

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA  
Y BIOLOGIA MOLECULAR II**

**PAPEL DE LAS PROTEINA QUINASAS PKC, RAF-1 Y ERK2  
EN LA ACTIVACION Y PROLIFERACION DE LINFOCITOS T**

Memoria de Tesis para optar al grado de doctor presentada por

**CARLOS LISBONA LAGUNA**

Directoras de Tesis:

**Dra. Margarita Fernández Martín**

Profesora Titular de la U.A.M.

**Dra. Susana Alemany de la Peña**

Colaborador Científico del C.S.I.C.

Tutora:

**Dra. Margarita Fernández García de Castro**

Profesora Titular de la U.C.M.

MADRID, 1995

El presente trabajo ha sido realizado en el laboratorio B-11 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.M - Instituto de Investigaciones Biomédicas del C.S.I.C, bajo la codirección de la Dra. Margarita Fernández Martín y la Dra. Susana Alemany de la Peña, con ayuda de una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

## **ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

AMPc:	Adenosín monofosfato cíclico.
ATP:	Adenosín trifosfato.
BIS:	Bisindolilmaleimida GF 109203X.
β-ME:	β-mercaptoetanol.
BSA:	Albúmina de suero bovino.
CHX:	Cicloheximida
Con A:	Concanavalina A.
cpm:	Cuentas por minuto.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
DAG:	Diacilglicerol.
DTT:	Ditioteitrol.
FCS:	Suero fetal de ternera.
FPLC:	Cromatografía líquida de flujo.
EDTA:	Acido etilén-diamino-tetracético.
EGTA:	Acido etilén-glicol bis (β amino etil eter-N,N'-tetracético)
ERK2:	Quinasa regulada por señal extracelular 2.
FPLC:	Cromatografía líquida de flujo.
IL-2:	Interleuquina 2.
IP <sub>3</sub> :	Inositol trifosfato.
kDa:	Kilodalton.
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógeno.
MBP:	Proteína básica de mielina.
PBS:	Tampón fosfato salino.
PC:	Fosfatidil colina.
PDBu:	Forbol-12,13-dibutirato.
PIP <sub>2</sub> :	Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato.
PKA:	Proteína quinasa A.
PKC:	Proteína quinasa C.
PLA <sub>2</sub> :	Fosfolipasa A <sub>2</sub> .
PLC:	Fosfolipasa C.
PLD:	Fosfolipasa D.
PMSF:	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo.
PS:	Fosfatidilserina.
rpm:	Revoluciones por minuto.
SDS:	Dodecil sulfato sódico.
TCR:	Receptor del antígeno en la célula T.
TBS:	Tampón Tris salino.

**INDICE**

## I- INTRODUCCION

1.- PROTEINA QUINASAS IMPLICADAS EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES.....	1
1.1- VIAS DE LAS MAP QUINASAS .....	1
1.1.1.- Señalización receptor tirosina quinasa -Ras .....	3
1.1.2.- Grupo de las MAPKKKs.....	4
1.1.2.1.- Miembros de las MAPKKKs. Regulación.....	4
1.1.2.2.- La familia de las proteína quinasas Raf.....	5
1.1.2.3.- Estructura de las proteína quinasas Raf.....	5
1.1.2.4.- Activación de Raf .....	6
1.1.2.5.- Relación de la hiperfosforilación de Raf con su activación.....	7
1.1.3.- Grupo de las MAPKKs.....	8
1.1.3.1.- Miembros de las MAPKKs.....	8
1.1.3.2.- Regulación de las MAPKKs.....	8
1.1.3.3.- Sustratos de las MAPKKs.....	9
1.1.4.- Grupo de las MAPKs.....	9
1.1.4.1.- Miembros de las MAPK.....	9
1.1.4.2.- Regulación de las MAPKs.....	10
1.1.4.3. Sustratos de las MAPKs.....	10
1.2.- PROTEINA QUINASA C.....	11
1.2.1.- Isoformas de PKC .....	12
1.2.2.- Estructura de las PKCs.....	13
1.2.3.- Activación, proteólisis y degradación de PKC.....	14
1.2.4.- Sustratos de PKC.....	17
1.2.4.1.- Sustratos de PKC in vitro.....	17
1.2.4.2.- Sustratos de PKC in vivo.....	17
2.- TRANSDUCCION DE LA SEÑAL EN LINFOCITOS T.....	18
2.1.- Transducción de la señal en la transición G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> .....	18
2.1.1.- Activación de PLC y de PKC.....	19
2.1.1.1.- Activación de PLC.....	19
2.1.1.2.- Activación de PKC.....	21
2.1.2.- Activación de calcineurina.....	21
2.1.3.- Activación de Ras.....	22
2.2.- Transducción de la señal en la transición G <sub>1</sub> /S.....	23
3.- PROTEINA FOSFATASAS IMPLICADAS EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES.	24
3.1.- Tipos de proteína fosfatasa.....	24
3.2.- Proteína fosfatasa que actúan en la vía de las MAPKs.....	25

## II-OBJETIVOS .....27

## III-MATERIALES Y METODOS

MATERIALES.....	28
METODOS.....	28
1.- OBTENCION DE LINFOCITOS T.....	28
1.1.- Obtención de linfocitos T quiescentes (G <sub>0</sub> ).....	29
1.2.- Obtención de linfoblastos T (G <sub>1</sub> ).....	29
2.- CONTAJE DE CELULAS.....	30

3.- MEDIDA DE LA PROLIFERACION CELULAR.....	30
3.1.- Incorporación de [ <sup>3</sup> H]-timidina de linfocitos T (G <sub>0</sub> ) .....	30
3.2.- Incorporación de [ <sup>3</sup> H]-timidina de linfoblastos T (G <sub>1</sub> ) .....	30
4.- INMUNODETECCIONES EN FILTRO.....	31
4.1.- Tampones.....	31
4.2.- Preparación de extractos celulares .....	32
4.2.1.- Extractos totales .....	32
4.2.2.- Preparación de fracciones citosólica y particulada.....	32
4.3.- Medida de la concentración de proteína.....	32
4.4.- Electroforesis de proteínas.....	32
4.5.- Inmunotransferencia.....	33
4.6.- Incubación del filtro.....	33
5.- CROMATOGRAFIAS.....	33
5.1.- Cromatografía en Mono-Q HR 5/5.....	33
5.1.1.- Tampones.....	33
5.1.2.- Preparación de la muestra y cromatografía.....	34
5.2.- Cromatografía en Heparina-agarosa.....	34
5.2.1.- Tampones .....	34
5.2.2.- Preparación de la muestra y cromatografía.....	34
6.- VALORACION DE LA ACTIVIDAD PKC.....	35
7.- ANALISIS ESTADISTICO.....	35

## IV-RESULTADOS

1.- PAPEL DE PKC EN LAS TRANSICIONES G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> Y G <sub>1</sub> /S DEL CICLO CELULAR DE LINFOCITOS T.....	36
1.1.- Transición G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> .....	36
1.2.- Transición G <sub>1</sub> /S.....	38
2.- ACTIVACION DE DIFERENTES ISOFORMAS DE PKC EN LA TRANSICION G <sub>1</sub> /S41	
2.1.- Estudio de la depleción de las isoformas de PKC .....	41
2.2.- Translocación a la membrana de las isoformas de PKC.....	41
3.- ESTUDIO BIOQUIMICO DE LOS POLIPEPTIDOS p75 ζ Y p82 ζ.....	45
3.1.- Cromatografía en Mono-Q sefarosa.....	45
3.1.1.- Comportamiento cromatográfico de p75 ζ y p82 ζ.....	45
3.1.2.- Ensayo de la actividad PKC. Respuesta a PS/PDBu, BIS y pseudosustrato ζ.....	45
3.2.- Cromatografía en Heparina-agarosa.....	48
3.2.1.- Comportamiento cromatográfico de p75 ζ y p82 ζ.....	48
3.2.2.- Ensayo de la actividad PKC. Respuesta a PS/PDBu.....	48
4.- ESTUDIO DE ERK2 EN LA TRANSICION G1/S.....	53
4.1.- ERK2 es activada tras la estimulación con PDBu.....	53
4.2.- Papel de ERK2 en la transición G <sub>1</sub> /S en linfoblastos T.....	55
4.2.1.- Efecto de BIS en la activación de ERK2.....	55
4.2.2.- Relación proliferación celular/activación ERK2.....	55
4.3.- ERK2 es necesaria pero no suficiente en la transición G <sub>1</sub> /S de linfoblastos T .....	

5.- LA ACTIVACION DE ERK2 PRECEDE A LA FOSFORILACION DE LA QUINASA RAF-1 .....	61
6.- PAPEL DE RAF-1 EN LA TRANSICION G <sub>1</sub> /S.....	61
6.1.- Bloqueo de la hiperfosforilación de Raf-1 por inhibición de PKC.....	61
6.2.- Efecto d un oligodesoxirribonucleótido antisentido de Raf-1 en la transición G <sub>1</sub> /S	64
6.3.- Raf-1 es requerida en la proliferación promovida por PDBu hasta 7 h después del estímulo	67
7.- EFECTO DEL AMP <sub>c</sub> EN LA TRANSICION G <sub>1</sub> /S.....	67
8.- ESTUDIO DE ERK2 Y RAF-1 EN LA TRANSICION G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> .....	70
8.1.- Activación de linfocitos T por Con A.....	70
8.2.- Activación de linfocitos T por PDBu más ionóforo de calcio A23187. ....	70
9.- ESTUDIO DE LA DEFOSFORILACION DE ERK2.....	74
9.1.- Cinética de la defosforilación de ERK2. ....	74
9.2.- Efecto de la inhibición de serina/treonina fosfatasas .....	75
9.3.- Efecto de la inhibición de tirosina fosfatasas y/o fosfatasas duales .....	80
9.4.- Efecto de la inhibición de fosfatasas inducibles .....	84
<b>V-DISCUSION</b>	
1.- ACTIVIDAD DE PKC EN LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS T.....	86
1.1.- Estudio de PKC en la transición G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> . ....	86
1.2.- Estudio de PKC en la transición G <sub>1</sub> /S .....	88
1.2.1.- Especificidad de acción de BIS y estaurosporina.....	88
1.2.2.- Participación de PKC en la transición G <sub>1</sub> /S.....	89
2.- ESTUDIO DE LAS ISOFORMAS PKC $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ , $\epsilon$ Y $\zeta$ EN LA TRANSICION G <sub>1</sub> /S. ....	89
3.- ESTUDIO BIOQUIMICO DE p75 $\zeta$ Y p82 $\zeta$ . ....	92
4.- ACTIVACION DE LAS QUINASAS ERK2 Y RAF-1.....	93
4.1.-Activación de ERK2. ....	93
4.2.-Activación de Raf-1.....	94
4.3.-Relación de ERK2 con Raf-1 .....	95
4.4.-Relación de PKC con Raf-1 y ERK2 .....	97
5.- ESTUDIO DE LA DEFOSFORILACION DE ERK2.....	98
5.1.- Papel de Serina/Treonina fosfatasas .....	98
5.2.- Papel de tirosina fosfatasas. ....	99
5.3.- Papel de fosfatasas inducibles.....	100
<b>VI-CONCLUSIONES</b> .....	102
<b>VII-BIBLIOGRAFIA</b> .....	103

## **I. INTRODUCCION**

El desarrollo de organismos eucariotas multicelulares necesita de la interacción de numerosos procesos de proliferación y diferenciación, que tienen lugar de una forma altamente 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, 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 requieren no solamente la intervención de proteína quinasas, sino también la activación de proteína fosfatasa. Las proteínas dianas son fosforiladas en sitios específicos por una o más proteína quinasas, y estos grupos fosfato son hidrolizados por proteína fosfatasa específicas. Por 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.

## **1.- PROTEINA QUINASAS IMPLICADAS EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES.**

Entre las proteína quinasas que participan en la transmisión de señales, últimamente, se han realizado numerosos estudios de los miembros que pertenecen a las vías de las MAP quinasas y a la familia de las PKCs.

### **1.1- VIAS DE LAS MAP QUINASAS**

Dentro del grupo de proteína quinasas que intervienen en la transducción de señales, se ha dado gran importancia a unas que actúan formando cascadas, en las cuales una quinasa, activada por la interacción de un factor de crecimiento, hormona o antígeno, con su respectivo receptor celular, fosforila y activa a la siguiente quinasa de la vía. El empleo de cascadas de proteína quinasas para la transducción de la señal es interesante porque, en principio, permite la amplificación, retroalimentación, interacción y ramificación de la misma (123).

Estas cascadas de quinasas han sido objeto de numerosos trabajos, siendo la perteneciente a la vía de las denominadas proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPK), vía de las MAPKs, una de las que más se han estudiado en los últimos años.

Aunque hasta hace poco se había considerado como una única vía, se ha visto que realmente representa un modelo al cual se ajustan varías vías similares. La característica común entre ellas es el estar formadas por una unidad funcional, como elemento central, compuesta de tres elementos que forman la cascada de quinasas y que son: Una serina/treonina proteína quinasa, MAPKKK, la cual fosforila y activa a una proteína quinasa de especificidad dual (que actúa sobre residuos de serina/treonina y de tirosina) MAPKK, que a su vez fosforila y activa otra serina/treonina proteína quinasa, MAPK (171).

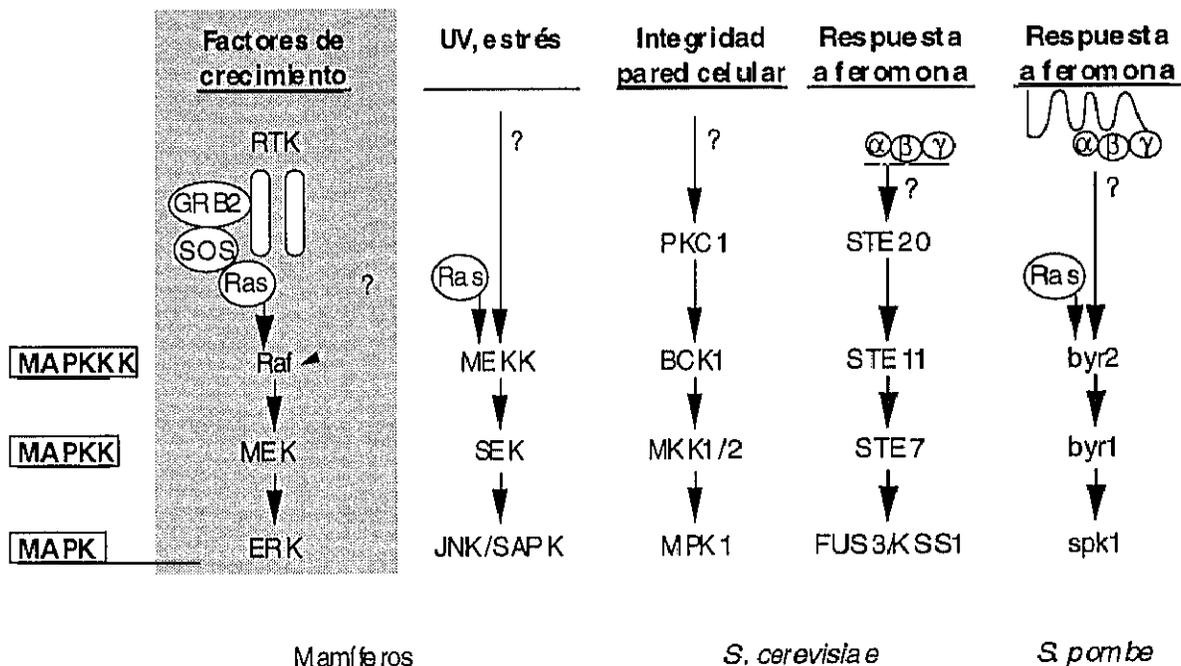


Figura 1. Miembros pertenecientes a vías de las MAPKs identificadas en mamíferos y levaduras. RTK: Receptor tirosina quinasa.

Esta unidad funcional de transducción de señales ha sido adaptada para acoplar diferentes estímulos a diferentes respuestas fisiológicas, uniendo señales generadas en la membrana celular a procesos que tienen lugar en el núcleo. En mamíferos, estas vías se activan como consecuencia de señales que proceden de receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca, receptores de citoquinas y de los acoplados a proteínas G heterotriméricas; y también en respuesta a fenómenos de estrés, como la radiación ultravioleta y el choque térmico (25,56,212,234). Estudios realizados en levaduras han mostrado, que estas quinasas participan en múltiples procesos, tales como: Respuesta a feromona, mantenimiento de la pared celular, crecimiento en alta osmolaridad y formación de esporas (111). En los diferentes procesos, en un determinado paso de la cascada participan quinasas distintas, aunque presentan un cierto grado de homología en estructura y función (Figura 1). Así, por ejemplo, para el caso de las levaduras en

respuesta a feromona las proteína quinasas que van a participar son STE11 (MAPKKK), STE7(MAPKK), y FUS3/KSS1 (MAPK), mientras que en el mecanismo necesario para mantener la integridad de la pared celular son BCK1/SSP31 (MAPKKK), MKK1/MKK2 (MAPKK) y MPK1 (MAPK) (111).

Entre todos los procesos descritos anteriormente, que activan las vías de las MAPKs, uno de los más estudiados es el desencadenado por la unión de factores de crecimiento con sus receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca. Tras la unión ligando-receptor, se va a producir la dimerización del receptor seguida de la autofosforilación del mismo en residuos de tirosina, la cual se va a producir mediante la fosforilación de una molécula de receptor por la otra que forma el dímero (110). Estas tirosinas fosforiladas van a ser reconocidas por proteínas que contienen dominios SH2, a través de los mismos. Las interacciones producidas van a originar una compleja red de señales, provocando la activación de un gran número de proteína quinasas citoplásmicas, entre las que están aquellas que forman la vía de las MAPKs respectiva. En este caso, los elementos de la vía son: Raf-1 (MAPKKK), MEK (MAPKK) y ERK(MAPK) (171).

### 1.1.1.- SEÑALIZACION RECEPTOR TIROSINA QUINASA - RAS.

Algunos de los sitios de autofosforilación en tirosina en los receptores para factores de crecimiento, funcionan como sitios de unión de alta afinidad para los dominios 2 de homología con Src (SH2), que están presentes en varias proteínas. Ejemplos de proteínas que contienen estos dominios SH2 son la fosfolipasa C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), la subunidad p85 de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI-3K), Shc, Nck, Grb2, proteína activadora de la actividad GTPasa (GAP), Syp y p91 (134).

Las proteínas que contienen dominios SH2 pueden ser fosforiladas y activadas por el receptor al que se han unido. El resultado de la fosforilación en tirosina de estas proteínas es la activación de un conjunto de segundos mensajeros y proteína quinasas. Por ejemplo, la activación de PLC $\gamma$ , genera IP $_3$  y DAG (140), el IP $_3$  provoca una liberación del calcio de almacenes intracelulares, y el DAG es un activador de la PKC. Por otro lado, la PI-3K es una proteína heterodimérica que fosforila lípidos de inositol en la posición del hidroxilo D-3 del inositol, la función de los productos generados no se conoce aún por completo (24).

Varias de las proteínas que contiene dominios SH2, como son PLC $\gamma$ , Grb2, GAP y la subunidad p85 de PI-3K, poseen en su secuencia dominios 3 de homología con Src (SH3), que también son dominios implicados en interacciones específicas proteína-proteína durante la transducción de la señal. Estos dominios interactúan con secuencias ricas en prolina.

Están descritos dos ejemplos de reacciones secuenciales de proteína quinasas en la red de la transducción de señal iniciada por moléculas que contienen dominios SH2 y SH3. Una vía, en la que tras la activación de la PLCγ seguida de la liberación de calcio y diacilglicerol, se activarían las isoformas de PKC que fosforilarían a la proteína quinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII), que también es activable por calcio (282). CamKII tiene muchos sustratos, incluyendo factores de transcripción como Ets-1 (124) y la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB) (250).

La segunda vía es más conocida, y es la correspondiente vía de las MAPK. En el caso concreto de la activación de receptores tirosina quinasa, una vez activado el receptor, éste se conecta con las quinasas mediante proteínas adaptadoras. Una de las posibilidades descritas sería utilizando la proteína adaptadora Grb2, que posee un dominio SH2 y dos dominios SH3, y se une a los residuos de tirosina fosforilados de los receptores de factores de crecimiento, como EGF y PDGF, a través del dominio SH2. Mediante los dominios SH3, Grb2 se une a la proteína Sos, que es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina de Ras. El complejo Grb2/Sos es llevado al receptor en la superficie citoplásmica de la membrana plasmática, donde Sos interacciona con Ras-GDP, y cataliza la disociación de GDP de Ras, permitiendo la formación del complejo Ras-GTP, que es la forma activa de Ras, capaz de unirse a sus efectores (25,74,157). Hasta ahora, en mamíferos, se han descrito los siguientes efectores: Las proteínas GAP (que promueven la actividad GTPasa intrínseca de Ras) (176), PI-3K (230) y Raf (177), siendo éste último la MAPKKK de la vía del receptor tirosina quinasa.

### **1.1.2.- GRUPO DE LAS MAPKKKs.**

#### **1.1.2.1.- Miembros de las MAPKKKs. Regulación.**

Comparando las MAPKKs de vertebrados con sus equivalentes en levaduras se ha visto que están altamente relacionados, mientras que no ocurre lo mismo para Raf y STE11 o byr2 (MAPKKKs en levaduras). Esto sugirió que podría haber homólogos de STE11 y byr2 en mamíferos. Confirmando esta hipótesis, se clonó un homólogo de STE11 en ratón, denominado MEKK (152), que estaría actuando al mismo nivel de Raf pero implicado en otras vías. Hasta el momento, entre las MAPKKKs que se han identificado están: Raf, MEKK, STE11, BCK1 y byr2 (Figura 1).

Se han descrito múltiples mecanismos para regular a las MAPKKK. Así, para *Schizosaccharomyces pombe* en la vía de respuesta a feromona, hay un obligado requerimiento de una interacción directa entre RasGTP y byr2 (280) Sin embargo, frente al mismo estímulo, *Saccharomyces cerevisiae* no emplea Ras en la activación de STE11. En *S.cerevisiae* se ha visto que anterior a MAPKKK en la vía activada por feromona

(STE11) y en la implicada en la integridad de la forma celular (BCK1) están situadas las serina/treonina quinasas STE20 y PKC1, respectivamente (154,155).

De todas las MAPKKs, la más estudiada es la perteneciente a la vía activada por el receptor con actividad tirosina quinasa intrínseca, la denominada Raf.

### 1.1.2.2.- La familia de las proteína quinasas Raf.

Trabajos publicados recientemente, han mostrado que las serina/treonina quinasas de la familia Raf se unen a Ras. Mas aún, esta unión es dependiente de GTP y ocurre en la región de unión al efector de Ras. Con anterioridad a estos hallazgos, se sabía que Raf era un elemento posterior a Ras en la vía de transducción de la señal, aunque se desconocía si había una asociación directa. Estos hallazgos comenzaron con análisis bioquímicos de proteínas que pudieran Interaccionar *in vitro* con Ras recombinante. Se encontró que la proteína Raf se unía a Ras de forma dependiente de GTP (187). Posteriormente, esta posibilidad de asociación directa se analizó mediante el sistema de los dos híbridos en levaduras, el cual reveló una asociación directa entre Ras y el dominio regulador amino terminal de Raf (280). Además, comparando la capacidad transformante de Ras con su unión a distintos efectores, se observó que la correlación mejor se producía con la quinasa Raf, indicando que Raf es el efector crítico en la transformación por Ras (16).

Raf-1 es el homólogo celular de v-Raf, el producto del gen transformante del virus 3611 del sarcoma murino. Del mismo modo que Ras, las Raf quinasas fueron descubiertas por primera vez en forma de mutantes con capacidad de transformar las células oncogénicamente (222).

Las Raf quinasas forman una familia de serina/treonina quinasas que están altamente conservadas en la evolución. Este hecho facilitó el aislamiento de homólogos de Raf en invertebrados como *Drosophila* (D-Raf) y en *Caenorhabditis elegans* (Ce-Raf) (32,104). Por experimentos genéticos, se ha mostrado que tales organismos sólo poseen un gen funcional, mientras que en vertebrados se ha descubierto la presencia de tres genes funcionales: A-raf, B-raf, y c-raf-1 (60). Además, se ha comprobado que esta familia de quinasas es esencial para el crecimiento y desarrollo en gusanos, moscas, anfibios y mamíferos .

### 1.1.2.3 Estructura de las proteína quinasas Raf.

Todas las proteínas Raf contienen 3 regiones altamente conservadas (CR1-3) separadas entre sí por regiones variables (60). Estas regiones variables están similarmente conservadas entre distintas especies, y por ello, parece que confieren propiedades específicas de isoenzimas. La región CR1 contiene el dominio de unión a Ras (residuos 51-131), seguido por un motivo que forma una estructura denominada

dedos de Zn. CR2 es una región rica en residuos de treonina y serina, algunos de los cuales son susceptibles de ser fosforilados y actúan como sitios reguladores. Por estudios realizados en células NIH3T3, se piensa que CR1 y CR2 forman la parte reguladora de la molécula Raf, ya que mutaciones, inserciones e incluso la delección completa de esta mitad amino terminal, resultan en una transformación oncogénica, la cual correlaciona con la actividad quinasa constitutiva (109). CR3 contiene el dominio catalítico, el cual presenta más homología con las proteína tirosina quinasas de la familia Src, que con otras proteína quinasas (168).

#### 1.1.2.4.- Activación de Raf

El mecanismo exacto mediante el cual la unión de Ras a Raf afecta a su actividad quinasa aún no se conoce, pero sí se sabe es Ras lleva a Raf a la membrana, en donde un evento aún no caracterizado tiene lugar, el cual activa a Raf y provoca su autofosforilación (123).

Todos los datos apuntan a que la unión de Ras a Raf no es suficiente, y se necesita un factor adicional para su activación. El hecho de que la adición de Ras-GTP a Raf purificado no provoque la activación de la quinasa, indica la necesidad de factores adicionales (60). Por experimentos anteriores, se sabía que la activación de Raf en fibroblastos transformados con Ras era aún dependiente del factor de crecimiento (123). Utilizando una proteína de fusión que constaba de la proteína c-Raf más 17 residuos de la región carboxi terminal de Ras, que contienen su dominio de localización en la membrana, se encontró que esta proteína de fusión, localizada en la membrana plasmática, estaba parcialmente activada, pero para una completa activación se necesitaba de la estimulación por el factor de crecimiento (103). Recientemente, se ha descrito una familia de proteínas denominadas 14-3-3, que intervienen en la activación de Raf. Diversas isoformas de esta familia de proteínas se unen al dominio regulador de Raf (4), y en células de mamífero, se las ha encontrado unidas a Raf en el citosol y en la membrana plasmática (81), lugar donde tiene la activación de Raf. Expresando Raf y Ras de mamífero, en levaduras, se ha visto que para la activación de Raf inducida por Ras se necesita de un homólogo de estas proteínas, denominado BMH1, de levaduras (128). Por ello se piensa que Ras y las proteínas 14-3-3 podrían ambos ser necesarios en un proceso común de la activación de Raf.

Se ha sugerido, que un factor adicional podría ser una quinasa que fosforilara Raf. De hecho, se ha observado un aumento en la fosforilación de Raf en células estimuladas, y por tanto, es probable que la unión de Ras a Raf vaya a producir su activación, porque lleva a Raf a la membrana plasmática, donde una quinasa presente lo fosforile y active (177). Actualmente, dos tipos de quinasas son candidatos para ser tal factor adicional de Raf *in vivo* :

### 1) Serina/treonina quinasas:

Uno es la isoforma  $\alpha$  de PKC, ya que fosforila y activa a c-Raf (145) (además ambas quinasas se translocan a la membrana tras ser activadas). Sin embargo, se han realizado estudios que muestran que la fosforilación de Raf, *in vitro*, producida por PKC activa la autofosforilación de Raf pero no su capacidad de fosforilar MEK (165), único sustrato de Raf *in vivo* conocido hasta el momento; aunque la reciente identificación de I $\kappa$ B como otro posible sustrato *in vivo* de Raf quinasa (158), podría clarificar este punto y demostrar que Raf tiene más sustratos además de MEK.

Otra quinasa que podría ser un activador de Raf es la proteína quinasa Mos (193), aunque es posible que sea un activador directo de MEK.

### 2) Tirosina quinasas:

La coexpresión de c-raf-1 con un ras oncogénico en células Sf9 de insecto, usando baculovirus recombinante, no activa Raf completamente, pero esta activación sí se produce si además se coexpresan con la tirosina quinasa v-src (292). Por tanto, según estos resultados, sería necesario la participación de dos señales: una dependiente de la actividad de Ras y la otra generada por tirosina quinasas.

También se piensa que algún factor lipídico podría participar en la activación de Raf debido a la estructura de dedos de Zn, que también está presente en el sitio de unión a diacilglicerol de PKC. Sin embargo, c-Raf no une DAG ni ésteres de forbol *in vitro* (80).

La activación de Raf puede también producirse sin la intervención de Ras, como ocurre en el caso de la estimulación de PKC *in vivo* por ésteres de forbol (116).

#### 1.1.2.5.- Relación de la hiperfosforilación de Raf con su activación.

Las activaciones fisiológicas de c-Raf van acompañadas de su hiperfosforilación, que se puede detectar por el retraso que sufre la proteína hiperfosforilada en electroforesis en SDS-PAGE. Estudios realizados en células quiescentes estimuladas con insulina o con factores de crecimiento (PDGF), la fosforilación ocurre principalmente en residuos de serina, concretamente en el residuo de serina 259, aunque se han detectado trazas de fosforilación en treonina y tirosina (108). La PKC  $\alpha$  fosforila Raf en el residuo de serina 499, y presumiblemente en serina 259, como se ha visto en fibroblastos tratados con ésteres de forbol, produciéndose la activación de Raf (145).

Sin embargo, el significado de la fosforilación en la activación de Raf aún no está claro, ya que algunos autores han mostrado que la fosforilación de Raf puede tener lugar bajo condiciones donde esta quinasa es inactiva, por ejemplo, la producida por la activación de PKA en el residuo de serina 43. Esta fosforilación no afecta a la actividad de Raf si previamente está activado (188), pero sí afecta si se produce anteriormente a la unión con Ras, inhibiendo tal unión, y produciendo un bloqueo de la activación (172).

Esta inactivación por PKA explicaría porqué la señal mitogénica en algunos tipos celulares está bloqueada por un aumento en los niveles de AMPc.

### 1.1.3.- GRUPO DE LAS MAPKKs.

Constituye el siguiente escalón de la vía. En él se incluyen quinasas de especificidad dual, que a su vez son activadas por fosforilación.

#### 1.1.3.1.- Miembros de las MAPKKs.

El clonaje de los cDNA de las MAPKKs de células de mamífero (14,55), *D.melanogaster* (275) y *X.laevis* (147), ha revelado un alto grado de homología entre ellas, y que estas enzimas están muy relacionadas con las quinasas de especificidad dual de levaduras.

Se han encontrado elementos pertenecientes a las MAPKKs en levaduras y mamíferos, habiendo distintos miembros en cada organismo que responden a diferentes estímulos. Hasta el momento se han identificado los siguientes: STE7, MKK1/MKK2, byr1, MEK, SEK (Figura 1), y PBS2, éste último en la vía activada en respuesta a alta osmolaridad en *S.cerevisiae*.

En rata y humano, se han identificado dos isoformas de MEK (207,300), aunque no está claro si éstas poseen distintos sustratos o mecanismos diferentes de regulación. Todas las MAPKKs clonadas de vertebrados, y la de *D.melanogaster*, poseen un sitio consenso de fosforilación para las MAPKs próximo al C-terminal, el cual es fosforilado *in vivo* (173); otro rasgo distintivo de las MAPKKs de vertebrados es una región rica en prolina, cuya función aún no se conoce (170).

En la vía acoplada a los receptores con actividad tirosina quinasa, la MAPKK correspondiente es la quinasa de especificidad dual MEK (201). Es una proteína de 45 kDa, que fue purificada por primera vez a partir de oocitos de *X.laevis*, como factor responsable de la activación de ERK (174), y posteriormente de células de mamífero (57,197)

#### 1.1.3.2.- Regulación de las MAPKKs.

Está muy conservado el mecanismo de regulación entre los distintos miembros. En todos los miembros de las MAPKKs secuenciadas existen dos residuos de serina, o uno de serina y otro de treonina, situados idénticamente en un motivo consenso LID/NSXANS/T (171). La activación de MEK resulta de la fosforilación por Raf de estos dos residuos de serina que están separados entre sí por cuatro aminoácidos, en el subdominio VIII de la quinasa (301). La sustitución de estos residuos por aminoácidos acídicos, que imitan la fosforilación, lleva a una activación parcial de MEK. El hecho de

que estos sitios susceptibles de ser fosforilados estén conservados, significa que es muy probable que todas las MAPKKs estén reguladas de igual modo.

### **1.1.3.3.- Sustratos de las MAPKKs.**

Hasta ahora, el único sustrato identificado son las respectivas MAPKs, aunque todavía no se conoce completamente cómo fosforila los dos residuos de treonina y tirosina de MAPK. La comparación de la secuencia de las MAPKKs y de otras quinasas de especificidad dual, no ha dado información concluyente respecto del tipo de secuencia que reconocen estas quinasas. Se sabe, sin embargo, que la fosforilación parece secuencial, ya que si el ATP es limitante, sólo es fosforilada la tirosina, pero no es necesaria esta fosforilación para que se fosforile la treonina (107).

### **1.1.4.- GRUPO DE LAS MAPKs.**

Es el último componente del módulo que forma la cascada de las vías de las MAPKs. Aunque aún queda mucho por conocer de estas vías, parece que MAPK es esencialmente el efector en cada una de ellas. El papel de las MAPKKs podría ser sólo fosforilar y activar a sus MAPKKs correspondientes, y el único papel de éstas sería fosforilar y activar a las MAPKs respectivas. Sin embargo, las MAPKs podrían tener múltiples sustratos y por ello podrían participar en numerosos eventos. En el caso de la vía Ras/Raf/MEK/ERK, los sustratos de ERK incluyen factores de transcripción y otras quinasas (25,113,273).

#### **1.1.4.1.- Miembros de las MAPK.**

Aparte de las MAPKs implicadas en la vía del receptor tirosina quinasa, bajo el nombre de MAPK, actualmente, se engloban una serie de proteína quinasas activadas por mitógeno, que van a estar implicadas en otros procesos fisiológicos. En levaduras, se han descrito varias vías de transducción de señal que activan diferentes MAPKs. En mamíferos, aunque el grupo más estudiado es el de las ERKs, incluidas en la vía del receptor tirosina quinasa, estudios recientes han mostrado la existencia de otros grupos adicionales que tienen distintas especificidades de sustrato y son reguladas por los mismos o diferentes estímulos extracelulares. Así, se han identificado las siguientes quinasas: ERKs, JNK/SAPKs, KSS1/FUS3, MPK1, spk1 (Figura 1), y además, en mamíferos p38 en respuesta a endotoxina, IL-1 y estrés ambiental, y en *S. cerevisiae* la quinasa HOG1 en la vía activada en respuesta a alta osmolaridad y SMK1 en la vía implicada en el control de la esporulación.

Las MAPKs de vertebrados tienen un peso molecular en el rango de 40-64 kDa. Las más estudiadas son las quinasas de 40-44 kDa, correspondientes a la vía del receptor tirosina quinasa y que incluyen los miembros ERK1 y ERK2.

En relación con los diferentes miembros de MAPK identificadas en mamíferos, hay diferencias a varios niveles. En la secuencia TXY, donde se encuentran la treonina y la tirosina que son fosforiladas para la activación, X varía entre ERK, JNK y p38. Por otro lado se encuentran implicados en vías diferentes, aunque a veces se activen frente a un mismo estímulo, como, por ejemplo, en respuesta a estrés ambiental se activan JNK y p38, aunque no se sabe si por la misma o diferentes vías.

#### 1.1.4.2.- Regulación de las MAPKs.

Las MAPKs están integradas en una cascada de quinasas y son activadas por fosforilación. Parece ser que hay cierto grado de conservación en lo que a activación de los elementos MAPK se refiere.

En células quiescentes o sin estimular, MAPK se encuentra en su forma defosforilada, y es activada mediante fosforilación en residuos de treonina y tirosina. Experimentos *in vitro* han mostrado que esta activación desaparece si alguno de los residuos es eliminado siendo, por tanto, la fosforilación de ambos esencial para la actividad. Los sitios de fosforilación identificados son los residuos de treonina 183 y tirosina 185, en el caso de la ERK2 de mamíferos (209), y los residuos de treonina 188 y tirosina 190 para la MAPK de *X. laevis* (218). Del mismo modo que en vertebrados, el miembro de MAPK en levaduras FUS3, también es activado por fosforilación en los residuos de treonina y tirosina de la secuencia TXY (86). Por tanto, se puede pensar que esta secuencia TXY representa el sitio de fosforilación regulador común a todas las MAPK. En todas las MAPKs estos motivos TXY se encuentran en el subdominio VIII de la quinasa (201,299).

#### 1.1.4.3. Sustratos de las MAPKs.

La especificidad por el sustrato se ha caracterizado mediante el uso de péptidos sintéticos como sustratos. Por ejemplo, en el caso de las ERK, se vio que son proteína quinasas dirigidas a prolina, como las cdk, y fosforilan motivos S/T-P (62). A pesar de que este motivo solo es suficiente para la fosforilación por ERK, una fosforilación óptima requiere la secuencia consenso P-X<sub>n</sub>-S/T-P, donde X representa cualquier aminoácido y n=1 ó 2 (92).

Entre los sustratos en la célula identificados para las MAPKs están (134):

- Receptores de factores de crecimiento: Receptor de EGF.
- Ser/Thr quinasas: Rsk90, MAPKAP quinasa 2, Raf y MEK.
- Fosfolipasas: cPLA2.

- Factores de transcripción: c-Myc, c-Jun, c-Fos, NF-IL6, Elk-1, TAL1 y ATF2
- Proteínas de citoesqueleto: MAP-2, Tau.

Con respecto a los sustratos empleados por cada una, dos sustratos bien caracterizados de ERK son la PLA<sub>2</sub> citoplásmica y el factor de transcripción Elk-1. La PLA<sub>2</sub> es activada por fosforilación en el residuo de serina 505, aumentando su actividad enzimática y con ello la liberación de ácido araquidónico y lisofosfolípidos a partir de fosfolípidos de membrana (159), formándose, por tanto, múltiples moléculas secundarias de señalización. El factor de transcripción Elk-1 se une, junto con el factor de respuesta al suero, al elemento de respuesta al suero, que está presente en el promotor de muchos genes. Este factor de transcripción al ser fosforilado por ERK aumenta su actividad transcripcional (167). JNK fosforila a c-Jun en el extremo amino terminal, concretamente en los residuos serina 63 y serina 73 (112), aumentando la actividad transcripcional de c-Jun (220), que entra a formar parte de los homodímeros o heterodímeros que se unen a los sitios AP-1, presentes en los promotores de muchos genes. En relación a p38 se ha propuesto que una función sería la de causar la fosforilación y activación de la MAPKAP quinasa 2 que, a su vez, fosforila las pequeñas proteínas del choque térmico Hsp25 y Hsp27 (260). Otro sustrato de MAPKAP quinasa 2 es la glucógeno sintetasa (259). En cuanto a la relación de la p38 con las vías de ERK y JNK, todavía se desconoce, aunque al ser activada por estímulos comunes con JNK, se piensa que esté relacionada con la vía de esta última.

Rsk90 está en el citoplasma y en el núcleo (45), y entre sus sustratos parece haber varios factores de transcripción implicados en repuestas mitogénicas (25). La consecuencia funcional de la fosforilación de Raf y MEK catalizada por ERK no está clara.

