

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

Departamento de Fisiología



**UNA APROXIMACIÓN AL ESTUDIO
DE LA VÍA DE LAS TIROSINAS
CINASAS EN ACINOS PANCREÁTICOS
DE RATA EN RESPUESTA A CCK**

Tesis Doctoral
presentada para optar
al grado de Doctor en Veterinaria por

D. JOSÉ A. TAPIA GARCÍA

Cáceres, junio de 2000

Edita: Universidad de Extremadura

Servicio de Publicaciones

c/ Pizarro, 8

Cáceres 10071

Correo e.: publicac@unex.es

<http://www.pcid.es/public.htm>



FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

Campus Universitario
Avenida de la Universidad, s/n
10071 – CÁ CERES

Teléfono: (927) 25 71 06 Ext. 155
Fax: (927) 25 71 54

D. LUIS JESÚS GARCÍA MARÍN, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Titular de Fisiología en la Facultad de Veterinaria de Cáceres.

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral elaborada por D. José Antonio Tapia García con el título “UNA APROXIMACIÓN AL ESTUDIO DE LA VÍA DE LAS TIROSINAS CINASAS EN ACINOS PANCREÁTICOS DE RATA EN RESPUESTA A CCK”, ha sido realizada bajo mi dirección en los laboratorios del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres. Hallándose concluida y reuniendo a mi entender las condiciones necesarias, autorizo su presentación a fin de que pueda ser defendida públicamente ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste expido y firmo el presente certificado en Cáceres a 20 de junio de 2000.

D. Luis Jesús García Marín

Este Trabajo ha sido realizado con cargo al Proyecto de Investigación subvencionado por la DGICYT (PB97-0370) y con la ayuda de una beca para Formación de Investigadores del Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco.

Los resultados contenidos en esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

J.A. Tapia, H.A. Ferris, R.T. Jensen y L.J. Garcia (1999). Cholecystokinin activates PYK2/CAK β by a phospholipase C-dependent mechanism and its association with the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry*, **267**:31261-31271

J.A. Tapia, H.A. Ferris, R.T. Jensen, L.J. García (1998). CCK causes tyrosine-phosphorylation of PYK2/CAK β in pancreatic acinar cells by both calcium-dependent and -independent pathways. *Journal of Physiology*, **509**:11P.

J.A. Tapia, R.T. Jensen, L.J. García (1999). Stimulation of translocation and tyrosine-phosphorylation [Tyr-Phos] of PKCdelta in rat pancreatic acinar cells by CCK. *Gastroenterology*, **116**:G2831.

L.J. García, H.A. Ferris, J.A. Tapia, R.T. Jensen (1999). A role for PYK2 in linking CCKA receptors with MAPK signalling pathway activation in rat pancreatic acini. *Gastroenterology*, **116**:G4885.

J.A. Tapia, A.G. Andreolotti, L.J. García, R.T. Jensen (2000). Is CCK-mediated PKCdelta tyrosine phosphorylation or translocation necessary for its activation in pancreatic acini? *Gastroenterology*, **118**:G639.

Por otra parte, están en fase de preparación de dos nuevos manuscritos con los resultados referentes a la PKC- δ .

Asimismo, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han realizado las siguientes estancias de investigación:

Estancia de tres meses en el laboratorio del Dr. Robert T. Jensen. Digestion Diseases Branch, NIDDK, NIH. Bethesda, MD (USA). Septiembre-diciembre 1998.

Segunda estancia de tres meses en el laboratorio del Dr. Robert T. Jensen. Digestion Diseases Branch, NIDDK, NIH. Bethesda, MD (USA). Mayo-julio 1999.

Deseo expresar un profundo y sincero agradecimiento a estas personas e instituciones:

– A mi director de Tesis, Dr. Luis Jesús García Marín, por prestarme todo su apoyo y su ayuda, y por sus enseñanzas siempre útiles.

– Al Dr. Ginés M. Salido Ruiz, por la posibilidad que me dio para realizar esta Tesis Doctoral y por la confianza y ayuda dispensadas.

– Al Dr. José Antonio Pariente Llanos, al Dr. Pedro Camello Almaraz, a la Dra. María José Pozo Andrada que me han ayudado, alentado y aconsejado en todo momento. A María Mercedes Gómez Blázquez (un mar de serenidad), con cuya colaboración conté siempre.

– A todas las personas que integran el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria, con cuya colaboración conté en todo momento, en especial a Belén Ramos, de quien he recibido ayuda, comprensión y amistad. También a Cristina Camello Almaraz, que me ayudó con la presentación de esta Tesis Doctoral, y a Alberto García Andreolotti, que colaboró con la bibliografía y, por supuesto, a Antonio González, Ana Lajas, Soledad Alcón, Sara Morales y Juan Antonio Rosado.

– A la unidad de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, en cuyas instalaciones se ha elaborado parte de esta Tesis, y a los amigos que allí tengo, en especial Ara y Alfonso.

– A la Facultad de Veterinaria de Cáceres de la Universidad de Extremadura, por poner a mi disposición las instalaciones y medios necesarios para la realización de esta Tesis Doctoral, especialmente a las unidades de Farmacología y Genética.

– A mi madre y a mis hermanos, con los que siempre puedo contar.

– Y especialmente a Concha, que tuvo paciencia y me alentó y ayudó en todo momento.

A todos ellos, muchas gracias.

A mis padres.

A Concha.

Abreviaturas

β 2 AR: receptores adrenérgicos β 2.

α 2A AR: receptores adrenérgicos α 2A

[Ca²⁺]_i: concentración intracelular del ion calcio.

8-Br-AMPC: 8-bromo adenosina-3',5'-monofosfato cíclico.

Aa o **aa:** aminoácido(s). Para denominar a los diferentes aminoácidos se ha utilizado el código internacional de tres letras, algunos de los nombrados han sido:

Arg: arginina.

Asn: asparragina.

Asp: ácido aspártico.

Glu: ácido glutámico (ó glutamina).

Gly: glicina.

Ile: isoleucina.

Lys: lisina.

Pro: prolina.

Ser: serina.

Thr: treonina.

Tyr: tirosina.

Xaa: cualquier aminoácido (en una secuencia peptídica).

AA: ácido araquidónico.

ABD: dominio de unión de actina

Abl: proteína de la leucemia de Abelson.

AC: adenilato ciclasa (ó adenilil ciclasa).

Ac: anticuerpo.

ACh: acetilcolina.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia (sintetizado por transcripción inversa a partir del ácido ribonucleico mensajero de determinados genes).

ADN-PK: proteína cinasa dependiente de ADN.

ADP: adenosina-5'-difosfato.

AFAP110: proteína de 110 kDa asociada con filamentos de actina.

AGL: ácidos grasos libres.

Akt/PKB: proteína cinasa B.

ALL: leucemia linfoblástica aguda.

AMP: adenosina-5'-(mono)fosfato (también ácido adenílico, ó adenilato).

AMPC: adenosina-3',5'-monofosfato cíclico.

ANOVA: análisis de la varianza.

aPKCs: proteínas cinasas C del grupo atípicas (véase PKC).

APS: persulfato amónico.

ARF: factor de ADP-ribosilación.

ARF-GAP: proteína estimuladora de la actividad GTPasa del factor de ADP-ribosilación (ARF).

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ASK1: cinasa 1 regulada por señales de apoptosis.

AT1: receptores tipo 1 de la angiotensina II.

ATM: proteína ataxia-telangiectasia.

ATP: adenosina-5'-trifosfato.

BD: dominio de unión.

bFGF: fragmento básico del factor de crecimiento de los fibroblastos.

BSA: albúmina sérica bovina.

CaM: Ca²⁺-calmodulina.

CCh: carbacol.

CCK: colecistocinina.

CCK-8: colecistocinina octapéptido.

CCK_A: receptor tipo A para la CCK.

CCK_B: receptor tipo B para la CCK y la gastrina.

CCK-JMV: véase *JMV-180*.

Cdc2: véase *CDK2*.

CDK2, o Cdc2: cinasa dependiente de ciclina 2.

CICR: liberación de calcio inducida por calcio.

CIF: factor de inducción de la entrada capacitativa de calcio.

cPKCs: proteínas cinasas C del grupo clásicas (véase *PKC*).

cPLA₂: fosfolipasas A₂ citosólicas.

cpm: cuentas por minuto.

CRAC: canal de entrada de Ca²⁺ activado por liberación de Ca²⁺.

CSF: factor estimulante de colonias.

CSF-R: receptor para el factor estimulante de colonias.

Csk: cinasa C-terminal de Src.

C-terminal, ó COOH-terminal: el extremo carboxilo terminal de la secuencia peptídica de una proteína.

DAG: 1,2-diacilglicerol.

DAK: diacilglicerol cinasa.

DMSO: dimetilsulfóxido.

DSP: fosfatasa de especificidad dual.
DTT: ditioneitol.
EC₅₀: concentración eficaz 50.
ECM: matriz extracelular.
EDTA: ácido etilén diamino tetraacético.
eEF-1 α : factor de elongación 1- α de eucariotas.
EEM: error estándar de la media.
EGF: factor de crecimiento epidermal.
EGF-R: receptor del factor de crecimiento epidermal.
EGTA: ácido etilén glicol-bis(β -aminoetiléter)N,N,N',N'-tetraacético.
EM: efecto máximo.
eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial.
ER: retículo endoplásmico.
ERK: cinasa regulada por señales extracelulares.
FAK: tirosina cinasa de adhesión focal.
Fc: fragmento constante de las inmunoglobulinas.
FGF: factor de crecimiento de los fibroblastos.
FGF-R: receptor del factor de crecimiento de fibroblastos.
FI: fosfolípidos de inositol o fosfatidilinositoles.
FRNK: proteína no cinasa relacionada con FAK.
FTasa: farnesil transferasa.
GAP: proteína activadora de GTPasas.
GDP: guanosina-5'-difosfato.
GDS: estimulador de la disociación de nucleótidos de guanina.
GEF: factor intercambiador de nucleótidos de guanina (intercambiador GDP/GTP), también denominado GRF o GDS.
GGTasa: geranil-geranil transferasa.
GH: hormona de crecimiento.
GHR: receptor de la hormona de crecimiento.
GHRH: factor hipotalámico de liberación de la hormona del crecimiento.
GMP: guanosina-5'-(mono)fosfato (ácido guanílico, ó guanilato).
GMPc: guanosina-3',5'-monofosfato cíclico.
GMRP: proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina.
GPCR: receptor acoplado a proteínas G.
Grb2: proteína 2 unida a receptor de factores de crecimiento.

GRD: dominio relacionado con GAP, presente en todas las proteínas activadoras de GTPasas.

GRF: factor liberador de nucleótidos de guanina.

GRK: cinasas de receptores acoplados a proteínas G.

GRK2: cinasa 2 de los receptores acoplados a proteínas G.

GRP: péptido liberador de gastrina.

GSK-3: glicógeno-sintasa cinasa-3.

GTP: guanosina-5'-trifosfato.

HOG1: proteína 1 que responde a la osmolaridad alta por glicerol (identificada en *Saccharomyces cerevisiae*. La p38MAPK es la homóloga en mamíferos).

HSP25/27: proteína 25/27 de choque térmico.

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina.

I_{CRAC}: corriente de entrada de Ca²⁺ activada por liberación de Ca²⁺.

IGF-1: factor de crecimiento-1 similar a la insulina.

IGF-1-R: receptor del factor de crecimiento similar a la insulina.

IgG: inmunoglobulina G.

InsP: inositol fosfato o fosfato de inositol (usada como referencia genérica de los fosfatos de inositol).

InsP_T: inositoles fosfato totales.

Ins(1)P: inositol 1-fosfato.

Ins(3)P: inositol 3-fosfato.

Ins(4)P: inositol 4-fosfato.

Ins(1,4)P₂: inositol 1,4-difosfato.

Ins(1,3)P₂: inositol 1,3-difosfato.

Ins(3,4)P₂: inositol 3,4-difosfato.

Ins(1,3,4)P₃: inositol 1,3,4-trifosfato

Ins(1,4,5)P₃, ó *InsP₃*, ó *IP₃*: inositol 1,4,5-trifosfato

Ins(1,3,4,5)P₄: inositol 1,3,4,5-tetrafosfato.

Insulina-R: receptor de la insulina.

IR: proteína relacionada con la insulina.

IR-R: receptor de la proteína relacionada con la insulina.

IRS-1: sustrato 1 del receptor de la insulina.

IRS-2: sustrato 2 del receptor de la insulina.

JMV-180, o **CCK-JMV**: Boc-Tyr(SO₃H)-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-2-feniletil éster.

JNK: cinasa Jun N-terminal (también denominadas SAPK).

JNKK: cinasa de las cinasas Jun amino-terminal.

K_d: constante de disociación.

LPA: ácido lisofosfatídico.

MAPK: proteínas cinasas activadas por la mitogénesis o por mitógenos.

MAPKAP cinasa: proteína cinasa activada por las proteínas cinasas activadas por mitógenos.

MAPKK: cinasas que activan las MAPKs.

MAPKKK: cinasas de las cinasas que activan las MAPKs.

MARCK: proteína miristilada rica en alanina sustrato de la cinasa C.

MBP: proteína básica de mielina.

MCL: leucemia mielógena crónica

MEK: MAPK/ERK cinasa.

MEKK: MAPK/ERK cinasa cinasa.

min: minuto(s).

MKK: MAPK cinasa.

MLCK: cinasa de la cadena ligera de miosina.

MLK3: cinasa 3 de linaje mixto, también denominada SPRK.

NGF: factor de crecimiento de nervios.

NGF-R: receptor del factor de crecimiento de nervios.

NMB: neuromedina B.

NMT: N-miristil transferasa.

NO: óxido nítrico.

NOS: óxido nítrico sintasa.

nPKCs: proteínas cinasas C del grupo novel o nuevas (*véase PKC*).

N-terminal, ó NH₂-terminal: el extremo amino terminal de la secuencia peptídica de una proteína.

OA: ácido okadaico.

p120^{CAS}: proteína de 120 kDa asociada con cadherinas sustrato de Src (CAS = *cadherin-associated Src substrate*).

p120^{Ras-GAP}, o Ras-GAP: proteína inductora de la actividad GTPasa de Ras.

p125^{FAK}: *véase FAK*.

p130^{CAS}: proteína de 130 kDa sustrato de tirosinas cinasas asociado con Crk (CAS = *Crk-associated substrate*; o *Crk-associated tyrosine kinase substrate*).

p164^{Rho-K}: *véase ROK*.

p190^{Rho-GAP}, o Rho-GAP: proteína inductora de la actividad GTPasa de Rho.

p38MAPK, o p38/HOG1: proteína cinasa de 38 kDa activada por mitógenos.

PACAP: polipéptido de pituitaria activador de la adenilato ciclasa.

PAK: cinasa activada por la p21.

PBS: tampón fosfato salino.

PBS1 y 2: lugares de unión con la paxilina 1 y 2 (secuencias localizadas en la región FAT de la tirosina cinasa de adhesión focal).

PDBu: forbol dibutirato.

PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

PDGF-R: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PDK1: proteína cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítidos.

PH: dominio con homología *pleckstrina*.

PHI: péptido histidina-isoleucina.

PI(4)P5-K, ó PtdIns(4)P 5-cinasa: fosfatidilinositol 4-fosfato 5-cinasa.

PI: fosfoinosítidos (fosfatidilinositoles).

PtdIns: fosfatidilinositol.

PtdIns(3)P, ó PI(3)P: fosfatidilinositol 3-fosfato.

PtdIns(4)P, ó PI(4)P, ó PIP: fosfatidilinositol 4-fosfato.

PtdIns(3,4)P₂, ó PI(3,4)P₂: fosfatidilinositol 3,4-difosfato.

PtdIns(4,5)P₂, ó PI(4,5)P₂, ó PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-difosfato.

PtdIns(3,4,5)P₃, ó PI(3,4,5)P₃, ó PIP₃: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.

PtdSer, o PS: fosfatidil serina

PtdCho: fosfatidil colina

PtdOH: ácido fosfatídico (fosfatidato).

PI3-K, o PtdIns 3-cinasa: fosfatidilinositol 3-cinasa.

PI4-K, o PtdIns 4-cinasa: fosfatidilinositol 4-cinasa.

PKA: proteína cinasa A.

PKC: proteína cinasa C.

cPKCs: proteínas cinasas C del grupo clásicas.

PKC- α : isoforma *alfa* de la proteína cinasa C

PKC- β I y II: isoformas *beta* I y *beta* II de la proteína cinasa C

PKC- γ : isoforma *gamma* de la proteína cinasa C

nPKCs: proteínas cinasas C del grupo novel o nuevas.

PKC- δ : isoforma *delta* de la proteína cinasa C.

PKC- ϵ : isoforma *epsilon* de la proteína cinasa C.

PKC- η : isoforma *eta* de la proteína cinasa C.

PKC- θ : isoforma *theta* de la proteína cinasa C.

PKC- μ : isoforma *micro (mu)* de la proteína cinasa C.

aPKCs: proteínas cinasas C del grupo atípicas.

PKC- λ : isoforma *lambda* de la proteína cinasa C.

PKC- ι : isoforma *iota* de la proteína cinasa C.

PKC- ζ : isoforma *zeta* de la proteína cinasa C.

PKI: inhibidor de proteínas cinasas.

PKN, o **PRK 1**: proteína cinasa N.

PLA₂: fosfolipasa A₂.

PLC: fosfolipasa C.

PLD: fosfolipasa D.

PMA: véase *TPA*.

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PP: polipéptido pancreático.

ppp: puntos por pulgada.

pRb: proteína de retinoblastoma.

PRK 1: véase *PKN*.

PSP: proteína serina/treonina fosfatasa.

PTB: dominio de unión con fosfotirosina.

PtdCho: véase *PI*.

PtdIns: véase *PI*.

PtdOH: véase *PI*.

PtdSer: véase *PI*.

PTK: proteína tirosina cinasa.

PTP: proteína tirosina fosfatasa.

PYK2/CAK β : tirosina cinasa 2 rica en prolina (PYK2) y cinasa β de adhesión celular (CAK β).

RAC: véase *Akt/PKB*.

RACK: receptor para PKC activada.

RICK: receptor para PKC inactiva.

ROK, o **p164^{Rho-K}**: proteína cinasa asociada a Rho.

RPTK: receptor con actividad tirosina cinasa intrínseca.

RPTP α : receptor proteína tirosina fosfatasa α .

RSV: virus del sarcoma de Rous.

SAPK: proteínas cinasas activadas por estrés (también denominadas JNKs).

SAPKK: cinasa de las proteínas cinasas activadas por estrés

SDS: lauril sulfato sódico.

seg: segundo(s).

SEK1: SAPK/ERK cinasa 1.

SH1: dominios con homología Src 1. Suele utilizarse para hacer referencia al dominio catalítico de las tirosinas cinasas.

SH2: dominios con homología Src 2.

SH3: dominios con homología Src 3.

Shc: dominio con homología Src y colágeno.

SHPTP, o **SHP**: proteína tirosina fosfatasa no receptor que contiene dominios SH2.

SNC: sistema nervioso central.

SOS: hijo de los “sin siete” (*son of sevenless*).

sPLA₂: fosfolipasas A₂ secretoras.

SPRK: cinasa rica en prolina que contiene un dominio SH3 (*Src homology 3 domain containing proline-rich kinase*). También denominada MLK3.

STAT: transductor de señales y activador de la transcripción.

TGF: factor de crecimiento transformante.

TNF: factor de necrosis de tumores.

TPA, ó **PMA**: 13, acetato de 12, O-tetradecanoil forbol.

VCAM: moléculas de adhesión a las células vasculares.

VII: virus de la inmunodeficiencia humana.

VIP: péptido intestinal vasoactivo.

Índices

I. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR.....	1
1. Vías clásicas de señalización intracelular	3
1.1. Proteínas G heterotriméricas	4
1.2. Fosfolipasa C	6
1.2.1. Isoenzimas y mecanismos de activación de la PLC	7
1.2.2. Metabolismo de los fosfoinosítidos y de los inositoles fosfato .	9
1.2.3. Ins(1,4,5)P ₃ y movilización de Ca ²⁺	11
1.2.4. Ion calcio y activación de la calmodulina	17
1.2.5. DAG y activación de la PKC	18
1.3. Fosfolipasa D	19
1.4. Fosfolipasa A ₂	21
1.5. Adenilato ciclasa	24
1.5.1. El AMP cíclico.....	25
1.5.2. Proteína cinasa A	26
2. Vía de las proteínas cinasas	28
Fosforilación de proteínas	28
Otras modificaciones de proteínas	30
Las proteínas cinasas.....	31
Las tirosinas cinasas	33
2.1. Tirosinas cinasas no receptor	36
2.1.1. Tirosinas cinasas de la familia Src	36
Estructura funcional de Src	39
Activación de las PTKs de la familia Src	41
Importancia funcional de los dominios SH.....	44
Sustratos de las tirosinas cinasas de la familia Src.....	45
Funciones biológicas de las tirosinas cinasas Src.....	46
2.1.2. Tirosinas cinasas de la familia FAK.....	53
2.2. Receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca.....	54
2.2.1. Características generales	54
2.2.2. Receptores para factores de crecimiento en acinos pancreáticos	56
2.3. Otras proteínas relacionadas con las vías de señalización de las tirosinas cinasas.....	59
2.3.1. Proteínas adaptadoras y proteínas de anclaje	59
Dominios estructurales de proteínas	60
Características estructurales y funcionales de algunas proteínas adaptadoras.....	62

Índice general

2.3.2. Fosfatidilinositol 3-cinasa.....	65
2.3.3. Proteínas G monoméricas.....	67
GTPasas de la familia Ras.....	68
GTPasas de la familia Rho.....	72
2.4. Serina/treonina cinasas: las proteínas cinasas activadas por mitógenos.....	76
2.4.1. Cascada de señalización de las MAP cinasas reguladas por señales extracelulares.....	79
MAPKKs de la cascada ERK: isoformas de Raf.....	79
MAPKKs de la cascada ERK: las MEKs.....	82
MAP cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs)83	
2.4.2. Cascadas de señalización de JNK/SAPK y p38MAPK.....	85
MAPKKs de las vías de estrés: las MEKs.....	85
Regulación de las cinasas MEKK por proteínas G monoméricas y por las cinasas activadas por las proteínas p21 (PAKs).....	86
MAPKKs de las vías de estrés: las MKKs o SAPKKs.....	87
SAPK: cinasas de estrés.....	88
2.4.3. Funciones de las MAP cinasas en las células de mamíferos	89
Proliferación y diferenciación.....	89
Estrés y apoptosis.....	90
2.4.4. Interregulación e integración de señales en las vías MAPK..	91
2.5. Proteínas fosfatasa.....	93
Proteínas serina/treonina fosfatasa.....	93
Proteínas tirosina fosfatasa.....	94
2.6. Activación de la vía de las tirosinas cinasas por receptores con actividad enzimática.....	96
2.7. Activación de la vía de las tirosinas cinasas por receptores sin actividad enzimática.....	99
2.8. Fosforilación en tirosina y receptores acoplados a proteínas G de membrana.....	101
2.8.1. Transactivación de receptores con actividad tirosina cinasa	102
2.8.2. Señalización a través de complejos de adhesión focal.....	104
2.8.3. Fosforilación del receptor acoplado a proteína G y formación de complejos con arrestinas: los GPCRs como plataforma de señalización.....	106
3. Receptor CCK_A y fosforilación en tirosina en acinos pancreáticos	109
3.1. La colecistocinina.....	109
3.2. Receptores de la CCK.....	110
3.3. Fosforilación en tirosina tras la ocupación del receptor CCK _A	113

II. MATERIALES Y MÉTODOS	117
1. Metodología general	119
1.1. Lista de reactivos y soluciones.....	119
1.2. Animales	123
1.3. Método de aislamiento de acinos pancreáticos.....	123
1.4. Estimación de la viabilidad celular	126
2. Determinación de la concentración intracelular de calcio.....	127
2.1. Carga con el indicador	128
2.2. Cuantificación de la fluorescencia en suspensiones celulares: espectrofluorimetría	129
2.3. Cuantificación de la fluorescencia y de la $[Ca^{2+}]_i$	130
3. Western blotting	132
3.1. Obtención de lisados celulares	133
3.1.1. Lisados celulares totales	133
3.1.2. Fracciones subcelulares	135
Obtención de la fracción nuclear	136
Obtención de las fracciones de membrana y citosólica...	137
3.2. Inmunoprecipitación y coinmunoprecipitación.....	138
3.2.1. Inmunoprecipitación para estudios de fosforilación	141
Inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en tirosina	141
Inmunoprecipitación de la PKC- δ	142
3.2.2. Estudios de coinmunoprecipitación	143
3.2.3. Otras inmunoprecipitaciones	144
3.3. Electroforesis y electrotransferencia	145
3.3.1. Preparación de las muestras	145
3.3.2. Electroforesis.....	147
3.3.3. Electrotransferencia.....	148
3.4. "Inmunoblotting" de proteínas	149
3.4.1. Bloqueo de la membrana.....	150
3.4.2. Anticuerpo primario	150
Detección e identificación de proteínas	150
Estudios de fosforilación.....	151
Estudios de coinmunoprecipitación	152
Estudios de translocación.....	153
3.4.3. Anticuerpo secundario.....	153
3.5. Detección y cuantificación de la señal	155
3.6. "Stripping"	156

4. Cuantificación de la actividad tirosina cinasa y serina/treonina cinasa.....	157
4.1. Lisado de las células.....	157
4.1.1. Lisados celulares totales	157
4.1.2. Fracciones subcelulares.....	158
4.2. Inmunoprecipitación	160
4.2.1. Inmunoprecipitación de la PYK2/CAK β	160
4.2.2. Inmunoprecipitación de la PKC- δ y de la PKC- α	161
4.3. Reacciones cinasa	162
4.3.1. Ensayo de la actividad cinasa de PYK2/CAK β	162
4.3.2. Ensayo de la actividad cinasa de la PKC	164
4.4. Electroforesis y secado de geles.....	166
4.5. Detección y cuantificación de la señal	168
5. Estadística.....	169
III. TIROSINAS CINASAS DE ADHESIÓN FOCAL: PYK2/CAKβ	171
1. Introducción	173
1.1. El citoesqueleto.....	173
1.1.1. Estructura del citoesqueleto	173
Filamentos de actina	173
Microtúbulos	175
Filamentos intermedios	176
1.1.2. El citoesqueleto de los acinos pancreáticos.....	177
1.1.3. Funciones básicas del citoesqueleto	178
1.2. Las placas de adhesión focal.....	181
1.3. Regulación de la formación de las placas de adhesión focal y las fibras de tensión de actina	186
1.4. Tirosinas cinasas de adhesión focal: FAK y PYK2/CAK β	188
1.4.1. Distribución y características estructurales de FAK y PYK2/CAK β	189
1.4.2. Regulación de la actividad de las tirosinas cinasas FAK y PYK2/CAK β	196
Regulación por las integrinas	196
Regulación por FRNK.....	198
Regulación mediante otros receptores de membrana y convergencia de diferentes rutas intracelulares	198
Integridad del citoesqueleto, actividad de Rho y fosforilación de las cinasas de adhesión focal.....	204
Regulación por la familia de tirosinas cinasas de la familia Src.....	205

1.4.3. Sustratos y proteínas con las que están relacionadas	
PYK2/CAK β y FAK	207
Paxilina	207
La p130 ^{CAS}	209
1.4.4. Funciones biológicas de las tirosinas cinasas de adhesión focal	
.....	210
2. Objetivos	214
3. Resultados	215
3.1. Activación del receptor CCK _A y fosforilación en residuos de tirosina y actividad de la PYK2/CAK β en acinos pancreáticos	215
3.2. Mecanismos intracelulares que median la fosforilación en residuos de tirosina de la PYK2/CAK β en acinos pancreáticos.....	221
3.3. Localización subcelular de las tirosinas cinasas de adhesión focal en respuesta a CCK en acinos pancreáticos	230
3.4. Acercamiento a la posible función de la tirosina cinasa PYK2/CAK β en acinos pancreáticos	232
4. Discusión.....	234
IV. FAMILIA DE LAS PROTEÍNAS CINASAS C: PKC-δ	245
1. Introducción	247
1.1. La familia de las proteínas cinasas C.....	247
1.1.1. Clasificación de las PKCs.....	248
1.1.2. Estructura de las PKCs.....	248
1.1.3. Variación del contenido en isoenzima en función del tejido.	250
1.1.4. Activación de la PKC mediante modificaciones post-translacionales.....	253
1.1.5. Activación de la proteína cinasa C por agonistas	255
1.1.6. Activación constitutiva y degradación proteolítica de la PKC.....	259
1.1.7. Down-regulation	259
1.1.8. Proteínas de anclaje de las PKC	261
1.2. La proteína cinasa C- δ	264
1.2.1. Estructura de la PKC- δ	264
1.2.2. Purificación y caracterización de la PKC- δ	265
1.2.3. Fosforilaciones de la PKC- δ	267
Fosforilación en residuos de tirosina	269
1.2.4. Funciones biológicas de la PKC- δ	270
1.2.5. Sustratos y proteínas de unión de la PKC- δ	276

Índice general

2. Objetivos	279
3. Resultados	280
3.1. Efecto de la activación del receptor CCK _A y del éster de forbol TPA en la fosforilación en residuos de tirosina y en la actividad de la PKC- δ	280
3.2. Estudio de los mecanismos intracelulares que median la fosforilación en residuos de tirosina de la PKC- δ : función de la PKC- α	288
3.3. Relación entre los procesos de translocación, activación y fosforilación en tirosina de la PKC- δ en acinos pancreáticos	303
3.4. Acercamiento a la posible función de la isoforma δ de la proteína cinasa C	320
4. Discusión.....	323
V. DISCUSIÓN GENERAL	335
VI. CONCLUSIONES	341
VII. BIBLIOGRAFÍA	345

I – VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

Tabla I-1. Distribución de las tirosinas cinasas de la familia Src 38

Tabla I-2. Componentes de las vías de señalización de las MAP cinasas 78

Tabla I-3. Tipos de proteínas serina/treonina fosfatasa..... 94

II - MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla II-1. Tampón base para la obtención de acinos..... 124

Tabla II-2. Composición del tampón de lavado 124

Tabla II-3. Tampón de gradiente 125

Tabla II-4. Tampón de incubación 125

Tabla II-5. Tampón Na–Hepes 129

Tabla II-6. Composición del tampón fosfato salino (PBS) 134

Tabla II-7. Tampón de lisis para la obtención de lisados totales 134

Tabla II-8. Tampón de lisis para la obtención de la fracción de membrana 135

Tabla II-9. Composición del tampón de lisis para la obtención de la fracción nuclear 136

Tabla II-10. Tampón de lisis con sacarosa para la obtención de la fracción nuclear 137

Tabla II-11. Composición del tampón de carga 2X..... 146

Tabla II-12. Composición de los geles de acrilamida 147

Tabla II-13. Tampón de electroforesis 147

Tabla II-14. Tampón de transferencia..... 149

Tabla II-15. Composición del tampón de bloqueo 150

Tabla II-16. Características del inmunoblotting para la detección e identificación de proteínas..... 151

Tabla II-17. Características del inmunoblotting para estudios de fosforilación 152

Tabla II-18. Características del inmunoblotting para estudios de translocación 153

Tabla II-19. Composición del tampón de lavado de membranas..... 154

Tabla II-20. Solución de stripping 156

Tabla II-21. Tampón de lisis para la determinación de la actividad cinasa en lisados totales 158

Tabla II-22. Tampón de lisis para la determinación de la actividad cinasa en la fracción de membrana..... 159

Índice de tablas

Tabla II-23. Tampón de ensayo para PYK2	162
Tabla II-24. Concentración final de los componentes de la reacción para medir la actividad de la PYK2/CAK β	163
Tabla II-25. Tampón de ensayo para PKC	164
Tabla II-26. Concentración final de los componentes de la reacción para medir la actividad cinasa de las isoformas de la PKC.....	165

IV - FAMILIA DE LAS PROTEÍNAS CINASAS C: PKC- δ

Tabla IV-1. Localización subcelular y otras características de las diferentes isoformas de la PKC	252
--	-----

I – VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

Gráfico I-1. Ciclo GTPasa de las proteínas G heterotriméricas 5

Gráfico I-2. Metabolismo de los fosfoinosítidos y de los inositoles fosfato 11

Gráfico I-3. Transducción de señales mediadas por las fosfolipasas C, D y A₂ 23

Gráfico I-4. Activación de una proteína cinasa dependiente de AMPc 27

Gráfico I-5. Representación esquemática de la estructura de Src 39

Gráfico I-6. Modelo de los dos estados conformacionales de Src 42

Gráfico I-7. Mecanismos de activación de Src 43

Gráfico I-8. Estructura de algunos receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca 56

Gráfico I-9. Especificidad de unión para diversos dominios modulares proteicos 62

Gráfico I-10. Representación esquemática de la estructura de varias proteínas adaptadoras (y de Src por comparación) 64

Gráfico I-11. Mecanismo de activación de las GTPasas de la familia Rho 74

Gráfico I-12. Activación de la vía de señalización intracelular ERK por los RPTKs 81

Gráfico I-13. Diagrama esquemático de las vías MAPK en mamíferos 84

Gráfico I-14. Cascadas de señalización activadas por RPTKs 98

Gráfico I-15. Estructura de los receptores sin actividad catalítica intrínseca y diagrama esquemático de las vías intracelulares activadas 100

Gráfico I-16. Activación de la cascada ERK por la transactivación del receptor del EGF 103

Gráfico I-17. Activación de ERK mediante la incorporación de PYK2/CAK β a las adhesiones focales 106

Gráfico I-18. Formación de un complejo de señalización de Src con el receptor adrenérgico β 2 dependiente de β -arrestinas 108

II - MATERIALES Y MÉTODOS

Gráfico II-1. Esquema de la inmunoprecipitación 139

Gráfico II-2. Esquema de la coinmunoprecipitación 140

Gráfico II-3. Esquemización del inmunoblotting 149

Gráfico II-4. Esquema del sistema de secado de geles 167

III - TIROSINAS CINASAS DE ADHESIÓN FOCAL: PYK2/CAK β

Gráfico III-1. Modelo esquemático con la disposición y las conexiones de los principales componentes en las placas de adhesión focal..... 183

Gráfico III-2. Esquema comparativo de la estructura de PYK2/CAK β y FAK, lugares de unión específicos y lugares de escisión de FAK por caspasas 195

IV - FAMILIA DE LAS PROTEÍNAS CINASAS C: PKC- δ

Gráfico IV-1. Estructura de las proteínas cinasas C 249

Gráfico IV-2. Modelo de la regulación de la PKC por fosforilación, proteínas específicas y cofactores 258

III - TIROSINAS CINASAS DE ADHESIÓN FOCAL: PYK2/CAK β

- Figura III-1.** Efecto de la CCK-8 en la fosforilación en restos de tirosina de PYK2/CAK β en acinos pancreáticos de rata 216
- Figura III-2.** Curva de tiempo (panel izquierdo) y curva dosis-efecto (panel derecho) de la fosforilación en restos de tirosina de PYK2/CAK β inducida por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata..... 217
- Figura III-3.** Curva de tiempo de la autofosforilación (panel superior) y de la actividad tirosina cinasa de la PYK2/CAK β (panel inferior) en acinos pancreáticos de rata estimulados con CCK-8 10 nM 218
- Figura III-4.** Efecto de la CCK-8 y la CCK-JMV, de forma individual o en combinación, en la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β en acinos pancreáticos de rata..... 220
- Figura III-5.** Efecto del éster de forbol TPA (1 μ M) en la estimulación de la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β en acinos pancreáticos de rata 222
- Figura III-6.** Efecto del ionóforo del calcio A23187 y la taspigargina, solos o en combinación con el éster de forbol TPA, en la estimulación de la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β en acinos pancreáticos de rata 223
- Figura III-7.** Efecto de la presencia o ausencia de calcio extracelular en la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β estimulada por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata 224
- Figura III-8.** Efecto del bloqueo de la movilización del calcio intracelular, en la fosforilación en restos de tirosina de PYK2/CAK β o p125^{FAK} inducida por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata 226
- Figura III-9.** Efecto del GF 109203X, solo o en combinación con taspigargina, en la fosforilación en restos tirosina de PYK2/CAK β y p125^{FAK} estimulada por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata..... 228
- Figura III-10.** Efecto de la citocalasina D y de la colchicina en la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β inducida por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata 229
- Figura III-11.** Efecto de la CCK-8 (1 nM) en la localización subcelular de las tirosinas cinasas PYK2/CAK β y p125^{FAK} en acinos pancreáticos de rata 231
- Figura III-12.** Efecto de la incubación con CCK-8 (1 nM), en la asociación de PYK2/CAK β con c-Crk endógena (panel izquierdo) o con Grb2 (panel derecho) 233
- Figura III-13.** Modelo propuesto para la activación de la vía de señalización intracelular de las MAPK mediada por el receptor CCK_A en acinos pancreáticos de rata..... 243

IV - FAMILIA DE LAS PROTEÍNAS CINASAS C: PKC- δ

- Figura IV-1.** Efecto de la CCK-8 en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ en acinos pancreáticos 281

Índice de figuras (resultados)

Figura IV-2. Curva de tiempo (panel superior) y curva dosis-efecto (panel inferior) de la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ inducida por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata 283

Figura IV-3. Curva de tiempo (panel superior) y curva dosis-efecto (panel inferior) de la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ inducida por el éster de forbol TPA en acinos pancreáticos de rata..... 284

Figura IV-4. Efecto de la CCK-8 en la actividad de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata..... 285

Figura IV-5. Efectos de la CCK-8 y la CCK-JMV, de forma individual o en combinación, en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata 287

Figura IV-6. Efecto de los inhibidores de la PI3-K, wortmanina y LY 294002, en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata 289

Figura IV-7. Efecto del ionóforo del calcio A23187 o la tapsigargina, solos o en combinación con el éster de forbol TPA, en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata 291

Figura IV-8. Efecto de la depleción de los depósitos intracelulares de calcio por la tapsigargina (TG), en el incremento en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ inducida por CCK-8 o TPA en acinos pancreáticos de rata 293

Figura IV-9. Efecto del BAPTA AM, un quelante intracelular de calcio, en el incremento en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ inducida por CCK-8 o TPA en acinos pancreáticos de rata..... 295

Figura IV-10. Efecto de la citocalasina D en la fosforilación en tirosina de PKC- δ inducida por CCK-8 y TPA en acinos pancreáticos de rata 296

Figura IV-11. Efecto del inhibidor general de las PKCs, GF 109203X, en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 o TPA en acinos pancreáticos de rata..... 298

Figura IV-12. Efecto del inhibidor de las cPKC, Gö 6976, en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 o TPA en acinos pancreáticos de rata 299

Figura IV-13. Efecto del safingol, un inhibidor específico de la PKC- α , en la actividad de esta isoforma de la PKC estimulada por TPA en acinos pancreáticos de rata 300

Figura IV-14. Efecto del inhibidor específico de la PKC- α , safingol, en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 o TPA en acinos pancreáticos de rata..... 302

Figura IV-15. Efecto de la CCK-8 y del TPA en la redistribución de la PKC- δ entre las fracciones subcelulares de acinos pancreáticos de rata 304

Figura IV-16. Curva de tiempo estimulada por CCK-8 y TPA para la translocación de la PKC- δ a la fracción de membrana en acinos pancreáticos de rata..... 306

- Figura IV-17.** Curva de tiempo estimulada por CCK-8 y TPA para la translocación de la PKC- δ a la fracción nuclear en acinos pancreáticos de rata 307
- Figura IV-18.** Efecto del rottlerin en la actividad de la PKC- δ estimulada por CCK-8 y TPA en acinos pancreáticos de rata 309
- Figura IV-19.** Efecto del inhibidor específico de la PKC- δ , rottlerin, en la redistribución de esta isoforma de la PKC entre las fracciones subcelulares de acinos pancreáticos de rata estimulados con CCK-8 o TPA 310
- Figura IV-20.** Efecto del rottlerin en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 y TPA en acinos pancreáticos de rata 311
- Figura IV-21.** Efecto del inhibidor de las tirosinas cinasas, B44, en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 y TPA en acinos pancreáticos de rata 313
- Figura IV-22.** Efecto de la tirfostina B44 en la redistribución de la PKC- δ entre las fracciones subcelulares de acinos pancreáticos de rata estimulados con CCK-8 o TPA 314
- Figura IV-23.** Efecto del inhibidor de las tirosinas cinasas, B44, en la actividad de la PKC- δ estimulada por CCK-8 y TPA en acinos pancreáticos de rata 315
- Figura IV-24.** Efecto del rottlerin en la actividad de la PKC- δ estimulada por CCK-8 y TPA en las fracciones citosólica y de membrana de acinos pancreáticos de rata 318
- Figura IV-25.** Efecto de la tirfostina B44 en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 y TPA en las fracciones citosólica y de membrana de acinos pancreáticos de rata 319
- Figura IV-26.** Efecto del rottlerin en la fosforilación en restos de tirosina de la p125^{FAK} y la paxilina estimuladas por CCK-8 y TPA en acinos pancreáticos de rata 321
- Figura IV-27.** Efecto del inhibidor específico de la PKC- α , safingol, en la fosforilación en tirosina de la p125^{FAK} y la paxilina estimuladas por CCK-8 o TPA en acinos pancreáticos de rata 322

*I. Vías de señalización
intracelular*

1. Vías clásicas de señalización intracelular

Los procesos celulares básicos están regidos por numerosas sustancias reguladoras. Algunas de éstas, como las hormonas esteroideas, entran en la célula, se unen con su receptor e influyen en la transcripción de determinados genes (1), sin embargo la mayoría de sustancias reguladoras ejercen sus efectos desde el exterior celular. El primer paso en la acción de estas últimas es unirse a receptores específicos en la superficie extracelular de la membrana plasmática de células diana. Aunque existen algunos receptores que actúan como efectores de la acción del ligando (por ejemplo, canales iónicos de neurotransmisores), para la mayor parte de las moléculas reguladoras existe una compleja serie de eventos intracelulares desde la unión con su receptor de membrana específico, hasta sus efectos finales en la función celular. Las moléculas reguladoras extracelulares ejercen sus efectos en la célula a través de las vías de transducción de señales (2). Aunque son muchas las sustancias reguladoras, se conocen relativamente pocas vías de transducción de señales; estas vías de señalización se basan en la modificación de la actividad de determinadas proteínas intracelulares que provocarán la respuesta celular (2).

La mayoría de ligandos con efecto en acinos pancreáticos, activan principalmente dos mecanismos intracelulares de acoplamiento estímulo-efecto: en el caso de la secretina y péptidos relacionados, activando la adenilato ciclasa e incrementando los niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (3,4); mientras que la colecistocinina (CCK), la acetilcolina (ACh) o la bombesina activan la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza fosfoinosítidos generando diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (Ins(1,4,5)P₃). Subsecuentemente el DAG estimula a proteínas serina/treonina cinasas de la familia de la proteína cinasa C (PKC); y el Ins(1,4,5)P₃ promueve el incremento de la concentración intracelular de calcio ([Ca²⁺]_i) (4,5). Estos dos mecanismos intracelulares pueden potenciar sus efectos en determinadas circunstancias (6) y se cree que son las vías de señalización intracelular más importantes en el páncreas exocrino (4).

Recientemente se han descrito vías de señalización intracelular basadas en la fosforilación en restos de tirosina de numerosas tirosinas cinasas y proteínas reguladoras. Además, numerosos estudios han puesto

de manifiesto que la activación de receptores acoplados a proteínas G de membrana, que carecen de actividad tirosina cinasa intrínseca, puede estimular la fosforilación de diferentes proteínas en residuos de tirosina (4,7-16). La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina inicia una cascada de señales intracelulares que tienen una gran importancia en la fisiología celular (4,9,17-21).

1.1. Proteínas G heterotriméricas

Gran parte de las hormonas, neuromoduladores y otras moléculas reguladores que modifican los procesos celulares lo hacen a través de vías intracelulares dependientes de las proteínas heterotriméricas que unen GTP (*heterotrimeric GTP-binding proteins*), también denominadas proteínas reguladoras que unen nucleótidos de guanina (*guanine-nucleotide-binding regulatory proteins*) o proteínas G (2,4,22). Existe otra clase de proteínas reguladoras de pequeño peso molecular que unen GTP, son las proteínas G monoméricas (*small GTP-binding proteins*) que tienen gran importancia en las vías de transducción de señales de las proteínas cinasas (23,24).

Una proteína G es un “interruptor” molecular que puede existir en dos estados: en su estado activado (*on*), tiene mayor afinidad por el GTP, mientras que la proteína G inactivada (*off*) se une preferentemente al GDP. Cuando están unidos con sus ligandos, algunos receptores de membrana pueden interactuar con una proteína G para activarla induciendo su unión con GTP. La proteína G activada puede entonces interactuar con proteínas efectoras, especialmente enzimas y canales iónicos, para modificar su actividad. La proteína G activada tiene actividad GTPasa, por lo que finalmente el GTP unido es hidrolizado a GDP y la proteína G vuelve a su estado inactivo (2,4,22).

Estructuralmente las proteínas G heterotriméricas están compuestas por subunidades α ($\approx 39\text{--}52$ kDa), subunidades β (≈ 36 kDa) y pequeñas subunidades γ ($\approx 6\text{--}9$ kDa) (22). La función y especificidad de una proteína G viene casi siempre, aunque no necesariamente, determinada por la subunidad α (22). La mayor parte de subunidades α contienen lugares para miristilación y/o palmitilación reversible (25-27) y todas las subunidades γ contienen sitios para isoprenilación (26). Esas acilaciones permiten localizar las proteínas G en la membrana plasmática, donde interactúan con los receptores de membrana, y ejercen su función (22,26).

La proteína G inactiva existe primariamente como heterotrímero $\alpha\beta\gamma$, con GDP en la zona de unión al nucleótido de guanina de la subunidad α (*Gráfico I-1*). La interacción de la proteína G con un receptor al que se ha unido su ligando provoca un cambio conformacional en la subunidad α , que ahora presenta mayor afinidad por el GTP y menor afinidad por el dímero $\beta\gamma$. Por tanto, la subunidad α libera el GDP, se une al GTP y luego se disocia de $\beta\gamma$ (2,4,22). En la mayoría de los casos, la subunidad α -GTP interacciona entonces con la siguiente proteína de la vía de transducción de la señal. Sin embargo, en algunas ocasiones, el dímero $\beta\gamma$ es el responsable de toda o parte de la respuesta mediada por el receptor (28-30). El GTP es hidrolizado a GDP debido a una actividad intrínseca GTPasa de la subunidad α y de este modo dicha subunidad se inactiva y se une al dímero $\beta\gamma$ de nuevo (*Gráfico I-1*) (2,4,22). Este sistema produce una amplificación de la señal debido a que la duración del complejo proteína G•GTP es mayor que la del complejo hormona-receptor (4,31).

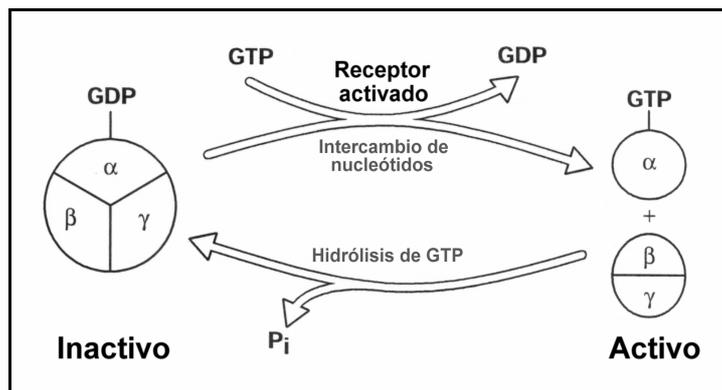


Gráfico I-1. Ciclo GTPasa de las proteínas G heterotrímicas. La proteína G inactiva (izquierda) es un heterotrímero unido a GDP. La unión con el ligando activa el receptor que está acoplado con la proteína G. La actividad del receptor induce un cambio conformacional en la subunidad α que se acompaña con el intercambio de GDP por GTP, permitiendo la disociación entre la subunidad α y el dímero $\beta\gamma$ (derecha). Estas subunidades separadas intervienen en los mecanismos de señalización. La proteína G se configura de nuevo como un heterotrímero inactivo después de que la subunidad α , con actividad GTPasa, ha hidrolizado el GTP, permitiendo la configuración heterotrímica con GDP. Adaptado de (32).

Entre los efectores regulados por las proteínas G se encuentran la adenilato ciclasa y la guanosina monofosfato cíclico (GMPc) fosfodiesterasa, las fosfolipasas C, A₂ y D, y, finalmente, ciertos canales

de calcio y de potasio, cuya actividad puede ser modulada por las proteínas G directamente (22,31). Todos los efectores descritos, regulados por las proteínas G, modificarán las concentraciones de los mensajeros intracelulares, como AMPc, GMPc, Ins(1,4,5)P₃, DAG y Ca²⁺ (2,22,31).

Numerosos autores [revisiones en (22,31-33)] han descrito la existencia de una gran diversidad de proteínas pertenecientes a la familia de proteínas G. Todas ellas han sido clasificadas en cuatro grupos en base al tipo de subunidad α : la familia de proteínas G_s (α_s , α_{olf}); la familia de proteínas G_{i/o} (α_i , α_t , α_o , α_{gust} , α_z), que contiene la forma G_o (α_o), muy abundante en el cerebro; una nueva familia de proteínas G, G_{q/11} (α_q , α_{11} , α_{14} , α_{15} , α_{16}), ampliamente distribuidas; y, finalmente, la familia G_{12/13} (α_{12} , α_{13}), identificadas inicialmente como unas proteínas de 42 y 43 kDa que activaban el metabolismo de los fosfoinosítidos.

Además de la gran diversidad de subunidades α , de las que se han reconocido 23 tipos (22,31), las subunidades β y γ también muestran gran variabilidad: se han identificado al menos 5 subunidades β y 11 subunidades γ diferentes (22,31). Aunque alguna de las posibles combinaciones entre las diferentes subunidades no está favorecida y otras no son posibles, la multiplicidad de subunidades α , β y γ permite la conformación de numerosas especies heterotriméricas diferentes, que podría aportar flexibilidad o especificidad a la señalización intracelular dependiente de proteínas G (22,31).

En el páncreas de rata se han encontrado al menos 15 tipos de subunidades α diferentes. Esta gran diversidad sugiere que diferentes vías de acoplamiento estímulo-respuesta podrían llevar asociadas distintos tipos de proteínas G (4,34). Además, receptores tales como el de la CCK, el cual existe en estados de alta y baja afinidad, posiblemente podría activar diferentes tipos de proteínas G en cada estado de afinidad (4,34).

1.2. Fosfolipasa C

Los fosfoinosítidos son fosfoglicéridos relativamente minoritarios presentes en la membrana plasmática, cuya cabeza polar está constituida por mio-inositol unido a uno o más grupos fosfato. Los fosfoinosítidos mayoritarios son el fosfatidilinositol (PtdIns), el fosfatidilinositol 4-fosfato (PtdIns(4)P) y el fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PtdIns(4,5)P₂), siendo el primero el más abundante (31,35,36). Un gran número de agonistas, incluyendo hormonas, neurotransmisores y factores de

crecimiento activan la PLC promoviendo la hidrólisis de PtdIns(4,5)P₂, lo que da lugar a Ins(1,4,5)P₃ y DAG. Ambos compuestos actúan como mensajeros intracelulares, el primero movilizando calcio intracelular (Ca²⁺_i) y el segundo activando la PKC, y de esta forma regulan diversas funciones celulares (4,5,37,38).

1.2.1. Isoenzimas y mecanismos de activación de la PLC

Se han identificado diez isoenzimas de la PLC que por sus características se han clasificado en tres grupos: PLCβ₁₋₄, PLCγ_{1,2} y PLCδ₁₋₄ (31,35,38-41). Todos ellos son monómeros y poseen pesos moleculares de aproximadamente 85 kDa (PLCδ) y 150 kDa (PLCβ y PLCγ). Presentan dos zonas de alta homología denominadas X (aproximadamente 170 aminoácidos) e Y (aproximadamente 260 aminoácidos), precedidas por un segmento de secuencia variable de unos 300 aminoácidos en el extremo amino terminal (NH₂-terminal, o N-terminal) (35,39,41). Ambas zonas, X e Y, parecen constituir el dominio catalítico y, en las PLCγ, están separadas por un segmento que contiene dominios homólogos de regiones conservadas en tirosina cinasas de la familia Src: la PLCγ presenta dos dominios SH2 y uno SH3 (39,41,42). Estos dominios SH2 y SH3 constituyen lugares de reconocimiento de fosfotirosinas y de zonas ricas en prolina de las proteínas del citoesqueleto, respectivamente (43-45). Finalmente, a diferencia de otros efectores como la adenilato ciclasa, el análisis hidropático de las secuencias de las PLC no revela la presencia de dominios hidrofóbicos, por lo que las PLC no son proteínas integrales de membrana, habiéndose detectado actividad PLC en el citosol, asociada a membrana (35,39,41) y también en el núcleo celular (46).

Se conocen, al menos en parte, los mecanismos de activación de las PLCβ y PLCγ, pero sobre la regulación de las PLCδ existen muy pocos datos (31,39-41,47,48).

Las PLCγ son activadas por receptores de factores de crecimiento que tienen actividad tirosina cinasa (49-51) y esta fosforilación provoca un incremento en su actividad catalítica (51-54). En presencia de los agonistas, estos receptores dimerizan y fosforilan tirosinas del propio receptor (autofosforilación) (55-57). Las fosfotirosinas formadas constituyen el lugar de interacción de los dominios SH2 de las PLCγ que también es fosforilada en tirosina, lo cual favorece su interacción, a través de los dominios SH3, con elementos de actina del citoesqueleto y

determina su actividad (56-58). Un mecanismo semejante parece implicado en su activación por otros receptores, como los de algunas inmunoglobulinas y citoquinas que, sin tener actividad enzimática, estimulan otras tirosina cinasas (21). Aunque en estos mecanismos no participan las proteínas G, está bastante establecido que éstas juegan un importante papel en ciertos casos de activación de la PLC γ por receptores acoplados a las mismas, que también estimulan tirosina cinasas, como los de angiotensina II en músculo liso vascular (59), los muscarínicos M2 (60), los dopaminérgicos D2 o los receptores A1 de adenosina en células COS-2 (61), y en muchos otros sistemas (51,62,63).

Por su parte, las PLC β son activadas por la ocupación de receptores acoplados a proteínas G, incluido el receptor CCK (64). Por un lado, todas ellas son estimuladas por las subunidades α de la familia G_q en presencia de GTP, o sus análogos no hidrolizables, habiéndose demostrado activación directa vía α_q en el caso de varios receptores, incluyendo los muscarínicos (31,40,41). Además, todas las PLC β , salvo la PLC β_4 , son activadas también por los dímeros $\beta\gamma$ de las proteínas G, efecto en el que no parece haber selectividad de subtipos de subunidades $\beta\gamma$, salvo en el caso del dímero $\beta_1\gamma_1$ de la transducina, una proteína G de la retina que muestra menor potencia (41,65-67).

Ambas activaciones muestran diferencias que pueden tener importancia funcional. La interacción de α_q y $\beta\gamma$ con las PLC β tiene lugar en distintos sitios del enzima, ubicados en las regiones carboxilo terminal (COOH-terminal, o C-terminal) y N-terminal respectivamente, por lo que las activaciones pueden ser aditivas (41,67). Además, las sensibilidades de las distintas PLC β frente a las subunidades α o $\beta\gamma$ también son diferentes. En el caso de la activación por α_q la sensibilidad sigue el orden: PLC β_1 > PLC β_3 > PLC β_4 > PLC β_2 , mientras que para las subunidades $\beta\gamma$, el orden es: PLC β_3 > PLC β_2 > PLC β_1 (65,66). Finalmente, las proteínas G de las que proceden ambos tipos de subunidades son probablemente distintas, pues las concentraciones de $\beta\gamma$ requeridas para la activación de la PLC β son mayores que las de α_q y diversas evidencias experimentales indican que las $\beta\gamma$ se originan por disociación de proteínas G_i o G_o (48,67). Este hecho puede explicar la existencia, repetidamente descrita, de activaciones de la PLC β insensibles a la toxina *pertussis* (que no interfiere con las proteínas G_q , pero cataliza la ADP-ribosilación de las G_i o G_o , bloqueando su activación por receptores), que serían mediadas por α_q , y de otras inhibidas por la toxina, que serían mediadas por $\beta\gamma$ (67). Los datos disponibles indican que la activación por uno u otro tipo de subunidades dependerá, en cada tejido, de la expresión de los diferentes isoenzimas de

la PLC β y de los distintos tipos de proteína G, así como de la capacidad de los receptores para interactuar con ellos (31,36,41,48,64).

Finalmente, las PLCs, incluida la PLC δ (68), pueden ser activadas por concentraciones de Ca²⁺ relativamente bajas, similares a las presentes en el citosol de células estimuladas con agentes que inducen la entrada de Ca²⁺ extracelular (31,41). Por ello, los agonistas que interactúan con receptores que son canales de cationes, que causan despolarización en células con canales de Ca²⁺ dependientes de voltajes o que activan canales de Ca²⁺ por algún otro mecanismo, pueden estimular la PLC de forma secundaria a la entrada del ion (31,41). Aunque se ha descrito la activación de la PLC δ por una proteína tipo Rho (69), el único mecanismo establecido hasta el momento para regular la actividad de esta isoforma depende de incrementos fisiológicos en la [Ca²⁺] intracelular (de 0.1 a 10 μ M) (41,68).

Recientemente Piiper y cols. (64) han identificado las isoformas PLC β_1 , PLC β_3 , PLC γ_1 y PLC δ_1 en acinos pancreáticos de rata. Utilizando anticuerpos neutralizantes específicos estos autores han caracterizado, además, la implicación de las isoformas presentes con la secreción enzimática pancreática inducida por agonistas, demostrando que CCK-8, bombesina y carbacol estimulan la secreción activando las isoformas PLC β_1 y la PLC β_3 . La sensibilidad a la inhibición fue diferente para los tres agonistas, así para la PLC β_1 la sensibilidad fue CCK-8 > bombesina > carbacol, y para la PLC β_3 carbacol > bombesina > CCK-8 (64). Para completar este amplio estudio Piiper y cols. (64) establecieron que la activación de las PLCs implicadas dependía de proteínas G_{q/11}.

1.2.2. Metabolismo de los fosfoinosítidos y de los inositoles fosfato

La biosíntesis *de novo* del PtdIns tiene lugar en el retículo endoplásmico y, en la membrana plasmática, es fosforilado secuencialmente por la PtdIns 4-cinasa y la PtdIns(4)P 5-cinasa para generar PtdIns(4,5)P₂ (*Gráfico I-2*) (36,40,47,70,71).

Existen distintas formas isoenzimáticas de ambas cinasas, así como fosfatasas que liberan los grupos fosfato introducidos por las primeras, desconociéndose la utilidad funcional de dicha diversidad (36,47,71). La hidrólisis de los fosfoinosítidos por la PLC genera DAG que puede ser recuperado para la resíntesis de PtdIns tras su fosforilación por la DAG cinasa, la conversión del fosfatidato (PtdOH) resultante en

CDP-DAG por la acción de la CTP-fosfatidato citidiltransferasa y la formación de PtdIns a partir de CDP-DAG e inositol por acción de la PtdIns sintasa (*Gráfico I-2*) (36,72).

El otro producto de la hidrólisis de PtdIns(4,5)P₂, el Ins(1,4,5)P₃, se metaboliza para dar inositol, que puede ser reutilizado para la formación de PtdIns, siguiendo dos vías alternativas (36,72,73). Una de ellas consiste en su defosforilación secuencial generando Ins(1,4)P₂, Ins(4)P e inositol. La segunda implica su fosforilación por una cinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina, dando lugar a Ins(1,3,4,5)P₄, el cual se transforma en Ins(1,3,4)P₃ que, a su vez, puede defosforilarse hasta inositol por dos rutas alternativas. Por la primera se forma Ins(1,3)P₂ e Ins(1)P y por la segunda Ins(3,4)P₂ e Ins(3)P. Por ambas vías se obtiene finalmente inositol después de una última defosforilación por una inositol monofosfatasa (*Gráfico I-2*) (36,72).

Diversos estudios muestran que la formación de Ins(1,4,5)P₃ es muy rápida en acinos pancreáticos. Así, en acinos marcados con [³H]inositol y estimulados con dosis máximas de CCK o del análogo de la ACh, carbacol (CCh), se ha observado que el Ins(1,4,5)P₃ aumenta de 2 a 5 veces por encima del nivel basal en 5 segundos y posteriormente disminuye, aunque los niveles permanecieron elevados hasta 10 minutos (4,74,75). La formación de Ins(1,3,4)P₃ tiene un patrón diferente; su aparición presenta un retraso de 15 a 40 segundos tras el Ins(1,4,5)P₃, pero continúa aumentando en presencia del estímulo (4,74).

Una pequeña proporción del Ins(1,4,5)P₃ generado tras la estimulación por un secretagogo (inferior al 5 %) es una forma cíclica. Esta forma es 16 veces menos potente que el Ins(1,4,5)P₃ no cíclico en el páncreas exocrino, pero es producida de manera continua a lo largo de la estimulación por el agonista. Debido a que es difícilmente degradable se va acumulando gradualmente en el interior celular y podría ser importante en algunos de los efectos estimulados por agonistas que actúan durante largos periodos de tiempo (4,74).

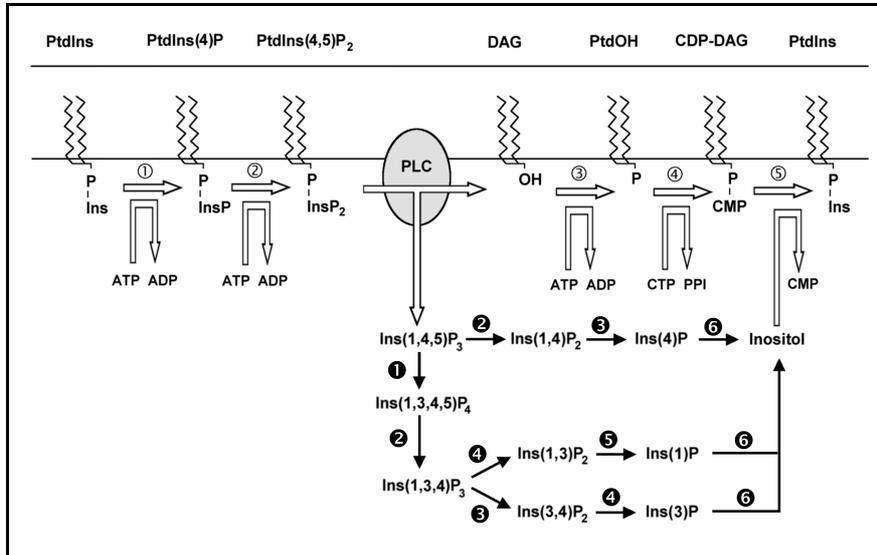


Gráfico I-2. Metabolismo de los fosfoinosítidos y de los inosítoles fosfato. ① *PtdIns* 4-cinasa; ② *PtdIns(4)P* 5-cinasa; ③ DAG cinasa; ④ CTP-fosfatidato citidiltransferasa; ⑤ *PtdIns* sintasa. Los enzimas especificados que intervienen en el metabolismo de los fosfatos de inositol son: ① *Ins(1,4,5)P₃* 3-cinasa; ② Inositol polifosfato 5-fosfatasa (*InsP_x* 5-Pasa); ③ *InsP_x* 1-Pasa; ④ *InsP_x* 4-Pasa; ⑤ *InsP_x* 3-Pasa; ⑥ Inositol monofosfatasa. Adaptado de (36) y (72).

1.2.3. *Ins(1,4,5)P₃* y movilización de Ca^{2+}

Los dos productos de la hidrólisis del *PtdIns(4,5)P₂* por las PLC, *Ins(1,4,5)P₃* y DAG, actúan como mensajeros intracelulares (5,37,76-78). Describiremos en primer lugar las acciones del *Ins(1,4,5)P₃* en la movilización de Ca^{2+} en el contexto general del papel de este ion en la transducción de señales.

El Ca^{2+} participa en la regulación de muchas e importantes funciones celulares modulando la actividad de proteínas, directamente o mediante proteínas reguladoras como la calmodulina (4,78). Dado que altas concentraciones de Ca^{2+} tienen efectos deletéreos para la célula, su concentración en el citosol se mantiene baja, aproximadamente 100 nM (en células acinares pancreáticas en reposo la concentración intracelular de calcio libre se mantiene entre 50 y 200 nM), gracias a la actividad de intercambiadores Na^+/Ca^{2+} y H^+/Ca^{2+} de la membrana plasmática y a

diversas Ca^{2+} -ATPasas que bombean el ion fuera del compartimento citosólico (78,79). En acinos pancreáticos uno de los mecanismos más importantes para la restitución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a niveles basales tras un estímulo es una Ca^{2+} -ATPasa dependiente de Mg^{2+} (80). Determinados microsomas también poseen mecanismos para captar Ca^{2+} , en ellos se ha descrito una Ca^{2+} -ATPasa similar a la localizada en el retículo endoplásmico, de forma que estos orgánulos también participan en el mantenimiento de los niveles fisiológicos de Ca^{2+} (81). Otro de los mecanismos que participan en el mantenimiento de los niveles del Ca^{2+} intracelular es un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ situado en la membrana plasmática (4,78,82,83).

Muchas señales extracelulares, entre las que se cuentan los agonistas que activan la PLC, ejercen su acción promoviendo una elevación transitoria de la concentración de Ca^{2+} intracelular (4,84). Esta puede tener dos orígenes distintos: por un lado, las señales pueden activar la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular donde su concentración es mucho mayor, mediante alguno de los múltiples canales de Ca^{2+} presentes en la membrana y, por otro, pueden movilizar Ca^{2+} almacenado en depósitos intracelulares (4,79,84,85). Ambos mecanismos están presentes en los efectos de los agonistas que activan la PLC. En general, estas sustancias inducen una elevación de la concentración de Ca^{2+} intracelular de dos tipos: respuestas transitorias y respuestas oscilatorias (4,86-88).

En las respuestas transitorias se puede distinguir un primer pico momentáneo de aumento, seguido de un periodo más prolongado en la que la concentración de Ca^{2+} se mantiene por encima del nivel basal (78,84). Dado que la segunda fase, pero no el pico inicial, depende de la presencia de Ca^{2+} extracelular, la primera fase se debe a movilización de Ca^{2+} intracelular y en la segunda participa la entrada de Ca^{2+} extracelular (78)(4,84). El segundo modelo temporal de la señal de calcio, conocido como oscilaciones, fue descubierto en hepatocitos en 1986 por Woods y cols. (89). Se trata de liberaciones repetitivas de calcio, de corta duración y frecuencia variable (86,87).

Respuestas transitorias

El principal responsable de la movilización de Ca^{2+} intracelular es el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, como fue mostrado inicialmente por Streb y cols. en células pancreáticas permeabilizadas (90) y verificado después en muchos sistemas (73,78). Sin embargo, no sólo el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ es capaz de liberar calcio desde los depósitos intracelulares. En los últimos años, se han descubierto nuevos mensajeros que regulan la señal de calcio. Uno de ellos, la ADP ribosa cíclica, induce la movilización de calcio en linfocitos T (91) y en células acinares pancreáticas (92,93). Otro compuesto que también participa activamente en la vía del calcio es el ácido nicotínico

adenín difosfato (NAADP) (94), que libera calcio en oocitos de invertebrados (95), en cerebro (96) y en células acinares pancreáticas (97). Aunque el NAADP y la cADP ribosa presentan diferencias estructurales y funcionales parece que son sintetizados por la misma enzima, la ADP ribosil ciclasa, encontrada en numerosos tipos celulares (98).

El $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ induce la liberación de Ca^{2+} desde depósitos presentes en el retículo endoplásmico a través de un canal ubicado en su membrana, que constituye el receptor de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (99,100). Este receptor es un tetrámero constituido por cuatro subunidades idénticas, de unos 310 kDa, de las que existen variantes muy similares generadas por diversidad génica (se conocen cuatro genes de las mismas) y por maduración alternativa (*splicing* alternativo) del ARNm. Cada subunidad tiene cuatro segmentos transmembrana en el extremo C-terminal, con los que se fija a la membrana del retículo endoplásmico, y un largo dominio citosólico, en cuya región N-terminal se encuentra el lugar de unión del $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, que es rico en lisina y arginina (99-102). El $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ eleva normalmente la concentración citosólica de Ca^{2+} hasta aproximadamente $1\ \mu\text{M}$ y su acción es muy rápida (4,103). Se ha observado variabilidad en la sensibilidad del receptor de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, que se ha atribuido a diferencias en el nivel de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares y a diversidad de subtipos y localización del receptor (104,105). Finalmente, el propio Ca^{2+} modula el efecto del $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, potenciándolo a concentraciones bajas e inhibiéndolo a concentraciones altas (73,78,106).

En la segunda fase de la señal, los agonistas activan la entrada de Ca^{2+} extracelular, lo cual prolonga la elevación de Ca^{2+} citosólico y permite el relleno de sus depósitos intracelulares (4,5,73,76,78).

Se desconoce la identidad de los canales responsables de esta entrada. Se ha propuesto que algunos podrían estar activados por $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ o $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, ya que se ha descrito la presencia de receptores del primero en la membrana plasmática de linfocitos y hepatocitos (107,108) y la activación por el segundo de la entrada de Ca^{2+} en oocitos y células lacrimales y endoteliales (78,109,110). No obstante, se ignora si los receptores de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ de la membrana plasmática son canales de Ca^{2+} , así como la presencia y contribución a la entrada del ion de los canales sensibles a $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ en otros tipos celulares (78).

Por otra parte, se ha establecido la existencia de canales activados por la liberación de Ca^{2+} intracelular (CRAC), inicialmente descritos en mastocitos (111,112) y después en otros sistemas (76,78), incluidos acinos pancreáticos (113). La estimulación de los canales CRAC puede llevarse a cabo, en ausencia de agonistas, por agentes que vacían los depósitos

intracelulares del ion, como la ionomicina o los inhibidores de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico (76,78,114).

Aunque se han caracterizado algunas corrientes de Ca^{2+} (I_{CRAC}) de este tipo, la conexión entre el vaciado del retículo endoplásmico y los CRAC es aún motivo de especulación. Partiendo del mecanismo de movilización de Ca^{2+} en el acoplamiento excitación–contracción en el tejido muscular, en el que existe conexión física entre los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico y canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, Irvine (106) ha propuesto que existe interacción entre el receptor del $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática, en el denominado *modelo de acoplamiento conformacional*. Según este modelo, un cambio de conformación del primero, consecuencia de la depleción de Ca^{2+} , activaría los segundos y se permitiría la entrada de calcio extracelular, en un proceso que podría requerir la presencia de $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ (106,115). Por otro lado, algunos autores han mostrado inhibición por $\text{GTP}\gamma\text{S}$ de la entrada de Ca^{2+} inducida por su liberación, sugiriendo la participación de proteínas G monoméricas, quizás de la familia Rab, que para su activación requieren no sólo la unión sino también la hidrólisis de GTP (76,78). Finalmente, Randriamampita y Tsien (116) han caracterizado parcialmente un factor que activa la entrada de Ca^{2+} (CIF: *Ca²⁺ influx factor*) que es producido por depleción intracelular del ion en células Jurkat-T. Se trata de un compuesto fosforilado de bajo peso molecular y parcialmente lipofílico, que podría ser librado del retículo endoplásmico tras la liberación de Ca^{2+} (116,117). Los datos disponibles sugieren que podría haber diversos mecanismos más o menos simultáneos en la activación de los CRAC tras la movilización del Ca^{2+} intracelular por el $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (78).

Después de ser activados, la modulación o control de la entrada de calcio a través de los canales CRAC parece que depende del propio calcio. Según esta hipótesis, el calcio que entra en la célula y se acumula cerca de la membrana plasmática inhibe estos canales, produciéndose un estado de equilibrio entre entrada de calcio a través de estos canales y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (118,119). Estudios recientes aportan más datos que apoyan esta teoría, ya que demuestran la existencia de un efecto de retroalimentación negativa en la activación de la corriente de canales CRAC producido por la propia entrada de calcio (120). Es decir, la entrada de calcio en el citosol inactiva a este canal mediante un lento proceso que depende de un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en el que no parece que intervengan el estado de relleno de los depósitos, la fosforilación de proteínas, las proteínas G ni los enzimas dependientes de calcio (120,121).

