
- St-Denis, A., Chano, F., Tremblay, P., St-Pierre, Y. and Descoteaux, A. (1998). Protein kinase C $\alpha$  modulates lipopolysaccharide induced functions in a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 273: 32787-32792.
- Stebbins, E.G. and Mochly-Rosen, D. (2001). Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of beta II protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 1029644–1029650.
- Stefano, G.B., Smith, E.M. and Hughes, T.K. (1991). Opioid induction of immunoreactive interleukin-1 in *Mytilus edulis* and human immunocytes; an interleukin-1 like substances in invertebrate neural tissue. *J. Neuroimmunol.* 32: 29-34.
- Steinberg, S.F. (2004). Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase C $\delta$ . *Biochem. J.* 384: 449–459.
- Stewart, D.T., Saavedra, C., Stanwood, R.R., Ball, A.O. and Zouros, E. (1995). Male and female mitochondrial DNA lineage in the blue mussel (*Mytilus edulis*) species group. *Mol. Biol. Evol.* 12: 735-747.
- Stout, R.D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S.K. and Suttles, J. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvirommental influences. *J. Immunol.* 175: 342-349.
- Strong, J.A., Fox, A.P., Tsien, R.W. and Kaczmarek, L.K. (1987). Stimulation of protein kinase C recruits convert calcium channels in *Aplysia* bag cell neurons. *Nature.* 325: 714-717.
- Stubbs, C.D. and Slater, S.J. (1996). The effects of non-lamellar forming lipids on membrane protein–lipid interactions. *Chem. Phys. Lipids.* 81: 185–195.
- Stubbs, C.D. and Slater, S.J. (1999). Ethanol and protein kinase C. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 23(9):1552-60.
- Sumbilla, C., Lewis, D., Hammerschmidt, T. and Inesi, G. (2002). The slippage of the Ca<sup>2+</sup> pump and its control by anions and curcumin in skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 277:13900–13906.

## **Bibliografía**

- Sun, H., Charles, E.H., Lau, L.F. and Tonks, N.K. (1993). MKP-1 (3CH 134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAK kinase "in vivo". *Cell*. 75: 487-492.
- Surh, Y.-J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer*. 3: 768–780.
- Sutton, R.B. and Sprang, S.R. (1998). Structure of the protein kinase C beta phospholipid-binding C2 domain complexed with Ca<sup>2+</sup>. *Structure*. 6(11): 1395–405.
- Sutton, R.B., Davletov, B.A., Berghuis, A.M., Sudhof, T.C. and Sprang, S.R. (1995). Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding fold. *Cell*. 80: 929-938.
- Suzuki, A., Akimoto, K. and Ohno, S. (2003). Protein kinase C  $\lambda_1$  (PKC  $\lambda_1$ ): a PKC isotype essential for the development of multicellular organisms. *J. Biochem*. 133: 9–16.
- Swairjo, M.A., Concha, N.O., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R. and Seaton, B.A. (1995). Ca<sup>(2+)</sup>-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat. Struct. Biol*. 2: 968–974.
- Sweet, M.J. and Hume, D.A. (1996). Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukocyte. Biol*. 60:8-13.
- Tabuse, Y., Nishiwaki, K. and Miwa, J. (1989). Mutations in a protein kinase C homolog confer phorbol ester resistance on *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 243: 1713-1716.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., and Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J. Biol. Chem*. 252(21): 7603–7609.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979). Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem*. 254: 3692-3695.
- Takeuchi, N., Nakamura, T., Takeuchi, F., Hashimoto, E. and Yamamura, H. (1992). Inhibitory effect of mitoxantrone on activity of protein kinase C and growth of HL60 cells. *J. Biochem*. 112: 762-767.
- Tamaoki, T. (1991). Use and specificity of staurosporine, UCN-01, and calphostin C as protein kinase inhibitors. *Meth. Enzymol*. 201: 340-347.
- Tapia-García, J.A. (2000). Una aproximación al estudio de la vía de las tirosinas cinasas en acinos pancreáticos de rata en respuesta a CCK. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.
- Taussing, R., Sweet-Cordero, A. and Scheller, R.H. (1989). Modulation of ionic currents in *Aplysia* motor neurons B15 by serotonin, neuropeptides, and second messengers. *J. Neuroscience*. 9: 3218-3229.
- Taylor, S.S. and Radzio-Andzelm, E. (1994). Three protein kinase structures define a common motif. *Structure*. 2: 345-355.
- Taylor, S.S. and Ghosh, G. (2006). Protein kinases: catalysis and regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 16: 665-667.
- Taylor, S.S. and Radzio-Andzelm, E. (1994). Three protein kinase structures define a common motif. *Structure*. 2(5): 345–355.