El papel preciso que va a jugar cada una de las vías de señalización, en las diferentes respuestas celulares, desencadenadas por la activación de los receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca, aún no se conoce completamente. Estudios acerca de la diferenciación de las células de mamífero PC12 en cultivo (52), y de *D.melanogaster* y *C.elegans* (68), sugieren que la activación de la vía de las ERK, podría ser suficiente para la diferenciación celular. En células PC12, la decisión entre proliferación o diferenciación parece estar determinada por la duración de la activación de las ERK. (171).

## 1.2.- PROTEINA QUINASA C.

Dos serina/treonina quinasas específicas, ambas activadas por la acción de segundos mensajeros, tienen un papel central en la transducción de señales: La PKA y la PKC. Esta última ve reforzado su papel como enzima clave en la transducción de la señal por el hecho de que representa el receptor directo de los ésteres de forbol, que son

sustancias conocidas por interferir de forma drástica con eventos de proliferación y diferenciación, ya que producen la transformación oncogénica de células *in vivo* e *in situ* (122).

El hecho de que la PKC represente una gran familia de genes de isoenzimas que difieren notablemente en su estructura y expresión en diferentes tejidos, en su modo de activación y en su especificidad de sustrato, puede ayudar a esclarecer el papel clave que desempeñan las distintas isoformas en la transducción de la señal.

### 1.2.1.- ISOFORMAS DE PKC

La PKC fue descubierta por Nishizuka y col. como una proteína quinasa sobre histona, procedente de cerebro y que podía ser activada por una proteólisis limitada (127), o por la acción de activadores como calcio y fosfolípidos (265), o ésteres de forbol y fosfolípidos (39). Aunque apartir de estudios bioquímicos se observó que la PKC representaba un grupo de, al menos, tres isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), el mayor avance se ha hecho a partir del clonaje de los cDNA de diferentes isoformas de PKC, principalmente de librerías de cerebro, y cuyo número está todavía en aumento (122). Hasta el momento las encontradas en mamífero, se pueden dividir, atendiendo a su estructura y requerimiento de activadores en tres grupos:

- A) Las clásicas o dependientes de calcio (cPKCs):  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ .
- B) Las nuevas o independientes de calcio (nPKCs):  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ .
- C) Las atípicas, independientes de calcio y que no unen DAG ni ésteres de forbol (aPKCs):  $\zeta$ ,  $\lambda$ ,  $\iota$ .

Mediante el uso de anticuerpos específicos para cada una de las isoformas se ha podido estudiar la deplección y la translocación selectiva, desde el citosol a la membrana, de las isoformas de PKC, sugiriendo estos dos parámetros que los diferentes isotipos de PKC están activados de forma distinta tras la activación del receptor. Por estudios de inmunofluorescencia, se ha visto, además de la redistribución a la membrana, la translocación de diferentes isoformas de PKC al citoesqueleto, compartimento subcelular del que se sabe que contiene una variedad de sustratos de PKC *in vitro* (63)

Debido a la falta de activadores o inhibidores específicos para las diferentes isoformas de PKC, el estudio de su papel en diferentes respuestas biológicas se ha realizado utilizando varios abordajes. La sobreexpresión de diferentes isoformas en líneas celulares ha sido muy utilizado, aunque este abordaje tiene el inconveniente de que los efectos de la sobreexpresión de PKCs, en la fosforilación de proteínas, pueden no ser directos ni fisiológicos.

También se han observado funciones potencialmente diferentes de los isotipos de PKC en proliferación y diferenciación, en varios tipos celulares. Así, en células

progenitoras mieloides 32D de ratón, se ha visto que PKC  $\alpha$  y  $\delta$ , pero no PKC  $\beta$ I,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  ó  $\eta$ , pueden participar en la diferenciación mieloides promovida por TPA (184). En la diferenciación de células de eritroleucemia inducible por TPA, parece estar implicada la PKC  $\alpha$  mientras que PKC  $\beta$ I parece estar implicada en la proliferación de dichas células (192).

En una variedad de tipos celulares y mediante distintos abordajes experimentales, los isotipos de PKC ejercen diferentes efectos biológicos. Es posible que esto sea debido a una diferente especificidad de sustrato intrínseca de las isoformas de PKC, unido a una distinta localización en la célula.

### 1.2.2.- ESTRUCTURA DE LAS PKCs.

Todas las isoformas de PKC están formadas por una cadena polipeptídica, que va a estar dividida en regiones conservadas (C1-C4) separadas por regiones variables (V1-V5) (17,122). La región carboxi-terminal que comprende las regiones C3-V5, ha sido

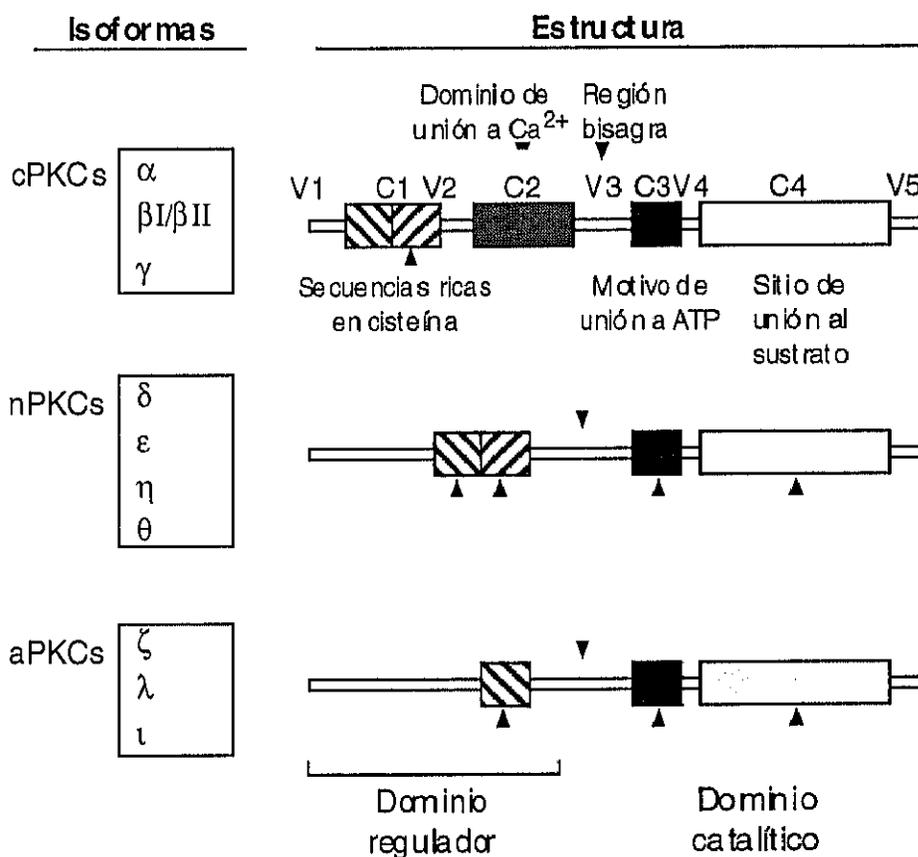


Figura 2. Estructura de los distintos tipos de PKCs.

definida como el dominio catalítico, el cual está separado del dominio regulador amino-terminal por la región V3 (Figura 2).

- Región C1: Al comienzo existe un motivo en todas las isoformas, cuya secuencia consenso es similar al motivo XRXXS/TXRX, encontrado en los sitios de fosforilación de importantes sustratos de PKC. Sin embargo, los residuos de serina y treonina están sustituidos por alanina en todas las PKCs, de manera que no pueden ser fosforilados y, por tanto, representa un pseudosustrato con características autorreguladoras, ya que bloquea el sitio catalítico (255). Esta estructura ha sido utilizada para el diseño de péptidos pseudosustratos, utilizados como inhibidores de PKC, y también para el diseño de péptidos sintéticos que contienen esta secuencia con alaninas sustituidas por serinas para ser utilizados como sustratos *in vitro*.

Otra región importante en C1 es una región rica en cisteína que forma dos motivos de la estructura denominada dedos de Zn, cada uno con seis residuos de cisteína. Esta región rica en cisteínas es necesaria para la unión de DAG y ésteres de forbol (36). PKC  $\zeta$  que tiene solamente un dedo de Zn (205), no une DAG o ésteres de forbol, esto está de acuerdo con que PKC  $\zeta$ , al menos *in vitro*, tiene actividad quinasa constitutiva (196), que podría estar afectada *in vivo* por otros factores adicionales.

- Región C2: Representa el dominio de unión al calcio (206) y está ausente en las nPKCs y en las aPKCs, las cuales son independientes de calcio.

- Región V3: Denominada región bisagra. Separa el dominio regulador del catalítico. Esta región es sensible a rotura proteolítica por tripsina o por proteasas neutras dependientes de calcio, calpaína I y II, originándose una actividad quinasa constitutivamente activa (243).

- Región C3: Contiene el motivo de unión a ATP, XGXGX<sub>2</sub>GX<sub>16</sub>KX, el cual está conservado en muchas proteína quinasa (268).

- Región C4: Contiene el sitio de unión al sustrato y la región de transferencia del fosfato, que contiene la secuencia DFG conservada entre proteína quinasa (137), excepto PKC  $\zeta$  que es DYG.

### 1.2.3.- ACTIVACIÓN, PROTEOLISIS Y DEGRADACION DE PKC.

Para las cPKCs, el modelo de activación intracelular, aceptado actualmente, sería (122):

1) La activación de la PLC y produciría la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), asociado a la membrana, liberándose DAG e IP<sub>3</sub>.

2) El IP<sub>3</sub> producido provocaría la liberación de calcio de reservas intracelulares no mitocondriales.

3) El calcio liberado se uniría a la región C2 de la PKC produciendo la translocación del enzima a la membrana plasmática.

4) Una vez en la membrana plasmática, la PKC se uniría a través de la región C1 al DAG, generado anteriormente y a PS, que está constitutivamente presente en la membrana, produciéndose su activación.

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 PKC (122).

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 micromolar. En el caso de la activación por ésteres de forbol no se necesita la presencia de calcio, pero éste reduce la concentración del éster de forbol necesaria para obtener una completa actividad de PKC (236).

Las nPKCs no van a necesitar de calcio, pero sí de DAG/PS o de ésteres de forbol/PS para activarse. Respecto a las aPKCs, en el caso de la PKC  $\zeta$  presenta actividad quinasa en ausencia de activadores (163), 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 dicho isoenzima (196)

Isoformas		Activadores		
		Ca <sup>2+</sup>	PS	DAG/Esteres forbol
cPKCs	$\alpha$			
	$\beta I/\beta II$	Si	Si	Si
	$\gamma$			
nPKCs	$\delta$	No	Si	Si
	$\epsilon$			
	$\eta$			
	$\theta$			
aPKCs	$\zeta$	No	(*)	No
	$\lambda$	No	Si	No
	$\iota$	No	N.D.	No

(\*) Existe discrepancia entre los datos obtenidos según distintos autores.

N.D.: No determinado.

**Figura 3. Respuesta de las isoformas de PKC a distintos activadores.**

Hay evidencias de que varias PKCs (entre ellas la PKC  $\zeta$ ) se estimulan por fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (195). 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, sino que también podrían participar las que activan a la PI3K. Además, hay datos que demuestran una estimulación diferencial de isoenzimas de PKC *in vitro* por ácidos grasos y lisofosfatídico en sinergismo con DAG (10).

Aparte de estos activadores se ha descubierto la capacidad de otros componentes del metabolismo de glicerolípidos de ser activadores de PKC, al menos *in vitro* (143,156). La cardiolipina activa PKC  $\alpha$  y  $\beta$ I (143). El ácido araquidónico (204), y la lipoxina A (249), otro metabolito de la lipooxigenasa, activan PKC  $\beta$ II y  $\epsilon$ . El PIP<sub>2</sub> puede sustituir al DAG como activador de PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\gamma$ , pero no  $\beta$ II (156). 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 PC (119), sugieren que, al menos, algunos isoenzimas de PKC pueden ser activados por otros segundos mensajeros. Citoquinas como INF $\alpha$ , IL-1 e IL-3, producen hidrólisis de PC pero no de PI (40,72,215), y se ha visto que PKC  $\beta$  y  $\epsilon$  se activan tras la acción de IFN $\alpha$  en células HeLa y Daudi respectivamente (214,215). Luego la producción de diferentes segundos mensajeros inducida por una señal podría decidir que isoenzimas de PKC se activan y cuáles no.

Hay diferentes datos que sugieren la existencia de fosforilaciones producidas por una PKC quinasa de eucariotas aún no identificada, previa a la activación. Sin esta fosforilación inicial PKC no es activa y tampoco puede ser activada (211).

La PKC fue descubierta como una proteína quinasa activada por proteasas (127), aunque posteriormente se vio que la proteólisis seguía a la activación (141). Se piensa que las proteasas responsables, *in vivo*, son las proteasas neutras dependientes de calcio (calpaínas I y II) las cuales son activas en el rango de micro y millimolar (127,141). Las calpaínas actúan sobre la región V3 y producen dos fragmentos que son, por un lado, el dominio regulador y, por otro, el dominio catalítico activo en ausencia de activadores (237). La activación proteolítica se puede realizar *in vitro* mediante tratamiento limitado con tripsina (120), aunque *in vivo* se piensa que la activación y translocación a la membrana celular son requisitos previos a la proteólisis. No está todavía claro si la degradación posterior sirve como mecanismo para inactivar la quinasa o si el fragmento catalítico liberado desde la membrana al citosol, o a otros compartimentos celulares, es capaz de actuar como una quinasa con actividad constitutiva independiente de activadores.

Se denomina "down regulation" al fenómeno por el que se deplecciona la PKC, por degradación proteolítica, como consecuencia del tratamiento prolongado de determinados tipos celulares con ésteres de forbol. Con respecto a la "down regulation", las distintas isoenzimas de PKC muestran rasgos muy diferentes que están de acuerdo con los observados *in vitro* (122).

## 2.4.- SUSTRATOS DE PKC.

### 1.2.4.1.- 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, IIIS, 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.

En relación a las nPKCs presentan grandes diferencias respecto a la cPKCs ya que muestran una actividad quinasa pobre hacia histona IIIS, MBP, protamina o protamina sulfato ( $\delta>\eta>\zeta$ ) (64,179,205,243). Por tanto, ha sido necesaria la utilización de péptidos sintéticos derivados de la secuencia del pseudosustrato, o del receptor EGF o de MBP, para ensayar la actividad quinasa de las nPKCs (204,237).

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 (242). Además, una proteína de fusión que consta del dominio catalítico de PKC  $\gamma$  y del dominio regulador de PKC  $\epsilon$  tiene la especificidad de sustrato de PKC  $\epsilon$  (210). Además, PKC  $\zeta$ , es capaz de fosforilar al péptido del receptor EGF cuando es proteolizada por quimotripsina, pero no cuando el enzima está intacto (122). También varía el requerimiento de activador dependiendo del sustrato, así para fosforilar protamina las cPKCs y las nPKCs no necesitan de ningún activador (19,163).

### 1.2.4.2.- 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 (122), que podrían dividirse en tres grupos:

- Proteínas implicadas en la transducción de señal: Receptores de EGF, de antígeno de la célula T y de insulina; Ras, GAP, Raf, S6 quinasa.
- Proteínas implicadas en vías metabólicas: Bombas, canales.
- Proteínas implicadas en la regulación de la expresión de genes: Factores de transcripción y de traducción.

Hay tres sustratos importantes en el control de la proliferación celular: MARCKS su fosforilación lleva a una redistribución de los filamentos de actina desde la membrana al citoplasma (106); DNA topoisomerasa (217) y lamina B (114), 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.

## 2.- TRANSDUCCION DE LA SEÑAL EN LINFOCITOS T.

Los linfocitos T son células pertenecientes al sistema inmunitario que tienen la misión de reconocer específicamente y actuar contra agentes extraños y mediar en la participación de otras células en la respuesta inmune. El reconocimiento del antígeno se lleva a cabo mediante el receptor de antígeno de la célula T (TCR). El TCR es un complejo formado por un heterodímero variable (Ti) que está asociado de forma no covalente con los heterodímeros CD3 $\epsilon\delta$ , CD3 $\epsilon\gamma$  y el homodímero  $\zeta$  (287). El heterodímero Ti es el responsable de mediar el reconocimiento del antígeno, que está asociado al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie celular de la célula presentadora de antígeno. Este reconocimiento provoca la activación del linfocito, que provoca que la célula, que antes del estímulo se encuentra en el estado  $G_0$ , pase a la fase  $G_1$  del ciclo celular. Durante esta transición se van a producir una serie de señales, que originándose en la superficie celular llegan hasta el núcleo, donde se induce la expresión de un conjunto de genes, entre los que están el gen de la IL-2, y el de la subunidad  $\alpha$  del receptor de IL-2 para formar el receptor de alta afinidad en la superficie celular. La IL-2 es la citoquina considerada factor de crecimiento de la célula T. Cuando el linfocito T es capaz de responder a la IL-2, que ha sido secretada, se encuentra en la fase  $G_1$  del ciclo celular. La unión de la IL-2 a su receptor genera una segunda señal que hace que el linfocito pase a la fase S, o fase de síntesis de DNA, y continúe el ciclo, produciéndose la proliferación.

### 2.1.- TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL EN LA TRANSICIÓN $G_0/G_1$ .

Se han realizado numerosos estudios acerca de las señales que se generan tras la activación del TCR. Se sabe que se produce un incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de numerosas proteínas, bien citoplásmicas o bien presentes en la membrana plasmática. El TCR no posee actividad tirosina quinasa intrínseca, llevándose a cabo estas fosforilaciones mediante tirosina quinasas de la familia Src y ZAP-70/Syk (117).

Entre los eventos que se desencadenan, los mejor caracterizados, hasta el momento, son la activación de la PLC, de Ras y de calcineurina (287). Los tres han sido

implicados en participar en la señal que lleva a la activación transcripcional del gen de la IL-2 (Figura 3).

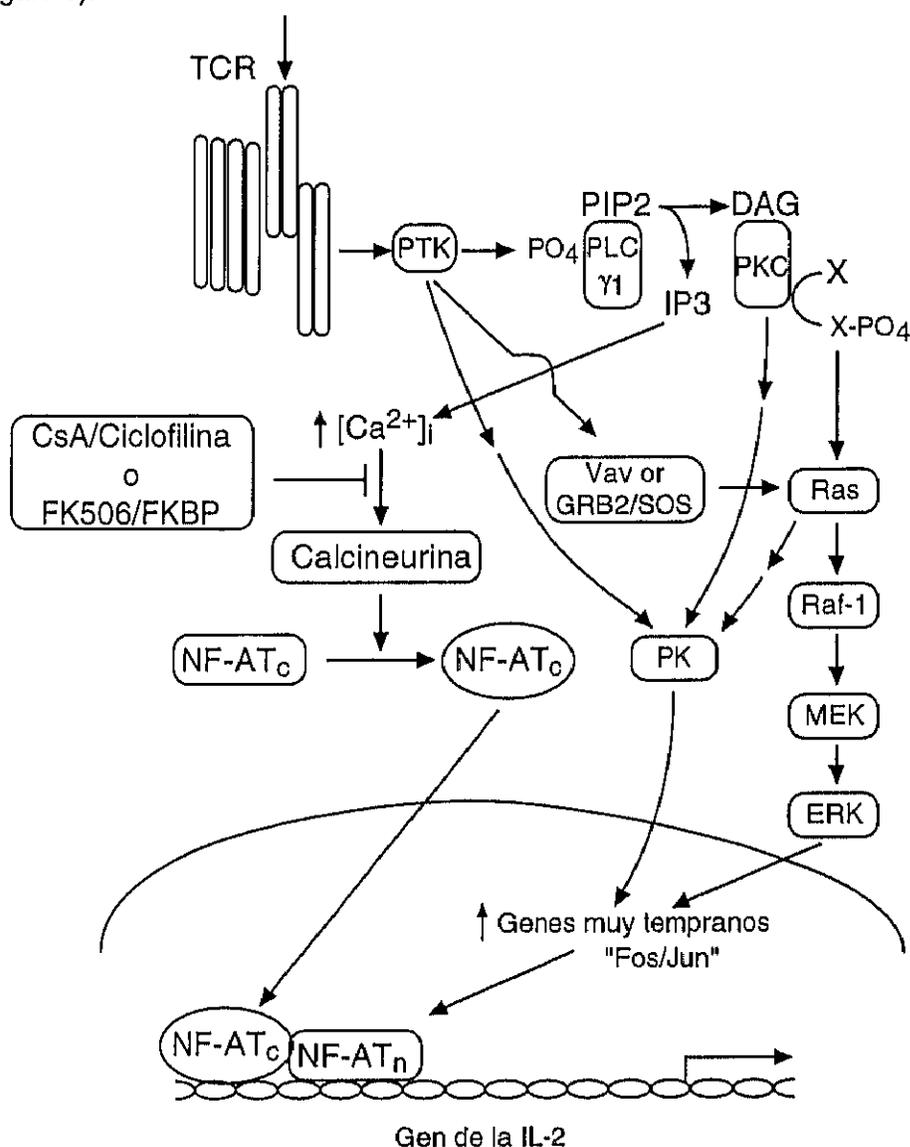


Figura 4. Esquema de las distintas vías de transducción de la señal que se activan tras el estímulo del TCR.

### 2.1.1.- Activación de PLC y de PKC.

#### 2.1.1.1- Activación de PLC

La estimulación del TCR produce la activación de la PLCγ1 (126), que hidroliza al PIP<sub>2</sub>, con la producción de dos segundos mensajeros que son IP<sub>3</sub> y DAG. El IP<sub>3</sub> produce el aumento de los niveles intracelulares de calcio libre, y el DAG se une y activa diferentes isoformas de PKC. La activación de linfocitos con lectinas o anticuerpos dirigidos contra moléculas de la superficie celular conduce a la activación de, al menos,

estas dos vías de transducción de la señal que implican un acúmulo de DAG y el incremento de los niveles de calcio citosólico (15,129,161). El aumento del calcio intracelular y la activación de PKC desencadenan una serie de señales, que van a originar la activación transcripcional del gen de la IL-2.

Entre los datos que apoyan la implicación de estas dos señales en la expresión de IL-2 están:

- La acción conjunta de ionóforos de calcio y ésteres de forbol, que mimetiza la elevación del calcio y la activación de PKC, provoca señales que inducen la expresión del gen de IL-2 (285)

- Con el empleo de inhibidores de PKC y quelantes de calcio se bloquea la expresión de IL-2 (200,289).

- La activación de una proteína G acoplada a un receptor que activa PLC a través de un mecanismo independiente de PTK es suficiente para inducir la secreción de IL-2 (67)

- El principal punto de actuación de los inmunosupresores ciclosporina A y FK506 es la calcineurina, serina/treonina fosfatasa activada por calcio-calmodulina (162)

Datos bioquímicos y genéticos sugieren que la activación de PLC ocurre mediante su fosforilación en tirosina (248). Inhibidores de proteína tirosina quinasas previenen la fosforilación en tirosina y la activación de PLC (95). Esta fosforilación en tirosina inducida por el TCR está asociada con una actividad catalítica aumentada *in vitro* (59). En líneas de células T mutantes que no presentan activación de PLC, la PLC $\gamma$ 1 no está fosforilada en tirosina (286).

#### 2.1.1.2.- Activación de PKC.

Hay muchos datos apoyando la participación de PKC en la activación de los linfocitos T. Además de ser activada en respuesta al aumento de los niveles de DAG como consecuencia de la estimulación del TCR, también interviene en la transducción de señales accesorias como la estimulación del antígeno de superficie CD2, y la provocada por la IL-1 secretada por células accesorias (macrófagos, células endoteliales y fibroblastos) (22). En el caso de IL-1 se ha descrito que la activación de PKC podría ir a través de la hidrólisis de PC y no de inositol fosfolípidos. (232)

Se ha estudiado su relación con componentes de la vía de transducción de la señal. Así, se ha descrito que la activación de p21<sup>ras</sup> en células T está mediada por PKC, probablemente a través de la inactivación de GAP (71). También se ha visto la dependencia de PKC en la activación de Raf y ERK cuando es estimulado el TCR. (199,253)

Se sabe que PKC puede regular la expresión de genes en la activación de la célula T mediante el control de factores de transcripción. En la región del promotor del

gen de IL-2 existen sitios de unión para los factores de transcripción NF-AT-1, NF $\kappa$ B, AP-1 y NFIL-2A, los cuales aparentemente actúan en conjunto para inducir la transcripción (118). Se ha visto que la activación NF-AT-1, NF $\kappa$ B, y AP-1 se induce de forma diferente con la expresión de formas constitutivamente activas de las isoenzimas PKC  $\alpha$  y PKC  $\epsilon$  (87).

### **2.1.2.- Activación de calcineurina.**

Tras la activación del TCR, y como consecuencia de la liberación de IP<sub>3</sub>, se produce un aumento de los niveles de calcio intracelulares. Esto va a producir la activación de proteínas citoplásmicas dependientes de calcio, como por ejemplo la calcineurina.

El empleo de drogas inmunosupresoras, como son la ciclosporina A (CsA) y FK506, han ayudado a conocer los efectos del aumento del calcio intracelular. Estas drogas ejercen, en parte, su efecto inmunosupresor, porque inhiben la transcripción de genes de linfocinas en células T. La CsA y FK506 se unen a proteínas citoplásmicas, ciclofilina y FKBP, denominadas ambas inmunofilinas (247), y los complejos interaccionan con alta afinidad con calcineurina, una serina fosfatasa dependiente de calcio-calmodulina, conocida como PP2B (162). La actividad inmunosupresora de las drogas correlaciona con su capacidad de inhibir la actividad fosfatasa de la calcineurina. El papel de la calcineurina está relacionado con el factor de transcripción NF-AT (nuclear factor of activated T cells), que se une al promotor del gen de IL-2 tras la activación de la célula T, y que consta de dos componentes, uno nuclear y otro citoplásmico. El componente citoplásmico, que es sensible a CsA, es una proteína que se transloca al núcleo tras la activación para dar lugar al factor NF-AT funcional (79). Esta forma citoplásmica es una fosfoproteína que puede ser defosforilada por calcineurina favoreciendo su translocación al núcleo (175). Por ello, cuando el complejo CsA-ciclofilina se une a calcineurina inhibiendo su actividad, no se produce la defosforilación del componente citoplásmico del factor NFAT, impidiéndose la formación del factor NFAT funcional.

### **2.1.3- Activación de Ras.**

La estimulación del TCR origina una rápida activación de Ras (71,132). Esta activación es el resultado de mecanismos dependientes e independientes de PKC. En otros sistemas celulares, el receptor tirosina quinasa regula la actividad de Ras mediante interacciones con proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina, como Sos y Vav, y proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs) (216,246). Tanto la inhibición de GAP, como la activación de las proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina, han sido observadas tras la estimulación de los linfocitos. GAP es fosforilada

en tirosina tras la estimulación de los linfocitos B, y en menor grado tras la estimulación del TCR (70,90). Vav también es fosforilada en tirosina en respuesta a TCR (37). La forma fosforilada de Vav tiene una actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina para Ras aumentada *in vitro* (98). Otro intercambiador, Sos y su molécula adaptadora GRB2 (246) están expresadas ubicuamente, y parecen interaccionar con proteína tirosina quinasas citoplásmicas, aunque no está claro cómo contribuyen a la activación de Ras en linfocitos.

Como ya se ha comentado, en células no linfoides se han identificado los efectores de Ras. Ras interacciona directamente con Raf-1, que regula la actividad de MEK, siendo ésta a su vez, la quinasa activadora de ERK (58). En el caso de las células T, se sabe que, además de la activación de Ras, Raf-1 se activa tras la estimulación del TCR, siendo esta estimulación mediada por PKC (253). La conexión entre Ras y Raf se piensa que también sea probable en linfocitos, ya que Raf-1 citosólico de células Jurkat (línea celular procedente de un linfoma T humano) se une ávidamente a Ras-GTP, pero no a Ras-GDP (101). También se produce la activación de MEK y ERK, igualmente asociada con la activación de PKC (101,199).

Se ha correlacionado la activación de Ras con la activación transcripcional del gen de IL-2. La expresión de una forma activada de Ras, puede sustituir en parte a los ésteres de forbol en sinergizar con ionóforos de calcio, para inducir la transcripción de IL-2 (225,293). La activación de Ras está implicada probablemente en la inducción del componente nuclear, independiente de calcio e insensible a CsA, de NF-AT. Este componente nuclear, que requiere activación de PKC, se sintetiza de novo y parece ser un heterodímero de miembros de las familias de los factores de transcripción Jun y Fos (133).

## 2.2.- TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL EN LA TRANSICIÓN G<sub>1</sub>/S.

La segunda señal, que hace que el linfocito continúe el ciclo celular (transición G<sub>1</sub>/S) se produce por la interacción de la IL-2, secretada durante G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, con su receptor de alta afinidad, expresado en la superficie celular en la transición G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Esta interacción produce una serie de señales, en su mayor parte aún desconocidas, que llevan a la proliferación celular (182,267).

El receptor de alta afinidad para la IL-2 consta de tres subunidades: Las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , ésta última también forma parte de los receptores de IL-4, IL-7 e IL-9. Tras la unión de la IL-2 se produce la heterodimerización de las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ , paso requerido para la transmisión de la señal por IL-2 (194). Este receptor no tiene actividad tirosina quinasa intrínseca aunque sí se asocia a quinasas, que estarán encargadas de transmitir la señal al interior de la célula.

Entre los eventos que se sabe que tienen lugar en la transmisión de esta señal se encuentra un aumento en la fosforilación en tirosina de sustratos celulares, presumiblemente debido a la activación de tirosina quinasas de la familia Src y de la familia Syk-ZAP70 (267). Recientemente se ha demostrado la inducción de la actividad de las tirosina quinasas Janus (JAK), en concreto Jak1 y Jak3, las cuales se asocian con la región rica en serina de la cadena  $\beta$  del receptor de IL-2 y con la región carboxi terminal de la cadena  $\gamma$ , respectivamente (186). Estas quinasas JAK fosforilan y activan a miembros de un grupo de factores de transcripción denominados STAT, concretamente en la vía de IL-2, se activan Stat3 y Stat5 (267).

La IL-2 produce un aumento en la actividad de la PI3K asociada con la PTK de la familia Src p59fyn, lo que sugiere que p59fyn podría estar implicada en la regulación del estado de fosforilación de esta enzima en los linfocitos T (182,267).

En esta vía de señalización también se produce la activación de Ras (96,241). En relación a la vía de las MAPK, aunque hay datos en la literatura que muestran la fosforilación y activación de Raf-1 (175), en general, se piensa que no hay una participación de la cascada de quinasas donde se incluyen MEK y ERK, aunque algunos grupos han detectado activación de ERK2 en respuesta a la citoquina (75,213).

Además, la IL-2 induce un incremento rápido y transitorio en la expresión de c-fos y un acúmulo más estable de los mensajeros de c-myc y c-myb. (208,227,258).

La participación de otros mecanismos de transducción de la señal, que se sabe que intervienen en la proliferación celular de muchos sistemas, como son la activación de PKA, de PKC y la movilización de calcio, no parece que tengan lugar en el caso de IL-2 (153,180,181,278). Se ha demostrado que la IL-2 produce proliferación en ausencia de activación de PKC (226). Sin embargo se puede reproducir la transición  $G_1/S$  de una forma no fisiológica mediante el uso de ésteres de forbol, que son activadores directos de PKC. Por otra parte, una elevada actividad de PKA inhibe la progresión de las células T desde la fase  $G_1$  temprana a la fase S (135,161).

### **3.- PROTEINA FOSFATASAS IMPLICADAS EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES.**

El estado de fosforilación de una proteína va a depender del balance existente entre proteína quinasas (PKs) y proteína fosfatasa (PPs) que actúan sobre sus residuos fosforilables. Por ello, el requerimiento de la acción coordinada de PKs y PPs como mecanismo de regulación de proteínas, es objeto de numerosos estudios.

#### **3.1.- TIPOS DE PROTEINA FOSFATASAS.**

Las PPs se pueden clasificar en tres grandes grupos según su especificidad respecto al residuo fosforilado sobre el que actúan.

1.- Serina/treonina fosfatasas (PSP)

2 - Tirosina fosfatasas (PTP).

3.-Fosfatasas de especificidad dual (PPD): Defosforilan residuos fosforilados de serina/treonina y de tirosina.

Aproximadamente un 95% de las fosforilaciones que tienen lugar en la célula se producen sobre residuos de serina/treonina. Las PSPs están implicadas en numerosos procesos biológicos como son ciclo celular, metabolismo energético, inmunosupresión, y expresión génica.

Las PSPs, de baja especificidad de sustrato, clásicamente se han dividido en PP1, PP2A, PP2B (calcineurina) y PP2C. Muchas toxinas microbianas son inhibidores de PP2A de PP1 o de ambas. Se han utilizado estos compuestos para estudiar funciones *in vivo* de estas PSPs, y han servido para descubrir papeles importantes de estas fosfatasas en la fisiología celular. Acido okadaico, microcistina, caliculina A y cantaridina promueven la formación de tumores, suprimen la transformación celular o inducen apoptosis (166), dependiendo del sistema celular empleado.

Otro grupo de inhibidores de PSP incluyen los Inmunosupresores CsA y FK506, cuyo mecanismo de acción en la célula se ejerce a través de la PP2B o calcineurina (162).

Las PTPs juegan un importante papel en la atenuación de señales generadas por PTKs implicadas en mitogénesis. Por ejemplo, cuando una célula es estimulada por un factor de crecimiento, como PDGF, que activa un receptor tirosina quinasa, el incremento en fosfotirosina es transitorio. La cantidad y el tiempo que permanece la fosforilación en tirosina, en el propio receptor y en otras proteínas celulares, pueden ser aumentados por el tratamiento con el inhibidor de PTPs ortovanadato sódico, o sus peroxid derivados (93,219). Como en el caso de los inhibidores de PSPs, los derivados de vanadato pueden, por sí mismos, inducir respuestas celulares en algunos sistemas, implicando que la actividad basal de PTKs es suficiente para promover una respuesta si la actividad de PTP está disminuida. Sin embargo, no todas las PTPs tienen una función reguladora negativa. Por ejemplo, SH-PTP2, una PTP que contiene dos dominios SH2, se requiere para la señalización mediada por el receptor de insulina (203). Otra fosfatasa que puede activar vías de señalización es la tirosina fosfatasa CD45, necesaria para la activación de la célula T (146).

Para que una proteína sea regulada por fosforilación, las actividades máximas de la(s) PK(s) y PP(s) que actúen en un determinado residuo deben estar en equilibrio, de otro modo la proteína estaría completamente fosforilada o defosforilada. La actividad catalítica intrínseca de la mayoría de PSPs y PSKs es aproximadamente la misma, y las concentraciones de las principales PSKs y PSPs son también similares (47). En principio,

esto proporcionaría el equilibrio, aunque las afinidades para sustratos específicos, junto con la localización subcelular de las proteínas diana y la(s) quinasa(s) y fosfata(s) en cuestión sean factores decisivos (123). En contraste, la actividad PTP intrínseca es generalmente unos dos o tres órdenes de magnitud mayor que la actividad PTK (263). Esta alta actividad puede dar cuenta del bajo nivel de fosfotirosina en las proteínas celulares y de la naturaleza transitoria de la mayoría de las respuestas mediadas por fosfotirosina. Sin embargo, para que la señal de PTK sea efectiva, la actividad de PTP debe estar fuertemente regulada. Dos formas de regular la actividad PTP son una localización subcelular discreta y la fosforilación en tirosina o serina/treonina (263). Sin embargo, a diferencia de las PSPs, no se han identificado subunidades reguladoras de PTP o proteínas inhibitorias. Los dominos catalíticos de las PTPs y PPDs están relacionados pero son diferentes de los de las PSPs.

### 3.2.- PROTEINA FOSFATASAS QUE ACTUAN EN LA VIA DE LAS MAPKs.

Varios de los componentes de las vías de las MAPKs están sujetos a regulación por PP. Las quinasas MEK, ERK, y seguramente Raf, están activadas por fosforilación, y la retirada de los fosfatos activantes da lugar a la inactivación. La PP fisiológica de Raf no se conoce aún, aunque puede ser defosforilado *in vitro* por PP1 y PP2A (123). Las fosfoserinas activantes de MEK pueden ser defosforiladas *in vitro* por PP2A y PP1, siendo más efectiva la PP2A (197). Respecto a ERK2 se sabe que *in vitro*, la PP2A defosforila la PThr-183, y la PTyr-185 puede ser defosforilada por PTPs, como CD45, resultando en la pérdida de la actividad de ERK2 (8).

Ya que ERK requiere una fosforilación dual en tirosina y en una treonina próxima para su activación, las fosfatasas con especificidad para residuos fosforilados que están próximos, podrían ser críticos para la regulación de ERK. El producto del gen H1 del virus vaccinia (VH1), es una de estas enzimas (97). Recientemente se han aislado fosfatasas que muestran gran homología de secuencia con VH1 lo cual indica que fosfatasas del tipo VH1 representan una nueva subfamilia que quizá funcione regulando la actividad de proteínas de transducción de señal como ERK. Un gen temprano, 3CH134, inducido por suero y factores de crecimiento en fibroblastos de ratón, se aisló y se mostró que tenía una alta homología de secuencia VH1 (43). El homólogo humano de 3CH134, CL100, se clonó (138) como un gen temprano en respuesta a estrés oxidativo y choque térmico. Otro gen temprano relacionado con VH1, PAC1, se aisló de células T activadas por mitógeno (231). CL100, 3CH134 y PAC1 son fosfatasas duales que defosforilan específicamente residuos de treonina y tirosina de ERK (6,262,281). La cinética de expresión de sus RNA mensajeros es característica de genes muy tempranos, los cuales no requieren síntesis de proteína para su inducción y sus RNAs mensajeros poseen una vida media corta (231). Se ha sugerido el nombre de MKP1 (MAP Kinase Phosphatase)

para 3CH134 como una indicación de su función biológica (262). Estudios genéticos en la levadura *S.cerevisiae* identificaron una fosfatasa de especificidad dual, MSG5, la cual inactiva las quinasas FUS3 y KSS1, dos miembros de las MAPKs en la vía de respuesta a feromona en levaduras (69).

La cinética de activación e inactivación de cada componente en la vía de ERK regula la cantidad y la duración de la activación de ERK, y esto a su vez puede determinar la respuesta celular a un estímulo. Por ejemplo, como ya se ha comentado antes, la duración de la señal procedente de ERK es un factor crítico en la decisión de las células PC12 para crecer o para diferenciar en respuesta a factores de crecimiento, que activan receptores con actividad tirosina quinasa: una activación prolongada lleva a la célula a diferenciar, mientras que la activación transitoria provoca el crecimiento celular (171).

En resumen, las cinéticas de la activación de ERK difieren entre los distintos tipos celulares y estímulos. La contribución relativa de los diferentes mecanismos de inactivación necesitan ser conocidos para poder predecir la cinética de activación de ERK en un tipo celular determinado y con ello predecir la respuesta celular.

## **II. OBJETIVOS**

La proliferación de los linfocitos T es un proceso altamente regulado por una serie de señales, extra e intracelulares, que han de ser transmitidas hasta el núcleo, donde se produce la síntesis de DNA necesaria para la posterior división celular.

Entre los mecanismos implicados en la transmisión de señales, la fosforilación de proteínas desempeña un papel esencial. Por este motivo, el estudio de las proteínas que intervienen en los procesos de fosforilación, así como de su regulación, puede aportar una serie de datos que ayuden a una mejor comprensión del funcionamiento de la célula T.

Con este propósito, los objetivos que nos planteamos a la hora de realizar este trabajo fueron:

1.- Realizar un estudio de PKC, quinasa implicada en la transducción de señales, en el ciclo celular de linfocitos T, durante las transiciones  $G_0/G_1$  y  $G_1/S$ , estudiando en más detalle varias isoformas de la misma.