Respuestas oscilatorias

A bajas concentraciones de CCK, bombesina o ACh el patrón de movilización de calcio en acinos pancreáticos es diferente al observado con dosis máximas de estos agonistas: la respuesta se caracteriza por la aparición de oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ (86,87,122), fenómeno que ha sido observado en célula acinar pancreática aislada de ratón, cobaya y rata (4).

Concentraciones fisiológicas del neurotransmisor ACh (50-300 nM) o de hormonas como CCK (3-50 pM) inducen, tras una latencia de 1 ó 2 minutos, oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ que presentan dos patrones oscilatorios diferentes: (a) *oscilaciones sinusoidales*, en las que se observan fluctuaciones regulares en la $[Ca^{2+}]_i$ que ocurren con alta frecuencia sobre un nivel de calcio alto. Se producen al estimular la célula con concentraciones submáximas de ACh y del análogo de la ACh carbacol (CCh); (b) *oscilaciones transitorias*, en las que los picos oscilatorios de calcio son menos frecuentes que en la sinusoidales y la concentración de calcio cae hasta el nivel basal entre cada dos picos. Aparecen al estimular las células acinares con concentraciones postprandiales de CCK o con el análogo de la CCK, JMV-180 (4,88,123,124).

Una vez iniciadas las oscilaciones se mantienen con una frecuencia relativamente constante durante el tiempo que el agonista esté presente (88,123,124). Estas oscilaciones son primariamente el resultado de liberaciones pulsátiles de Ca^{2+} desde almacenes intracelulares seguidas de la subsiguiente recaptación dependiente de ATP, por este motivo las oscilaciones pueden ser inhibidas por aquellos agentes que eliminan el ATP celular (87). Las oscilaciones pueden iniciarse en ausencia de calcio extracelular, pero no pueden mantenerse sin la presencia de éste ion en el medio extracelular (87).

Se han propuesto muchos modelos para tratar de explicar mecánicamente la generación de estas oscilaciones de Ca^{2+} . Parece que todos los autores coinciden en la necesidad de la formación de $Ins(1,4,5)P_3$ vía proteína G para explicar el incremento inicial en la $[Ca^{2+}]_i$ (4,125); sin embargo, no son necesarias oscilaciones de $Ins(1,4,5)P_3$ para generar oscilaciones de Ca^{2+} (126).

Por otro lado, cuando se utilizan concentraciones de agonista que provocan oscilaciones de Ca^{2+} no se aprecia ningún cambio en el metabolismo de los inosítoles fosfato. Además, el CCK-JMV (JMV-180), que no estimula un incremento detectable en los niveles de $Ins(1,4,5)P_3$ en períodos breves de tiempo, si es capaz de provocar oscilaciones de Ca^{2+} . El inhibidor de la PLC, U-73122, no bloquea las oscilaciones inducidas por la CCK-JMV, aunque si inhibe las provocadas por CCK o carbacol

(125). Consecuentemente, estos hallazgos ponen de manifiesto que otro mensajero intracelular diferente del $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ podría actuar como una señal para provocar las oscilaciones de Ca^{2+} en células acinares pancreáticas (127). Es posible que las oscilaciones provocadas por CCK o el CCh sean debidas a pequeños incrementos en los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, mientras que las oscilaciones generadas por la CCK-JMV pueden ser provocadas a través de una vía distinta a la descrita (4). También se tienen evidencias de que la activación de la adenilato ciclasa en acinos pancreáticos, incrementando los niveles de AMPc, no afecta ni a la generación ni al mantenimiento de las oscilaciones de Ca^{2+} (87).

Uno de los mecanismos propuestos para explicar las oscilaciones de Ca^{2+} se basa en la existencia de depósitos de Ca^{2+} sensibles e insensibles al $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$: este mensajero intracelular provocaría la liberación de una cantidad relativamente pequeña de Ca^{2+} desde los depósitos sensibles y las oscilaciones se propagarían por un proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) desde depósitos insensibles al $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (4).

Se ha especulado mucho acerca del papel fisiológico de las oscilaciones de Ca^{2+} . Se sabe que estas ocurren a bajas concentraciones, probablemente fisiológicas, de los agonistas y que el agonista de la CCK, JMV-180, es capaz de estimular la secreción de amilasas únicamente provocando oscilaciones de Ca^{2+} . Por todas estas razones parece que las oscilaciones juegan un papel importante en el control de la secreción de enzimas y fluidos en el páncreas exocrino (4).

Estudios sobre los aspectos espaciales de la señal de Ca^{2+} han mostrado que la señal inicial es detectada en el polo luminal de la célula y posteriormente se propaga en forma de onda hacia la región basal (88). El significado de este hecho no está muy claro, pero podría indicar la localización de los depósitos primarios de Ca^{2+} . Diversos autores están estudiando mediante sistemas de *imaging* y microscopía confocal la propagación de la señal de Ca^{2+} intercelular en acinos pancreáticos. Estos estudios parecen concluir que durante las oscilaciones de Ca^{2+} no todas las células del acino oscilan al unísono, y que cada ciclo oscilatorio que se origina en un área concreta del acino se extiende asincrónicamente hacia las células adyacentes (4,88).

Otro de los fenómenos evidenciados recientemente acerca del metabolismo del calcio en acinos pancreáticos ha sido la relación entre el incremento en la concentración de calcio citosólico y el pH intracelular. González y cols. (82,83) han demostrado que la movilización de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, observado tras la estimulación con CCK, está acompañada por una disminución en el pH intracelular. Este

fenómeno estaría mediado principalmente por la activación de un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ localizado en la membrana plasmática.

1.2.4. Ion calcio y activación de la calmodulina

Aunque la unión del Ca^{2+} directamente a una enzima es posible, la mayoría de las acciones del Ca^{2+} son iniciadas por la unión a proteínas sin actividad enzimática. Con la excepción de la troponina en el músculo esquelético, la proteína a la que suele unirse el Ca^{2+} en la mayoría de las ocasiones es la calmodulina (128). La calmodulina es una proteína ubicua con carácter ácido y un peso molecular de 19 kDa, que une 4 moles de Ca^{2+} por mol de proteína. La unión del Ca^{2+} se produce inicialmente en dos sitios localizados en el extremo carboxilo terminal de la molécula, para posteriormente unirse con baja afinidad a otros dos lugares de unión localizados en el extremo amino terminal (128).

La Ca^{2+} -calmodulina (CaM) es responsable de la activación de gran variedad de enzimas, incluyendo fosfatasa, fosfodiesterasas de nucleótido cíclico y varias cinasas (128). Algunas de estas cinasas, como la CaM cinasa II, pueden fosforilar una gran cantidad de proteínas, actuando por lo tanto como proteínas cinasas multifuncionales (2,129). Sin embargo, otras proteínas cinasas dependientes de la calmodulina, como la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), fosforilan un único sustrato proteico (2).

Se han identificado cuatro proteínas cinasas dependientes de CaM en el páncreas: la MLCK (130,131), CaM cinasa I (132), CaM cinasa II (133) y la CaM cinasa III (132). La CaM cinasa I fue inicialmente aislada por su capacidad para fosforilar una proteína de las vesículas sinápticas, la sinapsina I. La CaM cinasa II fue aislada a principios de los 80, la forma pancreática consiste en una única subunidad de 50 kDa (133), que presenta una reacción inicial de fosforilación intramolecular previa a la fosforilación de sustratos exógenos aún no identificados. Estudios recientes han demostrado que la proteína fosfatasa 1 participa en la defosforilación de la CaM cinasa II, contradiciendo la teoría que sugería que esta proteína presentaba actividad autónoma (134). La CaM cinasa III, de 140 kDa, es relativamente específica para su sustrato, el factor 2 de elongación, una proteína de 100 kDa que está relacionada con la translación ribosomal de ARNm (135), cuando este factor es fosforilado la eficiencia de la translación disminuye significativamente. El papel fisiológico de esta proteína podría estar relacionado con el efecto

inhibidor de las altas concentraciones de CCK en la síntesis de proteínas (4). La MLCK es una proteína de 138 kDa responsable de la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina que se observa en acinos pancreáticos estimulados por CCK (131).

1.2.5. DAG y activación de la PKC

El DAG formado por la hidrólisis del PtdIns(4,5)P₂ permanece en la membrana y activa la PKC, una proteína cinasa dependiente de fosfolípidos que fosforila proteínas en restos serina y treonina. Esta segunda rama de la señal ha sido también ampliamente estudiada, y los conocimientos acumulados se describen en revisiones recientes (136-139).

La activación de la PKC generalmente implica su translocación del citosol a la membrana, proceso que, en las formas dependientes de calcio, es favorecido por la elevación de la concentración citosólica de este ion (138,140). En la membrana, la PKC interacciona con lípidos, particularmente fosfatidilserina (PtdSer), y es activada por DAG, el cual aumenta la afinidad de la cinasa por el Ca²⁺. La interacción de la PKC con la membrana parece más compleja que la mera unión del enzima con algún lípido de la misma, habiéndose descrito la existencia de proteínas que se unen a la cinasa de forma dependiente de fosfolípidos, llamadas receptores para PKC activada (RACK) (141,142), las cuales podrían mediar la interacción, proporcionando especificidad a la misma (138,140).

No se conocen todos los factores que regulan los distintos isoenzimas, pero se ha establecido que las PKC clásicas (cPKC) son activadas por Ca²⁺, DAG, ácidos grasos insaturados y lisofosfolípidos, que las PKC novel o nuevas (nPKC) no requieren Ca²⁺ (no tienen dominio C2 de que depende la unión de este ion, véase capítulo IV) y se activan por DAG y ácidos grasos, y que las PKC atípicas (aPKC) no se activan por Ca²⁺ o DAG pero sí por ácidos grasos (138,140). De acuerdo con estas características, la activación de las isoformas c y n podrá ser consecuencia de la estimulación de la PLC, que genera DAG y promueve la movilización de Ca²⁺, pero también de la estimulación de otras fosfolipasas que igualmente pueden dar lugar a DAG o producir liberación de ácidos grasos y lisofosfolípidos (*Gráfico I-3*) (36,143). Todos los mecanismos que conducen a la activación de la PKC se explicarán con mayor detalle en el capítulo IV (*pág. 245*) de la presente Tesis Doctoral.

1.3. Fosfolipasa D

En algunos sistemas, el curso temporal de formación de DAG estimulado por agonistas presenta dos fases (*Gráfico I-3*). La primera es rápida y transitoria, coincide con la señal de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y el DAG formado tiene una composición en ácidos grasos similar a la del $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, por lo que parece generarse por hidrólisis de este fosfolípido catalizada por la PLC. La segunda es más lenta y prolongada y la composición del DAG difiere de la de los fosfoinosítidos, por lo que se forma a partir de otros fosfolípidos, muy probablemente de fosfatidilcolina (PtdCho) (31,136,143,144). Dos son las rutas posibles: hidrólisis por una PLC dando lugar a DAG y fosfocolina o hidrólisis por una PLD generando colina y fosfatidato (PtdOH) y posterior defosforilación de este por la fosfatidato fosfohidrolasa para dar DAG (31,136,144). La formación de PtdOH y DAG en preparaciones estimuladas en ausencia de ATP (que sería requerido para la formación de PtdOH a partir de DAG si la ruta fuera la primera), indica que la segunda fase de la señal de DAG se debe a la estimulación de la PLD (143).

La PLD fue descrita por primera vez en un tejido de mamíferos en 1973 (145) y, en los últimos años, diversas evidencias experimentales han conducido a proponer su inclusión entre los enzimas efectores con función en la transducción de señales, aunque sus características y rutas de activación son aun poco conocidas (31,40,144,146). La PLD cataliza la hidrólisis de fosfolípidos generando PtdOH que, además de ser precursor del DAG responsable de la activación prolongada de la PKC, podría actuar también como mensajero intracelular; se ha descrito que induce la entrada de Ca^{2+} extracelular en tejido muscular y líneas celulares de origen nervioso, que tiene actividad mitogénica en fibroblastos y que, posiblemente, activa las PKC- η y ζ (146).

La PLD también puede utilizar alcoholes primarios como nucleófilos en lugar de agua dando lugar a fosfatidilalcohol. Esta reacción, llamada transfosfatidilación, sólo es catalizada por la PLD, por lo que es de gran utilidad en la determinación de su actividad, que se realiza habitualmente por separación cromatográfica y cuantificación del fosfatidilalcohol formado a partir de fosfolípidos marcados y alcohol (36).

Se ha descrito la existencia de actividades PLD solubles y ligadas a membrana, aunque aún no se conocen completamente sus características moleculares (146). Entre las unidas a membrana, una PLD acídica y otra neutra han sido caracterizadas con cierto detalle, mostrando que son específicas para PtdCho y activables por detergentes (146). En preparaciones parcialmente purificadas de PLD de membrana procedente

de tejido cerebral, se ha observado activación por PtdIns(4,5)P₂, el cual ha sido propuesto como cofactor de la PLD. Recientemente, se han separado dos actividades PLD solubilizadas a partir de tejido cerebral, una de ellas activada por oleato sódico y la otra por PtdIns4,5P₂ y por nucleótidos de guanina en presencia de una proteína G monomérica, como se comentara mas adelante (146,147). Estos datos indican que distintas variedades del enzima pueden presentar diferentes mecanismos de activación. La PLD es activada por algunos receptores con actividad tirosina cinasa y por receptores acoplados a proteínas G, siendo, con frecuencia, estimulada por los mismos agonistas que activan la PLC (31,36,146).

Entre los mecanismos de activación de la PLD se ha propuesto la participación de tirosina cinasas, de PKC y de proteínas G (36,146). La primera se apoya en la ya citada activación de la fosfolipasa por algunos factores de crecimiento, en un proceso que es bloqueado por inhibidores de tirosina cinasas y potenciado por inhibidores de tirosina fosfatasas (144,146), efectos que también han sido demostrados en acinos pancreáticos (19,148). La activación vía PKC es revelada por la capacidad de los ésteres de forbol para activar la PLD, efecto que es bloqueado por inhibidores de la cinasa y que se pierde tras desensibilización de la PKC por tratamiento prolongado con los citados agentes (*down-regulation*) (144,146,149,150). Se desconoce si el efecto de la PKC implica fosforilación de la PLD, ya que en algunos casos se observa activación por ésteres de forbol en ausencia de condiciones fosforilantes, y tampoco es claro el papel de la PKC en la activación por agonistas, pues los inhibidores de la PKC son menos activos frente a estos que frente a los ésteres de forbol (36).

La participación de proteínas G es deducida de la activación de la PLD por análogos no hidrolizables del GTP en células permeabilizadas y preparaciones de membranas (150,151). La primera evidencia directa se ha obtenido en granulocitos, donde el efecto de los nucleótidos de guanina es mediado por una proteína G monomérica de la familia Ras, llamada factor de ADP-ribosilación (ARF) porque es requerida para la ADP-ribosilación de la proteína G, por la toxina colérica (151). Este factor, del que se conocen varias isoformas, participa en los procesos de tráfico intracelular de membranas (152) y, como las demás proteínas G, muestra actividad GTPasa que lo desactiva y que solo hidroliza GTP en presencia de una proteína activadora (ARF-GAP) ⁽¹⁾. Una propiedad notable de la proteína ARF-GAP es que es altamente dependiente de PtdIns(4,5)P₂ de modo que este fosfoinosítido es requerido tanto para la activación de la

⁽¹⁾ **GAP** (*GTPase-activating protein*): proteína activadora de GTPasas. Son proteínas que estimulan la actividad GTPasa de proteínas G, y, por lo tanto, las desactivan.

PLD como para la inactivación del ARF (152). También se ha descrito la participación de una segunda familia de GTPasas de bajo peso molecular, la familia Rho, probablemente a través de un mecanismo sinérgico con la PKC en la estimulación de la lipasa (146,149,150). Finalmente, también las proteínas G heterotriméricas podrían participar en la activación de la PLD, pues en diversos sistemas se observa estimulación por fluoruro de aluminio (AlF_4^-) (31,146), que activa dichas proteínas pero no las proteínas G monoméricas (153).

A la espera de la completa identificación de las distintas isoformas de la PLD y de la caracterización de sus mecanismos de regulación, parece razonable suponer, en analogía con otros enzimas efectores como la adenilato ciclasa, la PLC o la PKC, que existen diferentes rutas de activación, las cuales podrían ser específicas de los distintos isoenzimas (36,146).

1.4. Fosfolipasa A_2

Como ya se ha mencionado, los ácidos grasos insaturados y los lisofosfolípidos activan diversos isoenzimas de la PKC. Estos compuestos se forman por acción de la PLA_2 que hidroliza el enlace éster de la posición 2 del glicerol en los fosfolípidos (36,154,155). Dicha posición se encuentra, en una proporción importante, esterificada con ácidos grasos insaturados, entre ellos al ácido araquidónico. La importancia de este ácido graso radica en que, además de ser activador de varios isoenzimas de la PKC (α , β , γ , ϵ y ζ) (138,156), es el precursor metabólico de las prostaglandinas, los leucotrienos y los tromboxanos, compuestos que regulan múltiples respuestas celulares y cuya formación depende, fundamentalmente, de la disponibilidad de su precursor (36,154,155). Dado que en las células no estimuladas apenas existe ácido araquidónico libre, la formación de los citados prostanoides viene determinada por la actividad PLA_2 que libera el ácido graso y por los factores que la regulan (36,154,155).

La PLA_2 es estimulada por diversos agonistas, incluida la CCK (157), cuyos receptores son, en muchos sistemas, los mismos que median la activación de la PLC, aunque ambas activaciones parecen ser, en general, independientes (155,158). Por ello, y en consideración al papel funcional de los productos que genera, la PLA_2 se ha incluido entre los sistemas efectores que forman mensajeros activos en la transducción de señales (155). El interés de diversos investigadores por este sistema ha

permitido que se comience a conocer la identidad y características de los diferentes tipos de PLA₂, si bien los mecanismos de su activación son todavía poco conocidos (31,154,155).

Se han identificado dos tipos de PLA₂ (155). El primero corresponde a isoformas extracelulares llamadas PLA₂ secretoras (sPLA₂), de bajo peso molecular (10-20 kDa), inespecíficas respecto al ácido graso que liberan y que no participan en la transducción de señales. Al segundo tipo pertenecen las PLA₂ intracelulares, llamadas citosólicas (cPLA₂), que se encuentran tanto en el citosol como ligadas a membrana, son específicas para ácido araquidónico y son activadas específicamente por agonistas (36,155,159). Se ha clonado y caracterizado una de ellas, constituida por una cadena polipeptídica con un peso molecular de 85 kDa, que no muestra segmentos transmembrana y que posee un dominio de fijación de Ca²⁺, análogo al C2 de las PKC, implicado en su interacción con los fosfolípidos de la membrana (160). Esta PLA₂ muestra preferencia por PtdCho, fosfatidiletanolamina y, en menor grado, por PtdIns, es activada por concentraciones submicromolares de Ca²⁺ y su activación implica su translocación a la membrana (155,160).

En la estimulación de la cPLA₂ parecen estar implicados, al menos, dos mecanismos: fosforilación y activación por proteínas G. Respecto al primero, la PLA₂ es fosforilada por la PKC, posiblemente el isoenzima α (161,162), así como por la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) (162,163), produciéndose translocación y activación en ambos casos. Los dos procesos son independientes, pues ambas cinasas fosforilan distintos restos de serina (155). Las MAPKs participan en cascadas de señalización iniciadas por activación de receptores con actividad tirosina cinasa (56,164,165), por lo que estas vías podrían mediar la estimulación de la actividad de la PLA₂ que acontece tras la ocupación de esos receptores, si bien no se puede descartar, en este caso, que exista también activación de la PLA₂ por fosforilación en tirosinas (36,155,166,167).

Por otro lado, la participación de proteínas G en la regulación de esta fosfolipasa se infiere de la activación de la PLA₂ inducida por el AlF₄⁻ en membranas de macrófagos y células endoteliales (168,169). Posteriormente, se corrobora la participación de proteínas G en la activación de la PLA₂ en diversos tipos celulares (36,169-171), incluidos los acinos pancreáticos (172,173), donde se ha relacionado a la PLA₂ con las oscilaciones de calcio y la secreción (172-174). La activación no parece secundaria a la de PLC, ya que, en sistemas en los que el mismo agonista estimula ambas fosfolipasas, la activación de la PLA₂ es bloqueada por la toxina *pertussis* y la de PLC no, hecho que sugiere la

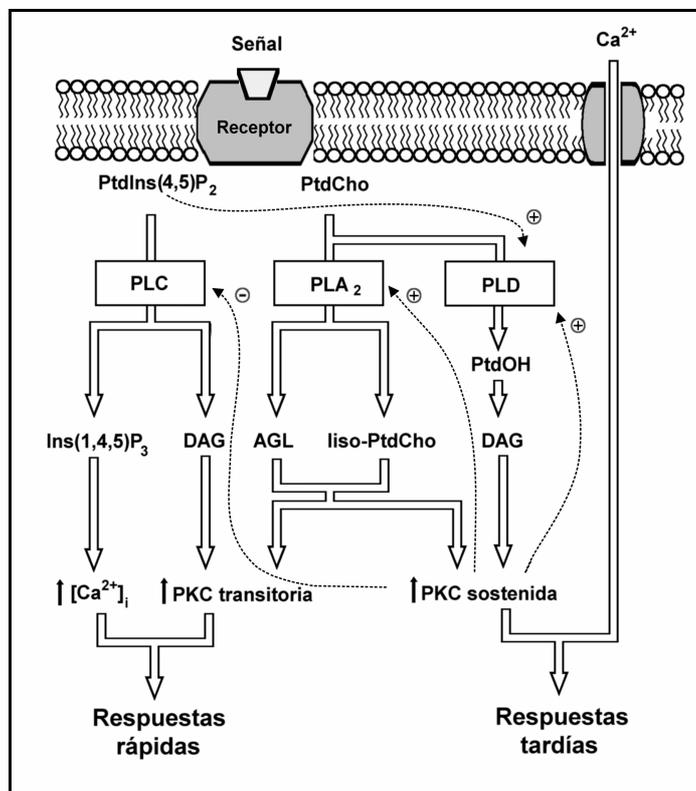


Gráfico I-3. Transducción de señales mediadas por las fosfolipasas C, D y A₂. La PLC, la PLA₂ y la PLD pueden ser activadas por señales que son reconocidas por receptores acoplados a proteínas G, así como por otros tipos de receptores, que promueven respuestas celulares tanto rápidas como lentas. Las primeras pueden ser el resultado de la movilización de Ca²⁺ y activación rápida de la PKC por los mensajeros intracelulares generados por la PLC, y las segundas pueden depender de la activación de la PKC por el DAG formado por la PLD. Los productos de la PLA₂ también son activadores de la PKC y pueden participar en la aparición de ambos tipos de respuestas. Además, la modulación de algunas de las fosfolipasas puede ser el resultado de la activación de otras, ya que todas son reguladas por la PKC. La PKC activa la PLD y la PLA₂, mientras que la activación por agonistas de la PLC es bloqueada por la PKC. Finalmente, el PtdIns(4,5)P₂, sustrato de la PLC, es cofactor de la PLD, por lo que la actividad de esta última puede depender del consumo de dicho lípido por la primera. La importancia de estos efectos dependerá, en cada tejido, de la clase de receptores implicados, así como de la presencia de isoformas específicas de las fosfolipasas, de las proteínas G y de las PKC. Como ejemplos de respuestas rápidas podemos citar la secreción o reacciones de liberación. Algunos ejemplos de respuestas tardías son la proliferación y la diferenciación. Adaptado de (143) y (36).

implicación de proteínas de la familia G_i/G_o en el caso de la primera (36,166,175). En acinos pancreáticos se ha demostrado la implicación de las subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G en la activación de una isoforma de la PLA_2 (172,173). Hallazgos similares se han obtenido en la retina, donde la activación de la transducina por la luz y $GTP\gamma S$ estimula la PLA_2 , habiéndose establecido que son las subunidades $\beta\gamma$ las responsables del efecto (176). Trabajos en otros sistemas con anticuerpos mas o menos específicos frente a distintas proteínas G o sus subunidades, también sugieren la participación de proteínas G_i/G_o , y de subunidades $\beta\gamma$ en la activación de la PLA_2 (36,155).

Aunque se trata de avances importantes, quedan aún muchas incógnitas por resolver, como completar la identificación de las proteínas G y las subunidades implicadas o determinar si la interacción entre estas y la fosfolipasa es directa o indirecta, en cuyo caso las proteínas G podrían modular los procesos que conducen a la fosforilación (por PKC o MAPK) y activación de la PLA_2 (36,155).

1.5. Adenilato ciclasa

La adenilato ciclasa (también denominada adenilil ciclasa) es la enzima que sintetiza el AMPc como mensajero intracelular y se ha encontrado en todos los tejidos de los mamíferos (2). Existen tres formas bioquímicamente diferentes, dos de ellas son proteínas de membrana: una sensible y otra insensible a la calmodulina (2). El tercer tipo es una proteína soluble que sólo se ha encontrado en el testículo (2,4). La adenilato ciclasa pancreática no es estimulada por la calmodulina y, al contrario que la PLC, es una proteína localizada exclusivamente en la membrana (4,177).

Las proteínas G que regulan la adenilato ciclasa se han clasificado como estimuladoras (G_s) e inhibidoras (G_i), en base a la presencia de distintas subunidades α estimuladoras (α_s , ≈ 45 kDa) e inhibidoras (α_i , $\approx 40-41$ kDa) (2,4,178), las cuales pueden distinguirse por su sensibilidad a la toxina del cólera y la toxina *pertussis* (22). Debido a la existencia de ambos tipos de subunidades, la adenilato ciclasa está sometida a un control tanto positivo como negativo por las vías mediadas por proteína G (2). La unión de un ligando estimulador con su receptor (por ejemplo el VIP o la secretina) provoca la activación de las proteínas heterotriméricas G_s , con subunidades α_s que se unirán al GTP y se disociarán del dímero $\beta\gamma$. Es entonces cuando α_s interacciona con la adenilato ciclasa para

activarla (2,4,22,33). Otros ligandos pueden activar receptores acoplados a proteínas G_i (por ejemplo la adenosina en sus receptores A_1), uniendo GTP y disociándose la subunidad α_i del dímero $\beta\gamma$. La subunidad α_i activada se une a la adenilato ciclasa para inhibirla (2,4,175,178).

Sin embargo, la activación de la adenilato ciclasa puede estar regulada, al menos en parte, por los dímeros $\beta\gamma$. En primer lugar, los dímeros $\beta\gamma$ pueden unirse a subunidades estimuladoras α_s , impidiendo la activación de la adenilato ciclasa por ligandos que promueven la formación de AMPc (22,28). Además de este mecanismo indirecto, Taussig y cols. (30) han descrito que las subunidades $\beta\gamma$ inhiben la actividad de la adenilato ciclasa tipo I mediante un mecanismo directo, mientras que activan adenilato ciclasa tipo II y potencian los efectos estimuladores de la subunidad α_s en esta enzima.

1.5.1. El AMP cíclico

El AMP cíclico (AMPc) fue el primero de los mensajeros intracelulares identificado, cuyo descubrimiento deriva de las investigaciones sobre los mecanismos implicados en el control hormonal de la síntesis y catabolismo del glucógeno (179-181).

Del mismo modo que el ion calcio, el AMPc juega un papel muy importante en la modulación de la actividad secretora del páncreas exocrino. Polipéptidos de la familia de la secretina, el VIP y el glucagón incrementan la secreción pancreática exocrina por la modulación de los niveles de AMPc [revisión en (4)]. Más recientemente se ha podido comprobar que otras moléculas que actúan como reguladores endógenos incrementan los niveles de AMPc como el PHI (182) o el PACAP (183). También se ha descrito que autacoides como la histamina pueden estimular la síntesis de AMPc (184). La CCK a altas concentraciones puede activar la adenilato ciclasa pancreática, pero este efecto parece que no tiene un papel fisiológico (4,185).

Aquellos compuestos que, o bien estimulan la adenilato ciclasa, tales como la toxina del cólera o la forskolina, o inhiben la actividad de la fosfodiesterasa que cataboliza el AMPc, como el IBMX, la teofilina y el Ro 20-174, afectan al metabolismo del AMPc (4,186).

Inicialmente en el cobaya, y posteriormente en la rata y el ratón, se ha podido comprobar que los secretagogos que actúan incrementando los niveles de calcio intracelular y los que lo hacen aumentando el AMPc pueden potenciar sus efectos; sin embargo, este fenómeno no afecta a

todas las respuestas celulares: está muy bien establecido para la secreción enzimática (4,6,187-189), pero no ocurre así para el transporte de sodio, donde el efecto es aditivo, ni para el transporte de glucosa donde el efecto inducido por agentes que actúan incrementando la $[Ca^{2+}]_i$ no se ve modificado por adición de VIP (4,6).

1.5.2. Proteína cinasa A

Todos los efectos conocidos del AMPc son llevados a cabo mediante la activación de una proteína cinasa dependiente de AMPc, o proteína cinasa A (PKA) activada por dicho nucleótido cíclico (190,191). En ausencia de AMPc la PKA está compuesta de cuatro subunidades: dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C) (*Gráfico I-4*) (190,191). En mamíferos se han identificado 3 subunidades C diferentes ($C\alpha$, $C\beta$ y $C\gamma$) y 4 subunidades R ($RI\alpha$, $RI\beta$, $RII\alpha$ y $RII\beta$). La mayoría de los tipos celulares contienen la misma subunidad catalítica, pero sus subunidades reguladoras difieren significativamente (190,191).

La presencia de las unidades reguladoras inhibe la actividad enzimática del complejo, pero en presencia de niveles micromolares de AMPc cada subunidad reguladora une dos moléculas de este nucleótido, lo que provoca un cambio conformacional que disminuye su afinidad por las subunidades catalíticas. Las subunidades catalíticas se separan entonces del complejo en estado activo y son capaces de fosforilar en residuos de serina/treonina las proteínas diana (190-192).

En el páncreas existen dos isoformas de la proteína cinasa activada por AMPc, son los tipos I y II, que se diferencian en sus subunidades reguladoras, $RI\alpha$ (52 kDa) y $RII\alpha$ (54 kDa) (3,4,193). Estudios clásicos demostraron que tanto la secretina como el VIP, son capaces de activar la proteína cinasa dependiente de AMPc, con una muy buena correlación entre dicha activación y los incrementos en los niveles de AMPc (194). También se ha demostrado que concentraciones fisiológicas de CCK no incrementan la actividad de dicha cinasa; únicamente concentraciones supramáximas de CCK pueden activar esta proteína. Este hecho está directamente, relacionado con el incremento en los niveles de AMPc que inducen estas concentraciones de CCK, a las que no se ha encontrado una significación fisiológica (185). Se ha descrito que la CCK no modifica el efecto del VIP o la secretina en la activación de la cinasa dependiente de AMPc, lo que parece indicar que el efecto potenciador de estos secretagogos no se produce a este nivel (4).

Los sustratos de la proteína cinasa activada por AMPc son totalmente desconocidos, pero todavía menos se conoce acerca de la proteína cinasa activada por GMPc que se ha descrito en células acinares (3,4,195).

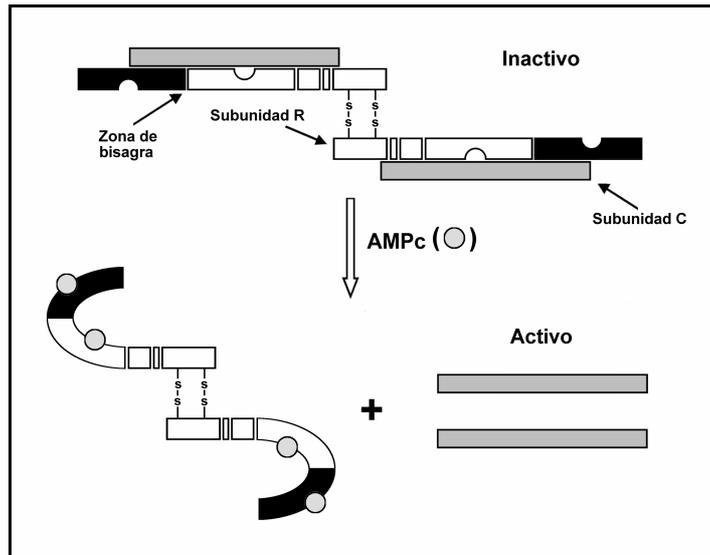


Gráfico I-4. Activación de una proteína cinasa dependiente de AMPc. Las dos subunidades reguladoras (R) del complejo R_2C_2 se mantienen unidas por dos puentes disulfuro. La unión de dos moléculas de AMPc a las subunidades R provoca un cambio de conformación en la región bisagra y se liberan en estado activo las dos subunidades catalíticas (C). Adaptado de (190).

2. Vía de las proteínas cinasas

En las últimas décadas se han descrito en diversos tejidos, entre los que se encuentra el páncreas exocrino, mecanismos que incorporan las proteínas tirosinas cinasas y a las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina a la ya larga lista de moléculas que forman parte de las vías de acoplamiento estímulo-efecto. Estas vías de transducción se basan en la actividad enzimática de proteínas tirosinas cinasas, que resulta en la incorporación covalente de un grupo fosfato a una proteína en la cadena lateral de un residuo de tirosina, desde una molécula de ATP que funciona como donante del grupo fosfato (21,196).

La existencia de grupos fosfato unidos a proteínas de forma covalente se conoce desde hace 90 años, la presencia de ésteres fosfato de serinas y treoninas en proteínas fue descrito en 1933 (197). Sin embargo, hasta 1955 no se identificó la primera enzima, la fosforilasa cinasa, capaz de añadir un grupo fosfato a las proteínas para regular su actividad (198,199). El descubrimiento en 1968 de la proteína cinasa dependiente de AMPc, PKA, fue la constatación de que la fosforilación de proteínas podía ser regulada por estímulos extracelulares (en este caso mediante el AMPc, como se ha descrito en el apartado anterior). En los años siguientes ha llegado a ser evidente que la fosforilación es el procedimiento más habitual para la modificación postranslacional de las proteínas (21), y que la fosforilación y defosforilación de proteínas es un proceso fundamental en el control de las funciones celulares (21,196,197).

Fosforilación de proteínas

Uno de los escenarios comunes en la transducción de señales es la alteración de las proteínas que conduce a la modificación de alguna o varias de sus propiedades, por ejemplo su actividad (197). Las modificaciones de las proteínas más habituales se denominan *postranslacionales*, porque se producen una vez que la proteína ha sido sintetizada por la maquinaria ribosomal, aunque algunas de ellas ocurren durante la translación (197). Estas modificaciones crean nuevas formas en algunos residuos de aminoácidos específicos que pueden expandir el repertorio de acciones que una proteína es capaz de desarrollar (27,196,200). La fosforilación es, quizá, la modificación más importante para la fisiología celular que pueden sufrir las proteínas (21,196,197).

El papel de la fosforilación y defosforilación en residuos de serina/treonina en la regulación de la actividad de las proteínas llegó a estar bien establecido mediante investigaciones desarrolladas a finales de la década de los 60 y en la de los 70 (21). Sin embargo, la modificación de las proteínas por fosforilación en residuos de tirosina no fue descubierta hasta 1979, mediante el estudio de los tumores con origen vírico (201-208). La existencia de fosforilación en restos de tirosina en las proteínas víricas transformantes, hizo emerger la hipótesis de que estas fosforilaciones podrían jugar un papel fundamental en el crecimiento incontrolado y los cambios morfológicos inducidos por esas proteínas en las células tumorales. Esta hipótesis fue inmediatamente fortalecida por el descubrimiento de que los receptores para el factor de crecimiento epidermal (EGF-R) (209), para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R) (210) y para la insulina (211), tenían actividad tirosina cinasa intrínseca, que era estimulada cuando se unía el ligando al receptor. En las dos décadas transcurridas desde entonces se ha hecho un enorme progreso en la identificación y regulación de las proteínas tirosinas cinasas.

Cuando una molécula es fosforilada, recibe un grupo γ -fosfato en un proceso catalizado por una proteína cinasa. La fosforilación de una proteína en restos de serina/treonina puede conducir a su activación o a su inhibición (197). Por ejemplo, el factor de transcripción Jun/AP1 contiene lugares de fosforilación en su extremo N-terminal y cerca del lugar de unión con la cadena de ADN. La fosforilación en el primero de ellos por una proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) está implicada en su activación, la fosforilación en la segunda localización por la glicógeno-sintasa cinasa-3 (GSK-3) silencia la actividad de este factor de transcripción (212,213).

Ya se ha indicado que desde los años 70 se tenía constancia de que la fosforilación de una proteína en restos de serina y treonina podía modificar su actividad. Teniendo en cuenta este precedente, era previsible que la fosforilación en tirosina tuviese un efecto equiparable; sin embargo, pasaron bastantes años hasta que se identificaron las primeras proteínas cuya actividad era modificada por fosforilaciones en residuos de tirosina (21). El primer ejemplo lo constituye c-Src (que será estudiada en detalle más adelante), una tirosina cinasa que sufre una fosforilación en un residuo de tirosina cerca del extremo C-terminal, regulando negativamente su actividad (214-216). La segunda constatación de esta regulación fue el descubrimiento de que la PLC γ , como ya se ha indicado en apartados anteriores, es fosforilada en residuos de tirosina en respuesta a la estimulación celular por factores de crecimiento (49,50) y esta fosforilación provoca un incremento en su actividad catalítica (52-54).

Otro factor importante para la regulación de la señalización intracelular dependiente de la fosforilación de proteínas en tirosina es que esta modificación crea unos lugares de unión altamente selectivos para proteínas que contienen dominios que reconocen estas secuencias fosforiladas (por ejemplo dominios SH2 y PTB) (45,217-219), formándose complejos multimoleculares que son capaces de activar otras proteínas (45,196). Debido a que las proteínas fosfatasas eliminan los grupos fosfato de sus sustratos, la presencia de éstas últimas permite intercambiar una proteína, y los complejos que dependen de su estado de fosforilación, entre estados activos e inactivos. Aunque la mayoría de las fosfatasas tienen un rango de sustratos muy amplio, recientemente se han identificado fosfatasas con una alta especificidad para determinadas proteínas fosforiladas (196), como se comentará más adelante.

Otras modificaciones de proteínas

Además de la fosforilación, existe otro tipo de modificaciones, generalmente postranslacionales, en las proteínas que conducen a la alteración de alguna o varias de sus propiedades. Entre estas se destacan las modificaciones lipídicas y las glicosilaciones (26,220).

Las (poli)isoprenilaciones y las acilaciones son las transformaciones lipídicas más habituales en las proteínas (26). Este tipo de modificaciones permite la asociación de las proteínas con las membranas biológicas, porque aportan grupos hidrofóbicos que se insertan en la doble capa de lípidos, anclando la proteína en una posición yuxtamembranal (26,221-223).

La miristilación ($C_{14:0}$) y la palmitilación ($C_{16:0}$), además de la metilación (CH_3-), son las acilaciones más frecuentes en las proteínas. Las isoprenilaciones más habituales son la farnesilación ($C_{15:3}$) y la geranil-geranilación ($C_{10:2}-C_{10:2}$), catalizadas respectivamente por las enzimas farnesil transferasa (FTasa) y geranilgeranil transferasa (GGTasa) (26,27,200,223).

La isoprenilación (también se denota simplemente como prenilación) es una modificación irreversible porque los polímeros de isopreno se añaden a residuos de cisteína de la proteína mediante un enlace tioéter estable (26,200). Por el contrario, la palmitilación es una modificación reversible de las proteínas (por eso se suele encontrar en la bibliografía como *palmitilación reversible*), debido a que las esterificaciones que unen el palmitato con los grupos tiol de cisteínas (tioacilación) son relativamente inestables (26,200).

La palmitilación está limitada a un pequeño grupo de proteínas celulares de señalización, entre las que se encuentran receptores acoplados a proteínas G, subunidades de proteínas G heterotriméricas, Ras (que también sufre isoprenilación), la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la adenilato ciclasa y tirosinas cinasas citoplasmáticas (200,224). A menudo las palmitilaciones se encuentran cerca de otras modificaciones lipídicas (como miristilaciones o isoprenilaciones) o adyacentes a tramos hidrofóbicos de aminoácidos que constituyen hipotéticos dominios transmembranales de proteínas (200,225).

La miristilación más habitual está catalizada por la N-miristil transferasa (NMT), y se restringe a un residuo de glicina en el extremo N-terminal de la cadena peptídica (26,27). Las proteínas que sufren este tipo de transformación se encuentran en las vías de señalización clásicas, como la PKA, una isoforma de la NOS, la NADH-citocromo b5 reductasa, y la mayoría de las subunidades α de proteínas G heterotriméricas, entre otras (25-27). También puede encontrarse esta modificación lipídica en proteínas localizadas en las vías de señalización que regulan los procesos de transformación, como Fyn, Lyn, Src, Hck; en proteínas estructurales, como Gag; y en proteínas de retrovirus, como el VIH, o de virus de otras familias (27).

Por último, la glicosilación es otro tipo de modificación postranslacional que puede modificar la actividad de una proteína. Entre todas las glicosilaciones posibles, destaca la unión reversible de N-acetilglucosamina a residuos de serina y treonina, que parece ser importante para el ensamblaje de complejos de proteínas, actuando como un antagonista de la fosforilación: la glicosilación y la fosforilación pueden competir por los mismos residuos de aminoácidos en muchas proteínas (220,226).

Las proteínas cinasas

Los enzimas pertenecientes a la superfamilia de las proteínas cinasas se clasifican atendiendo a su especificidad en serina/treonina cinasas (fosforilan residuos de serina o treonina), tirosinas cinasas (fosforilan residuos de tirosina) y proteínas cinasas con doble especificidad o duales (pueden fosforilar tanto residuos de serina y treonina como de tirosina) (227-229). Existe una excepción a esta clasificación, son las histidina cinasas identificadas en procariotas. Éstas se autofosforilan en residuos de histidina y fosforilan residuos de aspartato en sus sustratos (230). En las mitocondrias de organismos superiores existen algunas proteínas cinasas (por ejemplo, las piruvato

deshidrogenasa cinasas) que, aunque fosforilan proteínas en residuos de serina, están muy relacionadas estructuralmente con las histidina cinasas y se han encuadrado en esa familia (231).

Las proteínas cinasas convencionales se relacionan en virtud a su dominio catalítico que se compone de unos 260 aminoácidos. Todas las proteínas cinasas presentan en común secuencias homólogas en este dominio, basándose en este hecho Hanks y cols. han sugerido que todas ellas derivan de un único gen ancestral (227,228). Después de la obtención de la estructura cristalizada de varias proteínas cinasas en estado activo y/o inactivo, se han analizado y comparado estructural y mecánicamente dichos cristales (232,233). Estos estudios concluyen que, aunque las serina/treonina cinasas y las tirosinas cinasas difieren en los residuos a los que transfieren los grupos fosfato, sus dominios catalíticos parecen tener muchas características comunes y un modo de acción básicamente idéntico (233,234).

En términos evolutivos, las verdaderas proteínas tirosinas cinasas (PTKs) no emergen antes de la aparición de los metazoos, esta circunstancia está en concordancia con el hecho de que la función principal de las PTKs sea la comunicación intercelular, un proceso de necesidad limitada en protozoos (21,228).

La explicación de porque la fosforilación en tirosina, en oposición a la fosforilación en serina/treonina, ha evolucionado como un mecanismo de señalización intracelular no es muy evidente, si se tiene en cuenta que la estabilidad química de la fosforilación en serina/treonina y en tirosina son equivalentes a pH fisiológico (21,228). Sin embargo, los recambios que efectúan las proteínas tirosina fosfatasas (PTP) son muy altos, y esta propiedad, en combinación con la escasa regulación negativa de la actividad PTK, implica que la mayoría de sustratos de las PTKs tienen una fosforilación en tirosina basal muy baja, lo que constituye un requerimiento crítico para un sistema de señalización, que necesita una ganancia máxima (21,228).

Este factor, aún siendo necesario, no parece un motivo suficiente para desarrollar evolutivamente un sistema de señalización independiente, por lo tanto debieron existir otras razones para la adopción de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina como mecanismo de señalización intracelular (21). Una de las más plausibles puede encontrarse en la evolución paralela de los dominios que unen con una alta especificidad residuos fosforilados en tirosina en una secuencia contexto (SH2, PTB), facilitando con ello interacciones proteína-proteína específicas e inducibles en las vías de señalización. La fosforilación en tirosina podría haber sido seleccionada para este propósito, porque la cadena lateral aromática del residuo de tirosina fosforilado proporciona

una energía de unión significativamente superior comparada con la proporcionada por la cadena lateral alifática de los residuos de serina o treonina fosforilados (21,228). Esto por sí sólo bastaría para justificar evolutivamente un nuevo principio en la señalización celular por fosforilación de proteínas en residuos de tirosina (21,228).

Las tirosinas cinasas

El dominio catalítico de las tirosinas cinasas está compuesto por 250–300 aminoácidos (generalmente unos 260) y contiene 12 subdominios denotados por números romanos (196,228,229). Presentan en común entre sí, y con el resto de proteínas cinasas, secuencias homólogas muy conservadas en este dominio. Las bases estructurales para explicar la activación de las tirosinas cinasas han sido establecidas mediante la comparación de las estructuras cristalizadas de las formas activas e inactivas (fosforiladas y no fosforiladas) del dominio catalítico del receptor de la insulina (232,233,235,236).

Como en todas las proteínas cinasas, el dominio catalítico se organiza en dos estructuras lobulares separadas por el subdominio V. El pequeño lóbulo N-terminal (subdominios I–IV) está implicado en la unión y orientación del ATP. El lóbulo C-terminal (subdominios VIa–XI) es de mayor tamaño, y es el responsable de la unión del sustrato y del proceso de fosfotransferencia. La profunda hendidura localizada entre ambos lóbulos es el lugar de catálisis (233,235). Existe flexibilidad entre los dos lóbulos del dominio catalítico en respuesta a la unión del sustrato, en un proceso denominado “mecanismo de ajuste inducido” (*induced fit mechanism*) (232). Este mecanismo, que ha sido precisado completamente, supone la transición conformacional del dominio catalítico desde el estado abierto (inactivo) al estado cerrado (activo) por interacción con el sustrato, e implica, generalmente, (auto)fosforilaciones en el *asa de activación* del dominio catalítico, como se describe a continuación (196,232).

Así, la fosforilación del dominio catalítico de las tirosinas cinasas es un proceso necesario en la mayoría de los casos para desarrollar su actividad enzimática completa (57,196,229,233,237). Estas fosforilaciones, que permiten la correcta disposición de los dos lóbulos del dominio catalítico, se producen en la región central del *asa de activación*, localizada entre los subdominios VII y VIII. La fosforilación de este dominio puede producirse por dos fenómenos: autofosforilación o por mediación de una proteína cinasa reguladora (21,196). En otros casos la fosforilación de determinadas regiones del dominio catalítico puede conducir a la inhibición de la actividad enzimática de la proteína; en este

caso, la defosforilación de este dominio por acción de una fosfatasa reguladora es necesaria para su activación (21,196,197).

Un gran número de tirosinas cinasas, especialmente aquellas que están reguladas por mensajeros intracelulares, poseen un dominio regulador que se dispone sobre el dominio catalítico, impidiendo de este modo que el sustrato pueda acceder a estas regiones. La unión del segundo mensajero con el dominio regulador modifica la conformación de la proteína, lo que ocasiona que el dominio catalítico quede accesible y la proteína esté activa (196,229,237). Este hecho explica porqué la proteólisis en residuos específicos de algunas tirosinas cinasas provoca su activación (237,238).

Además, las proteínas tirosinas cinasas generalmente presentan a lo largo de su estructura molecular dominios SH2 y SH3, que les permiten establecer relaciones con sus sustratos (43,44). Los dominios SH2 tienen afinidad por proteínas que poseen residuos de tirosina fosforilados, en tanto que los SH3 tienen afinidad por aquellas que contienen secuencias de aminoácidos ricas en prolina, abundantes en proteínas del citoesqueleto (43-45,196,217).

Las tirosinas cinasas se subdividen en dos clases: *tirosinas cinasas no receptor* y *receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca* (o tirosinas cinasas que actúan como receptores de membrana) (21,227,239). La mayor parte de las tirosinas cinasas no receptor tienen una localización citoplasmática (por ello en ocasiones se denominan *tirosinas cinasas citoplasmáticas*, creemos que erróneamente), pero una fracción minoritaria puede encontrarse tanto en el citoplasma como en el núcleo (por ejemplo, c-Abl) (21). Además, aunque las tirosinas cinasas no receptor no atraviesan la membrana plasmática, aparecen en muchas ocasiones ancladas en las membranas biológicas (por ejemplo, c-Src) (229,240) y también pueden asociarse con receptores de membrana (21,229).

Muchas de las tirosinas cinasas no receptor tienen un importante papel en la transducción de señales, en particular miembros de las familias de Src, JAK, y FAK están directamente implicados en la señalización transmembranal y pueden actuar como unidades catalíticas de receptores de superficie que han perdido la actividad catalítica intrínseca (21,229,237,241).

El grupo de cinasas que actúan como receptores de membrana puede ser activado por la insulina y péptidos relacionados, y por los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), entre otros (21,227).

Entre los procesos más estudiados en los que participan las tirosinas cinasas, se encuentran aquellos que acontecen tras la ocupación de los receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca. El proceso de activación de estos receptores será abordado posteriormente, pero adelantaremos que la unión del factor de crecimiento al dominio externo del receptor origina, tras un proceso de dimerización del mismo, en la mayoría de las ocasiones, la autofosforilación de dominios intracelulares en residuos de tirosina. Éste se comporta entonces como activador de un complejo multimolecular que incluye un gran número de proteínas con actividad enzimática, entre las que se encuentran la fosfolipasa C γ (PLC γ), la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-K) y numerosas proteínas que actúan a modo de adaptadores proteicos (Shc, Grb2, etc.) (21,56,196).

Las tirosinas cinasas de ambas categorías pueden ser activadas, además, por receptores sin actividad enzimática, como los receptores acoplados a proteínas G de membrana, según se describirá más adelante, y por una gran variedad de productos de los oncogenes (7,13,20,242,243).

Como ya se ha comentado, se sabe que ambos grupos de tirosinas cinasas, receptor y no receptor, participan en la transducción de señales de múltiples orígenes y desempeñan un papel muy importante en el crecimiento, división y proliferación celular y en la repuesta al estrés ambiental (21,196,244-246). Frecuentemente se identifican nuevas tirosinas cinasas, o nuevas funciones para las ya conocidas, que las relacionan los más diversos procesos celulares. Así, se ha demostrado la participación de tirosinas cinasas en el establecimiento de las sinapsis neuromusculares (247,248), en la regulación del ciclo celular, a través de la inhibición por fosforilación en tirosina de la proteína cinasa reguladora dependiente de ciclina, Cdc2 (249,250), en las interacciones célula a célula, a través de los receptores denominados cadherinas que se asocian con miembros de la familia de tirosinas cinasas Src (216,241), en la regulación de la actividad de factores de transcripción, mediante la fosforilación en tirosina por miembros de la familia de PTKs Abl (251,252). Las tirosinas cinasas también actúan en muchas otras funciones en los más diversos tipos celulares, como la activación de las plaquetas (253,254), la degranulación de mastocitos (255-257), la reabsorción ósea por osteoclastos (258,259), la regulación de canales iónicos (260,261), la regulación de los receptores de Ins(1,3,4)P₃ en el retículo endoplásmico (ER) (262), y muchas otras. También se ha propuesto la participación de las tirosinas cinasas en la regulación de la secreción pancreática exocrina (16,263,264).

Todos los mecanismos en los que intervienen las PTKs están muy interrelacionados y constituyen un campo científico de enorme expansión, en el que se descubren continuamente nuevos procedimientos y

tratamientos que activan una u otra vía de señalización intra o intercelular dependientes de las PTKs (196). En realidad, es casi imposible identificar una intervención en las células que no active de alguna manera las vías de señalización de las MAP cinasas (especialmente la cascada ERK), que son iniciadas por PTKs (63). Sin embargo, las respuestas celulares *in vivo* parecen ser más específicas (196). También es objeto de debate el hecho de que diferentes tipos celulares pueden interpretar las mismas señales dependientes de las PTKs, con un resultado totalmente diferente. Parece que la explicación radica en la existencia de diferentes *potenciales nucleares* en cada tipo celular, que estarían predeterminados por la constelación de factores de transcripción expresados (21). Otras evidencias indican que la duración y la intensidad de la señal pueden jugar un importante papel en la especificidad de las respuestas celulares (265).

Hasta el momento se han identificado al menos 10 familias de tirosinas cinasas no receptor y 14 familias de receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca; además, se ha descrito la existencia de varias tirosinas cinasa que no parecen pertenecer a ninguna de estas (229,239). A continuación describimos las características de algunas tirosinas cinasas de ambos tipos, comenzando por las tirosinas cinasas no receptor de la familia Src.

2.1. Tirosinas cinasas no receptor

2.1.1. Tirosinas cinasas de la familia Src

La proteína tipo de la familia Src de tirosinas cinasas fue identificada inicialmente como la proteína vírica transformada (sarcosina vírica o v-Src) ⁽²⁾ codificada por el retrovirus con capacidad oncogénica, denominado virus del Sarcoma de Rous (RSV) (203,204). La tirosina cinasa v-Src es una variante mutante, constitutivamente activada y con

⁽²⁾ En la nomenclatura de la tirosina cinasa Src encontramos los siguientes términos:

c-src: proto-oncogen celular que codifica Src.

Src, ó **p60^{c-src}**, ó **c-Src**: tirosina cinasa sarcosina, producto celular del proto-oncogen src.

v-src: oncogen que codifica v-Src, encontrado en el genoma del virus del sarcoma de Rous, producto de la mutación del proto-oncogen src.

v-Src, ó **p60^{v-src}**: tirosina cinasa sarcosina constitutivamente activada, producto del oncogen v-src.

capacidad transformante, de la tirosina cinasa celular c-Src (también denominada Src o p60^{c-Src}), codificada por el proto-oncogen celular c-src (241). La variante celular se expresa de forma ubicua y está muy conservada a lo largo de la evolución (241,266). Un punto de inflexión para el reconocimiento de las funciones atribuidas a esta proteína fue el descubrimiento de que Src posee actividad tirosina cinasa (201,202,206,207). Como se ha comentado anteriormente, este descubrimiento disparó la búsqueda de proteínas tirosinas cinasas relacionadas y los estudios acerca de las funciones de la forma viral y celular de Src en el control de la diferenciación y crecimiento celular (21,241,267). En este apartado nos extenderemos en el estudio de la familia Src como ejemplo de tirosinas cinasas no receptor. Los conocimientos actuales acerca de esta familia de PTKs se encuentran revisados en las citas (266) y (241).

Se han identificado 10 proteínas que contienen características estructurales similares a Src y una homología en la secuencia primaria de aminoácidos muy elevada. Estas son Fyn, Yes, Yrk, Blk, Fgr, Hck, Lck, Lyn, y la subfamilia de proteínas Frk: que está formada por Frk/Rak y Iyk/Bsk (241,266).

Las investigaciones realizadas con Src y las proteínas relacionadas permitieron implicar a estas tirosinas cinasas, en la regulación de numerosos procesos celulares, además de la proliferación celular; por ejemplo, conformación del citoesqueleto, diferenciación, supervivencia celular, adhesión y migración (241,266). Este amplio abanico de funciones es consecuencia de la capacidad de estas cinasas de interactuar con diversos receptores celulares y con una miríada de sustratos diferentes (241,266).

Las PTKs de la familia Src pueden ser subdivididas en tres grupos atendiendo a su patrón de expresión (*Tabla I-1*). Src, Fyn y Yes se expresan en mayor o menor medida en todos los tejidos; sin embargo, algunas de esas cinasas tienen diferentes niveles de expresión en determinados tipos celulares. Por ejemplo, Src es ubicua, pero las plaquetas, neuronas y osteoclastos expresan esta PTK con niveles 5 a 200 veces más elevados, comparado con otros tipos celulares (241,266). La tirosina cinasa Yrk también pertenece a este grupo; aunque sólo se ha localizado en el pollo, aparece distribuida de forma ubicua por los diferentes tejidos (241,266).

El segundo grupo de PTKs de la familia Src, que está integrado por Blk, Fgr, Hck, Lck y Lyn, se ha encontrado fundamentalmente en células hematopoyéticas (268). Lck y Lyn también han sido detectados en neuronas, dónde podrían desempeñar funciones aún no identificadas

(241). Como en el caso de Src y Fyn, se han identificado isoformas alternativas de algunas de estas PTKs (241).

Tipo	Distribución
Src	Ubicua, dos formas específicas en neurona
Fyn	Ubicua, formas específicas en células T
Yes	Ubicua
Yrk ^(*)	Ubicua
Lyn	Cerebro, células B, células mieloides, páncreas
Hck	Células mieloides
Fgr	Células mieloides, células B
Blk	Células B
Lck	Células T, células T supresoras, cerebro
Subfamilia Frk	Primariamente en células epiteliales
Frk/Rak	
Iyk/Bsk	

Tabla I-1. Distribución de las tirosinas cinasas de la familia Src.
(*) esta proteína sólo se ha encontrado en pollos. Modificado de (241).

Las tirosinas cinasas relacionadas con Frk constituyen una subfamilia dentro de la familia Src. Este subgrupo contiene a dos proteínas: Frk/Rak y Iyk/Bsk (241). Las tirosinas cinasas Frk y Iyk comparten homología en todas las regiones, incluida la *región única*, y se expresan mayoritariamente en células epiteliales y sus derivados (269,270).

Estas observaciones indican que todas las células parecen expresar múltiples miembros de la familia de PTKs Src (241,266). Adicionalmente a la expresión diferencial, se ha descrito que estas cinasas se pueden encontrar en localizaciones subcelulares muy diferentes. Por ejemplo, Src ha sido encontrado en el sistema caveolar, en las adhesiones focales y en los endosomas, mientras que otros miembros de esta familia, por ejemplo Fgr y Frk, se han identificado en el núcleo (258,270,271).

Estructura funcional de Src

Las tirosinas cinasas de la familia Src son proteínas de 52–62 kDa compuestas por seis regiones funcionales distintas (Gráfico I-5): (a) el dominio con homología Src 4 (*Src homology 4*, SH4), (b) la *región única*, (c) el dominio SH3, (d) el dominio SH2, (e) el dominio catalítico, y (f) una pequeña región C-terminal que regula negativamente la actividad de Src (241,266).

El dominio SH4 es una secuencia de 15 aminoácidos que contiene información para la modificación por lípidos de las PTKs de la familia Src (272). El residuo de glicina en la posición 2 es importante para la acilación con ácido mirístico, modificación que ocurre durante la translación y de la que depende la capacidad de Src de asociarse con las membranas celulares. Este residuo está ausente en Frk(269), pero si se encuentra en Iyk (241). Además, los residuos de cisteína en el dominio SH4 sufren palmitilación (272).

Después del dominio SH4 se encuentra la *región única* (Gráfico I-5), que, como su nombre indica, es diferente para cada miembro de la familia. Se ha propuesto que esta *región o dominio único* es importante para establecer las interacciones con receptores o proteínas que son específicas para cada tirosina cinasa de esta familia (241,266).

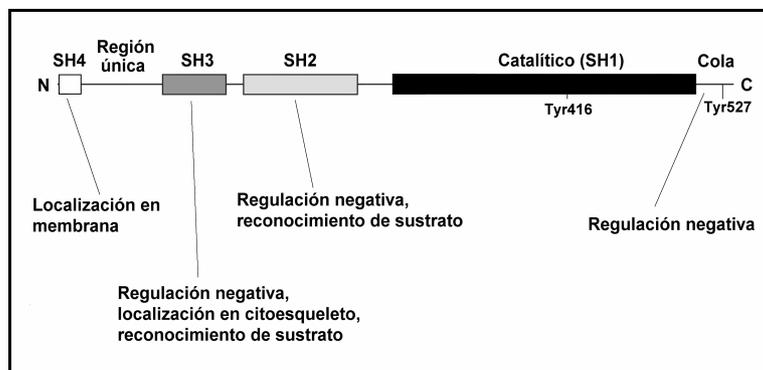


Gráfico I-5. Representación esquemática de la estructura de Src. Las proteínas de la familia Src presentan en su estructura tres dominios con homología Src (SH2, SH3 y SH4), además de una región única, variable entre las diferentes tirosinas cinasas de esta familia. En el extremo C-terminal se encuentra una cola reguladora con un residuo de tirosina (Tyr527) que sufre fosforilación y defosforilación, modificando la actividad de estas cinasas. También presentan, por último, un dominio catalítico (SH1) muy conservado, donde se localiza un residuo de tirosina (Tyr416) susceptible de autofosforilación. Adaptado de (241) y de (266).

Los dos dominios con homología Src (SH) que siguen a la región única, SH3 y SH2 (*Gráfico I-5*), constituyen estructuras modulares encontradas en muchas clases de proteínas (43,45,273). Estos dominios permiten la unión regulada y específica con otras proteínas, y están presentes en cinasas y fosfatasas de proteínas y lípidos, proteínas del citoesqueleto, proteínas adaptadoras, factores de transcripción, y en otras muchas (*véase pág. 59*) (45,241).

Los dominios SH3 de las PTKs de la familia Src están compuestos por unos 50 aminoácidos (43,241). Este dominio es importante para interacciones intra e intermoleculares que regulan la actividad catalítica de Src, para su emplazamiento y para la incorporación o reclutamiento de sustratos (44,241,274). SH3 une secuencias cortas de aminoácidos contiguos con abundante prolina (43,45,275). El segundo dominio modular que controla el repertorio de proteínas que interactúan con la familia Src es el dominio SH2 (45,275). Las interacciones y asociaciones mediadas por el dominio SH2 intervienen en la regulación de la actividad catalítica de estas PTKs, además permiten modificar la localización de Src o de sus proteínas de unión (45,241,266). Todos los dominios SH2 reconocen y unen secuencias cortas conteniendo residuos de tirosina fosforilada (45).

Algunos ejemplos de proteínas que interactúan *in vivo* e *in vitro* con PTKs de la familia Src, mediante dominios SH2 y SH3, incluyen la subunidad p85 de la PI3-K (276), las proteínas del citoesqueleto paxilina (277,278), p125^{FAK} (279,280), p130^{CAS} (281,282) y PYK2/CAK β (283), y la isoforma δ de la PKC, una serina/treonina cinasa que presenta fosforilación en residuos de tirosina (284,285).

El dominio catalítico (también denominado SH1) (*Gráfico I-5*) posee actividad proteína cinasa específica de tirosina (241,266). El dominio catalítico presente en las tirosinas cinasas Src está muy conservado entre las PTKs de la familia y, además, tiene una elevada homología con tirosinas cinasas de otras familias (266). Este dominio es necesario y suficiente para la actividad tirosina cinasa de estas proteínas, según se ha demostrado mediante la construcción de mutantes defectivos (216). También juega un importante papel en la regulación de la especificidad de sustrato (216,266).

Por último, las PTKs de la familia Src presentan una extensión C-terminal de 15–17 residuos adyacentes al dominio cinasa (*Gráfico I-5*) (266). Todas las colas o extensiones proteicas de estas cinasas presentan una secuencia muy conservada que contiene un residuo de tirosina (Tyr 527 en c-Src) en posición constante (215,286,287). Este residuo es un importante lugar de fosforilación en la proteína y, como se discutirá en

el siguiente apartado, tiene importantes implicaciones funcionales para las tirosinas cinasas de esta familia (241,266,286).

Activación de las PTKs de la familia Src

Los dominios SH2 y SH3 juegan un papel muy importante en la regulación de la actividad catalítica de Src (216,241,266). Como en el caso del receptor de la insulina, los cristales de alta resolución de las tirosinas cinasas Src y Hck, en su estado inactivo, han permitido establecer un modelo estructural, que es capaz de explicar las interacciones moleculares entre dominios que permiten estabilizar la conformación inactiva de las cinasas Src (*Gráfico I-6*) (217,287-289).

Gracias a estos estudios se ha establecido que las dos secuencias que flanquean la superficie hidrofóbica de unión del dominio SH3 contactan con el dominio catalítico y que el dominio SH3 interactúa con secuencias de la región de conexión que se encuentra entre los dominios SH2 y catalítico (*Gráfico I-6*) (287,289). Las interacciones descritas con la región de conexión y con el dominio catalítico parecen ser responsables de la regulación negativa en la actividad catalítica de la cinasa que depende del dominio SH3 (241,266).

Por su parte, el dominio SH2 interactúa con el residuo de tirosina fosforilado 527 (para c-Src) y con los residuos adyacentes, situados en la cola de la proteína en el extremo C-terminal, interacción que regula negativamente la actividad de la cinasa (*Gráfico I-6*) (266). La Tyr 527, y los residuos equivalentes para otras cinasas de la familia, es fosforilada por una tirosina cinasa citoplasmática, denominada cinasa C-terminal de Src (Csk) (215,216,229,241,290,291). Existen múltiples evidencias que indican que la defosforilación del residuo Tyr 527 permite la activación de c-Src: (a) la mutación de esta tirosina resulta en la activación constitutiva de la proteína cinasa (286,292); (b) este aminoácido y algunos que lo rodean se han perdido en v-Src, que presenta actividad constitutiva. La eliminación experimental de estos mismos residuos en c-Src provoca la activación de la proteína (293); (c) la eliminación del gen csk, que codifica la cinasa que fosforila c-Src en la Tyr 527, se asocia con la activación de al menos tres tirosinas cinasas de la familia Src (294,295). Estos y otros resultados apoyan las relaciones moleculares propuestas en el modelo tridimensional de Src entre la cola y el dominio SH2 (*Gráfico I-6*). En este modelo la fosforilación de la tirosina 527, mediada por la tirosina cinasa Csk, promueve una interacción intramolecular entre el dominio SH2 y la cola de la proteína fosforilada, manteniendo la cinasa en una conformación cerrada inactiva (241,266).

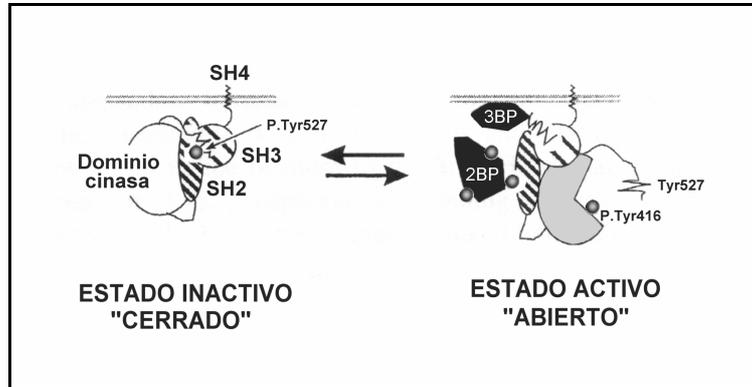


Gráfico I-6. Modelo de los dos estados conformacionales de Src. La tirosina cinasa Src puede adoptar una conformación cerrada o inactiva (izda.); o una conformación abierta o activa. Estado abierto presenta los dominios SH2 y SH3 accesibles para otras proteínas. Por el contrario, en el estado cerrado el dominio SH2 está asociado con la tirosina 527 fosforilada del extremo C-terminal, mientras que el dominio SH3 interacciona con el dominio catalítico, de forma que ambos dominios SH son inaccesibles para otras proteínas. La relación entre los dos estados conformacionales de la tirosina cinasa está desequilibrada en favor del estado cerrado si la tirosina 527 está fosforilada, y si las proteínas de unión para los dominios SH2 y SH3 no están presentes. El desequilibrio hacia el estado abierto se produce cuando la Tyr 527 está defosforilada, o si las proteínas de unión para los dominios SH2 y SH3 compiten con estructuras de Src que mantienen el estado cerrado. El estado abierto puede ser completamente estabilizado por la (auto)fosforilación del residuo de tirosina 416. Adaptado de (241) y de (266).

Al igual que en el caso del receptor de la insulina (235,236), en las PTKs de la familia Src también se detecta autofosforilación en residuos de tirosina del dominio catalítico, concretamente en el residuo de tirosina 416 para c-Src (Gráfico I-6), y residuos equivalentes para otras cinasas de la familia (216,241,266). Este residuo de tirosina no aparece fosforilado en la forma inactiva de c-Src nativa, pero está constitutivamente fosforilado en mutantes de Src oncogénicos (215,286,296,297). La fosforilación en el residuo de tirosina 416 podría estar implicada en revertir el efecto inhibitorio en la actividad catalítica de la cinasa dependiente del residuo no fosforilado y en estabilizar la estructura del dominio catalítico (266). Además de permitir la activación completa de c-Src, se piensa que la autofosforilación en la tirosina 416 (o residuos equivalentes) puede constituir un lugar de unión para dominios SH2 de otras proteínas, por ejemplo Csk, la tirosina cinasa reguladora de Src (241,266).

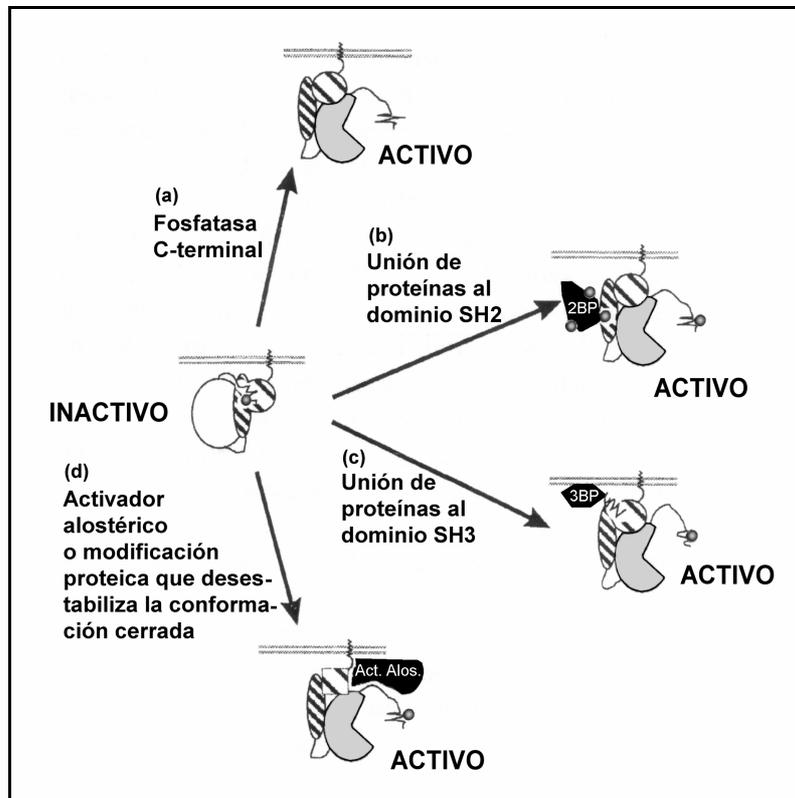


Gráfico I-7. Mecanismos de activación de Src. El estado cerrado inactivo de Src puede pasar a un estado abierto activo por (a) defosforilación del residuo Tyr 527 por una fosfatasa; (b) mediante la unión de una proteína con el dominio SH2 (2BP); (c) por la unión de una proteína con el dominio SH3 (3BP); (d) o mediante un activador alostérico que afecte indirectamente la capacidad de Src para mantener la conformación inactiva, por ejemplo comprometiendo la relación entre los dominios SH2, SH3 y la cola fosforilada. Cada uno de los efectores descritos desestabiliza la conformación cerrada hacia el estado activo; subsiguientemente se produce una defosforilación en el residuo Tyr 527 y reacciones de unión mediante los dominios SH2 y SH3 con otras proteínas; el orden de la defosforilación y de los eventos de unión puede diferir. Dicho de otro modo, el estado final activo de Src es indistinguible independientemente del proceso que haya desencadenado su activación. Adaptado de (241) y de (266).

Por lo tanto, y a modo de resumen, la fosforilación de la Tyr527 en el extremo carboxilo de Src (y residuos equivalentes en otras cinasas de la familia), por la tirosina cinasa C-terminal de Src (Csk), permite establecer una interacción intramolecular con el dominio SH2, que es estabilizada por una segunda interacción entre el dominio SH3, el dominio catalítico y la región de conexión, situada entre los dominios SH2 y catalítico (Gráfico I-6 y Gráfico I-7) (241,266). Estas relaciones intramoleculares mantienen a las PTKs de la familia Src en una

conformación cerrada inactiva (241,266). Se han descrito cuatro mecanismos por los que estas tirosinas cinasas pueden ser activadas, pasando a una conformación abierta (*Gráfico I-6* y *Gráfico I-7*): (a) defosforilación de la cola por una tirosina fosfatasa (CD45, RPTP α , SHPTP2/syp); (b) unión con alta afinidad entre el dominio SH2 de Src y un ligando fosforilado en tirosina; (c) competición por el dominio SH3 de Src por un ligando con alta afinidad que contenga secuencias ricas en prolina; (d) activación alostérica o modificación proteica que desestabilice la conformación cerrada (fosforilación en residuos de Ser/Thr de la región única, por ejemplo) (241,266).