- Tepperman, B.L., Chang, Q. and Soper, B.D. (2000). Protein kinase C mediates lipopolysaccharide and phorbol induced nitric oxide synthase activity and cellular injury in the rat colon. *Pharmacol. Exp. Ther.* 295: 1249-1257.
- Tincu, J.A. and Taylor, S.W. (2004). Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48: 3645-54.
- Thompson, C.B. (1995). New insights into recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity.* 3: 531-539.
- Tognon, C.E., Kirk, H.E., Passmore, L.A., Whitehead, I.P., Der, C.J. and Kay, R.J. (1998). Regulation of RasGRP Via a phorbol ester-responsive C1 domain. *Mol. Cell. Biol.* 18: 6995-7008.
- Toker, A., Meyer, M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Aneja, R., Aneja, S., Parra, A., Burns, D.J., Ballas, L.M., and Cantley, L.C. (1994). Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J. Biol. Chem.* 269(51): 32358-32367.
- Toker, A., Sellers, L.A., Amess, B., Yasmina, P., Harris, A. and Aitken, A. (1992). Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor (KCIP-1 /14-3-3) from sheep brain. Amino acid sequence of phosphorylated forms. *Eur. J. Biochem.* 206: 453-461.
- Tonks, N.K. (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7: 833-846.
- Torrecillas, A., Corbalán-García, S. and Gómez-Fernández, J. (2003). Structural study of the C2 domains of the classical PKC isoenzymes using infrared spectroscopy and two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *Biochemistry.* 42: 11661-11668.
- Torrecillas, A., Corbalán-García, S., de Godos, A. and Gómez-Fernández, J.C. (2001). Activation of protein kinase C alpha by lipid mixtures containing different proportions of diacylglycerols. *Biochemistry.* 40: 15038-15046.
- Torrecillas, A., Laynez, J., Menéndez, M., Corbalán-García, S. and Gómez-Fernández, J. (2004). Calorimetric study of the interaction of the C2 domains of classical protein kinase C isoenzymes with Ca<sup>2+</sup> and phospholipids. *Biochemistry.* 43: 11727-11739.
- Torreilles, J. and Guérin, M.C. (2001). The contribution of invertebrate study to the biology of nitric oxide. *J. Soc. Bio.* 195: 413-417.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.C. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8: 205-215.
- Tsutakawa, S.E., Medzihradsky, K.F., Flint, A.J., Burlingame, A.L., and Koshland, D.E., Jr. (1995). Determination of "in vivo" phosphorylation sites in protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 270(45): 26807-26812.
- Ulevitch, R.J. and Tobias, P.S. (1995). Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 437-457.
- Vaandrager, A. and de Jonge, H. (1996). Signalling by cGMP-dependent protein kinases. *Mol. Cell. Biochem.* 157: 23-30.
- Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 56: 395-411.