2.- Estudiar el papel que pudieran desempeñar dos elementos integrados en la cascada de las MAPKs: Raf-1 y ERK2 durante la proliferación de linfocitos T.

3.- Determinar la relación de estas quinastas, Raf-1 y ERK2, entre sí y con la PKC.

4.- Estudiar la regulación del proceso de defosforilación de ERK2, como mecanismo de finalización de la señal.

### **III. MATERIALES Y METODOS**

## MATERIALES.

Aldrich: Concanavalina A, Rojo Ponceau

Amersham Internacional: [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP, [ $^3\text{H}$ ]-timidina,  $\alpha$ -fosfotirosina 4G10,  $\alpha$ -PKC  $\delta$ , sistema de detección quimioluminiscente ECL.

Bio Rad: Marcadores de peso molecular, Tween 20, reactivo Bradford.

Boehringer: Anticuerpos  $\alpha$ -PKC  $\varepsilon$  y  $\alpha$ -PKC  $\zeta$ , ionóforo de calcio A23187, IL-2 recombinante de ratón.

Calbiochem: Bisindolilmaleimida GF 109203X.

Flow Laboratories: Glutamina.

Gibco: Medio de cultivo RPMI, FCS

ICN: Anticuerpos secundarios.

Konica: Películas para autorradiografías.

Llorente: Gentamicina.

Merck:  $\beta$ -ME

Millipore: Membranas de Immobilon-P.

Scandinavian Gene Synthesis: Oligodesoxirribonucleótidos antisentido (5'-TCCCTGTATGTGCTCCAT-3') y sentido (5'-ATGGAGCACATACAGGGA-3') de Raf-1, correspondientes a los codones 1-6 de c-Raf de ratón.

Seikagaku Kogyo: Anticuerpos  $\alpha$ -PKC  $\alpha$  y  $\alpha$ -PKC  $\beta$ .

Sigma: Acido iodoacético, ácido okadaico, antipafna, aprotinina, ATP, DTT, fosfatidilserina, fungizona, estaurosporina, leupeptina, ortovanadato sódico, PMSF, MBP.

Whatman: Papel p-81.

Zymed: Anticuerpo  $\alpha$ -ERK.

El resto de productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

## MÉTODOS

### 1.- OBTENCIÓN DE LINFOCITOS T.

Los linfocitos utilizados para este trabajo experimental se obtuvieron de dos órganos linfáticos secundarios: ganglios (mesentéricos y cervicales) y bazo, ambos procedentes de rata (cepa Wistar). Según se hiciera el estudio con células en el estado  $G_0$  o  $G_1$  se empleó como fuente uno u otro órgano.

### 1.1.- OBTENCION DE LINFOCITOS T QUIESCENTES (G<sub>0</sub>).

Los linfocitos T quiescentes se obtuvieron a partir de ganglios mesentéricos y cervicales de rata. Una vez extraídos los órganos, en condiciones de esterilidad, se pusieron en medio de cultivo RPMI suplementado con 2% (v/v) FCS, 60 µg/ml gentamicina y 0,25 µg/ml fungizona. El protocolo de obtención de linfocitos es el descrito por Kruse y col. (149) con algunas modificaciones. En esencia, los ganglios se presionaron sobre una gasa estéril con el émbolo de una jeringa, y las células tras ser filtradas se recogieron por centrifugación a 1800 rpm durante 4 min. Para lisar los glóbulos rojos las células fueron tratadas con un tampón hipotónico de cloruro amónico 0,14 M pH 7,4, durante 2 min, a 4°C. La reacción de lisis se inhibió añadiendo RPMI suplementado con 2% (v/v) FCS, 60 µg/ml gentamicina y 0,25 µg/ml fungizona. Posteriormente, las células se lavaron dos veces en el medio anterior. Finalmente las células se resuspendieron en medio basal, completo (RPMI, 5% (v/v) FCS, 2 mM glutamina, 60 µg/ml gentamicina, 0,25 µg/ml fungizona y 5x10<sup>-5</sup> M β-ME), a una concentración de 5x10<sup>6</sup> células/ml.

El FCS utilizado en todos los casos se inactivó previamente, mediante tratamiento a 56° C durante 30 min.

### 1.2.- OBTENCION DE LINFOBLASTOS T (G<sub>1</sub>).

Los linfoblastos T se obtuvieron a partir de bazos de rata. Una vez extraído el órgano del animal, en condiciones de esterilidad, se mantuvo en medio de cultivo RPMI con 2% FCS, 60 µg/ml gentamicina y 0,25 µg/ml fungizona. La obtención de los linfocitos a partir de bazo se realizó tal y como se ha descrito previamente para linfocitos T de ganglios. Una vez filtradas las células, éstas se recogieron por centrifugación a 1800 rpm durante 4 min. Las células se lavaron dos veces con el medio anterior, se resuspendieron en medio basal completo, a una concentración de 5x10<sup>6</sup> células/ml, y se estimularon con 2 µg/ml Concanavalina A durante 48 h, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad (durante este tiempo los linfocitos secretan IL-2 al medio de cultivo y expresan el receptor de alta afinidad para dicha citoquina). Al cabo de las 48 h, las células se recogieron por centrifugación, y se trataron con un tampón hipotónico de 0,14 M cloruro amónico, para lisar los glóbulos rojos, durante 3 min a 4°C. La reacción de lisis se detuvo añadiendo 2% FCS, 60 µg/ml gentamicina y 0,25 µg/ml fungizona en RPMI, lavándose las células dos veces más con este medio. Finalmente las células se resuspendieron en medio basal completo a 10<sup>6</sup> células/ml, durante 24 h, en las condiciones citadas anteriormente. Los linfoblastos T se mantuvieron estas últimas 24 h en un medio sin IL-2, con objeto de que en ausencia del factor de crecimiento se sincronicen en un estado G<sub>1</sub> basal.

## 2.- CONTAJE DE CELULAS.

Para determinar el número de células, tanto de linfocitos T quiescentes como de linfoblastos T, se ha utilizado una cámara de Neubauer y la viabilidad de las mismas se ha analizado con un colorante de exclusión, tripan blue, preparado al 10 % en agua. De esta forma, pueden distinguirse las células vivas de las no viables, ya que en estas últimas por tener una membrana plasmática alterada, el colorante es capaz de penetrar al interior de la célula, haciendo que ésta adquiera una coloración azul.

## 3.- MEDIDA DE LA PROLIFERACION CELULAR.

La proliferación celular se midió como la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina al DNA. Esta incorporación se cuantificó desde dos estadios diferentes de las células, bien desde la fase  $G_0$  o bien desde la fase  $G_1$  del ciclo celular.

### 3.1.- INCORPORACION DE [ $^3\text{H}$ ]-TIMIDINA DE LINFOCITOS T ( $G_0$ )

Para medir la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina desde  $G_0$ , los linfocitos T quiescentes se obtuvieron como se ha descrito anteriormente. Las células, resuspendidas en medio basal a una concentración de  $10^6$  células/ml en 100  $\mu\text{l}$ , se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad, en placas de 96 pocillos con la adición o no de los estímulos empleados en cada experimento. Al cabo de 48 h, se añadió 0,5  $\mu\text{Ci/pocillo}$  [ $^3\text{H}$ ]-timidina, y se mantuvieron, en las condiciones citadas anteriormente, durante 24 h más. Tras este tiempo la radiactividad no incorporada se lavó con ayuda de un colector de células, de forma que los ácidos nucleico se quedaban retenidos en filtros de fibra de vidrio y la [ $^3\text{H}$ ]-timidina, incorporada al DNA, se determinó por cuantificación de la radiactividad de los mismos en un contador de radiación  $\beta$ .

### 3.2.- INCORPORACION DE [ $^3\text{H}$ ]-TIMIDINA DE LINFOBLASTOS T ( $G_1$ )

Para medir la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina desde  $G_1$ , los linfoblastos T se obtuvieron como se ha descrito anteriormente. Las células, tras haberse mantenido 24 h en medio basal para que se sincronizaran en un estadio  $G_1$  temprano, se resuspendieron en dicho medio a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/ml en 100  $\mu\text{l}$ , y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  y 95 % de humedad en placas de 96 pocillos, en presencia o en ausencia de los estímulos que se utilizaran en cada experimento. A las 20 h de la adición de los estímulos se añadió 0,5  $\mu\text{Ci/pocillo}$  [ $^3\text{H}$ ]-timidina por pocillo, y se mantuvieron en las condiciones

descritas anteriormente durante 4 h más, tiempo al cabo del cual se lavó la radiactividad no incorporada, y se cuantificó la que sí lo estaba del modo citado anteriormente.

#### **4.- INMUNODETECCIONES EN FILTRO.**

Para realizar las inmunodetecciones de las diferentes proteínas en estudio, se procedió de la siguiente manera:

##### **4.1.- TAMPONES**

###### PBS

140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub>, 10 mM HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

###### Tampón de lavado de células

5 mM EDTA, 10 mM NaF, 0,4 mM ortovanadato sódico y 10 mM pirofosfato sódico en PBS.

###### Tampón de lisis total de células

50 mM Tris-ClH pH 7,5, 0,5 % Triton X-100, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 10 mM pirofosfato sódico, 1 mM ortovanadato sódico, 10 mM ácido yodoacético, 125 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 4 mM PMSF.

###### Tampón de lisis para preparación de fracción citosólica y particulada

20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,33 M sacarosa, 2 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 2 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptina

###### Tampón de muestras de Laemmli

62,5 mM Tris-ClH pH 6,8, 5% β-ME, 10% glicerol, 2% SDS, 0,001% azul de bromofenol.

###### Tampón de transferencia

25 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM glicina, 10% (v/v) metanol.

###### TBS

50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl

###### I-TBS

0,05% Tween-20 en TBS.

## **4.2.- PREPARACION DE EXTRACTOS CELULARES**

### **4.2.1.- Extractos totales**

Las células se recogieron en los tiempos indicados en cada experimento, por centrifugación a 1800 rpm durante 4 min. Se lavaron con tampón de lavado de células, se resuspendieron en el tampón de lisis total de células, se agitaron en vórtex durante 20 s, y se dejaron en hielo 15 min, tiempo tras el cual la suspensión fue centrifugada a 12000 rpm, durante 10 min y a 4°C. El sobrenadante de esta centrifugación se consideró el extracto celular total.

### **4.2.2.- Preparación de fracciones citosólica y particulada.**

Para analizar las proteínas de membrana y citosol celular de forma separada, los extractos se prepararon según el método descrito por Isakov y Altman (130). Para ello  $50 \times 10^6$  células se recogieron, como antes por centrifugación, se lavaron una vez con PBS frío, se resuspendieron en 2 ml de tampón de lisis para preparación de fracción citosólica y particulada y se sonicaron, en hielo, tres veces consecutivas, 10 s cada vez a 4 micrones de amplitud. El extracto se centrifugó a  $100000 \times g$  durante 20 min a 4°C en una ultracentrifuga TL 100. El sobrenadante se recogió, y es lo que se consideró fracción citosólica. El precipitado se resuspendió, con ayuda de un homogeneizador de vidrio, en el tampón anterior al que se le había añadido 1% Triton X-100, y se dejó durante 1 h a 4°C, con el objeto de solubilizar las membranas. Esta suspensión se centrifugó a  $100000 \times g$  durante 20 min a 4°C, y el sobrenadante fue lo que se recogió y se consideró como la fracción particulada.

## **4.3.- MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA.**

Del extracto obtenido anteriormente, bien sea procedente de una lisis total de la célula, o de las fracciones separadas de membrana y citosol, se determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford (30), utilizando BSA como estándar.

## **4.4.- ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.**

Los extractos proteicos fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS), según el método de Laemmli (151). Se aplicaron en los geles entre 30 y 80 µg de proteína de las distintas fracciones, previamente resuspendidas en tampón de muestras de Laemmli y hervidas.

En general, se utilizaron geles de 10 cm de longitud con 8% acrilamida, 0,2% bisacrilamida y 0,1% SDS. Cuando la proteína en estudio era ERK2, con el objeto de visualizar mejor el retraso en la movilidad electroforética se utilizaron geles de 20 cm de longitud con 8% de acrilamida, 0,14% bisacrilamida y 0,2% SDS.

#### **4.5.- INMUNOTRANSFERENCIA.**

Las proteínas separadas mediante electroforesis en SDS-PAGE, se transfirieron a filtros de Immobilon-P. La transferencia se realizó a 2 mA/cm<sup>2</sup>, durante 90 min y a temperatura ambiente, en tampón de transferencia. Una vez transferidas las proteínas, el filtro se tiñó con una solución de 0,1% rojo Ponceau en 1% ácido acético durante 10 min, y se destiñó con una solución de 1% ácido acético, para comprobar que la carga había sido homogénea y que la transferencia había funcionado correctamente.

#### **4.6.- INCUBACION DEL FILTRO.**

Posteriormente el filtro se incubó con 3% (p/v) leche en polvo desnatada en T-TBS, durante 1 h a temperatura ambiente, con el objeto de reducir las uniones inespecíficas, al filtro, de los anticuerpos que después se iban a utilizar. Tras lavarse con T-TBS 3 veces, 10 min cada vez, el filtro se incubó con la dilución adecuada del anticuerpo primario en T-TBS, durante 2 h a temperatura ambiente y se volvió a lavar con T-TBS 3 veces, 10 min cada vez, para después ser incubado con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa, diluido en T-TBS, durante 1 h a temperatura ambiente. El filtro se lavó con T-TBS, 10 min cada vez, y una vez con TBS. El revelado se realizó utilizando un método químico (cloronaftol junto con agua oxigenada) o un método quimioluminiscente (ECL).

### **5.- CROMATOGRAFIAS.**

#### **5.1.- CROMATOGRAFIA EN MONO-Q HR 5/5.**

##### **5.1.1.- Tampones.**

###### Tampón de lisis celular

50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,25 M sacarosa, 5 µg/ml pepstatina, 40 µg/ml PMSF, 10 mM benzamidina, 8 µg/ml antipafina, 25 µg/ml aprotinina, 0,5 mg/ml leupeptina, 0,1 mg/ml ovoalbúmina.

###### Tampón de equilibrado de la resina

50 mM Tris-ClH pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA y 1 mM DTT.

Todos los tampones fueron filtrados através de una membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ m de diametro de poro.

### **5.1.2.- Preparación de la muestra y cromatografía.**

La preparación de la muestra que posteriormente se iba a cromatografiar en la columna de Mono Q HR 5/5 fue como sigue: Se recogieron alícuotas de  $125 \times 10^6$  células, se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en el tampón de lisis celular. Posteriormente, se sonicaron en hielo tres veces consecutivas, 10 s cada vez a 4 micrones de amplitud. Los extractos se centrifugaron a  $100000 \times g$  durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ m de diámetro de poro, y se aplicaron 6-8 mg de proteína a una columna de Mono Q-Sefarosa, asistida por un sistema de cromatografía líquida de flujo (FPLC), previamente equilibrada en el correspondiente tampón de equilibrado. Las proteínas retenidas fueron eluidas de la resina con 15 ml de un gradiente de 0 a 400 mM NaCl en tampón de equilibrado, y recogidas en fracciones de 0,5 ml

Las distintas fracciones se utilizaron bien para el ensayo de actividad PKC, o bien para inmunodetección siguiendo los pasos descritos en el apartado anterior.

## **5.2.- CROMATOGRAFIA EN HEPARINA-AGAROSA.**

### **5.2.1.- Tampones**

#### Tampón de diálisis

50 mM Tris-ClH pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 5 mM  $\beta$ -ME, 10% glicerol.

#### Tampón de equilibrado

50 mM NaCl en tampón de diálisis.

### **5.2.2.- Preparación de la muestra y cromatografía.**

Las fracciones, procedentes de la cromatografía en Mono-Q sefarosa, con actividad entre 120 y 210 mM NaCl (3 ml) se juntaron. La mezcla resultante se dializó y cromatografió en un resina de heparina agarosa previamente equilibrada. Lo mismo se hizo con la actividad que eluía entre 230 y 320 mM NaCl. Tras aplicar cualquiera de las dos muestras, la resina se lavó con 5 volúmenes de la columna de tampón de equilibrado. Para eluir las proteínas retenidas, se aplicó un gradiente de 50-800 mM NaCl, de 15 ml, y se

recogieron fracciones de 0,5 ml. Las distintas fracciones se utilizaron bien para el ensayo de actividad PKC, o bien para inmunodetección siguiendo los pasos descritos en los apartados 4.4-4.6 de Materiales y Métodos.

## 6.- VALORACION DE LA ACTIVIDAD PKC.

Esta actividad se determinó midiendo la incorporación de  $^{32}\text{P}$  desde el sustrato donador,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ , al sustrato aceptor, MBP.

La mezcla de reacción, en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ , contenía: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mg/ml MBP, 40  $\mu\text{M}$  ATP,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  (2500 cpm/pmol), 10-20  $\mu\text{g}$  de proteína, con o sin 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 500  $\mu\text{g/ml}$  PS, y 100 ng/ml PDBu. La PS se secó mediante la evaporación del solvente orgánico, bajo una corriente de nitrógeno, y fue resuspendida en 50 mM Tris-HCl pH 7,5, mediante 2-3 sonicaciones consecutivas, de 10 s cada una a 4°C. Después de 10 min de incubación a 30°C, la reacción se paró mediante la adición de la mezcla de incubación a filtros de papel P-81. Los filtros se lavaron con 75 mM ácido fosfórico, varias veces hasta que la radiactividad en la solución de lavado era prácticamente despreciable. La radiactividad de los filtros se cuantificó con un contador de emisión  $\beta$ .

## 7.- ANALISIS ESTADISTICO.

Para la realización del análisis estadístico se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para la normalidad, y el test de Spearman para la correlación.

## **IV. RESULTADOS**

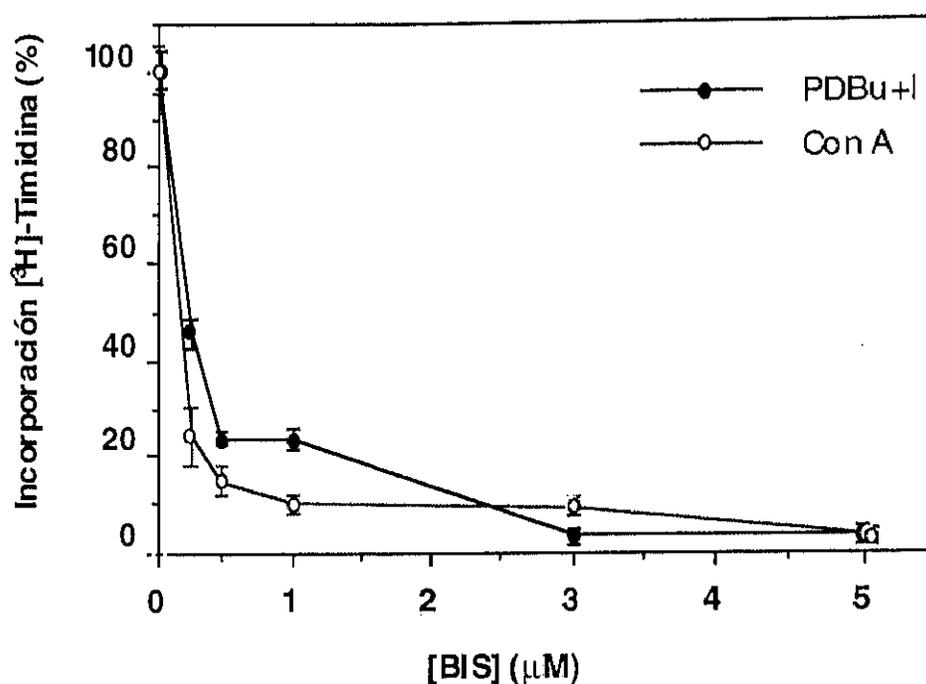
## 1.- PAPEL DE PKC EN LAS TRANSICIONES G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Y G<sub>1</sub>/S DEL CICLO CELULAR DE LINFOCITOS T.

### 1.1.- TRANSICION G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

Las señales que hacen que el linfocito T salga del estado de quiescencia G<sub>0</sub> y entre en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, como son la estimulación del TCR por un antígeno, o lectinas mitogénicas van a originar un aumento en los niveles intracelulares de dos segundos mensajeros que son calcio y diacilglicerol, provocando la activación fisiológica de PKC, entre otros eventos intracelulares (22). Esta activación del linfocito T puede conseguirse mediante el uso conjunto de ionóforos de calcio y ésteres de forbol (274,284), que promueven de forma no fisiológica un incremento del calcio intracelular y la activación de PKC. Ya que este aumento en la actividad de PKC es un requisito indispensable en la activación de linfocitos T, los inhibidores de PKC potencialmente actuarían bloqueando la proliferación de los mismos. Un inhibidor de PKC comúnmente utilizado ha sido el alcaloide microbiano estaurosporina (166). Sin embargo, su falta de especificidad (291) es el principal problema cuando se desea un bloqueo selectivo de una vía de señalización celular dependiente de PKC. En los últimos años se ha sintetizado un inhibidor de PKC, BIS, estructuralmente relacionado con estaurosporina y descrito como inhibidor potente y más específico de PKC (271) que los utilizados hasta el momento. Con el fin de estudiar la intervención de PKC en la activación de linfocitos T, y como base para estudios posteriores, analizamos el efecto del BIS en la transición G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular.

Este estudio lo llevamos a cabo midiendo la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina en linfocitos recién obtenidos de ganglios de rata. Para realizar esta medida, las células se preincubaron 1 h, antes del estímulo correspondiente, con BIS en un rango de concentraciones que variaron entre 0,25 y 5 μM. Posteriormente se añadió bien 2 μg/ml Con A, (lectina mitogénica), o bien 5 ng/ml PDBu (éster de forbol) junto con 0,25 μM A23187 (ionóforo de calcio). La incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina se realizó según se explica en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos.

En la figura 5, se muestra que en ambos casos se produjo un bloqueo por BIS de la proliferación que es dosis dependiente. También se pudo observar una inhibición, algo



**Figura 5. Inhibición de la proliferación celular de linfocitos T por BIS utilizado a distintas concentraciones.**

La figura muestra la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina de linfocitos T, realizada como se explica en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos, que habían sido incubados durante 1 h con diferentes concentraciones de BIS, y que posteriormente se estimularon con 2 μg/ml Con A (—○—), o con 5 ng/ml PDBu más 0,25 μM ionóforo A23187 (—●—). El experimento se realizó por triplicado representándose en la gráfica la media ± SD .

mayor, de la proliferación promovida por Con A, que de la inducida por PDBu junto con el ionóforo de calcio.

Para estudiar si esta actividad PKC, que se estaba inhibiendo, era necesaria sólo en un tiempo próximo al estímulo, o también en tiempos posteriores, se añadió 0,5  $\mu\text{M}$  BIS a la vez y a diferentes tiempos después de la adición del estímulo. Como se observa en la figura 6, el BIS añadido a la vez que el mitógeno, Con A o PDBu más ionóforo A23187, produjo una inhibición de más del 90% de la incorporación de ( $^3\text{H}$ )-timidina. La adición del BIS a tiempos posteriores, siguió bloqueando en un 90% la proliferación producida por Con A. En el caso de PDBu más ionóforo de calcio, el bloqueo de la proliferación fue progresivamente menor, siendo la inhibición de un 70% si el BIS se añadía a las 5 h tras el estímulo.

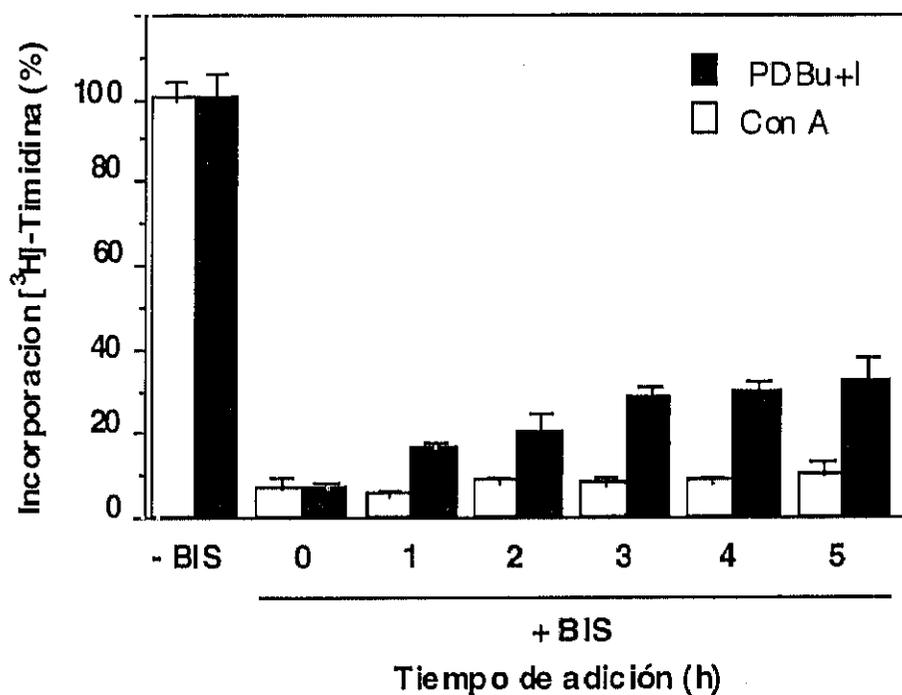
Estos resultados, de acuerdo con lo ya descrito (22), indican que en el sistema empleado es necesaria la actividad PKC en la transición  $G_0/G_1$ , y además no sólo como un evento temprano, sino también, al menos, hasta 5 h después del estímulo.

## 1.2.- TRANSICION $G_1/S$ .

Como se ha descrito anteriormente, el paso de la fase  $G_1$  a la fase S del ciclo celular en los linfoblastos T, puede producirse tras el estímulo de la célula con su factor de crecimiento específico IL-2, o con un éster de forbol como es el PDBu. Hay datos que demuestran que las vías de transducción activadas por ambos estímulos son distintas, residiendo una de las diferencias principales, en el hecho de que la proliferación por IL-2 es independiente de la actividad PKC, mientras que para el PDBu, su receptor intracelular es precisamente una buena parte de las isoformas de PKC. Por tanto, el uso de inhibidores específicos de la actividad PKC, bloquearía la proliferación desencadenada por el éster de forbol, pero no por la citoquina. Se analizó el efecto del BIS, y se comparó con el efecto producido por otro inhibidor de PKC menos específico, como es la estaurosporina, en la incorporación de ( $^3\text{H}$ )-timidina, en linfoblastos T, procedentes de bazo de rata, y obtenidos como se describe en el apartado 1.2 de Materiales y Métodos.

En la figura 7, se puede observar como BIS fue capaz de bloquear la proliferación inducida por PDBu a concentraciones (0,25  $\mu\text{M}$ ) a las que no afectó la causada por IL-2, inhibiéndose la proliferación promovida por esta última, sólo a altas concentraciones del inhibidor (3-5  $\mu\text{M}$ ). Por otro lado, la estaurosporina bloqueó la proliferación promovida por ambos mitógenos a concentraciones en el rango de nM.

Estos datos muestran claramente la especificidad de acción del BIS, como inhibidor de las señales desencadenadas por PKC, confirmando que la señal producida por IL-2 es independiente de la actividad PKC.



**Figura 6. Inhibición de la proliferación celular de linfocitos T por BIS añadido a distintos tiempos.**

La figura muestra la incorporación de ( $^3\text{H}$ )-timidina de linfocitos T estimulados con  $2\ \mu\text{g/ml}$  Con A, o con  $5\ \text{ng/ml}$  PDBu más  $0,25\ \mu\text{M}$  ionóforo A23187, incubados en ausencia o en presencia de  $0,5\ \mu\text{M}$  BIS, añadido al mismo tiempo (0 h) o después (1-5 h) del estímulo. El experimento se realizó por triplicado representándose en la gráfica la media  $\pm$  SD.

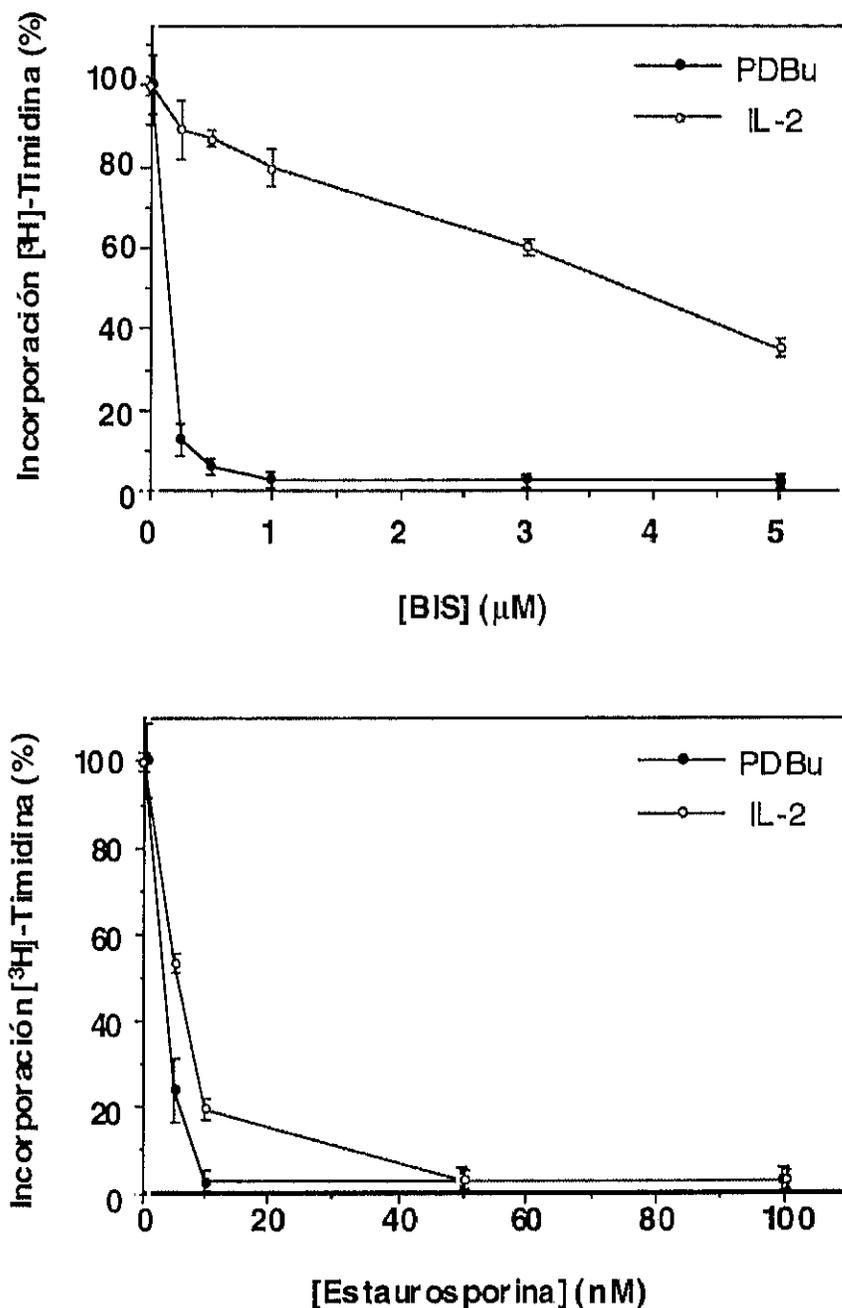


Figura 7. Efecto del BIS y de la estaurosporina en la proliferación celular producida por PDBu o IL-2 en linfoblastos T.

La figura muestra la incorporación de ( $^3\text{H}$ )-timidina de linfoblastos T, realizada como se explica en el apartado 3.2 de Materiales y Métodos, que hablan sido incubados durante 1 h con distintas concentraciones de BIS (parte superior de la figura) o de estaurosporina (parte inferior de la figura), y que posteriormente se estimularon con 80 ng/ml PDBu ( $\bullet$ ), o con 20 U/ml IL-2 ( $\circ$ ). El experimento se realizó por triplicado, representándose en la gráfica la media  $\pm$  SD.

## **2.- ACTIVACION DE DIFERENTES ISOFORMAS DE PKC EN LA TRANSICION G<sub>1</sub>/S**

### **2.1.- ESTUDIO DE LA DEPLECION DE LAS ISOFORMAS DE PKC**

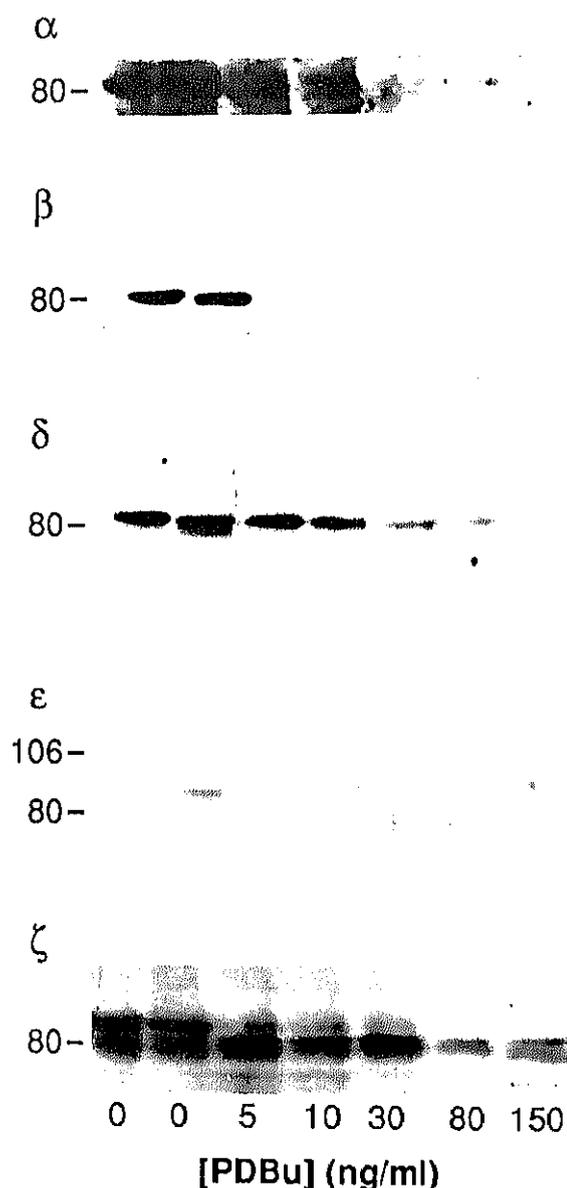
Los receptores intracelulares para los ésteres de forbol son las diferentes isoformas de PKC susceptibles de ser activadas por dichos agentes. Hasta el momento todas las isoformas de PKC se unen a ellos, a excepción de las isoformas  $\zeta$ ,  $\lambda$ ,  $\iota$  (122). El PDBu al unirse al dominio regulador de la mayoría de las PKC, promueve su translocación a la membrana, donde el enzima es activado por lípidos de membrana y degradado rápidamente. Si el tiempo de incubación con el éster de forbol es prolongado, se puede llegar a la eliminación, o depleción, del enzima de la célula debido a su degradación proteolítica. A este fenómeno se le conoce como "down regulation". Por tanto, para estudiar qué isoformas eran susceptibles de ser activadas por PDBu en la transición G<sub>1</sub>/S del ciclo celular, se analizó la depleción de las mismas, en respuesta a la incubación de linfoblastos T con diferentes concentraciones del éster de forbol, desde 5 a 150 ng/ml, seguida de inmunotransferencia y posterior inmunodetección, empleando anticuerpos específicos para cada una de las isoformas.

En la figura 8, se muestra como las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , y p82  $\zeta$  dejaron de detectarse después de 14 h de incubación de los linfoblastos T con PDBu. Además, se pudo observar que las isoformas eran igualmente sensibles al éster de forbol, excepto las isoformas  $\delta$  y p82  $\zeta$  que necesitaron concentraciones más altas (30-80 ng/ml) de PDBu, que las requeridas para la eliminación de las otras isoenzimas (5 ng/ml). Por otro lado, p75  $\zeta$  permaneció tras la exposición de las células al éster de forbol.

Luego, el experimento mostrado en la figura 8, implicaba que las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y p82  $\zeta$  son susceptibles de ser activadas por PDBu en la transición G<sub>1</sub>/S.

### **2.2.- TRANSLOCACION A LA MEMBRANA DE LAS ISOFORMAS DE PKC.**

Ya que el enzima en su proceso de activación, es translocado desde el citosol a la membrana plasmática, está aceptado como medida de activación de las isoformas de PKC su localización en la membrana en un tiempo corto después de la adición del estímulo (20). Por tanto, mediante inmunodetección en filtro, se estudió la translocación del citosol a la membrana de las distintas isoenzimas. Las células se estimularon bien con 80 ng/ml PDBu o con 20 U/ml IL-2, utilizando esta última como control negativo, y se recogieron a los tiempos indicados en la figura, separándose la fracción citosólica de la particulada según se explica en el apartado 4.2.2 de Materiales y Métodos.



**Figura 8. Efecto del tratamiento prolongado de linfoblastos T con PDBu sobre distintas isoformas de PKC.**

La figura muestra la inmunodetección en filtros, realizada según se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos, de distintas isoformas de PKC, utilizando anticuerpos específicos para cada isoforma. Los linfoblastos T una vez obtenidos, como se explica en el apartado 1.2 de Materiales y Métodos, se recogieron (primer carril izquierda), o se mantuvieron en cultivo en ausencia (segundo carril izquierda), o en presencia de diferentes concentraciones de PDBu durante 14 h. En la inmunotransferencia se utilizaron 60  $\mu\text{g}$  de proteína total, aislada a partir de los linfoblastos T, como se explica en el apartado 4.2.1 de Materiales y Métodos. El anticuerpo que se utilizó en cada caso, se especifica con la letra griega correspondiente, que aparece a la izquierda de cada inmunotransferencia. Los anticuerpos se emplearon a una concentración de 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Los números a la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular expresada en kDa.

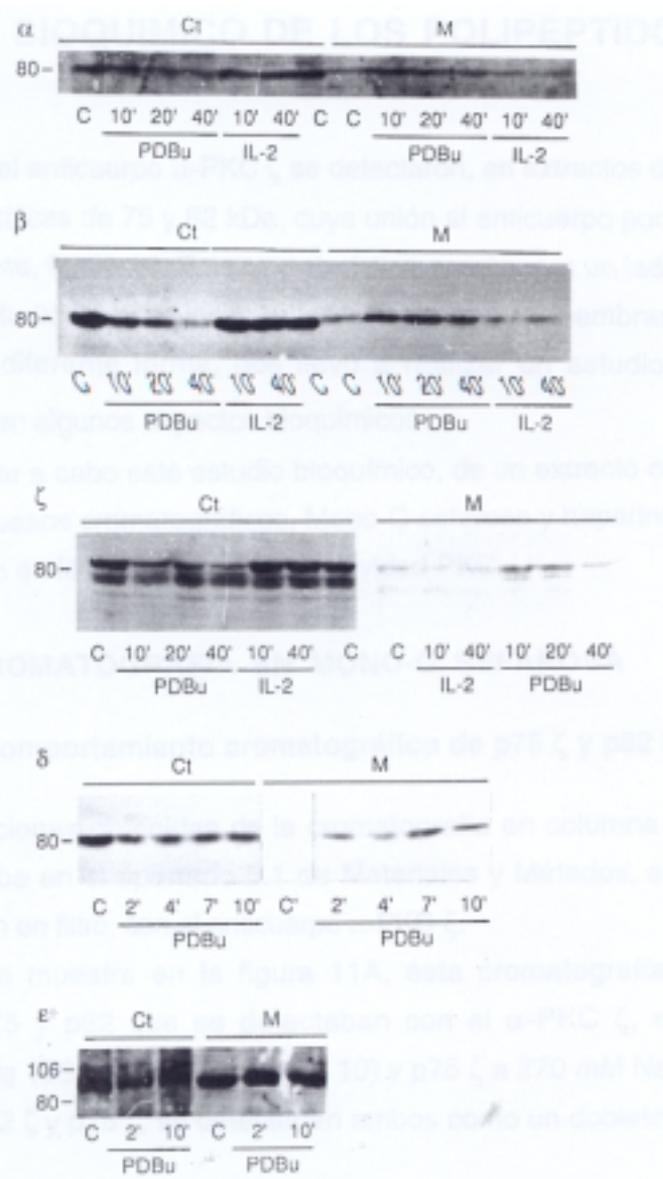
## 2.2.- TRANSLOCACION A LA MEMBRANA DE LAS ISOFORMAS DE PKC.