Importancia funcional de los dominios SH

Una vez activada, Src ejerce múltiples funciones en la célula. Para desarrollar la mayor parte de estas funciones las PTKs de la familia Src necesitan un dominio cinasa funcional, por lo que parece que en sus funciones biológicas está implicada la fosforilación de sustratos (298). También está bien establecido que para ejercer su actividad Src precisa una región SH4 intacta, que le permite una localización en las membranas biológicas (299).

Sin embargo, la necesidad de los dominios SH2 y SH3 en la funcionalidad de Src y cinasas relacionadas no está completamente establecida. Por una parte, se ha demostrado que mutaciones puntuales de aminoácidos, inserciones o deleciones en esos dominios, reducen la capacidad transformante de la forma activa de Src en fibroblastos de diferentes orígenes, o afectan a la morfología de las células transformadas (300-302). Sin embargo, todos estos efectos no son universales. Así, existen mutaciones que reducen la transformación de células procedentes de una especie animal, pero no de otra, hecho que sugiere que los efectos transformantes de Src requieren la interacción con proteínas específicas que son más abundantes, o que presentan estructuras alteradas, en una especie animal frente a otra (266). En definitiva, los estudios que relacionan mutaciones de los dominios SH2 y SH3 con cambios específicos de hospedador o fenotipos morfológicos, parecen otorgar un papel fundamental en la funcionalidad de Src a estos dominios (266), que estarían implicados en establecer relaciones proteína-proteína para localizar a Src en un territorio subcelular determinado o dirigir a esta tirosina cinasa hacia sustratos específicos (266).

En estudios recientes se han aportado más evidencias sobre la importancia funcional de los dominios no catalíticos en los mecanismos biológicos controlados por Src. En estos estudios, desarrollados acerca de

la función de las PTKs Src en los procesos de señalización dependientes de integrinas y en osteoclastos, se ha demostrado que los dominios de unión SH2 y SH3 de las cinasas Src (y posiblemente el dominio único), en algunas ocasiones permiten actuar a estas tirosinas cinasas como proteínas adaptadoras, independientemente de la actividad catalítica (241,266,303,304).

Sustratos de las tirosinas cinasas de la familia Src

Existe una larga lista de sustratos de las tirosinas cinasas de la familia Src, que incluye proteínas con funciones muy diversas, muchas de las cuales se unen y son fosforiladas por estas cinasas, mientras que a otras se les atribuye este papel porque muestran un elevado nivel de fosforilación en células transformadas por Src, pero no se ha demostrado una interacción directa con la tirosina cinasa (241,266). La mayoría de las proteínas encuadradas en este segundo grupo podrían ser fosforiladas en tirosina directamente, pero no es descartable que algunas de ellas sean sustratos para otras tirosinas cinasas activadas por Src en células transformadas (241,266).

Los sustratos de Src se pueden agrupar en dos clases, más o menos delimitadas, dependiendo de si estos sustratos también son fosforilados tras la activación de las tirosinas cinasas que funcionan como receptor (RPTKs), o no lo son; es decir, dependiendo de si están implicados en las señales mitogénicas activadas por los receptores de factores de crecimiento o no lo están (241,266).

En el primer grupo se encuentra la PLC γ , la p120^{Ras-GAP} (o Ras-GAP), la tirosina fosfatasa SHPTP2, la proteína adaptadora Shc y la subunidad p85 o subunidad reguladora de la PI3-K (241,266,305). La participación de estos sustratos en las vías de señalización dependientes de la ocupación de las tirosinas cinasas unidas a receptor será descrita posteriormente. Parece que Src y los receptores de factores de crecimiento actúan coordinadamente en esas proteínas para desarrollar el repertorio de funciones asociadas con la activación de estos últimos (241,266). Las conexiones bioquímicas entre los diferentes RPTKs y la familia Src son múltiples e incluyen la fosforilación y la activación de las tirosinas cinasas Src por los primeros, su asociación con los RPTKs y la fosforilación de los RPTKs por c-Src y proteínas afines (241,266,305-310).

La segunda clase de sustratos está formada por aquellas proteínas que no parecen sustratos directos de los RPTKs. Entre estos se encuentran la proteína p110 asociada con filamentos de actina (AFAP110), la cortactina, la tirosina cinasa de adhesión focal p125 (p125^{FAK}), la paxilina,

la tensina, la talina, la vinculina, las proteínas p130^{CAS} y p120^{CAS}, las conexinas, la PKC- δ y la proteína Sam68, entre otras (241,266,311-315). Estas proteínas están implicadas mayoritariamente en la organización del citoesqueleto y las placas de adhesión focal, los contactos célula a célula, los contactos célula–sustrato, la comunicación célula a célula, en las señales de supervivencia–apoptosis celular y en modificaciones del ARN (21,229,241,266,316-320).

Funciones biológicas de las tirosinas cinasas Src

La diversidad de sustratos que unen y/o fosforilan las PTKs de la familia Src y, consecuentemente, la diversidad de actividades biológicas dependientes de estas cinasas se complica aún más si se tiene en cuenta que muchos de los sustratos de Src también participan en la regulación de actividades biológicas múltiples (21,241,266). Por ejemplo, la PI3-K ha sido implicada en la regulación de la síntesis de ADN, en la supervivencia y apoptosis celular, en la diferenciación, en la protrusión de lamelipodios, en la quimiotaxis y migración, en la adhesión y en el crecimiento neural (321). De forma similar, la fosforilación de Shc y la subsiguiente activación dependiente de Ras de la vía de señalización intracelular de las MAPK, ha sido relacionada con la inducción de la síntesis de ADN, la migración, la maduración de ovocitos, la mitosis y el crecimiento neural (164,322-324).

Por los motivos descritos se hace difícil la discusión de los efectos individualizados e independientes de los miembros de la familia Src, teniendo en cuenta, además, que muchas de las funciones de estas cinasas son redundantes en muchos tipos celulares, de forma que la eliminación de una de ellas puede ser suplantada por otra (21,241,266). En general, se considera que estas tirosinas cinasas ejercen sus efectos fundamentalmente en dos niveles de la biología celular que, por otra parte, están muy interrelacionados (241,266). En primer lugar, Src y las tirosinas cinasas afines se encuentran en las vías intracelulares implicadas en el control de la progresión del ciclo celular (modificando la síntesis de ADN y la transición de fase G2/M del ciclo celular), en la diferenciación y desarrollo, en la apoptosis y en la transcripción génica (241,266). En segundo lugar, y probablemente de forma coordinada con las anteriores, las PTKs de la familia Src intervienen en la reorganización del citoesqueleto de actina, fundamentalmente en las placas de adhesión focal, que modificaría las capacidades celulares de adhesión y crecimiento en extensión (*spreading*), la lamelipodia, la migración celular y las interacciones célula-célula y célula-sustrato (241,266).

Síntesis de ADN

Respecto al primer grupo de funciones, se ha implicado a miembros de la familia Src con la regulación de la síntesis de ADN mediante la activación de múltiples mecanismos, que, entre otros, incluirían la fosforilación de Shc (que permite la activación de las cascadas de las MAP cinasas), la activación de la PI3-K y la fosforilación y/o activación de los receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca (RPTKs) (241,266,325-327).

Así, se ha evidenciado que las tirosinas cinasas Src intervienen en los mecanismos puestos en juego por los RPTKs para estimular la síntesis de ADN, mediante la microinyección celular del genoma que codifica una forma cinasa inactiva de Src o Fyn (328) o de un anticuerpo neutralizante para Src, Fyn y Yes (329), demostrándose que estos tratamientos inhiben la síntesis de ADN inducida por el EGF y el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1) (329). Otros autores han establecido que la estimulación de la transcripción dependiente de c-Myc inducida por la ocupación del PDGF-R requiere la participación de Src, Fyn y Yes (330), debido a que este proceso es bloqueado por anticuerpos que neutralizan esas PTKs y a que la inhibición de la síntesis de ADN por los anticuerpos neutralizantes puede revertirse con la expresión exógena de dicho factor de transcripción (330).

Transición G2/M del ciclo celular

Diversos autores (331-333) han otorgado un importante papel a c-Src en la mitosis de células somáticas, basándose en estudios realizados en células detenidas en mitosis (*arrested cells*) por medio de nocodazol, un inhibidor de la metafase, o mediante la microinyección celular de anticuerpos inhibidores de Src. La actividad de Src está elevada varias veces en las células detenidas en la metafase y este incremento se correlaciona con la fosforilación de Src por la cinasa dependiente de ciclina 2 (Cdc2, CDK2) en varios residuos de serina y treonina localizados en la región única (334,335). Estos y otros estudios sugieren la posibilidad de que la fosforilación de Src por la serina/treonina cinasa Cdc2 inicia un proceso que conduce a la activación de Src durante la mitosis. Las investigaciones desarrolladas por Roche y cols. (329,333), han demostrado que las microinyecciones de anticuerpos inhibidores de Src en fibroblastos de ratón en fase G2, bloquean la división celular subsiguiente, previamente a la rotura de la cubierta nuclear.

Los resultados descritos sugieren que el concurso de Src es necesario en un mecanismo crítico para la progresión del ciclo celular desde G2 hacia la fase M (241,266). Esta función parece ser redundante con las desarrolladas por Fyn y Yes, que también son activadas en la

mitosis, porque cuando se utiliza un anticuerpo que sólo es capaz de bloquear la actividad de c-Src no se detiene la división celular, mientras que el anticuerpo desarrollado frente al péptido C-terminal, con inhibición cruzada para todas estas tirosinas cinasas, sí es efectivo (241,266).

Diferenciación

La expresión de v-Src en células inmaduras puede inducir cambios manifiestos en el programa de diferenciación celular (241,266,296). En la mayor parte de los tipos celulares, la expresión de v-Src bloquea la diferenciación celular. Por ejemplo, la infección con el RSV de mioblastos, retinoblastos o condroblastos aviares, mantiene esas células en un estado proliferativo y bloquea su diferenciación hacia miocitos, células neuroretinales, células epidermales, o condrocitos, respectivamente (336-338). Por el contrario, la inducción de v-Src en células PC12 o en neuronas inmaduras del sistema simpático, induce el crecimiento de neuritas y la diferenciación terminal a células de tipo neuronal (339).

Estas alteraciones tan manifiestas en la diferenciación celular inducidas por v-Src no implican que la forma celular de Src, cuando es activada en condiciones fisiológicas, medie esos efectos (241,266). Aunque las cinasas Src parecen estar involucradas en alguna de esas respuestas en condiciones fisiológicas, los efectos debidos a v-Src están relacionados con la mimetización de las actividades celulares de otras tirosinas cinasas mediante la fosforilación de sustratos comunes, debido a que esta forma está constitutivamente activada y aparece sobreexpresada en los diferentes tipos celulares (241,266).

Reorganización del citoesqueleto

En el segundo grupo de funciones atribuidas a Src, encontramos la regulación de múltiples procesos que dependen de la organización del citoesqueleto celular, como la formación y desensamblaje de las adhesiones focales, la adhesión con la matriz extracelular (ECM), el *spreading* o crecimiento en extensión, la formación de lamelipodios y la migración (241,266).

Para establecer el papel del Src en estos procesos se han utilizado fibroblastos y otros tipos celulares defectivos del gen que codifica Src (*src*^{-/-}) u otras tirosina cinasas relacionadas. También se han utilizado estrategias experimentales dependientes de la sobreexpresión o la eliminación de la tirosina cinasa reguladora de la actividad de Src, la Csk. Por último, el grado de fosforilación y la ordenación de diversas proteínas del citoesqueleto en células transformadas por v-Src, ha permitido especular sobre los posibles sustratos y funciones de las tirosinas cinasas Src en estas estructuras celulares (241,266).

Adhesión y crecimiento en extensión (*spreading*)

El papel del Src en la adhesión mediada por los receptores de integrinas con la proteína fibronectina de la matriz extracelular ha sido abordada utilizando fibroblastos de ratón defectivos del gen que codifica Src ($src^{-/-}$), es decir, defectivos de la tirosina cinasa Src (Src^{-}). En estos fibroblastos se detecta un grado de adhesión y *spreading* en una matriz de fibronectina muy reducido, hecho que sugiere que Src es requerido para una adhesión óptima, pero no es absolutamente esencial para estos efectos (303). Los fibroblastos $src^{-/-}$, sin embargo, son indistinguibles de los nativos cuando se evalúa el grado de adhesión en una matriz de colágeno (303), hallazgo que indica que Src podría actuar específicamente en las respuestas adhesivas dependientes de la fibronectina (241,266,303).

La sobreexpresión de Csk, la tirosina cinasa C-terminal de Src, también se ha utilizado como aproximación experimental para investigar el papel de Src en la adhesión celular. La sobreexpresión de esa tirosina cinasa en células HeLa provoca su transformación en células esféricas, perdiendo la capacidad adherente y modificando la estructura de los dímeros $\alpha\beta$ de las integrinas en la superficie celular (241). Este efecto depende de la inactivación de Src por la Csk, al mantener un alto grado de la fosforilación inactivante en la tirosina 527 de Src, aproximación que aporta evidencias adicionales acerca del papel que ejerce Src en la adhesión celular (241,266).

El mecanismo último por el que Src interviene regulando estos efectos es desconocido. La actividad tirosina cinasa no parece ser fundamental, puesto que la adhesión deficiente que muestran los fibroblastos $src^{-/-}$ puede ser revertida por mutantes de Src en los que se ha eliminado el dominio catalítico; sin embargo, se precisan dominios SH2 y SH3 intactos para este efecto (241,266,303). Estos resultados han llevado a proponer para Src un papel de molécula adaptadora en los procesos de adhesión, que permitiría localizar proteínas específicas, hasta el momento desconocidas, en las estructuras celulares que intervienen en estos mecanismos (241,266,303).

Ensamblaje/desensamblaje de las adhesiones focales

Las placas de adhesión focal (serán descritas en profundidad más adelante) son unas estructuras celulares especializadas localizadas en la membrana plasmática, que conectan los componentes de la matriz extracelular (ECM) con estructuras intracelulares (340,341). Estas placas de adhesión son activadas tras la unión de las integrinas con la ECM e intervienen regulando procesos tan importantes para la fisiología celular como la adhesión al sustrato, la morfología y la migración (316,341).

La relación existente entre las placas de adhesión y las tirosinas cinasas de la familia Src, se ha puesto de manifiesto, de nuevo, mediante la fosforilación de sustratos en células transformadas por v-Src (311,342,343). Entre los sustratos fosforilados en esas células se ha detectado a la paxilina, la p130^{CAS}, la talina, la vinculina, la tensina, las cinasas de adhesión focal p125^{FAK} y PYK2/CAK β , y la subunidad β 1 de los heterodímeros de las integrinas, todos ellos componentes de las placas de adhesión (241,266,280,316,341). Además, cuando las integrinas de los contactos focales en células no transformadas se unen con la ECM, las señales transmitidas hacia el interior celular inducen la fosforilación en residuos de tirosina de un grupo de proteínas de las placas de adhesión focal, grupo que es muy similar al que sufre fosforilación en células transformadas (241,266,341,344,345). También se ha demostrado que la unión de las integrinas con sus sustratos puede estimular la actividad cinasa de Src (303), que Src puede localizarse en las placas de adhesión focal (291,304,316,346) y que Src se asocia con varias proteínas encontradas en los complejos de adhesión focal (241,266,278,279,283,304,316,319,346,347). Todos estos estudios sugieren que las tirosinas cinasas Src están implicadas en los procesos dinámicos que regulan la actividad de los contactos focales (241,266,316).

El papel de las tirosinas cinasas Src en la organización de las placas de adhesión no está establecido. Parece que su concurso no es indispensable, si se tiene en cuenta que los fibroblastos src^{-/-} pueden ensamblar los complejos de adhesión (303). Sin embargo, en este tipo celular no se detecta fosforilación en tirosina de la p130^{CAS} inducida por fibronectina, mientras que si se detecta en células defectivas de otras tirosinas cinasas, como FAK⁻, Fyn⁻ o Abl⁻, cuando son sometidas al mismo estímulo (348). También se ha descrito que la proteína p130^{CAS} no se localiza en las placas de adhesión focal en fibroblastos src^{-/-} (304,345).

Tanto Src como Fyn se unen con la tirosina cinasa de adhesión focal p125^{FAK} (o simplemente FAK), y podrían participar en las señales dependientes de su actividad (241,266,304,345). La unión de Src con la tirosina cinasa FAK puede provocar la activación de la primera, al desplazar la interacción inhibitoria de su dominio SH2 con la Tyr527, y Src puede activar a FAK (266,304,345). Una vez FAK y Src se encuentran activos, es muy probable que ambas cinasas compartan sustratos en las placas de adhesión focal, por ejemplo la paxilina (266,304,345).

Tirosinas cinasas Src y otras estructuras de contacto celular

Además de fosforilar y formar complejos con proteínas de las adhesiones focales, Src también demuestra actividad en las uniones

adherentes (*adherens junctions*), puesto que en células transformadas estas uniones se hallan interrumpidas. Las uniones adherentes constituyen unas zonas de interacción célula a célula, donde se ha demostrado la localización de Src (349,350). En esta situación Src puede interactuar y fosforilar diversas proteínas, como la p120^{CAS} y otras cadherinas, unas proteínas transmembranales de adhesión celular que forman conexiones homofílicas intercelulares en las uniones adherentes (351).

Otros tipos de interacciones célula a célula se producen en las uniones GAP (*GAP junctions*), que también contienen proteínas sustrato de Src. Estas estructuras permiten el intercambio entre células de pequeñas moléculas e iones (352). Las uniones GAP, de nuevo, están interrumpidas en células transformadas por v-Src (353). La proteína conexina43, que se encuentra en esta localización, es hiperfosforilada en tirosina en las células transformadas, y esta fosforilación se correlaciona con el bloqueo de estas uniones intercelulares (354).

Funciones biológicas *in vivo* de las tirosinas cinasas Src

Como se ha mencionado en los apartados anteriores, las PTKs de la familia Src se relacionan con una plétora de receptores, fosforilan y se asocian con sustratos específicos o comunes con otras tirosinas cinasas y participan en la regulación de funciones celulares muy diversas (241,266).

La mayor parte de estudios que han permitido establecer estas conexiones se han desarrollado en líneas de células inmortalizadas o en cultivos primarios de células, mediante aproximaciones experimentales que implicaban la sobreexpresión de formas mutantes de estas tirosinas cinasas constitutivamente activadas (241,266). Los efectos biológicos detectados en esas situaciones (procesos oncogénicos y diferenciación) presumiblemente son consecuencia de niveles constantes y elevados de activación de las vías de señalización intracelular (PI3-K, PLC γ , Ras/MAPK, STATs, etc.) (241,266).

Cuando se combinaron estos resultados con la evidencia de que la forma endógena celular de Src es activada por receptores para factores de crecimiento, se postuló la hipótesis de que Src podría regular el crecimiento y la diferenciación celular en situaciones fisiológicas (21,241,267). Desde entonces se han encontrado muchos procesos biológicos en cuya regulación participan las tirosinas cinasas Src (241,266). Sin embargo, los intentos para bloquear la actividad en la célula de estas cinasas e identificar de forma directa sus funciones fisiológicas, han encontrado numerosos contratiempos como la redundancia y la especificidad. Las dos aproximaciones principales que se han utilizado con este objetivo han sido la disrupción de genes diana específicos (*src*^{-/-}, *fyn*^{-/-}, etc.) y el bloqueo de la función de Src mediante

anticuerpos neutralizantes o la expresión de proteínas inhibitoras (Csk, por ejemplo) (241,266).

El examen de la función y regulación de las PTKs Src en organismos completos se ha conformado como un importante campo de investigación para establecer cómo la actividad molecular y celular de estas tirosinas cinasas se relaciona con los procesos fisiológicos y fisiopatológicos en que están implicadas (241,258,266). Para estas aproximaciones se han desarrollado ratones defectivos para cada uno de los genes conocidos que codifican las PTKs de mamíferos (241,258,266,355-357). Las deleciones de esos genes generalmente no son letales y los fenotipos obtenidos varían desde ningún efecto detectable, a diferentes anormalidades en distintos tipos celulares, tejidos y respuestas fisiológicas (241,258,266). El fenotipo subletal en estos ratones podría significar, en principio, que las tirosinas cinasas Src desarrollan papeles poco importantes en la fisiología de la mayor parte de células del organismo. Sin embargo, este hecho parece corresponderse más bien con fenómenos de redundancia en las funciones de estas cinasas, como se ha puesto de manifiesto en ratones defectivos de varios de esos genes (241,266). Cuando se desarrollan mutantes en los que se ha eliminado varios genes se aprecian variaciones en el fenotipo más acusadas, o bien resultan inviables, con detención del desarrollo embrionario o mortalidad perinatal (241,258,357,358). También se han detectado efectos muy acusados en cierto tipo de células hematopoyéticas en ratones con deleciones de uno o dos genes, probablemente porque la funcionalidad de las cinasas eliminadas es fundamental para estos tipos celulares y no existe redundancia (241,266). Por último, la eliminación del gen que codifica la tirosina cinasa reguladora Csk, resulta en un fenotipo inviable, mostrando importantes deficiencias en el desarrollo del tubo neural y con mortalidad embrionaria entre el 9º y 10º día de gestación, (294).

El efecto más remarcable detectado en ratones Src⁻ es la osteopetrosis (258,355), patología relacionada con un defecto en el remodelado óseo. Los ratones defectivos de otras cinasas de la familia Src demuestran diversas anormalidades. Así, en ratones Fyn⁻ se han detectado alteraciones en el hipocampo (241,258,266,359), y los neonatos son incapaces de succionar, alteración que ha sido relacionada con un descenso de aproximadamente el 50 % en la mielinización neural que presentan estos ratones (258,360). En el ratón Lck⁻ se detecta una reducción en el número de células T en el timo, especialmente acusada en la cantidad de células maduras, hallazgo que se asocia con un bloqueo en la diferenciación de las células precursoras en estos ratones (241,258,266,361).

2.1.2. Tirosinas cinasas de la familia FAK

El primer miembro de la familia de tirosinas cinasas FAK fue aislado en 1990 por Kanner y cols. (342) como una proteína de 125 kDa cuya fosforilación en tirosina se encontraba aumentada en embriones de pollo transformados por v-Src. La estructura de la tirosina cinasa fue determinada por el mismo grupo desde ADNc de pollo (362) y fue denominada tirosina cinasa de adhesión focal (FAK, o p125^{FAK}), atendiendo a su masa molecular y a su localización (362). Subsiguientemente se determinó que la tirosina cinasa p125^{FAK} del pollo estaba altamente conservada en humanos y en varias especies [revisiones en (316,347,363)].

Posteriormente Sasaki y cols. (364) describieron a partir de ADNc de rata una proteína de 112 kDa, a la que denominaron inicialmente como cinasa β de adhesión celular (CAK β) por su homología con la p125^{FAK}. Actualmente esta tirosina cinasa recibe varios nombres: tirosina cinasa 2 rica en prolina (PYK2) (260), tirosina cinasa relacionada con la adhesión focal (RAFTK) (365), tirosina cinasa dependiente de calcio (CADTK) (366) y, menos habitualmente, tirosina cinasa 2 de adhesión focal (FAK2) (en la presente Tesis Doctoral la hemos denominado PYK2/CAK β , o simplemente PYK2).

Ambas constituyen la familia FAK de tirosinas cinasas (21). Estas proteínas se asocian con las placas de adhesión focal y comparten una alta homología, especialmente en el dominio catalítico, aunque diversos autores han demostrado que están sujetas a una regulación diferente (367,368).

Las PTK de la familia FAK son un importante componente de las vías de señalización activadas por las integrinas, estructuras que participan en procesos celulares tales como el crecimiento en extensión, la migración, la supervivencia dependiente de anclaje o la proliferación (17,304,316). Además, se ha demostrado repetidamente su activación por diferentes tipos de receptores acoplados a proteínas G, por lo que se piensa que podrían mediar importantes efectos asociados con este tipo de receptores, como la estimulación mitogénica (369). Las características de esta familia de tirosinas cinasas, su regulación y su relación con el citoesqueleto serán descritos en detalle en el capítulo III (pág. 171).

2.2. Receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca

2.2.1. Características generales

Se han identificados al menos 20 subfamilias de RPTK distintas, que acogen a más de 50 tirosinas cinasas que actúan como receptor (196,229,239,370). Todos los RPTKs son proteínas transmembranales que presentan un dominio extracelular N-terminal muy grande, una secuencia transmembrana simple y uno o dos dominios intracelulares con actividad tirosina cinasa. El dominio extracelular presenta una amplia gama de variaciones estructurales (*Gráfico I-8*) (2,21,371,371).

Esta familia de receptores tiene como ligandos péptidos entre los que se encuentran la insulina y factores de crecimiento relacionados, como el factor de crecimiento tipo insulina-1 (IGF-1) o la proteína relacionada con la insulina (IR), el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor estimulante de colonias (CSF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (2,21,370,372). La unión de los ligandos al dominio extracelular provoca la homo o heterodimerización de los receptores, lo que induce la autofosforilación (o transfosforilación) de varios residuos de tirosina localizados en la región C-terminal citoplasmática del receptor, este hecho tiene una importancia funcional trascendental (55-57).

El primer receptor con actividad tirosina cinasa intrínseca identificado fue el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (2,370). En los últimos años se han caracterizado muchos otros que han sido agrupados en las diferentes subfamilias. A continuación se detallan las características más remarcables de las cuatro subfamilias a las que pertenecen receptores con actividad tirosina cinasa presentes en acinos pancreáticos (EGF-R, receptor de la insulina, IGF-1-R, IGF-2-R, PDGF-R y FGF-R) (2,4,373):

Subfamilia I. Subfamilia del receptor del EGF. Incluye al receptor del EGF (EGF-R, o ErbB1) y a tres receptores estrechamente relacionados con éste: receptor HER2 (o ErbB2/neu), del que no se conocen ligandos, receptor HER3 (o ErbB3) y receptor HER4 (o ErbB4). El EGF-R presenta un dominio extracelular con una secuencia repetida rica en cisteína, una secuencia transmembrana simple y un dominio intracelular con actividad tirosina cinasa. (*Gráfico I-8*) (2,370,371). Se conocen al menos 8 factores de crecimiento diferentes para estos receptores, que se subdividen en tres grupos atendiendo a su capacidad

para unirse y conformar distintos heterodímeros con los receptores Erb (370,374,375).

Subfamilia II. Subfamilia del receptor de la insulina. Esta familia comprende el receptor de la insulina (insulina-R), los receptores del factor de crecimiento tipo insulina-1 e insulina-2 (IGF-1-R, IGF-2-R) y el receptor de la proteína relacionada con la insulina (IR-R) (236). Los dos primeros son muy similares, de hecho, sus ligandos pueden unirse al otro tipo de receptor aunque la afinidad por este es menor que por el propio. Todos ellos tienen dominios extracelulares con una secuencia repetida rica en cisteína en cada uno de los dímeros que componen su estructura (*Gráfico I-8*) (2,236,371).

Subfamilia III. Subfamilia del receptor del PDGF. Incluye a los receptores A y B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R-A, PDGF-R-B) y el receptor del factor estimulante de colonias (CSF-R). Los receptores de esta familia se caracterizan por la inserción de aproximadamente 100 aminoácidos en el centro del dominio con actividad tirosina cinasa. El dominio extracelular contiene cinco secuencias de aminoácidos homólogas repetidas, con una estructura que se asemeja a la de las inmunoglobulinas (*Gráfico I-8*) (2,370,371).

Subfamilia IV. Subfamilia del receptor del FGF. Los receptores de esta familia tienen una estructura muy similar a los anteriores, pero presentan en el dominio extracelular solamente tres secuencias tipo inmunoglobulina. Otra característica diferencial es la inserción de unos 100 aminoácidos en el centro del dominio con actividad tirosina cinasa. Incluye el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-R) (*Gráfico I-8*) (2,327,370,371).

La unión de la insulina o factor de crecimiento al receptor con actividad tirosina cinasa intrínseca resulta en la dimerización (o heterodimerización en algunos casos) del complejo ligando-receptor, hecho que mejora la afinidad de unión y estimula la actividad del dominio catalítico intracelular (21,196,370-372). En la subfamilia del receptor de la insulina, el receptor sin ligando se presenta como un dímero unido por un puente disulfuro. La unión de la insulina (o péptidos afines) produce un cambio conformacional en ambos monómeros que potencia la afinidad por el ligando e induce la activación del dominio catalítico (21,236,371).

La unión a su receptor desencadena múltiples respuestas celulares, incluyendo entrada de calcio, aumento del intercambio Na^+/H^+ , estimulación de la captación de azúcares y aminoácidos y estimulación de la PLC γ y de la PI3-K, además de activar diversos componentes de la vía de señalización de las MAPK (2,19,196,372,376-378). Los mecanismos

de activación de los RPTK y las respuestas celulares inducidas serán abordados posteriormente en el apartado 2.6 (pág. 96).

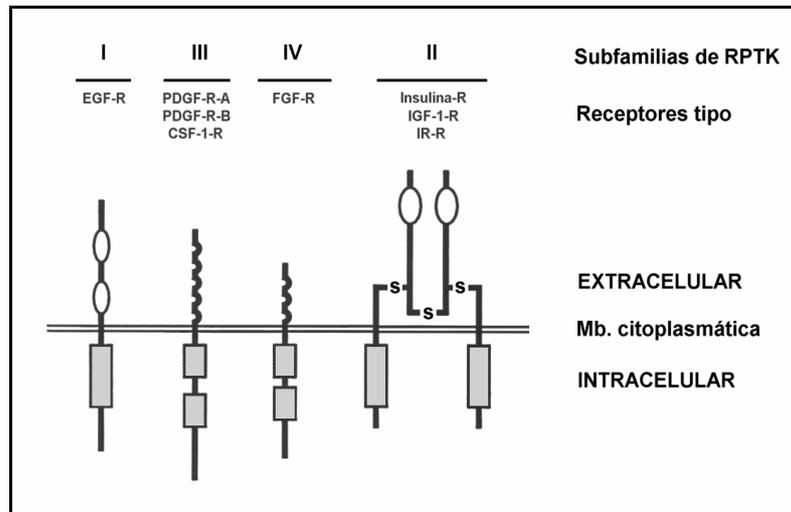


Gráfico I-8. Estructura de algunos receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca. En esta figura se esquematiza la estructura de cuatro de las ocho subfamilias existentes de este tipo de receptores. Las subfamilias I y II tienen dominios extracelulares con una secuencia repetida rica en cisteína (elipse), mientras que los dominios de las subclases III y IV tienen regiones de estructura semejante a las inmunoglobulinas (bucles). Los dominios intracelulares con actividad tirosina cinasa (rectángulos) son las secuencias más conservadas. La breve región intracelular, inmediatamente debajo de la membrana, la región intermedia en el dominio tirosina cinasa (bastante variable en longitud) y el extremo terminal carboxilo, son zonas de regulación de la actividad del dominio catalítico. Las vías intracelulares activadas tras la unión del ligando se describirán más adelante (véase apartado 2.6; página 96). Adaptado de (196).

2.2.2. Receptores para factores de crecimiento en acinos pancreáticos

Receptor del factor de crecimiento epidermal

Diversos estudios han demostrado la existencia de receptores para el EGF en rata y ratón (373,377). En acinos pancreáticos de rata el receptor del EGF tiene una alta afinidad (Kd 4.9 nM) por este factor de crecimiento y su unión no es inhibida ni por el factor de crecimiento de nervios (NGF) ni por la insulina; sin embargo, es inhibida por el factor de

crecimiento de fibroblastos (FGF) (379). Tanto en la rata como en el ratón, la unión del EGF a su receptor es inhibida por agentes que activan la PLC, pero no fue alterada por aquellos agentes que incrementan la concentración de AMPc (377,380), efecto probablemente debido a que las cascadas activadas por la PLC inhiben la internalización del EGF-R en este tipo celular (380).

En condiciones agudas el EGF no presenta efecto en la síntesis proteica ni en la secreción enzimática (379), pero su efecto crónico resulta contradictorio. Así, en cultivos de células acinares de ratón con exposiciones relativamente largas al EGF (superiores a 1 hora) se ha observado que es capaz de incrementar la secreción enzimática basal, potenciar la secreción enzimática estimulada por CCK e incrementar la incorporación de timidina tritiada en ADN (377). Sin embargo, en el páncreas de rata, la exposición al EGF durante varios días no tuvo ningún efecto estimulador en el crecimiento o la secreción pancreática, ni en la síntesis de ARN o ADN (381).

La ocupación del receptor del EGF causa la dimerización del receptor, su autofosforilación y la fosforilación en residuos de tirosina de un gran número de proteínas intracelulares, entre las que se encuentra la PLC γ y la PI3-K (21,55,56).

En diversos trabajos Profrock y cols. han demostrado que el EGF interacciona con al menos nueve tipos de proteínas G en acinos pancreáticos de rata, incluido el mismo tipo que interacciona con la CCK (382), y que este factor de crecimiento inhibe los incrementos en Ins(1,4,5)P₃ y calcio provocados por la CCK-8 (383), por lo que han postulado que la activación del receptor del EGF puede inhibir la actividad de la PLC inducida CCK (383).

Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas

El PDGF es un péptido dimérico de 30 kDa que regula la proliferación celular, la quimiotaxis y la reorganización del citoesqueleto. La unión a su receptor de membrana estimula su dimerización y la subsiguiente transfosforilación (21,21,57,384,385). La autofosforilación del receptor del PDGF tiene lugar en un gran número de residuos localizados a lo largo del dominio intracelular, a diferencia del receptor del EGF que se fosforila únicamente en residuos de tirosina localizados en el extremo carboxilo terminal (21,385).

La fosforilación del receptor del PDGF promueve la interacción del mismo con numerosas proteínas, entre ellas la PLC γ , fosfatasa de fosfotirosinas que contienen dominios SH2, la proteína inductora de la actividad GTPasa de Ras (p120^{Ras-GAP}), la subunidad p85 de la

fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-K) y tirosinas cinasas de la familia Src (21,385). El PDGF, a través de un mecanismo indirecto, es capaz de estimular la fosforilación de proteínas asociadas a las placas de adhesión focal como la p125^{FAK} y la paxilina en restos de tirosina (384).

Se ha descrito la existencia del receptor del PDGF en células acinares pancreáticas normales humanas y en células acinares tumorales procedentes de adenocarcinoma humano, en estas últimas, la expresión de este receptor es 7 veces superior a la de las células normales (386).

Receptor de los factores de crecimiento de fibroblastos

Los factores de crecimiento de los fibroblastos constituyen una familia de péptidos que incluye al menos siete componentes diferentes (385,387), de los cuales los más conocidos son el fragmento ácido y el fragmento básico. El fragmento básico del FGF (bFGF) es un polipéptido mitógeno que regula una gran variedad de funciones biológicas en distintos tejidos. En acinos pancreáticos el bFGF estimula la secreción de amilasas de forma dosis-dependiente (388).

Se han descrito 5 genes que codifican receptores del FGF (387), cada uno de ellos demuestra especificidad selectiva para los distintos tipos de FGF. La ocupación del receptor del FGF induce la activación de muchos sustratos, de forma muy similar a lo descrito para el PDGF, como la PLC γ (388) o GAP (372). Al igual que otros factores de crecimiento, la ocupación del receptor del FGF inicia la expresión de proto-oncogenes como c-fos y c-myc (372).

El bFGF inhibe la unión del EGF a su receptor de membrana en acinos pancreáticos (379). Estudios recientes (389) han mostrado que el bFGF puede inhibir la secreción de amilasas estimulada por la CCK en un mecanismo en el que estarían implicadas tirosinas cinasas, si se tiene en cuenta que el efecto inhibitor puede ser revertido utilizando inhibidores específicos de las tirosinas cinasas, como la tirfostina A25 (389).

Receptores para la insulina (Insulina-R)

Se ha demostrado la existencia de receptores para la insulina en células acinares pancreáticas de ratón, rata y cobaya (390,391). En la rata y el ratón se ha observado la existencia de dos estados de afinidad para el receptor de la insulina, un estado de alta afinidad y otro de baja afinidad (390).

Existe una gran controversia respecto al efecto de la insulina en la secreción pancreática exocrina. Bruzzone y cols. (392) han observado que la insulina inhibe la secreción basal y la estimulada por ceruleína en el páncreas perfundido de rata. Sin embargo Kano y Saito (393,394) demostraron, en la misma especie, que la insulina potencia la acción de la

CCK en la secreción de amilasa tanto *in vivo* como *in vitro*. Por su parte, Singh (395) ha descrito que la insulina no afecta a la secreción basal de amilasas pero sí potencia la secreción estimulada por ACh en segmentos pancreáticos del ratón. Posteriormente, este mismo grupo ha comprobado que la insulina estimula débilmente la secreción de amilasas en acinos pancreáticos de rata, pero potencia claramente la secreción estimulada por ACh (396). Finalmente, Saito y cols. (393,394) han descrito que la insulina potencia la liberación de amilasas estimulada por CCK tanto *in vivo* como *in vitro*.

Estudios posteriores demostraron que secretagogos como la CCK-8 o el carbacol pueden interactuar con el receptor de la insulina disminuyendo la afinidad de este por su ligando (373). En el caso de la CCK-8, Okabayashi y cols. (391) han establecido que el efecto se debe a la ocupación del receptor CCK_A, ya que fue bloqueado por el antagonista específico de dicho receptor, L-364,718.

La ocupación del receptor de la insulina estimula la captación de glucosa y la síntesis proteica, entre otros efectos (397). Estudios recientes han evidenciado que la insulina interactúa con las mismas proteínas G que la CCK (382); no obstante, la relación entre los efectos aditivos de la activación del receptor de la insulina y la CCK y la capacidad para interactuar con las mismas proteínas G no está clara hasta el momento (373). Finalmente, Juma y cols. (396) han sugerido que la insulina es capaz de movilizar calcio desde los depósitos intracelulares. Según estos autores la potenciación del efecto de la ACh se lleva a cabo por diferentes mediadores intracelulares, entre ellos el Ca²⁺, el AMPc o las tirosinas cinasas.

2.3. Otras proteínas relacionadas con las vías de señalización de las tirosinas cinasas

2.3.1. Proteínas adaptadoras y proteínas de anclaje

Las proteínas adaptadoras (*adaptor proteins*) son una serie de proteínas sin actividad enzimática que se caracterizan por contener en su estructura dominios discretos (*Gráfico I-10*), con capacidad de unirse específicamente con secuencias consenso de proteínas (*Gráfico I-9*)

cuando están insertas en un contexto peptídico determinado que le confiere afinidad y especificidad (21,45). Estas proteínas adaptadoras desempeñan un importante papel en las vías de señalización en las que participan las tirosinas cinasas. Se considera que su función primordial es transportar moléculas efectoras a regiones yuxtamembranales (21,45). Entre las proteínas adaptadoras más importantes en las vías intracelulares de las tirosinas cinasas se encuentran Grb2, Crk, Nck, Shc, Grap, y las proteínas 14-3-3 (21,43-45,63,196,398,399).

Las proteínas de anclaje (*docking proteins*) para tirosinas cinasas también tienen dominios reconocibles, pero además contienen múltiples lugares de fosforilación en tirosina (21,196). Su función principal parece corresponderse con el anclaje o localización dependiente de fosforilación en diversos territorios subcelulares, de proteínas con dominios SH2 y PTB (21,45,196,219). Además, pueden actuar como núcleos estructurales para la organización de complejos multimoleculares que participan en la transducción de señales dependientes de las tirosinas cinasas unidas y no unidas a receptor (21,316,319,400). Las proteínas de anclaje mejor conocidas en las vías de las tirosinas cinasas serían la IRS1, FRS2 p130^{CAS} y la Cbl (21,316,348,401).

Dominios estructurales de proteínas

PH (*Pleckstrin homology*): los dominios PH son unos dominios globulares, de alrededor de 120 residuos, con homología *pleckestrina*. Constituyen una secuencia consenso identificada inicialmente en la proteína del citoesqueleto epónima, y posteriormente en un muchas otras proteínas, entre las que se encuentran serina/treoninas y tirosinas cinasas, distintas isoformas de la PLC, GTPasas, factores intercambiadores de nucleótidos y componentes del citoesqueleto (273,402). Estos dominios unen fosfolípidos con alta especificidad (*Gráfico I-9*), pero no se han encontrado, hasta el momento, proteínas que se unan con ellos. Los dominios PH permiten a las proteínas que los contienen anclarse en las membranas biológicas de forma dependiente de fosfolípidos (21,45,273,402).

PTB (*phosphotyrosine-binding*): los dominios PTB son globulares, tienen alrededor de 150 residuos y están estructuralmente relacionados con dominios PH (219). Constituyen lugares de reconocimiento de residuos fosforilados en tirosina (*Gráfico I-9*), cuando éstos residuos están insertos en una secuencia específica, generalmente Asn-Pro-Xaa-Tyr (219). La especificidad de la unión viene determinada por la secuencia de residuos hacia el extremo N-terminal, al contrario que los dominios SH2 (21,45,219).

SH2 (*Src homology 2*): dominios con homología SH2. Son dominios compactos globulares de cerca de 100 aminoácidos, homólogos de regiones conservadas en las tirosinas cinasas de la familia Src (241). Constituyen lugares de reconocimiento de residuos fosforilados en tirosina (*Gráfico I-9*), cuando éstos residuos están insertos en una secuencia específica. La especificidad viene determinada por la secuencia de los aminoácidos hacia el extremo C-terminal (21,43,45).

SH3 (*Src homology 3*): dominios con homología SH3. Son dominios compactos globulares de alrededor de 60 aminoácidos, homólogos de regiones conservadas en tirosinas cinasas de la familia Src (241). Constituyen lugares de reconocimiento específico de secuencias cortas ricas en prolina (*Gráfico I-9*), con un péptido central Pro-Xaa-Xaa-Pro, pero la afinidad adicional y la especificidad para dominios SH3 determinados depende de los aminoácidos que la rodean (45). Estas zonas ricas en prolina son habituales en las proteínas del citoesqueleto. La interacción con dominios SH3 es independiente de fosforilación y es susceptible de asociación constitutiva (21,43,45).

WW (*Dominio triptófano triptófano*): es un pequeño dominio encontrado en algunas proteínas que intervienen en procesos de señalización, que se caracteriza por poseer dos residuos de triptófano (W: triptófano, en el código de una letra) conservados en su secuencia (403,404). Se ha encontrado en una gran variedad de proteínas reguladoras, del citoesqueleto o de señalización. Este dominio también interacciona con ligandos que contienen secuencias ricas en prolina (*Gráfico I-9*), pero con una especificidad distinta de la que presentan los dominios SH3. La secuencia consenso de unión es Xaa-Pro-Pro-Xaa-Tyr (405,406).

PDZ (*PSD-95/Dlg/ZO-1* o *post synaptic density disc-large zo-1'*): dominio que fue inicialmente identificado en los productos de los genes PSD-95, Dlg y ZO-1 (PZD: puede formarse como combinación de las iniciales de los tres genes, o *post synaptic density disc-large zo-1'*) (407). Aunque se han caracterizado perfectamente los mecanismos moleculares implicados en el reconocimiento y unión de péptidos por estas secuencias, que son muy similares a los de los dominios PTB (407), aún no se ha establecido completamente la actividad funcional de este tipo de dominios. Parece ser, sin embargo, que desempeñan un importante papel en la funcionalidad de proteínas implicadas en la transmisión sináptica, especialmente en aquellas que actúan como receptores de membrana o canales iónicos (196,408,409).

LIM (*lin-11/ISL1/mec-3 homology*): dominio que fue inicialmente identificado en los productos de los genes lin-11 (de *C. elegans*), ISL1 (de *rata*) y mec-3 (de *C. elegans*) (la abreviatura LIM es la combinación de las

iniciales de los tres genes). Los dominios LIM están constituidos por secuencias de aproximadamente 50 aminoácidos, ricas en cisteína, histidina, o residuos alternativos con capacidad para coordinar metales. Cada uno de los patrones repetitivos de esos residuos coordina dos átomos de zinc (196). Existen evidencias que han implicado a dominios LIM en la mediación de interacciones intra o intermoleculares dependientes de residuos de tirosina (Gráfico I-9) (21). No se ha descrito su unión con cadenas de ADN, a pesar de que su similitud con las regiones ricas en cisteína con forma de dedo que unen zinc hace probable esta interacción (21,196).

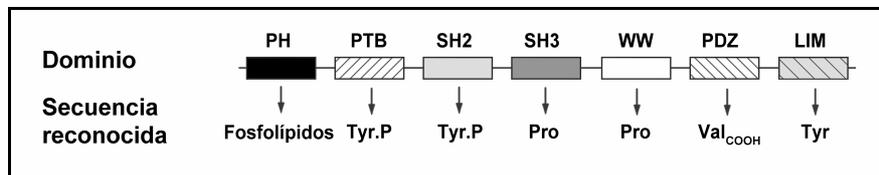


Gráfico I-9. Especificidad de unión para diversos dominios modulares proteicos. Tyr, tirosina; Tyr.P, tirosina fosforilada; Pro, prolina; Val_{COOH}, valina carboxi-terminal. Adaptado de (21).

Características estructurales y funcionales de algunas proteínas adaptadoras

Shc (*Src homology and collagen*): con este nombre se conoce a un grupo de proteínas adaptadoras que contienen dominios PTB y SH2 (Gráfico I-10). Se han identificado tres proteínas, de 46, 52 y 66 kDa, que constituyen la familia Shc (410,411). Las proteínas p46-Shc y p52-Shc contienen un dominio PTB N-terminal, un dominio central rico en prolina/glicina y un dominio N-terminal SH2. La tercera proteína, descubierta en 1997, p66-Shc, contiene otra región adicional rica en prolina/glicina también en el extremo N-terminal (411).

Las proteínas p46-Shc y p52-Shc han sido implicadas en la activación de las vías de señalización estimuladas por Ras/Raf, por su capacidad para formar complejos activadores de Ras con la molécula adaptadora Grb2 (21,63,196). La isoforma p66-Shc parece tener un efecto opuesto a las otras, ya que inactiva la cascada Ras/MAPK (411-413).

También se ha sugerido que los dominios únicos de las isoformas Shc, denominados CH1 y CH2, podrían estar implicados en una nueva forma de interacción entre proteínas, que otorgaría a Shc papeles en el

control de la señalización celular adicionales a la activación de Ras (410,411).

Proteínas 14-3-3: familia de proteínas evolutivamente muy conservadas, de aproximadamente 30 kDa, con estructura dimérica, codificadas por 8 genes diferentes (21,196,399). Reconocen secuencias específicas en proteínas que contienen residuos fosforilados en serina o en treonina y actúan como proteínas de anclaje, adaptadoras o reguladoras de la actividad para los sustratos unidos. La secuencia consenso con un residuo de fosfoserina reconocida por las proteínas 14-3-3, Arg–Ser–Xaa–Ser(P)–Xaa–Pro, se encuentra presente en las todas las isoformas Raf de mamíferos (63,196,399,414), aunque existe controversia acerca del papel de las proteínas 14-3-3 en la regulación de esta cinasa (63,399,414-416).

Grb2/Grap (*growth factor receptor-bound protein 2* y *Grb2-related adaptor protein*): Grb2 es una proteína adaptadora de 217 aminoácidos que contiene un dominio SH2 central flanqueado por dos dominios SH3 (*Gráfico I-10*). Parece estar constitutivamente asociada con el factor intercambiados de nucleótidos SOS. Esta interacción se establece entre secuencias ricas en prolina del extremo C-terminal de SOS con los dominios SH3 de Grb2, unión que se mantiene con una alta afinidad excepto en condiciones desnaturizantes (411). Grap posee el mismo ordenamiento estructural que Grb2 (SH3-SH2-SH3) y se expresa predominantemente en timo y bazo. Comparte un 59 % de homología con Grb2 y también se asocia con mSOS, mediante su dominio SH3 N-terminal (411,417).

Ambas proteínas adaptadoras, mediante interacciones específicas con diferentes proteínas, que vienen reguladas generalmente por tirosinas cinasas, permiten localizar a SOS cerca de Ras para realizar el intercambio GDP/GTP que activa la GTPasa, que a su vez estimula la cascada de las MAP cinasas (196,245,324,418)

Proteínas Crk: junto con Grb2 y las proteínas Nck, Crk pertenece a un tipo de proteína adaptadora que contiene dominios SH2/S3 en su molécula (*proteínas adaptadoras SH2/S3*), implicadas en la transducción de señales de las tirosinas cinasas. Se ha descrito que la forma v-Crk, codificada por el oncogen viral v-crk, induce sarcomas en pollos (398,411). Sus homólogos celulares c-Crk-I, c-Crk-II, y la proteína tipo Crk (CRKL) han sido implicados en muchos procesos de señalización intracelular, incluida la diferenciación y migración celular y la anergia de las células T en respuesta a la ocupación del TCR (196,398,411). También se ha descrito que CRKL es el sustrato principal de la oncoproteína de fusión Bcr-Abl que está implicada en la patogénesis de la leucemia mielógena crónica (MCL) y la leucemia linfoblástica aguda (ALL) (21,398,419).

La familia de proteínas adaptadoras Crk se caracteriza estructuralmente por la presencia de dominios SH2 y SH3 (*Gráfico I-10*), que intervienen regulando diversos procesos biológicos (21,398,411). Entre las proteínas que controlan las funciones de Crk se incluyen varios receptores y proteínas de unión, mientras que Crk regularía la actividad de varias proteínas cinasas y proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina (GNRPs) (21,398,411). La mayoría de las proteínas que se unen con los dominios SH2 y SH3 de Crk contienen lugares de anclaje con secuencias primarias muy similares. Esta característica ha permitido especular sobre la posibilidad de diseñar pequeñas moléculas inhibidoras, conteniendo esas secuencias, para bloquear la función de Crk con fines terapéuticos (398).

Las cascadas enzimáticas activadas por la familia de proteínas Crk no están completamente establecidas, pero se ha descrito en algunos sistemas celulares que activa las SAPK/JNKs, la GTPasa Rap 1 y la isoforma B de las cinasas Raf (21,63,245,398,411).

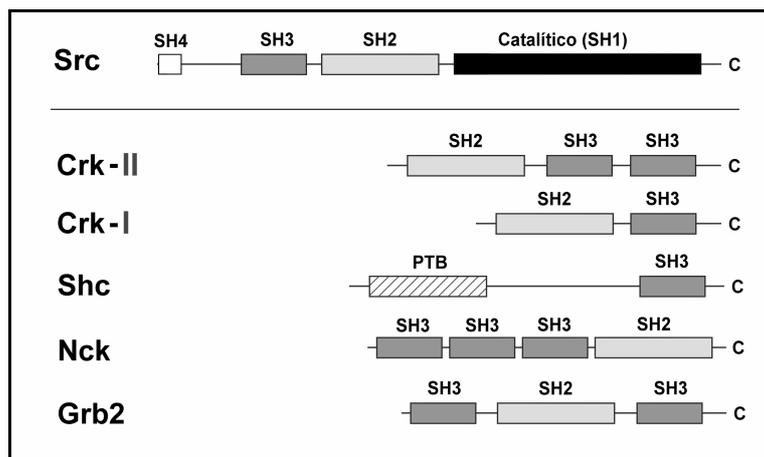


Gráfico I-10. Representación esquemática de la estructura de varias proteínas adaptadoras (y de Src por comparación). En la figura se recoge la organización de los dominios SH y PTB en las proteínas adaptadoras Crk, Shc, Nck y Grb2. Adaptado de (21).

2.3.2. Fosfatidilinositol 3-cinasa

La fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-K) es una cinasa lipídica que fosforila el fosfatidilinositol y sus derivados en la posición 3 del anillo de inositol, dando lugar a la formación de Ins(3)P, Ins(3,4)P₂ e Ins(3,4,5)P₃, que presenta dos subunidades de diferente masa molecular, denominadas subunidades p85 y p110 o subunidades reguladora y catalítica, respectivamente (420).

En tejidos de mamíferos se han descrito 4 isoformas de la subunidad de la que depende la actividad catalítica del enzima, son las isoformas p110 α , β , γ , y δ . Las dos primeras son ubicuas, mientras que las subunidades p110 γ y p110 δ se restringen a células hematopoyéticas (420-422).

Las isoformas p110 α , β y δ están constitutivamente asociadas con una subunidad reguladora que contiene dos dominios SH2, de las que existen dos variantes, denominadas p85 α y p85 β (420-422). La unión entre las dos subunidades se realiza mediante un dominio situado en el extremo C-terminal de la subunidad catalítica y una región situada entre ambos dominios SH2 de la subunidad reguladora (420-422). La subunidad p110 γ no se asocia con subunidades p85 y su actividad está controlada aparentemente por dímeros $\beta\gamma$ de proteínas G (421,423).

La subunidad p85 actúa como una proteína adaptadora, utilizando los dominios SH2 para establecer interacciones con proteínas que contienen residuos de tirosina fosforilados (43,45,421). Se ha demostrado que esta interacción con fosfotirosinas es suficiente para activar la subunidad catalítica (421,424). Adicionalmente a esta forma de activación, varios autores han demostrado que las subunidades p110 α y β pueden activarse al interactuar directamente con el dominio efector de p21-Ras (421,425). Sin embargo, el mecanismo más establecido de activación implica la unión de la subunidad p85 con residuos de fosfotirosinas, en receptores para los factores de crecimiento y también en otras muchas proteínas que poseen secuencias reconocidas por los dominios SH2 de esa subunidad (420-422).

Las funciones biológicas de la PI3-K no están completamente clarificadas, si bien, la elevación en los niveles de los productos de la PI3-K ha sido implicada en la regulación de la síntesis de ADN, en la supervivencia y apoptosis celular, en la diferenciación, en la protrusión de lamelipodios, en la quimiotaxis y migración, en la adhesión y en el crecimiento neural (321,422,426).

Recientemente se ha descrito una proteína que puede actuar como principal efector de la PI3-K. Se trata de una serina/treonina cinasa de 60 kDa que se denomina Akt/PKB (proteína cinasa B) (422,427). El extremo carboxilo terminal de esta proteína contiene el dominio catalítico, y presenta una estructura muy similar a la proteína cinasa A y la proteína cinasa C (por eso también es conocida como RAC: *related to A and C kinases*), mientras que el extremo amino terminal contiene un dominio PH, relacionado con las interacciones de la proteína con los fosfoinosítidos Ins(3,4)P₂ e Ins(3,4,5)P₃ (421,422).

El mecanismo preciso por el que esta cinasa es activada por los productos de la PI3-K no se conoce completamente; sin embargo, se ha establecido que Akt/PKB se une a través de su dominio PH con los fosfoinosítidos Ins(3,4)P₂ e Ins(3,4,5)P₃, aunque este hecho no es suficiente para activarla (421,422). Para que la activación se produzca parece que son precisas sendas fosforilaciones en el residuo Thr308 (situado en el *asa de activación*) y en el residuo Ser473. La primera fosforilación es ejecutada por otra cinasa dependiente de lípidos, la PDK1 (proteína cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítidos), y la del residuo Ser473 depende de una cinasa no identificada (que anticipadamente se denomina PDK2) (421,422). La PDK1, como la Akt/PKB, dispone de un dominio PH que interacciona con los productos de la PI3-K, aunque, al contrario que esta última, la PDK1 parece estar constitutivamente activa *in vivo* (421,422). Diversos estudios han demostrado que la cinasa PDK1 sólo puede fosforilar a la Akt/PKB en presencia de los fosfoinosítidos Ins(3,4)P₂ y el Ins(3,4,5)P₃, que serían requeridos para inducir un cambio de conformación en esta última (dependiente de la unión con el dominio PH), necesario para su fosforilación (422,428,429). Se desconoce si se requiere la unión de fosfoinosítidos con el dominio PH de la cinasa PDK1 para ejecutar la fosforilación en Akt/PKB (422,429). Un posible sustrato de Akt/PKB es la proteína p70s6 cinasa, pero no se ha establecido con exactitud si la Akt/PKB fosforila a esta cinasa, o si esta fosforilación se produce directamente por la PDK1 (427). Las investigaciones más recientes apuntan a que la p70s6K es fosforilada por un mecanismo dependiente de la PI3-K, pero independiente de Akt/PKB (422,430). También se ha demostrado que la Akt/PKB fosforila Bad en los residuos Ser112 y 136, modificaciones que protegen a la célula de la apoptosis (véase nota 7, pág. 20) (421,422). Finalmente, otros sustratos de Akt/PKB serían GLUT4, la proteína cardíaca PFK2 y GSK-3, que es inactivada por fosforilaciones dependientes de Akt/PKB. (421,422).

Además de la Akt/PKB y de la PDK1, existen otras proteínas que contienen dominios PH en cuya regulación interviene la PI3-K, aunque no se ha establecido cómo se produce dicha regulación (421,422). Entre éstas

se encuentran los factores intercambiadores de nucleótidos (GEFs) específicos de Rac y Arf, las tirosinas cinasas de la familia BTK (BTK, Itk, Tec, Bmx y otras)⁽³⁾ y la PLC γ (421,422). Finalmente, la PI3-K, a través de las proteínas descritas (fundamentalmente PDK1, tirosinas cinasas BTK, PLC γ y GEFs) modulan la actividad de otros efectores celulares, como PKA, PKC, Rac, Arf, y las mencionadas anteriormente como sustratos de la Akt/PKB, incluida la p70s6k; aunque, de nuevo, no se conocen los mecanismos precisos de regulación para todas ellas (422,431).

Diversos autores han demostrado que la unión de la CCK-8 a su receptor, posiblemente tras la activación de determinadas tirosinas cinasas de membrana, puede activar la PI3-K (19,148); sin embargo, el significado funcional de este hecho ha suscitado controversia. Rivard y cols. (19,148) han demostrado que la inhibición de la PI3-K con wortmanina, no tiene ningún efecto en la secreción pancreática estimulada por CCK-8. Este hecho sugiere que la PI3-K no participaría en los procesos de secreción pancreática exocrina estimulados por CCK-8, sino, más bien, estaría relacionada con sus efectos tróficos. En contraste con lo anterior, Tsunoda y cols. (432) han descrito que la unión de la CCK a su receptor activa la PI3-K a través de una ruta donde participa la tirosina cinasa Src, esta ruta podría mediar la secreción enzimática estimulada por CCK-8.

2.3.3. Proteínas G monoméricas

La superfamilia Ras de proteínas reguladoras de pequeño peso molecular que unen GTP, o proteínas G monoméricas, comprende un gran grupo de proteínas celulares implicadas en múltiples mecanismos de señalización intracelular. Esta superfamilia se subdivide en cinco grandes grupos o familias, denominadas Ras, Rho/Rac, Rab, Arf y Ran (433). Todas ellas se caracterizan por unir GTP y GDP y por poseer actividad GTPasa (también son denominadas GTPasas pequeñas). Como el resto de proteínas G, la unión y posterior hidrólisis del GTP habilita el intercambio

⁽³⁾ BTK (*Bruton's tyrosine kinase*) es el prototipo de una familia de tirosinas cinasas que se expresa en la mayoría de tejidos hematopoyéticos. Como las cinasas Src, estas tirosinas cinasas no receptor presentan dominios SH2 y SH3 en el extremo N-terminal, pero además disponen de un característico dominio con homología Tec y un dominio PH N-terminal. BTK es crítica para el desarrollo y función de las células B, y su deficiencia está asociada con una agammaglobulinemia ligada al cromosoma X en humanos y una inmunodeficiencia ligada al cromosoma X en ratones.

entre dos estados funcionales, activo e inactivo respectivamente, lo que permite actuar a estas proteínas como “interruptores” moleculares (433).

Las GTPasas de tipo Ras intervienen en la regulación de funciones celulares asombrosamente diversas, entre las que destacan la mitogénesis, la organización del citoesqueleto, el tráfico de vesículas y el transporte nuclear (433). Todos estos procesos biológicos requieren la inclusión de las GTPasas de pequeño peso molecular como componentes esenciales en la maquinaria molecular que los controla (433). La vasta complejidad de los mecanismos en que están implicadas depende de la multiplicidad de cascadas de GTPasas, de la gran variedad de efectores que son regulados por las proteínas tipo Ras y de las interconexiones que existen entre las vías dependientes de las proteínas cinasas reguladas por la actividad de estas GTPasas (152,433-435).

Otra característica común de todas las proteínas de tipo Ras es que se asocian con las membranas citoplasmáticas, donde ejercen sus funciones (224). Estas proteínas son hidrofílicas y no presentan segmentos transmembrana. Por lo tanto no son proteínas integrales de membrana; sin embargo, todas ellas (a excepción de las proteínas Ran) sufren modificaciones postranslacionales en las que obtienen grupos lipofílicos (miristilación, palmitilación, farnesilación) que les confieren la capacidad de asociarse con las membranas biológicas (224,433).

GTPasas de la familia Ras

La GTPasa p21-Ras es una proteína de 21 kDa que une nucleótidos de guanina, y que está codificada por tres genes celulares diferentes H-ras, K-ras y N-ras (433,436,437). Las isoformas Ras se localizan en la superficie interior de la membrana plasmática gracias a un mecanismo de interacciones lipofílicas dependiente de la poli-isoprenilación en el extremo C-terminal (224,433). Todas ellas se sintetizan como precursores moleculares biológicamente inactivos y posteriormente son farnesiladas en el residuo de cisteína que se encuentra en el cuarto lugar de la cadena peptídica desde el extremo C-terminal, en un proceso catalizado por la enzima FTasa (224). Después de la farnesilación la proteína inactiva sufre una ruptura proteolítica entre el tercer y cuarto aminoácido del extremo C-terminal y posteriormente una esterificación con un grupo metilo en la cisteína farnesilada que ahora se encuentra en el extremo C-terminal (224). Cuando este proceso post-translacional está bloqueado, las proteínas Ras son incapaces de asociarse a la membrana y, consecuentemente, pierden su actividad biológica (224,437,438).

El análisis de la secuencia primaria de las isoformas H-, K- y N-Ras muestra una alta homología en los primeros 164 aminoácidos, de los que los 86 primeros son idénticos y los 78 restantes tienen una homología del 79 % (439). Paradójicamente, los aminoácidos 165-168 muestran una alta divergencia, indicando funciones celulares hipotéticamente distintas, aunque la eliminación de esta región no parece comprometer la integridad estructural o la función biológica de las proteínas Ras (440).

Se ha obtenido la estructura cristalizada de Ras (441) y su análisis ha permitido identificar el lugar de unión con GTP y el dominio GTPasa, los dos muy conservados en todas las proteínas que unen nucleótidos de guanina (433,441). También se han identificado dos regiones “interruptor” (*switch regions*) que muestran conformaciones diferentes dependiendo del nucleótido unido a la molécula (441). Una de ellas se corresponde con el sitio de unión con efectores (*dominio efector*), situado entre los residuos 30 y 40. Este sitio permite la unión con Raf-1, la PI3-K y p120^{Ras-GAP}, entre otras, pero solamente cuando Ras está unida a GTP, es decir se encuentra en la configuración activa (442). La regulación de los mecanismos de unión de GTP es esencial para mantener el control fisiológico de la proliferación celular y la diferenciación. Las formas constitutivamente activas de Ras pueden inducir la transformación celular (443). Se ha calculado que el 10 % de todos los tumores humanos, el 70 % de los tumores pancreáticos y el 50 % de los cánceres colorectales están asociados con mutaciones de los genes que codifican Ras, cuya expresión se asocia con formas constitutivamente activas de esta GTPasa (444).

Las proteínas Ras están reguladas fundamentalmente por dos clases de proteínas: los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) y las proteínas inductoras de la actividad GTPasa (GAPs) (433,437). Los primeros también se denominan factores liberadores de nucleótidos de guanina (GRFs), o estimuladores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDSs), o proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina (GNRPs) (445). Además existe un tercer tipo de proteínas reguladoras de Ras: los inhibidores de la disociación de GDP (GDIs). Los factores Ras-GDI mantienen a Ras en la conformación inactiva unida a GDP (433,437).

Como se ha visto los factores GEF promueven la liberación del GDP y la unión de GTP con las proteínas Ras, es decir, promueven la activación de Ras, mientras que las proteínas GAP aceleran la actividad GTPasa de Ras y actúan como reguladores negativos (433,446). Por lo tanto, la conversión entre la forma unida a GDP y la unida a GTP es estimulada por el factor GEF y el paso contrario, que depende de la hidrólisis de GTP unido hasta GDP, es catalizada por la proteína inductora

de la actividad GTPasa (433). La conformación inactiva Ras•GDP puede estabilizarse por las proteínas Ras-GDI (433,437).

Factores GEFs: activadores de Ras

En mamíferos se han clonado y caracterizado 5 factores intercambiadores de nucleótidos de guanina específicos de Ras: mSOS1 (SOS: *son of sevenless*), mSOS2, C3G, Ras-GRF (también CDC25Mm o p140^{Ras-GRF}), y GRF2 (447-451). Los dos últimos son homólogos del factor intercambiador de nucleótidos Cdc25 presente en levaduras y constituyen una familia distinta de la formada por mSOS1 y mSOS2, que son homólogos en mamíferos del factor dSOS de *Drosophila* (433). Ambas familias poseen dominios catalíticos estimuladores del intercambio de nucleótidos, y la mayor parte poseen dominios PH, además de otros componentes modulares que les permiten interactuar con otras moléculas, como dominios IQ o DH (433). C3G ha sido recientemente descrito como una proteína de 130-140 kDa que muestra homología con otros GEFs de Ras y se une con las proteínas adaptadoras Crk y Grb2 (452).

Se ha establecido claramente que las proteínas SOS son factores que intermedian la activación de Ras dependiente de las tirosinas cinasas (unidas o no a receptor) (63,324,418). SOS se expresa de forma ubicua y se asocia directamente con una amplia gama de proteínas adaptadoras, incluyendo Grb2, Shc, Crk y Nck (453). Parece que SOS no puede activar Ras sin el concurso de Grb2 (454); además, es factible que ambos se encuentren unidos de forma constitutiva (45). Las proteínas adaptadoras, mediante interacciones específicas con diferentes proteínas, reguladas generalmente por tirosinas cinasas, permiten localizar a SOS cerca de Ras y estimular el intercambio GDP/GTP. Cuando Ras está unida a GTP (Ras•GTP) induce la actividad de Raf y la cascada de señalización de las MAPK que posteriormente se describirá (63,324,418). Las MAPK pueden establecer un mecanismo de retroalimentación negativo, al fosforilar la región C-terminal de SOS, reduciendo su capacidad de interacción con los receptores de factores de crecimiento (455).

Ras-GRF no parece desarrollar ninguna función en la activación de Ras dependiente de los factores de crecimiento o de la actividad tirosina cinasa (445). Se ha descrito la activación de este factor intercambiador de nucleótidos por LPA, tras la ocupación del receptor muscarínico M1 y por las elevaciones del Ca²⁺ citosólico (60,456). La independencia de los procesos regulados por fosforilación en tirosina puede deberse a que, al contrario que SOS, Ras-GRF no interactúa con Grb2, Shc o los receptores para factores de crecimiento (449,456), y tampoco necesita de una translocación para acceder a Ras (449,457), puesto que Ras-GRF se localiza permanentemente en la fracción

particulada de la célula, mediante interacciones dependientes de su dominio PH N-terminal (458).

Proteínas GAPs: inactivadores de Ras

Hasta el momento se han identificado y caracterizado siete proteínas inductoras de la actividad GTPasa selectivas de Ras en mamíferos: p120^{Ras-GAP}, GAP1^m, GAP1^{IP4BP}, GAP III, p98^{Ras-GAP}, p135Syn^{Ras-GAP} (p135-SynGAP) y neurofibromina (437,445,446).

Todas las proteínas GAP contienen una región estructural característica, denominada *dominio relacionado con GAP* (GRD) (433,437,445). Esta región es la unidad catalítica de la proteína, responsable de estimular la actividad de las proteínas G monoméricas y de otros enzimas con actividad GTPasa, como algunos factores de translación o las propias proteínas G heterotriméricas (aunque estas últimas generalmente no requieren de inductores de actividad, porque tienen una actividad específica mucho más alta que las proteínas G monoméricas o los factores de translación) (433,445). Además de ejercer un papel como reguladores de la actividad enzimática de Ras, se ha especulado con la posibilidad de que las proteínas Ras-GAP puedan actuar como efectores en las vías controladas por Ras (445,459).

p120^{Ras-Gap} (o Ras-GAP) posee dos dominios SH2 y uno SH3 en la región N-terminal (445). Los primeros le permiten interactuar con proteínas que contienen residuos de fosfotirosina, como p62 y p190^{Rho-GAP}; además, el dominio SH3 parece ser responsable del papel efector de esta proteína en las vías dependientes de Ras (437,445). También dispone de un dominio C2 (equivalente al de otras proteínas, como la PKC) (160), que le permite interacciones proteína-proteína y con fosfolípidos con carga negativa y parece responsable de la asociación de este GAP con la membrana y con otras proteínas (anexinas, por ejemplo) (433,437,445,446). Estas asociaciones generalmente están reguladas por la elevación intracelular de calcio, pero no siempre (445,460). Por último, p120^{Ras-Gap} presenta un dominio PH, flanqueado por los dos dominios SH2, que puede estabilizar las interacciones de membrana (433,437,445,446).

La proteína p135-SynGAP también tiene un dominio PH y un dominio C2 (437,461). Esta proteína se expresa predominantemente en sinapsis de neuronas del hipocampo, donde parece regular la plasticidad sináptica (445).

Por último GAP1^m, GAP1^{IP4BP}, GAP III y p98^{Ras-GAP}, están estructuralmente y funcionalmente muy relacionados y constituyen una familia de proteínas inductoras de actividad GTPasa (433,437,445,446). Cada uno de ellos contiene dos dominios C2 no idénticos (denominados

C2A y C2B) que tienen distinta especificidad por sustratos (445). Estos dominios se encuentran conservados entre los diferentes componentes de la familia (433,437,445,446).

Funciones de Ras

Las proteínas Ras están implicadas en muchos aspectos del control del crecimiento celular y de la apoptosis (437). Estas proteínas transmiten señales desde los receptores de factores de crecimiento a una cascada de cinasas que comienza con la proteína cinasa Raf y termina con las MAP cinasas (437,462). Éstas, a su vez, modifican la actividad de los factores de transcripción y proteínas que controlan el ciclo celular, como se describirá más adelante (196,245,324,418). Esta cascada está regulada a nivel de Ras en varios puntos. En primer lugar, como ya se ha comentado, la actividad de las proteínas Ras depende de GAPs y de factores intercambiadores de nucleótidos, cuya función es modificada por la activación de los receptores para los factores de crecimiento (446). Además, la transmisión de las señales desde Ras a Raf-1 está regulada por Rap1, proteína capaz de revertir la transformación celular, y por AMPc. Adicionalmente, existen otros factores que intervienen en la regulación de Ras, como las proteínas Ras-GDI, que mantienen a Ras en la conformación inactiva Ras•GDP (437).

La función de Ras en la activación de la cinasa Raf parece limitarse a localizar esta proteína cerca de la membrana, donde Raf sufre modificaciones estables (aún no completamente establecidas), que permiten su activación completa (196,245,324,418,463,464). El papel de Ras en las vías de señalización de las MAPK será abordado detenidamente más adelante.

GTPasas de la familia Rho

Una de las familias de proteínas que participa más activamente en el control de la reorganización del citoesqueleto y la formación de placas de adhesión focal son las GTPasas de la familia Rho (434). Las Rho GTPasas constituyen un subgrupo dentro de la superfamilia de las GTPasas de bajo peso molecular de la familia Ras (Rho: *Ras homology*). Se conocen al menos 11 miembros de esta familia en mamíferos, que se subdividen en cinco grupos atendiendo a su secuencia de aminoácidos y a las diferencias funcionales: (a) grupo 1, compuesto por Rho A, Rho B y Rho C; (b) grupo 2: Rac 1, Rac 2 y Rho G; (c) grupo 3: Cdc42 y TC10; (d) grupo 4: Rho D y (e) grupo 5: Rho E y TTF (433,465). Los mejor caracterizados son Rac 1, Cdc42 y Rho A (433,465). Además de éstas, se

han identificado otras muchas formas en organismos inferiores, como levaduras o moscas de la fruta (433,465).