## **Bibliografía**

- Vairo, G., Royston, A.K. and Hamilton, J.A. (1992). Biochemical events accompanying macrophage activation and the inhibition of colony-stimulating factor-1-induced macrophage proliferation by tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , and lipopolysaccharide. *J. Cell. Physiol.* 151: 630-641.
- Valledor, A.F., Xaus, J., Comalada, M., Soler, C., and Celada, A. (2000). Protein kinase C- $\epsilon$  is required for the induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Immunol.* 164: 29-37.
- Valverde, A.M., Sinnett-Smith, J., Van Lint, J., and Rozengurt, E. (1994). Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 91(18): 8572–8576.
- van den Bout, I., Truong, H.H., Huveneers, S., Kuikman, I., Danen, E.H., and Sonnenberg, A. (2007). The regulation of MacMARCKS expression by integrin beta3. *Exp.Cell. Res.* 313: 1260–1269.
- Vanhaesebroeck, B., Leeyers, S.J., Panayotou, G., and Waterfield M.D. (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* 22: 267–272.
- Verdaguer, N., Corbalán-García, S., Ochoa, W.F., Fita, I. and Gómez-Fernández, J.C. (1999). Ca<sup>2+</sup> bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase C $\alpha$  directly to phosphatidylserine. *Embo J.* 18(22): 6329–38.
- Vincent, J.B., Crowder, M.W. and Averill, B.A. (1992). Hydrolysis of phosphatate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends. Biochem. Sci.* 17:105-110.
- Violin, J.D. and Newton, A.C. (2003). Pathway Illuminated: Visualizing Protein Kinase C Signaling. *Life.* 55(12): 653–660.
- von Knethen, A., Tautenhahn, A., Link, H., Lindemann, D. and Brune, B. (2005). Activation induced depletion of protein kinase C  $\alpha$  provokes desensitization of monocytes/macrophages in sepsis. *J. Immunol.* 174: 4960-4965.
- Voronezhskaya, E.E., Hiripi, L., Elekes, K. and Croll, R.P. (1999). Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: I. Embryonic development of dopamine-containing neurons and dopamine-dependent behaviours. *J. Comp. Neurol.* 404: 285-296.
- Wakelam, M.J. (1998). Diacylglycerol—When is it an intracellular messenger? *Biochim. Biophys. Acta.* 1436: 117–126.
- Wald, D., Commane, M., Stark, G.R. and Li, X. (2001). IRAK and TAK1 are required for IL-18 mediated signaling. *Eur. J. Immunol.* 31:3747-3754.
- Waldmann, T.A. and Goldman, C.K. (1989). The multichain interleukin-2 receptor: a target for immunotherapy of patients receiving allografts. *Am. J. Kidney. Dis.* (5 Suppl 2): 45-53.
- Walsh, D.A., Perkins, J.P. and Krebs, E.G. (1968). An adenosine 3', 5'- monophosphate dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 243: 3763-3765.
- Wang, Q.J., Lu, G., Schlapkohl, W.A. Goerke, A. Larsson, C. Mischak, H. Blumberg, P.M. and Mushinski, J.F. (2004). The V5 domain of protein kinase C plays a critical role in determining the isoform-specific localization, translocation, and biological function of protein kinase C- $\delta$  and- $\epsilon$ . *Mol. Cancer. Res.* 2: 129–140.
- Wang, S., Guo, C.Y., Castillo, A., Dent, P. and Grant, S. (1998) Effect of bryostatin 1 on taxol-induced apoptosis and cytotoxicity in human leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* 56: 635–644.