Ya que el enzima en su proceso de activación, es translocado desde el citosol a la membrana plasmática, está aceptado como medida de activación de las isoformas de PKC su localización en la membrana en un tiempo corto después de la adición del estímulo (20). Por tanto, mediante inmunodetección en filtro, se estudió la translocación del citosol a la membrana de las distintas isoenzimas. Las células se estimularon bien con 80 ng/ml PDBu o con 20 U/ml IL-2, utilizando esta última como control negativo, y se recogieron a los tiempos indicados en la figura, separándose la fracción citosólica de la particulada según se explica en el apartado 4.2.2 de Materiales y Métodos.

Como se muestra en la figura 9, las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y p82  $\zeta$  son principalmente citosólicas en células no estimuladas, y se translocan a la membrana tras la adición de PDBu; p75  $\zeta$ , que también es citosólica, en mayor proporción, en estas células, no se ve afectada. IL-2 no originó ningún cambio en la localización subcelular de ninguna de las isoenzimas de PKC.

Con respecto a PKC  $\epsilon$ , en células no estimuladas ya se observó su presencia en membrana, y no se apreció ningún aumento del enzima en la misma tras el estímulo, pero sí se detectó una disminución de la cantidad presente en la fracción citosólica. Por otro lado este enzima fue especialmente sensible a proteólisis, pues cuando el extracto, una vez añadido el tampón de muestras de Laemmli, y hervido, es congelado y descongelado 2-3 veces, se produjo una visible degradación del enzima (datos no mostrados).

Estos datos nos indicaron que, al menos, las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y p82  $\zeta$  son activadas por PDBu.



**Figura 9. Distribución subcelular de distintas isoformas de PKC en linfoblastos T estimulados con PDBu.**

La figura muestra la distribución subcelular de distintas isoformas de PKC, mediante inmunodetección en filtro empleando anticuerpos específicos para cada isoforma. Para la inmunotransferencia se emplearon 40 µg de proteína procedente de la fracción soluble (Ct) o de la fracción particulada (M), obtenidas, según se explica en el apartado 4.2.2 de Materiales y Métodos, a partir de linfoblastos T, que habían sido estimulados con 80 ng/ml PDBu o con 20 U/ml IL-2, recogiendo las células a los tiempos indicados. El anticuerpo utilizado en cada caso se indica con la respectiva letra griega a la izquierda. Los números a la izquierda de cada inmunotransferencia señalan la posición de los marcadores de peso molecular, expresada en kDa. C: control de células sin estimular.

### **3.- ESTUDIO BIOQUIMICO DE LOS POLIPEPTIDOS p75 $\zeta$ Y p82 $\zeta$ .**

Utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -PKC  $\zeta$  se detectaron, en extractos de linfocitos T de rata, dos bandas específicas de 75 y 82 kDa, cuya unión al anticuerpo podía competir con el péptido inmunizante, figura 10. Esta característica común, por un lado, junto con el hecho de que en los estudios de depleción y translocación a la membrana, p75  $\zeta$  y p82  $\zeta$  se comportaran de diferente forma, nos llevó a realizar un estudio comparativo de su comportamiento en algunos aspectos bioquímicos.

Para llevar a cabo este estudio bioquímico, de un extracto celular de linfoblastos T se hicieron dos pasos cromatográficos, Mono-Q sefarosa y heparina-agarosa, análisis por inmunodetección en filtro y ensayo de la actividad PKC.

#### **3.1.- CROMATOGRAFIA EN MONO-Q SEFAROSA**

##### **3.1.1.- Comportamiento cromatográfico de p75 $\zeta$ y p82 $\zeta$ .**

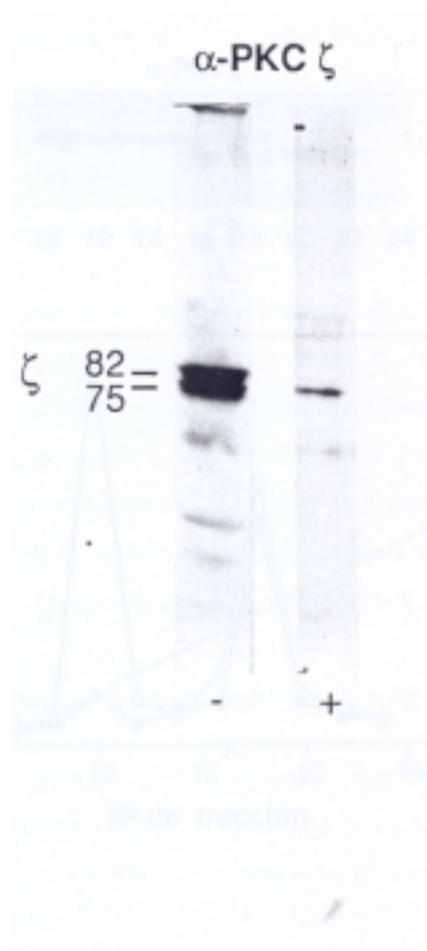
Las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de Mono-Q, realizada como se describe en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos, se analizaron mediante inmunodetección en filtro, con el anticuerpo  $\alpha$ -PKC  $\zeta$ .

Como se muestra en la figura 11A, esta cromatografía permitió separar los polipéptidos p75 y p82 que se detectaban con el  $\alpha$ -PKC  $\zeta$ , eluyendo p82  $\zeta$  a una concentración de 150 mM NaCl (fracción 10) y p75  $\zeta$  a 270 mM NaCl (fracción 18). Estos polipéptidos, p82  $\zeta$  y p75  $\zeta$ , se detectaban ambos como un doblete.

##### **3.1.2.-Ensayo de la actividad PKC. Respuesta a PS/PDBu, BIS y pseudosustrato $\zeta$ .**

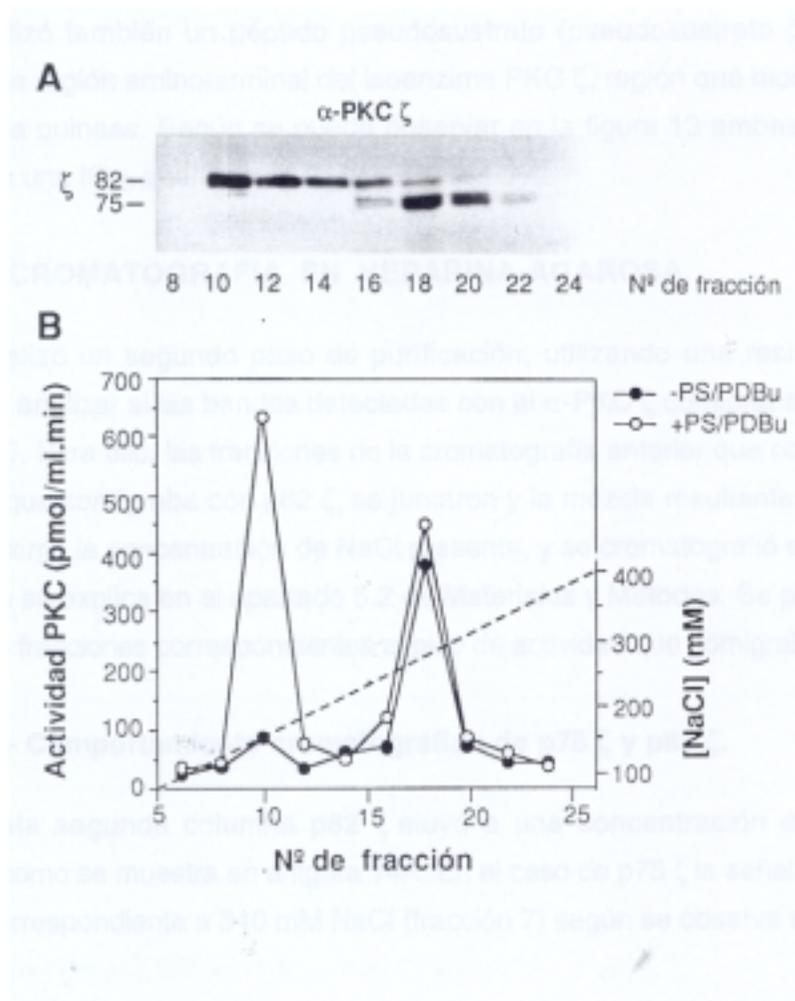
Se valoró la actividad PKC de las fracciones obtenidas en la columna anterior, según se explica en el apartado 6 de Materiales y Métodos.

Como se observa en la figura 11B, el polipéptido p82  $\zeta$  comigraba con una actividad fosforilante sobre MBP, la cual es estimulada unas dos veces por PS (datos no mostrados) y unas ocho veces por PS/PDBu, mientras que el polipéptido p75 comigró con una actividad que fosforilaba MBP, y que no respondió a ninguno de los dos activadores.



**Figura 10. Competición con el péptido inmunogénico del anticuerpo  $\alpha$ PKC  $\zeta$ .**

La figura muestra la inmunodetección de la isoforma  $\zeta$  de PKC detectada con el anticuerpo específico. Para la inmunotransferencia se emplearon 60  $\mu$ g de proteína total procedente de linfoblastos T. El filtro se incubó con el anticuerpo  $\alpha$ PKC  $\zeta$  en ausencia (-) o en presencia (+) del péptido inmunogénico, utilizado éste a una concentración de 1,5  $\mu$ g/ml.



**Figura 11. Separación mediante cromatografía en columna de Mono-Q de p82  $\zeta$  y p75  $\zeta$ .**

Se cromatografiaron 6-8 mg de proteína procedentes de linfoblastos T en una columna de Mono-Q, como se describe en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos. **(A)** Inmunodetección realizada con el anticuerpo  $\alpha$ -PKC  $\zeta$ . Para la inmunotransferencia se utilizaron 30  $\mu$ l de las fracciones procedentes de la cromatografía. **(B)** Perfil de la actividad PKC de las fracciones anteriores. El ensayo se realizó utilizando MBP como sustrato, en ausencia ( $\bullet$ ) o en presencia ( $\circ$ ) de PS y PDBu, como se explica en el apartado 6 de Materiales y Métodos, y por duplicado, representándose en la gráfica la media de ambos valores.

Para llevar a cabo una mejor caracterización de estas dos actividades, se estudió el efecto de diferentes inhibidores sobre ambas. Se probó el efecto del BIS, en las fracciones en las que eluían estas dos actividades de PKC. Ambas se inhibieron con una  $IC_{50}$  aparente de 30 nM, como se muestra en la figura 12.

Se utilizó también un péptido pseudosustrato (pseudosustrato  $\zeta$ ), diseñado de acuerdo con la región aminoterminal del isoenzima PKC  $\zeta$ , región que bloquea el dominio catalítico de la quinasa. Según se puede observar en la figura 13 ambas actividades se inhibieron con una  $IC_{50}$  aparente de 2  $\mu$ M.

### **3.2.- CROMATOGRAFIA EN HEPARINA-AGAROSA.**

Se realizó un segundo paso de purificación, utilizando una resina de heparina agarosa para analizar si las bandas detectadas con el  $\alpha$ -PKC  $\zeta$  comigraban de nuevo con actividad PKC. Para ello, las fracciones de la cromatografía anterior que constitúan el pico de actividad que comigraba con p82  $\zeta$ , se juntaron y la mezcla resultante se dializó, para reducir al máximo la concentración de NaCl presente, y se cromatografió en esta segunda resina, según se explica en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos. Se procedió de igual forma con las fracciones correspondientes al pico de actividad que comigraba con p75  $\zeta$ .

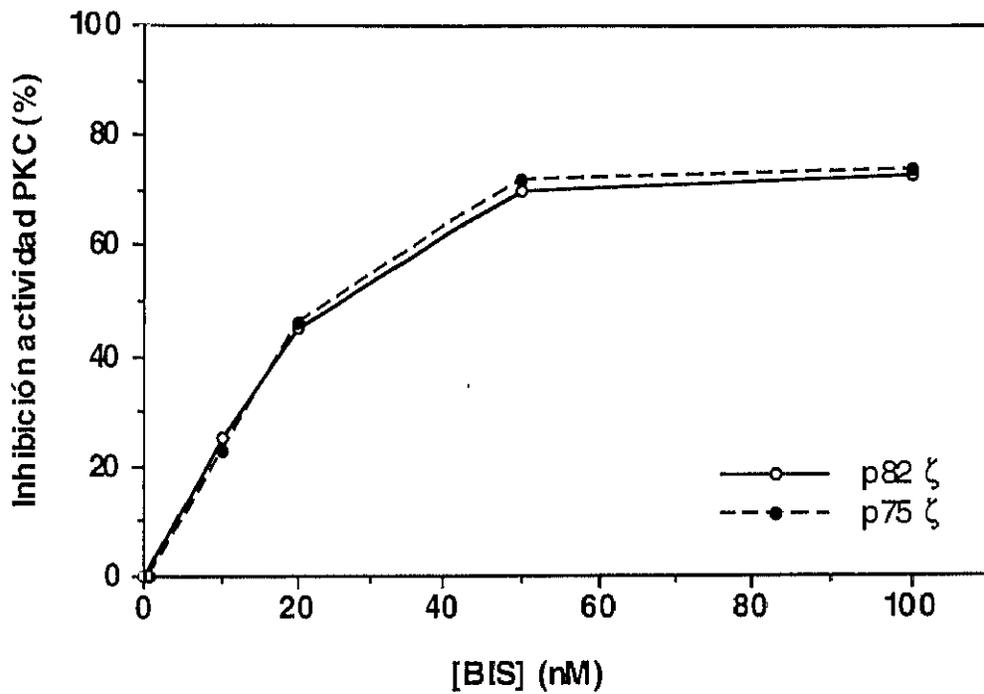
#### **3.2.1.- Comportamiento cromatográfico de p75 $\zeta$ y p82 $\zeta$ .**

En esta segunda columna p82  $\zeta$  eluyó a una concentración de 80 mM NaCl (fracción 3), como se muestra en la figura 14A. En el caso de p75  $\zeta$  la señal se detectó en la fracción 7, correspondiente a 340 mM NaCl (fracción 7) según se observa en la figura 15A.

#### **3.2.2.- Ensayo de la actividad PKC. Respuesta a PS/PDBu.**

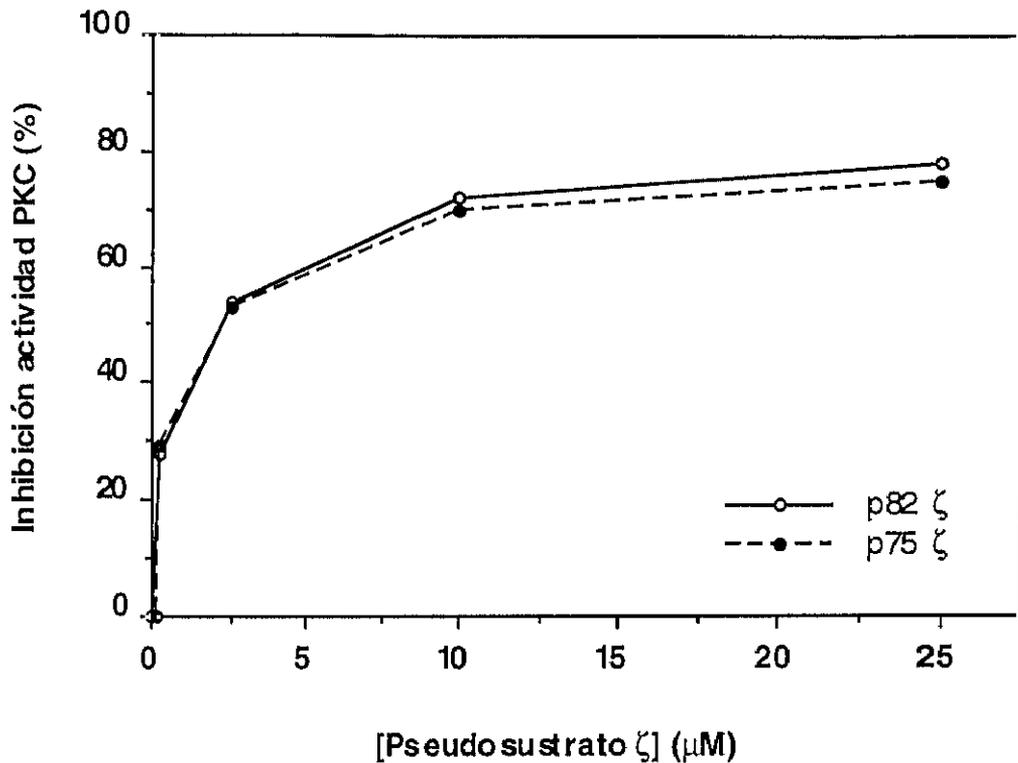
En la figura 14B se puede ver que al valorar la actividad quinasa sobre MBP, en ausencia de activadores, p82  $\zeta$  no comigraba con la fracción de máxima actividad, pero sí con una actividad que se estimulaba en presencia de PS/PDBu.

Por otra parte, en la cromatografía para p75  $\zeta$ , se observó que ésta comigraba de nuevo con una actividad quinasa sobre MBP insensible a PS/PDBu, como se muestra en la figura 15B.



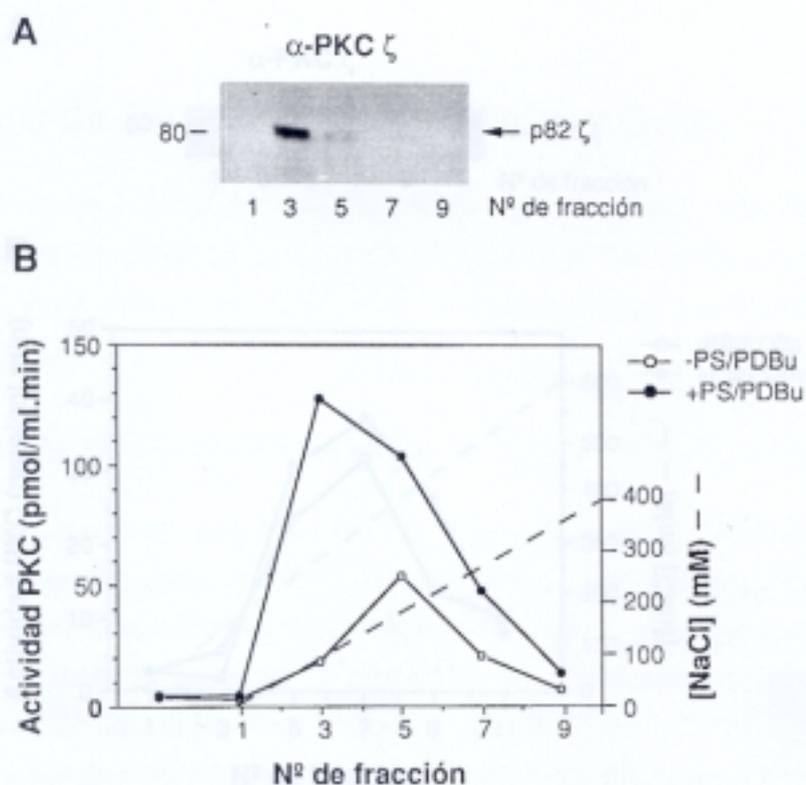
**Figura 12. Inhibición por BIS de la actividad PKC de p75  $\zeta$  y p82  $\zeta$ .**

La figura muestra la curva de Inhibición de la actividad PKC de p75  $\zeta$  y p82  $\zeta$  en presencia de diferentes concentraciones de BIS. Se utilizó como fuente de enzima 6  $\mu$ l de la fracción 18 de la Mono-Q para p75  $\zeta$ , y de la fracción 10 de la Mono-Q para p82  $\zeta$ . El ensayo se realizó utilizando MBP como sustrato, según se describe en el apartado de Materiales y Métodos, y por duplicado, representándose en la gráfica la media de ambos valores.



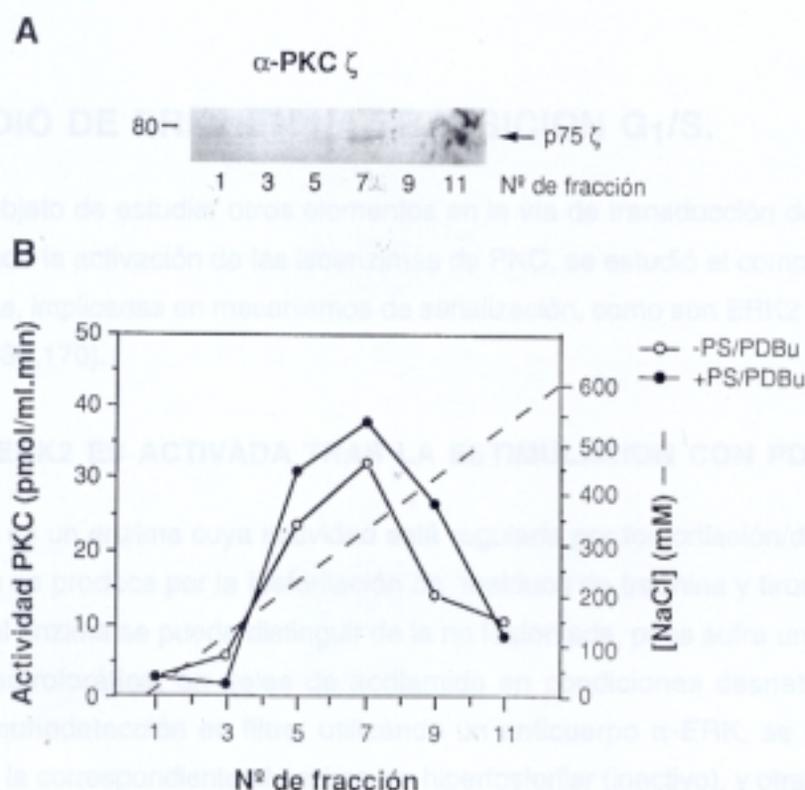
**Figura 13. Inhibición por pseudosustrato  $\zeta$  de la actividad PKC de p75  $\zeta$  y p82  $\zeta$ .**

La figura muestra la curva de inhibición de la actividad PKC de p75  $\zeta$  y p82  $\zeta$  en presencia de distintas concentraciones de pseudosustrato  $\zeta$ . Se utilizó como fuente de enzima 6  $\mu$ l de la fracción de la 18 de la Mono-Q p75  $\zeta$ , y de la fracción 10 de la Mono-Q para p82  $\zeta$ . El ensayo se realizó utilizando MBP como sustrato, según se describe en el apartado 6 de Materiales y Métodos, y por duplicado representándose en la gráfica la media de ambos valores.



**Figura 14. Análisis cromatográfico en columna de Heparina-agarosa de p82  $\zeta$ .**

La muestra, obtenida a partir de las fracciones del gradiente entre 120 y 210 mM NaCl de la columna de Mono Q, se preparó y cromatografió en una columna de Heparina-agarosa según se describe en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos. **(A)** Inmunodetección de p82  $\zeta$ , utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -PKC  $\zeta$ . Para la inmunotransferencia se utilizaron 30  $\mu$ l de las fracciones con actividad PKC procedentes de la cromatografía. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular expresada en kDa; la flecha a la derecha indica la posición de p82  $\zeta$ . **(B)** Perfil de la actividad PKC procedente de las fracciones anteriores. El ensayo se realizó utilizando MBP como sustrato, según se explica en el apartado 6 de Materiales y Métodos, en ausencia (—○—) o en presencia (—●—) de PS y PDBu, y por duplicado, representándose en la gráfica la media de ambos valores.



**Figura 15. Análisis cromatográfico en columna de Heparina-agarosa de p75  $\zeta$ .**

La muestra, obtenida a partir de las fracciones del gradiente entre 230 y 320 mM NaCl de la columna de Mono Q, se preparó y cromatografió en una columna de Heparin-agarosa según se describe en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos. **(A)** Inmunodetección de p75  $\zeta$  utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -PKC  $\zeta$ . Para la inmunotransferencia se utilizaron 30  $\mu$ l de las fracciones con actividad PKC procedentes de la cromatografía. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular expresada en kDa; la flecha a la derecha indica la posición de p75  $\zeta$ . **(B)** Perfil de la actividad PKC procedente de las fracciones anteriores. El ensayo se realizó utilizando MBP como sustrato, según se explica en el apartado 6 de Materiales y Métodos, en ausencia (—○—) o en presencia (—●—) de PS y PDBu, y por duplicado, representándose en la gráfica la media de ambos valores.

Los datos obtenidos de ambas cromatografías, Mono-Q seferosa y heparina-agarosa, indicaron que el polipéptido p75  $\zeta$  se comporta como la PKC  $\zeta$  descrita por algunos grupos (144,179), mientras que el polipéptido p82  $\zeta$  parece ser una isoforma relacionada.

#### **4.- ESTUDIO DE ERK2 EN LA TRANSICION G<sub>1</sub>/S.**

Con objeto de estudiar otros elementos en la vía de transducción de la señal que comenzaba con la activación de las isoenzimas de PKC, se estudió el comportamiento de otras quinasas, implicadas en mecanismos de señalización, como son ERK2 (134,170,171) y Raf-1 (60,134,170).

##### **4.1.- ERK2 ES ACTIVADA TRAS LA ESTIMULACION CON PDBu.**

ERK2 es un enzima cuya actividad está regulada por fosforilación/defosforilación. Su activación se produce por la fosforilación de residuos de treonina y tirosina. La forma fosforilada del enzima se puede distinguir de la no fosforilada, pues sufre un retraso en su movilidad electroforética, en geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes, y mediante inmunodetección en filtro, utilizando un anticuerpo  $\alpha$ -ERK, se observan dos señales: una, la correspondiente al enzima sin hiperfosforilar (inactivo), y otra, de migración más lenta, perteneciente a la fracción del enzima hiperfosforilado (activo). Por otro lado, ya que el enzima activado necesita ser fosforilado en tirosina, se puede detectar un aumento en los niveles de fosfotirosina en ERK2 activada, mediante el abordaje anterior, y empleando un anticuerpo  $\alpha$ -fosfotirosina ( $\alpha$ -PTyr). Por tanto, como criterio para medir la actividad analizamos los dos parámetros: Retraso en la movilidad electroforética y un aumento en los niveles de fosfotirosina.

Primeramente analizamos si a la concentración de PDBu a la cual se habían realizado los estudios de translocación de la PKC a la membrana, se observaba una activación de ERK2. Para ello, los linfoblastos T se incubaron con el éster de forbol, y se recogieron las células a 2 y 30 min tras el estímulo. Como se puede observar en la figura 16A, a dichos tiempos una fracción de las moléculas de ERK2 sufre un retraso en la movilidad electroforética, correlacionando la aparición de esta banda superior con un aumento en los niveles de fosfotirosina, figura 16B.

Este experimento demuestra que ERK2 se activa tras la estimulación de linfoblastos T con PDBu.



**Figura 16. Activación de ERK2 en linfoblastos T estimulados con PDBu.**

La figura muestra las inmunodetecciones de ERK2, utilizando (A) el anticuerpo específico α-ERK, c (B) el anticuerpo específico α-P-Tyr. En la inmunotransferencia mostrada en (A) se utilizaron 30 μg y en (B) 90 μg de proteína total procedente de linfoblastos T, estimulados con 80 ng/ml PDBu durante 2 ó 30 min. C: control de células sin estimular, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2, la flecha a la derecha señala ERK2 hiperfosforilada.

## **4.2.- PAPEL DE ERK2 EN LA TRANSICION G<sub>1</sub>/S EN LINFOBLASTOS T.**

### **4.2.1.- Efecto del BIS en la activación de ERK2.**

Debido a que ERK2 se activaba en respuesta a PDBu, y BIS bloqueaba la proliferación desencadenada por este mitógeno, estudiamos cómo se afectaba la activación de ERK2 en presencia del inhibidor de PKC.

Para ello se preincubaron las células con 0,5  $\mu$ M BIS, durante 1 h, previo al estímulo con 80 ng/ml PDBu. Como se muestra en la figura 17A, en presencia de BIS se inhibió el retraso en la movilidad electroforética, y el aumento en los niveles de fosfotirosina de ERK2, figura 17B.

La inhibición de la activación de ERK2, por parte de BIS, fue dosis dependiente, pues, en otro experimento, correlacionó con la inhibición de la proliferación en un rango de concentraciones de BIS entre 0,2 y 2  $\mu$ M (datos no mostrados).

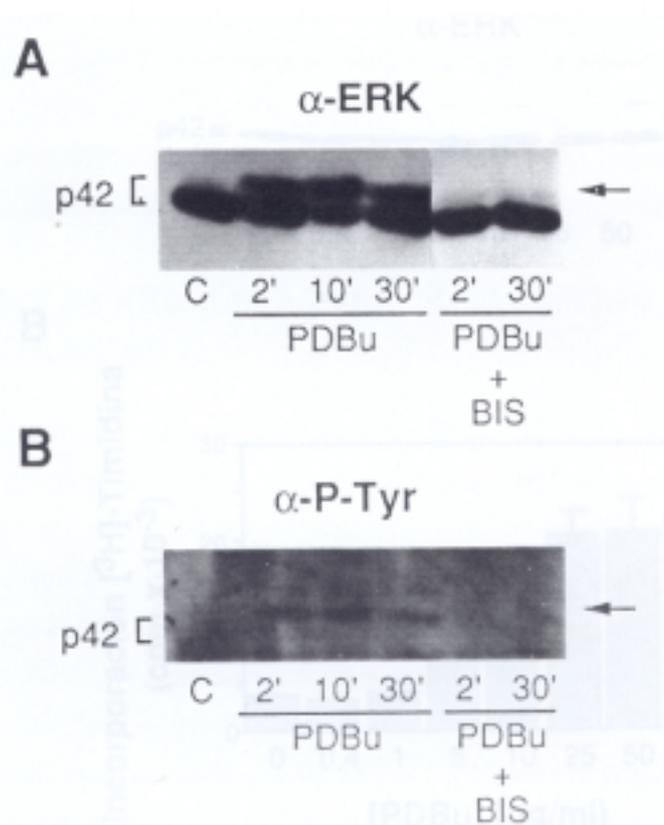
Estos resultados indicaron que la activación de ERK2 se debe específicamente a la activación de PKC, y que posiblemente esté participando en la señal de proliferación desencadenada por PDBu.

### **4.2.2.- Relación proliferación celular/activación ERK2.**

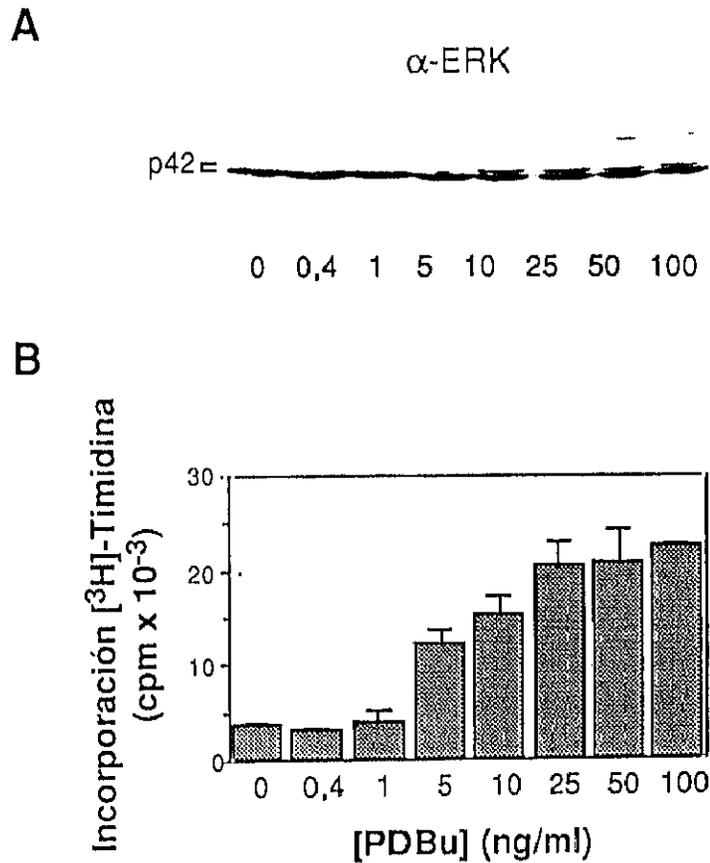
Con el fin de estudiar en más profundidad la importancia de la activación de ERK2 en la proliferación celular, se analizó la relación de la proliferación celular y la activación de ERK2, a diferentes concentraciones del mitógeno. La proliferación se midió como incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina en linfoblastos T.

Como se puede observar en la figura 18, existe una correlación directa entre la concentración de PDBu requerida para promover proliferación y la requerida para inducir la hiperfosforilación del enzima.

No solamente a diferentes concentraciones de PDBu variaba el retraso en la movilidad electroforética de ERK2, sino que también esta variación se observó entre diferentes experimentos, utilizando en todos ellos una concentración saturante (80 ng/ml) del éster de forbol, y siendo el tiempo de incubación del mitógeno igual en todos ellos. Ya que, por otro lado, la capacidad del PDBu de funcionar como mitógeno, medido como el número de veces que aumentaba la incorporación de timidina, también variaba entre distintos experimentos, utilizándose siempre 80 ng/ml, quisimos estudiar si había alguna relación entre el porcentaje de moléculas hiperfosforiladas de ERK2 y la proliferación celular.



**Figura 17. Efecto del BIS en la activación de ERK2 en linfoblastos T estimulados con PDBu.** La figura muestra la inmunodetección de ERK2, utilizando (A) el anticuerpo específico  $\alpha$ -ERK, o (B) el anticuerpo específico  $\alpha$ -P-Tyr. En la inmunotransferencia mostrada en (A) se utilizaron 30  $\mu$ g y en (B) 90  $\mu$ g de proteína total procedente de linfoblastos T, incubados durante 30 min en ausencia o en presencia de 0,5  $\mu$ M BIS, y posteriormente estimulados con 80 ng/ml PDBu durante los tiempos indicados. C: control de células sin estimular, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2, la flecha a la derecha señala ERK2 hiperfosforilada.



**Figura 18. Correlación de la activación de ERK2 con la proliferación de linfoblastos T a distintas concentraciones de PDBu.**

(A) Inmunodetección de ERK2, utilizando el anticuerpo específico  $\alpha$ -ERK. Para la inmunotransferencia se emplearon 30  $\mu$ g de proteína total, procedente de linfoblastos T que fueron estimulados durante 30 min con las concentraciones indicadas en la figura de PDBu; p42 indica las bandas correspondientes a ERK2. (B) Incorporación de ( $^3$ H)-timidina de linfoblastos T estimulados con las distintas concentraciones de PDBu. El ensayo se realizó por triplicado, representándose en la gráfica la media  $\pm$  SD.

Para realizar este estudio, se analizaron 11 experimentos diferentes. Se cuantificó el porcentaje de moléculas que habían sufrido el retraso en la migración mediante densitometrado, y se determinó para cada experimento, el número de veces que había aumentado la síntesis de DNA.

Como se muestra en la figura 19, se observó que el número de veces que aumentaba la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina, era mayor cuando el porcentaje de la fracción hiperfosforilada de ERK2 aumentaba, teniendo ambos parámetros una correlación significativa ( $p < 0,05$ ), según el test de Spearman.

Todos estos datos sugirieron que la activación de la quinasa ERK2 podría ser el paso limitante en la transición G<sub>1</sub>/S de los linfoblastos T promovida por PDBu.

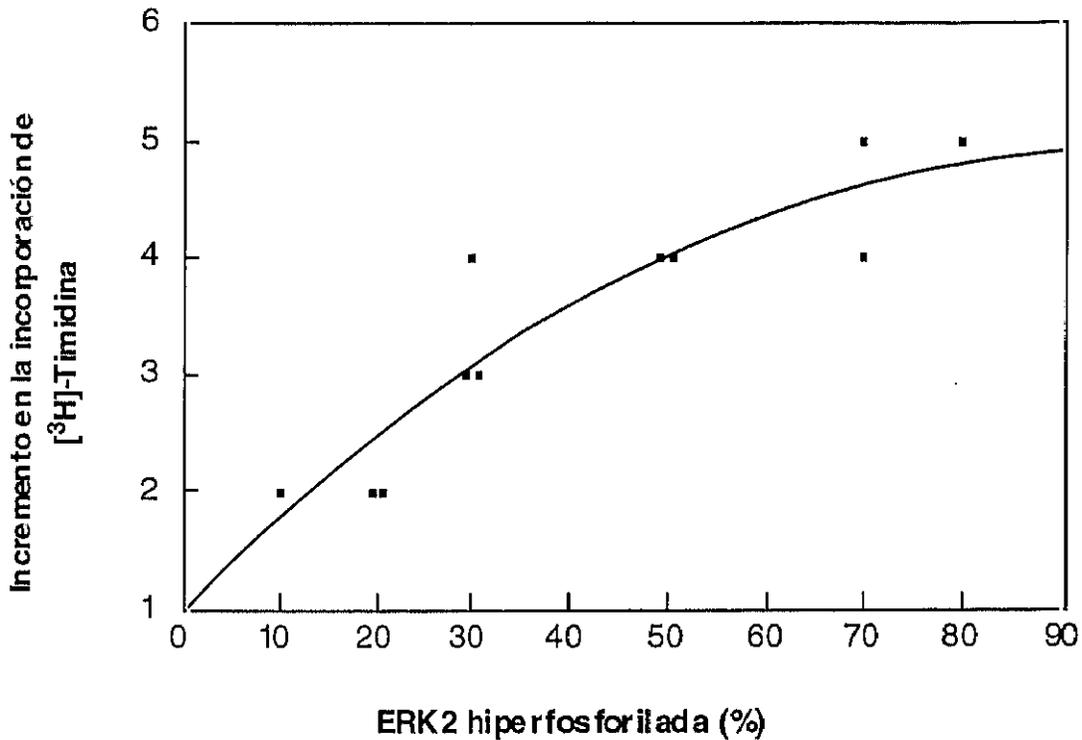
#### **4.3.- ERK2 ES NECESARIA PERO NO SUFICIENTE EN LA TRANSICION G<sub>1</sub>/S DE LINFOBLASTOS T.**

Para analizar si la señal transmitida por PKC iba exclusivamente vía ERK2, o se necesitaban otras vías adicionales, se estudió cuánto tiempo se mantenía ERK2 activada y se comparó con el tiempo que era necesario que estuviera presente la actividad PKC.