Rho contiene en su estructura una secuencia de aminoácidos responsable de la unión de GTP o GDP y un dominio con actividad GTPasa (433), secuencias peptídicas que están muy conservadas en todas las proteínas que unen GTP (433). En el caso de Rho la secuencia de aminoácidos para la unión con GTP se extiende entre el residuo 34 y 42 y se corresponde con secuencias homólogas en otras proteínas de la superfamilia Ras (466).

Las GTPasas de la familia Rho también se comportan como interruptores moleculares, teniendo dos estados funcionales: activas cuando están unidas a GTP e inactivas cuando están unidas a GDP. El paso del estado activo al inactivo y viceversa está controlado, al igual que en Ras, por los GEFs, los GAPs y GDIs (435,465,466). Por lo tanto, la conversión entre la forma inactiva unida a GDP y la activa unida a GTP es estimulada por el factor GEF y es inhibida por GDI, y la conversión entre la forma Rho•GTP y Rho•GDP es catalizada por la proteína inductora de la actividad GTPasa (GAP) (*Gráfico I-11*) (466). Hasta la fecha se han identificado diferentes tipos de GEFs: Smg-GDS (61 kDa), Dbl (108 kDa), Ost (98 kDa), p115^{Rho-GEF} y Lbc. También se han identificado dos tipos de Rho-GAPs: p50^{Rho-GAP} (50 kDa) y p190^{Rho-GAP} (190 kDa) (466,467), y tres tipos de Rho-GDIs: Rho-GDI-1, Rho-GDI-2 y Rho-GDI-3 (468).

Aunque el mecanismo preciso de activación de las GTPasas de la familia Rho no ha sido establecido completamente, algunos autores (466,468,469) han descrito un modelo de activación de estas proteínas Rho, según el cuál la actividad estaría regulada cíclicamente (*Gráfico I-11*) (466,468,469).

Según este modelo (*Gráfico I-11*), en las células no estimuladas las proteínas Rho inactivas (Rho•GDP) se encuentran en el citosol formando complejos con una proteína Rho-GDI. Cuando las células son estimuladas por señales extracelulares adecuadas, el complejo se disocia, en un proceso cuya regulación se desconoce, pero que parece depender de la actividad de DAG cinasas (DAK) (468); a su vez, se activan GEFs específicos para la familia de GTPasas Rho, probablemente por un mecanismo dependiente de fosforilaciones en tirosina y/o mediado por proteínas G_{α13} (469). Las formas Rho translocan a la membrana (antes o después de disociarse de GDI) y se unen a ella por su extremo carboxilo, que se encuentra isoprenilado. Una vez en la membrana, los GEFs catalizan el intercambio de GDP por GTP en las GTPasas Rho, pasando de la forma inactiva unida a GDP, a la forma activa unida a GTP. Una vez

que las proteínas Rho están activas, se unen a su molécula diana o efector específico, que ejercerá las funciones asociadas con la activación de Rho. Este proceso puede ser facilitado por uno de los factores GEF (468). Cuando Rho•GTP ha cumplido su función, pasa de nuevo la forma inactiva hidrolizando el GTP hasta GDP, en un proceso dependiente de la proteína Rho-GAP, que estimula la actividad GTPasa de Rho. Ahora la proteína Rho-GDI puede formar un nuevo complejo con Rho•GDP y extraerlo de la membrana al citosol, dónde se localiza hasta que se inicie el ciclo nuevamente (466,468,469).

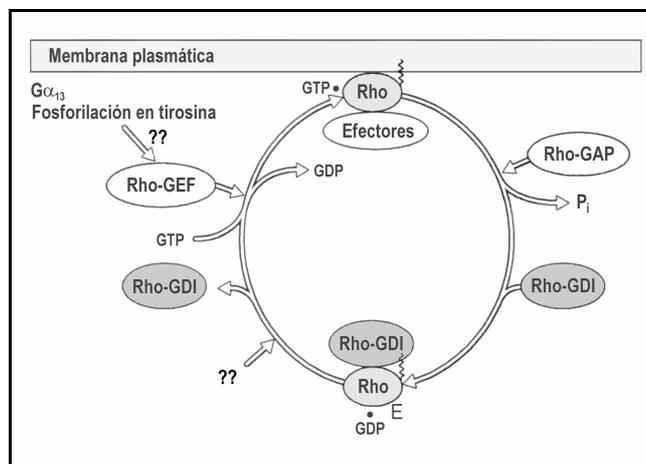


Gráfico I-11. Mecanismo de activación de las GTPasas de la familia Rho. Inicialmente Rho•GDP se encuentra unido con Rho-GDI en el citoplasma, formando un complejo inactivo. Ante el estímulo adecuado ambos se disocian, en un proceso cuya regulación se desconoce, y Rho se asocia con la membrana por su extremo C-terminal isoprenilado. Rho-GEF (activado probablemente por un mecanismo dependiente de fosforilación en tirosina o mediado por proteínas $G_{\alpha 13}$) puede entonces estimular el intercambio GDP/GTP activando a Rho. La forma Rho•GTP activa unida a la membrana interactúa con los efectores específicos. La proteína Rho-GAP opera como un regulador negativo porque estimula la actividad GTPasa de Rho, que pasa a la forma Rho•GDP inactiva. Ahora Rho-GDI puede unirse con la forma inactiva de Rho y extraerlo de la membrana hacia el citosol. Adaptado de (469) y (468)

Estudios de biología celular y molecular han demostrado que Rho participa en una gran cantidad de funciones celulares y cada día se le atribuyen más (434). Una de las principales es la regulación del citoesqueleto y de la formación de las placas de adhesión (434,435,466,470,471). Además de esta función, las proteínas de la familia Rho también desempeñan un papel importante en la proliferación

celular (434,465). Se ha comprobado que Rho se encuentra ubicada en las vías intracelulares activadas por las Ras, si están directamente relacionadas con el efecto de Ras en las proteínas Raf, MEK y ERK, o intervienen a otro nivel es algo que todavía se desconoce (434,435).

Las GTPasas de la familia Rho también participan en la progresión del ciclo celular. Así, la inhibición de Rho por la exoenzima C3, una ADP ribosiltransferasa de *Clostridium botulinum*, inhibe la síntesis de ADN estimulada por suero (434,472). Rho también participa en la regulación de la transcripción, siendo esta una posible explicación para la participación de las GTPasas en el control del crecimiento (434,472).

El efecto de Rho en la biología celular está inducido por diferentes señales extracelulares donde están implicados los receptores acoplados a las proteínas G de membrana o con actividad tirosina cinasa. Una de las proteínas implicadas es la proteína cinasa C, activada a través de la PLC β o γ (434,466).

La cascada de señales que media el efecto de las GTPasas de la familia Rho no se ha identificado aún (23,435,465). Diferentes estudios han demostrado que la proteína Cdc42, que se activa tras la ocupación de receptores de membrana acoplados a proteínas G, provoca la activación de las Jun N-terminal cinasas (JNK), de la GTPasa Rac y de la MAP cinasa p38 (472-474). Las Rac, que son activadas por la PI3-K, las Ras y la proteína Cdc42, activan a las JNKs y a la PLA₂ y esta última induce la activación de Rho (465,472,473).

Por último, Rho, que puede ser activada por la PLA₂ y posiblemente por otras fosfolipasas, y es regulada por la PI3-K, modifica la actividad un gran número de proteínas (434), por ejemplo, se ha descrito que interviene en la activación de la PtdIns(4)P 5-cinasa (71), de la PLD (149), de la proteína cinasa N (PKN, o PRK 1) y de la PRK 2 (475), de la proteína cinasa asociada a Rho (ROK), que actuaría sobre la MLC a nivel de la subunidad de unión de la miosina (470), de gran variedad de proteínas de adhesión focal (23,476,477), de la PKC- δ (476) y posiblemente de las MAP cinasas (a través de PAKs) (23,465).

2.4. Serina/treonina cinasas: las proteínas cinasas activadas por mitógenos

Entre las vías intracelulares que transducen las señales extracelulares en determinados efectos se encuentran unas cascadas de señalización que conducen a la activación de unas proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución, denominadas genéricamente como proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (196,245,324,418). Estas cascadas de señalización se basan en la fosforilación secuencial de tres proteínas cinasa (*Gráfico I-13*).

Las MAPK, unas serina/treonina cinasas, son fosforiladas y activadas por las MAPKK, proteínas que se comportan como cinasas de *especificidad dual*, puesto que catalizan la fosforilación de las MAPK en residuos de treonina y tirosina. Las MAPKK son fosforiladas y activadas, a su vez, por unas serina/treonina cinasas denominadas genéricamente MAPKKK (196,245,324,418). Además de los componentes descritos, en la regulación y activación de las MAPKKK intervienen proteínas G monoméricas (como Ras, Rac o Cdc42) y otras cinasas específicas (que pueden considerarse MAPKKKK, o MKKKK) (*Gráfico I-13*) (196,245,418).

A lo largo de la evolución muchas de las proteínas de los módulos MAPK han sido conservadas en levaduras y mamíferos. Hasta la fecha se han identificado 12 miembros de la familia MAPK en mamíferos (*Tabla I-2*), que pueden ser subdivididos en 5 subfamilias teniendo en cuenta la homología de secuencia, su regulación por MAPKKs y su función. Todas las MAPK son serina/treonina cinasas de entre 38 y 55 kDa. Además de éstas se han identificado 7 MAPKK y 14 MAPKKK (*Tabla I-2*) (196,245,324,418).

Entre todos los componentes descritos, que en muchas ocasiones demuestran funciones redundantes, se configuran las vías de señalización de las MAPKs (*Gráfico I-13*) (196,245,324,418). La especificidad de estas cascadas de señalización depende de la activación de diferentes módulos MAPKKK–MAPKK–MAPK en respuesta a diferentes estímulos. Los módulos MAPK son activados diferencialmente por factores de crecimiento, hormonas y citoquinas (196,245,324,418). Además, pueden ser activados cuando se induce estrés celular por radiaciones, choque térmico, desequilibrio osmótico, daño genómico o productos bacterianos como lipopolisacáridos (196,245,324,418). La activación de las MAPK en respuesta a esos estímulos controla la

expresión génica, el metabolismo, funciones del citoesqueleto y otros procesos de regulación celular (196,245,324,418). Las MAPKs, además, intervienen en procesos de regulación celular muy complejos, como la mitogénesis, la diferenciación, la supervivencia y la migración (196,245,324,418).

De las 5 subfamilias de las MAPKs hay tres que han merecido una atención especial por los investigadores. Estas subfamilias están conformadas por: (a) las cinasas reguladas por señales extracelulares o ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*, o *extracellularly-responsive kinases*); (b) las cinasas Jun amino-terminal, o JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), también conocidas como proteínas cinasas activadas por estrés, o SAPK (*stress activated protein kinases*); (c) la proteína cinasa de 38 kDa activada por mitógenos, o p38MAPK, y cinasas relacionadas (196,245,324,418).

En el primer grupo se encuentran las proteínas ERK1, de 44 kDa, y ERK2 de 42 kDa, unas serina/treonina cinasas dirigidas por prolina, que son un elemento esencial y constante en las señales mitogénicas; además se activan en otras muchas situaciones (196,324). Las cinasas del grupo de las JNK/SAPK se caracterizan por su capacidad para fosforilar el extremo N-terminal del factor de transcripción c-Jun, por eso reciben ese nombre (478). Se han identificado principalmente dos formas con masas moleculares de 46 y 55 kDa (196,245,479). La p38MAPK es el homólogo en animales superiores de la proteína HOG1, identificada en *Saccharomyces cerevisiae*, que puede activarse por estrés hiperosmótico (196).

La cascada de fosforilación de ERK está íntimamente relacionada con la regulación del crecimiento, división celular y diferenciación, en contraste, las JNK/SAPKs y la p38MAPK están más implicadas en las respuestas al estrés celular y en la supervivencia, aunque los límites funcionales entre unas y otras son difusos (196,245,245,324,418).

Grupo	Definición y componentes
MAPKKKs	<p>Cinasas de las cinasas que activan las MAPK. Primer grupo de proteínas en la secuencia de activación de cualquiera de las cascadas de señalización de las MAPKs. También se denominan MKKKs.</p> <p>Raf (Raf-1, A-Raf, B-Raf)</p> <p>MEKK1: MAPK/ERK cinasa cinasa 1</p> <p>MEKK2: MAPK/ERK cinasa cinasa 2</p> <p>MEKK3: MAPK/ERK cinasa cinasa 3</p> <p>MEKK4 (o MTK1): MAPK/ERK cinasa cinasa 4</p> <p>ASK1 (MKKK5): cinasa 1 regulada por señales de apoptosis.</p> <p>MLK3 (SPRK): cinasa 3 de linaje mixto</p> <p>TAK1: cinasa activada por el factor de crecimiento transformante β</p>
MAPKKs	<p>Cinasas que activan las MAPKs. Segundo grupo de proteínas en la secuencia de activación de cualquiera de las cascadas de las MAPKs. También se denominan MKKs.</p> <p>MEK1 (MKK1): MAPK/ERK cinasa 1</p> <p>MEK2 (MKK2): MAPK/ERK cinasa 2</p> <p>MEK5: MAPK/ERK cinasa 5</p> <p>MKK3 (MEK3, SAPKK2): MAPK cinasa 3</p> <p>MKK4 (MEK4, JNKK, SEK1, SAPKK1): MAPK cinasa 4</p> <p>MKK6 (MEK6, SAPKK3): MAPK cinasa 6</p> <p>MKK7 (MEK7, SAPKK4): MAPK cinasa 7</p>
MAPKs	<p>Proteínas cinasas activadas por la mitogénesis o por mitógenos. Paso final en la activación cualquiera de las cascadas de señalización de las MAPK.</p> <p>ERK1 (p44MAPK): cinasa 1 regulada por señales extracelulares</p> <p>ERK2 (p42MAPK): cinasa 2 regulada por señales extracelulares</p> <p>ERK3: cinasa 3 regulada por señales extracelulares</p> <p>ERK5: cinasa 5 regulada por señales extracelulares</p> <p>ERK6 (o SAPK3, o p38γ): cinasa 6 regulada por señales extracelulares (pertenece al grupo <i>p38-like</i>)</p> <p>JNK1 (SAPK1): cinasa 1 Jun N-terminal</p> <p>JNK2 (SAPK2): cinasa 2 Jun N-terminal</p> <p>Proteínas p38-like: ERK6 (SAPK3), Mxi2</p> <p>p38MAPK (p38, p38/HOG1): proteína cinasa de 38 kDa activada por mitógenos</p>

Tabla I-2. Componentes de las vías de señalización de las MAP cinasas. Entre paréntesis se indican algunos sinónimos de las proteínas que participan en las vías MAPK.

2.4.1. Cascada de señalización de las MAP cinasas reguladas por señales extracelulares

Las proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) fueron inicialmente identificadas como las proteínas cinasas que fosforilaban la proteína 2 asociada con los microtúbulos (MAP-2), en respuesta a la activación de los RPTKs por insulina u otros factores de crecimiento (164,196,245,324,418). Las cascadas de señalización intracelular que conducen a la activación de las ERKs están presentes en todos los organismos eucariotas (164,196,245,324,418), y se basan, como todas las vías MAPK, en la fosforilación secuencial de tres módulos, que incluyen una MAPK, que es activada por una MAPKK o MAPK/ERK cinasa (MEK), que a su vez es activada por una MAPKKK o MEK cinasa (MEKK) ⁽⁴⁾ (*Gráfico I-13*) (196,245,324,418).

La cascada ERK es la primera y mejor caracterizada vía de las MAPK y consiste en la activación secuencial de las isoformas de Raf, las MEK 1 y 2 y, finalmente, las ERK 1 y 2, que controlan la actividad de diferentes factores de transcripción y otras enzimas (*Gráfico I-12* y *Gráfico I-13*) (196,245,324,418). Esta vía está regulada por la proteína G monomérica Ras y tiene efectos en células proliferativas y no proliferativas (196,245,324,418), donde fundamentalmente ha sido implicada con la transducción de las señales mitogénicas y con la proliferación (196,245,324,418).

MAPKKKs de la cascada ERK: isoformas de Raf.

Raf, el primer componente de la cascada ERK (*Gráfico I-12* y *Gráfico I-13*), fue originariamente identificada como el producto de un oncogén viral (v-raf) cuya proto-oncoproteína equivalente c-Raf (también conocida como Raf-1) tiene 74 kDa (480,481). Después se han clonado completamente dos homólogos en mamíferos: A-Raf de 69 kDa y B-Raf de 95 kDa. Como en tantas otras ocasiones, no se conocen las razones biológicas que subyacen en la diversidad de Raf, pero podría estar

⁽⁴⁾ La nomenclatura que aparece en la bibliografía para referirse a las proteínas implicadas en las vías de las MAP cinasas es de una complejidad diabólica, puesto que existen múltiples sinónimos, contruidos generalmente con las iniciales de una larga secuencia de términos, para hacer referencia a la misma proteína o grupo de proteínas. En esta Tesis Doctoral se ha procurado incluir varios sinónimos, para adecuar la información aquí recogida con la aparecida en las diferentes referencias citadas en el texto (véase *Tabla I-2*).

relacionada con la activación diferencial por los agonistas de las diversas formas de Raf (482,483), o por la activación preferencial de las isoformas MEK por cada isoforma Raf (484,485).

Aunque la activación de la cascada ERK es la consecuencia principal de la activación de Raf (*Gráfico I-13*), esta proteína podría ejercer acciones adicionales independientes de la activación de las ERKs (486). De igual forma Raf podría no ser la única MAPKKK de la cascada ERK (487,488). Es interesante que la MAPKKK denominada MEKK1 (*MAPK/ERK kinase kinase 1*), que inicialmente fue propuesta como la cinasa que conectaba los GPCRs con la cascada ERK (487), actualmente es considerada como responsable de la activación de la cascada de las JNK/SAPKs, junto con las cinasas MEKK2 y 3 (*Gráfico I-13*) (63,488) (489,490).

Todas las isoformas Raf de mamíferos muestran una considerable homología, presentando un dominio regulador N-terminal y un dominio catalítico C-terminal (480). La eliminación o la mutación del dominio N-terminal resulta en una forma oncogénica de Raf (480). El dominio catalítico C-terminal está muy conservado, como en la mayoría de las cinasas, e incluye el sitio catalítico, la región que une ATP y la zona de unión del sustrato (63,197,324,418). También se ha identificado en este dominio un lugar de unión de ácido fosfatídico, que podría tener importantes implicaciones para su regulación funcional (491).

Una vía importante de activación de c-Raf depende de su interacción con la proteína G monomérica p21-Ras en su conformación activa (Ras•GTP), que está localizada en la cara interna de la membrana plasmática (*Gráfico I-12*) (437,492,493). Los intercambiadores de nucleótidos de guanina incrementan la afinidad de Ras por c-Raf (que es citosólica en células no estimuladas) lo que induce la translocación de la última a la membrana (463,464). Parece que esta interacción puede ser reforzada mediante la unión de la región rica en cisteína presente en el dominio regulador de c-Raf, con el fosfolípido de membrana fosfatidilserina (PtdSer) (494). No se ha establecido completamente si la activación de Ras induce la translocación de las otras isoformas de Raf (495).

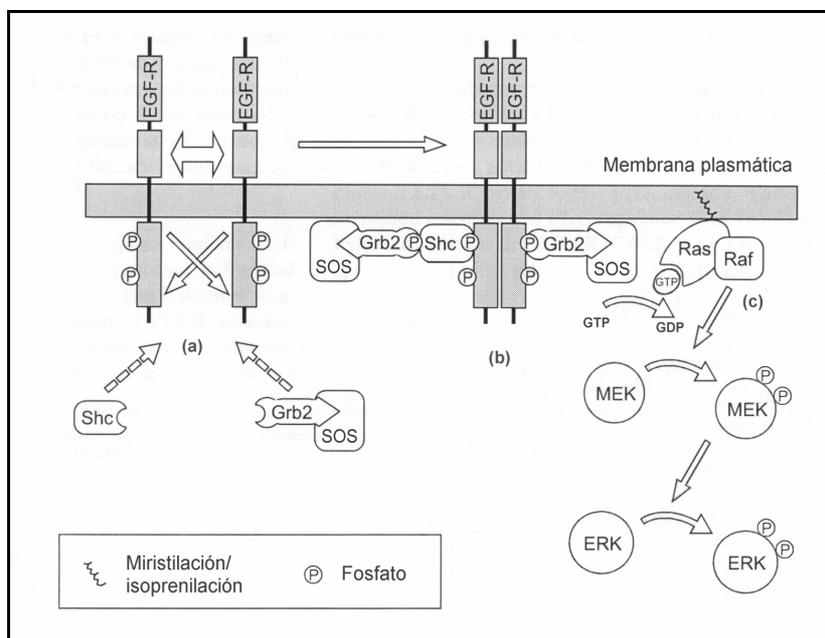


Gráfico I-12. Activación de la vía de señalización intracelular ERK por los RPTKs. (a) La unión de un agonista al dominio extracelular del RPTK, en este caso el EGF-R, induce la dimerización del mismo y la estimulación de la actividad tirosina cinasa. Esto se traduce en la autofosforilación de residuos de tirosina específicos en los dominios intracelulares del receptor, lo que permite la incorporación de proteínas adaptadoras que contienen dominios de unión específicos de fosfotirosinas, por ejemplo Grb2 y Shc. **(b)** Grb2 permanece constitutivamente asociado con el intercambiador de nucleótidos (GEF) SOS mediante sus dominios SH3. La unión de Grb2 a través de dominios SH2 con el RPTK localiza a SOS en la proximidad de la proteína G monomérica Ras•GDP, que se encuentra asociada con la membrana. SOS estimula el intercambio de GTP por GDP, activando a Ras. De forma alternativa la proteína adaptadora Shc se asocia con el RPTK fosforilado en tirosina mediante su dominio PTB. Shc es a su vez fosforilado, ofreciendo secuencias de unión con Grb2 a través del dominio SH2 de este último, lo que permite la localización de SOS en las proximidades de Ras para su activación. **(c)** La activación de Ras incrementa su afinidad por Raf e induce la translocación de esta última a la membrana para su completa activación. Una vez activa, Raf estimula, a su vez, a las MAPKK MEK1 y 2, y estas a las MAPK ERK 1 y 2. Adaptado de (62), (63) y (324).

La unión de Ras•GTP con c-Raf no es suficiente para activar completamente a esta última, al menos *in vitro*, por lo que es previsible que existan en la membrana efectos adicionales que permitan la completa activación de c-Raf (63,324,418). Entre estos estarían incluidos la fosforilación en las tirosinas 340 y 341, probablemente por PTKs de la familia Src, puesto que se ha demostrado que estas tirosinas cinasas interactúan con c-Raf (496,497). Las correspondientes defosforilaciones de c-Raf para inactivarla estarían mediadas por tirosinas fosfatasas reguladas por GPCRs (498).

Además de residuos tirosina susceptibles de ser fosforilados, las formas Raf presentan sitios adicionales para la fosforilación en serina/treonina (499,500). Cuando se produce, esta modificación puede tener un efecto activador o inhibidor (499,500). Las fosforilaciones activadoras pueden ser ejecutadas por la PKC (501,502) y/o otras proteínas cinasas (196,503,504). La fosforilación con carácter inhibidor implica al residuo serina 43 de c-Raf, que se encuentra inmediatamente adyacente, en dirección N-terminal, al dominio de interacción con Ras, presente en la región reguladora. Esta fosforilación es ejecutada por la PKA, y conlleva la inhibición de la unión de Ras•GTP con c-Raf, lo que impide la activación de la cascada ERK inducida por agonistas (505,506).

MAPKKs de la cascada ERK: las MEKs

MEK1 y MEK2 (*MAPK/ERK Kinase 1 y 2*), también denominadas MKK1 y MKK2 (*MAP kinase kinase 1 y 2*) respectivamente, son sustratos muy establecidos de Raf (*Gráfico I-13*) (63,324,418). Ambos contienen secuencias ricas en prolina necesarias para la interacción con esta MAPKKK (507). Las MEK son enzimas solubles que son fosforiladas por Raf en dos residuos serina, proceso que conduce a su activación (489,508-510). Como la translocación de Raf es necesaria para su activación, aún no está claro si la forma activa de Raf vuelve al citoplasma para fosforilar las MEK o si son fosforiladas en alguna localización yuxtamembranal, aunque se ha demostrado que c-Raf y A-Raf pueden fosforilar y activar las MEK *in vitro* en ausencia de membranas (482).

Como todas las MAPKKs, las MEK son unas cinasas con *función dual*. Puesto que son capaces de fosforilar residuos de tirosina y de treonina (63,197,324,418). Estas cinasas catalizan la fosforilación secuencial de un residuo de tirosina (primero) y otro de treonina (segundo), presentes en la secuencia consenso de activación de las MAPK: Tyr–Xaa–Thr, que en el caso de ERK1 y ERK2 es Thr–Glu–Tyr (63,324,418,511).

Parece que la fosforilación en ambos residuos es un requisito estricto para la localización de ambas cinasa en el núcleo, mientras que la actividad catalítica no es requerida para alcanzar esta localización (196,512). Además, la fosforilación de ambos residuos induce la dimerización de ERK2, que también parece un requisito para la localización nuclear (512). Si se tiene en cuenta que la mayoría de las cinasas solamente fosforilan en residuos de serina/treonina o bien de tirosina, esta inusual *fosforilación dual* de las MEKs podría ser un mecanismo preventivo para evitar una activación no específica de sus

sustratos, puesto que una activación desreglada de esas proteínas es un fenómeno potencialmente cancerígeno (63).

MAP cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs)

La ERK1 de 44 kDa (también conocida como p44-MAPK) y la ERK2 de 42 kDa (o p42-MAPK) son los sustratos mejor establecidos de las MEKs (*Gráfico I-13*) (513,514). Como la mayor parte de las MAPKs, ERK1 y ERK2 son serina/treonina cinasas dirigidas por prolina, que preferencialmente fosforilan la secuencia consenso Pro-Xaa-Ser/Thr-Pro y en menor medida Ser/Thr-Pro, en las proteínas diana (246). La interacción de ERKs con sus sustratos depende fundamentalmente de los dominios de unión para ERK en la proteína sustrato y de los dominios de unión en ERKs para el sustrato. Sin embargo, como las ERKs comparten secuencias de fosforilación en el sustrato con las JNK/SAPKs y las p38MAPKs, existe un posible cruce de señales entre las diferentes cascadas, cuyo significado biológico está por definir (63,418).

Los sustratos de ERK1 y ERK2 son numerosos (*Gráfico I-13*). Entre estos se incluirían factores y enzimas implicados en la activación de la transcripción dependiente de fosforilación, por ejemplo los factores de transcripción Elk-1 (515) y Tal (516) y la RNA polimerasa II (517). Con el objetivo de regular los procesos transcripcionales, las ERK1/ERK2, pero no las MEKs, translocan al núcleo después de su activación (165,518).

Entre los principales sustratos citoplasmáticos se incluyen los factores de traslación, como PHAS-I/eIF4E-BP (519); proteínas implicadas en reacciones de fosforilación-desfosforilación, como la cinasa ribosomal p90^{rsk} S6 (520) y la proteína fosfatasa 2C (521) y otras enzimas de señalización como la PLA₂ (163) y la tirosina hidroxilasa (522). Todas esas fosforilaciones activan las proteínas correspondientes que, como consecuencia, estimulan los procesos en los que están implicados (63,324,418).

ERK1 y ERK2 también fosforilan proteínas estructurales como la MBP (523), las proteínas 1 y 2 asociadas con microtúbulos (MAP-1 y MAP-2) y otros elementos del citoesqueleto (196,524), lo que indica que estas MAP cinasas podrían estar implicadas en la regulación de la estructura celular (63). Esta hipótesis aparece reforzada por el hecho de que aproximadamente la mitad de las ERKs en células activadas se encuentran unidas con el citoesqueleto (196,324).

Además, las ERKs fosforilan las cinasas situadas más arriba en la cascada de ERK, como la propia Raf (525) y las MEKs (526,527). De igual forma, otras proteínas implicadas en la regulación de dicha vía de señalización, por ejemplo SOS, también pueden ser fosforiladas en respuesta a la activación de ERK (528). Estas fosforilaciones parecen implicadas en un mecanismo de retroalimentación negativa (324,418,528).

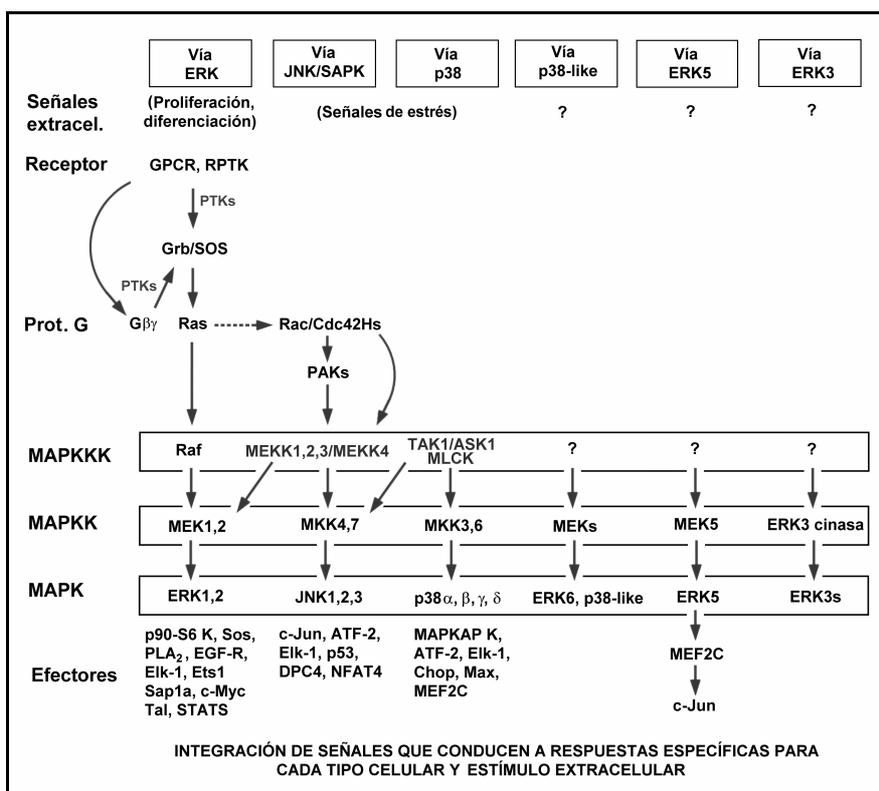


Gráfico I-13. Diagrama esquemático de las vías MAPK en mamíferos. Cada módulo MAPK está compuesto por una MAPKKK (ó MKKK), una MAPKK (ó MKK) y una MAPK. Las MAPKKK pueden activarse por gran variedad de señales extracelulares, incluyendo factores de crecimiento y señales de diferenciación y estrés. Las MAPKKK activas pueden estimular a una o varias MAPKK. Sin embargo, las MAPKK son relativamente específicas para sus MAPK sustrato. Una vez activadas, las MAPK pueden fosforilar factores de transcripción (por ejemplo, ATF-2, Chop, c-Jun, c-Myc, DPC4, NFAT4, Sap1a, STATS, Tal, p53), otras cinasas (MAPKAP cinasa, p90^{sk} S6 cinasa), componentes previos de las vías de señalización (EGF-R, SOS, Ras-GEF) y otras enzimas reguladoras como la PLA₂. Estos componentes controlan las respuestas celulares, que incluyen el crecimiento, la diferenciación y apoptosis. Las vías que no están completamente establecidas se representan con flechas discontinuas. Las señales extracelulares y proteínas desconocidas se representan con el símbolo (?). Adaptado de (324), (196), (245) y (418).

2.4.2. Cascadas de señalización de JNK/SAPK y p38MAPK

Como en el caso de las cascadas ERK, las vías de señalización intracelulares que conducen a la activación de las proteínas de estrés (JNK/SAPKs y p38MAPK, o genéricamente cinasas SAPK) se basan en la fosforilación secuencial de tres componentes (*Gráfico I-13*): un homólogo MAPKK cinasa (o MEKK), un homólogo MAPK cinasa (o MKK/MEK/SEK/JNKK/SAPKK) y un homólogo MAP cinasa (o SAPK/JNK/p38MAPK) (196,324,418).

MAPKKKs de las vías de estrés: las MEKKs

Como es previsible, si se tiene en cuenta la naturaleza secuencial de las cascadas de las proteínas activadas por estrés (o cascadas SAPKs) (*Gráfico I-13*), la activación de los homólogos MEK presentes en estas vías de señalización (MKKs) requiere la fosforilación por cinasas de tipo Raf (324,418).

Algunas de estas cinasas han sido identificadas. La primera descrita, una serina/treonina cinasa denominada MEKK1 (*MAPK/ERK kinase kinase 1*), demostró su capacidad para activar la cinasa MKK4 (*Gráfico I-13*) (490) y por ello es considerada coparticipante de la conexión funcional entre los agentes estresantes y la fosforilación de c-Jun mediante la activación secuencial MEKK1–MKK4–JNK (196,245); es decir, interviene en la activación de las vías de estrés (196,245).

En los últimos años se ha extendido la complejidad de la regulación de las vías SAPKs a nivel de las MAPKKK, al aislarse varias formas de MEKK, denominadas MEKK2 y MEKK3 (488), que pueden activar a las MEK/MKKs implicadas en la regulación de las JNKs y las ERKs, pero no a las que regulan la actividad de la p38MAPK (*Gráfico I-13*) (245,488). Estudios adicionales han demostrado que la MEKK2 activa preferencialmente a MKKs de las JNKs, mientras que MEKK3 lo hace con las que activan las ERKs (488). Adicionalmente se ha descrito la existencia de una MEKK4 (también denominada MTK1) que actuaría preferentemente sobre las cinasas MKK4 y MKK7, es decir regula la actividad de las JNKs (*Gráfico I-13*) (196,418).

Debido a la incapacidad de las MEKKs descritas para regular la activación de la p38MAPK, se ha intensificado la búsqueda de las MAPKKKs que intervienen en la activación de esta MAP cinasa (245,418). Se han identificado varias proteínas con este papel, por

ejemplo la cinasa activada por el factor de crecimiento transformante β (TAK1), pertenece al grupo de proteínas de tipo MEKK y es capaz de estimular las cinasas MKK3 y MKK6 (*Gráfico I-13*) (529,530).

Regulación de las cinasas MEKK por proteínas G monoméricas y por las cinasas activadas por las proteínas p21 (PAKs)

Debido a la función que desarrolla Ras (p21-Ras, c-Ras) en las vías ERKs (*Gráfico I-13*), se ha prestado especial atención al papel que las proteínas G monoméricas pueden desempeñar en estas otras cascadas de señalización (245). Mediante estos estudios se han obtenido evidencias que implican a las GTPasas de la familia Rho, Rac y Cdc42Hs, en la activación de estos sistemas, además de la propia p21-Ras (433).

Se ha descrito que Rac y Cdc42Hs activan las vías de señalización de las JNKs y de la p38MAPK (*Gráfico I-13*), puesto que la expresión de formas constitutivamente activas de ambas proteínas G induce la activación de la JNK1 (472,531-533) y de la p38MAP cinasa (533,534), pero no de las ERKs. Este hecho implica, en este nivel de la cascada, un factor de especificidad en la activación independiente de las vías de estrés y de las vías ERK (245,487). El concurso de ambas proteínas parece ser crítico en las vías de estrés, puesto que en los mutantes dominante negativo de Rac y de Cdc42 no se detecta actividad cinasa de las JNKs ni de la p38MAPK, cuando son estimulados por interleucina 1 (533), EGF (532,535) o tras la ocupación de los receptores muscarínicos (531).

Asimismo, existen evidencias que implican a p21-Ras en la regulación de las vías de estrés. En este sentido se ha descrito que la activación constitutiva de las isoformas Ras (mutantes Ha-Ras o d12-Ras), se corresponde con un incremento en la actividad de las JNKs (472,490), y que, por el contrario, la actividad de estas cinasas está bloqueada en los mutantes negativo dominante de Ras (N17-Ras o M17-Ras) (490). Sin embargo, el concurso de Ras en la activación de las vías de estrés puede no ser directo en muchos sistemas celulares, sino que se produciría mediante la activación de Rac (*Gráfico I-13*) (532,536,537). Por lo tanto, Ras se constituye como un punto de bifurcación adicional entre las cascadas de las MAPK clásicas y de las vías de estrés (245,487).

Aunque Rac puede interactuar directamente con la cinasa MEKK1, de forma análoga a como lo hace Ras en las vías ERK (245), generalmente existe un nivel de complejidad mayor en la transducción de las vías de estrés (*Gráfico I-13*) (245). Así, se ha demostrado la implicación en la transducción de estas señales de unas serina/treonina

cinasas denominadas cinasas activadas por p21 (PAKs) (245). Se ha demostrado que las formas PAK1, 2 y 3 (o PAK α , β y γ , respectivamente) se unen con las proteínas Cdc42 y Rac, y son activadas por éstas (533,538,539). También se ha establecido la implicación de las cinasas PAKs en la estimulación de las vías de estrés, al demostrarse que una forma constitutivamente activa de PAK, o la sobreexpresión de PAK1 y 2 inducen la activación de JNK/SAPKs (533,540).

MAPKKs de las vías de estrés: las MKKs o SAPKKs

La activación de las proteínas cinasas activadas por estrés SAPK/JNKs y p38MAPK, depende de la fosforilación dual en determinadas secuencias específicas: Thr-Pro-Tyr, para las JNKs (479), y Thr-Glu-Tyr, para la p38MAPK (541-543). Estos residuos son específicamente fosforilados por homólogos MKK/MEK distintos de MEK1 y MEK2 que, como hemos descrito, son responsables de la activación de las MAP cinasas clásicas ERK1 y ERK2 (245).

Las proteínas MKK (o MEK) identificadas inicialmente se denominaron (*Gráfico I-13*): SAPK/ERK cinasa 1 (SEK1) (544), las isoformas MKK/MEK 3 y 4 (545) y la JNK cinasa (JNKK) (546). Posteriormente se determinó que las proteínas SEK1, MKK4 y JNKK, capaces de activar *in vitro* las cinasas JNK y la p38MAPK sin demostrar efectos sobre las MAP cinasas ERK1 y ERK2, representaban un homólogo común en mamíferos (544-547).

En las células PC12 MKK4 puede actuar como cinasa con *función dual* sobre las JNKs y, minimamente, sobre la p38MAPK, mientras que la MKK3 actúa exclusivamente sobre la p38MAPK, aunque demuestra una actividad específica baja (548), proponiéndose que en células neuronales MKK4 presenta duplicidad de sustratos MAPK, mientras que la MKK3 es un activador específico de la p38MAPK (548). Estudios posteriores han establecido que la MKK4 se comporta en la mayoría de tipos celulares como una cinasa de función dual exclusiva de las JNKs (196,324,418).

Estudios más exhaustivos, desarrollados en diversos tipos celulares (548,549), han establecido que los componentes del grupo de proteínas activadoras de las cinasas JNK y p38 no se restringe a dos componentes, sino que existen diversas cinasas adicionales que suelen ser reguladas de forma específica para cada tipo celular (548,549). En particular, mediante estudios cromatográficos en células KB humanas sometidas a estrés osmótico, se ha descrito la existencia de cinco SAPKKs (548).

Una de ellas, denominada SAPKK3 (*Gráfico I-13*), demostró ser un activador específico de la p38, con una capacidad de estimulación de esa MAP cinasa 10 veces superior a la demostrada por la MKK3 en ese tipo celular (548). De nuevo existe duplicidad de términos, puesto que esta cinasa se corresponde con la descrita recientemente como un nuevo activador de la p38MAPK, y denominada MKK6 (530,550-552). Esta MAPKK se expresa en la mayoría de tejidos periféricos, incluyendo el músculo esquelético y cardíaco, pero no se presenta en el cerebro (530,550-552). Se considera que la MKK6 es la principal activadora de la p38MAPK en todas las células que no tienen un origen nervioso. Esto es constante incluso en aquellos tipos celulares que coexpresan MKK3 y MMK6, presumiblemente por la diferencia en la actividad específica que presentan ambas cinasas, muy favorable para la segunda (548).

La diversidad de SAPKKs no se restringe a la proteína p38, sino que las JNK/SAPKs también son susceptibles de ser activadas por otras cinasas diferentes de la MKK4 (245). Así, se han descrito nuevas proteínas activadoras de las JNKs, inmunológicamente diferentes de la MKK4, que han sido denominadas SAPKK4 y SAPKK5 (*Gráfico I-13*) (548). La primera de ellas se corresponde con la identificada en estudios realizados en fibroblastos sometidos a choque osmótico, denominada MKK7 (196).

SAPK: cinasas de estrés

Las cinasas activadas por las vías de estrés conforman una familia que está constituida por las JNK/SAPKs y las formas p38MAPK (genéricamente familia SAPK). Ambos grupos comparten un 42-45 % de homología en el dominio cinasa (418,553).

Las cinasas JNK/SAPK se caracterizan por su capacidad para fosforilar el extremo N-terminal del factor de transcripción c-Jun, por eso reciben ese nombre (478). Estas MAP cinasas están codificadas por tres genes diferentes, jnk1, jnk2 y jnk3; los dos primeros se expresan de forma ubicua, y el último se expresa selectivamente en el cerebro, el corazón y los testículos (553). Cuando se expresan, codifican 4 isoformas JNK1, 4 isoformas JNK2 y 2 isoformas JNK, todas ellas de 46-55 kDa (553). En contraste con las MAP cinasas clásicas (ERK1 y ERK2), las cinasas JNK son débilmente activadas por estímulos mitogénicos, sin embargo se activan potentemente ante estímulos estresantes como inflamación, citoquinas, isquemia, agentes quimioterapéuticos y radiaciones (196,418,553). En respuesta a su estimulación estas cinasas fosforilan múltiples sustratos, como ATF-2, c-Jun, JunD, Elk-1 DPC4, NFAT4, o p53 (*Gráfico I-13*) (418,553). Estos sustratos intervienen regulando varios

procesos celulares, incluyendo la proliferación (en algunos tipos celulares) y la apoptosis (196,418,553).

La p38MAPK es el homólogo en animales superiores de la proteína HOG1 identificada en *Saccharomyces cerevisiae*, que puede activarse por estrés hiperosmótico (196). Las cinasas p38, de las que se han descrito las isoformas α , β , γ , y δ (418), al igual que las JNK/SAPK son activadas por estímulos de estrés, fundamentalmente por citoquinas inflamatorias, radiaciones y ciertas toxinas, como anisomicina y arsenita (196,418). Entre los efectores de las cinasas p38 identificados se encuentran los siguientes sustratos: MAPKAP K, ATF-2, Elk-1, Chop, Max, y MEF2C (*Gráfico I-13*) (196,418).

2.4.3. Funciones de las MAP cinasas en las células de mamíferos

Proliferación y diferenciación

Las cinasas ERK1 y/o ERK2 son activadas por mitógenos en todas las células y, aparentemente, son un elemento esencial y constante para las señales mitogénicas (324). La activación prolongada y la retención nuclear de las ERKs es un requisito para la transcripción del gen ciclina D1 que codifica la proteína homónima (554), hecho que sugiere una forma de control del ciclo celular mediada por las ERKs (554). Las funciones de estas cinasas fuera del núcleo también pueden contribuir a establecer respuestas proliferativas. Como ya se ha indicado, aproximadamente la mitad de las ERKs en células activadas están unidas con el citoesqueleto (555), hallazgo que parece corresponderse con una regulación de estas estructuras por las cinasas ERK (324). También se ha descrito que es necesaria una actividad basal de las ERK para el mantenimiento de las interacciones celulares con la matriz extracelular, pero no para las interacciones célula a célula (164,555,556).

Parece que las cinasas JNK/SAPKs también desempeñan un papel en la señalización mitogénica. Así, en células B humanas las JNK/SAPKs son selectivamente activadas por la CD40 y esta activación protege a las células de la apoptosis (557). Por el contrario, la estimulación de las ERKs en estas células tras la activación de receptores de inmunidad induce la apoptosis (557). Las JNK/SAPKs también han sido asociadas con la regeneración hepática y con la activación de las células T (558,559). Otras evidencias otorgan a la p38 un papel inhibitorio en la proliferación celular. Su activación inhibe la transcripción del gen ciclina D1 y, por tanto,

debería inhibir la progresión del ciclo celular (554). El tratamiento de cultivos de neuronas fetales con insulina provoca la inhibición de la actividad de la p38, aumentando la supervivencia celular (560).

La expresión de componentes constitutivamente activos de la vía ERK causa la transformación celular, lo que parece implicar a las vías MAPKs en los procesos de carcinogénesis (324). Se ha comprobado que las ERKs están constitutivamente activas en carcinomas renales y su actividad se correlaciona con la gravedad del tumor (561). Estos autores (561) también han descrito que MEK1 se sobreexpresa en la mayoría de los tumores. Por otra parte, existen evidencias recientes que relacionan la actividad de las ERKs con ciertos tipos de cánceres pulmonares (562). Las cinasas JNK/SAPKs también han sido implicadas con fenómenos de transformación celular, así se ha descrito que estas cinasas están constitutivamente activas en células MT2 transformadas por el virus de la leucemia de células T humanas 1 (HTLV1) y en leucocitos aislados de pacientes adultos con leucemia de células T (563).

Diversas evidencias implican a la activación prolongada y la retención nuclear de las ERKs con la diferenciación (324). En la línea celular PC12, utilizadas generalmente como modelo en estudios de diferenciación, la activación sostenida de la cascada ERK conduce a la diferenciación, mientras que la activación transitoria no se acompaña de este efecto (324). De forma contradictoria, se ha demostrado en otros tipos celulares que los ésteres de forbol inducen una activación sostenida de las ERKs pero no la diferenciación celular (564). En cultivos primarios neuronales parece que estas cinasas no son necesarias para el crecimiento de neuritas estimulado por factores de crecimiento (565-567), pero en neuronas postmitóticas las ERKs estarían implicadas en la regulación de la plasticidad sináptica (568). De igual forma, otras MAPKs desempeñan un papel en la diferenciación celular. Así, la transcripción de un homólogo de la p38 se encuentra inducida durante la diferenciación de mioblastos a miotubos (569). Otros autores han indicado que una activación constitutiva de las subunidades $G\alpha_{16}$ y $G\alpha_q$, por la expresión de mutantes deficientes de la actividad GTPasa, provoca la activación persistente de las JNK/SAPKs y causa la diferenciación en células PC12 (570).

Estrés y apoptosis

El mayor avance obtenido en la comprensión de los eventos de señalización que se establecen en respuesta al estrés celular deriva del descubrimiento de que las JNK/SAPKs y la p38MAPK eran activadas por agentes y tratamientos que provocan estrés celular, como el choque

térmico, el choque osmótico, las citoquinas, los inhibidores de la síntesis proteica, los antioxidantes, las radiaciones ultravioleta y los agentes que inducen daño en el ADN (324). Se ha especulado con la posibilidad de que la inhibición del crecimiento descrita en el apartado anterior pueda ser consecuencia de la activación de estas MAPKs de estrés (324). La tirosina cinasa c-Abl parece que inhibe la proliferación y activa tanto a la JNK/SAPK como a la p38 en respuesta al estrés genómico inducido por el agente ara-C (571,572). De igual forma, la diferenciación también podría ser inhibida. En este sentido, se ha descrito que la p38 fosforila el factor de transcripción Chop/GADD153 en adipocitos y, consecuentemente, inhibe la diferenciación en este tipo celular (573).

Las MAP cinasas también intervienen en la señalización que conduce a la apoptosis celular, pero, como en los casos precedentes, es difícil generalizar a cerca de sus funciones (324). Se ha propuesto que las ERKs y las JNK/SAPKs tienen efectos opuestos en la regulación de la apoptosis, que serían intercambiables dependiendo del tipo celular (196,324). Así, en células B, ERK induce la apoptosis, mientras que JNK/SAPK protege a la célula de ese proceso (557). En otros modelos, por ejemplo en células PC12, también se ha observado un comportamiento opuesto entre ambas cinasas, pero la JNK/SAPK parece promover la apoptosis y ERK tiene un efecto protector (324,557,574). Para completar el rango de efectos posibles se ha descrito que la eliminación del NGF en células PC12 induce la apoptosis, pero activa concurrentemente a la JNK/SAPK y la p38, inhibiéndose las ERKs (574). Por último, aunque la activación de la JNK/SAPK parece un hallazgo frecuente en los fenómenos de muerte celular, este proceso no es suficiente para inducir la apoptosis mediada por el TNF en células MCF7 (575,576).

2.4.4. Interregulación e integración de señales en las vías MAPK

Las MAPKs actúan coordinadamente con otros sistemas de señalización celular, por lo que parece fundamental una interregulación entre todas esas vías intracelulares para obtener la respuesta celular adecuada (324). Como acabamos de describir las MAPKs actúan de forma antagonica en las células que experimentan apoptosis y también se ha observado que pueden cooperar o antagonizarse mutuamente en apoyo de la proliferación (324), por lo tanto también existen mecanismos de interregulación entre las vías MAPK (324).

Existen múltiples referencias que aportan evidencias sobre la necesidad de la activación simultánea de varias MAPKs para desarrollar algún efecto celular. Por ejemplo, la activación de la ERK y de la JNK/SAPK es necesaria para la estimulación de células T y la producción de IL-2 (559,577). En células neuronales las ERK, las JNK/SAPK y las p38 son activadas en respuesta a movilizaciones de calcio por la CaM cinasa IV (578), aparentemente esta cinasa coordina las señales dependientes del calcio, al menos en parte, mediante la activación de las MAPKs (578). En macrófagos los lipopolisacáridos activan la ERK, la JNK/SAPK y la p38, que son requeridas para la translación del TNF (579,580).

La integración de las señales puede ocurrir a muchos niveles: (a) controlando la actividad de los iniciadores de las cascadas, (b) modulando la actividad de los componentes de esas cascadas, (c) por inactivación regulada de las cascadas, y (d) a nivel de los sustratos (324). Como ejemplo del primer tipo de integración, se ha descrito que el AMPc puede inhibir o actuar de forma sinérgica con otros estímulos para activar las ERKs, dependiendo del tipo celular y de forma previa al inicio de la cascada MAPK (581). Respecto a las interregulaciones entre vías intracelulares por modificación de componentes de la cascada, se ha descrito que las cinasas MEK1/2 pueden ser reguladas a nivel de secuencias ricas en prolina, por elementos de otras vías de señalización (507,582), y también que la cinasa MEK1 es inhibida por fosforilaciones dependientes de la CDK2 (583). De igual forma, existen evidencias de inhibición regulada de las vías MAPK, por ejemplo: MEKK1 puede suprimir la actividad de ERK induciendo la expresión de genes que codifican fosfatasas de las MAPK (584).

Sin embargo, los ejemplos más documentados de una integración cruzada entre las diferentes cascadas se encuentran a nivel de sustrato (324). Así, en plaquetas estimuladas con colágeno o trombina se induce la activación de la PLA₂ por fosforilación en lugares específicos mediada por la p38 (585). Estos lugares específicos para fosforilación en la PLA₂ son reconocidos y fosforilados por las ERK en otros tipos celulares (586), por lo que parece que el acceso a la PLA₂ por las diferentes MAPKs es dependiente del tipo celular (324). También se ha descrito una regulación diferencial por las MAPK de algunas de las cinasas que pueden ser activadas por estas vías de señalización, como la proteína cinasa 3 activada por MAPK (MAPKAP cinasa 3, o 3PK) o la cinasa de integración de señales MAPK (MINK) (587).

2.5. *Proteínas fosfatasas*

En la regulación del estado de fosforilación de las proteínas intracelulares, juegan un papel muy importante las fosfatasas, ya que dicho estado de fosforilación viene dado por el balance entre la actividad de proteínas cinasas y fosfatasas (21,197,588-590).

Proteínas serina/treonina fosfatasas

Las proteínas fosfatasas específicas para residuos de serina/treonina son una gran familia de moléculas relacionadas funcionalmente y estructuralmente, de las que se han identificado seis tipos diferentes en células eucariotas. Esta clasificación agrupa a las serina/treonina (PSPs) fosfatasas según su comportamiento frente a diversos factores, como cuál de las subunidades de la fosforilasa cinasa prefieren defosforilar, su sensibilidad al ácido okadaico o a otros inhibidores y su dependencia de cationes divalentes (197,588).

Las fosfatasas de tipo 1 (PP-1) prefieren defosforilar la subunidad β de la fosforilasa cinasa, mientras que las de tipo 2 (PP-2) prefieren la subunidad α (*Tabla I-3*). Además, la actividad de las fosfatasas PP-1 está bloqueada por dos proteínas reguladoras denominadas inhibidor-1 (forma fosforilada) e inhibidor-2, mientras que las del tipo PP-2 no demuestran inhibición por este tratamiento (197,588).

Las PP-2 se subclasifican en PP-2A, PP-2B y PP-2C, atendiendo a su regulación por cationes divalentes y a su sensibilidad al ácido okadaico (*Tabla I-3*) (197,588). El subtipo PP-2B es dependiente de Ca^{2+} , el subtipo PP-2C es dependiente de Mg^{2+} , mientras que las fosfatasas PP-2A y PP-1 son independientes de los cationes divalentes (197,588). El ácido okadaico (OA)⁽⁵⁾ es un potente inhibidor para las fosfatasas PP-1 y PP-2A, mientras que es un débil inhibidor del subtipo PP-2B y no afecta al subtipo PP-2C (591).

Después se descubrieron los tipos PP-4 (PPX) y PP-5, ambas relacionadas con el tipo PP-1 y con localización exclusivamente nuclear. La primera demuestra una débil inhibición por OA y la segunda se inhibe moderadamente (197).

⁽⁵⁾ El ácido okadaico, un ácido graso complejo sintetizado por dinoflagelados marinos, es un promotor tumoral tan potente como los ésteres del forbol. Inicialmente se pensó que podían activar la PKC, de forma análoga a los ésteres de forbol, pero más tarde se ha sabido que este compuesto actúa inhibiendo la defosforilación de los sustratos de la PKC.

En el páncreas de la rata se han caracterizado ambos tipos de proteínas fosfatasas PP-1 y PP-2, basándose en la defosforilación de la fosforilasa cinasa (592). También se ha identificado en el páncreas una fosfatasa compuesta por dos subunidades, que es activada por Ca^{2+} y por calmodulina (592), de forma similar a la fosfatasa 2B localizada en el cerebro y denominada calcineurina. La proteína fosfatasa 1, está implicada en la defosforilación de la CaM cinasa II (134).

El OA, a concentración micromolar, es capaz de inhibir la secreción de amilasas estimulada por CCK, carbacol y bombesina en acinos pancreáticos de rata (593). Otra molécula reguladora de la actividad de fosfatasas, la calculina A, que inhibe los tipos PP-1 y PP-2A ($\text{IC}_{50} \approx 10 \mu\text{M}$), también se ha revelado como un inhibidor de la secreción pancreática, de hecho más potente que el ácido okadaico, sugiriendo que el efecto inhibitor en la secreción de amilasas depende de fosfatasas tipo PP-1 y PP-2A (593).

Carac. diferenciales	Subtipo			
	PP-1	PP-2A	PP-2B	PP-2C
Preferencia por la subunidad α o β de la fosforilasa cinasa	Subunid. β	Subunid. α	Subunid. α	Subunid. α
Inhibición por I-1 e I-2	Sí	No	No	No
Necesidad absoluta de cationes divalentes	No	No	Sí (Ca^{2+})	Sí (Mg^{2+})
Estimulación por calmodulina	No	No	Sí	No
Inhibición por ácido okadaico (IC_{50})	Sí ($\approx 20 \text{ nM}$)	Sí ($\approx 0.2 \text{ nM}$)	Sí ($\approx 5 \mu\text{M}$)	No
Actividad específica	Alta	Alta	Muy baja	Muy baja

Tabla 1-3. Tipos de proteínas serina/treonina fosfatasas. I-1: inhibidor-1 (forma fosforilada); I-2: inhibidor-2. Los tipos PP-4 y PP-5 (no representados) se diferencian de éstas por su localización exclusivamente nuclear y, entre ellas, por su diferente sensibilidad al ácido okadaico.

Proteínas tirosina fosfatasas

Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) no son homólogas estructuralmente a las serina-treonina fosfatasas y tampoco lo son entre

ellas, al contrario que las proteínas cinasas, que poseen una homología muy elevada y que pueden proceder de un único gen ancestral común, (21,197,239). Existen al menos tres familias de proteínas con actividad tirosina fosfatasa, que constituyen la superfamilia de PTPs. Existe una homología en la secuencia primaria muy baja entre los miembros de los tres grupos, aunque presentan una estructura terciaria similar y comparten el mismo mecanismo general catalítico (589).

Hasta el momento se han identificado 75 PTPs, pero los análisis genómicos predicen la existencia de unas 500 PTPs en humanos. Estas enzimas se caracterizan por poseer al menos un dominio catalítico de unos 240 residuos (dominio PTP) bastante conservado (589). La mayoría de las tirosina fosfatasas disponen, sin embargo, de dos de esos dominios PTP. Habitualmente uno de ellos, el situado más próximo al extremo N-terminal muestra actividad enzimática, mientras que el otro no. Se desconoce la función de este último, pero podría dirigir interacciones proteína-proteína para modular la actividad directamente, o indirectamente mediante la localización subcelular (589).

Las PTPs *clásicas* existen en formas transmembranales (*TM*) y no transmembranales (*non-TM*). De acuerdo con su estructura, las PTPs con dominios transmembrana probablemente son receptores cuya actividad PTPasa está modulada por ligandos extracelulares (son las receptor proteína tirosina fosfatasas, o RPTPs) (21,589).

Las fosfatasas de especificidad dual (DSPs) y las fosfatasas (ácidas) de bajo peso molecular (LMP) también pueden defosforilar fosfotirosinas (21). Entre las DSP, que defosforilan residuos de treonina y tirosina en una secuencia contexto, se incluyen los reguladores del ciclo celular Cdc25A, B y C, y las fosfatasas MKP-1 y PAC-1 de las MAPK (21,589). Por último, las pequeñas LMP son muy distantes estructuralmente de las PTP clásicas (receptor y no receptor) y las DSP; sin embargo, conservan los mecanismos catalíticos y se ha descrito que también participan en la regulación del ciclo celular (589).

Las PTPs intervienen en múltiples procesos celulares, previsiblemente los mismos en los que están implicados las PTKs (589). Se ha descrito que las PTP no receptor que contienen dominios SH2 (SHPTPs, o SHPs) regulan los procesos de señalización de los receptores para factores de crecimiento y citoquinas, modificando el estado de fosforilación de diferentes tirosinas cinasas. Sus efectos pueden ser predominantemente negativos (SHPTP1), o positivos (SHPTP2), es decir, la defosforilación reduce o incrementa la actividad de la señal estudiada (589). Sin embargo, estudios recientes parecen indicar que las fosfatasas SHPTP pueden tener ambos efectos dependiendo del tipo celular y de la vía de señalización implicada (21,589). Las proteínas tirosina fosfatasa

receptor (RPTPs), por su parte, intervienen en otros muchos procesos de señalización celular. Está bien caracterizado el concurso de estas últimas en la regulación de la adhesión celular y de las uniones adherentes (21,241,589,594). En el páncreas exocrino se ha asociado la actividad de PTPs endógenas y exógenas (microinyección de PTP-1 de origen neural) con un incremento en la secreción de amilasas inducida por movilizaciones de calcio citosólico (595).

En la regulación de las vías de señalización de las MAP cinasas también desarrollan una importante tarea las proteínas fosfatasas (418,589,590). Para la activación de las MAPKs se requiere una fosforilación en residuos de treonina y tirosina (por una cinasa de *especificidad dual*) (196,245,324,418), por lo tanto las fosfatasas de especificidad dual (DSPs) parecen ser las principales responsables en el control de su actividad, ya que son capaces de eliminar grupos fosfato de ambos residuos en las cinasas MAP (589,590). Sin embargo, también se ha descrito la participación de PSPs (PP-2A y PP-2C) y de PTPs (PTP-SL, PTP1B, y STEP entre otras) en la regulación de estas vías de señalización (589,590).

Por último, el control de la actividad de las vías MAPK por fosfatasas también puede ser inverso, es decir, se ha descrito que las MAPK regulan la actividad de varias PTPs por fosforilaciones inhibitoras, probablemente en un mecanismo de retroalimentación positiva (589,590). Por ejemplo, la fosfatasa PTP1B es fosforilada en los mismos residuos de serina en el extremo C-terminal ante estímulos mitogénicos y el estrés ambiental (596), y la fosfatasa PTP2C es fosforilada e inhibida por la MAPK p44 en células estimuladas por EGF (521).

2.6. Activación de la vía de las tirosinas cinasas por receptores con actividad enzimática

Todos los RPTKs son proteínas transmembranales con actividad tirosina cinasa intrínseca que se unen a ligandos polipéptidos en su región N-terminal, que se encuentra sobre la membrana plasmática en una localización extracelular (2,21,371,371). La unión de los ligandos provoca la homo o heterodimerización de los receptores (597), lo que induce la autofosforilación (o transautofosforilación) de varios residuos de tirosina,

localizados en la región C-terminal citoplasmática del receptor (55-57,196,210,211,598).

Esos residuos de tirosina fosforilados funcionan como lugares de unión para las proteínas que poseen dominios SH2 (43,45). Como ya se ha indicado, los dominios SH2 se encuentran en proteínas con actividad enzimática, como la PLC- γ , la subunidad reguladora p85 de la PI3-K, la p120^{Ras-GAP} y las cinasas de la familia Src, y también en algunas proteínas adaptadoras no enzimáticas, como Grb2, Shc, Crk, Nck e IRS-1 (*Gráfico I-14*) (21,45,57,196).

La identidad de las proteínas que se unen al receptor dependerá principalmente de la secuencia de aminoácidos situada alrededor del residuo de tirosina que es fosforilado en el receptor (21,57,196,599). Por tanto, cada receptor de factor de crecimiento incorporará una selección específica de proteínas en respuesta a la activación del ligando (21,57,196,599). Por ejemplo, como respuesta a la activación del PDGF-R, el complejo Grb2-SOS transloca hacia la membrana, y el dominio SH2 del Grb2 se une al aminoácido Tyr 716 en la cola del receptor. Además, la activación de PDGF-R induce la unión de p120^{Ras-GAP} a la Tyr 771, de la PLC- γ al residuo de Tyr 1021, y de la p85 PI3-K a los residuos de tirosina Tyr 740 y Tyr 751 (57).

En el caso de la proteína adaptadora Grb2, los residuos de fosfotirosina en el receptor y los aminoácidos vecinos hacia el extremo C-terminal son reconocidos por el dominio SH2 de Grb2 (o proteínas afines, como Grap). La formación del complejo RPTK-Grb2-SOS en el plano de la membrana localiza al último en la proximidad del complejo inactivo Ras•GDP (*Gráfico I-14; véase también Gráfico I-12, pág. 81*). El factor intercambiador de nucleótidos de guanina, SOS, estimula el intercambio del GDP por GTP en Ras, y como consecuencia se alcanza la conformación activa de Ras. Como se indicó en el apartado 2.4.1 (*pág. 79*) la interacción de Ras•GTP con c-Raf estimula la translocación de esta última a la membrana para su activación, y subsiguientemente se activan las vías MAPK (9,43,45,218,417).

En otras ocasiones, los miembros de una segunda familia de proteínas adaptadoras, la familia Shc, se asocian con el RPTK fosforilado en tirosina. Las proteínas p46-Shc y p52-Shc se unen a las secuencias específicas que contienen residuos de fosfotirosina en los RPTKs activados, y estos fosforilan un residuo en tirosina en el dominio central rico en prolina/glicina de Shc. Este lugar de fosforilación es reconocido por el dominio SH2 de Grb2. Como en el caso de una interacción directa entre Grb2 y el RPTK fosforilado en tirosina, la formación del complejo RPTK(P)-Shc(P)-Grb2-SOS estimula el intercambio GTP/GDP en Ras, y

con ello la activación de c-Raf (Gráfico I-14; véase también Gráfico I-12, pág. 81) (9,21,63,196).

Otra proteína que contiene dominios SH2 asociada con el RPTK activado es la proteína estimuladora de la actividad GTPasa de Ras, p120^{Ras-GAP}, de este modo tanto un activador de Ras (mSOS1) como un inhibidor (p120^{Ras-GAP}) son incorporados al receptor (196,437).

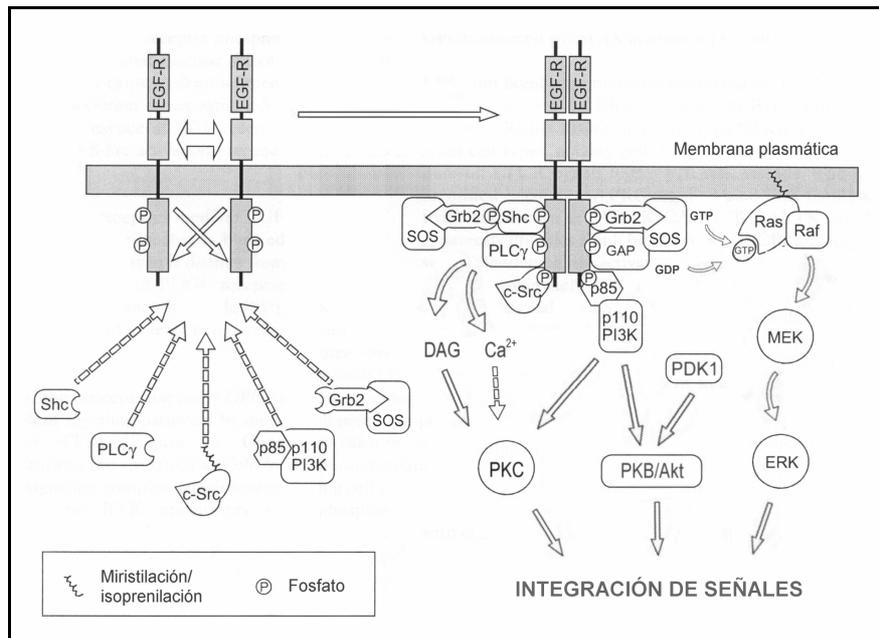


Gráfico I-14. Cascadas de señalización activadas por RPTKs. La unión de un agonista al dominio extracelular del EGF-R, induce la dimerización del mismo y la estimulación de la actividad tirosina cinasa. Esto se acompaña de la autofosforilación de residuos de tirosina específicos en los dominios intracelulares del receptor, lo que permite la incorporación de diferentes enzimas y proteínas adaptadoras que contienen dominios de unión específicos de fosfotirosinas, por ejemplo Grb2-SOS, Shc, PLC γ , c-Src y PI3-K. Estas proteínas son fosforiladas/activadas por el receptor, lo que estimula una serie de cascadas intracelulares que conducirán a distintos efectos biológicos, dependiendo de los efectores controlados por las vías activadas. Adaptado de (62), (63) y (324).

La unidad catalítica p110 de la PI3-K es otro efector de los RPTK. La unión de la subunidad reguladora p85 con el receptor mediante sus dominios SH2, provoca la activación de la subunidad catalítica p110 (420-422). También se ha demostrado que una parte de la actividad de la PI3-K inducida por la ocupación de los RPTK procede de una interacción directa entre la subunidad p110 y la región efectora de Ras (421,425). En el caso

del receptor de la insulina la incorporación y activación de la PI3-K se produce por la unión de p85 con residuos de tirosina fosforilados en las proteínas adaptadoras IRS (sustrato del receptor de insulina) (196,420). Como ya se ha indicado la PI3-K es una cinasa de lípidos que produce PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂ e PtdIns(3,4,5)P₃, fosfoinosítidos que intervienen, especialmente el último, en la regulación de muchos efectores intracelulares, como la PKC y la Akt/PKB (*Gráfico I-14*) (321,420,422).

Otra molécula con actividad enzimática que se incorpora a los RPTKs utilizando dominios SH2 es la isoforma γ de la PLC. La fosforilación en tirosina de la PLC- γ mediada por el RPTK estimula su actividad catalítica (51,54), de este modo, el PtdIns(4,5)P₂ es hidrolizado para liberar Ins(1,3,4)P₃ y DAG que, como ya se ha indicado, movilizan el calcio intracelular y activan las isoformas de PKC, respectivamente (*Gráfico I-14*) (5,37,73). La movilización de calcio y la hidrólisis de fosfoinosítidos detectados cuando se ocupan los receptores de factores de crecimiento están mediadas por la activación de la PLC γ (51,54,600).

2.7. Activación de la vía de las tirosinas cinasas por receptores sin actividad enzimática

La estimulación de las vías intracelulares de las tirosinas cinasas también puede iniciarse por ligandos que no interaccionan con receptores que presentan actividad enzimática. Estas otras señales actuarían en los receptores de citoquinas, en las integrinas y en los receptores acoplados a proteínas G (21,62,196,601,602).

Los receptores de citoquinas presentan un dominio extracelular bastante conservado, una región transmembrana y un dominio intracelular que contiene unas regiones proximales a la membrana plasmática denominadas *box1* y *box2* (21,196). Los receptores de citoquinas, de los que la mayor parte ha perdido su capacidad enzimática, se asocian de forma no covalente con tirosinas cinasas de la familia JAK que les confieren actividad cinasa (*Gráfico I-15*) (21,196,601).

Las integrinas constituyen un tipo de receptores de superficie cuyos ligandos son componentes de células vecinas o de la ECM, como colágeno, fibronectina o vitronectina. Estos receptores son heterodímeros de subunidades α y β , que disponen de un largo dominio extracelular, una región transmembrana y un corto dominio intracelular (*Gráfico I-15*)

(21,196,316,602,603). Estas estructuras serán descritas con mayor detalle en el contexto de las placas de adhesión focal (*apartado III.1.2, pág. 181*).

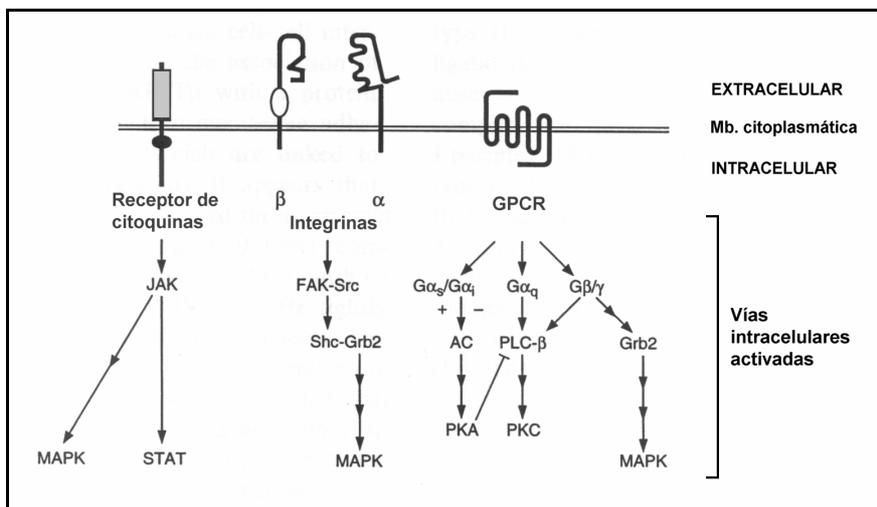


Gráfico I-15. Estructura de los receptores sin actividad catalítica intrínseca y diagrama esquemático de las vías intracelulares activadas. Los receptores para citoquinas (izquierda) disponen de un dominio extracelular, una única región transmembrana y un dominio intracelular que contiene las regiones box1 y box2 (elipse negra). Las vías activadas tras su ocupación (vías JAK/STAT) dependen de las tirosinas cinasas JAK y de los factores de transcripción STAT. Los receptores de las integrinas (en el centro) son heterodímeros de subunidades α y β , con un largo dominio extracelular, una región transmembrana y un corto dominio intracelular. Su estructura detallada y mecanismos de activación serán abordados en el apartado III.1.2 (pág. 181). Por último, los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (derecha) tienen siete dominios transmembrana, un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal citoplasmático. Las vías activadas tras su ocupación ya han sido descritas previamente; sin embargo, los mecanismos intracelulares que conectan su activación con las vías de las tirosinas cinasas serán descritos a continuación (ruta esquematizada como $\text{GPCR} \rightarrow \text{G}\beta\gamma \rightarrow \rightarrow \text{Grb2} \rightarrow \rightarrow \text{MAPK}$). Adaptado de (196).