- Wang, X.Y., Ward, S.M., GerthoVer, W.T. and Sanders, K.M. (2003) Protein kinase Ce translocation in enteric neurons and interstitial cells of Cajal in response to muscarinic stimulation. *Am. J. Physiol.* 285: G593–G601.
- Watson, S.P. and Lapetina, E.G. (1985). 1,2-Diacylglycerol and phorbol ester inhibit agonist-induced formation of inositol phosphates in human platelets: possible implications for negative feedback regulation of inositol phospholipid hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 2623.
- Way, K.J., Chou, E. and King, G.L. (2000). Identification of PKC isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends. Pharmacol. Sci.* 21: 181–187.
- Webb, P.R., Wang, K.Q., Scheel-Telner, D., Pongracz, J., Salmon, M. and Lord, J.M. (2000). Regulation of neutrophil apoptosis: a role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase. *Apoptosis.* 5:451-458.
- Weinstein, S.L., Sanghera, J.S., Lemke, K., De Franco, A.L. and Pelench, S.L. (1992). Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J. Biol. Chem.* 267: 14955-14960.
- Weis, G., Werner-Felmayer, G., Werner, E.R., Grunewald, K., Watcher, H. and Hentze, M.W. (1994). Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *J. Exp. Med.* 180: 969-976.
- Weiss, M., Fischer, G., Barth, E., Boneberg, E., Schneider, E.M., Georgieff, M. and Hartung, T. (2001). Dissociation of LPS induced monocytic ex vivo production of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) and TNF- $\alpha$  in patients with septic shock. *Cytokine.* 13: 51-54.
- Welman, A., Griffiths, J.R., Whetton, A.D. and Dive, C. (2007). Protein kinase C delta is phosphorylated on five novel Ser/Thr sites following inducible overexpression in human colorectal cancer. *Protein Science.* 16: 2711-2715.
- Wetsel, W.C., Khan, W.A., Merchenthaler, I., Rivera, H., Halpern, A.E., Phung, H.M., Negro-Vilar A., and Hannun, Y.A. (1992) Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J. Cell. Biol.* 117(1): 121–133.
- White, K.M. (1937) *Mytilus* Memorian. Liverpool. *Mar. Biol. Comm.* 37: 1-117.
- Wilkinson, S.E., Parker, P.J. and Nixon, J.S. (1993) Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem. J.* 294(Pt 2): 335–337.
- Williams, T. (1852) On the blood proper and chylaqueous fluid of invertebrate animals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 142: 595-653.
- Wolfman, A. and Macara, I.G. (1987). Elevated levels of diacylglycerol and decreased phorbol ester sensitivity in Ras-transformed fibroblasts. *Nature.* 325:359–361.
- Won, Y.K., Ong, C.N. and Shen, H.M. (2005). Parthenolide sensitizes ultraviolet (UV)-B-induced apoptosis via protein kinase C-dependent pathways. *Carcinogenesis.* 26(12): 2149-56.
- Woods, N.M., Cuthebertson, K.S. and Cobbold, P.H. (1986). Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature.* 319: 600-602.
- Xiao, F., Becker, K., Stribling, S., Peters, K. and Hannun, Y. (2000). Regulation of receptor-mediated protein kinase C membrane trafficking by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275: 17024–17034.