Con este fin, por un lado, se determinó cuál era la cinética de fosforilación/defosforilación de ERK2, y por otro lado, se midió la proliferación de los linfoblastos T estimulados con PDBu, en presencia, o en ausencia, del inhibidor de PKC, BIS, el cual se añadió al medio de cultivo a distintos tiempos tras el estímulo,

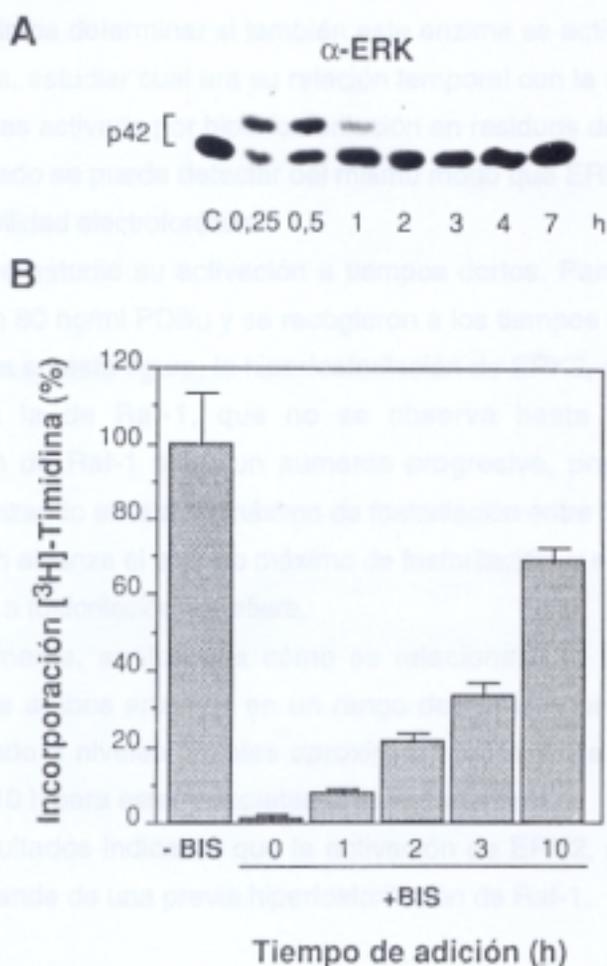
Como se muestra en la figura 20, ERK2 ha retornado prácticamente a sus niveles basales a las 2 h tras el estímulo, mientras que se observa como incluso 3 h después del estímulo con PDBu, el inhibidor de la actividad PKC, es capaz de reducir a un 40% la proliferación promovida por el éster de forbol.

Este resultado mostró que en la transición G<sub>1</sub>/S es necesario la presencia de una actividad PKC sostenida, incluso horas después de que ERK2 se ha inactivado, indicando que se necesita que PKC ejerza su función en otros pasos adicionales.



**Figura 19. Correlación de la activación de ERK2 con la proliferación de linfoblastos T estimulados con PDBu.**

Regresión polinómica obtenida por el test de correlación de Spearman, después de comprobar normalidad con el test de Kolmogorov-Smirnov ( $n=11$ ). El porcentaje de moléculas de ERK2 hiperfosforilada se cuantificó mediante densitometrado de las dos bandas correspondientes a ERK2 en las inmunodetecciones en filtro, realizadas con el anticuerpo  $\alpha$ -ERK, empleando 30  $\mu$ g de proteína procedente de linfoblastos T, estimulados durante 30 min con 80 ng/ml PDBu. La incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina se midió en los linfoblastos T estimulados con 80 ng/ml. Incremento en la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina significa el número de veces que aumenta la misma, en relación a las células no estimuladas.



**Figura 20. Inhibición por BIS de la proliferación de linfoblastos T estimulados con PDBu tras la activación de ERK2.**

(A) Inmunodetección de ERK2, utilizando el anticuerpo específico  $\alpha$ -ERK. Para la inmunotransferencia se emplearon 30  $\mu\text{g}$  de proteína total, procedente de linfoblastos T estimulados con 80 ng/ml PDBu, y recogidos a los tiempos indicados; C: control de células sin estimular, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2. (B). Incorporación de  $(^3\text{H})$ -timidina de linfoblastos T estimulados con 80 ng/ml PDBu, e incubados en ausencia o en presencia de BIS, el cual se añadió a la vez (0 h) o a diferentes tiempos (1-10 h) tras el estímulo. El experimento se realizó por triplicado, representándose en la gráfica la media  $\pm$  SD.

## **5.- LA ACTIVACION DE ERK2 PRECEDE A LA FOSFORILACION DE LA QUINASA RAF-1**

Raf-1 es otra quinasa implicada en los procesos de transducción de señales, por este motivo, quisimos determinar si también este enzima se activaba tras el estímulo con PDBu y, si así era, estudiar cual era su relación temporal con la activación de ERK2. Esta quinasa también es activada por hiperfosforilación en residuos de serina y treonina (60), y el enzima fosforilado se puede detectar del mismo modo que ERK2, es decir, mediante un retraso en su movilidad electroforética.

Primero se estudió su activación a tiempos cortos. Para ello se estimularon los linfoblastos T con 80 ng/ml PDBu y se recogieron a los tiempos indicados en la figura 21. Según se muestra en esta figura, la hiperfosforilación de ERK2, que ya se observa a los 2 min, precede a la de Raf-1, que no se observa hasta los 5 min. Además la hiperfosforilación de Raf-1 sufre un aumento progresivo, presentando varias formas fosforiladas, alcanzando el estadio máximo de fosforilación entre 30 y 40 min. Por otro lado, ERK2 ya en 2 min alcanza el estadio máximo de fosforilación, y sólo se aprecian dos formas en cuanto a fosforilación se refiere.

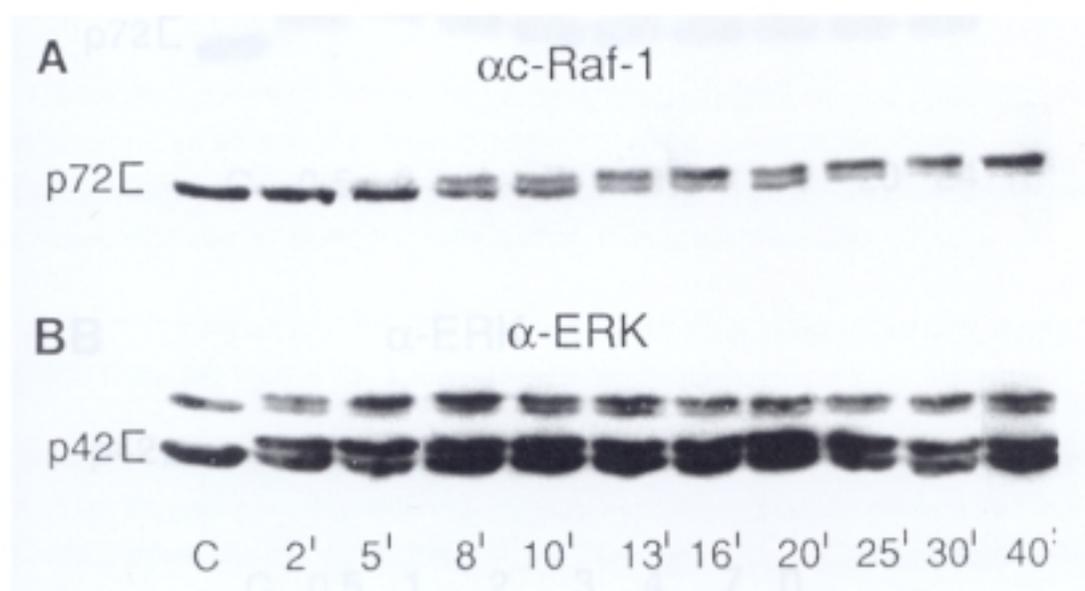
Posteriormente, analizamos cómo se relacionaba la cinética de fosforilación/defosforilación de ambas enzimas en un rango de horas. Como se ve en la figura 22, ERK2 ha retornado a niveles basales aproximadamente a las 3 h, mientras que Raf-1 necesita entre 7-10 h para estar completamente defosforilada.

Estos resultados indicaron que la activación de ERK2, promovida por PDBu, es anterior y no depende de una previa hiperfosforilación de Raf-1.

## **6.- PAPEL DE RAF-1 EN LA TRANSICION G<sub>1</sub>/S.**

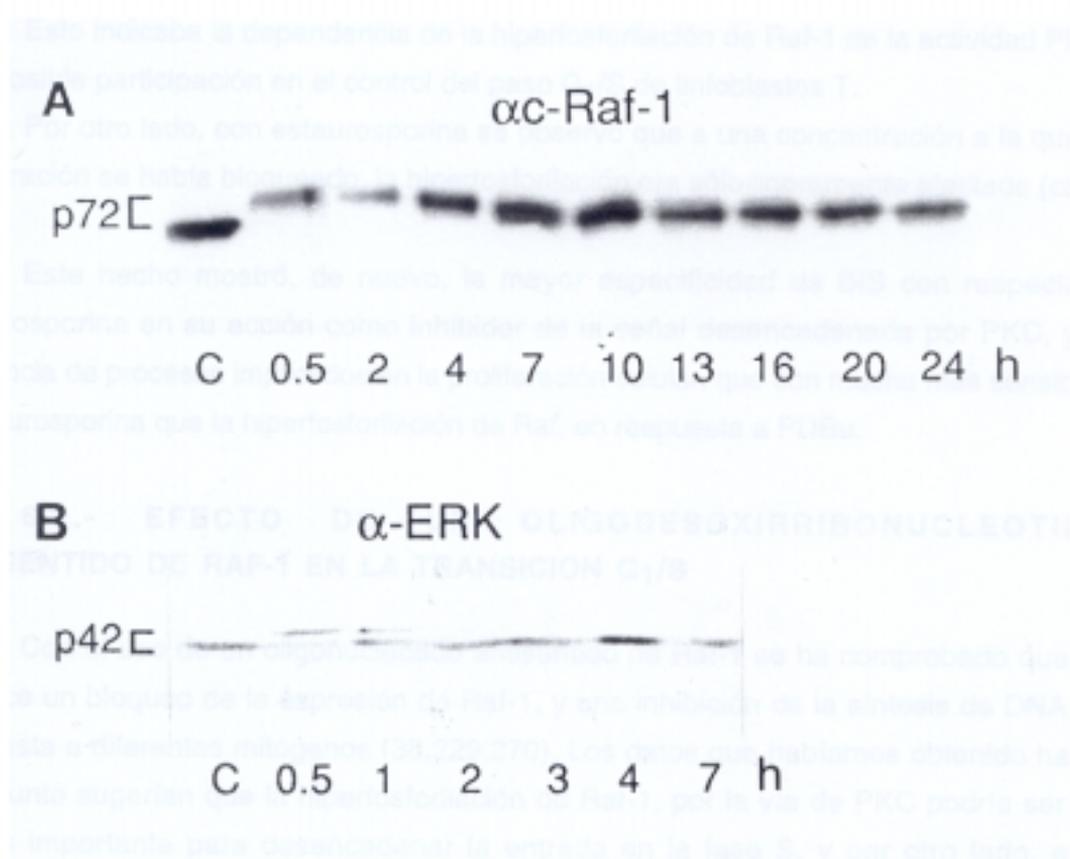
### **6.1.- BLOQUEO DE LA HIPERFOSFORILACION DE RAF-1 POR INHIBICION DE PKC.**

Se estudió cómo se afectaba la hiperfosforilación de Raf-1 en presencia del inhibidor de PKC, BIS. Para ello, se preincubaron los linfoblastos con BIS durante 1 h previamente al estímulo con PDBu, empleando varias concentraciones del inhibidor, las cuales ya se habían analizado cómo afectaban a la proliferación promovida por PDBu, (figura 7). También se probó el efecto de otro inhibidor de PKC, la estaurosporina, del que se había observado que tenía una especificidad menor (figura 7). Las células se recogieron a los 30 min de haber añadido el PDBu.



**Figura 21. Cinética de la hiperfosforilación de ERK2 y Raf-1 en linfoblastos T estimulados con PDBu.**

La figura muestra las inmunodetecciones de las quinasas Raf-1 y ERK2, utilizando (A) el anticuerpo específico  $\alpha$ -Raf-1, y (B) el anticuerpo específico  $\alpha$ -ERK. Para las inmunotransferencias se emplearon 30  $\mu$ g de proteína total procedente de linfoblastos T estimulados con 80 ng/ml PDBu, y recogidos a los tiempos indicados. C: control de células sin estimular, p72 indica las bandas correspondientes a Raf-1, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2.



**Figura 22. Cinética de la hiperfosforilación de ERK2 y Raf-1 en linfoblastos T estimulados con PDBu.**

La figura muestra las inmunodetecciones de las quinasas Raf-1 y ERK2, utilizando (A) el anticuerpo específico  $\alpha$ -Raf-1, y (B) el anticuerpo específico  $\alpha$ -ERK. Para las inmunotransferencias se emplearon 30  $\mu$ g de proteína total, procedente de linfoblastos T estimulados con 80 ng/ml PDBu, y recogidos a los tiempos indicados. C: control de células sin estimular, p72 indica las bandas correspondientes a c-Raf-1, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2.

El resultado, que se muestra en la figura 23, indica que cuando se utiliza BIS, la hiperfosforilación de Raf-1 es bloqueada de forma análoga a como es bloqueada la proliferación, inhibiéndose completamente a la misma concentración en que la proliferación se ha abolido (carriles 3-6).

Esto indicaba la dependencia de la hiperfosforilación de Raf-1 de la actividad PKC, y su posible participación en el control del paso G<sub>1</sub>/S de linfoblastos T.

Por otro lado, con estaurosporina se observó que a una concentración a la que la proliferación se había bloqueado, la hiperfosforilación era sólo ligeramente afectada (carril 8).

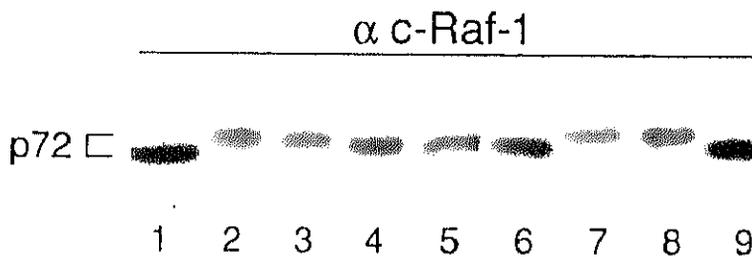
Este hecho mostró, de nuevo, la mayor especificidad de BIS con respecto a estaurosporina en su acción como inhibidor de la señal desencadenada por PKC, y la existencia de procesos implicados en la proliferación celular, que son mucho más sensibles a estaurosporina que la hiperfosforilación de Raf, en respuesta a PDBu.

## **6.2.- EFECTO DE UN OLIGODESOXIRRIBONUCLEOTIDO ANTISENTIDO DE RAF-1 EN LA TRANSICION G<sub>1</sub>/S**

Con el uso de un oligonucleótido antisentido de Raf-1 se ha comprobado que se produce un bloqueo de la expresión de Raf-1, y una inhibición de la síntesis de DNA en respuesta a diferentes mitógenos (38,229,270). Los datos que habíamos obtenido hasta este punto sugerían que la hiperfosforilación de Raf-1, por la vía de PKC podría ser un evento importante para desencadenar la entrada en la fase S, y por otro lado, esta hiperfosforilación era posterior a la activación de ERK2. Para estudiar en más profundidad este punto se analizó el efecto de dicho oligonucleótido antisentido de Raf-1 en la proliferación y en la hiperfosforilación de ERK2 de linfoblastos T estimulados con PDBu.

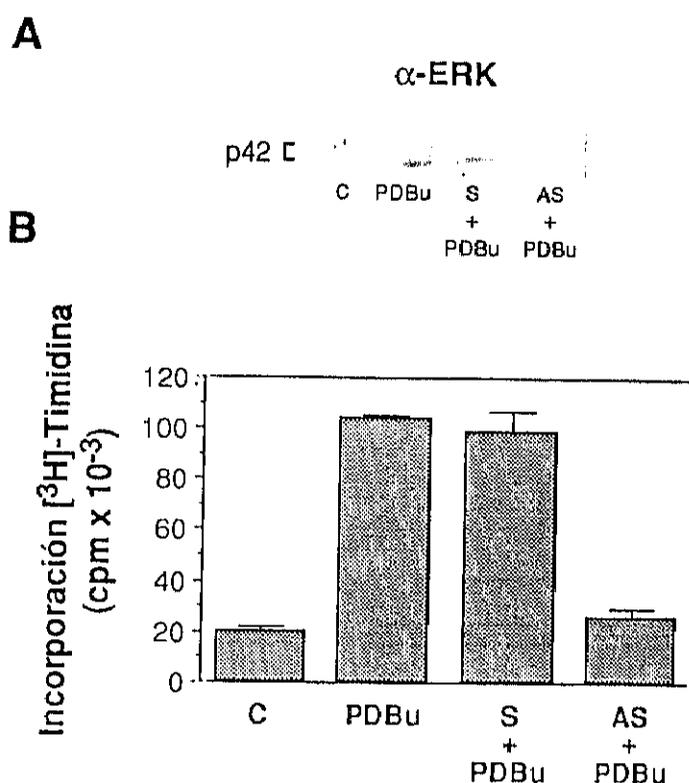
Para realizar el experimento, las células se preincubaron 5 h con el oligonucleótido antisentido o con el oligonucleótido sentido de Raf-1, añadiendo, pasado este tiempo el mitógeno. Como se muestra en la figura 24B, el oligo antisentido de Raf-1, pero no el complementario, fue capaz de bloquear la proliferación celular a una concentración de 1.5  $\mu$ M. Sin embargo, a dicha concentración de oligonucleótido, no se observó ningún efecto sobre la hiperfosforilación de ERK2, analizada ésta a los 30 min de la adición del éster de forbol, según se muestra en la figura 24A.

Estos datos indican que la activación de Raf-1 es un evento necesario en la señal mitogénica desencadenada por PDBu, aunque no está implicado en la activación de ERK2 por dicho mitógeno.



**Figura 23. Efecto del BIS y de la estaurosporina en la hiperfosforilación de Raf-1.**

La figura muestra la inmunodetección de la proteína Raf-1, empleando el anticuerpo específico  $\alpha c\text{-Raf-1}$ . Para la inmunotransferencia se utilizaron 30  $\mu\text{g}$  de proteína total procedente de linfoblastos T incubados en la condiciones que se explican a continuación: Los carriles 1 y 9 corresponden al control de células sin estimular, los carriles 2 y 7 corresponden al control de células estimuladas con 80 ng/ml PDBu, durante 30 min, los carriles 3-6 corresponden a linfoblastos T incubados con 0,25, 0,5, 1 y 2  $\mu\text{M}$  BIS respectivamente 1 h antes del estímulo, el carril 8 corresponde a linfoblastos T incubados con 10 nM estaurosporina 1 h antes del estímulo; p72 indica las bandas correspondientes a Raf-1.



**Figura 24. Efecto del oligonucleótido antisentido de c-Raf-1 en la activación de ERK2 y en la proliferación de linfoblastos T.**

Los linfoblastos T fueron incubados durante 5 h en presencia del oligonucleótido sentido (S+PDBu) o antisentido (AS+PDBu) de c-Raf-1, a una concentración de 1,5  $\mu$ M ambos, y posteriormente se estimularon con 80 ng/ml PDBu. C: control de células no estimuladas, PDBu: control de células estimuladas con 80 ng/ml PDBu. (A) Inmunodetección de ERK2, empleando el anticuerpo específico  $\alpha$ -ERK. Para la inmunotransferencia se utilizaron 30  $\mu$ g de proteína total procedente de linfoblastos T tratados en las condiciones explicadas anteriormente, y recogidos a los 30 min después de la adición del PDBu, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2. (B). Incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina de los linfoblastos incubados en las condiciones anteriores. El experimento se realizó por triplicado, representándose en la gráfica la media  $\pm$  SD.

### **6.3.- RAF-1 ES REQUERIDA EN LA PROLIFERACION PROMOVIDA POR PDBu HASTA 7 h DESPUES DEL ESTIMULO.**

Para determinar durante cuánto tiempo era necesaria la función de Raf-1 en la transición G<sub>1</sub>/S desencadenada por PDBu, se añadieron los oligonucleótidos, sentido y antisentido, de Raf-1 a diferentes tiempos, antes y después de la adición del éster de forbol.

Como se observa en la figura 25, la adición del oligonucleótido antisentido, hasta 7 h tras el estímulo, fue capaz de bloquear la proliferación celular.

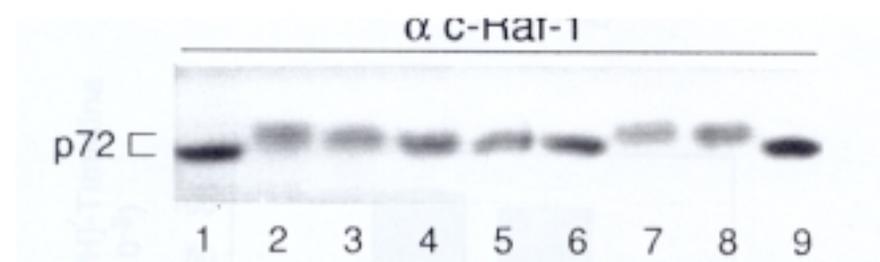
Este resultado muestra que Raf-1 es necesario al menos 7 h después de haber estimulado las células, coincidiendo este intervalo con el período de tiempo en que aún se encuentra hiperfosforilado (figura 22A), indicando que la activación de Raf-1 es requerida hasta bastantes horas tras haberse desencadenado la señal.

## **7.- EFECTO DEL AMPc EN LA TRANSICION G<sub>1</sub>/S**

Está demostrado que agentes que aumentan los niveles intracelulares de AMPc, activador de PKA, son capaces de inhibir la proliferación de linfoblastos T (18,78). También se ha descrito que la estimulación de PKA produce una inactivación de Raf-1 (49,295). Por este motivo quisimos estudiar si, en linfoblastos T, la PKA ejercía su efecto inhibitorio de proliferación en un paso anterior o posterior de la activación de ERK2.

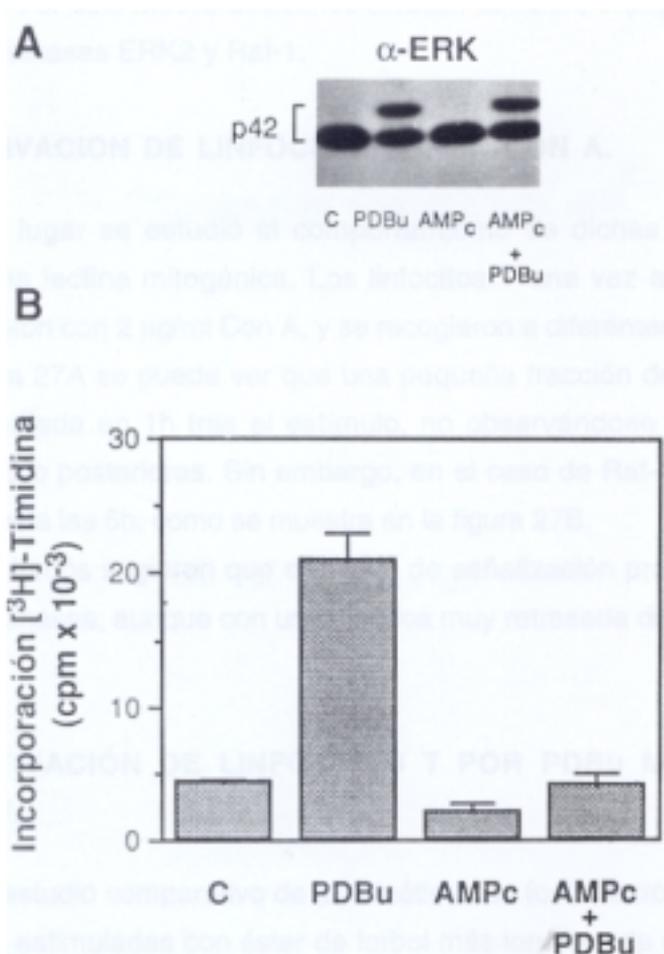
Para ello los linfoblastos T fueron incubados durante 30 min con 0,4 mM 8BrAMPc, y posteriormente estimulados con 80 ng/ml PDBu. Como se ve en la figura 26B, esta concentración de 8BrAMPc bloqueó la proliferación de linfoblastos T, pero no la hiperfosforilación de ERK2 promovida por el éster de forbol, figura 26A. El AMPc por sí solo no tuvo ningún efecto en la hiperfosforilación de ERK2.

Estos datos muestran que el 8BrAMPc bloquea la transición G<sub>1</sub>/S en un paso posterior, o en una vía distinta, a la activación de ERK2.



**Figura 23. Efecto del BIS y de la estaurosporina en la hiperfosforilación de Raf-1.**

La figura muestra la inmunodetección de la proteína Raf-1, empleando el anticuerpo específico  $\alpha$ -Raf-1. Para la inmunotransferencia se utilizaron 30  $\mu$ g de proteína total procedente de linfoblastos T incubados en las condiciones que se explican a continuación: Los carriles 1 y 9 corresponden al control de células sin estimular, los carriles 2 y 7 corresponden al control de células estimuladas con 80 ng/ml PDBu, durante 30 min, los carriles 3-6 corresponden a linfoblastos T incubados con 0,25, 0,5, 1 y 2  $\mu$ M BIS respectivamente 1 h antes del estímulo, el carril 8 corresponde a linfoblastos T incubados con 10 nM estaurosporina 1 h antes del estímulo; p72 indica las bandas correspondientes a Raf-1.



**Figura 26. Efecto del AMPc en la activación de ERK2 y en proliferación de linfoblastos T.**

Los linfoblastos T se preincubaron durante 30 min en presencia o en ausencia de 0,4 mM 8Br-AMPc, y posteriormente se estimularon con 80 ng/ml PDBu. **(A)** Inmunodetección de ERK2, utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -ERK. Para la inmunotransferencia se emplearon 30  $\mu$ g de proteína total procedente de células recogidas a los 30 min de la adición del mitógeno PDBu; p42 indica las bandas correspondientes a ERK2. **(B)** Incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina de linfoblastos T incubados en las condiciones anteriores. El experimento se realizó por triplicado, representándose en la gráfica la media  $\pm$  SD. C: control de células no estimuladas, AMPc: control de células incubadas solamente con 0,4 mM 8Br-AMPc.

## **8.- ESTUDIO DE ERK2 Y RAF-1 EN LA TRANSICION G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>**

Los experimentos de proliferación habían mostrado la participación de PKC en la salida de quiescencia de los linfocitos T, promovida por ConA o por PDBu junto con un ionoforo de calcio. Por este motivo decidimos estudiar también, el papel que pudieran jugar en esta fase las quinasas ERK2 y Raf-1.

### **8.1.- ACTIVACION DE LINFOCITOS T POR CON A.**

En primer lugar se estudió el comportamiento de dichas quinasas en células estimuladas con la lectina mitogénica. Los linfocitos T una vez aislados y puestos en cultivo se estimularon con 2 µg/ml Con A, y se recogieron a diferentes tiempos.

En la figura 27A se puede ver que una pequeña fracción de moléculas de ERK2 estaba hiperfosforilada en 1h tras el estímulo, no observándose ninguna activación a tiempos anteriores o posteriores. Sin embargo, en el caso de Raf-1 no se detectó forma hiperfosforilada hasta las 5h, como se muestra en la figura 27B.

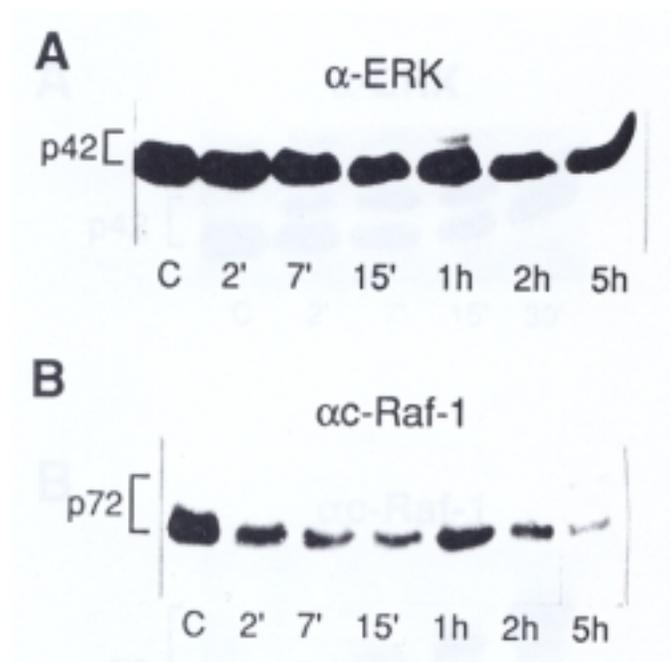
Estos resultados sugieren que en la vía de señalización promovida por Con A se activan las dos quinasas, aunque con una cinética muy retrasada de Raf-1 con respecto a ERK2.

### **8.2.- ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T POR PDBu MÁS IONÓFORO DE CALCIO A23187.**

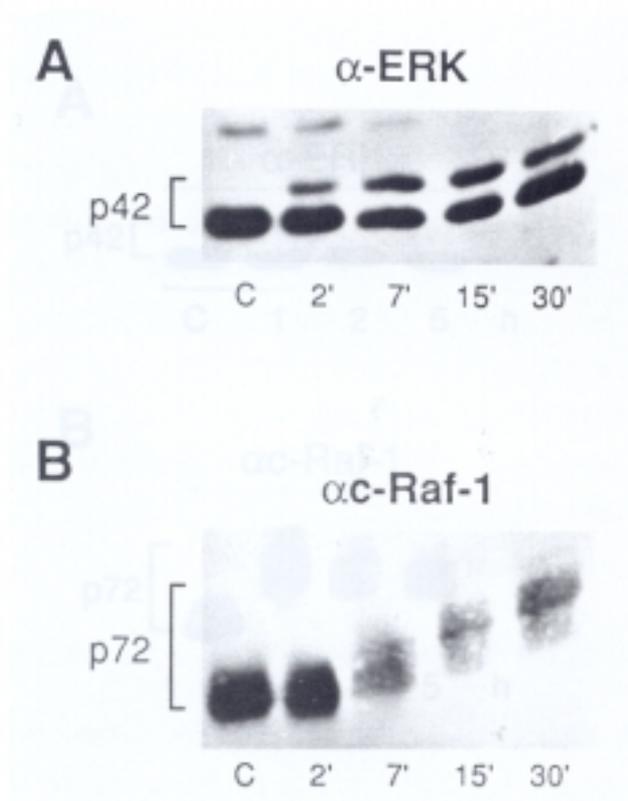
El mismo estudio comparativo de las cinéticas de fosforilación de ERK2 y Raf-1 se realizó en células estimuladas con éster de forbol más ionóforo de calcio. Los linfocitos T quiescentes se estimularon con 5 ng/ml PDBu junto con 0,25 µM A23187. Las células se recogieron a los tiempos indicados en la figura 28.

Como se muestra en la figura 28A, a los 2 min tras el estímulo ya se detectó la presencia de ERK2 hiperfosforilada, sin embargo, Raf-1 aún permanecía como en las células sin estimular, figura 28B. Posteriormente, mientras que ERK2 alcanzó el máximo estado de hiperfosforilación entre 7 y 15 min, Raf-1 presentaba una cinética más retrasada, apreciándose la situación de máxima fosforilación a los 30 min.

En tiempos posteriores, hasta 5h, la hiperfosforilación de Raf continuaba, figura 29B, mientras ERK2 a las 2h, prácticamente había vuelto a los niveles basales, según se ve en la figura 29A.

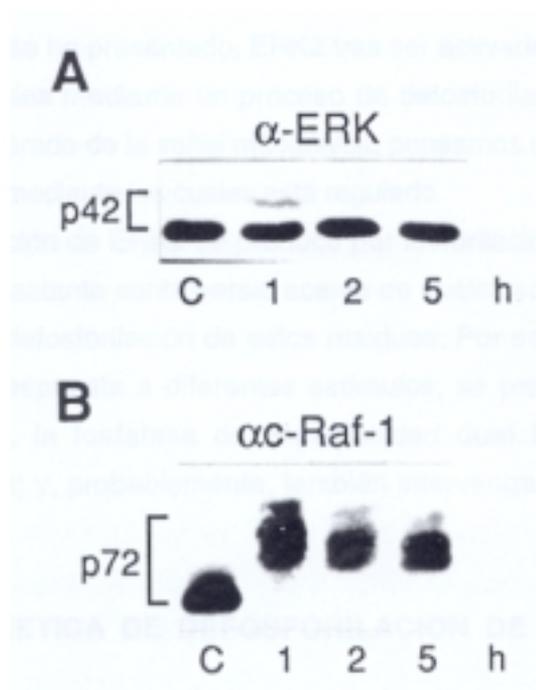


**Figura 27. Cinética de activación de ERK2 y c-Raf-1 en linfocitos T estimulados con Con A.** La figura muestra las inmunodetecciones de las quinasas ERK2 y Raf-1, utilizando (A) el anticuerpo  $\alpha$ -ERK, y (B) el anticuerpo  $\alpha$ c-Raf-1. Para las inmunotransferencias se emplearon 30  $\mu$ g de proteína total, procedente de linfocitos T quiescentes, estimulados con 2  $\mu$ g/ml Con A, y recogidos a los tiempos indicados. C: control de células sin estimular, p72 indica las bandas correspondientes a Raf-1, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2.



**Figura 28. Cinética de activación de ERK2 y c-Raf-1 en linfocitos T estimulados con PDBu más ionóforo A 23187.**

La figura muestra las inmunodetecciones de las quinasas ERK2 y Raf-1, utilizando (A) el anticuerpo  $\alpha$ -ERK, y (B) el anticuerpo  $\alpha$ c-Raf-1. Para las inmunotransferencias se emplearon 30  $\mu$ g de proteína total, procedente de linfocitos T quiescentes, estimulados con 5 ng/ml PDBu más 0,25  $\mu$ M ionóforo A 23187, y recogidos a los tiempos indicados. C: control de células sin estimular, p72 indica las bandas correspondientes a Raf-1, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2.



**Figura 29. Cinética de activación de ERK2 y c-Raf-1 en linfocitos T estimulados con PDBu más ionóforo A 23187.**

La figura muestra las inmunodetecciones de las quinasas ERK2 y Raf-1, utilizando (A) el anticuerpo  $\alpha$ -ERK, y (B) el anticuerpo  $\alpha$ -Raf-1. Para las inmunotransferencias se emplearon 30  $\mu$ g de proteína total, procedente de linfocitos T quiescentes, estimulados con 5 ng/ml PDBu más 0,25  $\mu$ M ionóforo A 23187, y recogidos a los tiempos indicados. C: control de células sin estimular, p72 indica las bandas correspondientes a Raf-1, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2.

Estos datos indicaron que en el estado  $G_0$  la activación de ERK2, promovida por el éster de forbol, es independiente de la previa hiperfosforilación de Raf-1, y que la hiperfosforilación de Raf-1 es más sostenida en el tiempo que la de ERK2.

## 9.- ESTUDIO DE LA DEFOSFORILACION DE ERK2

Como ya se ha presentado, ERK2 tras ser activada por hiperfosforilación, retorna a sus niveles basales mediante un proceso de defosforilación. Ya que este proceso va a participar en la parada de la señal mitogénica, pensamos que sería de interés el estudio de los mecanismos mediante los cuales está regulado.

La activación de ERK2 se produce por fosforilación en los residuos Thr 183 y Tyr 185 (209). Hay bastante controversia acerca de cuáles son las fosfatasas responsables de llevar a cabo la defosforilación de estos residuos. Por estudios hechos en distintos tipos celulares y en respuesta a diferentes estímulos, se piensa que pueden ser la Ser/Thr fosfatasa PP2A, la fosfatasa de especificidad dual PAC-1 (en el caso de células hematopoyéticas) y, probablemente, también intervengan tirosina fosfatasas, todavía no identificadas.

### 9.1.- CINETICA DE DEFOSFORILACION DE ERK2.

El estado de fosforilación de una proteína va a depender del balance entre la acción de las quinasas y de las fosfatasas que actúen sobre sus residuos susceptibles de ser fosforilados. Por este motivo, quisimos estudiar cómo se producía la disminución en los niveles de los grupos fosfato de ERK2, evitando en lo posible que se solaparan los procesos de fosforilación, es decir, que el resultado que se obtuviera fuera debido solamente a la acción de las fosfatasas. Para ello, se paró la puesta de los grupos fosfato bloqueando la actividad de la PKC, después del estímulo, haciendo uso del inhibidor BIS, el cual comienza a actuar rápidamente, pues como se muestra en la figura 30A, la adición de BIS 1 min después de estimular las células con PDBu, fue capaz de bloquear la hiperfosforilación de ERK2, analizada ésta a los 2 min tras el estímulo.

Para estudiar la defosforilación se añadió 0,5  $\mu$ M BIS a linfoblastos T, a los 10 min de haber sido estimulados con 80 ng/ml PDBu. Como se ha mostrado en la figura 16, la activación de ERK2 es muy rápida detectándose ya la máxima activación a los 2 min. Las células se recogieron a los tiempos indicados en la figura 30B.

Como se muestra en dicha figura, ya a los 30 min de haber sido estimuladas las células, se observa que la fracción hiperfosforilada es menor en presencia del BIS. Lo que nos sugiere que en ese tiempo ya están actuando actividades fosfatasa. A tiempos posteriores, a partir de 1h, el efecto de las fosfatasas es detectable con mayor claridad, y

se puede observar como a estos tiempos, los procesos de fosforilación siguen produciéndose cuando no se añade BIS.

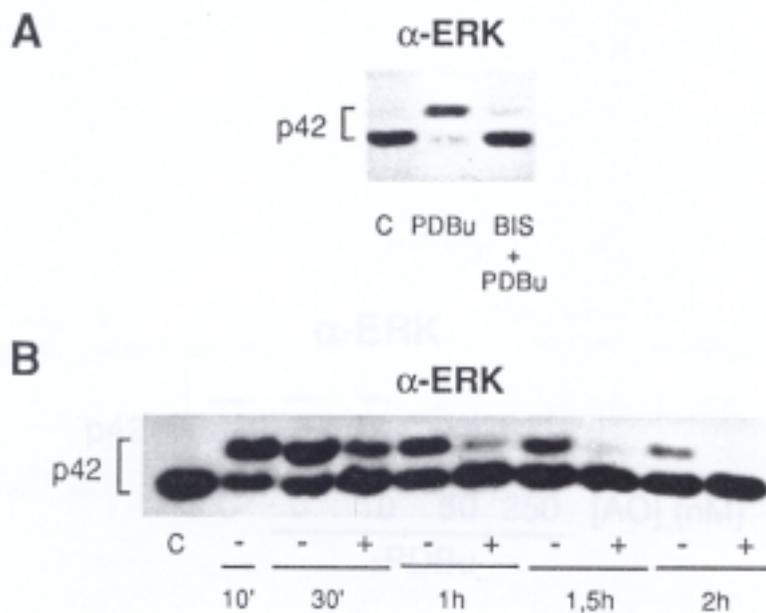
## 9.2.- EFECTO DE LA INHIBICION DE SERINA/TREONINA FOSFATASAS

Está descrito que la proteína fosfatasa 2A (PP2A) tiene acción *in vitro* sobre los residuos fosforilados de treonina de ERK2 (8). Esta fosfatasa se incluye dentro del grupo de las fosfatasas, de baja especificidad de sustrato, que actúan sobre residuos fosforilados de serina/treonina. Para hacer un estudio *in vivo* del papel que pudiera jugar esta fosfatasa en la vía de señalización activada por PDBu en linfoblastos T, se hizo uso de un inhibidor de las serina/treonina fosfatasa PP1 y PP2A, el ácido okadaico, el cual actúa selectivamente en función de la concentración utilizada (48).

Primeramente analizamos el efecto dosis dependiente del ácido okadaico tenía. Las células fueron incubadas con tres concentraciones de ácido okadaico, 10, 50 y 250 nM, durante 2 h, y posteriormente estimuladas con 80 ng/ml PDBu, recogiendo las células a los 30 min de la adición del mitógeno. Según se muestra en la figura 31, la adición de 10-250 nM ácido okadaico, produjo el aumento de la fracción hiperfosforilada de ERK2, siendo este efecto dependiente de la concentración de ácido okadaico empleada. Para experimentos posteriores utilizamos una concentración de 150 nM ácido okadaico, y un tiempo de preincubación de 2 h.