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) representan el tercer gran grupo de receptores sin actividad catalítica intrínseca, que pueden activar las vías de las tirosinas cinasas (62,196,604). Entre estos receptores se incluyen los muscarínicos y adrenérgicos, los receptores de la CCK, la serotonina, la dopamina, la adenosina, la angiotensina II, la trombina o el ácido lisofosfatídico (LPA), entre otros, además de algunos menos habituales como receptores del calcio extracelular, el receptor para el factor de apareamiento de levaduras (*yeast mating factor*) y receptores para el AMPc en nematodos del género *Dyctiostelium* (196,605-608). Todos ellos contienen siete regiones transmembrana, por ello también se

denominan receptores *serpentín*, con el extremo N-terminal extracelular y el C-terminal en el citoplasma (*Gráfico I-15*) (196). Después de la unión del ligando estos receptores interaccionan con proteínas G heterotriméricas induciendo el cambio GDP/GTP en estas últimas, y desencadenando todas las señales intracelulares ya desarrolladas a lo largo de esta introducción bajo el apartado *I.1. Vías clásicas de señalización intracelular*. Sin embargo, existen múltiples evidencias que establecen una conexión entre la ocupación de estos receptores y la activación de las vías intracelulares de las tirosinas cinasas [revisiones en (62,63,369)]. A continuación hacemos referencia a los principales mecanismos intracelulares descritos por los que se establece dicha conexión.

2.8. Fosforilación en tirosina y receptores acoplados a proteínas G de membrana

Aunque está bien establecido el papel de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) en la regulación del metabolismo intermedio de los segundos mensajeros o mensajeros intracelulares, hace relativamente poco tiempo que han sido reconocidos como importantes intermediarios en el crecimiento y diferenciación celular (9,20). Estos efectos dependen de la capacidad que muestran varios GPCRs para activar las vías de señalización intracelular de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) reguladoras de la transcripción (9,242).

La mayoría de los mecanismos que conectan los GPCRs con la activación de la cascada de las ERK implican la activación de la proteína G monomérica p21-Ras (433,437,609,610). Estas señales intracelulares dependientes de Ras están frecuentemente asociadas con la activación de efectores clásicos regulados por proteínas G, como la adenilato ciclasa o la PLC (611-613). Sin embargo, los mecanismos finales por los que los GPCRs promueven la activación de Ras son muy similares a aquellos utilizados por los RPTKs; es decir, implican la fosforilación en tirosina de proteínas y la incorporación de los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) a los complejos activadores de Ras, ensamblados sobre un armazón de proteínas fosforiladas en tirosina. Dicho de otro modo, implica una serie de interacciones proteína-proteína dependientes de dominios SH2 y SH3 entre proteínas fosforiladas en tirosina, Shc, Grb2 y SOS (9).

Las últimas evidencias existentes sobre los mecanismos implicados en la regulación de las señales mitogénicas, dependientes de la activación de Ras, por los receptores acoplados a proteínas G, implican a tres clases distintas de tirosinas cinasas como mediadores proximales de estos efectos: los RPTKs, las tirosinas cinasas de adhesión focal (FAK), y la familia de tirosinas cinasas Src (62). Dependiendo del receptor implicado y del tipo celular estudiado, cada una de esos tres grupos de cinasas ha demostrado contribuir de forma fundamental a la formación de los complejos que permiten la activación de Ras. Además, se ha demostrado que los GPCRs pueden formar complejos directamente con las tirosinas cinasas no receptor JAK y Src, indicando que estos receptores pueden tener un importante papel directo, al menos estructural, para la activación de esas vías de señalización (62).

Son tres los mecanismos descritos para activar las vías intracelulares de señalización dependientes de las tirosinas cinasas después de la ocupación de GPCR: la transactivación de receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca, la formación de complejos de activación de Ras en las adhesiones focales y la formación de complejos entre el GPCR y las arrestinas (62).

2.8.1. Transactivación de receptores con actividad tirosina cinasa

Varios grupos de investigación han demostrado que los mecanismos por los que los GPCR son capaces de activar la cascada ERK son muy similares a los que muestran los RPTKs. Así, la estimulación en fibroblastos de los receptores del LPA, de la α -trombina, el muscarínico M2, o los receptores adrenérgicos α 2A (α 2A AR) induce una rápida activación de Ras y ERK (62).

También está documentado que la activación del GPCR incrementa rápidamente la fosforilación en tirosina de proteínas adaptadoras, como Shc y Gab1, y la asociación de Shc y Grb2 (307,322,614,615). Los experimentos desarrollados en inmunoprecipitados de Shc de células estimuladas con LPA demuestran actividad Ras-GEF; además, utilizando mutantes negativo dominante de mSOS1, se ha demostrado que la incorporación de este GEF, mediada por Grb2, es necesaria para la activación de Ras por este tipo de receptores, si se tiene en cuenta que en estos mutantes se inhibe la activación de ERK mediada por GPCR (614).

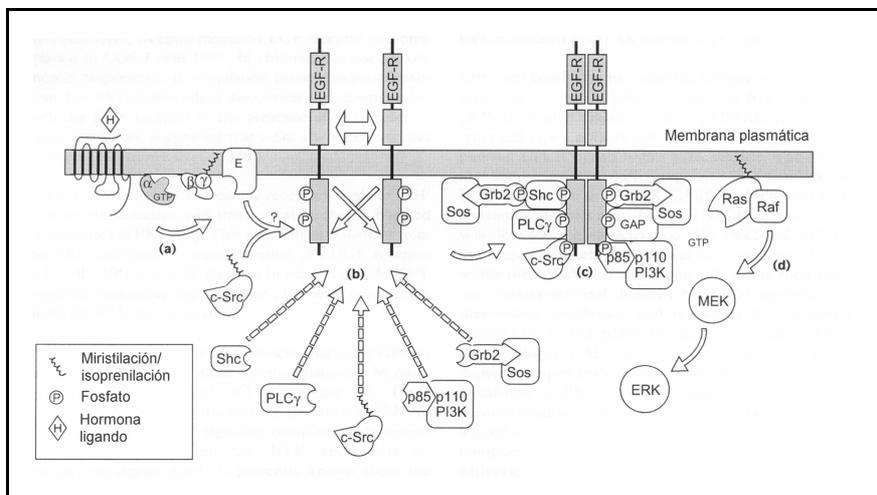


Gráfico I-16. Activación de la cascada ERK por la transactivación del receptor del EGF. Los RPTKs clásicos, como el EGF-R, son proteínas simples con un dominio transmembrana que dimerizan y se autofosforilan después de la unión del ligando. En este modelo los GPCR transactivan el EGF-R configurando el núcleo estructural para la estimulación de los procesos de mitogénesis por los GPCR. (a) La ocupación del GPCR por su ligando (H) provoca la disociación de la subunidad $G\alpha\bullet GTP$ y el dímero $G\beta\gamma$, y la activación del efector (E). (b) A través de efectores aún no identificados, que probablemente están regulados por el dímero $G\beta\gamma$, los GPCRs estimulan la actividad cinasa del EGF-R de forma independiente del EGF. (c) La fosforilación en resto de tirosina del EGF-R promueve su asociación con proteínas PTB de unión con fosfotirosina o proteínas adaptadoras con dominios SH2, como Shc o Grb2, y con proteínas de señalización como c-Src, la PLC γ , la proteína Ras-GAP que estimula la actividad GTPasa de Ras, o las subunidades p85 y p110 de la PI3-K, para formar un complejo activador de Ras asociado a la membrana. (d) La incorporación al EGF-R del complejo Grb2-SOS1 cataliza el intercambio Ras•GTP. Finalmente la asociación de Ras con la MAPK cinasa Raf inicia la cascada de señalización de las MAP cinasas Raf-MAK-ERK. Adaptado de (62).

Esta convergencia entre las vías de señalización de los GPCR y los RPTK se basa en las observaciones de que al menos tres RPTKs, el PDGF-R (616), el EGF-R (617) y el IGF-1-R (58), se fosforilan en tirosina después de la ocupación de los GPCRs (Gráfico I-16). Se ha descrito que la activación en células Rat1 y COS-7 de los receptores de LPA, endotelina-1 y trombina desencadena la fosforilación en tirosina del EGF-R y de otros RPTKs relacionados con éste, como el HER2/neu. Además, tanto la fosforilación en tirosina como la subsiguiente activación de la vía de señalización ERK dependientes de la activación de los GPCR, están bloqueados en mutantes negativo dominante del EGF-R, y también mediante el empleo de inhibidores químicos de la tirosina cinasa intrínseca del receptor del EGF. Estos hallazgos demuestran que la transactivación del EGF-R mediada por los GPCR es un paso intermedio

necesario para la activación de estas vías de señalización por los GPCR (307,617).

Numerosos estudios apoyan la hipótesis de que la mayoría de GPCRs acceden a las vías de señalización dependientes de Ras modulando la actividad de los RPTKs (*Gráfico I-16*) (58,62,616,617). Una vez transactivados los receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca proporcionan una base estructural para la organización de los complejos de señalización mitogénicos, que se parecen en gran medida a los formados cuando los RPTKs están ocupados por sus ligandos endógenos (62). Se conoce muy poco acerca de los mecanismos por los que se consigue la transactivación, aunque se ha demostrado la implicación de las subunidades G $\beta\gamma$, de las tirosinas cinasas Src, de la movilización de calcio y de la PKC (62,308,614,618,619).

2.8.2. Señalización a través de complejos de adhesión focal

Las adhesiones focales constituyen un lugar alternativo para el ensamblaje de los complejos de activación de Ras inducidos por GPCRs (*Gráfico I-17*) (21,345). Como más adelante se discutirá en profundidad, las adhesiones focales son puntos de interacción de la célula con la matriz extracelular (ECM) y los lugares de anclaje del citoesqueleto en la membrana plasmática (21,345). Las integrinas son receptores con un dominio transmembrana simple, que no presentan actividad enzimática intrínseca y que forman la columna vertebral de las adhesiones focales. La unión de las integrinas con proteínas de la ECM provoca el ensamblaje de los heterodímeros de integrinas $\alpha\beta$, que centralizan la formación de complejos de adhesión focal uniendo elementos del citoesqueleto con proteínas catalíticas de señalización (21,345).

Como componente de este complejo se encuentra la tirosinas cinasas de adhesión focal (FAKs), p125^{FAK} y PYK2/CAK β , que se fosforilan en tirosina después de la activación de las integrinas, creándose lugares de anclaje para varias proteínas de señalización. Las FAKs activadas se asocian con c-Src y con los complejos Ras-GEFs Grb2-SOS1 y Crk-C3G, iniciándose entonces varias señales asociadas con la proliferación celular y la diferenciación, incluyendo la activación de la cascada ERK (21,345).

La estimulación de los receptores para la bombesina, la vasopresina y el LPA en fibroblastos, produce una rápida fosforilación en tirosina (620,621) y la activación (622) de la p125^{FAK}. Este efecto es

independiente de la movilización de calcio o de la actividad de la PKC pero requiere la adhesión celular y la integridad del citoesqueleto. La activación de la p125^{FAK} inducida por los GPCRs está completamente inhibida por la exposición de las células a péptidos con la secuencia Arg–Gly–Asp, que bloquean la dimerización de las integrinas porque mimetizan el ligando de las integrinas encontrado en las proteínas de la matriz extracelular, y también por la citocalasina D, sustancia que interrumpe la polimerización del citoesqueleto de actina (622,623).

La activación de Src mediada por LPA o bombesina en células Swiss 3T3 (624) y la activación de ERK en fibroblastos Rat1 (625), son claramente independientes de la activación de las FAKs. Sin embargo, la tirosina cinasa de esta familia recientemente identificada, PYK2/CAK β , que está regulada por calcio y por la PKC, podría proporcionar un mecanismo de conexión entre la ocupación de los GPCRs y la activación de la cascada ERK dependiente de las adhesiones focales (260).

Así, en células neuronales (260) y hematopoyéticas (626), la activación de la PYK2/CAK β dependiente de calcio provoca la activación de la cascada ERK (*Gráfico I-17*). La estimulación con bradicinina de células PC12 induce la activación de PYK2/CAK β , la incorporación de Src, la fosforilación de PYK2/CAK β mediada por Src y la unión de Grb2 (283). La sobreexpresión de un mutante catalíticamente inactivo de la PYK2/CAK β bloquea la activación de ERK en células PC12 estimuladas con bradiquinina o con ionóforos de calcio (260), mientras que la sobreexpresión de PYK2/CAK β en células 293T, es suficiente para la activación dependiente de calcio de la cascada ERK inducida por LPA (283).

Por lo tanto, parece evidente que, como en el caso de la transactivación de los RPTKs por los GPCRs descrita en el apartado anterior, las tirosinas cinasas Src desempeñan un papel fundamental en la activación de la vía de señalización ERK mediada por PYK2/CAK β (*Gráfico I-17*) (62).

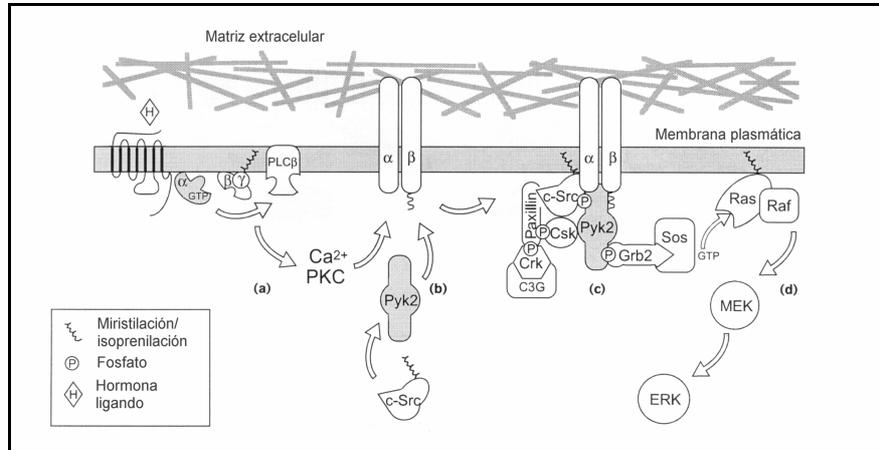


Gráfico I-17. Activación de ERK mediante la incorporación de PYK2/CAK β a las adhesiones focales. En este modelo los GPCRs inducen la incorporación de PYK2/CAK β , una tirosina cinasa de la familia FAK regulada por calcio y por PKC, a los dímeros de integrinas. Este hecho inicia la organización del complejo de activación de Ras estimulado por las adhesiones focales. La señal es dependiente de la adhesión celular a la matriz extracelular y la señal de calcio y activación de la PKC por los GPCRs. **(a)** La ocupación del GPCR activa la isoforma PLC β a través de las subunidades G α y/o G $\beta\gamma$, incrementándose el calcio intracelular y la actividad de la PKC. **(b)** La PYK2/CAK β es incorporada a los heterodímeros de integrinas $\alpha\beta$, donde se activa, se autofosforila y une el dominio SH2 de c-Src. **(c)** El complejo resultante dependiente de integrinas incorpora más proteínas, como paxilina y los complejos Ras-GEF Grb2-SOS1 y Crk-C3G. **(d)** El intercambio Ras•GTP subsiguiente inicia la cascada Raf-MEK-ERK. Adaptado de (62).

2.8.3. Fosforilación del receptor acoplado a proteína G y formación de complejos con arrestinas: los GPCRs como plataforma de señalización.

Cuando se produce la ocupación de un GPCR, éste activa a varias proteínas G heterotriméricas, tras lo cual finaliza su actividad mediante un proceso regulado de desensibilización y secuestro, que implica la formación de complejos estables entre los receptores y β -arrestinas (627,628). Como ya se ha indicado en esta introducción, la unión del agonista con su receptor estimula los procesos de fosforilación mediante proteínas cinasas reguladas por mensajeros intracelulares (por ejemplo, PKA, PKC, y muchas otras), pero también se producen fenómenos de fosforilación del propio GPCR por cinasas de receptores G (GRK)

(627,628). La fosforilación de los GPCRs por las GRKs es seguida por la unión de β -arrestinas, y ambos procesos permiten desacoplar el GPCR de su proteína G correspondiente y dirigir el complejo receptor- β -arrestina a las fosas u hoyuelos celulares cubiertas por clatrina (629,630). La clatrina es una proteína de 180 kDa que juega un papel clave en la transferencia de membranas desde una localización celular a otra, por ejemplo en procesos de endocitosis y exocitosis (631).

Recientemente se ha sugerido que los procesos de fosforilación del receptor y la formación de complejos con arrestinas, es decir los mecanismos de desensibilización e internalización de los GPCRs, son también componentes de vías de señalización (62,625,632). Así, la internalización del receptor puede desempeñar un importante papel en los mecanismos de señalización dependientes de los dos tipos de receptores cuyas interacciones estamos describiendo: los acoplados a proteína G y los que presentan actividad tirosina cinasa intrínseca, aunque a través de un mecanismo aún no completamente establecido (62).

Se ha descrito que la activación de la vía de señalización ERK por el EGF-R (633) y por el IGF-1-R (634) está bloqueada por agentes que inhiben la endocitosis del receptor mediada por clatrina. Además, la activación de la cascada ERK en fibroblastos Rat1 por receptores del LPA y de la trombina, está significativamente reducida por el pretratamiento con concanavalina A, por la exposición a un medio hipertónico y por la depleción del potasio intracelular (625). Todos estos tratamientos inhiben la endocitosis del GPCR sin afectar a su capacidad de unión con el ligando y sin modificar la activación de las proteínas G (625). Otros autores han obtenido resultados similares en células HEK-293 mutantes negativo dominante de las proteínas β -arrestina 1 o dinamina. En estas células no se detecta la internalización de los GPCRs y se inhibe la activación de las vías ERK inducida por el receptor del LPA y por el receptor adrenérgico β 2 (629). Mediante todas las manipulaciones y tratamientos descritos parece que la cascada de señalización ERK sólo alcanza hasta la activación de Raf y después se detiene, por lo que el proceso de internalización sería necesario para una eficiente fosforilación de las MEKs mediante la asociación Ras-Raf (635).

También se ha indicado que los β 2 AR forman complejos con las cinasas Src activas a través de las β -arrestinas en células HEK-293 y COS-7 (632). La cinasa Src se une a la arrestina y éstas al receptor activado por el agonista; el complejo formado es dirigido a las fosas celulares cubiertas por clatrina. Además, tanto la unión de Src con las β -arrestinas como la incorporación del complejo a las oquedades celulares

con clatrina, son necesarias para la activación de ERK tras la ocupación del receptor β_2 AR (632).

Con los datos disponibles Luttrell y cols. (62,632) han descrito recientemente un mecanismo dependiente de la desensibilización del receptor para describir la asociación física entre GPCR con PTKs. Este mecanismo está basado en la hipótesis de que la unión del receptor con β -arrestinas, implicadas en la finalización del acoplamiento del receptor con las proteínas G, activaría una segunda ola de señalización intracelular en la que la desensibilización del receptor actuaría como componente estructural para los complejos de señalización que activan las vías mitogénicas (Gráfico I-18) (62,632). En este modelo el papel de la endocitosis mediada por clatrina no está muy perfilado, aunque podrían presentar microdominios especializados dentro de la membrana celular para la asociación y ensamblaje de los componentes que forman los complejos activadores de las vías mitogénicas (62), de forma similar al papel otorgado para las caveolinas (636).

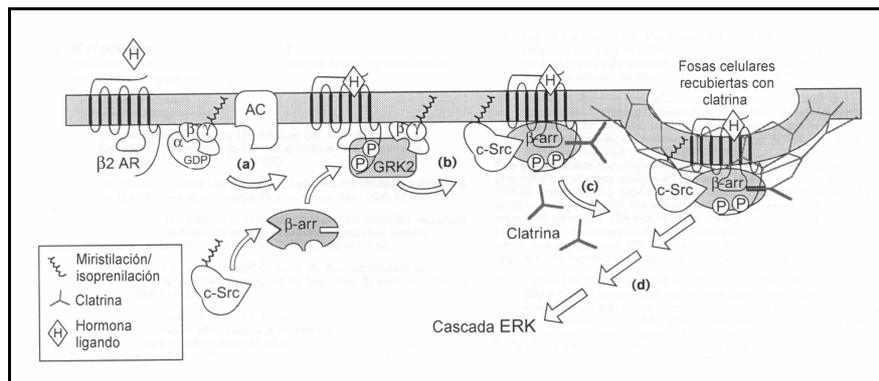


Gráfico I-18. Formación de un complejo de señalización de Src con el receptor adrenérgico β_2 dependiente de β -arrestinas. En este modelo las arrestinas al unirse al GPCR inician la formación de un complejo de señalización que comprende el GPCR, las β -arrestinas y c-Src. (a) La unión del agonista (H) a los receptores adrenérgicos β_2 (β_2 AR) separa la subunidad $G\alpha$ -GTP del dímero $\beta\gamma$, hecho que permite la activación de efectores mediados por proteínas G, como la adenilato ciclasa (AC). (b) Una consecuencia de la liberación de la subunidad $\beta\gamma$ es que se induce la fosforilación del receptor ocupado por el agonista, mediada por la cinasa 2 de los GPCR (GRK2). (c) La β -arrestina 1 (β -arr) se une tanto con el receptor fosforilado como con c-Src, y como resultado se incorpora esta última cinasa a la membrana. La subsiguiente interacción de la β -arrestina 1 con la proteína clatrina, dirige el complejo receptor- β -arrestina-c-Src a las fosas celulares cubiertas por clatrina. (d) Ambos eventos, es decir, la incorporación de proteínas mediada por β -arrestina y la presencia del receptor en las fosas celulares recubiertas de clatrina, son necesarios para la activación de la vía de señalización de las ERK mediada por el receptor adrenérgico β_2 . Adaptado de (62).

3. Receptor CCK_A y fosforilación en tirosina en acinos pancreáticos

3.1. La colecistocinina

La colecistocinina (CCK) es un neuropéptido que se comporta como un neurotransmisor en el sistema nervioso central (SNC) y el tracto gastrointestinal, en este último también actúa como hormona, demostrando numerosos efectos en ambos sistemas orgánicos. Así, en el SNC la CCK se comporta como un potente regulador de la saciedad y de la analgesia inducida por morfina, modula la liberación de dopamina, es el neurotransmisor implicado en los ataques de pánico y estimula la transmisión vagal aferente (637-641). En el tracto gastrointestinal la CCK es el regulador fisiológico de la secreción pancreática, de la contracción de la vesícula biliar, del vaciamiento gástrico y de la motilidad del colon (4,373,641-643).

En todos los vertebrados las células secretoras de CCK se encuentran distribuidas a lo largo del intestino y extendidas por todo el sistema nervioso central y periférico (644). Las células secretoras liberan la CCK en la circulación sistémica, donde está presente con distintas formas moleculares: CCK58, CCK39, CCK33, CCK8, CCK5, CCK4 y posiblemente CCK21 y CCK12, pudiendo o no estar sulfatado el aminoácido situado en posición 7, que es un residuo de tirosina (645).

Las funciones fisiológicas de la CCK y sus mecanismos de acción se han estudiado exhaustivamente en las células acinares pancreáticas, donde se ha descrito que la CCK estimula la secreción pancreática exocrina y la síntesis enzimática (642), induce la expresión de los oncogenes c-fos, c-jun y c-myc (646), estimula el crecimiento pancreático (378) y el desarrollo del páncreas (647), entre otros efectos que a continuación se describirán en detalle.

El principal efecto de la CCK en el páncreas exocrino consiste en la estimulación de la secreción enzimática (642), a la vez que aumenta la síntesis de proteínas (648,649) y potencia la secreción de bicarbonato (649) [revisión en (642)]. También se ha demostrado una acción estimulante de la fracción hidroelectrolítica de la secreción pancreática. Este último efecto depende de la especie: en el gato no se produce (650),

mientras que en el perro (649), en el conejo (651) y en el pollo (652) provoca un aumento en el flujo, aunque menos marcado que el que se produce en la secreción de proteínas; en la rata (653) y en el ratón (654) el efecto estimulante de la secreción de fluido es mayor incluso que el de la secretina; por último, el páncreas de cobaya se caracteriza por responder a la CCK con una abundante secreción de fluido rico en bicarbonato (187). Por otra parte, la CCK podría potenciar el efecto de la secretina en el páncreas exocrino de cobaya (188,189), ratón (6) y rata (655), aunque otros autores no encuentran potenciación entre ambos secretagogos (656) para esta última especie.

El efecto de la CCK en otras porciones del tracto digestivo consiste en una estimulación de la secreción de bicarbonato en el estómago y duodeno proximal (657), efecto trófico en el páncreas (658), inducción de la secreción de pepsinógeno por las glándulas gástricas (658) y contracción de la vesícula biliar y del esfínter de Oddi (659).

3.2. Receptores de la CCK

Estudios farmacológicos realizados en distintos tejidos han demostrado que existen dos clases de receptores para la CCK (373,660). El primer tipo son los receptores CCK_A, únicos descritos en el páncreas de rata, receptores que tienen una alta afinidad por la CCK y baja afinidad por la gastrina (660). El segundo tipo es el receptor CCK_B, también identificado como el receptor de la gastrina (661). Este receptor tiene la misma afinidad para la CCK que para la gastrina y se ha descrito en los acinos pancreáticos de cobaya, perro y en la línea tumoral de células acinares de rata AR42J (661,662).

Receptor CCK_A

Sankaran y cols. (663) determinaron la existencia de dos estados de afinidad del receptor CCK_A, uno de alta afinidad (Kd 64 pM) y otro de baja afinidad (Kd 21nM). Se ha demostrado la existencia de estados de alta afinidad del receptor en rata, ratón, cobaya, perro, conejo y hombre (664). En algunas especies (cobaya, perro y ternero) ambos estados del receptor, alta y baja afinidad, están presentes en los acinos pancreáticos, pero al menos en el cobaya solo el estado de alta afinidad del receptor está involucrado en los procesos de secreción enzimática; la ocupación del

estado de baja afinidad del receptor alteraría la función celular de forma todavía no bien definida (373).

Existen dos péptidos naturales relacionados estructuralmente con la CCK, la ceruleína y la gastrina. La gastrina se encuentra en el organismo en diferentes formas moleculares, todas ellas idénticas estructuralmente a la CCK en el pentapéptido carboxilo terminal (665). La ceruleína es un decapeptido aislado inicialmente de la piel de *Hyla caerulea*, siendo tan potente como la CCK-8 (666). Además de los mencionados se ha desarrollado una gran variedad de péptidos sintéticos con mayor o menor afinidad para unirse al receptor CCK_A, de entre todos ellos el denominado CCK (26-32) feniletil-éster o CCK-JMV-180, o JMV-180, o simplemente CCK-JMV, ha sido el más ampliamente utilizado en el estudio del receptor CCK_A, debido a que actúa en el ratón y la rata como un agonista parcial que no produce inhibición supramáxima, y en el cobaya como un antagonista de este receptor (667,668).

Entre los antagonistas del receptor se encuentra la proglumida o derivados de nucleótidos cíclicos como el 3',5' monofosfato de dibutilil guanosina, pero el antagonista más ampliamente usado es el L-364,718, debido a su potencia y selectividad por el receptor CCK_A frente al CCK_B (373,669).

Cuando la CCK-8 se une a su receptor se produce la activación de la PLC, que provoca la síntesis de Ins(1,4,5)P₃ y la movilización de calcio con la consiguiente activación de las cinasas dependientes de calmodulina y de la proteína cinasa C, y la subsiguiente secreción enzimática (373). En la rata, la curva dosis-respuesta de la secreción enzimática presenta la particularidad de ser bifásica, es decir, la secreción aumenta a medida que se incrementa la concentración de CCK hasta que alcanza un determinado valor, a partir de la cual la secreción enzimática disminuye. Este fenómeno se conoce como inhibición supramáxima. Sin embargo, el agonista parcial de la CCK, CCK-JMV, no provoca inhibición supramáxima (670). La CCK-JMV, que actúa en la rata como un agonista del estado de alta afinidad y un antagonista del estado de baja afinidad del receptor CCK_A (174) causa la misma secreción enzimática máxima que la CCK, sin presentar inhibición supramáxima. Asumiendo que existen dos estados de afinidad del receptor CCK_A se ha propuesto que el estado de alta afinidad del receptor es el responsable de la porción ascendente de la curva de secreción enzimática, mientras que el estado de baja afinidad provocaría la inhibición supramáxima al ser activado por altas concentraciones de CCK (671).

La CCK-JMV, así como bajas concentraciones de CCK-8, inducen oscilaciones en la concentración intracelular de calcio; sin embargo, el incremento en Ins(1,4,5)P₃ provocado por este agonista es

mínimo comparado con el causado por la CCK. Además se ha demostrado que la CCK-JMV es capaz de movilizar calcio por una vía independiente del $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y desde depósitos de calcio insensibles a la cafeína (127). Estas y otras evidencias sugieren que la ocupación del estado de alta afinidad del receptor de la CCK provoca oscilaciones de calcio, formación de diacilglicerol por hidrólisis de fosfatidilcolina y secreción enzimática con mínimos incrementos en los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. En contraste la ocupación del estado de baja afinidad del receptor causa incrementos en los niveles de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, un aumento inicial de los niveles de diacilglicerol y un amplio y transitorio incremento de la concentración de calcio citosólico (670).

Estudios en los que se ha empleado ^{125}I -BH-CCK-8, un agonista de la CCK-8 marcado radiactivamente, han demostrado que esta sustancia es rápidamente introducida en la célula, no estando muy claro aún el porqué de esta rápida internalización del receptor (660,672).

Receptor CCK_B

Numerosos estudios han demostrado la presencia de receptores CCK_B en acinos pancreáticos de cobaya, perro y la línea tumoral de células acinares de rata AR42J (661,662,673). El receptor CCK_B presenta una alta afinidad por la gastrina, hasta el punto que se ha identificado igualmente como el receptor de la gastrina, por esta razón se denomina receptor CCK_B/gastrina (373).

La gastrina fue una de las primeras hormonas gastrointestinales que se descubrieron; está formada por 17 aminoácidos y tiene en común con la CCK el pentapéptido carboxilo terminal, así como los efectos en la secreción pancreática exocrina (373,669,674).

El antagonista del receptor CCK_A, L-364,718, que tiene una alta afinidad por dicho receptor, presenta, en cambio, muy baja afinidad por el receptor CCK_B/gastrina; sin embargo, existe un antagonista selectivo para el receptor CCK_B/gastrina, el L-365,260. Este antagonista tiene una alta afinidad para el receptor CCK_B/gastrina (K_i 7 nM) (373,669).

No se conoce con exactitud el papel fisiológico del receptor CCK_B/gastrina en páncreas. En acinos pancreáticos de cobaya la ocupación del receptor CCK_B/gastrina no estimula la secreción de enzimas ni incrementa la concentración de calcio citosólico (661). En acinos pancreáticos de perro, la gastrina es aproximadamente 1000 veces menos potente que la CCK-8 estimulando la secreción enzimática (373), por lo que este no parece ser su papel fisiológico en el páncreas exocrino. En el caso particular de las células AR 42J, el receptor CCK_B/gastrina está acoplado a múltiples proteínas G, de modo similar al receptor CCK_A en

acinos pancreáticos normales de rata, y su activación provoca un ligero incremento en la secreción enzimática (675).

3.3. Fosforilación en tirosina tras la ocupación del receptor CCK_A

Como ya se ha mencionado, además de los efectos relacionados con la secreción pancreática exocrina, la CCK induce diversos efectos en el páncreas exocrino que implican la activación de las vías de señalización intracelulares basadas en la fosforilación de proteínas. Entre esos otros efectos de la CCK en el páncreas exocrino encontramos la inducción de la expresión de los oncogenes c-fos, c-jun y c-myc (646), un incremento en la síntesis de proteínas (378) y la estimulación del crecimiento (378) y del desarrollo del pancreático (647).

Así, está comúnmente aceptado que el crecimiento pancreático está afectado por diversas hormonas y neuropéptidos (4,676). Algunas de ellas, como la somatostatina y análogos estructurales, ejercen una acción inhibitoria del crecimiento en el páncreas exocrino (677). Por el contrario algunas otras, como la bombesina y particularmente la CCK, inducen el crecimiento y el aumento de tamaño en el páncreas normal (19,642,678). Además, se ha demostrado que el páncreas presenta una respuesta regenerativa a la resección, en un proceso que permite aumentar su tamaño y recuperar las funciones endocrinas y exocrinas (679) y en el que la CCK tiene un papel fundamental (680).

Sin embargo, no se conocen los mecanismos intracelulares inducidos por la CCK que conducen al aumento de tamaño, la hipertrofia, la hiperplasia y la expresión génica en el páncreas (676). Inicialmente fue asumido que los mismos mediadores intracelulares que mediaban la secreción, también regulaban estos procesos (676). Sin embargo, se ha establecido que otros agonistas, como el EGF o la insulina, pueden regular ciertas funciones pancreáticas mediante vías intracelulares alternativas; así mismo se ha demostrado que la CCK puede activar estas otras vías, la mayoría de las cuales implica la fosforilación de proteínas (19,264,378,676,681).

Existen numerosas referencias bibliográficas que han implicado al neuropéptido colecistocinina (CCK) con la activación de vías intracelulares en las que participa la fosforilación en residuos de tirosina de proteínas. Así, se ha descrito la activación por la CCK de las MAP cinasas

(ERK1 y ERK2) (263), las MEK cinasas (681), las Jun cinasas (682), tirosinas cinasas de la familia de las FAK (264,369,477,683), y la isoforma δ de la proteína cinasa C (684).

También se ha descrito que la CCK-8, actuando en receptores CCK_B en las células AR42J induce un incremento en la fosforilación en tirosina del IRS, iniciando vías intracelulares relacionadas con la síntesis de proteínas (676); asimismo, la ocupación de estos receptores transferidos a células 3T3 (685) o fibroblastos Rat1 (686), puede estimular la fosforilación en residuos de tirosina de la p125^{FAK}, la paxilina y activar las MAP cinasas.

Además de por los factores de crecimiento, la ruta de las MAP cinasas también puede ser activada en acinos pancreáticos por agonistas que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas, como la CCK (263,681). Duan y cols. (681) demostraron que la CCK, así como la activación de la PKC, producen la activación tanto de Ras como de las MEK cinasas en acinos pancreáticos de rata. Al igual que las MAP cinasas, las JNK/SAP cinasas pueden ser activadas en acinos por secretagogos clásicos como la CCK (682).

Las tres cascadas MAPK pueden ser claramente activadas en acinos pancreáticos independientemente (676). Sin embargo, de forma similar a otros GPCRs, no está perfectamente establecida la relación existente entre la activación de las cascadas de la PLC tras la ocupación del receptor CCK_A, con la fosforilación en tirosina de proteínas y la estimulación de las cascadas de las MAP cinasas descritas (676), particularmente se desconocen las tirosinas cinasas implicadas en estos eventos (676).

Fosforilación en tirosina y secreción

Diversos autores han estudiado en células acinares pancreáticas el papel de las proteínas tirosinas cinasas en la secreción enzimática con resultados muy diferentes. Piiper y cols. (687) han descrito que la genisteína, un inhibidor de las proteínas tirosinas cinasas, inhibe parcialmente la secreción enzimática estimulada por bombesina o carbacol. Lutz y cols. (688) han demostrado que la genisteína inhibe la secreción enzimática dependiente de los incrementos en $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción de amilasas estimulada por CCK-8. Por otro lado, se ha comprobado que la genisteína carece de efecto en la secreción enzimática estimulada por VIP o secretina (16). Piiper y cols. (687) establecieron que el efecto de la inhibición de las tirosinas cinasas en la secreción enzimática, estimulada por CCK-8 o carbacol, se produce únicamente a bajas concentraciones de estos secretagogos, sugiriendo que la secreción enzimática estimulada por dosis supramáximas de carbacol o CCK podría

ser regulada por las tirosinas cinasas de un modo distinto. Las tirosinas cinasas también participan en la producción de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ estimulada por carbacol, CCK-8 o bombesina, como se desprende de la inhibición que la genisteína provoca en la capacidad de estos agonistas para incrementar la concentración de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (687). Por el contrario, Jena y cols. (595) han observado que la adición de tirosina fosfatasas a células acinares pancreáticas permeabilizadas incrementa la secreción de amilasas dependiente de calcio.

Se han llevado a cabo diferentes estudios en otros modelos celulares analizando la relación entre las tirosinas cinasas y la secreción. Así, se ha comprobado que las tirosinas cinasas son necesarias para la secreción de catecolaminas en células cromafines de glándula adrenal en bóvidos (689), así como para la regulación de la liberación de prostaciclina por las células endoteliales humanas (690). Ambos estudios sugieren que el papel de las tirosinas cinasas en la secreción está mediado por el calcio intracelular (689,690). Estudios realizados en células β por Konrad y cols. (691) han puesto de manifiesto que el inhibidor de las tirosinas cinasas AG879 produce una inhibición dependiente de la concentración tanto de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina como de la secreción de insulina, además han sugerido que la fosforilación de una proteína, aún no bien identificada y denominada p125 de células β , podría ser necesaria para la secreción de insulina. Por el contrario, estudios realizados en células acinares de glándula parótida han demostrado que existe una relación entre las tirosinas fosfatasas y la secreción de amilasa, indicando que la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina inhibe la secreción de amilasas estimulada por secretagogos (18,692).

Estudios recientes han demostrado que el tratamiento con genisteína no tiene efecto en la secreción de amilasas en acinos pancreáticos estimulada por TPA, pero inhibe parcialmente la secreción estimulada por el ionóforo del calcio A23187 (16,688), sugiriendo que la movilización de calcio intracelular estimulada por CCK está relacionada con la activación de las tirosinas cinasas, en tanto que la activación de la PKC no parece estarlo (16,688). Otros estudios han puesto de manifiesto que diferentes inhibidores de las tirosinas cinasas disminuyen la entrada de calcio en la célula sin afectar la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico, este hecho sugiere que las alteraciones producidas por los inhibidores de las tirosinas cinasas en la entrada de calcio en la célula podrían ser las responsables de la inhibición de la secreción de amilasas estimulada por los secretagogos ensayados (693).

Numerosos estudios han sugerido que las GTPasas de bajo peso molecular podrían participar en la transducción de señales originadas tras

la estimulación hormonal en células acinares pancreáticas. Esta actividad podría estar relacionada, entre otros fenómenos, con la regulación del transporte de vesículas en la secreción y con la regulación de la exocitosis en estas células (694-697). Diferentes estudios, llevados a cabo en otros modelos celulares, han indicado que las proteínas de la superfamilia Ras juegan un papel muy importante en el transporte de membrana y en la exocitosis (256,257). Recientemente se ha comprobado que las GTPasas de la familia Rho son necesarias para el proceso secretor de la β -hexosaminidasa en mastocitos (255,257) y en células RBL-2H3 (698). En células RBL-2H3 permeabilizadas, el pretratamiento con la exoenzima C3 reduce la secreción de β -hexosaminidasa inducida por calcio o GTP γ S más calcio (698). El tratamiento de mastocitos permeabilizados con exoenzima C3 o la introducción del inhibidor de la disociación de Rho•GDP (Rho-GDI) redujo la secreción de β -hexosaminidasa estimulada por GTP γ S o calcio (255,257). Además, la adición de una isoforma mutante activa de Rho en estas células incrementó la secreción inducida por calcio (256). En los mastocitos, la función de Rho en la secreción podría ser independiente de su conocida participación en la mediación de señales entre los receptores de membrana y el citoesqueleto (256).

Estudios realizados en células Swiss 3T3 y plaquetas han puesto de manifiesto que la estimulación de FAK y de la paxilina por diferentes neuropéptidos requiere la integridad de los microfilamentos de actina (620,699,700). Utilizando acinos pancreáticos de rata, Rosado y cols. (701) han descrito recientemente que la desorganización de los filamentos de actina del citoesqueleto, por el pretratamiento de las células citocalasina D, inhibe la fosforilación en residuos de tirosina de FAK y la paxilina estimulada por carbacol o CCK-8. Este tratamiento, sin embargo, no afecta ni a la potencia ni a la eficacia de la CCK en la respuesta secretora. Sin embargo, estos autores han encontrado que el proceso secretor estimulado por CCK-8 en acinos pancreáticos depende, al menos en parte, de la actividad de Rho, puesto que la inhibición de esta GTPasa reduce significativamente la secreción de amilasas (701).

II. Materiales y métodos

1. Metodología general

1.1. Lista de reactivos y soluciones

- β -glicerol fosfato. Sigma Chemical Corporation.
- [γ - 32 P] ATP *redivue*[™]. Amersham Pharmacia Biotech.
- A23187 (ó calcimicina): ionóforo del calcio obtenido en *Streptomyces chartreusensis*. Calbiochem.
- Acrilamida. Bio-Rad.
- Anticuerpo monoclonal anti-Crk. Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina, clon 4G10. Upstate Biotechnology.
- Anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina, clon PY20. Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-Grb2. Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-p125^{FAK}. Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-paxilina. Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-PKC- α . Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-PKC- δ . Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-PYK2. Transduction laboratories.
- Anticuerpo policlonal anti-PKC- α . Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal anti-PKC- δ . Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano. Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa de rábano. Pierce.
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de ratón, no conjugado (anticuerpo puente). Pierce.
- Aprotinina: polipéptido de 58 Aa, inhibidor de proteasas séricas obtenido del pulmón de bóvidos. Boehringer Mannheim.

- APS: persulfato amónico. Bio-Rad.
- ATP: adenosina 5'-trifosfato. Sigma Chemical Corporation.
- Azida sódica. Sigma Chemical Corporation.
- Azul de bromofenol. Bio-Rad.
- BAPTA AM. BAPTA acetoximetil éster. Molecular Probes, Inc.
- Bis-acrilamida: N,N'-metil-bis-acrilamida. Bio-rad.
- BME aminoácidos (x 100): solución de aminoácidos *Basal Medium Eagle*. Sigma Chemical Corporation.
- BME vitaminas (x 100): solución de vitaminas *Basal Medium Eagle*. Sigma Chemical Corporation.
- BSA: Albúmina sérica bovina, Fracción V. Sigma Chemical Corporation.
- CCK-8: Colecistocinina octapéptido (CCK 26-33), forma sulfatada. Asp-Tyr(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂. Peptide Institute, Inc., distribuida por Peninsula Laboratories, Inc.
- Citocalasina D: isómero D de la citocalasina obtenido en *Zygosporium mansonii*. Calbiochem.
- Colagenasa CLSPA. Worthington Biochemical Corporation.
- Colchicina: obtenida de *Colchicum autumnale*. Calbiochem.
- Deoxicolato: ácido deoxicólico (ácido 5β-colan-24-oico-3α, 12α diol). Sigma Chemical Corporation.
- Digitonina. Sigma Chemical Corporation.
- DMSO: dimetilsulfóxido. Merck-Schuchardt.
- DTT: ditiotreitól. Bio-Rad.
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético. Sigma Chemical Corporation.
- EGF: factor de crecimiento epidermal, obtenido de glándulas submaxilares de ratón. Calbiochem.
- EGTA: ácido etilenglicol-bis(β-aminoetiléter)N,N,N',N'-tetraacético Sigma Chemical Corporation.
- Exoenzima C3: exoenzima C3 obtenida de *Clostridium botulinum*. Calbiochem.
- Fumarato sódico: ácido fumárico sal disódica anhidra. Fluka.

- Fura-2 AM: fura-2 acetoximetilester. Molecular Probes, Inc.
- Fura-2 PentaK⁺: fura-2 pentapotasio. Sigma Chemical Corporation.
- GF 109203X (ó Gö 6865): bisindolilmaleimida I. Calbiochem.
- Glicina. Sigma Chemical Corporation.
- Glutamato sódico: ácido L-glutámico sal monosódica. Fluka.
- Glutamina: L-glutamina. Sigma Chemical Corporation.
- Gö 6976. Calbiochem, Alexis Biochemicals.
- Hepes: ácido N-[Hidroxietyl] piperazina-N'-[2-etanosulfónico]. Sigma Chemical Corporation.
- Histona H1: obtenida del timo de ternero. Calbiochem, Upstate Biotechnology.
- Inhibidor de tripsina SBTI: inhibidor de tripsina obtenido de la soja. Sigma Chemical Corporation.
- Isonomicina: Isonomicina sal de calcio obtenida de *Streptomyces conglobatus*. Sigma Chemical Corporation.
- CCK-JMV (JMV-180 ó CCK 27-32 2-Phe): Boc-Tyr(SO₃H)-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-2-feniletiléster. Research Plus, Inc.
- Kit de ensayo PKC. Upstate biotechnology.
- Leupeptina: N-acetil-leu-leu-arginina · ½ H₂SO₄. Boehringer Mannheim.
- Líquido fijador: GBX Fixer / Replenisher. Kodak.
- Líquido revelador: GBX Developer / Replenisher. Kodak.
- LY 294002. Calbiochem, Cayman Chemical.
- Mercaptoetanol: 2-mercaptoetanol. Bio-Rad.
- MOPS: ácido 3-[N-morfolino]propano sulfónico. Sigma Chemical Corporation.
- Na₃VO₄: ortovanadato sódico. Sigma Chemical Corporation.
- Piruvato sódico: ácido pirúvico sal sódica. Fluka.
- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo. Sigma Chemical Corporation.
- Poli (Glu-Tyr) 4:1: Polímero peptídico formado por la secuencia glutámico:tirosina (4:1), sal sódica. Sigma Chemical Corporation.
- Proteína A-agarosa recombinante. Upstate Biotechnology.

- Proteína básica de mielina (MBP). Upstate biotechnology.
- Rottlerin (ó malotoxina). Calbiochem, Alexis Biochemicals.
- Safingol: L-treo-Dihidroesfingosina. Calbiochem.
- SDS: lauril sulfato sódico. Sigma Chemical Corporation.
- Solución Acrilamida/Bis-Acrilamida 30 %. Bio-Rad.
- Sustrato para reacción de quimiluminiscencia: ECL Western blotting, Amersham; SuperSignal[®] Substrate WB, Pierce
- Tampón Tris/glicina (x 10). Bio-Rad.
- Tampón Tris/glicina/SDS (x 10). Bio-Rad.
- Tapsigargina. Calbiochem, Biomol, Molecular Probes, Inc.
- Temed: N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina. Bio-Rad.
- Tirfostina B44(-) (ó AG 257). Calbiochem (USA).
- TPA (ó PMA): 13, acetato de 12, O-tetradecanoil forbol. Sigma Chemical Corporation.
- Triton X-100. Bio-Rad.
- Trizma base (TRIS): Tris[hidroximetil] aminometano. Sigma Chemical Corporation.
- Tween 20. Bio-Rad.
- Wortmanina (ó KY 12420). Calbiochem.

Los demás reactivos utilizados rutinariamente en el laboratorio para la preparación de soluciones han sido de grado analítico. Para muchas soluciones, en particular las realizadas para obtener medios libres de calcio, se utilizó agua bidestilada desionizada de tipo *Milli-Q*.

1.2. Animales

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han utilizado ratas Wistar macho con pesos comprendidos entre 150 y 250 gramos. Los animales procedían del Servicio de Animalario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, cumpliendo la legislación recogida en el Convenio Europeo sobre protección de animales vertebrados utilizados con fines científicos (B.O.E. nº 256 de 25 de octubre de 1990).

En estas instalaciones los animales se mantuvieron en fotoperíodo controlado, con un ciclo oscuridad-luz de 12 horas, y con temperatura ambiental de 25 °C, recibiendo una dieta estándar para ratas. Los animales se mantuvieron en ayunas doce horas antes de su utilización experimental, permitiéndoseles el libre acceso al agua.

1.3. Método de aislamiento de acinos pancreáticos

Para el aislamiento de acinos pancreáticos se utilizó la técnica descrita inicialmente en 1978 por Peikin y cols. (702), modificada en 1983 por Jensen y cols. (703) y en 1997 por García y cols. (477).

Las ratas se sacrificaron mediante dislocación cervical, se situaron en decúbito lateral derecho y se les practicó una laparotomía retrocostal izquierda para acceder a la cavidad abdominal. Una vez localizado el páncreas, éste se extrae tirando desde el bazo y seccionando todos los tejidos que lo unen a la curvatura mayor del estómago, al colon transversal y al duodeno. Finalmente se separa del bazo.

El páncreas se depositó en una placa de disección con tampón de lavado a 4 °C, para cuya elaboración se emplea un tampón base para la obtención de acinos pancreáticos al que se añaden albúmina sérica bovina y cloruro cálcico (*Tabla II-1* y *Tabla II-2*). En tampón de lavado se elimina todo el tejido graso periférico, los ganglios linfáticos y los vasos sanguíneos. Posteriormente el páncreas se fija sobre dicha placa y se procede a la inyección del tejido con 10 ml de tampón de lavado conteniendo 35 U/ml de colagenasa.

Reactivos	Concentración
HEPES	24 mM
NaCl	120 mM
KCl	7.2 mM
Piruvato sódico	6.0 mM
Fumarato sódico	7.1 mM
Glutamato sódico	6.0 mM
D-Glucosa	14.0 mM
Inhibidor de tripsinas	1.0 mg/ml
Solución de aminoácidos	25 ml/l
KH ₂ PO ₄	2.0 mM
MgCl ₂	1.2 mM
Solución de vitaminas	1.0 %
Glutamina	0.03 %

Tabla II-1. Tampón base para la obtención de acinos. El pH se ajustó a 7.4 con NaOH 10N.

A continuación el páncreas se introduce en un *Erlenmeyer* junto con el volumen de solución de colagenasa que no se pudo inyectar, se oxigena brevemente (O₂ 100 %) y se incuba durante 10 min en un baño orbital a 175 ciclos/min y 37 °C. Tras este período de tiempo se retira del *Erlenmeyer*, por decantación, la solución de colagenasa, sustituyéndola por 5 ml de solución de colagenasa nueva, se oxigena de nuevo y se incuba durante otros 10 min en idénticas condiciones. El proceso se repite una vez más, renovando la colagenasa, oxigenando e incubando el páncreas a 37 °C con agitación por otros 10 min. Trascorrida ésta tercera incubación se agita el matraz vigorosamente durante 15 seg para provocar la disgregación mecánica del páncreas.

Reactivos	Concentración
BSA	0.2 %
CaCl ₂	2.0 mM

Tabla II-2. Composición del tampón de lavado. Los reactivos se añaden al tampón base para la obtención de acinos.

Inmediatamente después de la disgregación mecánica se añade a la solución de colagenasa un exceso de tampón de lavado sin colagenasa a

4 °C, que detiene la digestión enzimática del tejido conectivo. Posteriormente se pipetea la suspensión acinar 5 veces, a través de dos pipetas de diámetro decreciente, de esta forma se disgrega totalmente el tejido. A continuación, la suspensión acinar se filtra a través de una malla inerte, con un poro de 150 µm de diámetro, que retiene los agregados celulares de gran tamaño, el tejido no digerido y las impurezas.

Tras el filtrado se centrifuga la suspensión acinar a 300 xg durante 2 min y se elimina el sobrenadante por decantación. Después los acinos pancreáticos son resuspendidos en tampón de lavado y se realiza una centrifugación en gradiente. Para ello se utilizan tubos *Corning* de 15 ml conteniendo 11 ml de un tampón de gradiente (Tabla II-3) con una alta proporción de BSA (4 %); sobre este tampón se deposita cuidadosamente 1 ml de la suspensión acinar en tampón de lavado, creándose una interfase entre ambas soluciones. Con esta disposición se centrifugan los tubos a 50 xg durante 10 min. Pasado este tiempo los acinos se han depositado en el fondo al tener mayor densidad que el tampón de gradiente, mientras que células aisladas, restos de membranas y otras impurezas permanecen en suspensión.

Reactivos	Concentración
BSA	4.0 %
CaCl ₂	2.0 mM

Tabla II-3. Tampón de gradiente. Los reactivos se añaden al tampón base para la obtención de acinos.

Finalmente, se elimina el tampón de gradiente por decantación y los acinos se resuspenden en 40 ml de tampón de incubación (Tabla II-4) en un *Erlenmeyer*. Los acinos se mantienen en este tampón a 37 °C, con oxigenación periódica cada 30 min (100 % O₂) y agitación suave (25 ciclos/min) durante 3 horas.

Reactivos	Concentración
BSA	1.0 %
CaCl ₂	0.5 mM

Tabla II-4. Tampón de incubación. Los reactivos se añaden al tampón base para la obtención de acinos.

1.4. Estimación de la viabilidad celular

Periódicamente se comprobó la viabilidad de las células acinares mediante la técnica de exclusión del azul tripán, que permite identificar y cuantificar las células que han sido dañadas irreversiblemente durante el proceso de aislamiento (704). La técnica se basa en que tras exponer las células al colorante éste penetra en todas ellas; sin embargo, aquellas que mantienen íntegros los mecanismos de transporte activo de sus membranas expulsan el colorante, mientras que las que no son viables no lo expulsan y muestran coloración azul al microscopio.

El azul tripán tiene mayor afinidad por las proteínas séricas que por las proteínas celulares, por este motivo se descartó el tampón de incubación habitual, que mostraba un fondo muy oscuro, y se utilizó tampón fosfato salino (PBS) (Tabla II-6) para comprobar la viabilidad celular.

La incubación con el colorante se realiza en este tampón tomando 0.5 ml de la suspensión celular (diluida previamente 2.5 veces) a los que se añaden 0.5 ml (factor dilución final = 5) de una solución azul tripán al 0.2 %, se mezcla suavemente y se deja reposar durante 5–10 min. Pasado este tiempo se cuantifica la cantidad de células viables en una cámara de Neubauer o cámara hemocitométrica y se expresa como porcentaje del total:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células viables (no teñidas)}}{\text{n}^\circ \text{ total de células (teñidas y no teñidas)}} \times 100$$

Se aceptaron como buenas aquellas preparaciones que generaron al menos un 95 % de células viables.

2. Determinación de la concentración intracelular de calcio

La aparición de indicadores fluorescentes sensibles a la concentración de calcio y el hecho de que puedan introducirse en el interior celular sin necesidad de alterar la integridad de la membrana, ha facilitado enormemente los estudios de la regulación de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) por hormonas y otros agonistas. En la década de los 80 Tsien y cols. comenzaron a usar el indicador quin-2 para estudiar la $[Ca^{2+}]_i$ y contribuyeron al desarrollo de nuevas sondas útiles en estos tipos de estudios (705-707).

En los experimentos para determinar la concentración intracelular de calcio hemos utilizado el indicador fluorescente fura-2, ya que, probablemente, es la sonda más adecuada para estudios de *espectrofluorimetría* y de *imaging*, y el más utilizado por presentar las siguientes características:

1.- el fura-2 en su forma acetoximetilester (fura-2 AM) difunde al interior de la célula donde las esterasas intracelulares eliminan el grupo éster y la sonda se convierte en una molécula altamente cargada incapaz de volver a atravesar la membrana plasmática y abandonar la célula.

2.- posee una Kd para el calcio alrededor de 225 nM, lo que le hace capaz de detectar concentraciones de calcio de hasta micromolar, aunque su sensibilidad disminuye al superar concentraciones de calcio de aproximadamente 600 nM.

3.- permite utilizar el concepto de ratio o cociente entre la fluorescencia emitida con cada una de las 2 longitudes de onda de excitación usadas: 340 y 380 nm (a estas longitudes se observan los máximos de excitación). Cuando el fura-2 se une al calcio la intensidad de fluorescencia emitida a 340 nm aumenta y la emitida a 380 nm disminuye. Sin embargo, el espectro de emisión casi no se modifica (la emisión máxima se mantiene en 510 nm tanto en presencia como en ausencia de calcio). La relación entre el cambio en la intensidad de fluorescencia emitida en cada una de las longitudes de onda define el ratio, permitiendo que el fura-2 sea utilizado como un indicador de doble excitación lo que permite eliminar posibles errores como *fotoblanqueo* de la sonda,

distribución no homogénea en la célula, carga deficiente y otros posibles artefactos debidos a manipulaciones experimentales. Además el fura-2 tiene un punto *isosbético* (punto de iso fluorescencia) a 360 nm que es útil para monitorizar la fluorescencia no dependiente de calcio o para apreciar el *quenching* o pérdida de fluorescencia cuando el fura-2 se une a determinados compuestos como metales pesados.

4.- el fura-2 presenta ventajas frente a otros indicadores: es alrededor de 30 veces más fluorescente que el quin-2, presenta menor sensibilidad al magnesio y es más fotoestable. Se usa a concentraciones intracelulares del orden de micromolar, mientras que el quin-2 se emplea a concentraciones del orden de milimolar, lo que podría indicar que la capacidad quelante del fura-2 sobre el ión calcio es menor.

Uno de los problemas que puede presentar esta sonda es que la forma acetoxi-metil éster no se hidrolice completamente y sea insensible a cambios de calcio. Otro inconveniente es que puede compartimentalizar en orgánulos subcelulares como vesículas secretoras, núcleo y retículo endoplásmico, efecto que está favorecido por las altas temperaturas.

2.1. Carga con el indicador

Una vez obtenida la suspensión de acinos, se incubaron a temperatura ambiente (20-23 °C) en *tampón Na-Hepes* (Tabla II-5) con el indicador fura-2 AM (fura-2 acetoximetilester) a una concentración de 1-2 μM durante 30 min. Tras este tiempo de carga, las células se lavaron mediante una suave centrifugación (60 xg a 4 °C durante 3 min) y se resuspendieron en tampón Na-Hepes con 2 mM de CaCl_2 , donde permanecieron a temperatura ambiente durante unos 15 min antes del inicio de los experimentos. Este tiempo es suficiente para que las esterasas citosólicas separen el grupo acetoximetilo hidrolizando el enlace éster que lo une al indicador, liberando la forma iónica (fura-2) sensible al ión calcio.

La viabilidad de las células, evaluada mediante extrusión de azul tripán, dio valores superiores al 95%.

Todos los experimentos se realizaron durante las 2-4 horas siguientes a la incubación con el indicador.

Reactivos	Concentración
NaCl	140 nM
KCl	4,70 nM
MgCl ₂	1.13 nM
HEPES	10 nM
D-glucosa	10 nM
CaCl ₂	1.10 nM
Inhibidor de tripsinas	1 mg/ml

Tabla II-5. Tampón Na-Hepes. Este tampón es utilizado para la determinación de calcio intracelular. El pH se ajustó a 7.4 con NaOH 10N. Los medios libres de calcio tuvieron la misma composición pero se eliminó el calcio y se añadió EGTA 1 mM.

2.2. Cuantificación de la fluorescencia en suspensiones celulares: espectrofluorimetría

Para la cuantificación de la fluorescencia se utilizó un espectrofluorímetro modelo *RF-5001PC* (Shimadzu). El equipo dispone de un dispositivo de agitación que permite mantener los acinos en suspensión dentro de la cubeta de cuarzo. Al mismo tiempo se mantenían a 37 °C mediante un sistema conductor de agua atemperada alrededor de la cubeta de medición.

Inicialmente se realizaron barridos de excitación (300-400 nm) y de emisión (450-550 nm) para encontrar las longitudes de onda con las que se obtenían la excitación máxima, el punto isobéptico del fura-2 y el valor de máxima emisión. Como resultado encontramos que los picos de máxima y mínima fluorescencia se hallaban en valores en torno a 340 y 380 nm respectivamente, y la emisión máxima se registró a 505 nm. Por lo tanto, para la monitorización de los cambios en la concentración de Ca²⁺ libre citosólico ([Ca²⁺]_i) las suspensiones celulares eran excitadas alternativamente a 340 y 380 nm, registrando la fluorescencia emitida a 505 nm (ranura de 3 nm).

Todos los agentes ensayados se añadieron directamente en la cubeta de cuarzo que contenía 2 ml de la suspensión de acinos.

2.3. Cuantificación de la fluorescencia y de la $[Ca^{2+}]_i$

La determinación de la $[Ca^{2+}]_i$ en suspensiones acinares se realizó a partir del *ratio* de la fluorescencia emitida en las dos longitudes de onda de excitación (F340/F380), previa substracción de los valores de autofluorescencia, como se ha descrito previamente por Grynkiewicz y cols. (705).

Para la determinación de los valores de autofluorescencia se tomaron 2 ml de una suspensión de células acinares sin el indicador y se excitaron alternativamente a 340 y 380 nm, registrando la emisión a 505 nm. Así se obtuvieron valores para cada longitud de onda de excitación, que posteriormente se utilizaron en los cálculos de la $[Ca^{2+}]_i$. En ningún caso los valores de autofluorescencia superaban en valor el 10% de la fluorescencia emitida cuando el fura-2 estaba presente.

Al término de cada protocolo experimental se realizó una calibración que consistía en la adición de digito Nina (concentración final 100 mM) para permeabilizar las células y obtener así un valor de fluorescencia máxima (Rmax) al saturar la molécula de fura-2 con exceso de Ca^{2+} extracelular. Cuando la señal de fluorescencia se estabilizó añadimos Tritón X-100 (concentración final 1 %) para disolver las membranas celulares y liberar el indicador que podría haber quedado atrapado dentro de los orgánulos intracelulares (la compartimentalización encontrada fue mínima). Al estabilizarse de nuevo la fluorescencia añadimos EGTA (concentración final 25-30 mM) con el fin de encontrar el valor mínimo de fluorescencia (Rmin) al quelar el Ca^{2+} y dejar libre la molécula de fura-2.

A partir de estos valores se calculó la concentración de calcio libre intracelular, utilizando el método descrito por Grynkiewicz y cols. (705). Este método se basa en curvas estándar realizadas *in vitro* y los parámetros descritos anteriormente, y se expresa mediante la siguiente fórmula:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \times \left(\frac{R - R \text{ min}}{R \text{ max} - R} \right) \times \frac{Sf}{Sb}$$

Donde:

R_{min} : es el ratio de fluorescencia en medio libre de calcio,

R_{max} : es el ratio de fluorescencia en condiciones de saturación,

S_f : es la intensidad de fluorescencia sin calcio con excitación a 380 nm,

S_b : es la intensidad de fluorescencia en condiciones de saturación de calcio con excitación a 380 nm,

K_d : es la constante de disociación del indicador fura-2 para el calcio.

En nuestro caso los parámetros de las calibraciones se calcularon *in vitro* como se explica a continuación.

Para la calibración *in vitro* de nuestro sistema se empleó un *kit* de soluciones con diferentes concentraciones de Ca^{2+} (Molecular Probes Inc.). Se calculó, en nuestras condiciones experimentales, la constante de disociación del indicador fura-2 para el ión Ca^{2+} (K_d), que se define como el punto de saturación (nM) de su molécula al 50 %. Para calcular esta constante se midió la fluorescencia emitida por el indicador fura-2 PentaK⁺ a distintas concentraciones de calcio, en presencia de magnesio en el medio para mimetizar las condiciones intracelulares.

En la determinación de calcio para suspensiones acinares utilizamos alícuotas de 2 ml de cada una de las soluciones de calibración en presencia de la sal pentapotasio de fura-2 (2.5 μ M), se introdujeron en la cubeta del espectrofluorímetro y se realizaron barridos de excitación entre 300 y 400 nm midiendo la fluorescencia emitida a 505 nm.

Al representar los cambios de fluorescencia de las muestras frente a las distintas concentraciones de calcio obtuvimos una función lineal en la que el valor que adquiere la variable X cuando Y es igual a 0 es el logaritmo decimal de la K_d del fura-2 para el ion Ca^{2+} . El valor de la K_d fue calculado para cada calibración, y osciló en un rango entre 150 y 250.

3. *Western blotting*

Tras el desarrollo en 1975 de la técnica del *Southern blotting* para identificar fragmentos de ADN (708) y en 1977 del *Northern blotting* para el ARN (709), Towbin y cols. (710) desarrollaron en 1979 la técnica del *blotting* de proteínas que se empezó a conocer, en una clara alusión jocosa a las precedentes, como *Western blotting* (711-713). En la presente Tesis Doctoral se ha empleado la técnica de *Western blotting* primero para la identificación de varias proteínas en lisados celulares totales o fracciones subcelulares de acinos pancreáticos de rata y posteriormente para la determinación y cuantificación de la fosforilación en residuos de tirosina de esas mismas proteínas.

La técnica aplicada para estudiar la presencia de proteínas en **lisados totales** o **fracciones subcelulares**, y cuantificar si procede su grado de fosforilación en residuos de tirosina, consiste básicamente en una primera extracción de las proteínas de interés (fosforiladas o no) presentes en los lisados de acinos pancreáticos por medio de una **inmunoprecipitación** con anticuerpos específicos.

Después, las proteínas inmunoprecipitadas son separadas por **electroforesis** en gel de acrilamida en función de su peso molecular (electroforesis unidimensional en condiciones de desnaturalización). Posteriormente las proteínas separadas se transfieren desde el gel a un soporte de nitrocelulosa, en un proceso denominado **electrotransferencia**.

A continuación la membrana de nitrocelulosa será incubada con anticuerpos que específicamente reconocen la secuencia de las proteínas en estudio. A esta primera incubación le sigue otra con un segundo anticuerpo que específicamente reconoce la secuencia del anticuerpo precedente y que lleva adosada una enzima que, en este caso, produce luz ante el sustrato adecuado. Cuando se expone la membrana a un film fotosensible la luz emitida es capaz de impresionarlo. Este proceso se denomina **immunoblotting**.

La intensidad de luz emitida por el enzima será proporcional a la cantidad de anticuerpo secundario unido al primario y la cantidad del primario es proporcional a la de la proteína en estudio presente en la membrana. Por tanto, la cuantificación por **densitometría** de las diferentes impresiones recogidas en el film es proporcional a la cantidad de la(s) proteína(s) en estudio presente(s) en la suspensión celular.

3.1. Obtención de lisados celulares

Antes de obtener los lisados celulares se hicieron pruebas para establecer las condiciones idóneas en las que el nivel basal de la fosforilación de proteínas (incrementado por la acción mecánica ejercida durante el aislamiento de los acinos pancreáticos) disminuyese hasta valores que nos permitiesen diferenciar con nitidez la fosforilación inducida por agonistas, de la que se produce en ausencia de estímulo. El estudio dio como resultado un tiempo óptimo de **preincubación** de las células acinares en *tampón de incubación* de 3 horas, a 37 °C y agitación suave (20-25 ciclos/min). Durante este tiempo la suspensión acinar se oxigenó brevemente cada 30 min con oxígeno al 100 %. Durante la preincubación se añaden a la suspensión acinar aquellos inhibidores que precisen un tiempo previo de actuación para conseguir un efecto óptimo (A23187, taspigargina, BAPTA AM, rottlerin, GF 109203X, safingol, Gö 6976, exoenzima C3, citocalasina D, etc.).

Cuando finaliza esta fase de estabilización se procede con la **incubación** de la suspensión de células acinares a 37 °C y 30 ciclos/min, en presencia o no de secretagogos, a razón de 1 ml/muestra. La duración de la incubación con los secretagogos y su concentración fue establecida mediante curvas dosis-efecto y de tiempo para cada uno de ellos. Se utilizaron estímulos máximos o submáximos dependiendo del diseño experimental. A partir de este punto se pueden obtener lisados celulares totales o bien fracciones subcelulares, separando las proteínas presentes en citoplasma, membrana y núcleo, para realizar estudios de localización y translocación.

3.1.1. Lisados celulares totales

Tras la incubación con los agentes en estudio cada muestra se centrifugó a 7200 xg durante 10-15 seg, se aspiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en pocos segundos en 1 ml de *tampón fosfato salino (PBS)* a 4 °C (*Tabla II-6*). A continuación las muestras fueron centrifugadas nuevamente en las condiciones anteriores, se aspiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de *tampón de lisis para la obtención de lisados totales* a 4 °C (*Tabla II-7*). Finalmente, las suspensiones acinares se sonicaron durante 5 seg (*VibraCell™*, Sonic Materials). El proceso completo, es decir, lavar las muestras en PBS, resuspenderlas en tampón de lisis y sonicarlas, se realiza lo más rápidamente posible, y nunca se extiende más de 1.5 min.

En la composición del tampón de lisis encontramos varios detergentes que permiten solubilizar las proteínas celulares no citoplasmáticas. Para facilitar esta solubilización las muestras se sonicar como se ha descrito, se agitan y se mantienen en hielo durante un periodo nunca inferior a 10 min, tiempo que facilita la acción de los detergentes en las proteínas de membrana.

Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 10000 xg durante 15 min a 4 °C, con la finalidad de separar la fracción celular insoluble (principalmente el citoesqueleto) de la soluble. La fracción soluble de los lisados celulares totales se utilizó para los estudios posteriores y la fracción insoluble se descartó.

Reactivos	Concentración
NaCl	137 mM
KCl	2.70 mM
Na ₂ HPO ₄	5.62 mM
NaH ₂ PO ₄	1.09 mM
KH ₂ PO ₄	1.47 mM
Na ₃ VO ₄	0.20 mM

Tabla II-6. Composición del tampón fosfato salino (PBS).
El pH del tampón se ajustó a 7.4.

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 7.5	50 mM
NaCl	150 mM
Tritón X-100	1.0 %
Deoxicolato	1.0 %
Azida sódica	0.1 %
EGTA	1.0 mM
EDTA	0.4 mM
Aprotinina	25 µg/ml
Leupeptina	25 µg/ml
PMSF	1.0 mM
Na ₃ VO ₄	0.20 mM

Tabla II-7. Tampón de lisis para la obtención de lisados totales. *El pH de este tampón se ajustó a 7.5. Este tampón es el utilizado para lisar los acinos y solubilizar las proteínas de membrana.*

3.1.2. Fracciones subcelulares

Para obtener fracciones subcelulares se utilizó aproximadamente doble cantidad de acinos que para el caso precedente, puesto que este método precisa gran cantidad de células para obtener fracciones con una concentración de proteínas suficiente para los estudios posteriores; resultó particularmente limitante la concentración de proteínas en la fracción nuclear.

Como en el apartado anterior, inmediatamente después de la incubación con los agentes en estudio se lavaron las muestras en 1 ml de PBS a 4 °C. A continuación las muestras fueron centrifugadas a 7200 xg durante 10-15 seg, después se aspiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de *tampón de lisis para la obtención de la fracción de membrana (TLMb)* a 4 °C (Tabla II-8). Este tampón es similar al utilizado para obtener lisados celulares totales, pero en su elaboración no se utilizan detergentes.

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 7.5	50 mM
NaCl	150 mM
Azida sódica	0.1 %
EGTA	1.0 mM
EDTA	0.4 mM
Aprotinina	25 µg/ml
Leupeptina	25 µg/ml
PMSF	1.0 mM
Na ₃ VO ₄	0.20 mM

Tabla II-8. Tampón de lisis para la obtención de la fracción de membrana. El pH de este tampón se ajustó a 7.5. Este tampón es el utilizado para homogeneizar los acinos, pero no solubiliza las proteínas no citoplasmáticas porque no dispone de detergentes.

Después, las suspensiones acinares de cada muestra se homogeneizaron en hielo durante 30 seg a 20000 rpm (repartidos en dos series de 15 seg con una pequeña pausa intermedia) y se procedió a centrifugar los homogenizados a 500 xg durante 10 min en centrífuga refrigerada (4 °C). El sobrenadante de esta centrifugación contenía la fracción citosólica y de membrana, que se separarán según se explica más

adelante. El precipitado de esta primera centrifugación a baja velocidad contiene los agregados de membrana y acinos no homogeneizados, y también el núcleo de las células homogenizadas, con mucha mayor densidad que el resto de componentes celulares.

Obtención de la fracción nuclear

Para purificar la fracción nuclear se utilizó el método descrito por Hockenbery y cols. (714), basado en una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. En la purificación de la fracción nuclear se utiliza un tampón de lisis para la obtención de la fracción nuclear (TLNu) (Tabla II-9), que solamente se diferencia del tampón descrito para la fracción de membrana en que sustituye el NaCl por KCl.

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 7.5	50 mM
KCl	150 mM
Azida sódica	0.1 %
EGTA	1.0 mM
EDTA	0.4 mM
Aprotinina	25 µg/ml
Leupeptina	25 µg/ml
PMSF	1.0 mM
Na ₃ VO ₄	0.20 mM

Tabla II-9. Composición del tampón de lisis para la obtención de la fracción nuclear. El pH de este tampón se ajustó a 7.5. En este tampón se sustituye el NaCl por KCl.

La purificación de la fracción nuclear comienza lavando el precipitado obtenido tras centrifugar a baja velocidad el homogenizado, para ello se resuspende en 1 ml de PBS a 4 °C, después se centrifuga a 7200 xg durante 10-15 seg y se aspira el sobrenadante. Inmediatamente después se añade al precipitado 1 ml de TLNu, se resuspende de nuevo y se centrifuga a 10000 xg durante 15 min a 4 °C.

A continuación se realiza una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Para ello se utiliza una ultracentrífuga *L8-80M* (Beckman) con un rotor *SW4iTi* (Beckman) en el que se disponen tubos para ultracentrífuga de 13 ml. Cada tubo contiene 10 ml del TLNu con sacarosa 2 M (Tabla II-10), sobre éste volumen se deposita el precipitado

de la última centrifugación resuspendido en 1 ml de TLNu sin sacarosa. Con esta disposición se centrifugan las muestras a 150000 xg durante 60 min a 4 °C.