## **Bibliografia**

- Xie, Q-W., Whisnant, R. and Nathan, C. (1993). Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 177: 1779-1784.
- Yamate, J., Maeda, M., Benn, S.J., Laithwaite, J.E., Allan, A., Ide, M., Kuwamura, M., Kotani, T., Sakuma, S. and LaMarre, J. (2001) Effects of lipopolysaccharide on a macrophage like cell line (HS-P) from a rat histiocytic sarcoma. *J. Comp. Path.* 125: 15-24.
- Yang, J., Cron, P., Thompson, V., Good, V.M., Hess, D., Hemmings, B.A., Barford, D. (2002). Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol. Cell.* 9(6): 1227-40.
- Yeung, O. and Hurta, RA. (2001). Phorbol ester tumour promoter mediated altered expression and regulation of matrix metalloproteinase-2 in a H-ras transformed cell line capable of benign tumour formation. *Mol. Cell. Biochem.* 220(1-2): 39-48.
- Yonemoto, W., McGlone, M.L. and Taylor, S.S. (1993). N-myristylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase conveys structural stability. *J. Biol. Chem.* 268: 2348-2352.
- Yonemoto, W., McGlone, M.L. and Taylor, S.S. (1997). Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. *Protein Eng.* 8: 915-925.
- Young, S., Parker, P.J., Ullrich, A., and Stabel, S. (1987). Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochem. J.* 244(3): 775-779.
- Yule, D.I. and Williams, J.A. (1994). Stimulus-secretion coupling in the pancreatic acinus, en *Physiology of the Gastrointestinal Tract, vol. 2, 3<sup>a</sup> ed.* (Johnson LR, Jacobson ED, Christensen J, Alpers DH, and Walsh JH, eds.) pp. 1447-1472. Raven Press, New York.
- Zang, R., Müller, H., Kielbassa, K., Marks, F. and Gschwendt, M. (1994). Partial purification of a type  $\eta$  protein kinase C from murine brain: separation from other protein kinase C isoenzyme and characterization. *Biochem. J.* 304: 641-647.
- Zhanf, F.X., Kirschning, C.J. and Mancinelli, R. (1999). Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-Kappa $\beta$  through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.* 274:7611-7614.
- Zhang, G., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M. and Hurley J.H. (1995). Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell.* 81(6): 917-24.
- Zhang, J., Tachado, S.D., Patel, N., Zhu, J., Imrich, A., Manfrulli, P., Cushion, M., Kinnane, T.B. and Koziel, H. (2005). Negative regulatory role of mannose receptors on human alveolar macrophage proinflammatory cytokine release "in vitro". *J. Leukoc. Biol.* 78(3): 665-74.
- Zhao, B., Stavchansky, S.A., Bowden, R.A. and Bowman, P.D. (2003). Effect of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha on gene expression in human endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284: 1577-1583.
- Zheng, J. and Ramirez, V.D. (2000). Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br. J. Pharmacol.* 130: 1115-1123.
- Zinyama, R.M., Bancroft, G.J. and Sigola, L.B. (2001). Adrenaline suppression of the macrophage nitric oxide response to lipopolysaccharide is associated with differential regulation of tumour necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 10. *Immunology.* 104: 439-446.

## **Bibliografía**

Zouros, E., Ball, A.O., Saavedra, C. and Freeman, K.R. (1994). An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 7463-7467.

Zwaan, A. and Mathieu, M. (1992). Cellular Biochemistry and endocrinology. En *The mussel Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture*. Ed por Gosling E. *Elsevier*, Amsterdam Holanda. Pp: 223-307.

# *Abreviaturas*

**A B C D.....W**

## Abreviaturas

ALS	Solución antiagregante Alseve
ADP	Adenosina - 5' - difosfato
AMPC	Adenosina -3', 5' - monofosfato cíclico
aPKs	Proteínas quinasas atípicas
aPKC(s)	Proteína quinasa C atípica (s)
ATP	Adenosina - 5' - trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
BTK	Tirosina quinasa de Bruton
CBR	Calcium binding región / Región de unión del calcio
CCK	Colecistoquinina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
cPKC(s)	Proteína quinasa clásica (s)
CPM	Cuentas por minuto
DAG	Diacilglicerol
DE52 ó DEAE	Dietilaminoetil celulosa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
DTT	DL-ditiotreitol
EC	Extracto crudo
EGF	Factor de crecimiento epidermico
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EGTA	Ácido etilenglicol bis ( $\beta$ - aminoetileter)- N, N, N', N' - tetracético
ePKs	Proteínas quinasas eucarióticas o típicas
ERK2	Quinasa regulada por señal extracelular de tipo 2
EtOH	Etanol
FCS	Suero fetal bovino
FPLC	Fast proteín liquid chromatography
GMP	guanosina - 5' - monofosfato (ácido guanílico, ó guanilato).
GTP	Guanosin - 5' - trifosfato
GF	Gel filtración
H III-S	Histona tipo III – S
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxietileno)-1-piperazina-etano sulfónico
HTP	Hidroxilapatito