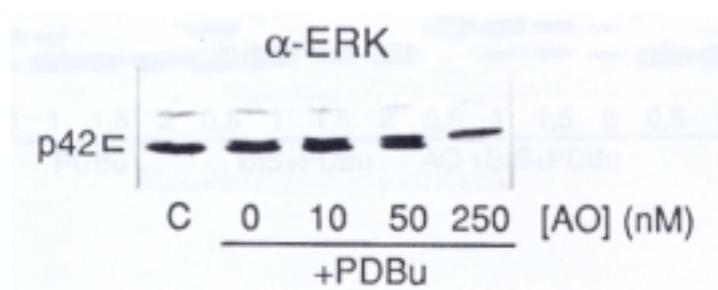
Teniendo como objetivo evitar en lo posible la intervención de las quinasas de la cascada, se hizo uso del BIS, el cual se adicionó a los 10 min de haber estimulado los linfoblastos con 80 ng/ml PDBu, previamente incubados con ácido okadaico. Como se ve en la figura 32, el ácido okadaico retrasó la defosforilación de ERK2 que se observaba, en presencia de BIS, haciendo incluso, que se mantuvieran más tiempo los niveles de ERK2 hiperfosforilada, que cuando las células se habían incubado sólo con PDBu. Por otro lado el ácido okadaico por sí solo produjo un retraso en la movilidad electroforética de la ERK2. El ácido okadaico junto con PDBu producen un efecto sinérgico en la hiperfosforilación de ERK2, mayor que el que se debiera a una simple adición de los efectos de ambos agentes por separado, figura 33.

Estos resultados indicaron la participación de estas serina/ treonina fosfatasas en la defosforilación de la ERK2. Sin embargo, su actuación no se puede situar exclusivamente a nivel de la ERK2, sino que también pueden estar defosforilando residuos de serina/treonina de otros elementos de la cascada, como MEK, cuya activación prolongada al inhibir su defosforilación, produciría una hiperfosforilación más sostenida de ERK2.



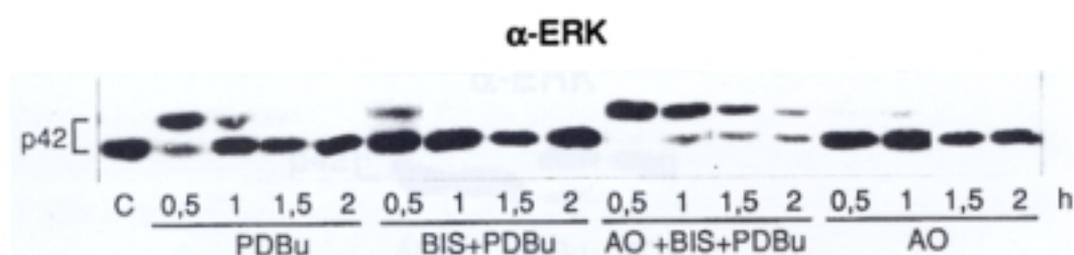
**Figura 30. Defosforilación de ERK2 *in vivo*. Efecto del BIS.**

La figura muestra las inmunodetecciones de ERK2, empleando el anticuerpo  $\alpha$ -ERK. Para las inmunotransferencias se utilizaron 30  $\mu$ g de proteína total procedente de linfoblastos T, incubados en las condiciones que se explican a continuación. **(A)** Inmunotransferencia de la proteína total de células estimuladas con 80 ng/ml PDBu en ausencia o en presencia de 0,5  $\mu$ M BIS, añadido éste 1 min después de la adición del mitógeno. Los linfoblastos T se recogieron 2 min después de ser estimulados con PDBu. **(B)** Inmunotransferencia de la proteína total de células estimuladas con 80 ng/ml PDBu en ausencia (-) o en presencia (+) de 0,5  $\mu$ M BIS, añadido 10 min después de la adición del mitógeno. Los linfoblastos T se recogieron a los tiempos indicados tras la adición del PDBu. C: control de células sin estimular, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2.



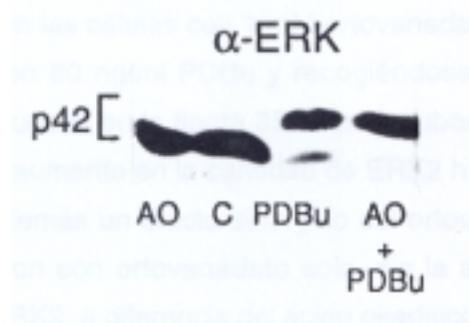
**Figura 31. Efecto dosis dependiente del ácido okadaico en la activación de ERK2.**

La figura muestra la inmunodetección de ERK2, utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -ERK. Para la inmunotransferencia se emplearon 30  $\mu$ g de proteína total procedente de linfoblastos T, incubados durante 2 h con ácido okadaico a las concentraciones indicadas, y que posteriormente se estimularon con 80 ng/ml PDBu durante 30 min. C: control de células sin estimular, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2.



**Figura 32. Efecto del ácido okadaico en la cinética de defosforilación de ERK2.**

La figura muestra la inmunodetección de ERK2, utilizando el anticuerpo  $\alpha$ ERK. Para la inmunotransferencia se utilizaron 30  $\mu$ g de proteína total procedente de linfoblastos T, que se habían incubado durante 2 h en ausencia o en presencia de 150 nM ácido okadaico, y que posteriormente se estimularon con 80 ng/ml PDBu, añadiendo 10 min después 0,5  $\mu$ M BIS. En la parte inferior se indican los tiempos (h) en que se recogieron las células tras la adición del PDBu. C: control de células sin estimular, AO: control de células incubadas sólo con ácido okadaico, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2.



### Figura 33. Efecto sinérgico del ácido okadaico y PDBu en la activación de ERK2.

La figura muestra la inmunodetección de ERK2, utilizando el anticuerpo  $\alpha$ ERK. Para la inmunotransferencia se emplearon 30  $\mu$ g de proteína total procedente de linfoblastos T, incubados durante 2 h en ausencia o en presencia de 150 nM ácido okadaico, y que posteriormente se estimularon con 80 ng/ml PDBu durante 30 min. En la parte inferior se indican los tiempos (h) en que se recogieron las células tras la adición del PDBu. C: control de células sin estimular, AO: control de células incubadas sólo con ácido okadaico, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2.

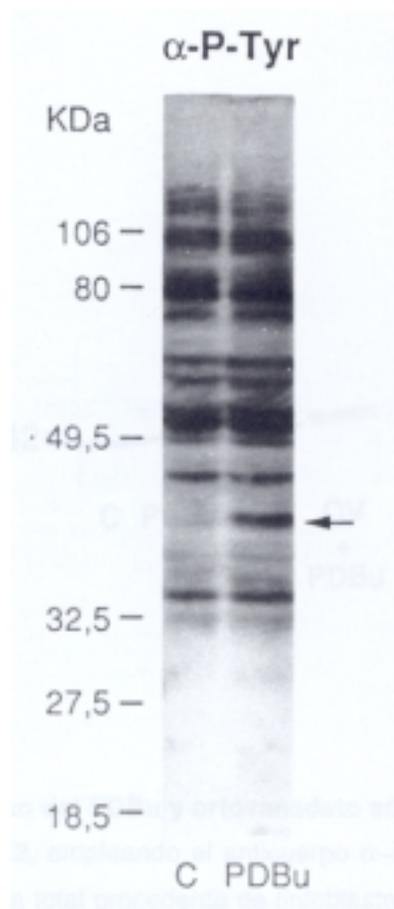
### 9.3.- EFECTO DE LA INHIBICION DE TIROSINA FOSFATASAS Y/O FOSFATASAS DUALES

El ortovanadato sódico está descrito como inhibidor de tirosina fosfatasas (93) y de fosfatasas de especificidad dual, como PAC-1 (281). Como se ha presentado anteriormente, ERK2 es fosforilada en tirosina cuando los linfoblastos T son estimulados con PDBu, siendo además la única proteína en que detectamos un aumento en los niveles de fosfotirosina tras dicho estímulo, como se muestra en la figura 34. Por tanto, el efecto que observáramos inhibiendo la actividad de fosfatasas que actuaran sobre residuos de P-Tyr, sería más específico de ERK2, que mediante el bloqueo de serina/treonina fosfatasas, las cuales tienen más puntos posibles de actuación a lo largo de la vía.

Se preincubaron las células con 1 mM ortovanadato durante 2 h, y posteriormente fueron estimulados con 80 ng/ml PDBu y recogiendo a los 30 min de la adición del mitógeno. Como se muestra en la figura 35, la preincubación con ortovanadato, antes del estímulo, producía un aumento en la cantidad de ERK2 hiperfosforilada, presente a los 30 min, observándose además un efecto sinérgico del ortovanadato y el PDBu. Cuando las células se preincubaron con ortovanadato solo, sin la adición de PDBu, no se detectó hiperfosforilación de ERK2, a diferencia del ácido okadaico (figura 32) que por sí solo sí era capaz de inducirla.

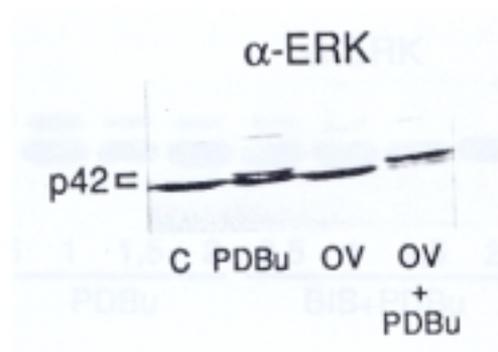
Como en el caso del ácido okadaico, y siguiendo el mismo abordaje, se probó el efecto del ortovanadato en presencia de BIS. En la curva de tiempos de la figura 36, se observa como se produjo un retraso en la defosforilación de la ERK2 al preincubar con ortovanadato antes del estímulo con PDBu, tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de PKC. En todos los casos se observó un efecto menos pronunciado del ortovanadato que el producido por el ácido okadaico, en la figura 28, probablemente debido a que éste último actúe en más de un nivel.

Estos datos nos indicaron la existencia de, al menos, una actividad fosfatasa, inhibible por ortovanadato que actuaba a nivel de ERK2.



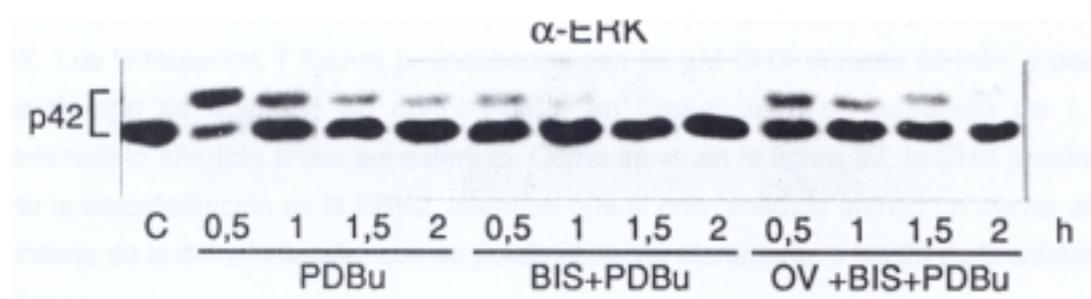
**Figura 34. Efecto del PDBu en el patrón de proteínas fosforiladas en tirosina en linfoblastos T.**

La figura muestra la inmunodetección de ERK2, utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -P-Tyr. Para la inmunotransferencia se emplearon 90  $\mu$ g de proteína total procedente de linfoblastos T, que fueron incubados durante 30 min en ausencia (C) o en presencia (PDBu) de 80 ng/ml PDBu. A la izquierda se muestra la posición de los marcadores de peso molecular. A la derecha se indica con una flecha la única banda en que se detecta un aumento en la cantidad de fosfotirosina.



**Figura 35. Efecto sinérgico del PDBu y ortovanadato sódico en la activación de ERK2.**

Inmunodetección de ERK2, empleando el anticuerpo  $\alpha$ -ER2. Para la inmunotransferencia se utilizaron 30  $\mu$ g de proteína total procedente de linfoblastos T, que se incubaron durante 2 h en ausencia o en presencia de 1 mM ortovanadato sódico, y que posteriormente se estimularon con 80 ng/ml PDBu durante 30 min. Las células se recogieron a los 30 min de la adición del PDBu. C: control de células sin estimular, OV: control de células incubadas sólo con ortovanadato sódico, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2.



**Figura 36. Efecto del ortovanadato sódico en la cinética de defosforilación de ERK2.**

La figura muestra la inmunodetección de ERK2, utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -ERK. Para la inmunotransferencia se emplearon 30  $\mu$ g de proteína total procedente de linfoblastos T, incubados durante 2 h en ausencia o en presencia de 1 mM ortovanadato sódico. Posteriormente se estimularon con 80 ng/ml PDBu, añadiendo 10 min después 0,5  $\mu$ M BIS. En la parte inferior se indican los tiempos (h) en que se recogieron las células tras la adición del PDBu. C: control de células sin estimular, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2.

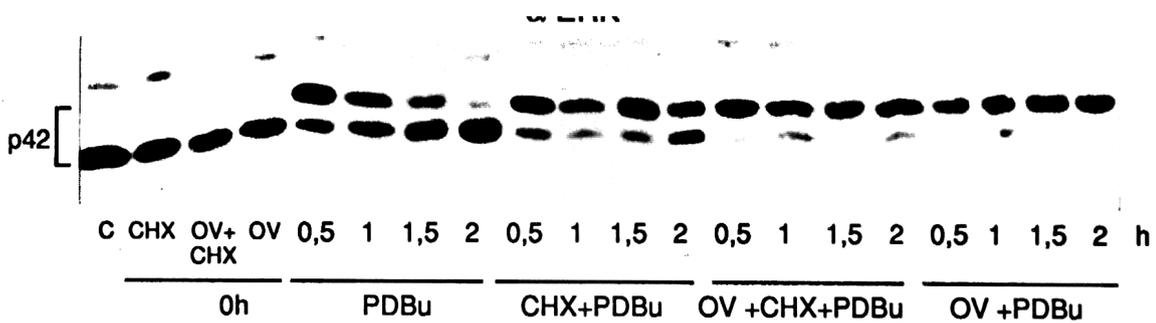
#### 9.4.- EFECTO DE LA INHIBICION DE FOSFATASAS INDUCIBLES

Se ha descrito la existencia de una fosfatasa dual, denominada PAC-1, que tiene actividad sobre residuos fosforilados de treonina y de tirosina, es inhibible por ortovanadato, y su síntesis es inducida en linfocitos T, en respuesta a señales que les hacen proliferar, como la lectina mitogénica fitohemaglutinina junto con el éster de forbol PMA.(231) Además esta fosfatasa ha sido implicada en la defosforilación *in vivo* de IERK2 (281).

Por los resultados mostrados anteriormente, habíamos observado que en linfoblastos T había, al menos, una actividad fosfatasa inhibible por ortovanadato, por tanto, estudiamos si esta actividad fosfatasa estaba regulada a nivel de síntesis, como la fosfatasa dual PAC-1, ya descrita.

Para ello se trataron las células con un inhibidor de la síntesis de proteínas como es CHX. Los linfoblastos T fueron preincubados con 25  $\mu$ M CHX durante 30 min, y pasado este tiempo se adicionó 80 ng/ml PDBu, en presencia o en ausencia de 1 mM ortovanadato añadido antes del estímulo. Como se ve en la figura 37, la CHX previno en parte la defosforilación de la ERK2, mientras que el ortovanadato ejerció un mayor efecto inhibitorio de la defosforilación, que se puede observar claramente a las 2h de la adición del mitógeno.

Este resultado sugirió la presencia de, al menos, una actividad fosfatasa que actuaba sobre ERK2 en el paso G<sub>1</sub>/S del ciclo celular, regulada por síntesis del tipo PAC-1, existiendo además otra(s) actividad(es) de tipo tirosina fosfatasa.



**Figura 37. Efecto de la CHX en la cinética de defosforilación de ERK2.**

La figura muestra la inmunodetección de ERK2, empleando el anticuerpo  $\alpha$ -ERK. Para la inmunotransferencia se utilizaron 30  $\mu$ g de proteína total procedente de linfoblastos T, que fueron incubados durante 1,5 h en ausencia o en presencia de 1 mM ortovanadato sódico, tiempo tras el que se incubaron 30 min en ausencia o en presencia de 25  $\mu$ M CHX. Posteriormente se recogieron las células (0 h), o se estimularon con 80 ng/ml PDBu. En la parte inferior se indican los tiempos (h) en que se recogieron las células tras la adición del PDBu. C: control de células sin estimular, p42 indica las bandas correspondientes a ERK2.

## **V. DISCUSSION**

Los linfocitos T constituyen un modelo celular que ha sido objeto de numerosos estudios, ya que son células que van a participar en la respuesta inmune, proceso fisiológico de gran importancia en organismos superiores. Por tanto, el conocimiento de los mecanismos implicados en la activación y proliferación de estas células puede contribuir a una mayor comprensión del funcionamiento del sistema inmune, tanto en una situación fisiológica normal, como alterada. Además, constituyen un sistema adecuado para el estudio de procesos en las distintas fases del ciclo celular.

## **1.- ACTIVIDAD DE PKC EN LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS T.**

Cuando el linfocito T interacciona con su antígeno específico, lectinas mitogénicas o anticuerpos dirigidos contra el complejo TCR/CD3, entre los eventos que van a tener lugar está la activación de PKC y el aumento de los niveles intracelulares de calcio. (13,126,160,287). Una vez que la célula se encuentra en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, para que se inicie la fase S es necesario que la IL-2, secretada por la célula T, interaccione con su receptor, provocando la señal correspondiente que llevará a una síntesis de DNA (254). Esta segunda señal que hace que el linfocito, una vez activado, progrese en el ciclo celular, se puede reproducir con el uso de agentes no fisiológicos, como son los ésteres de forbol. Con el propósito de estudiar la participación de PKC en este sistema de células, como punto de partida analizamos cómo se afectaba la proliferación celular promovida por diferentes mitógenos, en presencia de un inhibidor específico de PKC, que es el BIS (271). Los resultados obtenidos con el uso de dicho inhibidor, muestran que esta quinasa es necesaria tras la primera señal de activación del linfocito T (producida por dos tipos distintos de estímulo: lectina mitogénica o éster de forbol junto con ionóforo de calcio), y que una vez que el linfocito está activado, la segunda señal que hace que la célula progrese en el ciclo activa una vía independiente (IL-2) o dependiente (PDBu) de PKC.

### **1.1.- ESTUDIO DE PKC EN LA TRANSICION G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.**

El hecho de que este inhibidor bloqueara la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina, producida por ambos tipos de mitógenos (lectina mitogénica Con A, o PDBu junto con el ionóforo A21387), confirma que la actividad PKC es necesaria en la activación de los linfocitos T, como ya había sido descrito (130,278). Este efecto inhibitorio es dependiente de la concentración de BIS utilizada. El bloqueo en la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina producida por Con A ya ha sido mostrado mediante el empleo de otro inhibidor de PKC, como es H7

(297), menos específico que BIS, y que por tanto podría estar inhibiendo otras quinasas además de PKC.

También analizamos si esta activación es solamente un evento temprano, o se necesita durante un periodo de horas. Esta actividad es necesaria al menos durante 5 h tras el estímulo, y no está actuando solamente como una señal temprana. La necesidad de una actividad sostenida de PKC para la activación de la célula T ha sido descrita en varios trabajos (21,22,264,297), y se sabe que se requiere en combinación con una elevación sostenida del calcio intracelular, al menos durante 4-6 h, para inducir niveles significativos de expresión de IL-2R $\alpha$  y secreción de IL-2 (61,150,178). En la activación del linfocito T en condiciones fisiológicas, señales accesorias, como las generadas por el antígeno de superficie CD2, y por IL-1 secretada por macrófagos, cooperan con la estimulación del TCR, al menos parcialmente, intensificando la activación de PKC (22).

Se ha estudiado en profundidad el mecanismo por el que se regula la activación prolongada de PKC en varios tipos de células en respuesta a agonistas. El aumento del DAG (activador de PKC) producido por la activación de la PLC es transitorio, ya que es metabolizado rápidamente por la célula (11,239), pero se ha descrito que es seguido de un incremento más sostenido en el tiempo (50,214,215), que parece ser debido a la acción de otra fosfolipasa, la PLD, que hidroliza PC generando colina y ácido fosfatídico, a partir del cual se produce DAG (202) por la acción de una fosfatasa. Se ha descrito que los ésteres de forbol producen un aumento sostenido en la cantidad de DAG (191,221) y que estimulan la actividad de la PLD y la hidrólisis de PC, a veces de forma sinérgica con ionóforos de calcio (191,221). Esto podría explicar la activación continuada de PKC en nuestro sistema celular en respuesta al éster de forbol junto con ionóforo de calcio.

Otra fosfolipasa que también está relacionada con la PKC es la PLA<sub>2</sub>. Muchos de los agonistas que inducen la hidrólisis de inositol fosfolípidos, también producen activación de PLA<sub>2</sub> (33,66,288). Esta fosfolipasa actúa sobre la PC, liberando ácidos grasos libres insaturados y lisoPC. Estos compuestos potencian la activación de ciertas isoformas de PKC dependientes de DAG, y con ello la respuesta celular correspondiente. En el caso concreto de los linfocitos T, se ha visto que la lisoPC se acumula tras el estímulo con el antígeno (12). La lisoPC también es capaz de aumentar la activación de linfocitos T humanos promovida por DAG e ionomicina (12). Respecto a los ácidos grasos libres insaturados, se sabe que potencian la síntesis de IL-2 inducida por DAG en linfocitos T (264). Por otro lado, se ha demostrado que la PLA<sub>2</sub> es un sustrato de ERK2, y en la activación de PLA<sub>2</sub> por agonista, ERK2 juega un papel esencial fosforilando y activando a la PLA<sub>2</sub> (159). Por este motivo, sería razonable pensar que en la transición G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en linfocitos, donde se produce la activación de ERK2, pudiera haber una actividad aumentada de PLA<sub>2</sub>.

Por otra parte, se cree que la PKC podría intervenir en la activación de PLD y PLA<sub>2</sub> (10,202), y, por tanto, se originaría una producción continua de DAG y una activación

prolongada de PKC. El final de la degradación de los fosfolípidos y de la consiguiente activación de PKC dependería de la cantidad de DAG y del tiempo de acción del agonista.

Mediante el empleo del BIS se pudo apreciar un bloqueo ligeramente mayor de la proliferación causada por Con A que por el éster de forbol con el ionoforo de calcio. El que el inhibidor no fuera igual de efectivo en uno u otro caso, parece reflejar el que no sean exactamente las mismas isoformas de PKC las que se activen en ambas situaciones, o que el grado de activación sea diferente, cosa bastante probable, ya que, aunque en los dos casos se produce un aumento del calcio intracelular, se diferencian en que el mecanismo de activación de PKC en el caso de la lectina mitogénica es a través de un incremento en los niveles de DAG, mientras que en el caso del PDBu es mediante una activación directa por el éster de forbol que se une a diferentes isoformas de PKC. El que las señales que producen ambos tipos de mitógenos presenten diferencias, también se observó en la activación de ERK2 y Raf-1 (como se comenta más adelante), pues aunque ambas quinasas se hiperfosforilan, presentan distinta cinética según el mitógeno.

## **1.2.- ESTUDIO DE PKC EN LA TRANSICION G<sub>1</sub>/S**

Este mismo tipo de estudio se llevó a cabo durante la transición G<sub>1</sub>/S. Respecto a la participación de PKC en la respuesta a IL-2 o PDBu se piensa que la proliferación producida por IL-2 es independiente de la activación de PKC (180,226,278), al contrario que en el caso de PDBu. El estudio comparativo de cómo se afecta la transición G<sub>1</sub>/S, promovida por IL-2 o por PDBu, por la presencia de BIS, nos sirvió para estudiar la especificidad de acción de este compuesto, frente a otro inhibidor de PKC, estaurosporina, y también para comprobar la participación de PKC en la señal promovida por PDBu, y no en la originada por IL-2.

### **1.2.1.- Especificidad de acción de BIS y estaurosporina.**

A concentraciones entre 0,25 y 1  $\mu$ M, el BIS inhibe la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina promovida por PDBu, pero no por IL-2, mostrando su especificidad de acción a esas concentraciones. El que a concentraciones mayores en un orden de magnitud (3-5  $\mu$ M) bloquee el efecto de ambos mitógenos, se podría explicar como un efecto inespecífico debido a la mayor concentración de inhibidor utilizada, aunque tal efecto no se produce con igual intensidad en ambos casos, ya que reduce hasta un 40-60% la acción mitogénica de IL-2 mientras que inhibe completamente la proliferación inducida por PDBu.

La estaurosporina se ha utilizado como inhibidor de PKC, aunque realmente se trata de un inhibidor de quinasas, que puede actuar tanto sobre serina/treonina quinasas como sobre tirosina quinasas (291), y no es específico de PKC. Por tanto, el hecho de que inhiba la proliferación provocada por ambos mitógenos puede considerarse debido a que,

debido a su mayor espectro de acción, puede inhibir otras quinasas, que intervengan en la señal inducida por IL-2, distintas de PKC.

La distinta especificidad de estaurosporina y BIS, demostrada en los experimentos de proliferación, se volvió a poner de manifiesto en los estudios de hiperfosforilación de Raf-1 en respuesta al éster de forbol. Mientras que la concentración de BIS, requerida para bloquear la proliferación, es la misma que la que se necesita para abolir la hiperfosforilación de Raf-1, la estaurosporina utilizada a una concentración suficiente para bloquear proliferación no afecta visiblemente la hiperfosforilación de Raf-1. Estos datos indican, de nuevo, que el BIS se comporta como un inhibidor de PKC más específico que la estaurosporina.

### 1.2.2.- Participación de PKC en la transición G<sub>1</sub>/S.

El hecho de que el BIS, utilizado a una determinada concentración, inhiba la proliferación provocada por PDBu pero no por IL-2, demuestra que PKC está implicada en la señal inducida por el éster de forbol pero no por la citoquina. La participación de PKC en la señal producida por IL-2 sigue siendo bastante discutida. La fosforilación *in situ* de un sustrato endógeno de PKC de 80 kDa se produce como consecuencia de la estimulación de células T por IL-2 (83,84,183). Sin embargo, la IL-2 no estimula la hidrólisis de inositolfosfolípidos por PLC (148,181,290), y por ello parecería improbable que la activación de PKC por IL-2 vaya a través de esta vía. Aunque antes existía la idea de que la hidrólisis del PIP<sub>2</sub> era el único mecanismo responsable para la activación de PKC en las células, actualmente, como se ha comentado anteriormente, se piensa que hay otros mecanismos, como la hidrólisis de PC (51,102) y la producción de ácido araquidónico (65,121) que pueden activar y desempeñar papeles importantes en la señal celular mediada por receptor. De cualquier forma, la mayor parte de los resultados obtenidos apuntan a que la proliferación producida por IL-2 es independiente de la actividad PKC (180,226,278), ya que, aunque se ha visto que la IL-2 estimula la actividad PKC en varias líneas celulares dependientes de IL-2 (77,164,190), se piensa que esa activación no es un paso esencial en el mecanismo por el que induce proliferación celular, aunque sí intervendría en la señal mediante la cual IL-2 protege de la apoptosis (muerte celular programada) a células CTLL-2 (164).

## 2.- ESTUDIO DE LAS ISOFORMAS PKC $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ , $\epsilon$ Y $\zeta$ EN LA TRANSICION G<sub>1</sub>/S.

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 (63). Por este motivo, se quiso analizar qué isoformas de PKC estaban presentes en linfoblastos T, y cuáles se activaban en la transición G<sub>1</sub>/S.

Para realizar este estudio se llevaron a cabo dos tipos de análisis distintos. Se sabe que los ésteres de forbol se unen al menos a un sitio presente en la región reguladora de la mayoría de las PKC, promoviendo la translocación del enzima a la membrana plasmática, en donde los fosfolípidos presentes producen su activación, seguida de la rápida degradación proteolítica de la misma. Por tanto, el análisis de la depleción y redistribución subcelular, de cada una de las isoformas, es un abordaje que sirve para estudiar su activación.

Con el estudio de la translocación y depleción de distintas isoformas de PKC en linfoblastos T, en respuesta a PDBu, observamos que hay un comportamiento diferente entre estas isoenzimas frente a un mismo estímulo, resultados que sugieren que puedan estar jugando papeles distintos en la señal desencadenada por un éster de forbol, que induce que estas células progresen desde la fase G<sub>1</sub> a la fase S del ciclo celular.

Respecto a las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , éstas se comportaron de acuerdo con lo que ya estaba descrito para las cPKCs, y, en concreto, con lo observado en células Jurkat (276), es decir, son isoformas principalmente citosólicas en células no estimuladas, se translocan rápidamente tras el estímulo a la fracción particulada y después de una exposición prolongada de las células al éster de forbol se produce su depleción.

Estas isoformas, por otra parte presentaron una mayor sensibilidad a dicho tratamiento que otras isoformas, pues junto con PKC  $\epsilon$  se proteolizan a concentraciones más bajas de PDBu que p82  $\zeta$  y que PKC  $\delta$ , siendo esta última la isoforma menos susceptible a la proteólisis, detectándose todavía, aunque ligeramente, en condiciones en que otras isoformas han sido totalmente deplecionadas.

La isoforma  $\delta$ , al igual que las anteriores, se detecta fundamentalmente en la fracción citosólica en los linfoblastos T de rata antes del estímulo. Sin embargo, en otro tipo de células T, como son las células Jurkat, esta isoforma se ha encontrado asociada principalmente a membrana en células sin estimular (276). En los linfoblastos T de rata se transloca a la fracción particulada en tiempos cortos después del estímulo, y se produce su depleción después de un tratamiento prolongado con PDBu. Esto señala otra diferencia en su comportamiento con lo descrito en células Jurkat, donde la translocación de PKC  $\delta$  no es aparente antes de 1 h, aunque su cantidad disminuye tras 4-6 h de tratamiento. Por otro lado, esta isoforma no se ha detectado en otro tipo de células T, como son los timocitos de ratón (82). Todas estas diferencias entre distintas células T podrían reflejar un papel de PKC  $\delta$  específico para cada subtipo celular.

La única isoforma que en células no estimuladas estaba en mayor proporción en la membrana, fue PKC  $\epsilon$ . Esta característica de dicha isoenzima también se ha observado en células U937 (139), fibroblastos de rata (28) y células Jurkat (276). En distintos tipos celulares en ausencia de estímulo, se han detectado otras isoformas mayoritariamente en membrana, por ejemplo PKC  $\delta$  en adipocitos (76) y fibroblastos de rata (28), y, como se ha citado anteriormente, en células humanas Jurkat (276). Este fenómeno no ha podido ser

explicado, pero la presencia en membrana en células no estimuladas no significa necesariamente que PKC esté activada, pues se ha visto mediante un ensayo directo de PKC, que esta quinasa puede estar presente, en la membrana de diferentes tipos celulares, tanto en un estado activo como inactivo (41).

En el caso de los linfoblastos T la fracción de PKC  $\epsilon$  presente en el citosol disminuye tras el estímulo, sin que haya un incremento aparente del enzima presente en la fracción particulada, además el enzima pudo deplecionarse después del tratamiento prolongado con PDBu, ocurriendo lo contrario que en fibroblastos de rata y en células Jurkat (28,276), donde sí se transloca, pero sólo es deplecionado parcialmente con el éster de forbol. En nuestro caso podría ser que, como ya se ha postulado (73), el enzima soluble fuera un reservorio de enzima funcional que puede ser movilizado para reemplazar la fracción de membrana que se proteoliza tras su activación.

Los resultados obtenidos con el estudio de PKC  $\zeta$  también muestran diferencias en el comportamiento de esta isoforma respecto de las demás estudiadas. Con el anticuerpo se detectan dos polipéptidos, p75  $\zeta$  y p82  $\zeta$ , que se comportan de forma diferente entre sí en los experimentos de translocación y de "down regulation" o de depleción. La isoforma p75  $\zeta$  se diferencia de todas las demás en que no responde al éster de forbol, ni translocándose ni deplecionándose. En este sentido hay que mencionar que, aunque hay algunos datos en la bibliografía en los que se propone que esta isoforma responde a ésteres de forbol (28,53), la mayoría de los datos publicados la describen como insensible al tratamiento con dichos agentes (44,125,276,283).

La IL-2 no provoca ningún cambio en la distribución subcelular de ninguna de las isoformas estudiadas. Estos resultados sugieren que estas isoenzimas de PKC no están participando en la vía desencadenada por la citoquina, lo cual está de acuerdo con los experimentos de proliferación en los que el inhibidor de PKC, BIS, no inhibía la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina producida por la IL-2, a concentraciones a las que sí inhibía la proliferación promovida por PDBu. Sin embargo, se ha mostrado en algunos casos la activación de PKC en la señal producida por IL-2 en ausencia de una translocación a la membrana de la misma (164,190), no obstante estos datos provienen de estudios realizados en la línea celular CTLL2, que aunque son células dependientes de IL-2, a veces pueden presentar un comportamiento diferente de lo observado en cultivos primarios de células T.

El papel exacto que cada una de las isoformas de PKC pueda jugar en la proliferación celular no se conoce aún completamente. Para el caso concreto de la activación de los linfocitos T se han hecho estudios transfectando distintas isoformas en células Jurkat, y se ha visto que PKC  $\alpha$  y PKC  $\epsilon$  pueden inducir la actividad de los factores de transcripción AP-1 y NF-AT-1. PKC  $\epsilon$  produce además la activación de NF- $\kappa$ B. Sin embargo, PKC  $\zeta$  no produce ningún efecto en la activación de ninguno de estos factores

(87). Estos resultados indican funciones selectivas para los diferentes isotipos de PKC en células T.

### 3.- ESTUDIO BIOQUIMICO DE p75 $\zeta$ Y p82 $\zeta$ .

Como se ha descrito en los resultados, con el anticuerpo  $\alpha$ -PKC  $\zeta$  detectamos dos bandas inmunorreactivas en extractos totales de linfoblastos T. Resultados similares se han descrito para líneas celulares linfocíticas (276) y otros tipos celulares como fibroblastos (28,102), miocitos (235,257), células PC12 (294), y macrófagos (85), entre otros. Por los resultados obtenidos en los experimentos de depleción y translocación, PKC  $\zeta$  75 parece representar la isoforma  $\zeta$  ya descrita, insensible a PDBu (125,283). Sin embargo, el polipéptido p82  $\zeta$  sí responde a ésteres de forbol translocándose a la membrana y deplecionándose.

Los datos obtenidos del estudio bioquímico de los polipéptidos p75  $\zeta$  y p82  $\zeta$ , indican que p75  $\zeta$  es probablemente el enzima PKC  $\zeta$  ya descrito, mientras que p82  $\zeta$  sería una isoforma distinta, aunque relacionada.

Ambos polipéptidos son separables mediante la cromatografía en columna de Mono-Q. El polipéptido p75  $\zeta$  comigra con una actividad que fosforila MBP, de forma constitutiva. Este comportamiento estaría de acuerdo con lo descrito por algunos autores para PKC  $\zeta$ , en cuanto que presenta una actividad independiente de activadores (144,179). Sin embargo, otros grupos han mostrado que su actividad es dependiente de PS (205), o también de fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (195), aunque no es sensible (122) ni a ésteres de forbol (205).

Por otro lado, p82  $\zeta$ , se comporta como una forma relacionada con PKC  $\zeta$ , ya que su actividad quinasa se inhibe por el pseudosustrato  $\zeta$  con la misma IC50 que p75  $\zeta$ . Por otro lado, ambas actividades se inhiben por BIS con igual IC50. Sin embargo, el hecho de que esta actividad, p82  $\zeta$ , se active por PS y/o PDBu, la diferencia de p75  $\zeta$ . En este aspecto, hay que decir que en cerebro de rata donde también se han observado dos bandas de 75 y 80 kDa (7), la correspondiente a 80 kD se ha separado a su vez en dos bandas y por sucesivas purificaciones se han identificado tres actividades de cPKCs ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). En el caso de de linfoblastos T de rata, p82  $\zeta$  no parece comigrar con una actividad de tipo cPKC, ya que, en ensayo *in vitro*, no responde a calcio, y en los experimentos de depleción muestra una sensibilidad diferente a las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ . Además, apoyando que no sea una cPKC, hay que considerar su comportamiento cromatográfico, pues en experimentos hechos en linfocitos T periféricos (130), se ha mostrado que toda la actividad PKC dependiente de calcio y fosfolípidos (cPKCs) eluye, en una resina DE52, a una concentración de NaCl entre 20 y 60 mM, y en extracto crudo de riñón bovino, las cPKCs no se retienen en una columna DEAE-Sephacel a 100 mM NaCl (196). Sin embargo, la p82  $\zeta$  de linfoblastos T de rata eluye de la resina a una concentración de NaCl de 150 mM.

## 4.- ACTIVACION DE LAS QUINASAS ERK2 Y RAF-1

### 4.1.- ACTIVACION DE ERK2.

La actividad ERK puede ser inducida en una variedad de células en estado quiescente, cuando éstas interactúan con sus factores de crecimiento, (3,29,91,94,115,136,185,233,244) hormonas (223,224), o en el caso de las células T tras la activación del complejo TCR/CD3 (105). También se sabe que la ERK2 es activada tanto en células T primarias (101,199), como otros tipos celulares (1,46), tras su estimulación con ésteres de forbol. Aparte de participar como señal temprana en la salida de quiescencia en muchos tipos celulares, también se sabe que esta proteína participa en pasos posteriores del ciclo celular, como en el caso de células de ovario de hamster chino donde se ha descrito una activación bifásica de ERK en la fase G<sub>1</sub> y alrededor de la fase M del ciclo celular (266), y en oocitos donde se activa en la transición G<sub>2</sub>/M (251).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en linfocitos T, tanto en la transición G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, promovida bien por Con A o por PDBu más ionóforo de calcio, como en la transición G<sub>1</sub>/S llevada a cabo por PDBu, también se produce la activación de ERK2, indicando una activación bifásica de esta quinasa durante el ciclo celular de linfocitos T. Además en la transición G<sub>1</sub>/S la activación de ERK2 parece ser el paso limitante, siendo necesaria pero no suficiente para la entrada de la célula en la fase S.

En relación con la estimulación de linfocitos T con la lectina mitogénica Con A, hay que mencionar que, al igual que con PDBu, también se observa activación de ERK2, aunque, en el caso de la Con A, es más tardía y no tan sostenida en el tiempo. La diferencia observada puede ser un reflejo de una distinta activación de las isoformas de PKC en uno y otro caso. Esta activación de ERK2 por lectinas mitogénicas ha sido descrita en células Jurkat por la acción de la lectina mitogénica PHA (105).

Cuando las células, en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular, se estimularon con PDBu más ionóforo de calcio, la activación de ERK2 fue debida solamente a la acción del éster de forbol, pues el ionóforo de calcio por sí solo, o en combinación con PDBu, no produjo ningún efecto en la activación de ERK2. El complejo AP1, es un factor de transcripción que interviene en la activación del promotor de IL-2 (54). Este factor compuesto de las proteínas Jun y Fos (9), y su actividad está regulada a nivel de la transcripción de los genes fos y jun (272), y por modificación postraduccional de sus productos (23,220). Recientemente se han identificado otros miembros de la familia de las MAPKs, llamados JNKs, responsables de la fosforilación del factor de transcripción c-Jun (112). Estudios realizados en células Jurkat, han mostrado que la activación de estas quinasas por éster de forbol se ve aumentada por la acción conjunta con un ionóforo de calcio (261), correlacionando esta activación con la producción de IL-2, siendo por ello un elemento

donde convergen las vías de PKC y calcio, necesarias para la expresión del gen de IL-2. El que JNK sea capaz de integrar señales que llevan a la activación de la célula T, no excluye que las quinasas ERK puedan participar también, ya que un evento clave en la inducción de fos es la fosforilación del factor de transcripción TCF/Elk1 por ERK (88,89).