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 7.5	50 mM
KCl	150 mM
Sacarosa	2.0 M
Azida sódica	0.1 %
EGTA	1.0 mM
EDTA	0.4 mM
Aprotinina	25 µg/ml
Leupeptina	25 µg/ml
PMSF	1.0 mM
Na ₃ VO ₄	0.20 mM

Tabla II-10. Tampón de lisis con sacarosa para la obtención de la fracción nuclear. *Este tampón se utiliza en la ultracentrifugación en gradiente con la que se obtiene la fracción nuclear.*

Cuando finaliza la ultracentrifugación se aspira el sobrenadante y el pequeño precipitado que se obtiene se resuspende cuidadosamente en 1 ml de TLNu sin sacarosa a 4 °C. En este momento se comprueba la pureza de la fracción nuclear mediante microscopía de contraste de fases. La suspensión se centrifuga de nuevo a 10000 xg durante 15 min a 4 °C, después se aspira el sobrenadante y se resuspende en 150 µl del *tampón de lisis* utilizado para la obtención de lisados totales a 4 °C. A partir de aquí se procede de igual modo que el descrito en la obtención de los lisados totales: las muestras se sonicán en tapón de lisis, se centrifugan a 10000 xg y se recoge el sobrenadante como **fracción nuclear** para los estudios posteriores.

Obtención de las fracciones de membrana y citosólica

Después de centrifugar a 500 xg durante 10 min los homogenizados de las suspensiones acinares el sobrenadante de esta centrifugación se utiliza para obtener las fracciones de membrana y citosólica. Para separar ambas fracciones utilizamos una centrifuga GS-15

(Beckman) con un rotor *F2402H* en el que se disponen tubos *Eppendorf* de polipropileno para ultracentrífuga con una capacidad de 1.5 ml (Beckman). La ultracentrifugación del sobrenadante se realiza a 50000 xg durante 30 min a 4 °C.

El sobrenadante obtenido de la ultracentrifugación es la **fracción citosólica**, que se recoge para estudios posteriores. El precipitado obtenido se resuspende en 1 ml de TLMb a 4 °C con el objeto de lavar el resto de fracción citosólica. La suspensión se centrifuga entonces a 10000 xg durante 15 min, después se aspira el sobrenadante y se resuspende en 750 µl de *tampón de lisis* utilizado para la obtención de lisados totales a 4 °C. A partir de aquí se procede como en el caso de los lisados totales, sonicando las muestras en tapón de lisis durante 5 seg, centrifugando la suspensión a 10000 xg y recogiendo el sobrenadante como **fracción de membrana**.

3.2. Inmunoprecipitación y coimmunoprecipitación

Mediante la inmunoprecipitación se consiguen precipitar con anticuerpos específicos las proteínas objeto de estudio presentes en la fracción soluble de los lisados totales o de las fracciones subcelulares, separándolas de esta forma del resto de proteínas.

El rendimiento de la inmunoprecipitación, expresado en términos de cantidad y pureza de las proteínas obtenidas, depende fundamentalmente de la afinidad y especificidad del anticuerpo empleado en este proceso. La baja afinidad de un anticuerpo se puede soslayar parcialmente incrementando la cantidad de proteínas del lisado y la cantidad de anticuerpo añadido en este proceso, aunque se incrementa significativamente el coste y no siempre se dispone de muestras con gran concentración de proteínas.

Un anticuerpo poco específico representa otro factor indeseable puesto que, aunque la cantidad de proteína inmunoprecipitada puede ser conveniente, aparecerá poco purificada y al realizar el *immunoblotting* encontraremos bandas no específicas correspondientes a otras proteínas que se han unido al anticuerpo de forma inespecífica.

Para estandarizar el proceso de inmunoprecipitación se debe utilizar la misma cantidad de proteínas en todas las muestras. Con este fin se determinó la concentración de proteínas presentes en el lisado o

fracciones celulares por medio de un ensayo de Bradford estándar (715). Con los valores obtenidos se equilibró la cantidad de proteínas de cada muestra en la inmunoprecipitación, utilizándose una cantidad mayor o menor dependiendo de las características del anticuerpo utilizado, pero siempre igual en todas las muestras.

La inmunoprecipitación se realiza incubando la mezcla de proteínas presentes en los lisados o fracciones celulares con el anticuerpo específico para las proteínas en estudio, junto con proteína A unida a agarosa. (*Gráfico II-1*). La proteína A tiene gran afinidad por el fragmento Fc del anticuerpo (IgG) y generalmente se une a él con elevada especificidad. Sin embargo, en algunas ocasiones puede ser necesaria la utilización de un *anticuerpo puente* para mejorar la unión de la proteína A con algunos tipos de anticuerpo, particularmente algunos monoclonales de ratón (cepas IgG₁). El anticuerpo puente presenta mucha mayor afinidad que la proteína A por el anticuerpo que se utiliza para inmunoprecipitar las proteínas y éste anticuerpo puente se une a la proteína A con mayor facilidad. El resultado final es que se mejora la inmunoprecipitación de aquellos anticuerpos que no se unen con afinidad alta a la proteína A y con ellos la cantidad de la proteína en estudio.

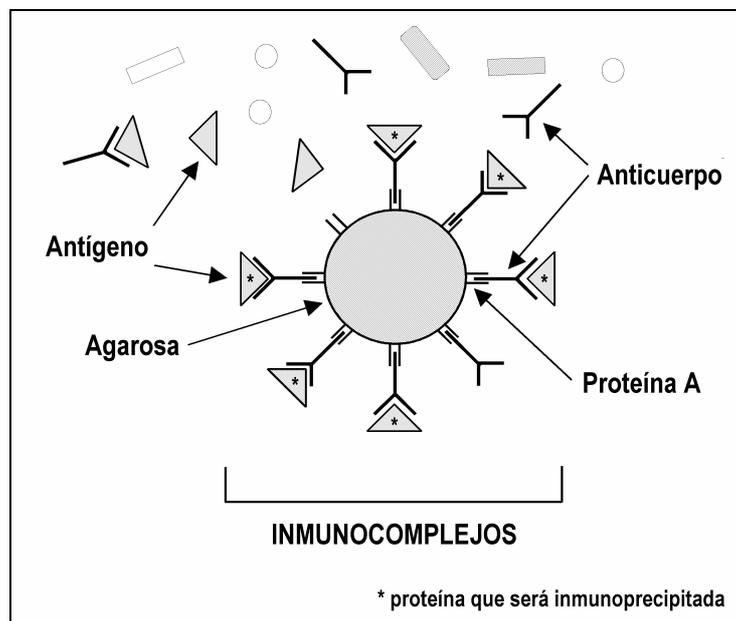


Gráfico II-1. Esquema de la inmunoprecipitación. La proteína A, que está unida a un soporte de agarosa, tiene gran afinidad por el anticuerpo y éste se une específicamente al antígeno. El inmunocomplejo se purifica fácilmente por centrifugación.

Como la proteína A está unida a agarosa, un soporte inerte fácilmente precipitable mediante centrifugación, se puede separar el inmunocomplejo del resto de proteínas que permanecerán en el sobrenadante, restringiendo las proteínas existentes en los inmunoprecipitados a aquellas en las que estamos interesados.

El proceso de coimmunoprecipitación (*Gráfico II-2*) se fundamenta en la capacidad que tienen ciertas proteínas de unirse con otras diferentes. Cuando dos proteínas distintas se encuentran físicamente unidas en la célula, al precipitar una de ellas mediante el empleo de un anticuerpo específico para dicha proteína, podrán identificarse las dos en el precipitado. Esta unión no siempre será de forma constitutiva, puede producirse de forma transitoria, por ejemplo tras la estimulación de los acinos con los agonistas. La técnica de coimmunoprecipitación es de particular interés en el estudio de la función y regulación de las proteínas adaptadoras cuya función biológica primordial consiste en unirse a otras proteínas, regulando de esta forma su actividad. También es una buena herramienta para realizar estudios sobre proteínas de anclaje que ofrecen un lugar de unión a otras proteínas.

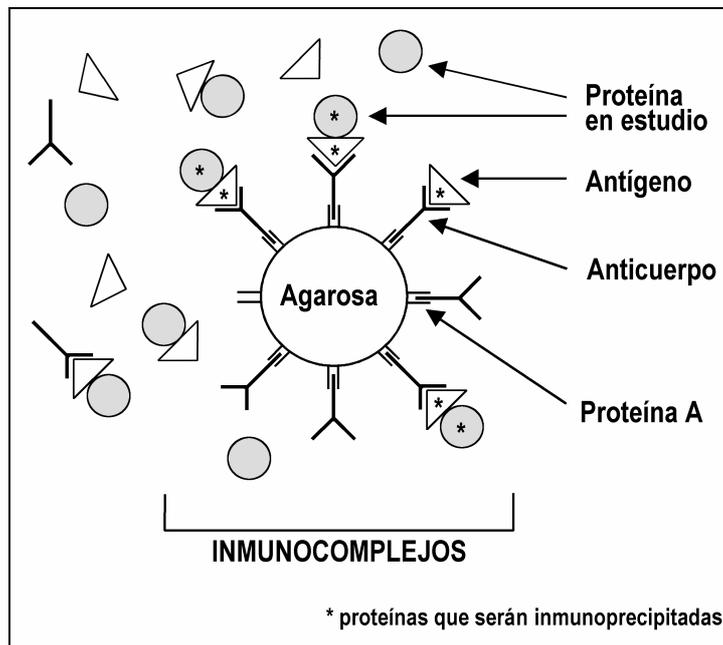


Gráfico II-2. Esquema de la coimmunoprecipitación. Cuando dos proteínas se encuentran unidas en la célula, al utilizar un anticuerpo frente a una de ellas, se obtienen las dos en el inmunoprecipitado.

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral utilizamos protocolos de inmunoprecipitación para identificar varias proteínas en acinos pancreáticos y, una vez identificadas, para estudiar la regulación de su fosforilación en restos de tirosina. También utilizamos técnicas de coimmunoprecipitación para caracterizar la formación de complejos proteicos en acinos pancreáticos inducida por CCK-8.

3.2.1. Inmunoprecipitación para estudios de fosforilación

Para cuantificar la fosforilación de una proteína en restos de tirosina se puede utilizar dos aproximaciones experimentales. La primera consiste en precipitar todas la proteínas que estén fosforiladas en residuos de tirosina utilizando un anticuerpo monoclonal específico para restos de tirosina fosforilados y, posteriormente, estudiar la proteína deseada realizando un *immunoblotting* con el anticuerpo específico para esta proteína.

La segunda posibilidad consiste en precipitar únicamente la proteína en estudio (fosforilada o no en restos de tirosina) con su anticuerpo específico y, posteriormente, estudiar la fosforilación en residuos de tirosina de esta proteína en el *immunoblotting*, empleando para ello un anticuerpo específico que reconoce restos de tirosina fosforilados. El resultado obtenido utilizando cualquiera de los dos procedimientos es el mismo.

Para la realización de los estudios de fosforilación se han utilizado ambas aproximaciones, siguiendo una u otra dependiendo de las características de los diferentes anticuerpos para cada proteína en estudio.

Inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en tirosina

A 1 ml de lisados acinares totales conteniendo 400–500µg de proteínas, se le añadieron 4 µg del anticuerpo monoclonal (isotipo IgG_{2bκ}) anti-fosfotirosina, clon PY20, y 30 µl de una solución de proteína A-agarosa (50 % v/v). Además se añadieron 4 µg del anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón, que favorece la unión entre la proteína A y el anticuerpo PY20. Esta mezcla se mantuvo en agitación constante en un rotor durante 12 horas a 4 °C.

El *immunoblotting* se realizó con el anticuerpo específico para cada proteína en estudio, como se explica en el apartado 3.4. “*immunoblotting* de proteínas”.

Las características de la inmunoprecipitación para estudios de fosforilación se resumen a continuación:

- **Muestras:** lisados celulares totales
- **Cantidad de proteínas:** 400–500 μg
- **Volumen:** 1 ml
- **Anticuerpo principal**
 - tipo: anti-fosfotirosina PY20, monoclonal
 - cantidad: 4 μg (4 μl)
 - compañía: Transduction Laboratories
- **Anticuerpo puente**
 - tipo: anti-IgG de ratón, no conjugado
 - cantidad: 4 μg (2 μl)
 - compañía: Pierce
- **Proteína A-agarosa:** 30 μl
- **Tiempo de incubación:** 12 horas

Inmunoprecipitación de la PKC- δ

Las proteínas de los lisados celulares totales, o de fracciones subcelulares de citoplasma o membrana, se diluyeron con tampón de lisis de forma proporcional para ajustar la cantidad procedente de las diferentes muestras a 500–600 μg de proteína en 1 ml. A estas muestras se le añadieron 4 μg del anticuerpo policlonal anti-PKC- δ (C-17) y se incubaron en un rotor durante 120 min a 4 °C. Pasado este tiempo se añadieron 30 μl de la solución de proteína A-agarosa y la mezcla se mantuvo en rotación durante 60 min más, siempre a 4 °C. Con anticuerpos policlonales no es necesario añadir anticuerpo puente.

El *immunoblotting* correspondiente a esta inmunoprecipitación se realizó con un anticuerpo anti-fosfotirosina, según se especifica en el apartado 3.4. En la fracción nuclear nunca se obtuvo la cantidad mínima de proteínas que permitiese realizar un *immunoblotting* posterior; es decir, la inmunoprecipitación de las proteínas de esta fracción nunca rendía una cantidad mínima detectable por *immunoblotting*, por esta razón ninguna proteína de la fracción nuclear fue sometida a inmunoprecipitación.

El protocolo para inmunoprecipitar la PKC- δ en estudios de fosforilación se resume a continuación:

- **Muestras:** lisados celulares totales
fracción citosólica
fracción de membrana
- **Cantidad de proteínas:** 500–600 μ g
- **Volumen:** 1 ml
- **Anticuerpo principal**
 - tipo: anti-PKC- δ (C-17), policlonal
 - cantidad: 4 μ g (20 μ l)
 - compañía: Santa Cruz Biotechnology
- **Anticuerpo puente**
 - tipo: —
 - cantidad: —
 - compañía: —
- **Proteína A-agarosa:** 30 μ l
- **Tiempo de incubación:** 120 min (Ac) + 60 min (proteína A)

3.2.2. Estudios de coimmunoprecipitación

En los ensayos de coimmunoprecipitación indagamos sobre la capacidad de las proteínas Crk y Grb2 para unirse a la proteína PYK2/CAK β . Para ello se utilizaron anticuerpos específicos frente a las primeras y se realizó el inmunoblotting con un anticuerpo específico de la segunda.

Para estos estudios se utilizaron lisados acinares totales. Las proteínas de las diferentes muestras se diluyeron para alcanzar una concentración de 600–700 μ g/ml. A 1 ml de estas muestras se le añadieron 4 μ g de los anticuerpos monoclonales anti-Crk o anti-Grb2 y se incubaron durante 120 min a 4 °C. Después se añadieron 30 μ l de la solución de proteína A-agarosa y 4 μ g del anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón y la mezcla se mantuvo en rotación durante 60 min a 4 °C.

El *immunoblotting* se realizó con el anticuerpo monoclonal anti-PYK2 y con los anticuerpos que intervienen en la coimmunoprecipitación descrita, según se especifica en el apartado 3.4. de este capítulo.

Las coimmunoprecipitaciones realizadas con las proteínas adaptadoras tuvieron las siguientes características:

- **Muestras:** lisados celulares totales
- **Cantidad de proteínas:** 600–700 μg
- **Volumen:** 1 ml
- **Anticuerpos principales**
 - tipos: anti-Crk, monoclonal ó anti-Grb2, monoclonal
 - cantidad: 4 μg (16 μl)
 - compañía: Transduction Laboratories
- **Anticuerpo puente**
 - tipo: anti-IgG de ratón, no conjugado
 - cantidad: 4 μg (2 μl)
 - compañía: Pierce
- **Proteína A-agarosa:** 30 μl
- **Tiempo de incubación:** 120 min (Ac) + 60 min (proteína A).

3.2.3. Otras inmunoprecipitaciones

Además de los anticuerpos ya descritos, se utilizaron otros con el fin de inmunoprecipitar las proteínas PKC- α y PYK2/CAK β . En ambos casos se utilizó el mismo protocolo:

A 1 ml de una solución de lisados totales (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se le añadieron 3 μg del anticuerpo monoclonal anti-PKC- α o del anticuerpo monoclonal anti-PYK2, ambos de Transduction Laboratories, y 30 μl de proteína A-agarosa (50 % v/v) junto con 4 μg del anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón. La mezcla se mantuvo en rotación durante 12 horas a 4 °C.

El *immunoblotting* se realizará posteriormente con los mismos anticuerpos. En el caso de PYK2/CAK β además se realizó un *immunoblotting* con el anticuerpo anti-fosfotirosina PY20. Todo ello aparece descrito con mayor detalle en el apartado 3.4. de este capítulo.

3.3. *Electroforesis y electrotransferencia*

La *electroforesis* es una técnica eficaz para la separación y análisis de las mezclas de proteínas que se encuentran en un material biológico. Se fundamenta en el hecho de que las velocidades (V) de arrastre de las proteínas en un campo eléctrico no son constantes, sino que dependen de la *fuerza del campo eléctrico* (E), de la *carga eléctrica neta de la proteína* (Z) y de la *resistencia de fricción* (F , que depende a su vez de la forma y del tamaño de la proteína). La velocidad de migración está definida, por lo tanto, por estas variables, que se relacionan mediante la expresión:

$$V = \frac{EZ}{F}$$

Otro factor importante que afecta a la movilidad electroforética es el pH del soporte en el que se realiza la electroforesis. El punto isoeléctrico es el pH en el que no existe carga eléctrica en la proteína. A este pH, la movilidad de la proteína es cero, porque Z es cero. Por debajo del punto isoeléctrico la molécula queda cargada positivamente, por encima está cargada negativamente.

3.3.1. *Preparación de las muestras*

Cuando se utilizó una **inmunoprecipitación**, las muestras se centrifugaron a 7000 xg durante 1 min, con el fin de separar la proteína en estudio del resto de proteínas del lisado celular, puesto que la proteína de interés está unida específicamente a la proteína A-agarosa por el anticuerpo utilizado. Una vez los inmunocomplejos se han depositado en el fondo del *Eppendorf* se aspira el sobrenadante casi completamente y se añade 1 ml de PBS a 4 °C con el objeto de lavar las muestras. Esta operación de lavado se repite 2 veces, centrifugando y aspirando sucesivamente.

Una vez terminado el último lavado se aspira el sobrenadante completamente, se añaden a los inmunocomplejos 12 μ l de tampón de

carga 2X (Tabla II-11) y se agita suavemente para facilitar la mezcla. Las muestras se calientan a 95 °C durante 5 min, con dos objetivos: primero, desnaturalizar las proteínas, proceso necesario para la separación de las mismas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes; segundo, separar el complejo anticuerpo-proteína A-agarosa creado durante inmunoprecipitación.

Reactivos	Tampón 2X
Tris/HCl pH 6.8	50 mM
DTT (ditiotreit ol)	10 mM
SDS	4.0 %
Glicerol	5.0 %
Azul de bromofenol	0.5 %
2-mercaptoetanol	7.5 %

Tabla II-11. Composición del tampón de carga 2X. En algunas ocasiones se ha utilizado este mismo tampón doblemente concentrado (tampón de carga 4X).

Cuando se ha completado el proceso de calentamiento, las muestras se centrifugan de nuevo a 7000 xg durante 1 min y se carga todo el sobrenadante en los pocillos del gel.

Sin embargo no todas las muestras fueron inmunoprecipitadas, en particular las fracciones subcelulares obtenidas para estudios de translocación. Las **muestras no inmunoprecipitadas** contienen todas las proteínas posibles, por ello tienen una concentración mucho más elevada y un pequeño volumen de lisado es suficiente para obtener una buena señal en el *immunoblotting* posterior. Para realizar la electroforesis se cargaron en los pocillos de 5 a 15 µg de proteínas, dependiendo de la proporción de la proteína en estudio en el total de la muestra y de la calidad del anticuerpo que posteriormente se utilizará. El ajuste de la cantidad que se debe cargar para obtener una señal adecuada se realizó empíricamente para cada proteína estudiada y el anticuerpo utilizado.

Cada muestra se diluyó proporcionalmente hasta alcanzar la concentración requerida (5–15 µg) en un volumen de 11 µl, después se añadieron 4 µl de tampón de carga 4X (Tabla II-11), se agita suavemente y se calienta la mezcla a 95 °C durante 5 min. Tras la desnaturalización, las muestras se centrifugan a 7000 xg durante 1 min para concentrar todo el volumen en el fondo del tubo y, finalmente, se cargan los pocillos con todo el contenido, es decir 15 µl.

3.3.2. Electroforesis

El tipo de soporte electroforético utilizado fue el SDS-PAGE (*sodium docecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*), es decir el soporte de la electroforesis está constituido por un gel de poliacrilamida con el detergente SDS.

El gel de poliacrilamida utilizado constaba de dos secciones, una superior o *gel de carga*, con un 4 % de acrilamida, y una inferior o *gel separador*, con un porcentaje de acrilamida del 10, 12 ó el 14 % (*Tabla II-12*), utilizándose uno u otro dependiendo del peso molecular de la proteína en estudio. Estos geles se fabricaron en el interior de unos cartuchos plásticos preparados al efecto. Para ciertos estudios que implicaban proteínas de peso molecular muy bajo se utilizaron geles comerciales de poliacrilamida en gradiente 4-20 % (*Tris-Glycine Gels 4-20 %*, Novex), puesto que estos geles ofrecen mayor resolución para proteínas de peso molecular en torno a 20 kDa (óptima entre 6-31 kDa).

Reactivos	Gel 4 %	Gel 10 %	Gel 12 %	Gel 14 %
Acrilamida/Bisacrilamida	4 %	10 %	12 %	14 %
Tris/HCl pH 8.8	375 mM	375 mM	375 mM	375 mM
TEMED	0.1 %	0.05 %	0.05 %	0.05 %
APS (persulfato amónico)	0.05 %	0.05 %	0.05 %	0.05 %

Tabla II-12. Composición de los geles de acrilamida. El gel del 4 % se utilizó como gel de carga y los geles del 10, 12 y 14 % como geles separadores. El TEMED y el APS son inductores de la polimerización y se añaden en último lugar.

Una vez polimerizados los geles en el cartucho, éstos se dispusieron en la cubeta de electroforesis *XCell II™ MiniCell* de Novex, se añadió el *tampón de electroforesis* (*Tabla II-13*) y las muestras fueron sometidas a un campo eléctrico utilizando la fuente *PowerPac 300* de Bio-Rad ajustando el voltaje como parámetro de referencia constante.

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 8.3	2.50 mM
Glicina	19.20 mM
SDS	0.01 %

Tabla II-13. Tampón de electroforesis.

Al ser sometidas a un campo eléctrico de voltaje constante las muestras migraron hacia el ánodo (+) a lo largo del gel de carga (80 mV) y del gel separador (145 mV). La duración aproximada de la electroforesis fue de 100 min. Al menos en una de las calles se cargó un estándar de proteínas teñidas con peso molecular conocido, que posteriormente nos sirvió como patrón de referencia para calcular el peso molecular de las proteínas en estudio (*SeeBlueTM Pre-Stained Standard*, Novex).

3.3.3. *Electrotransferencia*

Concluida la electroforesis las proteínas separadas por peso molecular se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (*Protran[®]*, Schleicher & Schuell). Este proceso, denominado *electrotransferencia*, ofrece una imagen especular de las proteínas contenidas en el gel sobre la membrana.

La identificación de las proteínas separadas por electroforesis en los geles de poliacrilamida se ve limitada por el pequeño tamaño del poro de los geles, que limita la penetración de las macromoléculas que las reconocen específicamente. Para solventar este problema las proteínas son transferidas a una membrana porosa de material adsorbente, generalmente de nitrocelulosa. La membrana de nitrocelulosa posee unos poros de mayor tamaño y es además un soporte más estable y manejable para los estudios posteriores. Se utilizaron membranas con un tamaño de poro de 0.45 μm , para proteínas con un peso molecular mayor de 60 kDa, y de 0.20 μm , para proteínas de menos de 60 kDa.

Para realizar la electrotransferencia se utilizó una cubeta de transferencia *Mighty Small Transphor* de Hoefer Pharmacia Biotech. En este equipo los geles se disponen en el interior de los cartuchos de transferencia, formando un sándwich en el que el gel se coloca íntimamente unido a la membrana de nitrocelulosa y ambos son rodeados por papel absorbente.

El sándwich, con la membrana hacia el ánodo (+) y el gel hacia el cátodo (-), se introduce en la cubeta de transferencia que se rellena con *tampón de transferencia* (Tabla II-14). Después, a través de los electrodos situados a ambos lados de la cubeta, se aplica durante 3 horas un campo eléctrico con una intensidad constante de 380 A. Este campo eléctrico hará migrar a las proteínas (que están cargadas negativamente) desde el gel situado en el polo (-), hacia la membrana, que está situada en el polo (+); es decir, migran desde el cátodo (-) hacia el ánodo (+).

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 8.3	2.5 mM
Glicina	19.2 mM
Metanol	20 %

Tabla II-14. Tampón de transferencia.

Para evitar que la temperatura en el interior de la cubeta sea demasiado elevada el tampón de transferencia se mantiene en constante agitación y es refrigerado mediante una red de circulación de agua fría que existe en la cubeta. La fuente eléctrica utilizada fue la *PowerPac 300* de Bio-Rad, ajustando la intensidad como parámetro de referencia constante.

3.4. “Inmunoblotting” de proteínas

La membrana de nitrocelulosa es ahora incubada con *anticuerpos primarios* que específicamente reconocen las proteínas en estudio. A esta primera incubación le sigue otra con un *anticuerpo secundario* que específicamente reconoce la secuencia del anticuerpo precedente y que lleva adosado un enzima que produce luz ante el sustrato adecuado (*Gráfico II-3*). Después se expone la membrana a un film fotosensible que será impresionado por la luz emitida de forma proporcional a la cantidad de la proteína presente en la membrana. Por último se revela el film y se realiza una cuantificación por densitometría de las diferentes impresiones recogidas en éste.

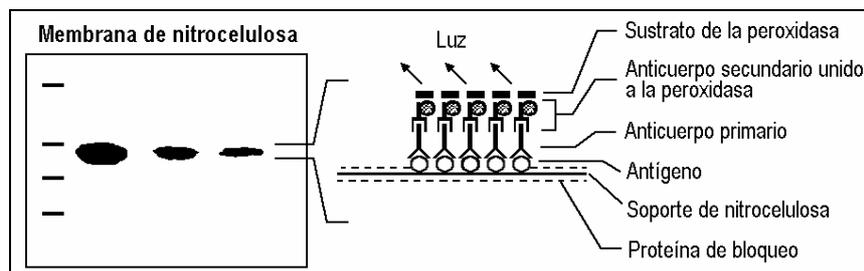


Gráfico II-3. Esquemática del inmunoblotting. Las proteínas están inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa, a ellas se une específicamente el anticuerpo primario y a éste el secundario, marcado con una peroxidasa que, al actuar en el sustrato, produce luz.

3.4.1. Bloqueo de la membrana

Al concluir la transferencia las membranas se incubaron con un tampón de bloqueo (Tabla II-15), que contiene una alta concentración de proteínas y es utilizado para disminuir la unión inespecífica.

El *bloqueo* de las membranas se realizó indistintamente de dos formas: durante toda la noche a 4 °C sin agitación o durante 60 min a temperatura ambiente con agitación. Ambos procedimientos logran un bloqueo adecuado de la membrana, se utilizó uno u otro dependiendo de la duración del experimento en curso.

Reactivos	Concentración
NaCl	0.46 %
Tris/HCl pH 8.0	50 mM
CaCl ₂	20 mM
Tween 20	0.05 %
Leche en polvo desnatada	5.00 %
Azida sódica	0.02 %

Tabla II-15. Composición del tampón de bloqueo.

3.4.2. Anticuerpo primario

Tras el *bloqueo* de las membranas se procedió a la incubación de las mismas con el anticuerpo primario específico de la proteína objeto de estudio. Todos los anticuerpos se diluyeron en tampón de bloqueo.

La concentración y el tiempo de incubación con este anticuerpo es variable y depende de su afinidad y de la cantidad de proteína presente en la membrana. El ajuste del tiempo óptimo de incubación con el anticuerpo primario y su concentración se realizó de forma empírica para cada anticuerpo utilizado.

Detección e identificación de proteínas

Para la detección e identificación de una proteínas en lisados de células acinares se realizó una inmunoprecipitación con el anticuerpo que

reconoce esa proteína y el *immunoblotting* con el mismo anticuerpo o con otro de diferente compañía, pero que reconoce la misma proteína. Este protocolo además nos sirve para calibrar si se ha utilizado la misma cantidad de proteínas en cada muestra.

Utilizando el mismo anticuerpo en la inmunoprecipitación y el *immunoblotting* se han identificado las siguientes proteínas: PYK2/CAK β , Grb2, Crk, PKC- δ y PKC- α . Las concentraciones del anticuerpo, su tiempo de incubación en el *immunoblotting* y la cantidad de proteínas utilizada en la inmunoprecipitación se recogen en la siguiente tabla:

Proteína	Cantidad en IP ⁽¹⁾ (μ g)	Anticuerpo en IB ⁽²⁾ (tipo) ⁽³⁾	Conc. Ac. IB ⁽²⁾ (μ g/ml)	Tiempo (min)
PYK2	400–500	Anti-PYK2 (mAb)	0.50 μ g/ml	90
Crk	500–600	Anti-Crk (mAb)	0.50 μ g/ml	120
Grb2	500–600	Anti-Grb2 (mAb)	0.50 μ g/ml	120
PKC- δ	500–600	Anti-PKC- δ (pAb)	2.0 μ g/ml	120
PKC- δ	500–600	Anti-PKC- δ (mAb)	0.25 μ g/ml	90
PKC- α	400–500	Anti-PKC- α (pAb)	2.0 μ g/ml	120
PKC- α	400–500	Anti-PKC- α (mAb)	0.25 μ g/ml	90

Tabla II-16. Características del *immunoblotting* para la detección e identificación de proteínas. ⁽¹⁾IP: inmunoprecipitación. ⁽²⁾IB: *immunoblotting*. ⁽³⁾mAb: anticuerpo monoclonal; pAb: anticuerpo policlonal.

Estudios de fosforilación

Para cuantificar la fosforilación en restos de tirosina de p125^{FAK}, paxilina y PYK2/CAK β se inmunoprecipitan todas las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina presentes en lisados totales, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina PY20, específico para restos de tirosina fosforilados, y posteriormente realizamos el *immunoblotting* empleando el anticuerpo específico para cada una de esas proteínas.

Para completar el estudio de la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β inmunoprecipitamos toda la PYK2/CAK β , fosforilada o no, en lisados totales. El *immunoblotting* se realiza con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-fosfotirosina del clon PY20.

Para estudiar la fosforilación en tirosina de la PKC- δ inmunoprecipitamos toda la PKC- δ , fosforilada o no, presente en lisados

totales o fracciones subcelulares, y el *immunoblotting* se realiza con el anticuerpo monoclonal de ratón (isotipo IgG_{2bκ}) anti-fosfotirosina del clon 4G10, que específicamente reconoce restos de tirosina fosforilados. Para caracterizar perfectamente la fosforilación de la PKC- δ se realizó una inmunoprecipitación de todas la proteínas fosforiladas en tirosina de los lisados totales con el anticuerpo anti-fosfotirosina PY20 y, posteriormente, realizamos el *immunoblotting* con el anticuerpo específico anti-PKC- δ .

En la siguiente tabla se recogen las concentraciones del anticuerpo primario, su tiempo de incubación en el *immunoblotting* y la cantidad de proteínas utilizada en la inmunoprecipitación:

Proteína	Cantidad en IP ⁽¹⁾ (μ g)	Anticuerpo en IB ⁽²⁾ (tipo) ⁽³⁾	Conc. Ac. IB ⁽²⁾ (μ g/ml)	Tiempo (min)
p125 ^{FAK(a)}	400–500	Anti-FAK (mAb)	0.25 μ g/ml	90
PYK2 ^(a)	400–500	Anti-PYK2 (mAb)	0.50 μ g/ml	90
PYK2 ^(b)	400–500	Anti-fosfotirosina PY20 (mAb)	0.25 μ g/ml	90
Paxilina ^(a)	400–500	Anti-paxilina (mAb)	0.025 μ g/ml	90
PKC- δ ^(b)	500–600	Anti-fosfotirosina 4G10 (mAb)	1.00 μ g/ml	120
PKC- δ ^(a)	500–600	Anti-PKC- δ (mAb)	0.25 μ g/ml	90

Tabla II-17. Características del immunoblotting para estudios de fosforilación.
^(a) Inmunoprecipitación con un anticuerpo antifosfotirosina. ^(b) Inmunoprecipitación con el anticuerpo frente a la proteína en estudio. ⁽¹⁾IP: inmunoprecipitación; ⁽²⁾IB: immunoblotting; ⁽³⁾mAb: anticuerpo monoclonal.

Estudios de coinmunoprecipitación

Para realizar estos estudios se inmunoprecipitaron en lisados celulares totales las proteínas Crk o Grb2 y el *immunoblotting* se realizó con el anticuerpo monoclonal anti-PYK2 y los anticuerpos monoclonales que intervienen en la coinmunoprecipitación: anti-Crk o anti-Grb2.

En estos estudios se incrementa el tiempo de incubación con el anticuerpo primario anti-PYK2 (0.50 μ g/ml) a 120 min, porque la cantidad de proteína coinmunoprecipitada no es muy elevada y, por lo tanto, la señal es débil. Para el resto de anticuerpos las condiciones fueron iguales a las utilizadas en los experimentos de identificación.

Estudios de translocación

En los estudios de translocación realizados con la PYK2/CAK β , la p125^{FAK} y la PKC- δ , como ya se ha indicado, generalmente no se realiza inmunoprecipitación sino que los lisados de las fracciones subcelulares se separan directamente por SDS-PAGE y el *immunoblotting* se realiza como aparece descrito en la tabla Tabla II-18.

En el caso de la PKC- δ se realizaron inmunoprecipitaciones de la fracción citosólica y de la fracción de membrana para analizar la fosforilación en resto de tirosina en estas fracciones. Por lo tanto, los inmunoprecipitados fueron sometidos a *immunoblotting* como se describe en el apartado *estudios de fosforilación*.

Proteína	Cantidad (μg) ⁽¹⁾	Anticuerpo en IB ⁽²⁾ (tipo) ⁽³⁾	Conc. Ac. IB ⁽²⁾ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Tiempo (min)
PYK2	FC: 10	Anti-PYK2 (mAb)	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	90
PYK2	FMb: 15	Anti-PYK2 (mAb)	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	90
p125 ^{FAK}	FC: 10	Anti-FAK (mAb)	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	90
p125 ^{FAK}	FMb: 15	Anti-FAK (mAb)	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	90
PKC- δ	FC: 7	Anti-PKC- δ (pAb)	2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	120
PKC- δ	FMb: 10	Anti-PKC- δ (pAb)	2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	120
PKC- δ	FNu: 10	Anti-PKC- δ (pAb)	2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	120

Tabla II-18. Características del immunoblotting para estudios de translocación.

⁽¹⁾Fracción: FC, fracción citosólica; FMb, fracción de membrana; FNu, fracción nuclear.

⁽²⁾IB: immunoblotting. ⁽³⁾mAb: anticuerpo monoclonal; pAb: anticuerpo policlonal.

3.4.3. Anticuerpo secundario

Después de la incubación con el anticuerpo primario las membranas se lavan 2 veces durante 4 min con tampón de bloqueo para eliminar el anticuerpo primario no unido a las membranas y después se incuban con el anticuerpo secundario, que específicamente reconoce la secuencia del anticuerpo precedente y que lleva adosado un enzima que produce luz ante el sustrato adecuado.

De nuevo, la concentración y el tiempo de incubación con este anticuerpo son variables, pudiéndose ajustar un rango de concentraciones relativamente amplio con diferentes tiempos de incubación, para mejorar

el rendimiento. Como los anteriores, el resultado obtenido depende de la afinidad que muestre por el antígeno (en este caso el anticuerpo primario), y de la cantidad de éste presente en la membrana. El ajuste del tiempo óptimo de incubación con el anticuerpo secundario y su concentración se realizó de forma empírica para cada anticuerpo primario utilizado.

Los anticuerpos secundarios utilizados, su concentración y el tiempo de incubación aparecen reflejados a continuación:

- para los **anticuerpos primarios IgG de ratón** (monoclonales): *Anti-mouse IgG (HRP conjugate)*. Es un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce). Este anticuerpo se utilizó durante 45 min con una dilución 1:3000 (el rango de diluciones fue desde 1:500 a 1:6000).
- para los **anticuerpos primarios IgG de conejo** (policlonales): *Anti-rabbit IgG (HRP conjugate)*. Es un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology). Este anticuerpo se utilizó durante 45 min con una dilución 1:7500 (el rango de diluciones fue desde 1:5000 a 1:20000).

Cuando finaliza la incubación con el anticuerpo secundario se lavan las membranas 4 veces durante 4 min, dos de ellas con tampón de bloqueo y dos más con *tampón de lavado de membranas* (Tabla II-19). Este tampón es muy parecido al de bloqueo, pero se retira la fuente de proteínas (generalmente leche en polvo desnatada) y la azida sódica, que reducen sensiblemente la actividad de la peroxidasa.

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 8.0	50 mM
NaCl	0.46 %
CaCl ₂	20 mM
Tween 20	0.05 %

Tabla II-19. Composición del tampón de lavado de membranas.

Cuando finaliza este lavado las membranas se secan depositándolas sobre papel absorbente y ya están listas para ser incubadas con el sustrato de la peroxidasa.

3.5. Detección y cuantificación de la señal

La detección de las proteínas se realizó incubando las membranas con el sustrato de la peroxidasa que se encuentra unida al anticuerpo secundario, de este modo se produce una reacción de quimioluminiscencia y la luz producida es capaz de impresionar un film.

Como sustrato de la reacción de quimioluminiscencia se utilizó dos reactivos diferentes:

- ***SuperSignal[®] Substrate WB*** (Pierce). Este reactivo es de elección en la mayoría de los casos, puesto que produce gran cantidad de luz en un corto período de tiempo. Sin embargo, no es de elección cuando hay gran cantidad de proteínas en la membrana, porque el sustrato se consume en pocos segundos antes de dar tiempo a exponer el film, de forma que la impresión no se produce (falsos negativos). El tiempo de incubación fue de 4 min.
- ***Western Blotting ECL[®]*** (Amersham). Este reactivo posee mayor estabilidad, pero rinde menor cantidad de luz. Se utilizó cuando existen demasiadas proteínas en la membrana porque tarda más en desaparecer la señal por consunción del sustrato. El tiempo de incubación fue de 1 min.

En ambos casos se realiza la incubación de la membrana con un volumen muy pequeño: 0.25 ml por cm² de membrana.

A continuación se expone un film fotosensible a la luz liberada por la reacción de quimioluminiscencia. En aquellas zonas de la membrana donde se produjo la reacción el film queda impresionado. Posteriormente se procede al revelado del film introduciéndolo secuencialmente en la solución reveladora (3 min), en agua (lavado rápido) y en la solución fijadora (1 min). Finalmente, el film se lava en agua abundantemente. Todo este proceso se lleva cabo en una cámara oscura.

Una vez seco, el film se digitalizó en un escáner *HP ScanJet 5200C* de Hewlett Packard con una resolución de 300 ppp en escala de grises y sobre la digitalización se utilizó el programa informático *BandLeader[®] v2.01* para cuantificar la intensidad de las manchas, que asigna un valor a cada región por medio de un algoritmo basado en la profundidad de los niveles de grises.

3.6. “Stripping”

El *stripping* (término anglosajón intraducible en este contexto, que significa *desnudar* o *despojar*) es un procedimiento que consigue despegar los anticuerpos unidos a las proteínas presentes en la membrana, con el objeto de realizar nuevas incubaciones con otros anticuerpo primarios. Este procedimiento se realiza sumergiendo la membrana en la *solución de stripping* (Tabla II-20) durante 30 min a 35 °C, con una agitación constante y suave (15 ciclos/min).

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 6.7	62.5 mM
SDS	2 %
β-mercaptoetanol	100 mM

Tabla II-20. Solución de stripping.

Una vez finalizado el *stripping* se procede con el bloqueo de la membrana y la incubación con un nuevo anticuerpo primario, repitiéndose todo el proceso que aparece descrito en el apartado 3.4 de este capítulo.

Este procedimiento es adecuado para estudiar la presencia en la misma membrana de proteínas con peso molecular muy parecido (es el caso de p125^{FAK} y PYK2/CAKβ), de forma que la incubación simultánea con anticuerpos primarios que reconozcan cada una de las proteínas no se puede realizar porque se superpone la señal dependiente de cada uno de ellos. Para solventar este problema se realiza una incubación con uno de los anticuerpos; una vez finalizado el proceso se elimina por medio de *stripping* el anticuerpo precedente y se realiza una segunda incubación con el anticuerpo que reconoce la otra proteína.

También se ha utilizado durante la realización de la presente Tesis Doctoral para identificar bandas de fosforilación: una vez se han analizado todas las bandas de las proteínas fosforiladas que aparecen en la membrana, se retira mediante *stripping* el anticuerpo anti-fosfotirosina y se comprueba si alguna de las bandas que aparecían fosforiladas presenta inmunoreactividad con el anticuerpo que reconoce determinada proteína.

4. Cuantificación de la actividad tirosina cinasa y serina/treonina cinasa.

La actividad cinasa se ensayo con 3 proteínas: la PYK2/CAK β y las isoformas α y δ de la PKC. La PYK2/CAK β es una tirosina cinasa con unos requerimientos alostéricos muy diferentes de los que presenta la serina/treonina cinasa PKC. Por lo tanto, aunque el protocolo es básicamente común en el lisado de las células, la inmunoprecipitación, la electroforesis y secado de geles, y la cuantificación; sin embargo, las condiciones establecidas para la reacción cinasa son distintas para la PYK2/CAK β y la PKC. El protocolo utilizado para las dos isoformas de la PKC es básicamente el mismo, aunque se utilizó distinto sustrato en la reacción cinasa.

Todas las reacciones para la cuantificación de la actividad tirosina cinasa y serina/treonina cinasa, que implicaban la utilización del isótopo radiactivo ^{32}P , se realizaron en las instalaciones del Servicio de Isótopos Radioactivos de la Facultad de Veterinaria de la UEX.

4.1. Lisado de las células

4.1.1. Lisados celulares totales

El protocolo para obtener lisados celulares totales es básicamente el mismo que en el caso del *Western blotting*, sólo se diferencian en que se utilizan tampones ligeramente diferentes y en que la cantidad de acinos utilizada era bastante más elevada (aproximadamente el doble).

Brevemente, cuando finaliza la incubación de la suspensión acinar con los agentes en estudio cada muestra se centrifugó a 7200 xg durante 10-15 seg, se aspiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de PBS a 4 °C. A continuación las muestras fueron centrifugadas nuevamente en las mismas condiciones, se aspiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml tampón de lisis para la determinación

de la actividad cinasa en lisados totales (TLALT) a 4 °C (Tabla II-21) y aquí las suspensiones acinares se sonicaron durante 5 seg.

En la composición del tampón de lisis para estudios de actividad se elimina el detergente deoxicolato, las sustancias quelantes de cationes divalentes (EDTA y EGTA) y la azida sódica, porque todas ellas interfieren con la determinación de la actividad cinasa.

Después de esperar 10 min tras la sonicación, las muestras se centrifugaron a 10000 xg durante 15 min a 4 °C, con la finalidad de precipitar la fracción celular insoluble. La fracción soluble de los lisados celulares totales se utilizó para los estudios posteriores.

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 7.4	50 mM
NaCl	150 mM
Tritón X-100	1.0 %
Aprotinina	5 µg/ml
Leupeptina	5 µg/ml
PMSF	1.0 mM
Na ₃ VO ₄	0.20 mM

Tabla II-21. Tampón de lisis para la determinación de la actividad cinasa en lisados totales. Se diferencia del utilizado en estudios de Western blotting en que se eliminan todas las sustancias que interfieren con la actividad. El pH se ajustó a 7.4.

4.1.2. Fracciones subcelulares

Para obtener fracciones subcelulares se utilizó aproximadamente doble cantidad de acinos que en el caso precedente (cuádruple que en la obtención de lisados totales para *Western blotting*), puesto que este método precisa gran concentración de proteínas.

De nuevo resulta limitante la concentración de proteínas en la fracción nuclear, que no rindió nunca cantidad suficiente para realizar estudios de actividad. Por este motivo la fracción nuclear no se utilizó para realizar estudios de actividad.

Como en el apartado anterior, inmediatamente después de la incubación con los agentes en estudio se lavaron las muestras con 1 ml de PBS a 4 °C. A continuación las muestras fueron centrifugadas a 7200 xg

durante 10-15 seg, después se aspiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis para la determinación de la actividad cinasa en la fracción de membrana (TLAMb) a 4 °C (Tabla II-22). Este tampón es el mismo que el utilizado para cuantificar la actividad en lisados celulares totales, pero en su elaboración no se utiliza el detergente tritón X-100.

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 7.4	50 mM
NaCl	150 mM
Aprotinina	25 µg/ml
Leupeptina	25 µg/ml
PMSF	1.0 mM
Na ₃ VO ₄	0.20 mM

Tabla II-22. Tampón de lisis para la determinación de la actividad cinasa en la fracción de membrana. En este tampón se elimina el detergente tritón X-100.

Después, las suspensiones acinares de cada muestra se homogeneizaron en hielo, en dos series de 15 seg con una pequeña pausa intermedia, y se procedió a centrifugar los homogenizados a 500 xg durante 10 min en centrífuga refrigerada a 4 °C.

El precipitado de esta centrifugación a baja velocidad contiene grandes agregados de membrana, acinos no homogeneizados y el núcleo de las células homogeneizadas, de mucha mayor densidad que el resto de componentes celulares, y se descartó. El sobrenadante contiene la fracción citosólica y de membrana, que se separarán a continuación.

Para separar las fracciones de membrana y citosólica se realiza una ultracentrifugación en tubos *Eppendorf* de 1.5 ml (Beckman) a 50000 xg durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido en la ultracentrifugación es la **fracción citosólica**, que se recoge para realizar posteriormente una inmunoprecipitación.

El precipitado obtenido se resuspende en 1 ml de TLAMb a 4 °C con el objeto de lavar el resto de fracción citosólica. La suspensión se centrifuga entonces a 10000 xg durante 15 min, después se aspira el sobrenadante y se resuspende en 1 ml de TLALT a 4 °C. A partir de aquí se procede como en la obtención de lisados totales: sonicando las muestras durante 5 seg, centrifugando los lisados y recogiendo el sobrenadante como **fracción de membrana** para la inmunoprecipitación.

4.2. Inmunoprecipitación

Los anticuerpos utilizados para realizar la inmunoprecipitación en los estudios de actividad, además de poseer las características de afinidad y especificidad ya descritas, no deben interferir con la actividad cinasa de las proteínas. Cuando se diseñan los anticuerpos para las diferentes proteínas, pueden utilizarse como determinantes antigénicos regiones de la proteína que están implicadas con su actividad, bien directamente el lugar activo o sitios para cofactores; o bien lugares cercanos a estas regiones en la estructura tridimensional de la proteína, de forma que cuando el anticuerpo se une impide o reduce significativamente la actividad cinasa de la proteína.

Otro factor a tener en cuenta a la hora de realizar estos estudios es que se necesita inmunoprecipitar gran cantidad de proteína para obtener señales claras, por este motivo la cantidad de anticuerpo añadida a los lisados está incrementada respecto a la utilizada para *Western blotting*.

4.2.1. Inmunoprecipitación de la PYK2/CAK β

A continuación se resume el protocolo utilizado para inmunoprecipitar la PYK2/CAK β en estudios de actividad, se utilizó el mismo anticuerpo que en los estudios de *Western blotting*:

- **Muestras:** lisados celulares totales
- **Cantidad de proteínas:** 1200–1400 μ g
- **Volumen:** 1 ml
- **Anticuerpo principal**
 - tipo: anti-PYK2, monoclonal
 - cantidad: 6 μ g (24 μ l)
 - compañía: Transduction Laboratories
- **Anticuerpo puente**
 - tipo: anti-IgG de ratón, no conjugado
 - cantidad: 6 μ g (3 μ l)
 - compañía: Pierce
- **Proteína A-agarosa:** 40 μ l
- **Tiempo de incubación:** 12 horas (4 °C, agitación constante)

4.2.2. Inmunoprecipitación de la PKC- δ y de la PKC- α

El anticuerpo policlonal de Santa Cruz Biotechnology utilizado para inmunoprecipitar la proteína PKC- δ en *Western blotting* se ha sustituido por uno monoclonal de Transduction Laboratories, que funciona más satisfactoriamente en los estudios de actividad. El anticuerpo policlonal mencionado reduce ligeramente, pero de forma significativa, la actividad cinasa de la proteína, aunque no la anula completamente y puede utilizarse para la reacción cinasa si no se dispone de ningún otro. Para inmunoprecipitar la proteína PKC- α utilizamos un anticuerpo monoclonal de Transduction Laboratories.

A 1200–1400 μg de lisados celulares totales o de fracciones subcelulares de citoplasma o membrana, diluidos en tampón de lisis hasta completar 1 ml, se le añadieron 6 μg del anticuerpo monoclonal anti-PKC- δ o anti-PKC- α , 40 μl de la solución de proteína A-agarosa y 6 μg del anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón no conjugado. La mezcla se mantuvo en rotación durante 12 horas a 4 °C.

El protocolo para inmunoprecipitar la PKC en estudios de actividad se resume a continuación:

- **Muestras:** lisados celulares totales
fracción citosólica
fracción de membrana
- **Cantidad de proteínas:** 1200–1400 μg
- **Volumen:** 1 ml
- **Anticuerpos principales**
 - tipos: anti-PKC- δ , monoclonal
anti-PKC- α , monoclonal
 - cantidad: 6 μg (24 μl)
 - compañía: Transduction Laboratories
- **Anticuerpo puente**
 - tipo: anti-IgG de ratón, no conjugado
 - cantidad: 6 μg (3 μl)
 - compañía: Pierce
- **Proteína A-agarosa:** 40 μl
- **Tiempo de incubación:** 12 horas (4 °C, agitación constante)

4.3. Reacciones cinasa

Los ensayos de actividad cinasa utilizados se basan en la fosforilación de un sustrato exógeno con fósforo marcado radiactivamente (^{32}P), por medio de la transferencia de un γ -fosfato procedente del nucleótido adenosina 5'-[^{32}P]trifosfato ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$: ATP marcado con un átomo ^{32}P en el fosfato en posición gamma). El sustrato fosforilado se separa entonces del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ residual por medio de electroforesis y el gel es cuantificado por autoradiografía.

Las reacciones de autofosforilación comparten el mismo principio, pero en este caso el sustrato exógeno no se añade a la reacción, y la actividad se evalúa por la incorporación de ^{32}P en la propia cinasa. Este tipo de ensayo se utilizó con la $\text{PYK2}/\text{CAK}\beta$.

Las reacciones que se describen a continuación, son lineales para tiempos de incubación de hasta 30 min y una incorporación máxima de hasta el 20 % del ATP total. Estos ensayos están diseñados para cuantificar en inmunoprecipitados la actividad fosfotransferasa de cinasas en un sustrato exógeno.

4.3.1. Ensayo de la actividad cinasa de $\text{PYK2}/\text{CAK}\beta$

Cuando finalizó la inmunoprecipitación las muestras se centrifugaron a 7000 xg durante 1 min a 4 °C, después se aspiró el sobrenadante casi completamente y se añadió 1 ml de PBS a 4 °C con el objeto de lavar las muestras. Esta operación se repite 2 veces. Después se realizan dos nuevos lavados con 1 ml del tampón de ensayo para PYK2 (Tabla II-23) a 4 °C, centrifugando y aspirando sucesivamente.

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 7.4	50 mM
MnCl_2	5 mM
MgCl_2	5 mM
DTT	2 mM

Tabla II-23. Tampón de ensayo para PYK2. El pH se ajustó a 7.4. Para la reacción cinasa se utilizó éste mismo tampón de ensayo concentrado 5 veces.

Una vez terminado el último lavado y retirado todo el sobrenadante tiene lugar la reacción cinasa propiamente dicha. Para ello se añade a cada inmunoprecipitado un volumen de 20 μl a 4 °C, conteniendo:

- 4 μl tampón de ensayo para PYK2 (concentrado 5 veces)
- 2 μl de una solución de ATP 100 μM en H_2O (concentrado 10 veces).
- 10 μl de una solución del sustrato exógeno Poly(Glu-Tyr) 4:1 con una concentración de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en H_2O (concentrado 2 veces). Cuando se realizaron estudios de autofosforilación, no se añadió el sustrato exógeno.
- 4 μl de H_2O bidestilada, para completar un volumen final de 20 μl (en estudios de autofosforilación se añaden 14 μl).

El sustrato Poly(Glu-Tyr) 4:1 es un polímero peptídico sintético formado por la secuencia glutámico:tirosina en proporción 4:1 (-Glu-Glu-Glu-Glu-Tyr-). Debido a que las cadenas peptídicas son de diferente longitud, éste polímero no tiene un peso molecular concreto, oscilando entre 20 y 60 kDa.

La **concentración final** de todos los componentes en la reacción aparece en la siguiente tabla:

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 7.4 ⁽¹⁾	50 mM
MnCl ₂ ⁽¹⁾	5 mM
MgCl ₂ ⁽¹⁾	5 mM
DTT ⁽¹⁾	5 mM
ATP	10 μM
Poly(Glu-Tyr) 4:1 ⁽²⁾	2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Tabla II-24. Concentración final de los componentes de la reacción para medir la actividad de la PYK2/CAK β .
⁽¹⁾ presentes en el tampón de ensayo para PYK2. ⁽²⁾ no se encuentra presente en estudios de autofosforilación.

Cuando los componentes de la reacción están presentes se agita brevemente la mezcla para resuspender los inmunoprecipitados y, antes de añadir el ATP marcado, la mezcla se mantiene a 4 °C durante 5-10 min

para bloquear la unión inespecífica de fósforo al sustrato y reducir de esta forma la señal de fondo.

Después se añaden 10 μCi (1 μl) de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) a las muestras y se agitan vigorosamente a 30 °C durante 15 min, tiempo durante el que se produce la incorporación de ^{32}P al sustrato de forma proporcional a la actividad de la cinasa, o bien la autoincorporación de ^{32}P (autofosforilación), también de forma proporcional a su actividad.

El volumen de reacción total es de 21 μl , sobre 20 μl de proteína A-agarosa (100 %). Para terminar la reacción se añaden 10 μl de tampón de carga 4X a la mezcla y posteriormente se procede a la desnaturalización de las proteínas por calentamiento de las muestras a 95 °C durante 5 min.

4.3.2. Ensayo de la actividad cinasa de la PKC

Al igual que en el caso anterior, una vez finaliza la inmunoprecipitación de las isoformas α y δ de la PKC las muestras se lavan dos veces en 1 ml de PBS a 4 °C. Después se realizan dos nuevos lavados con 1 ml de *tampón de ensayo para PKC* (Tabla II-25) a 4 °C, centrifugando y aspirando sucesivamente en las condiciones descritas.

Reactivos	Concentración
MOPS pH 7.2	20 mM
β -glicerol fosfato	25 mM
Na_3VO_4	1 mM
DTT	1 mM
EGTA (*)	5 mM
CaCl_2 (*)	1 mM

Tabla II-25. Tampón de ensayo para PKC. (*)Para los ensayos cinasa de PKC- δ se añadió EGTA y no CaCl_2 , y al contrario para los ensayos con PKC- α .

Cuando termina el último lavado tiene lugar la reacción cinasa. Para producir esta reacción utilizamos el *kit* de ensayo cinasa para PKC de Upstate Biotechnology (*PKC Kinase Assay Kit*), que contiene un

activador lipídico, una solución con inhibidores de otras cinasas y una solución de magnesio/ATP, todos ellos disueltos en tampón de ensayo para PKC. Además, se han preparado alícuotas con el sustrato de la PKC diluido en ese mismo tampón. La reacción comienza añadiendo a los inmunoprecipitados las soluciones a 4 °C hasta un volumen final de 50 µl:

- 10 µl del tampón de ensayo para PKC
- 10 µl del activador lipídico en tampón de ensayo para PKC, conteniendo:
 - 5 µg de PS
 - 0.5 µg de DAG
- 10 µl del inhibidor de otras cinasas en tampón de ensayo para PKC, conteniendo:
 - 2 µM del péptido inhibidor de la PKA, denominado PKI
 - 20 µM del compuesto R24571
- 10 µl del sustrato en tampón de ensayo para PKC, conteniendo:
 - 10 µg de histona H1 para la PKC-δ ó
 - 50 µg de MBP para la PKC-α
- 10 µl de la solución de magnesio/ATP en tampón de ensayo para PKC, conteniendo
 - 75 mM MgCl₂
 - 0.5 mM ATP

La **concentración final** de todos los componentes en la reacción es la que aparece a continuación (en tampón de ensayo para PKC):

Reactivos	Concentración
PS	0.10 µg/µl
DAG	0.01 µg/µl
PKI	0.4 µM
R24571	4.0 µM
Histona H1 ^(*)	0.2 µg/µl
MBP ^(*)	1.0 µg/µl
MgCl ₂	15 mM
ATP	100 µM

Tabla II-26. Concentración final de los componentes de la reacción para medir la actividad cinasa de las isoformas de la PKC. No aparecen reflejados los componentes de tampón de ensayo para PKC. ^(*) Para los ensayos cinasa de PKC-δ se añadió la histona H1, y MBP para los ensayos con PKC-α.

Cuando todos los componentes están presentes se agita la mezcla brevemente para resuspender los inmunoprecipitados y, antes de añadir el ATP marcado, la mezcla se mantiene a 4 °C durante 5-10 min para bloquear la unión inespecífica de fósforo al sustrato y reducir de esta forma el ruido de fondo.

Pasado este tiempo se añaden a las muestras 10 µCi (1 µl) de [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol, 10 µCi/µl) y se mantienen a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 15 minutos con agitación vigorosa.

El volumen total de reacción fue de 51 µl (sobre 20 µl de proteína A-agarosa 100 %). Para terminar la reacción se añaden 10 µl de tampón de carga 4X a la mezcla y posteriormente se calientan las muestras a 95 °C durante 5 min.

4.4. Electroforesis y secado de geles

Después de añadir el tampón de carga y tras la desnaturalización de las proteínas, las muestras se centrifugan a 7000 xg durante 1 min y se cargan 30 µl del sobrenadante en los pocillos de geles de poliacrilamida en gradiente 4-20 % (*Tris-Glycine Gels 4-20 %*, Novex), puesto que estos geles ofrecen mejor resolución para los sustratos empleados en las diferentes reacciones cinasa.

A continuación se realizó la electroforesis, según las condiciones descritas en el apartado 3.3.2 de este capítulo, para separar el sustrato marcado o la proteína autofosforilada (sólo PYK2/CAK β) del γ -³²P no unido.

Una vez terminada la electroforesis se procedió a secar los geles de poliacrilamida utilizando el sistema de secado *GelAir*[®] de Bio-Rad (*GelAir*[®] *Dry System*). Este equipo es capaz de secar perfectamente los geles en 90 minutos. Los geles después del secado quedan protegidos entre dos capas de celofán, hecho que mejora la seguridad del proceso porque el plastificado evita la contaminación de las superficies que entran en contacto con los geles al quedar perfectamente aislados del exterior.

Para secar los geles se toman dos hojas de celofán (*GelAir*[®] *Cellophane Support*, Bio-Rad) y se humedecen en agua bidestilada durante 5 min. Los geles se extraen del cartucho plástico en el que se realiza la electroforesis y se sumergen durante 10 min en la solución para secado de geles (*Gel Drying Solution*, Bio-Rad) cuya composición no ha sido suministrada por la compañía.

Después del equilibrado de los geles y de tener las hojas de celofán humedecidas, se coloca una de ellas sobre el soporte de ensamblaje (*Gráfico II-4*). Sobre esta primera hoja se disponen los geles de acrilamida, y sobre ellos se coloca la segunda hoja de celofán humedecida, evitando la presencia de aire entre ellas. Finalmente se estiran las hojas de celofán dando tensión al conjunto, que será mantenida por medio de unas pinzas o cierres de plástico colocados en los cuatro lados del soporte. La tensión de las hojas y los geles permite un secado uniforme sin arrugas ni dobleces.

El soporte se introduce en el horno de secado, que dispone de una fuente de calor y un ventilador que hace circular aire caliente sobre el celofán y los geles. Ambos van perdiendo humedad progresivamente por convección, hasta que se consigue un secado completo. El horno se colocó en el interior de una campana de extracción adaptada para el trabajo con isótopos radioactivos.

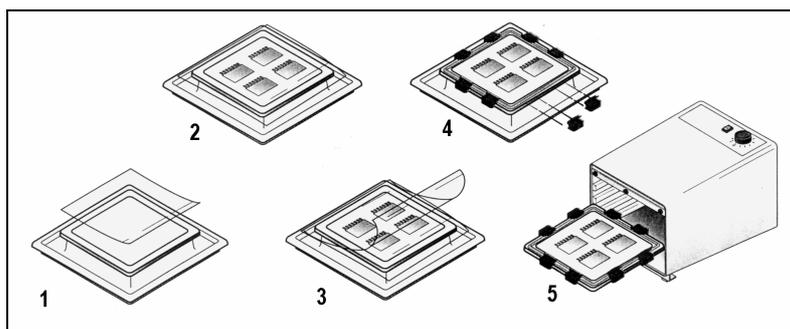


Gráfico II-4. Esquema del sistema de secado de geles. 1.- se coloca la primera hoja de celofán sobre el soporte; 2.- se colocan los geles; 3.- se coloca la segunda hoja de celofán; 4.- se colocan los cierres que mantienen la tensión; 5.- geles y celofán se introducen en el horno de secado.

4.5. Detección y cuantificación de la señal

La cuantificación de la actividad cinasa se realizó por autoradiografía electrónica o *phosphoimaging*, y por densitometría.

El equipo de *phosphoimaging* utilizado fue el InstantImager® (Packard Instruments Company) y los valores de emisión se obtuvieron por medio del *software* InstantImage™ suministrado con este instrumento que realiza, entre otras, las siguientes cuantificaciones:

- cuentas totales
- cuentas por minuto (cpm)
- cuentas totales por mm²
- cpm por mm²

Este programa también permite sustraer el ruido de fondo de la muestra por lo que las determinaciones y comparaciones tienen un grado de precisión muy aceptable. Para nuestros estudios consideramos los valores correspondientes a cpm.

Para realizar las cuantificaciones densitométricas expusimos de 3 a 24 horas un film radiosensible al gel que contenía el sustrato o la proteína autofosforilada marcados con ³²P. El film quedó impresionado de forma proporcional a la radiación emitida o cantidad de ³²P presente en el gel, siendo ésta un índice de una mayor o menor actividad de fosfotransferencia o actividad cinasa.

Una vez obtenida la autoradiografía se actúa de igual forma que en el *Western blotting*, es decir, se procede al revelado en la cámara oscura con la solución reveladora y la solución fijadora, y posteriormente se seca. Después se cuantificaron las bandas del film por densitometría, utilizando el mismo equipo que en el *Western blotting*.

5. Estadística

Los resultados obtenidos experimentalmente se han expresado como media \pm error estándar de la media (EEM) y han sido representados gráficamente frente al logaritmo de la concentración del secretagogo empleado.

Los resultados obtenidos empleando la técnica del *Western blotting* (unidades densitométricas arbitrarias), o los obtenidos en los ensayos de actividad cinasa o en la producción de InsP_T (ambos en cpm), se representan gráficamente como incremento neto (incremento del efecto obtenido en presencia de estímulo, dividido por el valor control obtenido en ausencia de estímulo), como tanto por ciento de la respuesta máxima (obtenida con el secretagogo cuyo efecto es estudiado) o bien como tanto por ciento del control (valor obtenido con el agonista estudiado a una concentración diferente de la que produce el efecto máximo). En los estudios de translocación los resultados se expresan como tanto por ciento de la translocación máxima.

Los resultados obtenidos empleando el método de la determinación de calcio intracelular se expresan en molaridad.

En las curvas dosis-respuesta se llevó a cabo una regresión no lineal para ajustar una curva a los datos experimentales, obteniendo para cada curva los dos parámetros que la definen: efecto máximo o EM (parámetro indicativo de la eficacia) y concentración eficaz 50 o EC₅₀ (parámetro indicativo de la potencia).

Para comparar los resultados obtenidos con distintos tratamientos se emplearon un análisis de la varianza o ANOVA cuando el número de grupos era superior a dos o una t de Student cuando el número de grupos era de dos. En aquellos ANOVA que mostraron diferencias significativas entre los grupos comparados se realizaron a posteriori comparaciones dos a dos mediante el test de Scheffe. Todos los valores de p inferiores a 0,05 los hemos considerado como significativos. Todas las comparaciones se realizaron por medio del programa *Statistica* v4.0, de StatSoft, Inc.

*III. Tiroquinas cinasas de
adhesión focal:
PYK2/CAK β*

1. Introducción

1.1. El citoesqueleto

La capacidad de las células eucariotas para adoptar una gran variedad de formas y realizar movimientos depende del esqueleto celular o citoesqueleto, una compleja red de microfilamentos y microtúbulos que se extienden por todo el citoplasma.

El citoesqueleto es responsable de fenómenos tales como la contracción muscular o los cambios de morfología de las células embrionarias en desarrollo; también proporciona el soporte material para el desplazamiento de los distintos orgánulos citoplasmáticos de un lugar a otro del citosol (716). El hecho de que las bacterias carezcan de citoesqueleto ha llevado a pensar a los investigadores que la presencia de citoesqueleto en las células eucariotas podría haber sido un factor crucial en su evolución (716).

1.1.1. Estructura del citoesqueleto

El citoesqueleto se compone principalmente de tres tipos de filamentos, todos ellos de naturaleza proteica: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Todos son homopolímeros de diferentes proteínas, pudiendo dar lugar a una gran variedad de estructuras de acuerdo con las proteínas a las que estén asociados (716). Los filamentos de actina se encuentran localizados tanto en las células musculares como en células no musculares (cortex celular, etc.) (717,718). Los microtúbulos son los responsables del movimiento ciliar, de la polaridad celular y del movimiento de los orgánulos en el citoplasma (719). Los filamentos intermedios se localizan alrededor de la membrana nuclear (716).

Filamentos de actina

La actina es una proteína globular (actina G) que se ensambla para dar lugar a formaciones filamentosas (actina F). Es la proteína más

abundante en la mayoría de las células eucariotas: constituye más del 5% del total de las proteínas celulares (718).

Los filamentos de actina son especialmente importantes en las células musculares. La contracción es el tipo de movimiento mejor estudiado, en el que intervienen estos filamentos. Este proceso está mediado por un sofisticado aparato intracelular presente en todo su apogeo en las células musculares, pero también de una forma más o menos rudimentaria en casi todas las células eucariotas (720). En esta maquinaria intervienen filamentos de actina, filamentos de miosina sobre los que se deslizan los anteriores y una serie de proteínas asociadas que colaboran en este proceso, estas proteínas son: la tropomiosina y las troponinas C, I y T (720). Dado que las células acinares no poseen una estructura contráctil definida no profundizaremos más en este tema pasando a continuación a describir otras estructuras celulares compuestas por filamentos de actina.

El cortex celular

La actina se encuentra distribuida por todo el citoplasma, sin embargo, en la mayoría de las células animales existe una densa red de filamentos de actina y otras proteínas asociadas localizada inmediatamente bajo la membrana plasmática. Esta estructura recibe el nombre de cortex celular. El cortex celular confiere fuerza mecánica a la superficie de la célula y la capacidad para cambiar su forma o moverse (718).

La forma del cortex celular varía de una célula a otra, o de una región a otra dentro de la misma célula. En unos casos es una red tridimensional de filamentos de actina entrecruzados, en otros casos son finas láminas y en ocasiones forman estructuras hacia el exterior dando lugar a prolongaciones de la superficie celular (718).

Otras estructuras formadas por filamentos de actina

En las células no musculares a menudo se forman, para realizar una función concreta, estructuras contráctiles compuestas por filamentos de actina y miosina que desaparecen cuando la acción se ha llevado a cabo. Este es el caso de los **anillos contráctiles**, unas estructuras especializadas que se forman bajo la membrana plasmática durante la división celular. La tensión que genera este anillo constriñe la célula en división por la línea ecuatorial permitiendo la separación de las dos células hijas (721).

Otro ejemplo de las formaciones contráctiles temporales de actina y miosina son las **fibras de estrés** o **fibras de tensión**. Las fibras de tensión son muy evidentes en los fibroblastos en cultivo. Uno de los extremos de dichas fibras se inserta en unas estructuras especializadas de la membrana plasmática, las placas de adhesión focal, el otro extremo de las fibras de tensión se inserta o bien en los filamentos intermedios que rodean al núcleo o en una segunda placa de adhesión focal (722,723). En las fibras de tensión se encuentran muchas de las proteínas contráctiles presentes en las células musculares, incluyendo la actina y la miosina II, que se organizan de modo similar a como lo hacen en los sarcómeros (723,724). Aunque la organización de las fibras de tensión sugiere una función contráctil en la célula, raramente se produce un acortamiento de estas fibras en células vivas (723,724). Se ha sugerido que las fibras de tensión presentan una contracción isométrica y que esta tensión isométrica generada contribuye a su propio ensamblaje (341,725). Las fibras de tensión se forman en respuesta a la tensión generada en la célula por estímulos externos, transmitida por la adhesión de la célula a la matriz extracelular y desaparecen durante la división celular, momento durante el cual la célula pierde sus adherencias al sustrato que la rodea (722). También se ha comprobado que la ruptura de uno de los anclajes de las fibras de tensión provoca la rápida desintegración de la misma (722). Se cree que las fibras de tensión se contraen para permitir a las células ejercer tensiones sobre la matriz extracelular que la rodea. Este fenómeno es particularmente importante en la morfogénesis y en la motilidad celular (722).

No todas las formaciones contráctiles compuestas por filamentos de actina en las células no musculares son transitorias. Los **cinturones de adhesión**, que existen en la región apical de las células epiteliales y que permiten la fijación de unas células a otras manteniendo un orden, son más duraderos (716,723).

Aproximadamente el 50% de las moléculas de actina están sin polimerizar en la mayoría de las células animales, encontrándose o bien monómeros libres o bien formando complejos con otras proteínas. Existe un equilibrio dinámico entre la reserva de moléculas de actina sin polimerizar y los filamentos de actina. Este equilibrio ayuda a la coordinación de muchos movimientos de la superficie celular y es esencial para la rápida reorganización de los microfilamentos de actina (723).

Microtúbulos

Los microtúbulos son unas formaciones filamentosas constituidas por moléculas de tubulina. Cada molécula de tubulina es un heterodímero

constituido por dos subunidades globulares: α -tubulina y β -tubulina. La tubulina está presente en la célula en menor cantidad que la actina. Estos túbulos son los de mayor diámetro de cuantos constituyen el citoesqueleto. Cuando las dos moléculas de tubulina se ensamblan forman protofilamentos con la subunidad β -tubulina de una molécula de tubulina en contacto con la subunidad α -tubulina de la molécula siguiente. Cada microtúbulo está formado por 13 protofilamentos, alineados en paralelo, que dejan un hueco central aparentemente vacío (719).

Los microtúbulos se encuentran en una disposición radial en la célula, iniciándose en una localización cercana al núcleo y ofreciendo un sistema de fibras que sirven de soporte para el transporte de vesículas y otros orgánulos citoplasmáticos. Además, estas formaciones también pueden favorecer mecanismos que permiten establecer la polaridad celular y participar en la regulación de la forma, el movimiento y el plano de división celular (719). Sin embargo, los microtúbulos fundamentalmente desarrollan sus funciones facilitando el transporte de sustancias de una parte a otra del citoplasma (726). La más clara demostración de este hecho es el papel de los microtúbulos en el transporte axonal en las neuronas. En dichas células se produce un rápido transporte de vesículas en ambas direcciones a lo largo del axón, entre el cuerpo neuronal y la terminación nerviosa (726).

La colchicina, un alcaloide obtenido del *Colchicum autumnale*, es capaz de inhibir la polimerización de los microtúbulos. Cada molécula de colchicina se une débilmente a una molécula de tubulina evitando su polimerización (727). Otras drogas como el taxol tienen el efecto opuesto, es decir, se unen ligeramente a los microtúbulos estabilizándolos y causando la polimerización de las moléculas de tubulina libres (728).