## **Abreviaturas**

ICC	Células intersticiales de Cajal
IFN	Interferon
IL-2	Interleukina 2
Ins(1, 4, 5)P <sub>3</sub> ó IP <sub>3</sub>	Inositol – 1, 4, 5 - Trifosfato
IPANs	Neuronas aferentes primarias intrínsecas
kDa	Kilodalton
Ki	Constante de inhibición
Km	Constante de Michaelis-Menten
lisoPC	Lisofosfatidilcolina
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
MAA	Musculo aductor anterior
MAP	Musculo aductor posterior
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MARB	Musculo aductor retractor del biso
MARCKS	Sustrato para la proteína quinasa C rica en alanina miristoilada
MBP	Proteína básica mielina
MKP-1	Fosfatasa quinasa de MAP
mc-NOS	Oxido nítrico sintetasa constitutiva
mw-NOS	Oxido nítrico sintetasa inducible
mCi	Milicurios
min	Minutos
MPRB	Musculo posterior retractor del biso
mUI	Miliunidades internacionales
nPKC(s)	Proteína quinasa C nueva (s)
NLS	Secuencia de localización nuclear
NOS	Oxido nítrico sintasa
OLGs	Oligodendrocitos
PA	Ácido fosfatídico
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PDBu	Forbol -12,13- dibutirato
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDK-1	Proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinositol



PDZ	Dominio denominado así por las tres proteínas en las que fue identificado por primera vez: PSD-95, la proteína supresora de tumores DLG en <i>Drosophila</i> y una proteína llamada ZO-1. Los dominios PDZ intervienen en el reclutamiento y la interacción de proteínas y ayudan a formar armazones proteicos y redes de señalización.
PH	Dominio de anclaje a la membrana, un pequeño modulo de unos 120 aminoácidos que se produce en una amplia gama de proteínas del citoesqueleto, o proteínas implicadas en la señalización intracelular.
PI3-K	Fosfatidilinositol 3 – quinasa
PI	Fosfatidilinositol
PICK	Proteína perinuclear que se une a PKC
PIP	Fosfatidilinositol 4 - Fosfato
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5 difosfato
PIP <sub>3</sub>	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PK(s)	Proteína quinasa (s)
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico
PKG	Proteína quinasa dependiente de GMP cíclico
PKC	Proteína quinasa C <i>cPKCs</i> : proteínas quinasas C clásicas. <i>nPKCs</i> : proteínas quinasas C noveles o nuevas. <i>aPKCs</i> : proteínas quinasas C atípicas.
PKCI	Proteína inhibidora de la PKC
PKD	Proteína quinasa D
PKM	Fragmento catalítico de la PKC
PL	Fosfolípido
PLA2	Fosfolipasa 2A
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMA	Forbol 12-miristoato 13-acetato
PMSF	Formil metil sulfonil fluoruro
p.p.m.	Partes por millón
PS	Fosfatidil L-serina
PtdIns <sub>4,5</sub> P <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

## **Abreviaturas**

PTK	Proteína tirosina quinasa
RACKs	Receptor para quinasas C activadas
RH	Hemocito redondo
RICKS	Receptor para quinasas C inactivadas
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsas	Ribonucleasas
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida - SDS
Ser-P	Serina fosfato
SH	Hemocito expandido
SNC	Sistema nervioso central
Temed	Tetrametiletildiamina
Thr-P	Treonina fosfato
Tyr-P	Tirosina fosfato
TBS	Tampón Tris salino
TCR	Receptor del antígeno en la célula T
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante
TK	Tirosina quinasa
TLK	Tirosine kinase like
TTBS	Tampón Tris salino tween
V <sub>máx</sub>	Velocidad máxima

**Abreviaturas**

<b>Aminoácidos</b>	<b>Simbología</b>	
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Tirosina	Tyr	Y
Triptófano	Trp	T
Valina	Val	V