La activación de ERK2 parece ser el paso limitante del proceso, pues observamos que en diferentes experimentos, existe una correlación entre proliferación y porcentaje de moléculas de ERK2 activadas. Se han mostrado ejemplos en los que la activación de ERK es suficiente para promover proliferación o diferenciación (31,52). En el caso de linfoblastos T, la activación de ERK2, por sí sola no es suficiente para que se produzca la proliferación, pues cuando en la transición G<sub>1</sub>/S, la mayoría de las moléculas de ERK2 han retornado a los niveles basales de fosforilación, aún se necesita la actividad PKC, indicando que otros sustratos de PKC, aparte de los pertenecientes a la vía que activa ERK2, deben ser fosforilados para alcanzar la fase S. Este resultado concuerda con lo mostrado en estudios realizados en líneas celulares dependientes de IL-3 que expresan receptores de IL-2, en donde la estimulación de ERK2 es necesaria pero no suficiente para la proliferación de esas células promovida por IL-2 (213).

#### 4.2.- ACTIVACION DE RAF-1

El producto del protooncogen raf-1, ha sido descrito como participante en procesos de mitogénesis, transformación y diferenciación (60). Respecto a los procesos de proliferación, en células T se ha observado su papel en la transición G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (252) y en la progresión desde la fase G<sub>1</sub> a S del ciclo celular, en estudios que muestran que IL-2 induce la hiperfosforilación de Raf-1 y aumenta su actividad quinasa (277,302). También se ha descrito que Raf se hiperfosforila en diferentes células tratadas con ésteres de forbol (189,298). En este trabajo, mostramos que Raf-1 es hiperfosforilado durante la activación de los linfocitos T, promovida por Con A o por PDBu más ionóforo de calcio, y en la transición G<sub>1</sub>/S en respuesta a PDBu, siendo ,además, necesaria esta quinasa para que la célula alcance la fase S. La hiperfosforilación en respuesta a PDBu, en las transiciones G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>/S, está de acuerdo con los datos ya obtenidos por Zmuidzinas y col. (302) y por Siegel y col. en células T humanas (252).

La hiperfosforilación de Raf-1 durante la transición G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> inducida por PDBu presenta una cinética similar a la de G<sub>1</sub>/S, siendo detectada al cabo de pocos minutos de la adición del estímulo. Sin embargo, en el caso de Con A, la hiperfosforilación es bastante más tardía, no observándose antes de las 5 h. Esta diferencia en la cinética de fosforilación con ambos mitógenos, como ya se ha dicho antes, también ocurrió en el caso de ERK2, y podría ser debido a que con PDBu se produce la activación directa de isoformas de PKC, mientras que con la lectina mitogénica no es directa, sino que tiene lugar a través de

segundos mensajeros, y, por ello, puede ser distinto, tanto las isoformas de PKC que intervienen en ambos casos, como su grado de activación.

Considerar que la hiperfosforilación de Raf-1 refleja su estado de activación, últimamente se está cuestionando. Inicialmente, su hiperfosforilación se asociaba con activación, ya que Raf-1 es una quinasa regulada por fosforilación/defosforilación. Sin embargo, se han descrito casos en los que se ha observado hiperfosforilación en ausencia de activación (238). Esto es debido a que los residuos que son fosforilados no son los mismos en cada caso (60). Por tanto, sólo la presencia de Raf-1 hiperfosforilado como indicativo de su activación hay que tomarla con reservas. No obstante, esta relación sí tiene lugar en la respuesta de algunos tipos celulares a determinados estímulos (228), y más concretamente a ésteres de forbol (189,253,302).

Haciendo uso de un oligonucleótido antisentido demostramos que la quinasa Raf-1 es necesaria en la transición G<sub>1</sub>/S de linfoblastos T. Con el mismo oligonucleótido, otros grupos han mostrado un bloqueo de la proliferación de linfocitos T periféricos en respuesta a IL-2 (229), y también una supresión de la síntesis de DNA promovida por insulina, eritropoyetina e IL-3 (38). Todos estos datos indican que la quinasa Raf-1 es un elemento esencial en el ciclo celular de linfocitos T y de otras células.

El hecho de que el bloqueo de la proliferación, observado en linfoblastos T de rata, siga ocurriendo cuando el oligonucleótido antisentido de Raf-1 se añade a las células, incluso a las 7 h tras la estimulación con PDBu, sugiere que la actividad quinasa de Raf-1 es requerida tarde en la transición G<sub>1</sub>/S del ciclo celular. Este dato, además, correlaciona con la cinética de hiperfosforilación de Raf-1, donde se vio que era entre 7-10 h cuando la forma hiperfosforilada dejaba de detectarse, siendo quizá el tiempo donde ya deje de necesitarse la actividad de Raf-1. Hay datos en la bibliografía que muestran un aumento en la cantidad de proteína Raf y en su actividad a través de G<sub>1</sub>, alcanzando los máximos niveles justamente antes del pico de síntesis de DNA (302). En linfoblastos T de rata no observamos si la actividad de Raf-1 se necesitaba o no, también como un evento temprano tras el estímulo.

#### **4.3.-RELACION DE ERK2 CON RAF-1**

Acerca del orden de participación de las quinasas ERK2 y Raf-1, los resultados obtenidos en linfoblastos T nos llevan a sugerir que, la activación de ERK2 no depende de la activación previa de Raf-1.

Esta conclusión está basada fundamentalmente en dos hechos. Por una parte, porque la cinética de fosforilación de ERK2 precede a la de Raf-1. En segundo lugar, debido a que el oligonucleótido antisentido de Raf-1 no es capaz de bloquear la hiperfosforilación de ERK2. Por otro lado, y aunque se trate de un dato más indirecto, por el hecho de que el AMPc, activador de la PKA, bloquee la transición G<sub>1</sub>/S pero sin afectar a la activación de ERK2, ya que sugiere que el punto donde actúa para bloquear la proliferación

es posterior, o está situado en una vía distinta, a ERK2. El AMPc es un agente inhibidor de proliferación de linfocitos T y de otros tipos celulares (35,78,135,161). Se ha descrito que esta función la ejerce, al menos en parte, inhibiendo la vía de las MAPKs (34). La elevación de los niveles intracelulares de AMPc activa la PKA, que impide la activación de Raf-1, inducida por ésteres de forbol y factores de crecimiento (49,295), mediante la fosforilación en el residuo de Ser 43, localizada en el dominio regulador N-terminal de Raf-1 (295). Luego en el caso de los linfoblastos T una posibilidad sería que el AMPc bloqueara la proliferación mediante la inactivación de Raf, siendo éste último un elemento posterior, o situado en una vía diferente, a ERK2.

La idea de que Raf-1 no esté situado en un paso anterior a ERK2, en la cascada de quinasas, estaría en contra del modelo establecido para la vía de señalización activada por los receptores con actividad tirosina quinasa (171), y por TCR (131), receptor que no posee actividad tirosina quinasa intrínseca, en donde se propone que Raf-1 es un elemento anterior a ERK2 en la vía de las MAPK. Sin embargo, también se han descrito casos en la literatura en que la activación de ERK2 no es dependiente de la de Raf-1. Por ejemplo, se ha mostrado que Raf-1 es dispensable para la activación de ERK2 en la vía de señalización de EGF y PDBu, bien porque ERK2 sea un elemento previo, o porque estén situados en vías independientes.(42). Por otro lado, mediante el uso de líneas celulares de fibroblastos de rata, se ha mostrado que Raf-1 no es el principal activador de ERK *in vivo* (142), proponiendo que, como en el caso de levaduras (201), una proteína quinasa similar a STE11 podría estar actuando sobre MEK. Una proteína quinasa homóloga a STE11, MEKK, se ha identificado como un activador de MEK en ratones (152). En este aspecto, se ha visto que MEKK de ratón, expresada en levadura, puede actuar como elemento posterior a PKC1 (homólogo de PKC en levadura), corrigiendo una mutación en la que no existe BCK1 (MAPKKK en la vía de la integridad de la pared celular), sin intervenir en las mutaciones de las MAPKKKs de otras vías (26). Por tanto, sería interesante encontrar si una MEKK podría estar implicada en la activación de ERK2 por PDBu, en un paso posterior a PKC, en linfoblastos T de rata.

Luego, la diversidad de los resultados obtenidos respecto al orden de participación de Raf y ERK2 podría ser explicado porque, según el tipo celular y el mitógeno empleados, la vía de señalización intracelular activada sea diferente.

#### **4.4.-RELACION DE PKC CON RAF-1 Y ERK2**

Con el inhibidor específico de PKC, BIS, se suprimen la activación de ERK2 y la hiperosforilación de Raf-1, demostrando que estos dos eventos son debidos a la activación de PKC.

Hasta el momento, se ha considerado como receptor intracelular de los ésteres de forbol a la PKC, o más concretamente a las isoformas de PKC que unen tales agentes. Sin

embargo, se han descrito otras proteínas que también pueden unir ésteres de forbol (2,100,279). Por ejemplo para el caso de los linfocitos T se sabe que ésteres de forbol producen la activación de Ras (71,225) pero no se conoce cual es el mecanismo exacto. Por otro lado, se ha descrito que el éster de forbol PMA se une directamente a la proteína Vav (100), intercambiador de GDP/GTP para Ras (98), produciendo la activación de la misma en linfocitos T (99). Debido a esto, algunos autores han postulado que, cabría la posibilidad de que la activación de Ras inducida por ésteres de forbol, en las células T, se debiera a la estimulación de Vav, y no necesariamente a la activación de PKC (100). Por esta razón, se podrían estar detectando efectos no mediados por PKC cuando se emplearan ésteres de forbol. Para descartar que los eventos que estábamos observando fueran debidos a otros efectos que produjera el PDBu, aparte de la activación de PKC, se empleó este inhibidor de PKC, BIS, resultando que estas señales (activación de Raf-1 y de ERK2), sí son producidas a través de la activación de PKC.

La dependencia de PKC para la activación de ERK actualmente está bastante controvertida. El requerimiento de PKC en la activación de ERK por un éster de forbol ha sido descrito mediante experimentos *in vitro* (169). Esta dependencia de PKC también se ha observado, *in vivo*, en distintos tipos celulares con diferentes estímulos. Así, se ha mostrado en células Jurkat estimuladas con antiCD3 (199), y en células no linfoides: en la línea celular 3T3-L1 con LIF (245), y en miocitos con endotelina (27). Sin embargo, también *in vivo* se ha descrito la activación de ERK independiente de PKC, en células 3T3-L1 con EGF (245) y en miocitos con FGF ácido (27), entre otros.

El hecho de que, en la forma activada de ERK2, se detecte un aumento en los niveles de fosfotirosina, implica la existencia de al menos alguna quinasa (tirosina quinasa o de especificidad dual), intermedia entre la PKC y ERK2, y por tanto, se descarta que la activación se deba a una fosforilación directa por parte de PKC. La quinasa responsable de la fosforilación en tirosina, podría ser la proteína quinasa de especificidad dual MEK, ya descrita como quinasa activadora de ERK2 (123,170,171)

En relación con la activación de Raf-1, hay estudios en los que se ha postulado que para una máxima activación de Raf es necesario la participación de Ras y tirosina quinasas (292). Por otro lado, se ha propuesto que la activación por PKC, de la cascada de las MAPKs, podría representar una ruta alternativa a la activación de Raf por tirosina quinasas y Ras (169). De todas formas, la interdependencia de PKC y Ras para activar la ruta de las MAPKs no está aún clara. Con respecto a la activación de Raf vía PKC, hay resultados distintos según el tipo celular y el estímulo empleado. Por ejemplo, se ha demostrado en líneas celulares que la activación del TCR aumenta la fosforilación de Raf e induce su actividad quinasa, siendo este efecto dependiente de PKC (253). Sin embargo, la activación de Raf mediada por el receptor de PDGF es independiente de PKC (189)

## 5.- ESTUDIO DE LA DEFOSFORILACION DE ERK2.

Las señales estudiadas anteriormente están reguladas, de forma que van a tener un tiempo de actuación limitado, característica de las repuestas celulares que hace que éstas tengan un significado fisiológico. Las proteínas quinasas reguladas por fosforilación/defosforilación van a dejar de estar activadas debido a la defosforilación de los residuos que habrían producido su activación. Por tanto, presenta interés el estudio de las actividades fosfatasa responsables de tal inactivación.

En relación a los miembros de la familia de las MAPK, dicha inactivación se produce por la defosforilación de los residuos de fosfotreonina y fosfotirosina (8). Se han hecho estudios en este aspecto y se han identificado fosfatasas responsables de la inactivación de ERK2 tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque todavía no se conoce completamente cómo se produce este mecanismo de defosforilación.

En cualquier caso, la defosforilación podría deberse a la acción de una proteína fosfatasa de especificidad dual, a la acción de serina/treonina fosfatasas junto con tirosina fosfatasas, o a la participación conjunta de los tres tipos de fosfatasas.

### 5.1.- PAPEL DE SERINA/TREONINA FOSFATASAS

Está descrito que la serina/treonina fosfatasa PP2A, *in vitro*, defosforila a la ERK2 en su residuo de P-Thr183 (8). También se piensa que está implicada en su defosforilación *in vivo* (5). Esta fosfatasa es inhibida por ácido okadaico (48). Por este motivo, quisimos analizar si esta fosfatasa estaba actuando *in vivo* sobre ERK2 en la transición G<sub>1</sub>/S empleando dicho inhibidor. Por los experimentos realizados con ácido okadaico, pensamos que al menos una serina/treonina fosfatasa, probablemente PP2A, está regulando el estado de fosforilación de ERK2, directa o también indirectamente.

Los resultados obtenidos mostraron que se produce un retraso en la defosforilación cuando las células se preincuban con ácido okadaico. Este dato confirma que hay fosfatasas inhibibles por ácido okadaico, que participan en la defosforilación de ERK2. Aparte de estar implicada en la defosforilación de ERK2, la PP2A, *in vitro*, también defosforila las serina activantes de MEK (198). No sólo *in vitro*, también *in vivo*, la inactivación de la PP2A produce un aumento en la activación de MEK, además de ERK, aunque sin afectar a Raf (256). Por tanto, al inhibir esta fosfatasa probablemente se esté actuando a distintos niveles en la vía de transducción, y por esta razón no se puede hablar de una inactivación específica de ERK2, ya que la inhibición de PP2A actuando sobre MEK, también afectaría a la hiperfosforilación de ERK2.

El ácido okadaico, en ausencia de otro estímulo, produce un aumento en la hiperfosforilación de ERK2, está de acuerdo con los datos relativos a células PC12, en donde se ha visto que, la principal fosfatasa que actúa sobre ERK y MEK, en ausencia de estímulo es la PP2A (5). Una inhibición de esta fosfatasa provocaría que el equilibrio en

este estado basal, en donde esta favorecida la defosforilación de estas quinasas, se viera desplazado hacia el estado fosforilado de las mismas.

Aunque todos los estudios, realizados hasta el momento, apuntan a que la PP2A es una de las fosfatasa que posiblemente están actuando sobre ERK y MEK, hay que tener en cuenta que en estos experimentos *in vivo*, donde se utiliza un inhibidor no específico para una fosfatasa, no se puede excluir el que se afecte la PP1, también inhibible por ácido okadaico (48), y que ésta última estuviera interviniendo de una forma indirecta en la fosforilación que se observa en ERK2 .

## 5.2.- PAPEL DE TIROSINA FOSFATASAS.

La fosforilación en tirosina es un evento menos generalizado que las producidas sobre residuos de serina y treonina , pues representa, aproximadamente, sólo un 5% de las fosforilaciones en la célula. Cuando los linfoblastos T son estimulados con PDBu, mediante nuestro abordaje experimental, detectamos fundamentalmente ERK2 como única proteína en la que se producía un aumento de la cantidad de fosfotirosina. Por tanto, el análisis de las defosforilaciones sobre residuos de fosfotirosina, podría ser una aproximación más específica en el estudio de esta quinasa. Con este objetivo, analizamos el efecto del ortovanadato sódico sobre la defosforilación de ERK2, descrito como un buen inhibidor de tirosina fosfatasa (93).

Mediante el empleo del ortovanadato, observamos que en la defosforilación de ERK2 están interviniendo fosfatasa sensibles al mismo, ya que observamos una hiperfosforilación más sostenida de ERK2 cuando las células se preincubaron con este agente.

No se ha identificado aún ninguna tirosina fosfatasa que sea la responsable fisiológica de la defosforilación del residuo P-Tyr185 de ERK2. Sin embargo sí se han visto varias fosfatasa de este tipo que son capaces de defosforilar e inactivar a ERK *in vitro*, como son la CD45 (8), tirosina fosfatasa situada en la membrana de los linfocitos con dominios extra e intra citoplásmicos, y también una tirosina fosfatasa purificada de oocitos de *X. laevis* (240).

De todas formas, hay autores que han propuesto que cuando la inactivación de ERK2 tiene lugar en el citoplasma por PP2A, conjuntamente está actuando alguna tirosina fosfatasa citoplásmica que sería la responsable de la defosforilación del residuo de P-Tyr185 (5).

## 5.3.- PAPEL DE FOSFATASAS INDUCIBLES.

Se ha descrito la existencia de un grupo de fosfatasa de especificidad dual responsables de inactivar a miembros de la familia de las MAPK *in vivo*. Estas fosfatasa son sintetizadas rápidamente después del estímulo, siendo su síntesis sensible a

cicloheximida, y su actividad es inhibible por ortovanadato. En fibroblastos de ratón estimulados con suero, en 1 h ya se detectan los niveles de una de dichas fosfatasa, la denominada MKP-1 (262), y su aparición coincide con la defosforilación e inactivación de ERK2. En células humanas se ha encontrado un homólogo, denominado CL100 inducible por estrés oxidativo en fibroblastos de piel (269). También se ha identificado otra fosfatasa de las mismas características pero específica de células hematopoyéticas, denominada PAC-1 (281). En el caso concreto de células T, en células Jurkat estimuladas con PHA más PMA, PAC-1 se identificó como el producto de un gen temprano, cuya expresión es independiente de una síntesis previa de proteína (231). En este trabajo quisimos estudiar si en los linfoblastos T, en la transición G<sub>1</sub>/S, una actividad fosfatasa de estas características actuaba sobre ERK2. Los resultados obtenidos sugieren que una fosfatasa regulada a nivel de síntesis, está implicada en la defosforilación de ERK2 tras el estímulo, siendo un posible candidato la denominada PAC-1.

La preincubación con CHX, inhibidor de la síntesis de proteínas, produce un retraso en la defosforilación de ERK2, sugiriendo la presencia de una actividad fosfatasa, como la ya descrita, que estaba siendo regulada a nivel de síntesis, y por ello con un comportamiento similar a PAC-1. Aunque tampoco se puede descartar que, lo que se esté inhibiendo con la CHX, sea la síntesis de algún otro factor necesario para la defosforilación de ERK2.

Se piensa que, en la defosforilación e inactivación de ERK2, no siempre actúan estas fosfatasas de especificidad dual. Así, estudios llevados a cabo en células PC12, estimuladas con EGF, la defosforilación de ERK2 no se ve afectada por la presencia de inhibidores de la transcripción, ni de la síntesis de proteínas, descartando, por este motivo, la participación de fosfatasas inducibles (296). Otros autores proponen que, la activación de ERK2, en dicha situación, es demasiado corta en el tiempo, como para que esta quinasa se transloque al núcleo, y allí sea defosforilada por CL100, que es de localización nuclear (5). En linfoblastos T, tras la estimulación con PDBu, la activación de ERK2 se mantiene durante 2-3 h, que es un tiempo suficientemente largo, como para que se transloque al núcleo, y allí actúe sobre ella una fosfatasa dual, como por ejemplo PAC-1 que es de localización nuclear (231).

En otros sistemas se ha visto que la hiperfosforilación de ERK, es más sostenida, llegando hasta varias horas, y pudiendo translocarse al núcleo, pero no afectándose cuando la CL100 se expresa en la célula (5). Por estos resultados se piensa que en la defosforilación de ERK2 no siempre interviene estas fosfatasas de especificidad dual, siendo en estos casos otras fosfatasas citoplásmicas o nucleares las responsables de su inactivación.

El hecho de que la adición conjunta de CHX y ortovanadato, que también inhibe estas fosfatasas de especificidad dual, mantuviera aún más la hiperfosforilación de ERK2 que el empleo de CHX solamente, sugiere la existencia de otras actividades fosfatasa,

aparte de la regulada a nivel de síntesis, que fueran sensibles a ortovanadato, tanto tirosina fosfatasas como fosfatasas de especificidad dual, y que estuvieran actuando sobre ERK2.

En resumen, los datos presentados en el estudio de la defosforilación de ERK2, nos permiten proponer la existencia de actividad(es) serina/treonina fosfatasas del tipo de PP2A inhibibles por ácido okadaico, y actividad(es) tirosina fosfatasas inhibibles por ortovanadato, entre las que probablemente se encuentre(n) alguna(s) de especificidad dual, cuya síntesis se induce por el estímulo.

## **VI. CONCLUSIONES**

Las conclusiones más importantes que se derivan de este trabajo son:

- 1.- En las transiciones  $G_0/G_1$  y  $G_1/S$ , del ciclo celular de linfocitos T, es necesaria la activación sostenida de PKC en el tiempo.
- 2.- Durante la transición  $G_1/S$  de linfocitos T inducida por PDBu, las isoformas PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , p82  $\zeta$  y p75  $\zeta$  presentan un comportamiento diferente en respuesta al estímulo, implicando probablemente un distinto papel para cada una de ellas en la transducción de la señal.
- 3.- Con el anticuerpo  $\alpha$ -PKC  $\zeta$  se detectan dos polipéptidos: p75  $\zeta$ , que se comporta como la PKC  $\zeta$  ya descrita, y p82  $\zeta$ , que aunque es una isoforma relacionada presenta características bioquímicas diferentes a la anterior.
- 4.- En el ciclo celular de linfocitos T, se produce la activación de la quinasa ERK2 en las transiciones  $G_0/G_1$  y en  $G_1/S$  del ciclo celular (inducida esta última por PDBu), siendo necesaria, pero no suficiente, para la entrada en S de la célula T.
- 5.- En linfocitos T, la quinasa Raf-1 es hiperfosforilada durante las transiciones  $G_0/G_1$  y  $G_1/S$  del ciclo celular (ésta última inducida por PDBu), siendo esta quinasa necesaria, al menos, hasta un paso tardío en la transición, para que la célula alcance la fase S del ciclo celular.
- 6.- Durante la transición  $G_1/S$  del ciclo celular de linfocitos T, el PDBu induce la activación de ERK2 y Raf-1 mediante la estimulación de PKC, no dependiendo la activación de ERK2 de la previa activación de Raf-1.
- 7.- En la defosforilación de ERK2 durante la transición  $G_1/S$  parecen estar implicadas serina/treonina fosfatasas del tipo PP2A, tirosina fosfatasas y fosfatasas duales del tipo PAC-1.

## **VII. BIBLIOGRAFIA**

1. Adams, P.D. and P. J. Parker. 1991. TPA-induced activation of MAP kinase. *FEBS Lett.* **290**:77-82.
2. Ahmed, S., J. Lee, R. Kozma, A. Best, C. Monfries, and L. Lim. 1993. A novel functional target for tumor-promoting phorbol esters and lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **268**:10709-10712.
3. Ahn, N.G., J. E. Weiel, C. P. Chan, and E. G. Krebs. 1990. Identification of multiple epidermal growth factor-stimulated protein serine/threonine kinases from Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **265**:11487-11494.
4. Aitken, A. 1995. 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends Biochem. Sci.* **20**:95-97.
5. Alessi, D.R., N. Gomez, G. Moorhead, T. Lewis, S. M. Keyse, and P. Cohen. 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.
6. Alessi, D.R., C. Smythe, and S. M. Keyse. 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.
7. Allen, B.G., J. E. Andrea, and M. P. Walsh. 1994. Identification and characterization of protein kinase C-immunoreactive proteins. *J. Biol. Chem.* **269**:29288-29298.
8. Anderson, N.G., J. L. Maller, N. K. Tonks, and T. W. Sturgill. 1990. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* **343**:651-653.
9. Angel, P. and M. Karin. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **1072**:129-157.
10. Asaoka, Y., S. Nakamura, K. Yoshida, and Y. Nishizuka. 1992. Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends Biochem. Sci.* **17**:414-417.
11. Asaoka, Y., M. Oka, K. Yoshida, and Y. Nishizuka. 1991. Metabolic rate of membrane-permeant diacylglycerol and its relation to human resting T-lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **88**:8681-8685.
12. Asaoka, Y., M. Oka, K. Yoshida, Y. Sasaki, and Y. Nishizuka. 1992. Role of phosphocholine in T-lymphocyte activation: Involvement of phospholipase A<sub>2</sub> in signal transduction through protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:6447-6451.
13. Ashman, R.F. 1984. Lymphocyte activation. *Fund. Immunol.* **12**:267-300.
14. Ashworth, A., S. Nakielny, P. Cohen, and C. Marshall. 1992. The amino acid sequence of a mammalian MAP kinase kinase. *Oncogene.* **7**:2555-2556.
15. Averill, L.E., R. L. Stein, and G. M. Kammer. 1988. Control of human T lymphocyte interleukin-2 production by a cAMP-dependent pathway. *Cell. Immunol.* **115**:88-89.
16. Avruch, J., X. F. Zhang, and J. M. Kyriakis. 1994. Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* **19**:279-283.
17. Azzi, A., D. Boscoboinik, and C. Hensey. 1992. The protein kinase C family. *Eur. J Biochem* **208**:547-557.
18. Baker, P.E., J. V. Fahey, and A. Munck. 1981. Prostaglandin inhibition of T-cell proliferation is mediated at two levels. *Cell. Immunol.* **61**:52-61.
19. Bazzi, M.D. and G. L. Nelsestuen. 1987. Role of substrate in imparting calcium and phospholipid requirements to protein kinase C activation. *Biochemistry* **26**:1974-1982.
20. Bazzi, M.D. and G. L. Nelsestuen. 1988. Constitutive activity of membrane-inserted protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**:336-343.
21. Berry, N., K. Ase, A. Kishimoto, and Y. Nishizuka. 1990. Activation of resting human T cells requires prolonged stimulation of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:2294-2298.

22. **Berry, N. and Y. Nishizuka.** 1990. Protein kinase C and T cell activation. *Eur. J. Biochem.* **189**:205-214.
23. **Binetruy, B., T. Smeal, and M. Karin.** 1991. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* **351**:122-127.
24. **Bjorge, J.D., T. O. Chan, M. Antczak, H. J. Kung, and D. J. Fujita.** 1990. Activated type I phosphatidylinositol kinase is associated with the epidermal growth factor (EGF) receptor following EGF stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:3816-3820.
25. **Blenis, J.** 1993. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **90**:5889-5892.
26. **Blumer, K.J., G. L. Johnson, and C. A. Lange-Carter.** 1994. Mammalian mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK) can function in a yeast mitogen-activated protein kinase pathway downstream of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **91**:4925-4929.
27. **Bogoyevitch, M.A., P. E. Glennon, M. B. Andersson, A. Clerk, A. Lazou, C. J. Marshall, P. J. Parker, and P. H. Sugden.** 1994. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* **269**:1110-1119.
28. **Borner, C., S. N. Guadagno, D. Fabbro, and I. B. Weinstein.** 1992. Expression of four protein kinase C isoforms in rat fibroblasts. *J Biol Chem.* **267**:12892-12899.
29. **Boulton, T.G., S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R. A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb, and G. D. Yancopoulos.** 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.
30. **Bradford, M.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.
31. **Brunet, A., G. Pagès, and J. Pouyssegur.** 1994. Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. *Oncogene* **9**:3379-3387.
32. **Brunner, D., N. Oellers, J. Szabad, W. H. Bigg III, L. Zipursky, and E. Hafen.** 1994. A gain-of-function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* **76**:875-888.
33. **Burch, R.M., A. Luini, and J. Axelrod.** 1986. Phospholipase A<sub>2</sub> and phospholipase C are activated by distinct GTP-binding proteins in response to  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation in FRTL5 thyroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:7201-7205.
34. **Burgering, B.M.T., G. J. Pronk, P. C. vanWeeren, P. Chardin, and J. L. Bos.** 1993. cAMP antagonizes p21ras directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *EMBO J.* **12**:4211-4220.
35. **Burgering, B.M.Th., A. J. Snijders, J. A. Maassen, M. L. Van de Wetering, A. J. Van der Eb, F. McCormick, and J. L. Bos.** 1989. Insulin stimulation of gene expression mediated by p21ras activation. *EMBO J.* **10**:1103-1109.
36. **Burns, D.J. and R. M. Bell.** 1991. Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *J Biol Chem.* **266**:18330-18338.
37. **Bustelo, X.R., J. A. Ledbetter, and M. Barbacid.** 1992. Product of vav proto-oncogene defines a new class of tyrosine protein kinase substrates. *Nature* **356**:68-71.
38. **Carroll, M.P., J. L. Spivak, M. McMahon, N. Weich, U. R. Rapp, and W. S. May.** 1991. Erythropoietin induces Raf-1 activation and Raf-1 is required for erythropoietin-mediated proliferation. *J. Biol. Chem.* **266**:14964-14969.

39. **Castagna, M., Y. Takai, K. Kalbuchi, K. Sano, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka.** 1982. Direct activation of calcium activated phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **257**:7847-7851.
40. **Cataldi, A., S. Miscia, R. Lisio, R. Rana, and L. Cocco.** 1990. Transient shift of diacylglycerol and inositol lipids induced by interferon in Daudi cells. *FEBS Lett.* **269**:465-468.
41. **Chakravarthy, B., A. Bussey, J. F. Whitfield, M. Sikorska, R. E. Williams, and J. P. Durkin.** 1991. The direct measurement of protein kinase C in isolated membranes using selective peptide substrate. *Anal. Biochem.* **196**:144-150.
42. **Chao, T.S., D. A. Foster, U. R. Rapp, and M. R. Rosner.** 1994. Differential Raf requirement for activation of mitogen-activated protein kinase by growth factors, phorbol esters, and calcium. *J Biol Chem.* **269**:7337-7341.
43. **Charles, C.H., A. S. Ablner, and L. F. Lau.** 1992. cDNA sequence of a growth factor-inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein. *Oncogene* **7**:187-190.
44. **Chen, C.-C.** 1993. Protein kinase C  $\alpha$ ,  $d$ ,  $e$  and  $z$  in C6 glioma cells. TPA induces translocation and down-regulation of conventional and new PKC isoforms but not atypical PKC  $z$ . *FEBS Lett.* **332**:169-173.
45. **Chen, R.-H., C. Sarnecki, and J. Blenis.** 1992. Nuclear localization and regulation of Erk and Rsk-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* **12**:915-927.
46. **Chung, J., R. -H. Chen, and J. Blenis.** 1991. Coordinate regulation of pp90<sup>rsk</sup> and a distinct protein-serine/threonine kinase activity that phosphorylates recombinant pp90<sup>rsk</sup> *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **11**:1868-1874.
47. **Cohen, P.** 1992. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem. Sci.* **17**:408-413.
48. **Cohen, P., C. F. B. Holmes, and Y. Tsukitani.** 1990. Okadaic acid: a new probe in the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* **15**:98-102.
49. **Cook, S.J. and F. McCormick.** 1993. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* **262**:1069-1071.
50. **Cook, S.J., S. Palmer, R. Plevin, and M. J. O. Wakelam.** 1990. Mass measurement of inositol 1,4,5-trisphosphate and sn-1,2-diacylglycerol in bombesin-stimulated Swiss 3T3 mouse fibroblasts. *Biochem. J.* **265**:617-620.
51. **Cook, S.J. and M. J. O. Wakelam.** 1992. Phospholipases C and D in mitogenic signal transduction. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol* **119**:13-45.
52. **Cowley, S., H. Paterson, P. Kemp, and C. J. Marshall.** 1994. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **77**:841-852.
53. **Crabos, M., R. Imber, T. Woodtli, D. Fabbro, and P. Erne.** 1991. Different translocation of three distinct PKC isoforms with tumor-promoting phorbol ester in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**:878-883.
54. **Crabtree, G.R.** 1989. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* **243**:355-361.
55. **Crews, C.M., A. Alessandrini, and R. L. Erikson.** 1992. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**:478-480.
56. **Crews, C.M., A. Alessandrini, and R. L. Erikson.** 1992. Erks: Their fifteen minutes has arrived. *Cell Growth. Differ.* **3**:135-142.
57. **Crews, C.M. and R. L. Erikson.** 1992. Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast byr1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **89**:8205-8209.

58. **Crews, C.M. and R. L. Erikson.** 1993. Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. *Cell* **74**:215-217.
59. **Dasgupta, J.D., C. Granja, B. Druker, L. -L. Lin, E. J. Yunis, and U. Rellas.** 1992. Phospholipase C-G1 association with CD3 structure in T cells. *J. Exp. Med.* **175**:285-288.
60. **Daum, G., I. Eisenmann-Tappe, H. Fries, J. Troppmair, and U. R. Rapp.** 1994. The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem. Sci.* **19**:474-479.
61. **Davis, L.S. and P. E. Lipsky.** 1989. T cell activation induced by anti-CD3 antibodies requires prolonged stimulation of protein kinase C. *Cell Immunol* **118**:208-221.
62. **Davis, R.J.** 1994. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci* **19**:470-473.
63. **Dekker, L.V. and P. J. Parker.** 1994. Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci* **19**:73-77.
64. **Dekker, L.V., P. J. Parker, and P. McIntyre.** 1992. Biochemical properties of rat protein kinase C-h expressed in COS cells. *FEBS Lett.* **312**:195-199.
65. **Dell, K.R. and D. L. Severson.** 1989. Effect of cis-unsaturated fatty acids on aortic protein kinase C activity. *Biochem. J.* **258**:171-175.
66. **Dennis, E.A., S. G. Rhee, M. M. Billah, and Y. A. Hannun.** 1991. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J* **5**:2068-2077.
67. **Desai, D.M., M. E. Newton, T. Kadlecsek, and A. Weiss.** 1990. Stimulation of the phosphatidylinositol pathway can induce T-cell activation. *Nature* **348**:66-69.
68. **Dickson, B. and E. Hafen.** 1994. Genetics of signal transduction in invertebrates. *Curr Opin Genet. Dev.* **4**:64-70.
69. **Doi, K., A. Gartner, G. Ammerer, B. Errede, H. Shinkawa, K. Sugimoto, and K. Matsumoto.** 1994. MSG5, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S.cerevisiae*. *EMBO J.* **13**:61-70.
70. **Downward, J., J. Graves, and D. Cantrell.** 1992. The regulation and function of p21<sup>ras</sup> in T cells. *Immunol. Today* **13**:89-92.
71. **Downward, J., J. D. Graves, P. H. Warne, S. Rayter, and D. A. Cantrell.** 1990. Stimulation of p21<sup>ras</sup> upon T-cell activation. *Nature* **346**:719-723.
72. **Duronio, V., L. Nip, and S. L. Pelech.** 1989. Interleukin-3 stimulates phosphatidylcholine turnover in a mast/megakaryocyte cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**:804-808.
73. **Díaz-Guerra, M.J.M. and L. Boscá.** 1990. Lack of translocation of protein kinase C from the cytosol to the membranes in vasopressin-stimulated hepatocytes. *Biochem J* **269**:163-168.
74. **Egan, S.E., B. W. Giddins, M. W. Brooks, L. Buday, A. M. Sizeland, and R. A. Weinberg.** 1993. Association of Sos ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* **363**:45-51.
75. **Fairhurst, R.M., M. Daeipour, M. C. Amaral, and A. E. Nel.** 1993. Activation of mitogen-activated protein kinase/ERK-2 in phytohaemagglutinin blasts by recombinant interleukin-2: contrasting features with CD3 activation. *Immunology.* **79**:112-118.
76. **Farese, R.V., M. L. Standaert, A. J. Francois, K. Ways, T. P. Arnold, H. Hernandez, and D. R. Cooper.** 1992. Effects of insulin and phorbol esters on subcellular distribution of protein kinase C isoforms in rat adipocytes. *Biochem. J.* **288**:319-323.
77. **Farrar, W.L. and W. B. Anderson.** 1985. Interleukin-2 stimulates association of protein kinase C with plasma membrane. *Nature* **315**:233-235.

78. **Farrar, W.L., S. W. Evans, U. R. Rapp, and J. L. Cleveland.** 1987. Effects of antiproliferative cyclic AMP on interleukin 2-stimulated gene expression. *J. Immunol.* **139**:2075-2080.
79. **Flanagan, W.M., B. Corthesy, R. J. Bram, and G. R. Crabtree.** 1991. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* **352**:803-807.
80. **Force, T., J. V. Bonventre, G. Heidecker, U. Rapp, J. Avruch, and J. M. Kyriakis.** 1994. Enzymatic characteristics of the c-Raf-1 protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:1270-1274.
81. **Freed, E., M. Symons, S. G. Macdonald, F. McCormick, and R. Ruggieri.** 1994. Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation. *Science* **265**:1713-1716.
82. **Freire-Moar, J., H. Cherwinski, F. Hwang, J. Ransom, and D. Webb.** 1991. Expression of protein kinase C isoenzymes in thymocyte subpopulations and their differential regulation. *J Immunol* **147**:405-409.
83. **Friedrich, B., D. A. Cantrell, and M. Gullberg.** 1989. Increased cyclic AMP levels block interleukin 2-induced protein kinase C substrate phosphorylation but not the mitogenic response. *Eur. J. Immunol.* **19**:1111-1116.
84. **Friedrich, B. and M. Gullberg.** 1988. The role of protein kinase C in early activation vs. growth of T lymphocytes. *Eur. J Immunol* **18**:489-492.
85. **Fujihara, M., N. Connolly, N. Ito, and T. Suzuki.** 1994. Properties of protein kinase C isoforms (beta II, epsilon, and zeta) in a macrophage cell line (J774) and their roles in LPS-induced nitric oxide production. *J Immunol* **152**:1898-1906.
86. **Gartner, A., K. Nasmyth, and G. Ammerer.** 1992. Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev.* **6**:1280-1292.
87. **Genot, E.M., P. J. Parker, and D. A. Cantrell.** 1995. Analysis of the role of protein kinase C- $\alpha$ , - $\epsilon$ , and - $\zeta$  in T cell activation. *J. Biol. Chem.* **270**:9833-9839.
88. **Gille, H., M. Kortenjann, O. Thomae, C. Moomaw, C. Slaughter, M. H. Cobb, and P. E. Shaw.** 1995. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J.* **14**:951-962.
89. **Gille, H., A. Sharrocks, and P. Shaw.** 1992. Phosphorylation of p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-Fos promoter. *Nature* **358**:414-417.
90. **Gold, M.R., M. T. Crowley, G. A. Martin, F. McCormick, and A. L. De-Franco.** 1993. Targets of B lymphocyte antigen receptor signal transduction include the p21ras GTPase-Activating Protein (GAP) and two GAP-associated proteins. *J. Immunol.* **150**:377-386.
91. **Gomez, N. and P. Cohen.** 1991. Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* **353**:170-173.
92. **González, F.A., D. L. Raden, and R. J. Davis.** 1991. Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J. Biol. Chem.* **266**:22159-22163.
93. **Gordon, J.A.** 1991. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol.* **201**:477-482.
94. **Gotoh, Y., E. Nishida, T. Yamashita, M. Hoshi, M. Kawakami, and H. Sakai.** 1990. Microtubule-associated-protein (MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. Identity with the mitogen-activated MAP kinase of fibroblastic cells. *Eur. J Biochem* **193**:661-669.
95. **Graber, M., C. H. June, L. E. Samelson, and A. Weiss.** 1992. The protein-tyrosine kinase inhibitor herbimycin A, but not genestein, specifically inhibits signal transduction by the T cell antigen receptor. *Int. Immunol* **4**:1201-1210.