Filamentos intermedios

Son polímeros fibrosos a modo de cuerdas, descritos inicialmente en las células musculares, que se cree tienen un papel estructural muy importante en la célula. Su estructura, a modo de cuerdas trenzadas, presenta típicamente un diámetro entre 8 y 10 nm, intermedio entre el de los filamentos de actina (los más finos) y el de los microtúbulos (de ahí el nombre) (729). En las células animales los filamentos intermedios forman una especie de red o canasta alrededor del núcleo, extendiéndose desde esta localización hacia la periferia celular (716).

Los filamentos intermedios están formados por cuatro tipos de polipéptidos que se clasifican por su secuencia de aminoácidos en cuatro categorías: tipo I a IV (729,730).

Las células pueden regular el número, la longitud y la posición de los filamentos intermedios que contienen, esto indica que las células disponen de mecanismos para controlar el ensamblaje y desensamblaje de esos filamentos. Un factor importante en este control es la fosforilación de residuos específicos en estas proteínas. Por ejemplo, la vimentina, proteína identificada como parte de estos filamentos, existe tanto en estado fosforilado como no fosforilado. Si los filamentos de vimentina son fosforilados por las proteínas cinasas se desensamblan en unidades más pequeñas. Es decir, la fosforilación es un proceso muy importante en el proceso de formación y destrucción de estos filamentos y, por lo tanto, de las redes estructurales que forman (731).

La función de los filamentos intermedios parece ser proporcionar un soporte mecánico a la célula y estructuras subcelulares, especialmente al núcleo. Existen muchos ejemplos que apoyan esta hipótesis. En el caso de las células epiteliales, los filamentos intermedios forman una red transcelular que parece diseñada para resistir fuerzas externas. Los neurofilamentos en los axones de células nerviosas probablemente sean los responsables de conferirles resistencia, que evitaría su rotura por movimientos. Los filamentos formados por desmina proporcionan un soporte mecánico a los sarcómeros. Finalmente, la vimentina rodea, y probablemente también mantiene su conformación, las gruesas gotas de grasa en las células adiposas (716).

Existen unas regiones en los filamentos intermedios, denominadas *regiones variables*, que determinan no solo su asociación con otros filamentos intermedios, sino también con otros componentes celulares tales como microtúbulos o la membrana plasmática. Las proteínas que componen las regiones variables de los filamentos intermedios podrían ejercer una función similar a la de las proteínas accesorias de los filamentos de actina y de los microtúbulos, con la salvedad de que en este caso están unidas de forma covalente a las subunidades estructurales de estos filamentos intermedios, en lugar de ser una proteína accesoria independiente (716).

1.1.2. El citoesqueleto de los acinos pancreáticos

El citoesqueleto de las células acinares pancreáticas está compuesto por las tres clases de filamentos descritos con anterioridad: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Mayoritariamente los tres tipos de filamentos se localizan próximos al

complejo de Golgi y en la región apical de la célula (732). Los *filamentos de actina* constituyen una red que se sitúa inmediatamente debajo de la membrana plasmática, ocupando en la célula en reposo toda la zona apical, de forma que esta red impide el contacto de orgánulos con la membrana (732). Los filamentos de actina también forman estructuras paralelas que se extienden desde los microvilli hacia el interior, rodeando en ocasiones los gránulos de zimógeno (732). Los *filamentos intermedios*, aunque están dispersos por el citoplasma en estas células, se concentran en las inmediaciones de los desmosomas (732). Los *microtúbulos* forman una estructura a modo de cesta en el polo basal de la células acinares pancreáticas (732).

Cuando la célula acinar es estimulada para secretar, la red apical de microfilamentos que se localiza bajo la membrana sufre una clara reducción, permitiendo a los gránulos de zimógeno aproximarse hacia la membrana (733). Sin embargo, cuando la célula se estimula con concentraciones supramáximas de algunos secretagogos, como la CCK o el carbacol, los microvilli y la red apical de filamentos de actina desaparecen (733). Bajo estas condiciones, algunas estructuras que normalmente no se localizan en la zona apical, como el retículo endoplásmico o los lisosomas, pueden desplazarse hasta esta región subcelular. Estos cambios en el citoesqueleto de la región apical pueden estar relacionados con la inhibición de la secreción observada al estimular la célula con concentraciones supramáximas de CCK o carbacol (733). Por otro lado, parece necesario un citoesqueleto intacto en la región apical para mantener la polaridad celular y permitir un proceso de exocitosis normal (732).

1.1.3. Funciones básicas del citoesqueleto

En el citoplasma existe una espesa red de filamentos integrada por los tres tipos descritos en el apartado anterior (716,734,735). Estos filamentos se encuentran relacionados entre sí y con una serie de proteínas accesorias, que participan coordinando la labor del citoesqueleto. Toda esta maraña de filamentos, no constituye, por lo tanto, un elemento inerte en la célula sino que está complejamente organizada para llevar a cabo una función regulada: mediar cambios de la morfología celular, producir diferentes movimientos, tanto celulares como de los orgánulos citoplasmáticos, proporcionar resistencia mecánica, etc. (735,736).

Aunque la función principal de las células acinares pancreáticas no es la de migrar por el organismo, como es el caso de las células defensivas o de las células pluripotenciales, como los fibroblastos, debemos detenemos en primer lugar sobre este aspecto para tener una visión global del citoesqueleto en la fisiología celular.

El citoesqueleto es responsable de la *migración celular*, pero para que la célula efectúe el desplazamiento el proceso requiere una cierta polaridad; es decir, el desplazamiento se produce en una única dirección (737). Así, la membrana celular se encuentra inalterada en toda su superficie excepto en aquel borde que indica la dirección de migración, por donde se proyectarán prolongaciones centrífugas que marcan el movimiento (737). Cuando la célula migra los microtúbulos y los microfilamentos de actina trabajan conjuntamente, por lo que es difícil discernir las funciones individuales de cada uno de ellos (738).

Además de su papel en la migración celular, los microtúbulos juegan un papel crucial en el *control de la forma celular*. En general, los tipos celulares de eucariotas tienen morfologías muy distintas, en unos casos debido a sus características externas (presencia de cilios, etc.) y en otros casos por la posición de sus orgánulos celulares (716).

El citoesqueleto de una célula puede influir en sus células vecinas, mediante un proceso de comunicación intercelular que se cree juega un papel primordial en la determinación de la morfología de los diferentes órganos y tejidos de los animales (716). Uno de los mecanismos por los que el citoesqueleto de una célula puede influir en sus células vecinas depende de la relación entre el citoesqueleto de una célula y la matriz extracelular que ésta secreta. Una célula que tiene orientado su citoesqueleto, tiende a secretar una matriz extracelular igualmente orientada, y esta puede influir en la orientación del citoesqueleto de aquellas células que estén en contacto con ella (716). Sea cual sea el mecanismo por el que lo logran (relaciones celulares directas, o indirectas a través de la ECM), parece fundamental que las células que forman un tejido deben organizar sus estructuras de soporte coordinadamente para establecer el patrón de organización de todo ese tejido (716).

También está perfectamente establecido el papel central del citoesqueleto en el *desarrollo* del organismo animal, y dentro del mismo, en la *génesis de la morfología* (o morfogénesis) de los diferentes tejidos (304,716,735). La correcta morfología y disposición de las células en los tejidos, en el ámbito individual y colectivo, depende de las estructuras del citoesqueleto. A menudo los microtúbulos son los responsables de guiar los movimientos morfogenéticos, y en otros casos esta función depende de los filamentos de actina (304,716,735).

Finalmente, otra de las funciones importantes del citoesqueleto es la *participación en los procesos secretores*, que en los acinos pancreáticos adquiere una especial relevancia. Uno de los fenómenos que preceden a la exocitosis es el transporte de gránulos de secreción hacia la membrana, proceso en el que interviene el citoesqueleto (732,739). También es necesaria una alteración del cortex celular en aquella zona donde se produce la exocitosis (732,739).

Estudios realizados en células acinares pancreáticas han demostrado que la activación del receptor de la CCK_A con concentraciones supramáximas de ceruleína, un análogo de la CCK-8, provocan una desorganización progresiva de los microtúbulos y microfilamentos de actina, fenómeno que podría explicar la inhibición de la secreción de amilasas producida por CCK-8 a concentraciones supramáximas (733,740).

Así, se ha demostrado que existe una estrecha relación entre las alteraciones morfológicas del citoesqueleto de la región apical de la célula y el efecto inhibitorio que en la secreción tienen concentraciones supramáximas (mayores de 0,1 nM) de determinados secretagogos, como la CCK y su análogo, la ceruleína (733,741). Burnham y cols. (131), estudiando el efecto de la citocalasina B en la inhibición de la secreción inducida por la CCK-8 a esas concentraciones supramáximas, sugirieron que el efecto inhibitorio de la secreción se debía a una alteración de la homeostasis del calcio y a una alteración en la contracción de los microfilamentos de actina (6).

Muallen y cols. (742) han sugerido que los filamentos de actina de la región apical de las células acinares pancreáticas actúan como bloqueantes de la exocitosis; sin embargo, para que se lleve a cabo un proceso normal de exocitosis es necesaria una mínima estructuración del citoesqueleto de la región apical, ya que la despolimerización de los filamentos de actina con faloidina inhibe dicha exocitosis. Sin embargo, Rosado y cols. (701) han descrito recientemente que la desorganización de los filamentos de actina utilizando citocalasina D, no afecta ni a la potencia ni a la eficacia de la respuesta secretora inducida por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata.

No está muy claro si la participación del citoesqueleto en los procesos de exocitosis y de almacenamiento de los gránulos de secreción es un proceso activo, en el que intervengan interacciones actina-miosina para generar la fuerza que conduzca estos gránulos hacia la membrana plasmática. Alternativamente, las proteínas del citoesqueleto podrían participar de una forma pasiva, actuando como simples guías que permitan la aproximación de los gránulos al polo apical de la célula durante la secreción (739).

Así pues, se extraen dos conclusiones de estos hallazgos; en primer lugar es necesario un citoesqueleto intacto para mantener la polaridad celular y permitir el proceso de exocitosis y en segundo lugar los cambios en el citoesqueleto de la región apical pueden estar relacionados con la inhibición de la secreción pancreática observada tras la estimulación con concentraciones supramáximas de CCK y carbacol.

1.2. Las placas de adhesión focal

Las adhesiones focales, también conocidas como contactos focales o placas de adhesión focal, son unas regiones especializadas de la célula, donde se establece una estrecha relación entre la membrana celular y la matriz extracelular. La matriz extracelular (ECM) está compuesta por proteínas tales como el colágeno, la fibronectina, las lamininas y la vitronectina (304,341,734,743). Aunque las placas de adhesión “clásicas” sólo se encuentran en células en cultivo, aparentemente las adhesiones focales *in vivo* son homólogas y pueden ser consideradas morfológica y funcionalmente análogas (743).

La organización estructural de las placas de adhesión focal es muy compleja. Durante las últimas décadas se han descubierto nuevos miembros de la sección citoplasmática de las adhesiones focales y se han estudiado sus interacciones físicas. Al integrar todos estos estudios se han propuesto varios modelos que describen las relaciones moleculares que permiten anclar el citoesqueleto de actina en la membrana plasmática a nivel de las adhesiones focales, pero ninguno de ellos da una explicación global a todas las interacciones y relaciones moleculares que se han ido describiendo por los diferentes investigadores (743). Actualmente se piensa que existen múltiples mecanismos o variantes para conectar el citoesqueleto de actina con las integrinas (735,743).

Entre los elementos que constituyen las placas de adhesión focal se encuentran los siguientes (*Gráfico III-1*):

- Las ***integrinas***. Son unos receptores transmembranales heterodiméricos constituidos por subunidades α y β , que actúan como nexo de unión entre la matriz externa y el citoesqueleto de actina. Las integrinas presentan un dominio extracelular, por el que se unen los ligandos de la ECM, un dominio transmembrana simple y unos cortos dominios citoplasmáticos que interaccionan con estructuras del citoesqueleto (744). Las integrinas transmiten señales de la ECM al interior celular a través del citoesqueleto (304,603,734,735,744-746).

- La **actina**. Componente estructural de los microfilamentos de actina que ya han sido descritos en el anterior apartado (723,735).

- La **α -actinina**. Es un homodímero cuya función es proporcionar cohesión entre los filamentos de actina. También se une al dominio citoplasmático de la subunidad β de las integrinas, a la vinculina, a Crk y a la PI3-K (341,603,746). La unión de la α -actinina a las integrinas presenta baja afinidad *in vitro* y ha sido difícil demostrar que estas interacciones ocurren *in vivo* (743).

- La **talina**. Es el principal componente estructural de las adhesiones focales y también la primera proteína del citoesqueleto para la que se demostró una interacción directa con el dominio citoplasmático de las integrinas (747). Esta proteína establece relaciones, por lo tanto, con el dominio citoplasmático de las integrinas y también con la vinculina (317,744,748,749). Entre los componentes enzimáticos que puede unir están la p125^{FAK}, la paxilina y la Csk (304,743). También se sospecha que estas proteínas se unen directamente a los filamentos de actina, actuando como intermediarios de un enlace semidirecto entre la actina y las integrinas (743). La unión de la talina con el dominio citoplasmático de las integrinas, como en el caso anterior presenta baja afinidad (743).

- La **vinculina**. Es una de las proteínas más abundantes de las adhesiones focales. Interactúa con la talina y la α -actinina; y también se ha descubierto un lugar de unión crítico con la actina, que permite una interacción directa cuando la conformación es favorable (743). Además se relaciona con la tensina y la paxilina (603,743). La vinculina tiene un papel crítico en el ensamblaje de las adhesiones focales (743).

- La **tensina**. Es una proteína que contiene un dominio SH2 (750), que dirige interacciones proteína-proteína, promoviendo uniones estables entre proteínas del citoesqueleto cuyas secuencias peptídicas contienen fosfotirosinas (43,45). La tensina se une a la vinculina y a los filamentos de actina (603).

- La **zixina** (no se representa en el gráfico). Una proteína que se une a la α -actinina y a una proteína denominada proteína rica en cisteína o **cCRP**. Ambas proteínas, zixina y cCRP, poseen dominios LIM que favorecen la interacción proteína-proteína (317,751).

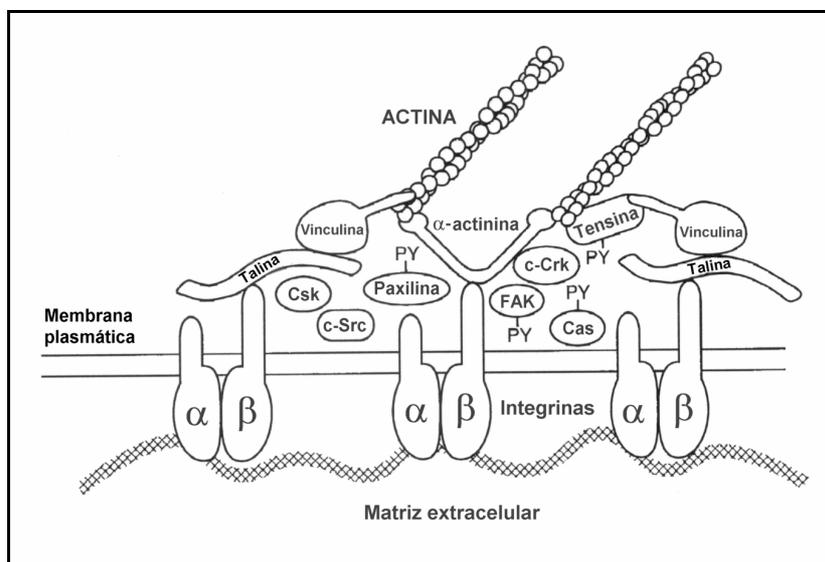


Gráfico III-1. Modelo esquemático con la disposición y las conexiones de los principales componentes en las placas de adhesión focal. La figura está simplificada y solamente se recogen las proteínas más importantes de las adhesiones focales. No se representa un hipotético enlace directo entre la talina y la actina. Además, la conexión entre la vinculina y la actina puede ser directa o estar mediada por la tensina o la α -actinina. Véase explicación en el texto. PY: fosfotirosina. Adaptado de (743).

Cuando un componente de la matriz extracelular se une a las integrinas el primer fenómeno que se observa es la fosforilación de distintas proteínas en restos de tirosina. De igual modo, algunas serina/treonina cinasas, tales como la proteína cinasa C (752) o las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) (749,753), también son estimuladas por este mismo fenómeno, incluso se ha observado un incremento en la concentración de calcio intracelular (754,755). Es importante resaltar el papel primordial que la fosforilación de proteínas en restos de tirosina juega en la formación y organización de las placas de adhesión focal, según ha sido demostrado por numerosos autores (279,281,316,318,347,363,603,756).

Se ha identificado un gran número de proteínas sin función estructural (o no exclusivamente estructural) que están relacionadas con las placas de adhesión focal, y que además son activadas por la unión de las integrinas con ligandos de la matriz extracelular (316,341,344,603). Entre estas destacamos las siguientes:

- **Tirosinas cinasas de adhesión focal.** Las tirosinas cinasas de adhesión focal p125^{FAK} (o FAK) y PYK2/CAK β , y sus sustratos paxilina

y p130^{CAS} juegan un papel central en la transducción intracelular de las señales derivadas de la activación de las integrinas, participando en la reorganización de las placas de adhesión focal. La unión de las integrinas a sus ligandos provoca la fosforilación de la PYK2/CAK β y de la p125^{FAK} en restos de tirosina (253,281,304,312,316,363,367,603,756,757).

- **Proteínas de la familia Src.** Estas tirosinas cinasas se asocian con los complejos proteicos de las placas de adhesión focal, principalmente con FAK y paxilina, mediante sus dominios SH2 y SH3. Como se describió en el capítulo I, estas proteínas participan en la regulación de la actividad de las anteriores (241,266,304,602).

- **Csk:** Es una tirosina cinasa que presenta un dominio SH2 y cuya función es supresora de la actividad cinasa de las proteínas de la familia Src. Está asociada con FAK y paxilina (241,266,304,602).

- **Proteína cinasa C:** Es una serina/treonina cinasa que se describirá con mayor profundidad en el capítulo IV. Se ha observado su localización en las placas de adhesión y puede intervenir activamente en la organización de las adhesiones focales (471,476,752).

- **MAP cinasas.** Son serina/treonina cinasas que, cuando son activadas, se fosforilan tanto en residuos de tirosina como de treonina. Su activación y participación en mecanismos intracelulares fueron descritas en el capítulo I (603,749,753).

- **Crk.** Pertenece a la familia de *proteínas adaptadoras SH2/SH3*. Como ya se ha descrito, la función de esta familia de proteínas, que carecen de dominio catalítico, es favorecer la interacción proteína-proteína actuando como intermediarios o interfases en distintas funciones biológicas. Una posible función de Crk es la de favorecer la interacción entre la paxilina, fosforilada en restos de tirosina, y C3G, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina de Ras (Ras-GEF), a través de sus dominios SH2 y SH3. Estas interacciones, que generalmente están reguladas por Src y Csk, podrían conducir a la activación de las GTPasas de la familia Ras y las vías MAP cinasa (Paxilina^(PY) \rightarrow Crk/C3G \rightarrow Ras \rightarrow MAPK) (304,398,603,758).

- **Grb2.** Es otra proteína perteneciente a la familia de las proteínas adaptadoras SH2/SH3. Puede asociarse con FAK o con PYK2/CAK β mediante su dominio SH2 (en residuos distintos de aquellos donde se une c-Src a ambas cinasas) y al Ras-GEF mSOS1, por el dominio SH3. Como en el caso anterior, estas tres proteínas podrían regular la activación de las proteínas de la familia Ras (FAK^(PY) o PYK2/CAK β ^(PY) \rightarrow Grb2/SOS \rightarrow Ras \rightarrow MAPK) (283,304,603).

- **Shc**. La interacción de Grb2 con PYK2/CAK β y FAK puede estar intermediada por esta otra proteína adaptadora. Se ha demostrado que Shc se une con residuos de fosfotirosina en PYK2/CAK β y FAK mediante su dominio PTB; Shc puede ser fosforilada por estas tirosinas cinasas, creando residuos de fosfotirosina reconocidos por el dominio SH2 de Grb2/mSOS1 (FAK^(PY) o PYK2/CAK β ^(PY) \rightarrow Shc^(PY) \rightarrow Grb2/SOS \rightarrow Ras \rightarrow MAPK) (304,625,759).

- **Ras GEFs**. Se han localizado factores intercambiadores de nucleótidos de Ras en las adhesiones focales, hallazgo que es absolutamente lógico, teniendo en cuenta los comentarios sobre las 3 últimas proteínas. Ya se ha comentado en anteriores apartados que la función de los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de Ras (Ras-GEFs) consiste en favorecer el paso de la conformación inactiva Ras•GDP a Ras•GTP activa. Se han localizado los Ras-GEFs mSOS1 y C3G asociados a Grb2, Crk y Nck en las adhesiones focales (283,304,398,603,625,758,759).

- **GAPs**. Como se ha indicado en el capítulo I, las proteínas estimuladoras de la actividad GTPasa catalizan la hidrólisis del GTP unido en las formas activas de las proteínas G monoméricas (son inactivadoras de su función, por lo tanto). Cuando las integrinas son activadas, los GAPs de Ras (p120^{Ras-GAP}) y de Rho (p190^{Rho-GAP}) se asocian con elementos de las adhesiones focales (como Src, PYK2/CAK β o FAK) y se activan (23,241,437).

- **Proteínas G monoméricas**. Se han encontrado GTPasas de las familias Ras y Rho en las placas de adhesión, asociadas a la membrana. La familia de GTPasas de pequeño peso molecular Rho está íntimamente relacionada con la reorganización del citoesqueleto y la formación de fibras de tensión (256,433,435,437,744,760).

- **Fosfatidilinositol 3-cinasa**. También se ha indicado que la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-K) está presente en las adhesiones focales. Cuando se produce la activación de las integrinas se asocia con FAK (347), con las proteínas de la familia Src (241) y con las proteínas del citoesqueleto. Además, es activada *in vitro* por Rho (23,603,761).

- **Fosfolipasa C**. La isoforma γ puede localizar en las adhesiones focales y es fosforilada en restos de tirosina tras la activación de las integrinas (603,762).

Además, en las placas de adhesión se han localizado otras cinasas o lípidos relacionados con las rutas intracelulares activadas por las integrinas, como la PtdIns(4)P 5-cinasa, la PLA₂, el ácido araquidónico (AA) o la 5-lipooxigenasa (71,341,363,763).

1.3. Regulación de la formación de las placas de adhesión focal y las fibras de tensión de actina

Las placas de adhesión focal y el citoesqueleto se encuentran íntimamente relacionados ya que muchos de los elementos que los componen son compartidos, como la paxilina, la talina o la actina y, al mismo tiempo, las placas focales reorganizan la formación de fibras de tensión de actina. Por esta razón, parece lógico abordar conjuntamente la regulación de la organización de las placas de adhesión y la formación de fibras de tensión o de estrés.

Las observaciones llevadas a cabo por muchos autores indican que incrementos en la fosforilación en residuos de tirosina de proteínas asociadas a las placas de adhesión focal, en respuesta a la activación de las integrinas, se acompaña con la formación de placas de adhesión y la reorganización del citoesqueleto, fenómeno que se ha observado en la mayoría de los modelos celulares donde se ha estudiado (347). Además, los inhibidores de las tirosinas fosfatasa permiten mejorar la formación de contactos focales y el tratamiento con inhibidores farmacológicos de tirosinas cinasas previene su formación (341). La tirosina cinasa FAK, en virtud de su localización en las placas de adhesión y considerando las evidencias apuntadas anteriormente, representó el primer candidato propuesto para regular la constitución de las placas de adhesión y la formación de fibras de tensión de actina en fibroblastos (344,362,764). Sin embargo, se han encontrado algunas evidencias en otros tipos celulares que indican lo contrario. Por ejemplo, en células musculares de aorta de ratón se ha observado que la FAK no participa en el ensamblaje de las fibras de tensión en las placas de adhesión (765). Defilippi y cols., en un primer trabajo con fosfatasa, implicaron a FAK y a su fosforilación en tirosina en la organización de placas de adhesión y en el desarrollo de las fibras de estrés (766), pero en un estudio posterior estos autores concluyen lo contrario, demostrando que la activación de FAK no provoca *per se* la constitución de las placas de adhesión, sino que es un proceso dependiente de Rho y de la PKC (471). Lyman y cols. (767) han obtenido resultados similares. Finalmente, Ilic y cols. (768) han demostrado que los fibroblastos aislados y cultivados a partir de un ratón FAK⁻ son perfectamente capaces de establecer los contactos focales.

Por lo tanto, parece que no es necesaria la participación de FAK en la formación de las placas de adhesión focal y las fibras de tensión (aunque se ha establecido claramente su participación en los procesos de

reordenamiento dinámico y señalización posteriores a su formación), sin embargo, si parece necesaria la activación de Rho (23,435,471,476,767).

En el modelo que describe el ensamblaje de las adhesiones focales propuesto por Burridge y cols. (341), las integrinas unidas al ligando extracelular, en células no estimuladas, se encuentran asociadas físicamente con los filamentos de actina a través de proteínas intermediarias como la talina o la α -actinina. Las integrinas en este momento no están agrupadas, y los filamentos de actina asociados con ellas no están sometidos a tensión, o a muy poca, debido a que la miosina se encuentra en conformación inactiva (341). Cuando las células en cultivo son estimuladas (por ejemplo con LPA), se activa Rho y esto induce la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) y su activación. Como resultado se produce el ensamblaje de los filamentos de miosina que genera fuerzas capaces de alinear los filamentos de actina (341). La tensión generada en los filamentos será transmitida hacia las integrinas de la membrana que, como ya se ha indicado, están asociadas con los filamentos de actina, resultando finalmente en su agregación (341).

Desde su descubrimiento se pensó que las proteínas de la familia Rho estaban implicadas en procesos que conducen a la reorganización del citoesqueleto, así se ha descrito que Rho dirige la formación de fibras de tensión, Cdc42 controla la filipodia y Rac regula la lamelipodia (435,465). Además las GTPAsas de esta familia también están implicadas en la regulación de otras modificaciones del citoesqueleto, como la formación de adhesiones celulares en células epiteliales polarizadas y el crecimiento axonal (435).

Aunque no se conoce el mecanismo molecular último, se ha demostrado que la participación de Rho a dos niveles es imprescindible para la formación de las placas de adhesión y las fibras de estrés: agregación de integrinas y polimerización de actina (435). Se ha propuesto que la proteína cinasa asociada a Rho (ROK), que es activada por la GTPasa, participa en la regulación de este proceso puesto que esta cinasa fosforila la MLC en la subunidad de unión de la miosina (470,769,770). Por otra parte, la activación de las GTPAsas de la familia Rho se acompaña de un aumento en los niveles de PtdIns(4,5)P₂, hecho que favorece la unión de vinculina y α -actinina, y permite, además, la polimerización de actina porque se provoca su disociación de las proteínas bloqueantes profilina y la gelsolina (435,470). Estas dos proteínas monoméricas se encuentran unidas con el extremo del filamento de actina impidiendo su polimerización, y serían retiradas en un mecanismo dependiente de Rac, vía activación de la síntesis de PtdIns(4,5)P₂ (771). Cdc42 y Rho también estimulan la producción de inosítoles polifosfato y

podrían controlar la extensión de los filamentos de actina por un mecanismo similar al utilizado por Rac (435,470).

La agregación de integrinas es el proceso limitante para el ensamblaje de las adhesiones focales, si se inhibe su agrupamiento (*clustering*) dicho ensamblaje no se produce, según han demostrado diversos autores (316,341,743). En una aproximación opuesta se obtienen más evidencias que apoyan esta teoría. Así, se ha comprobado que si el ensamblaje se induce mecánicamente desde el otro lado de la membrana (por ejemplo, utilizando anticuerpos unidos a un soporte) se detecta la colocalización intracelular de la mayor parte de moléculas que constituyen las adhesiones focales (743).

El ensamblaje de las moléculas estructurales del citoesqueleto que forman parte de las adhesiones focales, se acompaña de la incorporación o reclutamiento del resto de moléculas de señalización o no estructurales (por ejemplo las tirosinas cinasas) que conformarán finalmente la placa de adhesión (316,743). Estudios realizados por Dash y cols. (772) en plaquetas, han demostrado que la asociación con el citoesqueleto de FAK y otras proteínas, como p60^{src} o las GTPasas Cdc42 y Rap1, es un proceso reversible que está directamente regulado por la concentración de calcio intracelular.

La defosforilación de proteínas también participa en la organización del citoesqueleto. Así, la fosfatasa microcistina-LR produce una desorganización de los filamentos intermedios y de la red de filamentos de actina en hepatocitos. Estos estudios apuntan a que las interacciones entre los filamentos intermedios, los microfilamentos de actina y otros componentes celulares dependen del equilibrio fosforilación/defosforilación de proteínas intracelulares (594).

1.4. Tirosinas cinasas de adhesión focal: FAK y PYK2/CAK β

Ya se ha descrito en el capítulo I de esta Tesis Doctoral que la familia de tirosinas cinasas de adhesión focal está compuesta por dos miembros. El primero de ellos fue aislado en 1990 por Kenner y cols. (342) como una proteína de 125 kDa cuya fosforilación en tirosina se encontraba aumentada en embriones de pollo transformados por v-Src. Fue denominada tirosina cinasa de adhesión focal (inicialmente FadK,

luego FAK o p125^{FAK}) atendiendo a su localización (362). Esta tirosina cinasa está muy conservada en diferentes especies (316,347,363).

El segundo miembro de la familia FAK de tirosinas cinasas fue identificado a partir de ADNc de rata por Sasaki y cols. (364) como una proteína de 112 kDa estructuralmente relacionada con FAK. Esta proteína se denominó inicialmente cinasa β de adhesión celular (CAK β), por su homología con la p125^{FAK}, y posteriormente recibió varios nombres: PYK2 (260), RAFTK (365), CADTK (366), y, menos habitualmente, FAK2.

Las tirosinas cinasas de la familia FAK son un importante componente de las vías de señalización activadas por las integrinas (17,304,316); además, se ha demostrado repetidamente su activación por diferentes tipos de receptores acoplados a proteínas G (304,316,363,369), oncogenes (279,311,346,773,774) y receptores con actividad tirosina cinasa (10,384,757,775,776).

1.4.1. Distribución y características estructurales de FAK y PYK2/CAK β

PYK2/CAK β (112 kDa) es ligeramente más pequeña que FAK (119 kDa) y ambas presentan una homología de aproximadamente el 45 % en su secuencia de aminoácidos, siendo más alta (60 %) en el dominio tirosina cinasa central y las regiones que se encuentran alrededor de los residuos fosforilados, y menor en el extremo N-terminal (*Gráfico III-2*) (304,367).

FAK se expresa en la mayoría de los tejidos y líneas celulares examinados hasta la fecha (777). En algunos de ellos el extremo carboxilo terminal se expresa autónoma e independientemente como una proteína de aproximadamente 41 kDa denominada proteína no cinasa relacionada con FAK (FRNK o p41^{FRNK}, se corresponde con los residuos 691–1053 de FAK) (778). Por el contrario, PYK2/CAK β , que muestra una difusión más restringida, se expresa mayoritariamente en células del sistema nervioso central y en líneas celulares de origen hematopoyético (253,365,779). En otros tejidos su expresión no es tan elevada como en los anteriores (779); hasta el momento no se ha descrito la presencia de PYK2/CAK β en los acinos pancreáticos. También se ha detectado la expresión autónoma del dominio C-terminal de PYK2/CAK β en células embrionarias de pollo (secuencias relacionadas con FRNK) (367).

PYK2/CAK β y FAK se localizan de forma diferente en las células que las coexpresan: la última se detecta fundamentalmente en las placas de adhesión focal, mientras que PYK2/CAK β se encuentra mayoritariamente difusa por el citoplasma, en los lugares de contacto célula-célula y en situación perinuclear; una pequeña cantidad colocaliza en las adhesiones focales con FAK (304,367)

Las PTKs de la familia FAK presentan unas características estructurales diferentes de las otras tirosinas cinasas conocidas (*Gráfico III-2*). El hecho más notable observado al estudiar su estructura es la ausencia de dominios SH2 y SH3, que sí están presentes en las cinasas de la familia Src y en otras muchas tirosinas cinasas no receptor (43,45). La carencia de dominios SH2 y SH3 en esta familia sugiere que esta proteína podría jugar un papel en la fisiología celular diferente al caracterizado previamente para otras tirosinas cinasas no receptor; sin embargo, es probable que los dominios no catalíticos de las FAK participen dirigiendo las interacciones proteína-proteína que regulan y controlan sus funciones de modo análogo a las proteínas que contienen dominio con homología Src (304,363).

PYK2/CAK β y FAK (*Gráfico III-2*) presentan un **dominio catalítico central** similar al de otras tirosinas cinasas, flanqueado por dos grandes dominios amino y carboxilo terminales. Del **extremo amino terminal**, no catalítico, dependen varias interacciones moleculares, como la unión con la proteína adaptadora Shc, con la subunidad p85 de la PI3-K o con c-Src. El **extremo carboxilo terminal** es el responsable de su localización en las placas de adhesión focal (304,363).

En la región N-terminal se localizan las secuencias requeridas para una hipotética asociación directa de FAK con el dominio citoplasmático de las integrinas, aunque no se han identificado los residuos implicados (304,363). Estas interacciones se han demostrado utilizando péptidos sintéticos que mimetizan los dominios citoplasmáticos β_1 , β_2 y β_3 de las integrinas, péptidos que son capaces de unirse a FAK en células embrionarias lisadas de pollo (363). La unión directa de FAK a las integrinas y la fosforilación en restos de tirosina de FAK dependiente de la adhesión celular sugieren que las integrinas podrían regular directamente la actividad tirosina cinasa de FAK (700). Esta capacidad de unión directa con las integrinas no ha sido establecida en PYK2/CAK β .

Del extremo C-terminal de ambas cinasas depende un buen número de interacciones moleculares relacionadas con su localización en las placas de adhesión focal de las células, así como con la unión con varias proteínas sustrato como la paxilina o la p130^{CAS} (304). En la región C-terminal de FAK se localiza una secuencia denominada *focal adhesion*

targeting o FAT (Gráfico III-2), de unos 160 aminoácidos, que es necesaria para la localización correcta de FAK en las placas de adhesión focal (304,363); este fragmento puede funcionar como un ente autónomo capaz de localizar proteínas de fusión en esos contactos focales (304,780). Dentro de esta región FAT de la cinasa FAK se localizan las secuencias de unión para la paxilina y la talina.

La paxilina, que se describirá más adelante con detalle, es una proteína adaptadora asociada con el citoesqueleto, que se encuentra estrechamente relacionada con los componentes de la familia FAK en las placas de adhesión. La interacción entre la paxilina y FAK parece ser directa, dado que ambas pueden coimmunoprecipitar usando anticuerpos específicos anti-FAK o anti-paxilina, lo cual indica que estas proteínas se encuentran establemente relacionadas *in vivo* (780). Experimentos desarrollados *in vitro* utilizando diferentes péptidos de FAK para determinar la secuencia de aminoácidos que median las interacciones de la región FAT, indican que existen dos lugares de unión con la paxilina (PBS1 y PBS2) y uno con la talina (304,780,781). Aunque se ha postulado que la paxilina incorpora a FAK a las adhesiones focales (781), otros autores han demostrado una localización de FAK en esas estructuras en ausencia de paxilina (780).

A pesar de que PYK2/CAK β no tiene un dominio FAT completo, conserva las secuencias de unión con la paxilina en su extremo carboxilo (Gráfico III-2) y se ha demostrado la asociación de ambas en lisados procedentes de gran variedad de tipos celulares (304,782). Aunque se ha establecido fehacientemente la asociación de paxilina y PYK2/CAK β , los estudios inmunológicos desarrollados con PYK2/CAK β endógena (757) o recombinante (367) solamente demuestran una débil asociación de esta cinasa con los contactos focales, mientras que la paxilina aparece localizada mayoritariamente en esas estructuras. Los hallazgos descritos adquieren más relevancia cuando se contrastan con los datos recogidos por otros autores que describen: (a) una localización mayoritaria en las adhesiones focales del extremo C-terminal de PYK2/CAK β autónomo cuando se expresa exógenamente en embriones de pollo (secuencias relacionadas con FRNK) (367); y (b) la proteína de fusión PYK2/CAK β , construida intercambiando el extremo C-terminal de la proteína nativa por el de FAK, presenta una localización estable en las adhesiones focales (757). Globalmente estos resultados sugieren que los dominios C-terminales de PYK2/CAK β y de FAK no son equivalentes en su capacidad para establecer una asociación estable con las proteínas de las adhesiones focales (304). La región de unión con la paxilina de PYK2/CAK β puede ser suficiente para promover su localización autónoma en los contactos focales, pero, en el contexto de la proteína

completa, las interacciones adicionales que establecen otras zonas de la cadena pueden superar a las que permiten mantenerla anclada en este lugar, limitando de esta forma la cantidad de PYK2/CAK β presente en los contactos focales (304,367,757).

Se ha observado la activación de las tirosinas cinasas de la familia FAK en respuesta a tres tipos estímulos de muy diferente naturaleza: (a) estimulación celular con neuropéptidos, lípidos activos y factores de crecimiento (13,17,260,264,283,369,385,604,622,759,783,784); (b) adhesión celular a moléculas de la matriz extracelular vía integrinas (253,254,471,749,757,774,781,785); y (c) activación de las proteínas FAK en células transformadas por tirosinas cinasas Src, producto de expresión de oncogenes (279,311,346,773,774). Estos datos sugieren que las cinasas de la familia FAK podrían representar un punto de convergencia entre los mecanismos de acoplamiento estímulo-respuesta de los receptores acoplados a las proteínas G de membrana, de los factores de crecimiento, de las integrinas y de los oncogenes (785).

En células transformadas por el virus del sarcoma de Rous (RSV) la fosforilación de FAK en restos de tirosina se ve incrementada varias veces sobre el valor encontrado en células normales (342). Esta observación apoya la hipótesis que considera a FAK como el sustrato original de c-Src (342). En las células transformadas la mayoría de FAK (>80 %) se encuentra establemente unida a v-Src (279). Los primeros estudios realizados *in vitro* sobre la formación del complejo FAK-v-Src indicaron que para su formación eran necesarios el dominio SH2 de Src y un residuo de fosfotirosina de FAK, que además se establecía por autofosforilación (279,304).

El análisis de la activación de PYK2/CAK β y FAK por cualquiera de los tres procesos descritos demuestra que es un mecanismo complejo dependiente de fosforilaciones e interacciones moleculares SH2/SH3. En la tirosina cinasa FAK se han demostrado al menos 6 lugares de fosforilación *in vivo* (*Gráfico III-2*) (304): dos residuos en la región C-terminal (Tyr 925 y Tyr 861), dos más en el *asa de activación* del dominio cinasa (Tyr 577 y Tyr 576) y, por último, dos en el extremo amino terminal (Tyr 407 y Tyr 397) (304). El residuo Tyr 397 es el principal lugar de autofosforilación de FAK, y la secuencia que rodea este residuo fosforilado ha demostrado unirse específicamente con el dominio SH2 de PTKs de la familia Src, el resto de lugares de fosforilación pueden ser lugares transfosforilados por esas tirosinas cinasas *in vivo* (304).

Cuatro de los seis residuos de tirosina fosforilables en FAK (Tyr 397, 576, 577 y 925) están conservados en PYK2/CAK β presentando

residuos equivalentes (Tyr 402, 579, 580 y 881) en su secuencia (*Gráfico III-2*) (304).

Como ya se ha indicado, tras la activación de FAK o PYK2/CAK β , por cualquiera de los mecanismos mencionados, estas cinasas se autofosforilan, habiéndose demostrado que los residuos equivalentes Tyr 397 y Tyr 402 son, respectivamente, los principales lugares de autofosforilación (304,363). Estos residuos se localizan en el extremo N-terminal, muy próximos al dominio catalítico y al lugar de unión del ATP (*Gráfico III-2*), cuando se encuentran fosforilados se constituyen secuencias específicas de unión para dominios SH2 de PTKs de la familia Src (304,311,363). La sustitución de la Tyr 397 o Tyr 402 por fenilalanina bloquea eficazmente las interacciones entre PYK2/CAK β y FAK con c-Src, tanto *in vivo* como *in vitro*. Además de las PTKs Src, en los residuos Tyr 402 de PYK2/CAK β y Tyr 397 de FAK también se ha demostrado la unión del complejo Shc/Grb2/mSOS1 y de la subunidad reguladora p85 de la PI3-K (304,749,763,786).

Cuando se establece la unión de las tirosinas cinasas Src en los lugares de autofosforilación homólogos de PYK2/CAK β y FAK, las primeras fosforilan en diversas localizaciones a las cinasas focales, con varios efectos: crean nuevos lugares de interacción para dominios SH2 y permiten la completa actividad cinasa de las proteínas FAK (304,311). Este último efecto se produce por fosforilaciones efectuadas en los residuos homólogos altamente conservados del *asa de activación* (subdominio VIII) del dominio catalítico en PYK2/CAK β (Tyr 579 y 580) y FAK (Tyr 576 y 577) (*Gráfico III-2*). Como en casi todas las tirosinas cinasas, la fosforilación de estos residuos se acompaña de un incremento en la actividad tirosina cinasa (304,311).

El residuo Tyr 407 de FAK también es fosforilado por las tirosinas cinasas Src, pudiendo constituir un lugar de reconocimiento de dominios SH2, aunque aún no se han demostrado interacciones a este nivel (304). Otro hipotético lugar de fosforilación de FAK es la Tyr 10, que parece ser fosforilado *in vitro* de forma eficaz por las proteínas de la familia Src (311), aunque este residuo no está bien caracterizado ni se conocen las posibles interacciones con otras proteínas (304).

Finalmente, los residuos Tyr 881 de PYK2/CAK β y Tyr 925 de FAK (*Gráfico III-2*), son lugares de unión, cuando se encuentran fosforilados, para dominios SH2 de Grb2, que posiblemente puede conectar los procesos de señalización iniciados en las adhesiones focales con la activación de la vía Ras/Raf/MAPK (253,260,304,345). La mutación de la secuencia de inserción residuo del Tyr 881 en PYK2/CAK β se acompaña con la incapacidad de unir Grb2 (11,304).

Adicionalmente a los residuos de fosfotirosina que median interacciones específicas por dominios SH2, PYK2/CAK β y FAK disponen de sendas secuencias ricas en prolina en el extremo C-terminal (*Gráfico III-2*), que les permiten establecer interacciones con proteínas que dispongan de dominios SH3 (304). Así, se ha demostrado que mediante interacciones SH3 con la región rica en prolina C-terminal de PYK2/CAK β y FAK se produce la unión tanto de p130^{CAS}, una proteína adaptadora de gran tamaño, como de Graf, una Ras-GAP (281,304,787,788). La proteína adaptadora p130^{CAS} también puede estabilizar su unión mediante interacciones SH3 con la segunda secuencia rica en prolina situada en las proximidades del dominio catalítico en la tirosina cinasa FAK (*Gráfico III-2*) (280).

En resumen, los lugares de interacción para dominios SH2/SH3 en PYK2/CAK β y FAK están muy conservados. Teniendo en cuenta esta evidencia parece una asunción razonable que ambas cinasas interactúan con un grupo de proteínas similar, aunque, como se comentará más adelante, este hecho no implica que tengan una regulación equivalente (304). También se ha demostrado fehacientemente que ambas cinasas se autofosforilan en un residuo conservado y homólogo, que les confiere capacidad de interactuar con dominios SH2 de cinasas de la familia Src (especialmente c-Src y Fyn). Éstas últimas fosforilan a las cinasas FAK en lugares específicos que además de establecer nuevos lugares de interacción SH2, incrementan la actividad de PYK2/CAK β y FAK por fosforilaciones en residuos del dominio catalítico. Sin embargo, la actividad cinasa de FAK no parece esencial en todas sus funciones. Por ejemplo, un mutante inactivo de FAK es capaz de promover la migración celular (304). Ambas tirosinas cinasas se asocian con las placas de adhesión focal, aunque PYK2/CAK β presenta una localización minoritaria en estas estructuras, probablemente debido a que dispone de asociaciones más débiles y reversibles que FAK con las proteínas de anclaje en los contactos focales (paxilina) (367).

Sin embargo, PYK2/CAK β y FAK muestran bastantes divergencias en sus mecanismos de regulación, por ejemplo PYK2/CAK β está regulada por los cambios en la concentración de Ca²⁺ citosólico mientras que generalmente FAK es independiente de este evento y presentan, además, una expresión tisular y una distribución subcelular diferentes (364,367,368,779).

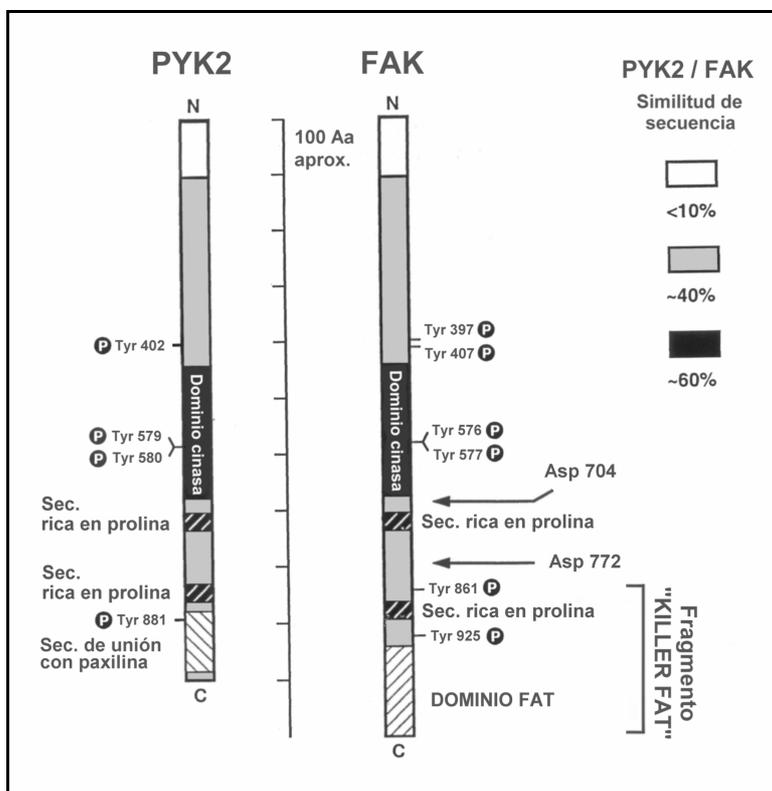


Gráfico III-2. Esquema comparativo de la estructura de PYK2/CAK β y FAK, lugares de unión específicos y lugares de escisión de FAK por caspasas. El dominio tirosina cinasa central, las regiones que se encuentran alrededor de los residuos fosforilados (P) y las secuencias ricas en prolina muestran una alta homología en ambas tirosinas cinasas. Los residuos Tyr 402 de PYK2/CAK β y Tyr 397 de FAK son los lugares de unión con las PTKs de la familia Src a través de sus dominios SH2. Los residuos Tyr 881 de PYK2/CAK β y Tyr 925 de FAK, son lugares de unión para dominios SH2 de Grb2. FAK dispone de un dominio FAT (Focal adhesion targeting domain) en su extremo C-terminal, a través del que se une a la paxilina y a la talina. Aunque PYK2/CAK β no tiene un dominio FAT completo, conserva las secuencias de unión con la paxilina en su extremo carboxilo. En la secuencia rica en prolina C-terminal de PYK2/CAK β y FAK se unen p130^{CAS} y Graf (una Ras-GAP) mediante dominios SH3. La p130^{CAS} también puede estabilizar su unión mediante interacciones SH3 con la segunda secuencia rica en prolina (cerca del dominio catalítico) en ambas cinasas. Además de las PTKs Src, en el residuo Tyr 402 de PYK2/CAK β o Tyr 397 de FAK se ha demostrado la unión del complejo Shc/Grb2/mSOS1, y de la subunidad reguladora p85 de la PI3-K con PYK2/CAK β y FAK en esos mismos residuos. Por último, los residuos fosforilados Tyr 579 y 580, en PYK2/CAK β , y Tyr 576 y 577, en FAK, regulan la actividad catalítica de las cinasas. En la figura se muestra además la homología entre secuencias de PYK2/CAK β y FAK. Por otra parte, la caspasa 3 escinde la tirosina cinasa FAK en el residuo Asp 772 y Asp 704 en humanos y ratones, respectivamente, liberando un gran fragmento N-terminal, que contiene el dominio cinasa, y una pequeña cadena C-terminal (\approx 35 kDa para la FAK humana y \approx 50 kDa para la de ratón) con una o dos secuencias ricas en prolina y los lugares de reconocimiento para dominios SH3. La expresión exógena del fragmento C-terminal obtenido por la proteólisis a nivel del residuo Asp 772 induce apoptosis celular, por este motivo se le denomina como fragmento Killer FAT. Adaptado de (304) y (743).

1.4.2. Regulación de la actividad de las tirosinas cinasas FAK y PYK2/CAK β

Regulación por las integrinas

Las integrinas constituyen la principal familia de receptores de superficie que participan en la relación entre la célula y la matriz extracelular y en las interacciones célula a célula. De todas estas interacciones depende críticamente la regulación de un gran número de funciones celulares (304,345).

Las integrinas son heterodímeros, compuestos por subunidades α y β , seleccionadas de entre 16 tipos diferentes de subunidades α y 8 tipos de subunidades β . Con estos tipos de subunidades α y β se constituyen los 20 heterodímeros de integrinas diferentes descritos en la actualidad (241,603). Ambas subunidades de integrinas tienen dominios extra e intracelulares y una secuencia transmembrana. El corto dominio intracelular carece de actividad enzimática intrínseca y se cree que ejerce su acción acoplándose a dos tipos distintos de proteínas: (a) el primer tipo está representado por proteínas citoplasmáticas que inducen la formación de grandes complejos proteicos; entre ellas se encuentran tanto proteínas estructurales del citoesqueleto, como las proteínas que catalizan la formación y organización de las placas de adhesión (241,603,744); (b) el segundo tipo son proteínas que regulan la formación de dichas placas de adhesión focal (241,603,744). Una de las principales funciones de las integrinas es la transmisión de señales de la matriz extracelular al citoplasma, función que tiene gran trascendencia biológica a diferentes niveles: desarrollo embrionario, crecimiento de células tumorales, metástasis, apoptosis, hemostasia, activación de los leucocitos o la respuesta de las células a la presión, entre otras (304,316,341,363,603,743,749,785,789).

Uno de los primeros eventos detectados tras la activación de los receptores de integrinas es el incremento en la fosforilación en restos de tirosina de proteínas intracelulares (304,743,790). Como los receptores de integrinas han perdido su actividad catalítica y, además, los ratones defectivos de los genes que codifican FAK y fibronectina resultan en un fenotipo letal en fases embrionarias tempranas, se ha propuesto que la activación de FAK es esencial para los procesos de señalización mediados por fibronectina (304,316,743,756,781,790).

Así, la interrelación de las integrinas con la matriz extracelular podría inducir la activación de las cinasas FAK, y, como consecuencia directa, la autofosforilación de estas cinasas, estableciéndose un lugar de

alta afinidad para la unión de la c-Src o de otras cinasas de esta familia (304,341,345,363,743). Determinar el mecanismo por el que las integrinas inducen la activación de las tirosinas cinasas FAK ha suscitado la atención de muchos investigadores en los últimos años.

Akiyama y cols. (789) establecieron que la subunidad β de las integrinas es la responsable de la activación de las tirosinas cinasas FAK, en un proceso dependiente del extremo carboxilo terminal (317,363). En otros estudios, llevados a cabo con dos formas mutantes de integrinas, transferidas a células CHO-K1, el tipo $\alpha_{11b}\beta_3$ (D723A/E726A), que tiene alterado el lugar de unión a FAK, y el tipo $\alpha_{11b}\beta_3$ (F727A/K729E/F730A), que tiene alterado el lugar de unión a la α -actinina, se ha puesto de manifiesto que la fosforilación de FAK en respuesta a la activación de las integrinas se produce por dos mecanismos independientes: (a) la formación de las placas de adhesión focal, que se acompaña con la activación de FAK, y (b) la activación directa por las integrinas. Por lo tanto existen mecanismos directos e indirectos derivados de la activación de las integrinas, que conducen a la activación de FAK (316,743,767).

Aunque los primeros trabajos sugerían que PYK2/CAK β no era activada por la estimulación de fibronectinas en fibroblastos de rata (364), estudios posteriores han demostrado que la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β está incrementada por la estimulación de integrinas en células B (788), megacariocitos (253), linfocitos T (626,791), osteoclastos (776) y, después de la expresión exógena, en fibroblastos de pollo (367). Además, la expresión de PYK2/CAK β está aumentada en fibroblastos FAK⁻ y la regulación de la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β estimulada por fibronectina en estas células es muy similar a la de fibroblastos normales (304).

De todas formas subyace la cuestión de si la actividad de la tirosina cinasa PYK2/CAK β está regulada por el *agrupamiento* de integrinas, como ocurre con FAK. Diversos autores (312,320,792,793) han sugerido que la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β , más que depender directamente del reordenamiento de integrinas, podría estar mediada por la actividad de PTKs de la familia Src que son activadas directamente por las integrinas, probablemente como consecuencia de la ineficiente localización de PYK2/CAK β en los lugares de *agrupamiento* de integrinas (791,794,795).

Este modelo está de acuerdo con el hallazgo de que cuando se sustituye el extremo C-terminal de PYK2/CAK β por el de FAK, la proteína mutante muestra una localización en los contactos focales y su fosforilación está incrementada tras la estimulación celular con fibronectina (757). Además, estos resultados refuerzan la hipótesis de que

la localización de FAK (o de PYK2/CAK β cuando es forzada) en los lugares de agrupamiento de integrinas es un factor importante en los mecanismos de activación directa de esas PTKs (304,316,743,795).

Regulación por FRNK

La proteína no cinasa relacionada con FAK (FRNK) es una forma autónoma de FAK de unos 41-43 kDa compuesta únicamente por el extremo C-terminal no catalítico de FAK, que ha sido identificada exclusivamente en células embrionarias (304,778). En las células y tejidos de origen aviar FRNK es codificada por un ARNm de 2,4 Kb (778) y en células humanas por un ARNm de tamaño similar (363). Otey (317) ha descrito que la sobreexpresión de FRNK disminuye la fosforilación de FAK y ralentiza los fenómenos de desplazamiento celular estimulados por fibronectina. No está muy claro cuál puede ser el proceso por el que FRNK regula la actividad de FAK, aunque se cree que ambas proteínas, la reducida y la de tamaño completo, compiten por el mismo sustrato. Como consecuencia una sobreexpresión de FRNK se acompaña con una inhibición competitiva de FAK (317).

Debido a que la expresión de la forma FRNK está limitada a células embrionarias, se ha especulado con la posibilidad de que pueda existir alguna otra proteína reguladora equivalente en células no embrionarias (317).

Regulación mediante otros receptores de membrana y convergencia de diferentes rutas intracelulares

Como se ha indicado anteriormente FAK y, en menor medida PYK2/CAK β , colocalizan con los receptores de integrinas en los contactos focales, especialmente en fibroblastos, y su actividad tirosina cinasa está incrementada cuando la célula se une a proteínas de la matriz extracelular; es decir, cuando se activan las integrinas. Como consecuencia se ha propuesto que las tirosinas cinasas de la familia FAK desempeñan un papel central en los eventos de señalización dependientes de estos receptores (304,317).

Sin embargo, se ha descrito en multitud de ocasiones la existencia de una gran variedad de estímulos celulares de distinta naturaleza, que generan señales desde receptores acoplados a proteínas G, receptores transmembranales de factores de crecimiento, o por mecanismos no

conocidos, que pueden incrementar el nivel de fosforilación en tirosina de FAK y PYK2/CAK β en esas células (304,317). Es decir, las tirosinas cinasas de la familia FAK pueden ser activadas por una serie de agentes que actúan mediante rutas intracelulares independientes de las integrinas. Así, se ha demostrado que factores de crecimiento (10,384,757,775,776,783), lípidos bioactivos como el ácido lisofosfatídico (15,796), neurotransmisores como la ACh (701,797), o su análogo carbacol (8), y péptidos mitogénicos como la bombesina, la vasopresina y las endotelinas (7,13,620,620), la bradicinina (14,699), la angiotensina II (10,798) o la CCK-8, (en este caso exclusivamente para FAK, no existen evidencias para PYK2/CAK β) (264,477), estimulan la fosforilación en tirosina de las cinasas FAK.

Se ha demostrado que algunos de esos estímulos afectan la actividad cinasa de FAK y PYK2/CAK β directamente, mientras que otros podrían activar otras tirosinas cinasas que incrementan indirectamente la fosforilación en tirosina de las primeras (304,317). En cualquier caso, parece un hecho destacable, y así lo han evidenciado diversos autores (317,369,785), que las cinasas focales representan un punto de convergencia de vías de acoplamiento estímulo-respuesta con orígenes tan diversos como las iniciadas por péptidos mitógenos, factores de crecimiento, integrinas, oncogenes y lípidos activos.

Activación de FAK independiente de integrinas

La ocupación de los receptores acoplados a proteínas G de membrana (GPCR) y la subsiguiente activación de las vías asociadas, se acompaña en muchas ocasiones de efectos que inicialmente no están regulados por las vías clásicas de señalización; por ejemplo, embriogénesis, regeneración tisular, estimulación del crecimiento y neoplasias (785). Fenómenos que, por otra parte, están regulados en muchas ocasiones por mecanismos intracelulares dependientes de fosforilación en tirosina (21,196). No obstante, al carecer de actividad tirosina cinasa intrínseca, de la que sí disponen los receptores de los factores de crecimiento, se ignoraba si la ocupación de los GPCR estimulaba la fosforilación en residuos de tirosina de las cinasas de adhesión focal, particularmente de FAK (PYK2/CAK β aún no existía para la comunidad científica). Gutkind y Robbins (8) demostraron en 1992 que el carbacol incrementa, de forma dependiente de la concentración, la fosforilación de un gran número de proteínas en fibroblastos en los que se induce la expresión de receptores muscarínicos, entre las proteínas fosforiladas se encuentran FAK, p130^{cas} y PI3-K. Posteriormente se han ido describiendo diversos agonistas que actúan en los GPCRs e inducen la fosforilación de esta tirosina cinasa FAK por mecanismos independientes de la activación de integrinas.

Así, se ha descrito que la CCK estimula la fosforilación en residuos de tirosina de una gran número de proteínas intracelulares, cinasas o no, entre las que se encuentran las JNK y MAP cinasas (263,681,682), FAK, paxilina y p130^{CAS} (264,369,477,683). La fosforilación en residuos de tirosina es uno de los procesos más importantes en la acción de la CCK (19,378,799) y de otro importante número de neuropéptidos (376,482,785,800,801) que actúan como potentes factores de crecimiento celular al unirse a GPCRs, puesto que la fosforilación de proteínas en tirosina parece implicada en mediar los efectos tróficos y los cambios en el citoesqueleto que inducen (17,19,378,699,799).

Como se recoge en el primer capítulo, existen dos tipos de receptores para CCK, el receptor CCK_A y el receptor CCK_B/gastrina. Seufferlein y cols. (686) y Taniguchi y cols. (685) han descrito que la ocupación del receptor CCK_B/gastrina transfectado en fibroblastos Rat1 o en células NIH3T3 induce la fosforilación de FAK y de paxilina, así como la formación de fibras de tensión, la activación de las MAP cinasas y la mitogénesis, en un proceso que depende de la hidrólisis de inosítoles fosfato y del incremento en la concentración de calcio intracelular.

Algunos componentes de nuestro grupo de investigación han demostrado que la ocupación del receptor CCK_A en acinos pancreáticos de rata induce la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y de la paxilina de forma totalmente dependiente de la integridad del citoesqueleto de actina y parcialmente de la actividad de la GTPasa p21-Rho, de la PKC y de la movilización de calcio intracelular (264,369,477). De igual forma Rosado y cols. (701,797,802) han descrito que la activación de los receptores muscarínicos en acinos pancreáticos de rata estimula la fosforilación de FAK, paxilina y p130^{CAS} por mecanismos dependientes e independientes de la activación de la PKC y de la movilización de calcio intracelular, que están regulados por la PI3-K.

Otros autores han establecido que la bombesina estimula la fosforilación de FAK y paxilina en residuos de tirosina en fibroblastos 3T3, a través de una vía independiente de la PKC y del calcio citosólico (620). La fosforilación de FAK y paxilina inducida por este agonista requiere, además, la integridad del citoesqueleto de actina y la actividad de la GTPasa Rho (620). Las tirfostinas, que se comportan como potentes inhibidores de las tirosinas cinasas, reducen la fosforilación de FAK y la paxilina inducida por bombesina en células 3T3 (803). La fosforilación de FAK y paxilina indica que éstas proteínas participan en las vías de acoplamiento estímulo-respuesta activadas por la bombesina; sin embargo, los componentes de estas vías todavía no han sido completamente identificados (384,620). Por ejemplo, los resultados

obtenidos con las tirfostinas parecen sugerir el concurso de tirosinas cinasas adicionales en la fosforilación de FAK y la paxilina inducida por bombesina en el tipo celular 3T3 (803).

La trombina, al contrario que la bombesina, estimula la fosforilación en restos de tirosina de FAK en plaquetas por una vía dependiente de la proteína cinasa C y del calcio citosólico (603). Los resultados obtenidos con este agonista sugieren, además, que los receptores acoplados a las proteínas G de membrana podrían cooperar con las integrinas amplificando las señales inducidas por la activación de estas últimas (603).

La insulina también participa en la regulación de FAK, según se desprende de los estudios desarrollados por Pillay y cols. (804) en fibroblastos Rat1, y por Knight y cols. (805) en células CHO. Ambos grupos han demostrado que la insulina estimula la defosforilación de FAK y reduce la formación de fibras de tensión. El mecanismo por el que se establecen estos efectos podría depender de la tirosina fosfatasa SHPTP2, que participa en las cascadas de señalización activadas por la insulina (21,806).

El efecto de los factores de crecimiento en la fosforilación de FAK está sujeto a una compleja regulación. Por ejemplo, la estimulación de la fosforilación de FAK por el PDGF depende no solo de la variedad molecular del factor de crecimiento, sino también de la concentración empleada e incluso del tipo celular estudiado. Así, el PDGF-BB es capaz de estimular la fosforilación de FAK en células musculares de aorta de ratón, mientras que el PDGF-AA no se acompaña de este efecto (807). Por otro lado ambas formas moleculares del PDGF estimulan la fosforilación de FAK en fibroblastos 3T3 a bajas concentraciones. A concentraciones altas, sin embargo, no tienen ningún efecto (384). Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado que FAK y paxilina se fosforilan en tirosina en respuesta al EGF en acinos pancreáticos de rata por un proceso independiente de la PKC y dependiente de la PI3-K, p21-Rho y de la integridad del citoesqueleto de actina (783).

El LPA es un constituyente fisiológico del suero y el principal responsable de su actividad como promotor del crecimiento. El LPA es un fosfolípido mitogénico que induce la fosforilación de múltiples proteínas, entre ellas las MAP cinasas y FAK (808). La estimulación de células con suero o con LPA se acompaña de una rápida formación de placas de adhesión focal y fibras de tensión, procesos que estarían relacionados con la fosforilación de FAK en residuos de tirosina (764).

En las plaquetas, se expresa un único receptor para las inmunoglobulinas, el Fc γ RII. Este receptor interviene en múltiples

respuestas celulares al interactuar con distintos complejos inmunes. La ocupación del receptor Fc γ RII de las plaquetas por las IgGs también induce la fosforilación de distintas proteínas en residuos de tirosina, entre las que se encuentran FAK y c-Syk (809). La fosforilación de estas proteínas también se produce en plaquetas unidas a las IgG que son deficientes en las integrinas, lo que demuestra que la ocupación del receptor Fc γ RII provoca la fosforilación de FAK en residuos de tirosina por una vía independiente de las integrinas (809).

Activación de PYK2/CAK β independiente de integrinas

Además de los efectos descritos, PYK2/CAK β , el otro miembro de la familia de tirosinas cinasas de adhesión focal, también experimenta variación en su nivel de fosforilación en tirosina ante estímulos de muy distinta naturaleza, que actúan de forma independiente de las integrinas (795). Muchos de esos factores son los mismos que han demostrado efecto en la fosforilación de FAK, como activación de GPCR (260,283,604,759,784), factores de crecimiento (10,757,776) o fosfolípidos (283,366); mientras que otros, como la despolimerización celular (368), el estrés osmótico (366,367,810), o el tratamiento con ionóforos de calcio (366,757,794,811,812) tienen un efecto mucho mayor sobre PYK2/CAK β que sobre FAK en aquellas células que expresan ambas cinasas (795).

Se ha especulado con la posibilidad de que las diferencias observadas están mediadas por la movilización intracelular de calcio (de hecho PYK2/CAK β también se denomina CADK: cinasa dependiente de calcio) (795). Sin embargo, existen evidencias indicando que la movilización de calcio también puede estimular variaciones en la fosforilación en tirosina de FAK, aunque de menor intensidad que para PYK2/CAK β (368,369). Las señales de calcio que incrementan la fosforilación de PYK2/CAK β pueden ser generadas por el calcio extracelular mediante canales dependientes de voltaje (260,810) o por la liberación desde depósitos intracelulares (366,794). Aunque no se ha establecido el mecanismo por el que la movilización de calcio incrementa la fosforilación de PYK2/CAK β , se especula con la posibilidad de que estén implicadas interacciones únicas del dominio N-terminal de PYK2/CAK β con hipotéticas proteínas de unión con calcio (304,795).

Dikic y cols. (283) han descrito que el LPA, al igual que en caso de FAK, también induce la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β . Estos autores demuestran, además, que la fosforilación descrita se correlaciona con la formación de complejos (en el residuo Tyr 402) PYK2/Shc/Grb2/mSOS y con la activación de las vías Ras/MAPK. Como se ha expuesto en el capítulo I, este es uno de los mecanismos propuestos

en diversos tipos celulares para establecer la conexión entre la ocupación de GPCR y la activación de las vías MAPK (62,604).

Como ya se ha indicado, se ha descrito que la ocupación del receptor CCK_A en acinos pancreáticos de rata induce la fosforilación en residuos de tirosina de la FAK y de la paxilina [revisión en (369)]. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito que la ocupación del receptor CCK_A tenga efecto alguno en la fosforilación de PYK2/CAK β . En células acinares pancreáticas de rata, a diferencia de otras especies como el cobaya o el hombre, solo se ha descrito la presencia de receptores CCK_A (813), por lo que es una especie idónea para estudiar si este tipo de receptor modifica la fosforilación en tirosina y/o la actividad de PYK2/CAK β .

PYK2/CAK β y FAK se regulan diferencialmente a nivel de sustrato

De forma adicional a la distinta sensibilidad que muestran las cinasas de la familia FAK ante ambas ramas de la cascada de señalización dependiente de la hidrólisis de PtdIns por las PLCs, se han descrito otros procesos de regulación diferencial entre PYK2/CAK β y FAK (304,795). Algunos de ellos podrían establecerse al nivel de sustrato. Así, Schaller y Sasaki (367) han demostrado que después del tratamiento de células CE que sobreexpresan o bien PYK2/CAK β o bien FAK con el inhibidor de fosfatasas vanadato, se detecta un gran incremento en el contenido de fosfotirosinas en un grupo de proteínas sustrato común a ambas tirosinas cinasas, incluidas la paxilina, la p130^{CAS} y la tensina. Sin embargo, aunque la fosforilación de tirosinas es un proceso generalizado en ambos tipos celulares, varios de esos sustratos, particularmente p130^{CAS}, demuestran un nivel de fosforilación diferencial en las células de los dos orígenes. Los niveles de fosforilación detectados eran significativamente más elevados en células con altos niveles de PYK2/CAK β y al inmunoprecipitar el contenido de fosfotirosina procedente de lisados de ambos tipos celulares, se detectaron más especies fosforiladas en las células con alto contenido en PYK2/CAK β .

Además, el vanadato induce profundas modificaciones morfológicas en las células que sobreexpresan PYK2/CAK β , pero no en las que sobreexpresan FAK (367). Estos autores atribuyen este hecho a la fosforilación diferencial de sustratos, puesto que alguno de las proteínas implicadas en los procesos transformantes es fosforilada y activada por PYK2/CAK β y no por FAK (367). Sin embargo no aportan ninguna evidencia definitiva que apoye esta hipótesis.

Integridad del citoesqueleto, actividad de Rho y fosforilación de las cinasas de adhesión focal

A través de las placas de adhesión focal se transmiten señales desde la matriz extracelular al interior celular (603), bien modificando estructuras del citoesqueleto o mediante la activación de otras rutas intracelulares de acoplamiento estímulo-secreción, por ejemplo las rutas de las MAP cinasas ERK (260,283,316,749,784,808,814), o las rutas JNK/SAPK (366,810). Está perfectamente establecido que la fosforilación de FAK y de PYK2/CAK β en residuos de tirosina, tras la unión de un ligando de la matriz extracelular con las integrinas, es un fenómeno necesario para la transducción de señales desde las placas de adhesión focal (363) y, por lo tanto, para que la señal pueda ser transmitida desde la matriz extracelular al citoesqueleto o a las vías intracelulares que deben ser activadas. De modo recíproco, la correcta conformación de los componentes del citoesqueleto de actina modifica la actividad de estas tirosinas cinasas (304).

Así, y refiriéndonos a los estímulos que median su acción tras la activación de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas, el incremento en la fosforilación en restos de tirosina de la FAK, estimulado por bombesina o endotelina en fibroblastos 3T3 (17,620), o el de la PYK2/CAK β , estimulado por trombina o angiotensina II en plaquetas o en músculo liso vascular (10,254), esta inhibido tras el tratamiento de éstas células con citocalasina D. La citocalasina D es una toxina obtenida de hongos, que induce la despolimerización de forma selectiva de los filamentos de actina (815). Resultados similares se han obtenido tras la activación de diversos tipos de receptores, como los de factores de crecimiento o integrinas, en diferentes tipos celulares pretratados con citocalasina D (10,17,620,776,783,788,794). Estos resultados confirman que la correcta organización del citoesqueleto es un prerequisite para que se produzca la fosforilación en restos de tirosina de FAK y la PYK2/CAK β , en diferentes tipos celulares y en respuesta a los más diversos estímulos.

Existen múltiples evidencias que implican a las proteínas de la familia Rho de GTPasas de bajo peso molecular en la formación de las placas de adhesión focal y de las fibras de tensión de actina (23,471,476,790). Por ejemplo, la inhibición de Rho mediante el tratamiento de las células con la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*, que cataliza la ADP-ribosilación del residuo de asparragina localizado en la posición 41 de la molécula de Rho (816), reduce notablemente la formación de fibras de tensión estimulada por bombesina y, paralelamente, desciende la fosforilación de FAK y la paxilina en restos

de tirosina (817). Otros autores han indicado que las rutas de la fosfolipasa C y de las proteínas de la familia Rho podrían cooperar para regular la reorganización de los microfilamentos de actina (466). García y cols. (264,477,701) han establecido que la fosforilación de FAK inducida por CCK depende de la integridad del citoesqueleto de actina y de la actividad de Rho.

En resumen, parece evidente que existe una íntima relación entre FAK, el citoesqueleto y Rho (466). La fosforilación de FAK en un residuo de tirosina puede estar motivada por, entre otros fenómenos, la unión de las integrinas a un componente de la matriz extracelular o por la activación de los receptores unidos a proteínas G de membrana de algunos neuropéptidos, como la bombesina, la endotelina o la CCK. Este segundo mecanismo es totalmente dependiente del citoesqueleto de actina y también, en cierta medida, de la funcionalidad de Rho (363,620,785).

Parsons y cols. (363) han planteado la hipótesis de que la señal iniciada tras la ocupación de los receptores de membrana acoplados a proteínas G puede ser transmitida a FAK a través del citoesqueleto de actina. Según esta hipótesis, se podría inducir la formación de una placa de adhesión en sentido inverso, es decir, desde el interior celular, con objeto de transmitir una señal a la matriz extracelular y a las células vecinas, para así coordinar la función de todo un conjunto de células (363).