96. Graves, J.D., J. Downward, M. Izquierdo-Pastor, S. Rayter, P. H. Warne, and D. A. Cantrell. 1992. The growth factor IL-2 activates p<sup>21ras</sup> proteins in normal human T lymphocytes. *J. Immunol.* **148**:2417-2422.
97. Guan, K.-L., S. S. Broyles, and J. E. Dixon. 1991. A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature* **350**:359-362.
98. Gulbins, E., K. M. Coggeshall, G. Baier, S. Katzav, P. Burn, and A. Altman. 1993. Tyrosine kinase-stimulated guanine nucleotide exchange activity of vav in T cell activation. *Science* **260**:822-825.
99. Gulbins, E., K. M. Coggeshall, G. Baier, D. Telford, C. Langlet, G. Baier-Bitterlich, N. Bonnefoy-Berard, P. Burn, A. Wittinghofer, and A. Altman. 1994. Direct stimulation of Vav guanine nucleotide exchange activity for Ras by phorbol esters and diglycerides. *Mol. Cell. Biol.* **14**:4749-4758.
100. Gulbins, E., K. M. Coggeshall, C. Langlet, G. Baier, N. Bonnefoy-Berard, P. Burn, A. Wittinghofer, S. Katzav, and A. Altman. 1994. Activation of Ras in vitro and in intact fibroblasts by the Vav guanine nucleotide exchange protein. *Mol. Cell. Biol.* **14**:906-913.
101. Gupta, S., A. Weiss, G. Kumar, S. Wang, and A. Nel. 1994. The T-cell antigen receptor utilizes Lck, Raf-1, and MEK-1 for activating mitogen-activated protein kinase. Evidence for the existence of a second protein kinase C-dependent pathway in an Lck-negative Jurkat cell mutant. *J. Biol. Chem.* **269**:17349-17357.
102. Ha, K.S. and J. H. Exton. 1993. Differential translocation of protein kinase C isoenzymes by thrombin and platelet-derived growth factor: a possible function for phosphatidylcholine-derived diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* **268**:10534-10539.
103. Hall, A. 1994. A biochemical function for Ras- at last. *Science* **264**:1413-1414.
104. Han, M., A. Golden, Y. Han, and P. W. Sternberg. 1993. *C.elegans lin-45 raf* gene participates in *let-60 raf-1* stimulated vulval differentiation. *Nature* **363**:133-140.
105. Hanekom, C., A. Nel, C. Gittinger, A. Rheeder, and G. Landreth. 1989. Complexing of the CD-3 subunit by a monoclonal antibody activates a microtubule-associated protein 2 (MAP-2) serine kinase in Jurkat cells. *Biochem. J.* **262**:449-456.
106. Hartwig, J.H., M. Thelen, A. Rosen, P. A. Janmey, A. C. Nairn, and A. Aderem. 1992. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* **356**:618-622.
107. Haystead, T.A., P. Dent, J. Wu, C. M. Haystead, and T. W. Sturgill. 1992. Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett.* **306**:17-22.
108. Heidecker, G., W. Kolch, D. K. Morrison, and U. R. Rapp. 1992. The role of Raf-1 phosphorylation in signal transduction. *Adv. Cancer Res.* **58**:53-73.
109. Heidecker, G., M. Muleihel, J. L. Cleveland, W. Kolch, T. W. Beck, P. Lloyd, T. Pawson, and U. R. Rapp. 1990. Mutational activation of c-raf-1 and definition of the minimal transforming sequence. *Mol. Cell. Biol.* **10**:2503-2512.
110. Heldin, C. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80**:213-223.
111. Herskowitz, I. 1995. MAP kinase pathways in yeast: For mating and more. *Cell* **80**:187-197.
112. Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden, and M. Karin. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* **7**:2135-2148.
113. Hill, C.S. and R. Treisman. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80**:199-211.
114. Hornbeck, P., K. P. Huang, and W. E. Paul. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2279-2283.

115. Hoshi, M., E. Nishida, and H. Sakai. 1988. Activation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -inhibitable protein kinase that phosphorylates microtubule-associated protein 2 *in vitro* by growth factors, phorbol esters, and serum in quiescent cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **263**:5396-5401.
116. Howe, L.R., S. J. Leever, N. Gómez, S. Nakielnny, P. Cohen, and C. J. Marshall. 1992. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* **71**:335-342.
117. Howe, L.R. and A. Weiss. 1995. Multiple kinases mediate T-cell-receptor signaling. *Trends Biochem. Sci.* **20**:59-64.
118. Hoyos, B., D. W. Ballard, E. Bohnlein, M. Siekevitz, and W. C. Greene. 1989. Kappa B-specific DNA binding proteins: Role in the regulation of human Interleukin-2 gene expression. *Science* **244**:457-460.
119. Huang, C. and M. C. Cabot. 1990. Phorbol diesters stimulate the accumulation of phosphatidate, phosphatidylethanol, and diacylglycerol in three cell types. *J. Biol. Chem.* **265**:14858-14863.
120. Huang, F.L., Y. Yoshida, J. R. Cunha-Melos, M. A. Beaven, and K. -P. Huang. 1989. Differential down-regulation of protein kinase C isoenzymes. *J. Biol. Chem.* **264**:4238-4243.
121. Huang, X.P., C. Da Silva, X. T. Fan, and M. Castagna. 1993. Characteristics of arachidonic-acid-mediated brain protein kinase C activation: evidence for concentration-dependent heterogeneity. *Biochim. Biophys. Acta* **1175**:351-356.
122. Hug, H. and T. F. Sarre. 1993. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem. J.* **291**:329-343.
123. Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**:225-236.
124. Hunter, T. and M. Karin. 1992. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**:375-387.
125. Huwiler, A., D. Fabbro, S. Stabel, and J. Pfeilschifter. 1992. Immunocharacterization of d- and z-isoenzymes of protein kinase C in rat renal mesangial cells. *FEBS Lett.* **300**:259-262.
126. Imboden, J.B. and J. D. Stobo. 1985. Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J. Exp. Med.* **161**:446-456.
127. Inoue, M., A. Kishimoto, Y. Takai, and Y. Nishizuka. 1977. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* **252**:7610-7616.
128. Irie, K., Y. Gotoh, B. M. Yashar, B. Errede, E. Nishida, and K. Matsumoto. 1994. Stimulatory effects of yeast and mammalian 14-3-3 proteins on the Raf protein kinase. *Science* **265**:1716-1719.
129. Isakov, N. and A. Altman. 1985. Tumor promoters in conjunction with calcium ionophores mimic antigenic stimulation by reactivation of alloantigen-primed murine T lymphocytes. *J. Immunol.* **135**:3674-3680.
130. Isakov, N. and A. Altman. 1987. Human T lymphocyte activation by tumor promoters: Role of protein kinase C. *J. Immunol.* **138**:3100-3107.
131. Izquierdo, M., S. Bowden, and D. Cantrell. 1994. The role of Raf-1 in the regulation of extracellular signal-regulated kinase 2 by the T cell antigen receptor. *J Exp Med.* **180**:401-406.
132. Izquierdo, M., J. Downward, J. D. Graves, and D. A. Cantrell. 1992. Role of protein kinase C in T-cell antigen receptor regulation of p21ras: evidence that two p21ras regulatory pathways coexist in T cells. *Mol. Cell. Biol.* **12**:3305-3312.
133. Jain, J., P. G. McCaffrey, V. E. Valge-Archer, and A. Rao. 1992. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* **356**:801-804.

134. **Johnson, G.L. and R. R. Vaillancourt.** 1994. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**:230-238.
135. **Johnson, K.W., H. D. Bruce, and K. A. Smith.** 1988. cAMP antagonizes interleukin-2 promoted T cell cycle progression at a discrete point in early G<sub>1</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:6072-6076.
136. **Kazlauskas, A. and J. A. Cooper.** 1988. Protein kinase C mediates platelet-derived growth factor-induced tyrosine phosphorylation of p42. *J. Cell. Biol* **106**:1395-1402.
137. **Kemp, B.E. and R. B. Pearson.** 1990. Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* **15**:342-346.
138. **Keyse, S.M. and E. A. Emslie.** 1992. Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature* **359**:644-647.
139. **Kiley, S.C. and P. J. Parker.** 1995. Differential localization of protein kinase C isozymes in U937 cells: Evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation. *J. Cell Sci.* **108**:1003-1016.
140. **Kim, H.K., J. W. Kim, A. Zilberstein, B. Margolis, J. G. Kim, J. Schlessinger, and S. G. Rhee.** 1991. PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC-G 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell* **65**:435-441.
141. **Kishimoto, A., N. Kajikawa, M. Shiota, and Y. Nishizuka.** 1983. Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium dependent neutral protease. *J. Biol. Chem.* **258**:1156-1164.
142. **Kizaka-Kondoh, S. and H. Okayama.** 1993. Raf-1 is not a major upstream regulator of MAP kinases in rat fibroblasts. *FEBS Lett.* **336**:255-258.
143. **Kochs, G., R. Hummel, B. Fiebich, T. F. Sarre, D. Marmé, and H. Hug.** 1993. Activation of purified human protein kinase C  $\alpha$  and  $\beta$  isoenzymes in vitro by Ca<sup>2+</sup>, phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochem. J.* **291**:627-633.
144. **Kochs, G., R. Hummel, D. Meyer, H. Hug, D. Marmé, and T. F. Sarre.** 1993. Activation and substrate specificity of the human protein kinase C  $\alpha$  and  $\zeta$  isoenzymes. *Eur. J. Biochem.* **216**:597-606.
145. **Kolch, W., G. Heidecker, G. Kochs, R. Hummel, H. Vahidi, H. Mischak, and G. Finkenzeller.** 1993. Protein kinase C $\alpha$  activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**:249-252.
146. **Koretzky, G.A., J. Picus, M. L. Thomas, and A. Weiss.** 1990. Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T cell antigen receptor to the phosphatidylinositol pathway. *Nature* **346**:66-68.
147. **Kosako, H., E. Nishida, and Y. Gotho.** 1993. cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase cascade pathways in yeasts to vertebrates. *EMBO J.* **12**:787-794.
148. **Kozumbo, W.J., D. T. Harris, S. Gromkowski, J. C. Cerottini, and P. A. Cerutti.** 1987. Molecular mechanisms involved in T cell activation: the phosphatidylinositol signal-transducing mechanism mediates antigen-induced lymphokine production but not interleukin-2-induced proliferation in cloned cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* **138**:606.
149. **Kruse, C.A., K. O. Lillehei, D. H. Mitchell, and B. Kleinschmidt-DeMasters.** 1990. Analysis of interleukin 2 and various effector cell populations in adoptive immunotherapy of 9L rat gliosarcoma: Allogeneic cytotoxic T lymphocytes prevent tumor take. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:9577-9581.
150. **Kumagal, N., S. H. Benedict, G. B. Mills, and E. W. Gelfand.** 1987. Requirements for the simultaneous presence of phorbol esters and calcium ionophores in the expression of human T lymphocyte proliferation-related genes. *J. Immunol.* **139**:1393-1399.
151. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

152. **Lange-Carter, C., C. Pleiman, A. Gardner, K. Blumer, and G. Johnson.** 1993. A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* **260**:315-319.
153. **LeGrue, S.J.** 1988. Does interleukin 2 stimulus-response coupling result in generation of intracellular second messengers? *Lymphokine Res.* **7**:187-200.
154. **Leberer, E., D. Dignard, D. H Marcus, D. Y. Thomas, and M. Whiteway.** 1992. The protein kinase holomologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein bG subunits to downstream signalling components. *EMBO J.* **11**:4815-4824.
155. **Lee, K.S. and D. E. Levin.** 1992. Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol. Cell. Biol.* **12**:172-182.
156. **Lee, M.-H. and R. M. Bell.** 1991. Mechanism of protein kinase C activation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* **30**:1041-1049.
157. **Li, N., A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Bar-Sagi, B. Margolis, and J. Schlessinger.** 1993. Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* **363**:85-88.
158. **Li, S. and J. Sediny.** 1993. Raf-1 protein kinase activates the NF- $\kappa$ B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:9247-9251.
159. **Lin, L.L., M. Wartmann, A. Y. Lin, J. L. Knopf, A. Soth, and R. J. Davis.** 1993. cPLA<sub>2</sub> is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**:269-278.
160. **Linch, D.C., D. L. Wallace, and K. O'Flynn.** 1987. Signal transduction in human T lymphocytes. *Immunol. Rev.* **95**:137-159.
161. **Lingk, D.S., M. A. Chan, and E. W. Gelfand.** 1990. Increased cyclic adenosine monophosphate levels block progression but not initiation of human T cell proliferation. *J. Immunol.* **145**:449-455.
162. **Liu, J., J. D. Jr. Farmer, W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, and S. L. Schreiber.** 1995. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**:807-815.
163. **Liyanage, M., D. Frith, E. Livneh, and S. Stabel.** 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.
164. **Lu, Y., R. Tremblay, H. Jouishomme, B. Chakravarthy, and J. P. Durkin.** 1994. Evidence that the activation of an inactive pool of membrane-associated protein kinase C is linked to the IL-2-dependent survival of T lymphocytes. *J. Immunol.* **153**:1495-1504.
165. **MacDonald, S., C. Crews, L. Wu, J. Driller, R. Clark, R. Erikson, and F. McCormick.** 1993. Reconstitution of the Raf-1-MEK-ERK signal transduction pathway *in vitro*. *Mol Cell Biol* **13**:6615-6620.
166. **MacKintosh, C. and R. W. MacKintosh.** 1994. Inhibitors of protein kinases and phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* **19**:444-448.
167. **Marais, R., J. Wynne, and R. Treisman.** 1993. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* **73**:381-393.
168. **Mark, G.E. and U. R. Rapp.** 1984. Primary structure of v-raf: Relatedness to the Src family of oncogenes. *Science* **224**:285-289.
169. **Marquardt, B., D. Frith, and S. Stabel.** 1994. Signalling from TPA to MAP kinase requires protein kinase C, raf and MEK: Reconstitution of the signalling pathway *in vitro*. *Oncogene* **9**:3213-3218.
170. **Marshall, C.J.** 1994. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**:82-89.

171. **Marshall, C.J.** 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signalling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**:179-185.
172. **Marx, J.** 1993. Two major signal pathways linked. *Science* **262**:988-990.
173. **Matsuda, S., Y. Gotoh, and E. Nishida.** 1993. Phosphorylation of Xenopus mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase by MAP kinase kinase kinase and MAP kinase. *J Biol Chem.* **268**:3277-3281.
174. **Matsuda, S., H. Kosako, K. Takenaka, K. Moriyama, H. Sakai, T. Akiyama, Y. Gotoh, and E. Nishida.** 1992. Xenopus MAP kinase activator: Identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade. *EMBO J* **11**:973-982.
175. **McCaffrey, P.G., B. A. Perrino, T. R. Soderling, and A. Rao.** 1993. NF-ATp, a lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs. *J. Biol. Chem.* **268**:3747-3752.
176. **McCormick, F.** 1989. Ras GTPase activating protein: Signal transmitter and signal terminator. *Cell* **56**:5-8.
177. **McCormick, F.** 1994. Activators and effectors of *ras* p21 proteins. *Curr Opin Genet. Dev.* **4**:71-76.
178. **McCready, C.W., C. M. Ely, E. Westin, and R. A. Carchman.** 1988. Coordination and reversibility of signals for proliferative activation and interleukin-2 mRNA production in resting human lymphocytes by phorbol ester and calcium ionophore. *J. Biol. Chem.* **263**:18537-18544.
179. **McGlynn, E., J. Liebetanz, S. Reutener, J. Wood, N. B. Lydon, H. Hofstetter, M. Vanek, T. Meyer, and D. Fabbro.** 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.
180. **Mills, G.B., P. Girard, S. Grinstein, and E. W. Gelfand.** 1988. Interleukin-2 induces proliferation of T lymphocyte mutants lacking protein kinase C. *Cell* **55**:91-100.
181. **Mills, G.B., D. J. Stewart, A. Mellors, and E. W. Gelfand.** 1986. Interleukin 2 does not induce phosphatidylinositol hydrolysis in activated T cells. *J Immunol* **136**:3019-3024.
182. **Minami, Y., T. Kono, T. Miyazaki, and T. Taniguchi.** 1993. The IL-2 receptor complex: Its structure, function and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:245-267.
183. **Mire, A.R., R. G. Wickremasinghe, R. Michalevicz, and A. V. Hofbrand.** 1985. Interleukin-2 induces rapid phosphorylation of 85 kilodalton protein in permeabilized lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **847**:159.
184. **Mischak, H., J. H. Pierce, J. A. Goodnight, M. G. Kazanietz, P. M. Blumberg, and J. F. Mushinsky.** 1993. Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C- $\alpha$  and - $\delta$  and not by protein kinase C- $\beta$ , - $\epsilon$ , - $\zeta$ , and - $\eta$ . *J Biol Chem.* **268**:20110-20115.
185. **Miyasaka, T., D. W. Sternberg, J. Miyasaka, P. Sherline, and A. R. Saltiel.** 1991. Nerve growth factor stimulates protein tyrosine phosphorylation in PC-12 pheochromocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **88**:2653-2657.
186. **Miyazaki, T., A. Kawahara, H. Fujii, Y. Nakagawa, Y. Minami, Z. -J. Liu, I. Oishi, O. Silvennoinen, B. A. Witthuhn, J. N. Ihle, and T. Taniguchi.** 1994. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* **266**:1045-1047.
187. **Moodie, S.A., B. M. Willumsen, M. J. Weber, and A. Wolfman.** 1992. Complexes of Ras-GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase. *Science* **260**:1658-1661.
188. **Morrison, D.K., G. Heidecker, U. R. Rapp, and T. D. Copeland.** 1993. Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J. Biol. Chem.* **268**:17309-17316.
189. **Morrison, D.K., D. R. Kaplan, U. Rapp, and T. M. Roberts.** 1988. Signal transduction from membrane to cytoplasm: Growth factors and membrane-bound oncogene products increase Raf-1 phosphorylation and associated protein kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:8855-8859.

190. **Mukaida, N., H. Yagisawa, T. Kawai, and T. Kasahara.** 1988. The role of protein kinase C activation in signal transmission by interleukin 2. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **154**:187-193.
191. **Mullmann, T.J., M. I. Siegel, R. W. Egan, and M. M. Billah.** 1990. Complement C5a activation of phospholipase D in human neutrophils. A major route to the production phosphatidates and diglycerides. *J. Immunol.* **144**:1901-1908.
192. **Murray, N.R., G. P. Baumgardner, D. J. Burns, and A. P. Fields.** 1993. Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia (K562) cell proliferation and differentiation. *J. Biol. Chem.* **268**:15847-15853.
193. **Mushin, A., A. MacNicol, and L. Williams.** 1993. Raf-1 protein kinase is important for progesterone-induced *Xenopus* oocyte maturation and acts downstream of Mos. *Mol. Cell. Biol.* **13**:4197-4202.
194. **Nakamura, Y., S. M. Russell, S. A. Mess, M. Friedmann, M. Erdos, C. Francois, Y. Jacques, S. Adelstein, and W. J. Leonard.** 1994. Heterodimerization of the IL-2 beta and gamma-chain cytoplasmic domain is required for signalling. *Nature* **369**:330-333.
195. **Nakanishi, H., K. A. Brewer, and J. H. Exton.** 1993. Activation of the z isoenzyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate. *J Biol Chem.* **268**:13-16.
196. **Nakanishi, H. and J. H. Exton.** 1992. Purification and characterization of the z isoform of protein kinase C from bovine kidney. *J Biol Chem.* **267**:16347-16354.
197. **Nakielnny, S., D. G. Campbell, and P. Cohen.** 1992. MAP kinase kinase from rabbit skeletal muscle. A novel dual specificity enzyme showing homology to yeast protein kinases involved in pheromone-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* **308**:183-189.
198. **Nakielnny, S., P. Cohen, J. Wu, and T. Sturgill.** 1992. MAP kinase activator from insulin-stimulated skeletal muscle is a protein threonine/tyrosine kinase. *EMBO J* **11**:2123-2129.
199. **Nel, A.E., C. Hanekom, A. Rheeder, K. Williams, S. Pollack, R. Katz, and G. E. Landreth.** 1990. Stimulation of MAP-2 kinase activity in T lymphocytes by anti-CD3 or anti-TI monoclonal antibody is partially dependent on protein kinase C. *J Immunol* **144**:2683-2689.
200. **Nel, A.E., I. Schabort, A. Rheeder, P. Bonic, and M. W. Wooten.** 1987. Inhibition of antibodies to CD3 surface antigen and phytohemagglutinin-mediated T cellular responses by inhibiting Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-dependent protein kinase activity with the aid of 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride. *J. Biol. Chem.* **139**:2230-2236.
201. **Nishida, E. and Y. Gotoh.** 1993. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci* **18**:128-131.
202. **Nishizuka, Y.** 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**:607-613.
203. **Noguchi, T., T. Matozaki, K. Horita, Y. Fujioka, and M. Kasuga.** 1994. Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation. *Mol Cell Biol* **14**:6674-6682.
204. **Ogita, K., S. Miyamoto, K. Yamaguchi, H. Koide, N. Fujisawa, U. Kikkawa, S. Sahara, Y. Fukami, and Y. Nishizuka.** 1992. Isolation and characterization of d-subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:1592-1596.
205. **Ono, Y., T. Fujii, K. Ogita, U. Kikkawa, K. Igarashi, and Y. Nishizuka.** 1989. Protein kinase C z subspecies from rat brain: Its structure, expression and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:3099-3103.
206. **Ono, Y., U. Kikkawa, K. Ogita, T. Fujii, T. Kurokawa, Y. Asaoka, K. Sekiguchi, K. Ase, K. Igarashi, and Y. Nishizuka.** 1987. Expression and properties of two types of protein kinase C: alternative splicing from a single gene. *Science* **236**:1116-1120.

207. Otsu, M., Y. Terada, and H. Okayama. 1993. Isolation of two members of the rat MAP kinase kinase gene family. *FEBS Lett.* **320**:246-250.
208. Pauza, C.D. 1987. Regulation of human T-lymphocyte gene expression by interleukin-2 of immediate-response genes include the protooncogene c-myc. *Mol. Cell. Biol.* **7**:342-348.
209. Payne, D.M., A. J. Rossomando, P. Martino, A. K. Erickson, J. H. Her, J. Shobanowitz, D. F. Hunt, M. J. Weber, and T. -W. Sturgill. 1991. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* **10**:885-892.
210. Pears, C., D. Schaap, and P. J. Parker. 1991. The regulatory domain of protein kinase C- $\epsilon$  restricts the catalytic-domain- specificity . *Biochem. J.* **276**:257-260.
211. Pears, C., S. Stabel, S. Cazaubon, and P. J. Parker. 1992. Studies on the phosphorylation of protein kinase C- $\alpha$ . *Biochem. J.* **283**:515-518.
212. Pelech, S.L. and J. S. Sanghera. 1992. Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signaling. *Trends Biochem Sci* **17**:233-238.
213. Perkins, G.R., J. Marvel, and M. K. L. Collins. 1993. Interleukin 2 activates extracellular signal-regulated protein kinase 2. *J. Exp. Med.* **178**:1429-1434.
214. Pfeffer, L.M., B. L. Eisenkraft, N. C. Reich, T. Improta, G. Baxter, S. Daniel-Issakami, and B. Strulovici. 1991. Transmembrane signaling by interferon  $\alpha$  involves diacylglycerol production and activation of the  $\epsilon$  isoform of protein kinase C in Daudi cells . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:7988-7992.
215. Pfeffer, L.M., B. Strulovici, and A. R. Saltiel. 1990. Interferon- $\alpha$  selectively activates the  $\beta$  isoform of protein kinase C through phosphatidylcholine hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:6537-6541.
216. Polakis, P. and F. McCormick. 1993. Structural requirements for the interaction of p21<sup>ras</sup> with GAP, exchange factors, and its biological effector target. *J. Biol. Chem.* **268**:9157-9160.
217. Pommier, Y., D. Kerrigan, K. D. Hartmann, and R. T. Glazer. 1990. Phosphorylation of mammalian DNA topoisomerase I and activation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **265**:9418-9422.
218. Posada, J. and J. A. Cooper. 1992. Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Science* **255**:212-215.
219. Posner, B.I., R. Faure, J. W. Burgess, A. P. Bevan, D. Lachance, G. Zhang-Sun, I. G. Fantus, J. B. Ng, D. A. Hall, and B. S. Lum. 1994. Peroxovanadium compounds: a new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. *J. Biol. Chem.* **269**:4596-4604.
220. Pulverer, B.J., J. M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki, and Woodgett, J.R.. 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**:670-674.
221. Qian, Z. and L. R. Drewes. 1990. A novel mechanism for acetylcholine to generate diacylglycerol in brain. *J. Biol. Chem.* **265**:3607-3610.
222. Rapp, U.R., M. D. Goldsborough, G. E. Mark, T. I. Bonner, J. Groffen, Jr. Reynolds, F.H., and J. R. Stephenson. 1983. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:4218-4222.
223. Ray, L.B. and T. W. Sturgill. 1988. Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* **263**:12721-12727.
224. Ray, L.B. and T. W. Sturgill. 1988. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:3753-3757.
225. Rayter, S.I., M. Woodrow, S. C. Lucas, D. A. Cantrell, and J. Downward. 1992. p21<sup>ras</sup> mediates control of IL-2 gene promoter function in T cell activation. *EMBO J.* **11**:4549-4556.

226. **Redondo, J.M., A. Lopez-Rivas, V. Vila, E. J. Cragoe, and M. Fresno.** 1988. The role of protein kinase C in T lymphocyte proliferation. Existence of protein kinase C-dependent and independent pathways. *J. Biol. Chem.* **263**:17467-17470.
227. **Reed, J.C., D. E. Sabath, R. G. Hooever, and M. B. Prystowsky.** 1985. Recombinant interleukin 2 regulates levels of c-myc mRNA in A cloned murine T lymphocyte . *Mol. Cell. Biol.* **5**:3361-3368.
228. **Reimann, T., D. Büscher, R. A. Hipskind, S. Krautwald, M. -L. Lohmann-Matthes, and M. Baccarini.** 1994. Lipopolysaccharide induces activation of the Raf-1/MAP kinase pathway: A putative role for Raf-1 in the induction of the IL-1b and the TNF-a genes. *J. Immunol.* **153**:5740-5749.
229. **Riedel, D., U. Brennscheidt, M. Kiehntopf, M. Brach, and F. Herrmann.** 1993. The mitogenic response of T cells to interleukin-2 requires Raf-1. *Eur. J Immunol* **23**:3146-3150.
230. **Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. Fry, M. D. Waterfield, and J. Downward.** 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase is a direct target of Ras. *Nature* **370**:527-532.
231. **Rohan, P.J., P. Davis, C. A. Moskaluk, M. Kearns, H. Krutzsch, U. Siebenlist, and K. Kelly.** 1993. PAC-1: A mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. *Science* **259**:1763-1766.
232. **Rosoff, P.M., N. Savage, and C. A. Dinarello.** 1988. Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism. *Cell* **54**:73-81.
233. **Rossomando, A.J., D. M. Payne, M. J. Weber, and T. W. Sturgill.** 1989. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:6940-6943.
234. **Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Lamazares, D. Zamanillo, T. Hunt, and A. R. Nebreda.** 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**:1027-1037.
235. **Rybin, V.O. and S. F. Steinberg.** 1994. Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart. *Circ. Res.* **74**:299-309.
236. **Ryves, W.J., A. T. Evans, A. R. Olivier, P. J. Parker, and F. J. Evans.** 1991. Activation of the PKC-isotypes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$  by phorbol esters of different biological activities. *FEBS Lett.* **288**:5-9.
237. **Saïdo, T.C., K. Mizuno, Y. Konno, S. Osada, S. Ohno, and K. Suzuki.** 1992. Purification and characterization of protein kinase C  $\epsilon$  from rabbit brain. *Biochemistry* **31**:482-490.
238. **Samuels, M.L., M. J. Weber, J. M. Bishop, and M. McMahon.** 1993. Conditional transformation of cells and rapid activation of the mitogen-activated protein kinase cascade by an estradiol-dependent human raf-1 protein kinase. *Mol Cell Biol* **13**:6241-6252.
239. **Sano, J.K., Y. Takai, J. Yamanishi, and Y. Nishizuka.** 1983. A role of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in human platelet activation . *J. Biol. Chem.* **258**:2010-2013.
240. **Sarcevic, B., E. Erikson, and J. L. Maller.** 1993. Purification and characterization of a mitogen-activated protein kinase tyrosine phosphatase from *Xenopus* eggs. *J Biol Chem.* **268**:25075-25083.
241. **Satoh, T., M. Nakafuku, A. Miyajima, and Y. Kaziro.** 1991. Involvement of ras in signal transduction pathways from interleukin-2, interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor, but not from interleukin-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:3314-3318.
242. **Schaap, D., J. Hsuan, N. Totty, and P. J. Parker.** 1990. Proteolytic activation of protein kinase C- $\epsilon$ . *Eur. J. Biochem.* **191**:431-435.
243. **Schaap, D. and P. J. Parker.** 1990. Expression, purification and characterization of protein kinase C- $\epsilon$ . *J. Biol. Chem.* **265**:7301-7307.

244. **Schanen-King, C., A. Nel, L. K. Williams, and G. Landreth.** 1991. Nerve growth factor stimulates the tyrosine phosphorylation of MAP2 kinase in PC12 cells. *Neuron* **6**:915-922.
245. **Schiemann, W.P. and N. M. Nathanson.** 1994. Involvement of protein kinase C during activation of the mitogen-activated protein kinase cascade by leukemia inhibitory factor. Evidence for participation of multiple signaling pathways. *J Biol Chem.* **269**:6376-6382.
246. **Schlessinger, J.** 1993. How receptor-tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem. Sci.* **18**:273-275.
247. **Schreiber, S.L. and G. R. Crabtree.** 1992. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* **13**:136-142.
248. **Secrist, J.P., L. Karnitz, and R. T. Abraham.** 1991. T-cell antigen receptor ligation induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-G1. *J. Biol. Chem.* **266**:12135-12139.
249. **Shearman, M.S., Z. Naor, K. Sekiguchi, A. Kishimoto, and Y. Nishizuka.** 1989. Selective activation of the  $\alpha$ -subspecies of protein kinase C from bovine cerebellum by arachidonic acid and its lipoxygenase metabolites. *FEBS Lett.* **243**:177-182.
250. **Sheng, M., M. A. Thompson, and M. E. Greenberg.** 1991. CREB: A  $Ca^{++}$  regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* **252**:1427-1430.
251. **Shibuya, E.K., T. G. Boulton, M. H. Cobb, and J. V. Ruderman.** 1992. Activation of p42 MAP kinase and the release of oocytes from cell cycle arrest. *EMBO J.* **11**:3963-3975.
252. **Siegel, J.N., C. H. June, H. Yamada, U. R. Rapp, and L. E. Samelson.** 1993. Rapid activation of c-Raf-1 after stimulation of the T-cell receptor or the muscarinic receptor type 1 in resting T cells. *J. Immunol.* **151**:4116-4127.
253. **Siegel, J.N., R. D. Klausner, U. R. Rapp, and L. E. Samelson.** 1990. T cell antigen receptor engagement stimulates c-raf phosphorylation and induces c-raf-associated kinase activity via a protein kinase C-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **265**:18472-18480.
254. **Smith, K.A.** 1988. Interleukin-2: Inception, impact and implications. *Science* **240**:1169-1176.
255. **Soderling, T.R.** 1990. Protein kinases. *J. Biol. Chem.* **265**:1823-1826.
256. **Sontag, E., S. Fedorov, C. Kamibayashi, D. Robbins, M. Cobb, and M. Mumby.** 1993. The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* **75**:887-897.
257. **Standaert, M.L., D. R. Cooper, H. Hernandez, T. P. Arnold, and R. V. Farese.** 1993. Differential down-regulation of insulin sensitive protein kinase-C isoforms by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in Raf adipocytes and BC3H-1 myocytes. *Endocrinology* **132**:689-692.
258. **Stern, J.B. and K. A. Smith.** 1986. Interleukin-2 induction of T-cell G<sub>1</sub> progression and c-myc expression. *Science* **233**:203-206.
259. **Stokoe, D., D. G. Campbell, S. Nakielny, H. Hidaka, S. J. Leervers, C. Marshall, and P. Cohen.** 1992. MAPKAP kinase-2: A novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *EMBO J.* **11**:3985-3994.
260. **Stokoe, D., K. Engel, D. G. Campbell, P. Cohen, and M. Goestel.** 1992. Identification of MAPKAP Kinase-2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* **313**:307-313.
261. **Su, B., E. Jacinto, M. Hibi, T. Kallunki, M. Karin, and Y. Ben-Neriah.** 1994. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* **77**:727-736.
262. **Sun, H., C. H. Charles, L. F. Lau, and N. K. Tonks.** 1993. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* **75**:487-493.

263. Sun, H. and N. K. Tonks. 1994. The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* **19**:480-485.
264. Szamel, M., B. Rehmann, B. Krebs, R. Kurre, and K. Resch. 1989. Activation signals in human lymphocytes. Incorporation of polyunsaturated fatty acids into plasma membrane phospholipids regulates IL-2 synthesis via sustained activation of protein kinase C. *J Immunol* **143**:2806-2813.
265. Takai, Y., A. Kishimoto, Y. Iwasa, Y. Kawahara, T. Mori, and Y. Nishizuka. 1979. . *J Biol Chem.* **254**:3692-3695.
266. Tamemoto, H., T. Kadowaki, K. Tobe, K. Ueki, T. Izumi, Y. Chatani, M. Kohno, M. Kasuga, Y. Yazaki, and Y. Akanuma. 1992. Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **267**:20293-20297.
267. Taniguchi, T. 1995. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* **268**:251-260.
268. Taylor, S.S., J. A. Buechler, and W. Yonemoto. 1990. . *Annu. Rev. Biochem.* **59**:971-1005.
269. Thomas, S.M., M. DeMarco, G. D'Arcangelo, S. Halegoua, and J. S. Brugge. 1992. Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell* **68**:1031-1040.
270. Tornkvist, A., S. Parpal, J. Gustavsson, and P. Stralfors. 1994. Inhibition of Raf-1 kinase expression abolishes insulin stimulation of DNA synthesis in H4IIE hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **269**:13919-13921.
271. Toullec, D., P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier, F. Loriolle, and et-al. 1991. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**:15771-15781.
272. Treisman, R. 1992. The serum response element. *Trends Biochem. Sci.* **17**:423-426.
273. Treisman, R. 1994. Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Curr Opin Genet. Dev.* **4**:96-101.
274. Truneh, A., F. Albert, P. Golstein, and A. -M. Schmitt-Verhulst. 1985. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature* **313**:318-320.
275. Tsuda, L., Y. Inoue, M. -A. You, M. Mizuno, M. Hata, Y. Lim, T. Adachi-Yamada, H. Ryo, Y. Masamune, and Y. Nishida. 1993. A protein kinase similar to MAP kinase activator acts downstream of the Raf kinase in *Drosophila*. *Cell* **72**:407-414.
276. Tsutsumi, A., M. Kubo, H. Fujii, J. Freire-Moar, C. W. Turck, and J. T. Ransom. 1993. Regulation of protein kinase C isoform proteins in phorbol ester-stimulated Jurkat T lymphoma cells. *J Immunol* **150**:1746-1754.
277. Turner, B., U. Rapp, H. App, M. Greene, K. Dobashi, and J. Reed. 1991. Interleukin 2 induces tyrosine phosphorylation and activation of p72-74 Raf-1 kinase in a T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **88**:1227-1231.
278. Valge, V.E., J. G. P. Wong, B. M. Datlof, A. J. Sinskey, and A. Rao. 1988. Protein kinase C is required for responses to T cell receptor ligands but not to interleukin-2 in T cells. *Cell* **55**:102-112.
279. Valverde, A.M., J. Sinnott-Smith, J. Van-Lint, and E. Rozengurt. 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 U. S. A.* **91**:8572-8576.
280. Van Aelst, L., M. Barr, S. Marcus, P. Polverino, and M. Wigler. 1993. Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6213-6217.

281. Ward, Y., S. Gupta, P. Jensen, M. Wartmann, R. J. Davis, and K. Kelly. 1994. Control of MAP kinase activation by the mitogen-induced threonine/tyrosine phosphatase PAC1. *Nature* **367**:651-654.
282. Waxham, M.N. and J. Aronowski. 1993. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II is phosphorylated by protein kinase C in vitro. *Biochemistry* **32**:2923-2930.
283. Ways, D.K., P. P. Cook, C. Webster, and P. J. Parker. 1992. Effect of phorbol esters on protein kinase C-z. *J Biol Chem.* **267**:4799-4805.
284. Weiss, A., J. Imboden, D. Shoback, and J. Stobo. 1984. Role of T3 surface molecules in human T-cell activation: T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:4169-4173.
285. Weiss, A. and J. B. Imboden. 1987. Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. *Adv. Immunol* **41**:1-38.
286. Weiss, A., G. Koretzky, R. Schatzman, and T. Kadlecsek. 1991. Stimulation of the T cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-G1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:5484-5488.
287. Weiss, A. and D. R. Littman. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**:263-274.
288. Weiss, B.A. and P. A. Insel. 1991. Intracellular Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C interact to regulate  $\alpha_1$ -adrenergic and bradykinin receptor-stimulated phospholipase A<sub>2</sub> activation in madin-darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* **266**:2126-2133.
289. Weiss, M.J., J. F. Daley, J. C. Hodgdon, and E. L. Reinherz. 1984. Calcium dependency of antigen-specific (T3-Ti) and alternative (T11) pathways of human T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:6836-6840.
290. Wickremasinghe, R.G., A. R. Mire-Sluis, and A. V. Hoffbrand. 1987. Interleukin-2 binding to activated human T lymphocytes triggers generation of cyclic AMP but not of inositol phosphates. *FEBS Lett.* **220**:52.
291. Wilkinson, S.E. and T. J. Hallam. 1994. Protein kinase C: Is its pivotal role in cellular activation over-stated? *Trends Pharmacol. Sci* **15**:53-57.
292. Williams, N.G., T. M. Roberts, and P. Li. 1992. Both p21<sup>ras</sup> and pp60<sup>v-src</sup> are required, but neither alone is sufficient, to activate the Raf-1 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:2922-2926.
293. Woodrow, M.A., S. Rayter, J. Downward, and D. A. Cantrell. 1993. p21<sup>ras</sup> function is important for T cell antigen receptor and protein kinase C regulation of nuclear factor of activated T cells. *J. Immunol.* **150**:3853-3861.
294. Wooten, M.W., M. L. Seibenhener, Y. Soh, S. J. Ewald, K. R. White, E. D. Lloyd, A. Olivier, and P. J. Parker. 1992. Characterization and differential expression of protein kinase C isoforms in PC12 cells. Differentiation parallels an increase in PKC beta II. *FEBS Lett.* **298**:74-78.
295. Wu, J., P. Dent, T. Jelinek, A. Wolfman, M. J. Weber, and T. W. Sturgill. 1993. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3,5-monophosphate. *Science* **262**:1065-1069.
296. Wu, J., L. F. Lau, and T. W. Sturgill. 1994. Rapid deactivation of MAP kinase in PC12 cells occurs independently of induction of phosphatase MKP-1. *FEBS Lett.* **353**:9-12.
297. Xu, H., S. G. Fan, and C. M. Lee. 1989. The protein kinase C inhibitor H-7 inhibits concanavalin A induced T-lymphocyte activation. *Gen. Pharmacol.* **20**:585-588.
298. Xu, J., S. Rockow, S. Kim, W. Xiong, and W. Li. 1994. Interferons block protein kinase C-dependent but not -independent activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinases and mitogenesis in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**:8018-8027.

- 
299. **Zhang, F., A. Strand, D. Robbins, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith.** 1994. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3Å resolution. *Nature* **367**:704-711.
300. **Zheng, C. and K. Guan.** 1993. Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J. Biol. Chem.* **268**:11435-11439.
301. **Zheng, C.-F. and K. -L. Guan.** 1994. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J.* **13**:1123-1131.
302. **Zmuidzinas, A., H. J. Mamon, T. M. Roberts, and K. A. Smith.** 1991. Interleukin-2-triggered Raf-1 expression, phosphorylation, and associated kinase activity increase through G1 and S in CD3-stimulated primary human T cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**:2794-2803.