Regulación por la familia de tirosinas cinasas de la familia Src

La transformación celular provocada por el virus del Sarcoma de Rous (RSV), que codifica la forma mutante constitutivamente activa v-Src, es un proceso complejo que produce la generación de una serie de señales que dirigen un crecimiento incontrolado y una serie de perturbaciones en la estructura celular y en su comportamiento (267). La capacidad del v-Src para inducir cambios en la morfología celular es independiente de la función nuclear, más bien parece estar relacionada con la actividad tirosina cinasa en la periferia celular (267,773).

La actividad de v-Src estimula tanto la fosforilación de FAK en residuos de tirosina como la desorganización de las placas de adhesión focal y ambos procesos permiten a la célula afectada un crecimiento independiente del medio que la rodea (773). El hecho de que esta cinasa provoque la fosforilación de FAK dando lugar a la formación de placas de adhesión focal y al mismo tiempo cause la desintegración de dichas placas es paradójico. El RSV inicialmente estimula la fosforilación de FAK en

residuos de tirosina, pero seguidamente induce su degradación antes de que la célula se independice de su entorno (773). Como ya se ha indicado, diversos autores han encontrado evidencias de que la función de FAK está encaminada hacia la reorganización de las placas de adhesión focal, no a su formación. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Ilic y cols. (768) utilizando células embrionarias deficientes en FAK, que describen la capacidad perfectamente normal de dichas células para organizar los contactos focales. El papel de FAK en la reestructuración de las placas de adhesión podría explicar la independencia del medio en las células transformadas por el RSV, ya que la sobreexpresión de FAK daría como resultado la aparición de un menor número de placas de adhesión en estas células (768).

Como se ha indicado en el apartado I.2.1.1 de esta Tesis Doctoral, la activación de las tirosinas cinasas de la familia Src es un proceso complejo que implica reacciones de fosforilación y defosforilación e interacciones con otras proteínas. La fosforilación del residuo de tirosina 527 por la PTK Csk en el extremo C-terminal de las cinasas c-Src y c-Fyn, facilita una interacción entre esta secuencia y sus dominios SH2 que permite mantener a las tirosinas cinasas en una conformación plegada inactiva (241,266). La proteína cinasa c-Src puede activarse por el desplazamiento de la secuencia reguladora de Src del dominio SH2 o por la interrupción de las interacciones intramoleculares del dominio SH3, que estabilizan la conformación cerrada (241,266). Este mecanismo de activación de Src fundamenta la hipótesis de que la (auto)fosforilación del residuo Tyr 397 de FAK puede crear un lugar de alta afinidad para la unión de las proteínas c-Src y c-Fyn y que estas proteínas podrían unirse a FAK, desplazando la secuencia reguladora de las mismas (279). La unión de FAK con Src o Fyn podría ser el mecanismo por el que estas últimas son activadas, así como un mecanismo para localizar dichas proteínas en un lugar muy concreto de la célula (363).

Las consecuencias de la activación de FAK, Src y la Fyn tampoco están muy claras. Es muy posible que la activación de FAK y de las Src/Fyn sea necesaria para catalizar el ensamblaje de las placas de adhesión focal, iniciando señales que podrían activar otras vías de acoplamiento estímulo-respuesta en la célula (363). La activación de las proteínas FAK y de Src y Fyn podría ser suficiente para inducir la expresión de determinados genes o para activar otras rutas intracelulares, aunque aún no se ha determinado cuáles son estas rutas y cómo se lleva a cabo este proceso (602).

Grant y cols. (346) han comprobado que FAK está regulada específicamente por c-Fyn en el cerebro, ya que la mutación inactivante de esta proteína produce una hipofosforilación de FAK. Este fenómeno no

se observa cuando la mutación se produce en c-Src u otras tirosinas cinasas. El papel de la c-Fyn en la regulación de FAK es muy importante para la transmisión de señales intracelulares en la neurona. Como se ha comentado anteriormente las proteínas de la familia Src fosforilan a FAK en los residuos Tyr 576 y Tyr 577 del dominio catalítico. La ausencia de c-Fyn en células nerviosas reduce la fosforilación de FAK en esos residuos, lo que se acompaña con un descenso de actividad (346).

Por otra parte, parece que existe una dependencia funcional de PYK2/CAK β respecto de las cinasas Src en el mecanismo que permite su activación por las integrinas. Como ya se ha comentado, la activación de las integrinas induce un incremento en la fosforilación en residuos de tirosina y la activación de PYK2/CAK β , a través de un mecanismo que probablemente está mediado por las PTKs de la familia Src (304). Esta hipótesis se ha establecido al comprobar en que en los osteoclastos Src⁻ no se detecta fosforilación de PYK2/CAK β después de la activación de las integrinas (818). Además, en fibroblastos defectivos de Src, la estimulación por fibronectina en presencia del agente PP1, un inhibidor selectivo de las PTKs de la familia Src, se acompaña con una drástica reducción de la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β (819). Un resultado totalmente equiparable se ha encontrado en células FAK⁻ que sobreexpresan Csk (819).

Sin embargo, la fosforilación en restos de tirosina de FAK estimulada por integrinas no demuestra dependencia de las cinasas Src, puesto que la inhibición de la actividad de estas últimas en fibroblastos normales tiene escaso efecto en los incrementos de la fosforilación en tirosina de FAK estimulada por fibronectina (819,820). Estos hallazgos parecen indicar que la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β , más que depender directamente del reordenamiento de integrinas (como ocurre con FAK), podría estar mediada por la actividad de PTKs de la familia Src que son activadas directamente por las integrinas (304).

1.4.3. Sustratos y proteínas con las que están relacionadas PYK2/CAK β y FAK

Paxilina

La paxilina es una proteína componente del citoesqueleto que se localiza en el extremo de las fibras de tensión de actina en las placas de adhesión focal. Esta proteína, de 68 kDa de peso molecular, fue purificada

de músculo liso de pollo, y en vista de su localización se propuso la denominación de paxilina (del latín *paxillus*). Esta denominación quería expresar la idea de que la paxilina actúa a modo de *poste* donde los filamentos de actina se unen (277,278). Durante el proceso de purificación también a menudo se originaron dos bandas inmunoreactivas de 43 y 41 kDa, que se cree son el resultado de su degradación proteolítica (277,278).

La distribución de la paxilina en los diferentes tejidos es muy similar a la de la mayoría de las proteínas asociadas a las placas de adhesión focal. Es más abundante en el tejido muscular; así, en el músculo liso es donde se han observado los niveles más altos de paxilina (277,278). De igual modo está presente, aunque a menores concentraciones, en el músculo esquelético y cardíaco (277,278). Hasta la fecha no se ha detectado su presencia en tejido neuronal ni en plaquetas. El hecho de que no aparezca en el tejido nervioso coincide con la baja expresión en este tejido de otras proteínas relacionadas con las placas de adhesión focal, como la talina y la vinculina (747). Sin embargo, es sorprendente la ausencia de paxilina en las plaquetas dado que muchas de las propiedades de las mismas derivan de sus placas de adhesión focal y también porque contienen niveles excepcionalmente altos de otras proteínas relacionadas con las adhesiones focales, como la talina, la vinculina y las integrinas (277,278).

Existen muchas evidencias que indican que la paxilina es un sustrato de FAK. Estas se fundamentan en el hallazgo de que ambas se fosforilan en residuos de tirosina tras la ocupación de las integrinas por elementos de la matriz extracelular (344) o cuando las células son estimuladas con agentes como la bombesina, el ácido lisofosfatídico, el PDGF, el EGF o la CCK-8 (17,369,477,783,796). La fosforilación simultánea de la paxilina y FAK en residuos de tirosina en respuesta a los múltiples estímulos citados, sugiere que la fosforilación de la paxilina está íntimamente relacionada con la actividad de ésta última (17). No obstante, se ha descrito que la paxilina es predominantemente fosforilada en residuos de serina en respuesta a la adhesión celular a la matriz extracelular (821), aunque la proteína cinasa responsable de esta fosforilación así como el efecto que este fenómeno tiene sobre la actividad de la paxilina todavía son desconocidos (278).

La paxilina sirve como un adaptador que podría regular la formación de complejos proteicos tras su fosforilación en residuos de tirosina (277,278,347). La capacidad de la paxilina para unirse a numerosas proteínas depende de la gran cantidad de dominios presentes en su estructura que favorecen las interacciones proteicas. Así, la paxilina contiene dominios SH2 y SH3; además, cuenta con cuatro dominios LIM

y otras secuencias denominadas LD, cuya función es facilitar su unión con FAK, la vinculina y quizás otras proteínas aún no identificadas (277,278,822,823). Además de unirse con la vinculina y con FAK, la paxilina se une por medio del dominio SH2 con las proteínas Crk, Csk y Lyn y por el dominio SH3 con Src (277,278,603). Por esta razón se cree que la paxilina tiene un papel de pivote en las placas de adhesión focal diversificando la respuesta iniciada por la activación de las integrinas. Sin embargo, se ha demostrado la paxilina no se une a otros componentes de las placas de adhesión focal como la talina, la α -actinina o a la actina (277,278).

Se han identificado los residuos de tirosina 31 y 118 como los principales residuos fosforilados por FAK *in vitro* (756,824). No obstante, la localización de la paxilina en las placas de adhesión focal no depende ni de los lugares de fosforilación de FAK ni de los dominios LD, sino que esta localización depende de los dominios LIM (278,822,823).

Hasta la fecha se desconoce la relación existente entre la fosforilación en restos de tirosina de FAK y paxilina y la formación de las placas de adhesión. Una posibilidad sería que la fosforilación en restos de tirosina de la paxilina permitiría a esta proteína incorporar o reclutar en torno a los lugares de adhesión, proteínas con dominios SH2, como la tensina, que una vez localizada en estas zonas podría crear un centro de nucleación para la polimerización de las moléculas de actina y consiguientemente la formación de fibras de tensión (277,278).

Como ya se ha comentado, la fosforilación de restos de tirosina de FAK y paxilina está implicada en la organización de las placas de adhesión focal y de las fibras de tensión (347,363), pero además depende de otros mecanismos, quizá más limitantes, por ejemplo la activación de la proteína cinasa C (471,825,826). Todos ellos podrían contribuir al normal ensamblaje de los elementos del citoesqueleto.

La p130^{CAS}

Se ha comprobado que la p130^{CAS} es otro sustrato de las tirosinas cinasas de adhesión focal. La p130^{CAS}, fue inicialmente identificada como una proteína de 130 kDa con altas tasas de fosforilación en residuos de tirosina en células que sobreexpresan v-Crk y v-Src (282). Este hallazgo sugirió que esta proteína desempeña un importante papel en la transformación celular mediada por los oncogenes v-crk y v-src. La p130^{CAS} posee un único dominio SH3 y múltiples residuos de tirosina cuya fosforilación daría lugar a la aparición de lugares de alta afinidad para dominios SH2; por esta razón, se cree que esta proteína tiene un

importante papel amplificando y propagando las señales iniciadas tras la activación de las integrinas (281,304,348).

La p130^{CAS} se une directamente tanto *in vivo* como *in vitro* con PYK2/CAK β , FAK y FRNK a través de interacciones de su dominio SH3 con la secuencia rica en prolina localizada en el extremo carboxilo-terminal de todas ellas (281,782,787). La activación de las integrinas estimula la fosforilación de la p130^{CAS} que participa en la cascada de señales iniciada por estos receptores (281).

1.4.4. Funciones biológicas de las tirosinas cinasas de adhesión focal

Actualmente, se sabe realmente poco acerca de las funciones de las tirosinas cinasas de la familia FAK en la fisiología celular. No se ha podido establecer una función clara y determinada para estas proteínas, únicamente se ha demostrado su participación en mecanismos concretos en aquellas células donde se han estudiado (304).

El papel de las FAKs se ha relacionado siempre con la formación de las placas de adhesión focal y fibras de tensión en células en cultivo iniciada por la activación de las integrinas, sin embargo, existen datos contradictorios al respecto. En células REF52, la inhibición de la actividad de FAK, mediante el inhibidor de las tirosinas cinasas herbimicina A, produce disminución de la creación de dicha placas de adhesión focal y consiguientemente disminuye la capacidad de extensión y movilidad celular (344). Sin embargo, en algunos modelos celulares, como las células musculares de aorta de ratón, FAK no es responsable de la formación de las placas de adhesión focal ni de las fibras de tensión (765). Es posible que en este modelo celular la función de FAK sea diferente a la descrita en fibroblastos y células epiteliales, donde FAK puede participar activamente en la constitución y ensamblaje de las placas de adhesión focal (317,363). Este hecho está apoyado por los estudios realizados por Defilippi y cols. (766) tratando células epiteliales con dos inhibidores diferentes de las fosfatasa (vanadato y óxido de fenilarsina). La morfología de las células tratadas con estos inhibidores, así como el número de adhesiones celulares y su distribución más homogénea indican que el incremento en la fosforilación de FAK aumenta el número de placas de adhesión focal en estas células.

Por el contrario, estudios realizados con fibroblastos obtenidos de embriones de ratón de 8 días deficientes en FAK han puesto de manifiesto que la función de FAK en la constitución de las placas de adhesión está

más orientada hacia la reorganización de dichas placas que hacia su formación (768). Esto podría explicar la presencia en las células FAK⁻ de un número de placas de adhesión muy superior a las presentes en células normales, fenómeno que da como resultado la reducción de la migración de estas células, porque se fijan más al sustrato, y a alteraciones en su morfología: las células son más redondeadas y su citoplasma presenta menos extensiones que las células normales (768). La formación de fibras de tensión de actina también se altera en las células deficientes en FAK, ya que si bien hay formación de fibras de tensión, su localización alrededor de la periferia celular en lugar de en la región central de la célula hace suponer que FAK participa en la regulación de su organización, así mismo, la deficiencia en FAK da lugar a una distribución subcortical difusa de la cortactina, una proteína que se une a la actina, fenómeno que indica la desorganización del citoesqueleto de la región cortical (768). En fibroblastos FAK⁻ se observa una expresión elevada de PYK2/CAK β , sugiriéndose un posible efecto compensatorio para este aumento, que recuperaría las funciones perdidas en estas células FAK⁻ (304). Sin embargo, se ha observado que el incremento compensatorio en la expresión de PYK2/CAK β en fibroblastos FAK⁻ podría compensar determinadas funciones de FAK, pero no las relacionadas con la formación de las adhesiones focales y la migración celular (304).

También se ha sugerido que las tirosinas cinasas de adhesión focal juegan un papel importante en el crecimiento celular dependiente del anclaje. Para crecer en cultivos la mayoría de las células normales (no transformadas) requieren la adhesión a proteínas de la matriz extracelular (ECM) y la estimulación por suero o factores de crecimiento (304). Uno de los mecanismos por el que los receptores de integrinas pueden facilitar la supervivencia celular se basa en contrarrestar las señales que conducen a una muerte celular programada. Cuando las células epiteliales y endoteliales pierden el contacto con proteínas de la ECM, disminuye rápidamente su viabilidad y sufren procesos de apoptosis (304). La estimulación por integrinas de las vías de señalización de la GTPasa Rho (827,828) y de la Ras/PI3-K (425) puede prevenir la muerte celular que se desencadena cuando las células pierden el anclaje. Además, se ha demostrado que el crecimiento en extensión de las células endoteliales, pero no la simple unión a la fibronectina, genera señales importantes de supervivencia celular (304,829). Por último, la inhibición de FAK utilizando *antisense* o anticuerpos se acompaña con un incremento de la apoptosis en cultivos celulares (830,831).

Se ha establecido que las señales de supervivencia dependientes de integrinas/FAK suprimen una ruta apoptótica regulada por la proteína

supresora de tumores p53⁽⁶⁾ (832). Ilic y cols. (832) han propuesto un modelo en el que las señales de supervivencia procedentes de las integrinas/FAK en células dependientes anclaje silencian la ruta p53. Durante los procesos de transformación celular, las mutaciones del gen de la proteína supresora de tumores p53 permiten la supervivencia celular independiente de anclaje (832).

Como se acaba de describir, FAK está implicada en fenómenos inhibidores de la apoptosis celular, por tanto son lógicos los hallazgos en los que se describe que la radiación ultravioleta o la privación de factores de crecimiento pueden promover la ruptura y degradación de FAK durante el estado inicial de la apoptosis celular (304,833). Parece que durante algunos procesos de apoptosis, la estimulación de las células con fibronectinas suprime la proteólisis de FAK, hallazgo que sugiere que la activación de FAK puede prevenir su propia degradación (834). En contraste con este efecto antiapoptótico de FAK, Xiong y Parsons (320) han descrito que la sobreexpresión de PYK2/CAK β en fibroblastos de rata y ratón induce la muerte celular por un fenómeno de apoptosis. Estos autores demuestran que tanto el extremo N-terminal como la actividad catalítica de esta cinasa son necesarios para inducir la apoptosis celular (320).

La ruptura de FAK es un proceso que coincide con su salida de las adhesiones focales, con el cambio de morfología celular hacia formas esféricas y con la redistribución de FAK hacia las protusiones de membrana características de los estados apoptóticos (304). En células humanas endoteliales, la escisión de FAK en el residuo Asp 772 (*Gráfico III-2*), genera dos fragmentos de aproximadamente 90 y 35 kDa. El primero de ellos, que contiene el dominio catalítico, parece no disponer de los residuos esenciales para la localización en los contactos focales de las células. El residuo de ruptura, que es reconocido específicamente por la proteasa caspasa-3, está conservado en la mayoría de las especies excepto en el ratón, cuyo lugar de ruptura se ha identificado en el residuo Asp 704 (304).

Algunas evidencias implican al fragmento C-terminal con los procesos apoptóticos; así, se ha descrito que la expresión exógena del fragmento FAT de FAK en fibroblastos primarios induce la apoptosis

⁽⁶⁾ El gen p53 aparece mutado en aproximadamente la mitad de los cánceres humanos. La proteína p53 está implicada en la respuesta celular al estrés citotóxico y, junto con p19^{ARF}, induce la expresión de p21^{Cip1}, que causa detención del ciclo celular (*growth arrest*). Además, p53 es capaz de inducir apoptosis por mecanismos transcripcionales y no transcripcionales.

(832). Debido a estas propiedades deletéreas para la célula, se ha bautizado a este fragmento como dominio *killer* FAT (*Gráfico III-2*).

La actividad proapoptósica del fragmento *killer* FAT depende de su localización en los contactos focales, aunque el fragmento de mayor tamaño FRNK (residuos 691–1053), que adopta una localización equivalente, no induce los procesos de apoptosis (832). Este hallazgo parece indicar que la segunda región rica en prolina (presente en FRNK y no en *killer* FAT) previene de alguna manera la muerte celular inducida por el fragmento corto, aunque aún no se ha establecido si el fragmento originado en ratones por la ruptura proteolítica de FAK en el residuo Asp 740, que origina un fragmento conteniendo la segunda secuencia rica en prolina, demuestra actividad proapoptósica (304).

Por otra parte, FAK es esencial en la fisiología de las células embrionarias, ya que su falta en este tipo de células es letal (347). También se ha relacionado FAK con la extensión de la célula en la matriz extracelular y con la motilidad celular (341,344). Así, el PDGF estimula la fosforilación en residuos de tirosina de FAK al tiempo que la quimiotaxis (807) y, recientemente, se ha demostrado que FAK es esencial para la movilidad de las células endoteliales umbilicales humanas (347). Además, como ya se ha indicado, en fibroblastos FAK⁻ se ha observado una motilidad retardada debida a una mayor adhesión de las células al sustrato (768). Todas estas observaciones implican a FAK en los procesos celulares de la migración y la extensión (304,347).

En células patológicas, como las células transformadas por el RSV, se ha observado que FAK es la mediadora de muchos de los efectos de esta transformación (304,347). En aquellos tumores en los que se modifica la expresión de la integrinas en la superficie celular, también se modifican las características carcinogénicas y metastásicas de la célula tumoral, fenómeno este que podría deberse a la acción de FAK en estas células (304,347). También FAK podría estar involucrada en otras patologías, como la hiperproliferación y migración de células musculares de los vasos sanguíneos (304,347).

2. Objetivos

Con los antecedentes bibliográficos expuestos nos propusimos alcanzar los siguientes objetivos:

Primero:

Determinar la presencia y localización subcelular en acinos pancreáticos de rata de la proteína de la familia de tirosinas de adhesión focal PYK2/CAK β ; así como examinar si la ocupación del receptor CCK_A induce su fosforilación en restos de tirosina y activación.

Segundo:

Realizar un estudio comparativo de las vías intracelulares implicadas en la regulación de la fosforilación en restos de tirosina de los miembros de la familia de tirosinas cinasas de adhesión focal, PYK2/CAK β y p125^{FAK}, en respuesta a la ocupación del receptor A de la CCK en acinos pancreáticos de rata.

Tercero:

Comprobar la hipotética relación entre la fosforilación en restos de tirosina de PYK2/CAK β y la formación de complejos activadores de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos en respuesta a la ocupación del receptor A de la CCK en acinos pancreáticos de rata.

3. Resultados

3.1. Activación del receptor CCK_A y fosforilación en residuos de tirosina y actividad de la PYK2/CAK β en acinos pancreáticos

Para estudiar la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β inducida tras la ocupación del receptor CCK_A incubamos los acinos pancreáticos con CCK-8 10 nM durante 2.5 min, concentración y tiempo que provocan la estimulación máxima en la fosforilación de p125^{FAK} y paxilina (264,477). Cuando los lisados procedentes de estos acinos se inmunoprecipitan con un anticuerpo anti-fosfotirosina (PY20) y posteriormente se analizan por *Western blotting* utilizando éste mismo anticuerpo, se detecta un incremento en la fosforilación en tirosina de al menos dos componentes mayoritarios con pesos moleculares de 115–140 kDa y 65–80 kDa (*Figura III-1, panel superior izquierdo*). Después de ésta primera incubación se eliminó el anticuerpo anti-fosfotirosina de la membrana y se realizó una segunda incubación con un anticuerpo específico anti-PYK2, que no presenta inmunoreactividad cruzada con la p125^{FAK}. El anticuerpo anti-PYK2 puso de manifiesto que en condiciones basales existen unos niveles muy bajos de fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β ; sin embargo, el tratamiento con CCK-8 10 nM provoca un incremento claro en la fosforilación en tirosina de ésta proteína (*Figura III-1, panel superior derecho*).

Obtuvimos unos resultados muy similares a los descritos cuando inmunoprecipitamos PYK2/CAK β en lisados de acinos pancreáticos utilizando el anticuerpo anti-PYK2 y después analizamos la proporción de esta proteína fosforilada en tirosina mediante un *Western blotting* con el anticuerpo anti-fosfotirosina PY20 (*Figura III-1, panel inferior izquierdo*). Tras eliminar de la membrana el anticuerpo anti-fosfotirosina la incubamos de nuevo con el anticuerpo monoclonal anti-PYK2, demostrando que el tratamiento de las células acinares con CCK-8 no afecta a los niveles de PYK2/CAK β (*Figura III-1, panel inferior derecho*). Los resultados descritos evidencian que la proteína PYK2/CAK β se expresa en acinos pancreáticos y que se fosforila en tirosina tras estimular los acinos pancreáticos con el neuropéptido CCK.

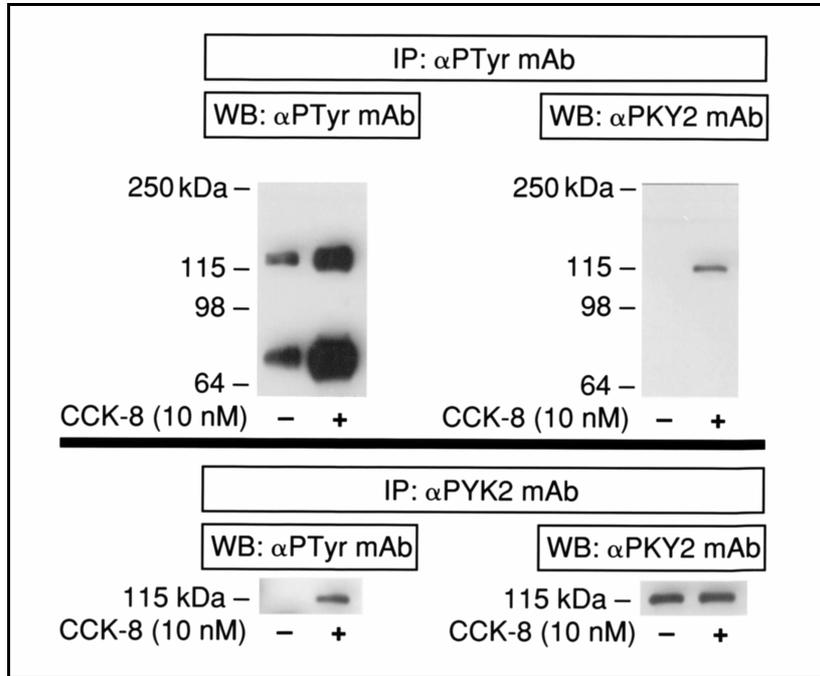


Figura III-1. Efecto de la CCK-8 en la fosforilación en restos de tirosina de PYK2/CAK β en acinos pancreáticos de rata. Tras incubar los acinos pancreáticos durante 2.5 min en ausencia o presencia de CCK-8 10 nM se lisaron según se describe en el capítulo "Materiales y métodos". Los lisados celulares totales se inmunoprecipitaron (IP) con el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina PY20 (α PTyr mAb, panel superior) o con el anticuerpo monoclonal anti-PYK2/CAK β (α PYK2 mAb, panel inferior). Los inmunoprecipitados fueron analizados por Western blotting (WB) utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina (paneles superior e inferior izquierdos) o anti-PYK2 (paneles superior e inferior derechos). A la izquierda aparece señalada la posición de las proteínas con peso molecular conocido utilizadas en el estándar. También se señala la posición de la banda que tiene inmunoreactividad con PYK2/CAK β , con un peso molecular aparente de 115 kDa. Los films son representativos de tres experimentos independientes.

La fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β se produce de forma rápida tras estimular los acinos pancreáticos con CCK-8 10 nM (Figura III-2, panel izquierdo). La fosforilación alcanza el máximo en 1 min, con un incremento de 50 ± 10 veces el valor basal, y después de 2.5 min descendiendo rápidamente. Sin embargo, tras 20 min de incubación con CCK-8 la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β aún no ha retornado a valores basales, presentando para este tiempo de incubación una fosforilación en tirosina de 11.5 ± 2 veces el valor control (Figura III-2, panel izquierdo).

El efecto que la CCK-8 muestra en la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β depende de la concentración (*Figura III-2, panel derecho*). Se ha realizado una curva dosis–efecto para la fosforilación de PYK2/CAK β en acinos pancreáticos de rata, encontrando que la CCK-8 provoca un incremento de 18 ± 8 veces el valor basal en la concentración 0.1 nM, tiene la EC₅₀ en 0.3 nM, y su efecto máximo se produce en 1 nM (*Figura III-2, panel derecho*).

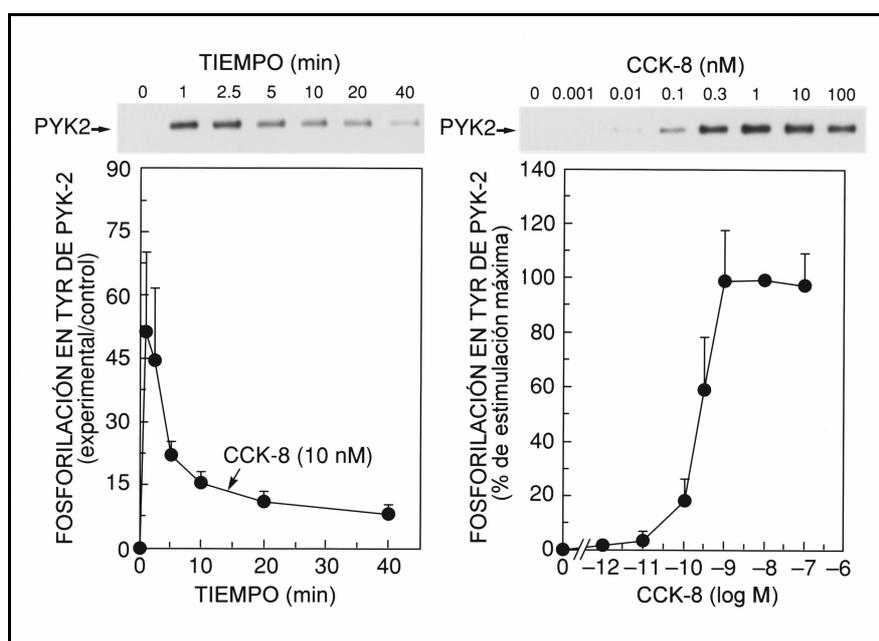


Figura III-2. Curva de tiempo (panel izquierdo) y curva dosis-efecto (panel derecho) de la fosforilación en restos de tirosina de PYK2/CAK β inducida por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata. En la parte superior del panel izquierdo se muestra el film de un experimento típico obtenido tras incubación de los acinos pancreáticos durante los tiempos indicados con CCK-8 10 nM. Este experimento es representativo de otros tres adicionales en duplicado. Los valores de fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β representados en la parte inferior son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes, obtenidos tras dividir el valor experimental por el nivel de fosforilación basal encontrado antes de comenzar el tratamiento (experimental/control). En el panel derecho los acinos pancreáticos de rata fueron incubados durante 2.5 min con las concentraciones indicadas de CCK-8. En la parte superior de este panel se muestra un experimento típico, representativo de tres más en duplicado, con los niveles basales de fosforilación en restos de tirosina de PYK2/CAK β y los niveles obtenidos tras la estimulación con las concentraciones indicadas de CCK-8. En la parte inferior se muestran los valores obtenidos tras la cuantificación de la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β . Los valores representados son la media \pm EEM ($n = 4$) expresados como porcentaje del incremento máximo, obtenido con la concentración 10 nM de CCK-8.

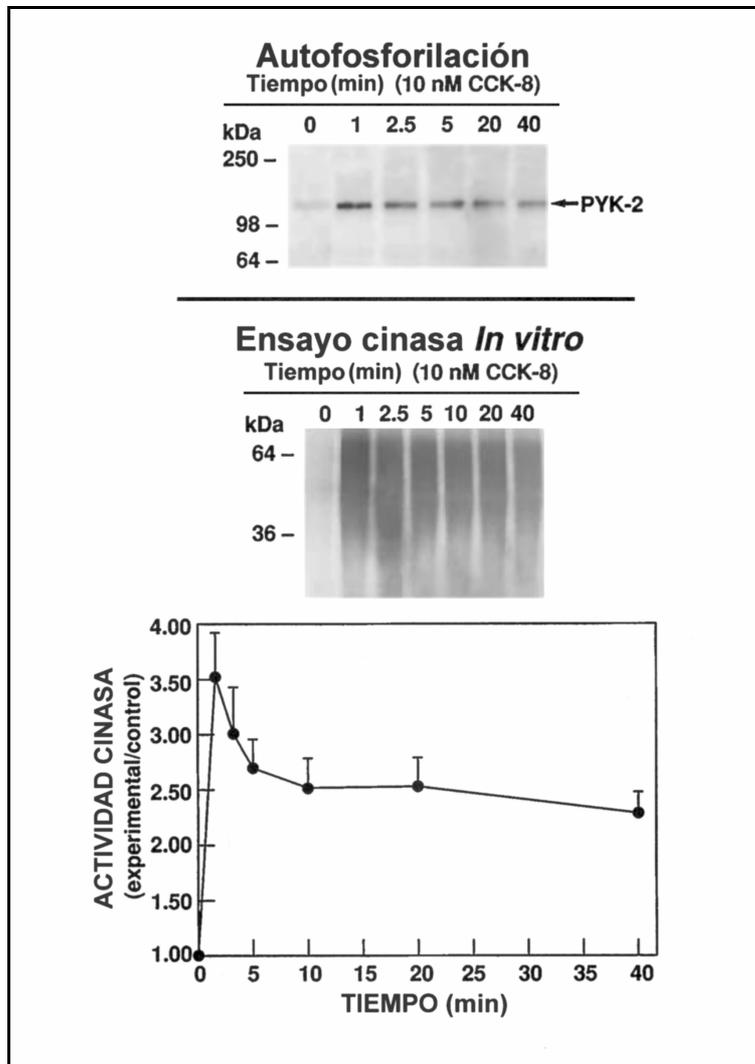


Figura III-3. Curva de tiempo de la autofosforilación (*panel superior*) y de la actividad tirosina cinasa de la PYK2/CAK β (*panel inferior*) en acinos pancreáticos de rata estimulados con CCK-8 10 nM. El autorradiograma del *panel superior* es representativo de otros tres experimentos y muestra el incremento dependiente del tiempo en la autofosforilación de PYK2/CAK β en acinos pancreáticos estimulados con CCK-8 durante 1, 2.5, 5, 20 y 40 min. En la parte superior del *panel inferior* se muestra una autorradiografía típica en la que se observa un incremento en la fosforilación del sustrato Poly (Glu-Tyr) (4:1) en acinos pancreáticos incubados con CCK-8 10 nM a diferentes tiempos. Este experimento es representativo de otros tres. En la parte inferior de este panel se representa la media \pm EEM obtenida de cuatro experimentos independientes. La actividad cinasa se expresa como cociente del valor experimental, obtenido en la fosforilación del sustrato Poly (Glu-Tyr) (4:1) tras la estimulación de los acinos con CCK-8 10 nM a distintos tiempos, y el valor control, obtenido en acinos a los que no se les añadió CCK-8.

Previamente se ha descrito que el incremento en la fosforilación de tirosina de la PYK2/CAK β se produce de forma paralela a un incremento en su actividad cinasa (366). Buscando confirmar esta hipótesis cuantificamos la actividad cinasa en inmunoprecipitados de acinos pancreáticos tratados a diferentes tiempos con una concentración 10 nM de CCK-8 (*Figura III-3, panel inferior*). Cuando aplicamos este protocolo encontramos que el neuropéptido CCK-8 provoca un rápido incremento en la actividad cinasa de la PYK2/CAK β , con una activación máxima en 1–2.5 min, y con un patrón temporal muy similar al obtenido para la fosforilación en tirosina de esta proteína inducida por CCK-8 (comparar *Figura III-2, panel izquierdo*, y *Figura III-3, panel inferior*). En otros tipos celulares, se ha descrito la capacidad de la PYK2/CAK β para autofosforilarse en restos de tirosina, utilizándose este parámetro como medida indirecta de su actividad (11,792,793). En acinos pancreáticos de rata estimulados con CCK-8 10 nM detectamos que la PYK2/CAK β se autofosforila de manera dependiente del tiempo de incubación, con un patrón temporal muy similar al descrito para la fosforilación en tirosina (*Figura III-3, panel superior*).

Sankaran y cols. (397,663) describieron la existencia de dos estados de afinidad del receptor CCK_A, uno de alta afinidad (Kd 64 pM) y otro de baja afinidad (Kd 21 nM), proponiéndose la hipótesis de que el estado de alta afinidad es el responsable de la porción ascendente en la curva bifásica de secreción enzimática estimulada por la CCK, mientras que el estado de baja afinidad provocaría la inhibición supramáxima al ser activado por altas concentraciones de CCK (671). Diversos autores han descrito que la CCK-JMV (ó JMV-180) se comporta en acinos pancreáticos de rata como un agonista del estado de alta afinidad del receptor CCK_A y un antagonista del estado de baja afinidad (369,668,835,836). La CCK-JMV con una concentración 1 μ M estimula un incremento neto de 12 ± 2 veces el valor basal en la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β , que representa un 25 ± 4 % de la máxima respuesta inducida por CCK-8 obtenida con la concentración 1 nM (*Figura III-4, panel superior -comparar líneas 2 y 3-*).

Como la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β estimulada por la CCK-JMV no se corresponde con la respuesta completa obtenida por la CCK-8, utilizamos combinaciones de ambas sustancias para identificar el estado de afinidad del receptor CCK_A del que depende esta fosforilación. Con este objetivo estimulamos los acinos pancreáticos simultáneamente con CCK-8 (1 nM) y concentraciones crecientes de JMV-CCK (0.03, 0.1, 0.3 y 1 μ M) (*Figura III-4, panel superior, líneas 4 a 7*). La reducción en la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β empieza a detectarse con la concentración 0.3 μ M de

CCK-JMV (Figura III-4, línea 6 en panel superior, y panel inferior). Cuando utilizamos simultáneamente JMV-180, con una concentración 1 μ M, y CCK-8 1 nM, el nivel resultante en la fosforilación de la PYK2/CAK β se ha reducido hasta valores similares a los obtenidos utilizando 1 μ M de CCK-JMV en solitario (Figura III-4, panel superior - comparar líneas 3 y 7-, y panel inferior).

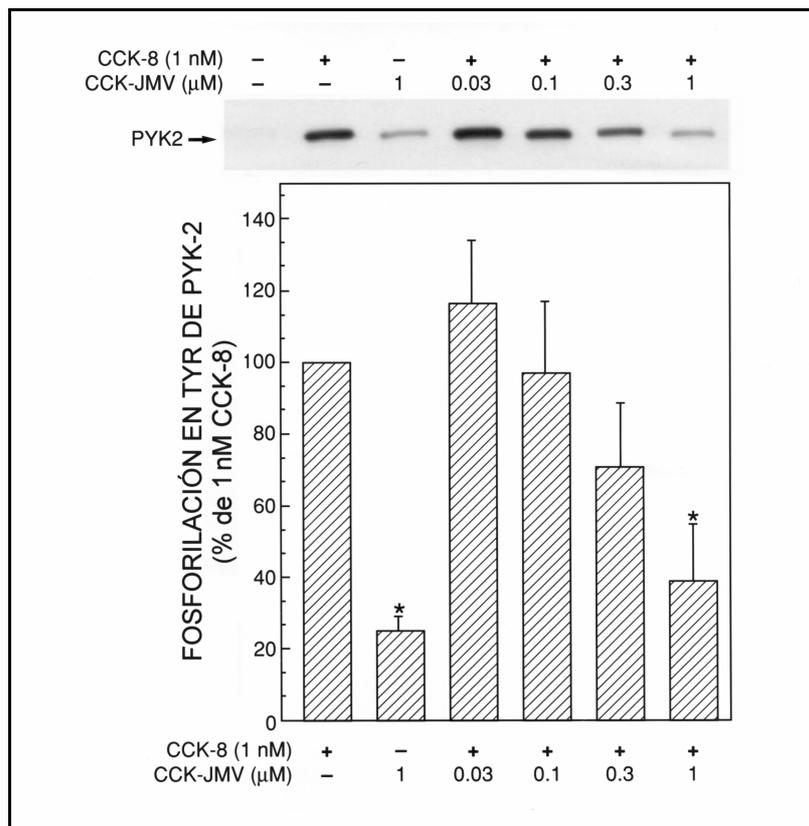


Figura III-4. Efecto de la CCK-8 y la CCK-JMV, de forma individual o en combinación, en la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β en acinos pancreáticos de rata. Los acinos fueron estimulados durante 2.5 min con CCK-8 1 nM, con CCK-JMV 1 μ M, o con CCK-8 1 nM en combinación con diferentes concentraciones de CCK-JMV. La fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β se determinó como aparece descrito en "Materiales y métodos". En el panel superior se muestra un experimento representativo de otros tres en duplicado. El panel inferior muestra los resultados obtenidos en la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β , expresados como porcentaje del incremento máximo sobre valores control, obtenido con 1 nM de CCK-8. Los valores son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes en duplicado. El asterisco indica diferencias significativas entre los resultados obtenidos con CCK-JMV sola o en combinación con CCK-8 y los valores obtenidos con la concentración 1 nM de CCK-8 ($p < 0.05$, t de Student para muestras no apareadas).

3.2. Mecanismos intracelulares que median la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β en acinos pancreáticos

Es bien conocido que la ocupación del receptor CCK_A causa la activación de la PLC por proteínas G de membrana, y ésta hidroliza el PtdIns(4,5)P₂ liberando Ins(1,4,5)P₃ y DAG, que a su vez provocan el incremento de la [Ca²⁺]_i y la activación de la PKC, respectivamente (4). En varios estudios realizados con otros tipos celulares se sugiere que los incrementos en el calcio citosólico y la activación de la PKC inducidos por agonistas, podrían jugar un importante papel en la estimulación de la fosforilación en tirosina (254,260,283,604,759,792) de PYK2/CAK β y de la actividad de esta y otras cinasas (366,837). Teniendo en cuenta estos antecedentes nos propusimos investigar si la capacidad de la CCK-8 para estimular la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β en acinos pancreáticos depende de los incrementos en la concentración del calcio citosólico, de la activación de la PKC, o de ambos eventos.

Para establecer si la activación directa de la PKC es capaz de incrementar la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β , incubamos los acinos pancreáticos con el éster de forbol TPA, un agente que selectivamente activa esta cinasa. El tratamiento con TPA (1 μ M) estimula un rápido aumento en la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β , alcanzando a los 10 min un incremento máximo de 31 ± 6 veces el valor basal, que se mantiene de forma sostenida durante al menos 20 min (*Figura III-5*).

Para determinar si la movilización intracelular de calcio puede modificar la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β utilizamos el ionóforo del calcio A23187 y la tapsigargina, un agente que específicamente inhibe la Ca²⁺-ATPasa del retículo endoplasmático, lo que provoca la depleción de los depósitos intracelulares de Ca²⁺ e incrementa la entrada de este ion desde el medio extracelular (*influx*) (838,839). El ionóforo A23187 (1 μ M) y la tapsigargina (10 μ M) (*Figura III-6*), utilizados en las condiciones experimentales en que previamente se ha demostrado que aumentan la [Ca²⁺]_i (839,840), estimulan la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β hasta 14 ± 5 y 25 ± 9 veces el nivel basal, respectivamente, incrementos que representan el 28 ± 9 % y el 56 ± 7 % de la respuesta máxima obtenida al estimular los acinos pancreáticos con una concentración 1 nM de CCK-8 (*Figura III-6, panel superior -comparar líneas 3-4 y 7-, y panel inferior*).

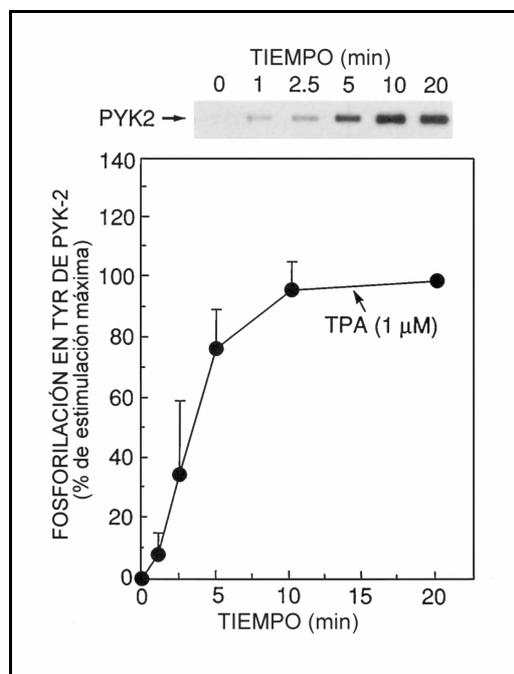


Figura III-5. Efecto del éster de forbol TPA (1 μ M) en la estimulación de la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se preincubaron con TPA 1 μ M durante los tiempos indicados. La fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β se determinó como se describe en el capítulo "Materiales y métodos". En el panel superior se muestra el film de un experimento representativo de otros tres más en duplicado. En el panel inferior se representa la cuantificación de la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β inducida por TPA 1 μ M con diferentes tiempos de incubación. Los valores son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes expresados como porcentaje de la estimulación máxima, obtenida tras el tratamiento con TPA 1 μ M durante 20 min.

Para establecer si la movilización intracelular de calcio y la activación simultánea de la PKC modifican la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β , estimulamos los acinos pancreáticos conjuntamente con A23187 (1 μ M) y TPA (1 μ M) o con tapsigargina (10 μ M) y TPA (1 μ M). Tras este tratamiento la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β se incrementó hasta el 130 ± 22 % y el 173 ± 27 % del incremento obtenido con CCK-8 (1 nM), respectivamente (*Figura III-6, panel superior, líneas 5 y 6, y panel inferior*). El aumento detectado tras la estimulación simultánea con TPA y cada uno de los agentes que movilizan calcio, es superior a la suma de los incrementos obtenidos individualmente con cada uno de estos agentes (*Figura III-6*).

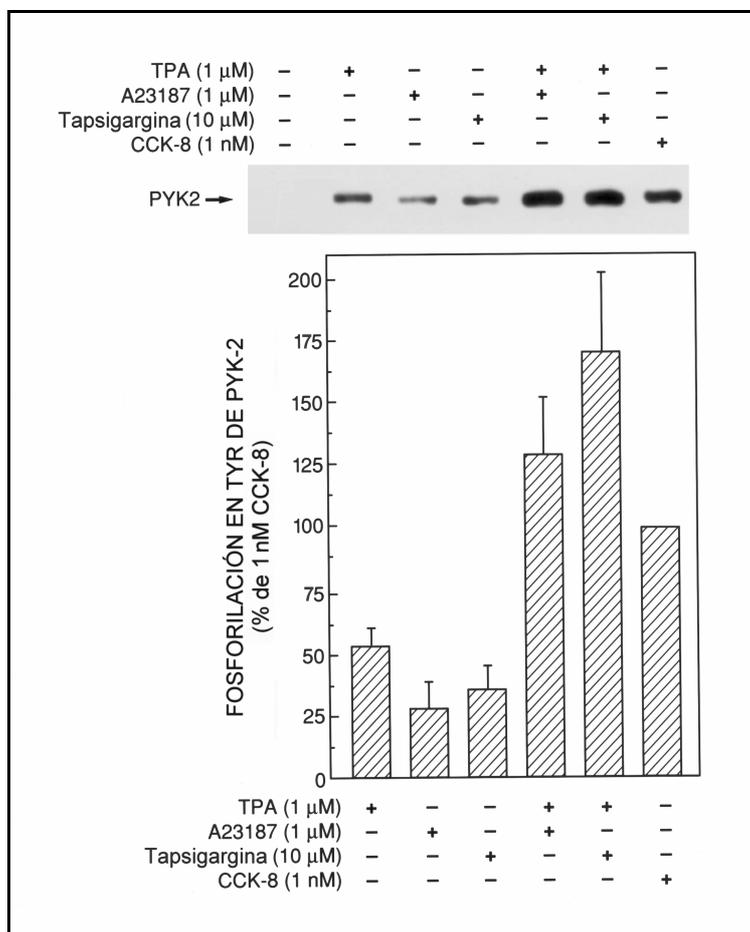


Figura III-6. Efecto del ionóforo del calcio A23187 y la tapsigargina, solos o en combinación con el éster de forbol TPA, en la estimulación de la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos de rata fueron incubados durante 5 min con los agentes indicados. En el panel superior se muestra un experimento típico representativo de otros tres en duplicado. Los resultados que aparecen en el panel inferior son la media \pm EEM de cuatro experimentos diferentes, expresados como el porcentaje del incremento máximo en la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β , causado por 1 nM de CCK-8.

La activación del receptor CCK_A provoca la liberación de Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares, seguida de una entrada de calcio desde el medio extracelular (*influx*) (4,839). Como el ionóforo A23187 y la tapsigargina, utilizados en condiciones que incrementan [Ca²⁺]_i, son capaces de estimular la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β en acinos pancreáticos, abordamos, en primer lugar, el

estudio del papel que desempeña el calcio extracelular en la fosforilación de esta proteína inducida por CCK-8. Para realizar este estudio comparamos la respuesta de los acinos pancreáticos a este agonista cuando están resuspendidos en un medio libre de calcio (con EGTA 5 mM) frente a la respuesta obtenida cuando se incuban en un medio conteniendo una concentración normal de calcio (*Figura III-7*).

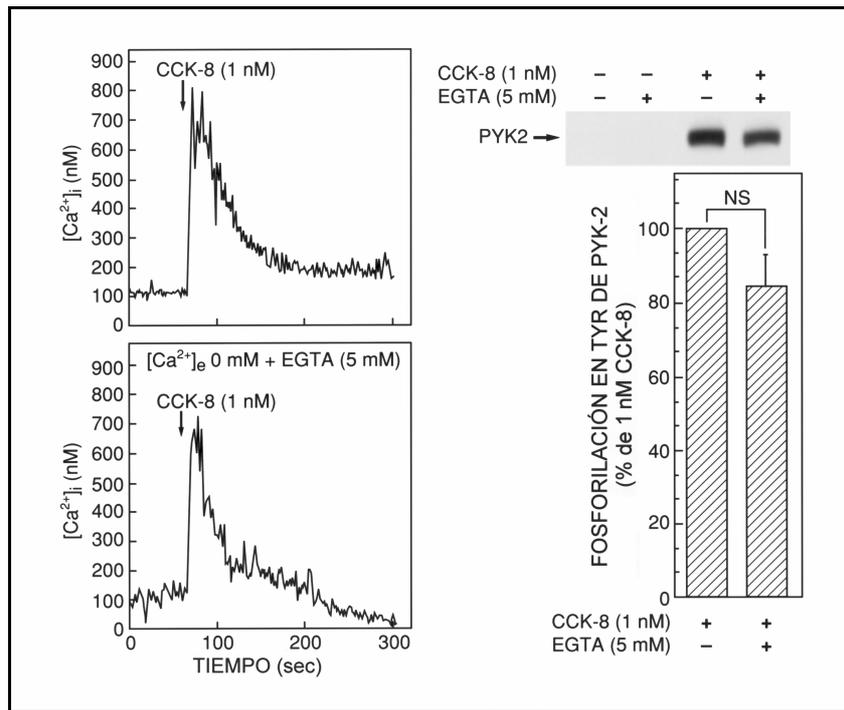


Figura III-7. Efecto de la presencia o ausencia de calcio extracelular en la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β estimulada por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos fueron pretratados durante 10 min a 37 °C en un tampón de incubación conteniendo calcio (medio de incubación habitual) o en un tampón de incubación sin calcio (con EGTA 5 mM), y después se incubaron durante 2.5 min adicionales en ausencia o presencia de CCK-8 (1 nM). Para la cuantificación de la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β y la determinación de la [Ca²⁺]_i, se utilizaron los procedimientos descritos en "Materiales y métodos". En el panel izquierdo se muestran dos registros de la [Ca²⁺]_i a lo largo del tiempo, obtenidos tras la estimulación de las suspensiones acinares con CCK-8 (1 nM) en un tampón de incubación con calcio (registro superior), o en uno libre de calcio (registro inferior). En la parte superior del panel derecho se presenta un film representativo de otros tres más en duplicado. Los resultados mostrados en el gráfico inferior de este panel son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes, expresados como el porcentaje del incremento máximo de la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β , obtenido tras estimular los acinos pancreáticos con CCK-8 1 nM en un medio conteniendo la concentración habitual de calcio.

Cuando los acinos pancreáticos son preincubados durante 10 min en un tampón de incubación sin calcio, la entrada de calcio está reducida puesto que no es posible su incorporación desde el medio extracelular. Si estimulamos los acinos con CCK-8 en estas condiciones se produce de forma normal el incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$, pero la concentración basal previa a la estimulación se alcanza más rápidamente si se compara con la respuesta inducida por la CCK-8 en un medio que permite la entrada de calcio desde el medio extracelular (*Figura III-7, paneles izquierdos*). La inhibición de la entrada de calcio no tuvo ningún efecto significativo en el incremento de la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β estimulado por CCK-8 en acinos pancreáticos (*Figura III-7, panel superior derecho -comparar líneas 3 y 4-, y panel inferior derecho*).

A continuación examinamos el papel que la movilización intracelular de calcio juega en la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β inducida por CCK-8 utilizando dos aproximaciones experimentales. Para la primera aproximación se pretrataron los acinos pancreáticos durante 30 min con taspigargina 1 μ M en un medio libre de calcio (con EGTA 5 mM), protocolo que inhibe completamente el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ estimulado por CCK-8 1 nM (*Figura III-8, panel izquierdo central*). Para la segunda aproximación se pretrataron los acinos pancreáticos durante 30 min con el quelante intracelular de calcio BAPTA AM (50 μ M) en un medio sin calcio y con EGTA 5 mM, procedimiento que también inhibe completamente la movilización de calcio intracelular inducida por CCK-8 1 nM, pero además reduce significativamente la $[Ca^{2+}]_i$ basal (*Figura III-8, panel izquierdo inferior*).

La preincubación de los acinos pancreáticos con taspigargina o con BAPTA AM en un medio libre de calcio, reducen la fosforilación en restos de tirosina estimulada por CCK-8 (1 nM) de la PYK2/CAK β en el 69 ± 3 y el 64 ± 3 %, respectivamente (*Figura III-8, panel superior derecho, y panel inferior derecho*). Sin embargo, ninguna de las dos aproximaciones descritas modifican la estimulación de la fosforilación en restos de tirosina de la p125^{FAK} inducida por la CCK-8 en idénticas condiciones, demostrando que los pretratamientos con taspigargina o con BAPTA AM no poseen un efecto inhibitor in específico (*Figura III-8, panel superior derecho -comparar las líneas 5 y 6 en las bandas PYK2 y p125^{FAK}-, y panel inferior derecho*).

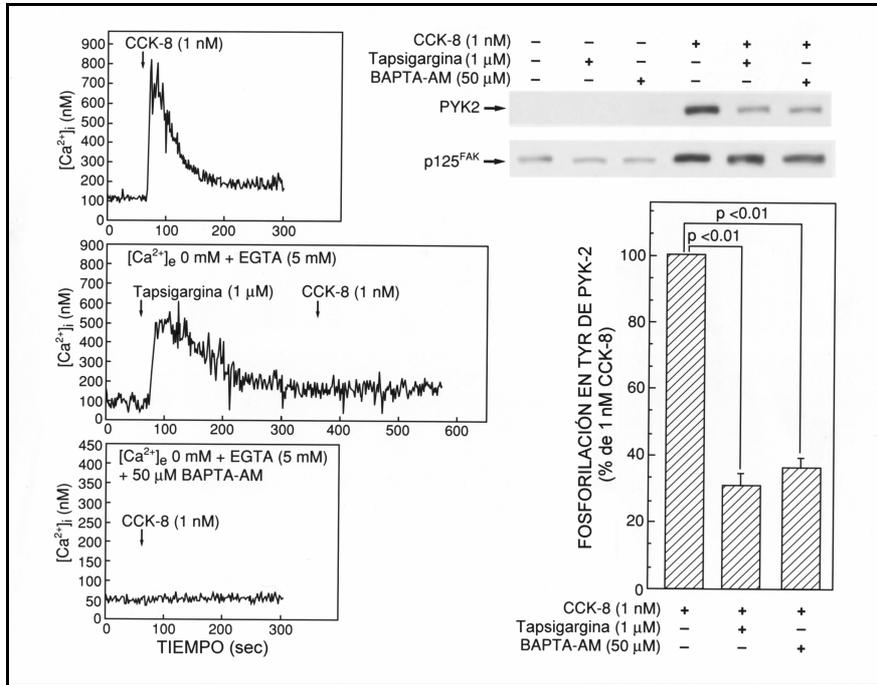


Figura III-8. Efecto del bloqueo de la movilización del calcio intracelular, en la fosforilación en restos de tirosina de PYK2/CAK β o p125^{FAK} inducida por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos fueron preincubados durante 30 min a 37 °C en un tampón de incubación sin calcio (conteniendo EGTA 5 mM) con tapsigargina (1 μM) o con BAPTA (50 μM), y después se incubaron durante 2.5 min adicionales en presencia o ausencia de CCK-8 (1 nM). Para determinar la fosforilación en restos de tirosina de PYK2/CAK β y p125^{FAK} en los lisados acinares y la [Ca²⁺]_i en suspensiones acinares, se utilizaron los procedimientos descritos en el capítulo "Materiales y métodos". En los paneles izquierdos se muestran registros representativos de la [Ca²⁺]_i a lo largo del tiempo, obtenidos tras estimular las suspensiones acinares pancreáticas con CCK-8 1 nM en un medio de incubación con calcio (registro superior), en un medio de incubación sin calcio tras 5 min de tapsigargina 1 μM (registro intermedio), y después de preincubar los acinos durante 30 min en un medio de incubación libre de calcio con BAPTA 50 μM (registro inferior). En el panel superior derecho se muestra un film representativo de tres experimentos más en duplicado. Los resultados que aparecen en el panel inferior derecho son la media ± EEM de cuatro experimentos en duplicado expresados como el porcentaje del incremento máximo sobre el basal de la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β , obtenido con CCK-8 (1 nM) en un medio con la concentración habitual de calcio.

Para establecer si la activación de la PKC puede mediar los incrementos estimulados por CCK-8 en la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β , utilizamos el GF 109203X, un inhibidor específico de la PKC (841). Nuestro grupo ha demostrado recientemente que el pretratamiento de los acinos pancreáticos durante 2 horas con una concentración 5 μM de GF 109203X se acompaña con una inhibición

completa de la fosforilación en restos de tirosina de la p125^{FAK} y la paxilina inducida por TPA (477). En nuestros experimentos utilizamos de nuevo esta aproximación experimental con p125^{FAK} y paxilina para obtener un control del efecto del inhibidor del GF 109203X en los acinos pancreáticos, obteniendo los mismos resultados, es decir: el pretratamiento con GF 109203X inhibe completamente la fosforilación en tirosina de la p125^{FAK} y la paxilina inducida por TPA.

El pretratamiento durante 2 horas con una concentración 5 μ M de GF 109203X reduce el incremento en la fosforilación en restos de tirosina de PYK2/CAK β en respuesta a CCK-8 1 nM en un 50 ± 7 % (*Figura III-9, panel superior -comparar las líneas 4 y 5 en la banda PYK2-, y panel inferior izquierdo*); al realizar experimentos paralelos sobre la fosforilación en tirosina de p125^{FAK} estimulada por CCK-8 se comprueba que este pretratamiento no tiene ningún efecto (*Figura III-9, panel superior -comparar las líneas 4 y 5 en la banda p125^{FAK}-, y panel inferior derecho*).

Como el incremento del calcio intracelular inducido por el ionóforo A23187 o la tapsigargina y la estimulación de la PKC con TPA se comportan de forma sinérgica en la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β (*Figura III-6*), y como la inhibición independiente de ambos sucesos reduce aproximadamente en un 50 % esta fosforilación en respuesta a CCK-8, el siguiente paso fue ensayar la inhibición conjunta de ambos efectos desencadenados tras activar la cascada de la PLC por la CCK-8. El pretratamiento conjunto de los acinos pancreáticos en un medio libre de calcio con tapsigargina, para inhibir la movilización de calcio, y con GF 109203X, para bloquear la actividad de la PKC, inhibe completamente la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β (*Figura III-9, panel superior -comparar las líneas 4 y 6 en la banda PYK2-, y panel inferior izquierdo*). Si comparamos estos resultados con los obtenidos en experimentos paralelos en la fosforilación de la p125^{FAK} inducida por CCK-8, encontramos de nuevo una regulación diferencial entre ambas proteínas, porque la combinación de tapsigargina y GF 109203X reduce aproximadamente un 50 % la fosforilación en restos de tirosina de la p125^{FAK}, pero no la inhibe completamente (*Figura III-9, panel superior -comparar las líneas 4 y 6 en la banda p125^{FAK}-, y panel inferior derecho*).

Los hallazgos referentes a la inhibición de la fosforilación de p125^{FAK} utilizando el GF 109203X y la combinación de GF 109203X y tapsigargina, han sido obtenidos y publicados previamente por otros investigadores de nuestro grupo (477). En este trabajo se abordaron de nuevo para caracterizar la regulación diferencial de la PYK2/CAK β y la p125^{FAK} como miembros de la misma familia de tirosinas cinasas.

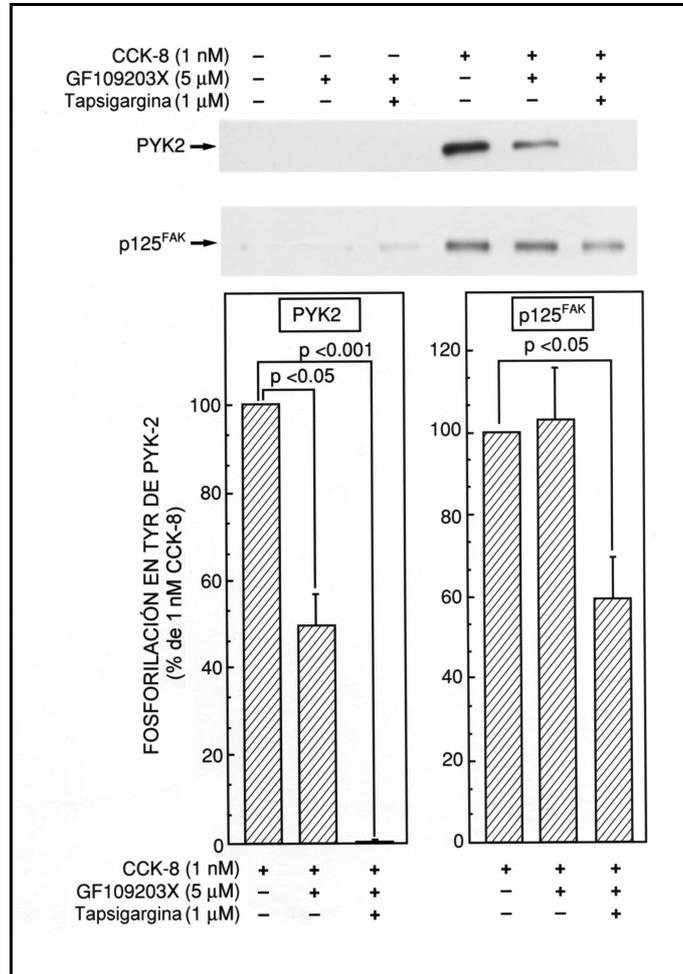


Figura III-9. Efecto del GF 109203X, solo o en combinación con tapsigargina, en la fosforilación en restos tirosina de PYK2/CAK β y p125^{FAK} estimulada por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se pretrataron con tapsigargina (1 μ M) durante 30 min en un medio libre de calcio (con EGTA 5 mM) o con GF 109203X (5 μ M) durante 2 horas, o bien con una combinación de ambos tratamientos. A continuación los acinos se incubaron durante 2.5 min adicionales en presencia o ausencia de CCK-8 (1 nM). La fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β y de p125^{FAK} se determinó según los procedimientos descritos en el capítulo II. En el panel superior se muestran dos films representativos de tres experimentos más en duplicado. Los datos recogidos en el panel inferior son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes expresados como porcentaje del incremento sobre el basal obtenido con CCK-8 (1 nM) en un medio conteniendo la concentración habitual de calcio (las comparaciones estadísticas se realizaron por medio de una t de Student para muestras no apareadas).

Estudios recientes han demostrado que la integridad del citoesqueleto de actina juega un importante papel en la fosforilación en tirosina de varias proteínas celulares, entre las que se encuentran la p125^{FAK} y la paxilina (10,477,620).

Para investigar si la integridad del citoesqueleto es un requisito para la estimulación por CCK-8 de la fosforilación en restos de tirosina de PYK2/CAK β , pretratamos los acinos pancreáticos con citocalasina D, sustancia que interrumpe selectivamente el ensamblaje de los filamentos de actina, o con colchicina, agente que selectivamente inhibe la síntesis de los microtúbulos, y después incubamos los acinos durante 2.5 min con CCK-8 (1 nM) (Figura III-10).

El pretratamiento durante 2 horas con citocalasina D (3 μ M) inhibe completamente la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β estimulada por CCK-8 (1 nM) (Figura III-10, línea 5). Sin embargo, el pretratamiento durante 2 horas con colchicina (0.3 μ M) no muestra ningún efecto en la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β inducida por CCK-8 (1 nM) (Figura III-10, línea 6).

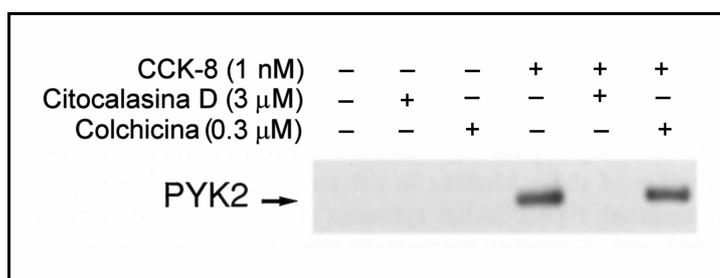


Figura III-10. Efecto de la citocalasina D y de la colchicina en la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β inducida por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se pretrataron durante 2 horas a 37 °C en ausencia o presencia de citocalasina D 3 μ M o colchicina 0.3 μ M. Después se incubaron durante 2.5 min en ausencia o presencia de CCK-8 1 nM. Para cuantificar la fosforilación en residuos de tirosina de la PYK2/CAK β se utilizaron los procedimientos descritos en el capítulo II. El panel muestra un film representativo de otros tres adicionales en duplicado.

3.3. Localización subcelular de las tirosinas cinasas de adhesión focal en respuesta a CCK en acinos pancreáticos

Diversos autores han descrito que tras la activación de las células por efecto de factores de crecimiento, oncogenes, o neurotransmisores (u hormonas) se puede detectar la redistribución celular de algunas proteínas fosforiladas en tirosina (282,683,842-844). Para examinar si esta posibilidad es efectiva con PYK2/CAK β o p125^{FAK}, investigamos en condiciones basales y después de la estimulación con CCK-8 la distribución de estas proteínas en la fracción citosólica y de membrana procedentes de acinos pancreáticos de rata (*Figura III-11*).

En acinos pancreáticos de rata no estimulados las tirosinas cinasas PYK2/CAK β y p125^{FAK} pueden ser localizadas tanto en la fracción citosólica como en la fracción de membrana (*Figura III-11, panel superior izquierdo -líneas 1 y 3-, y panel superior derecho -líneas 1 y 3-*). Los análisis densitométricos de las bandas indicaron que la PYK2/CAK β se encuentra mayoritariamente (77 ± 7 % del total) en la fracción de membrana de los acinos no estimulados (*Figura III-11, panel superior izquierdo -comparar líneas 1 y 3-, y panel inferior*); sin embargo, en condiciones basales la p125^{FAK} se encuentra mayoritariamente (86 ± 3 % del total) en la fracción citosólica (*Figura III-11, panel superior derecho -comparar líneas 1 y 3-, y panel inferior*).

Al estimular los acinos pancreáticos durante 2.5 min con CCK-8 (1 nM) se detecta una reducción del 59 ± 9 % en la cantidad de PYK2/CAK β presente en el citosol (*Figura III-11, panel superior izquierdo -comparar líneas 1 y 2-, y panel inferior*), pero éste descenso en el citosol no se corresponde con un incremento estadísticamente significativo de la PYK2/CAK β en la fracción de membrana después del tratamiento con CCK-8 (*Figura III-11, panel superior izquierdo -comparar líneas 3 y 4-, y panel inferior*).

Tras la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 (1 nM) durante 2.5 min se produce un incremento del 86 ± 32 % en la cantidad de p125^{FAK} detectada en la membrana (*Figura III-11, panel superior derecho -comparar líneas 3 y 4-, y panel inferior*). De nuevo las variaciones en una de las fracciones no se corresponden con variaciones en la complementaria. Así, el incremento en la cantidad de p125^{FAK} detectado en la membrana tras estimular las células con CCK-8, no es acompañado por un descenso estadísticamente significativo de la p125^{FAK} presente en

la fracción citosólica (Figura III-11, panel superior izquierdo -comparar líneas 1 y 2-, y panel inferior).

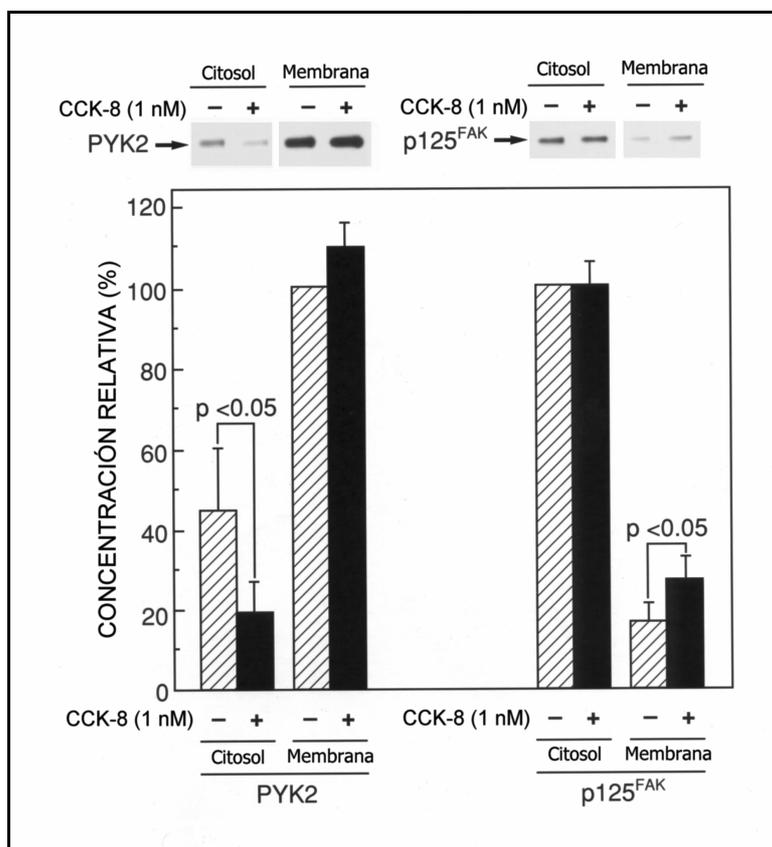


Figura III-11. Efecto de la CCK-8 (1 nM) en la localización subcelular de las tirosinas cinasas PYK2/CAK β y p125^{FAK} en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se incubaron durante 2.5 min en ausencia o presencia de CCK-8 (1 nM). Los lisados de las fracciones subcelulares (15 μ g por muestra) se analizaron sin realizar inmunoprecipitación previa mediante Western blotting con un anticuerpo monoclonal anti-PYK2 (panel superior izquierdo) o un anticuerpo monoclonal anti-FAK (panel superior derecho). En el panel superior se muestran sendos films, cada uno representativo de otros tres más en duplicado para cada proteína en cada fracción. En el panel inferior se muestra la concentración relativa de PYK2/CAK β (izquierda) o de p125^{FAK} (derecha) en cada una de las fracciones. Los resultados se han normalizado como porcentaje respecto a la máxima cantidad detectada (independiente para cada proteína) en las fracciones de acinos pancreáticos no estimulados. Por ejemplo, el máximo nivel de PYK2/CAK β se detectó en la fracción de membrana de células control y se normalizo a 100 %; los valores de la fracción citosólica y los valores de la fracción de membrana tras el tratamiento se expresan respecto a este. El valor normalizado 100 % de la p125^{FAK} se corresponde con la cantidad máxima detectada en células no estimuladas, que en este caso se encuentra en la fracción citoplasmática. Los valores son la media \pm EEM (n = 4).

3.4. Acercamiento a la posible función de la tirosina cinasa PYK2/CAK β en acinos pancreáticos

Varios estudios desarrollados en acinos pancreáticos de rata (263,681,682) han demostrado la activación de la vía de las MAPK después de la ocupación del receptor CCK_A. Además, en otros estudios llevados a cabo en diferentes sistemas celulares se ha sugerido que la PYK2/CAK β pudiera ser la tirosina cinasa responsable de la activación de la vía de señalización intracelular Ras/MAPK, cuando la activación de esta vía es inducida por receptores acoplados a proteínas G (260,283,604).

Para establecer si la PYK2/CAK β está implicada en la activación de la vía Ras/MAPK que acontece tras la ocupación del receptor CCK_A hemos realizado una aproximación metodológica, mediante la cual caracterizamos la interacción o formación de complejos inducida por CCK-8 entre la tirosina cinasa PYK2/CAK β y proteínas adaptadoras relacionadas con la vía Ras/MAPK (*Figura III-12*). Para evaluar la formación del complejo entre Grb2 y PYK2/CAK β se utilizaron técnicas de coimmunoprecipitación, mediante las que recuperamos en el inmunoprecipitado ambas proteínas utilizando exclusivamente el anticuerpo anti-Grb2 (*Figura III-12, panel superior derecho*), este hecho prueba que existe una unión entre estas dos proteínas. Además, encontramos que la formación del complejo Grb2-PYK2/CAK β inducida por CCK-8 1 nM no es estática, sino que depende del tiempo de estimulación, alcanzándose el máximo tras 2.5 min (*Figura III-12, panel superior derecho -ver banda 116 kDa-, y panel inferior derecho*). Las variaciones encontradas en la cantidad de PYK2/CAK β que coimmunoprecipita con Grb2 no se deben a diferencias en la carga de esta proteína, ya que el *Western blotting* con un anticuerpo monoclonal anti-Grb2 mostró una cantidad equiparable de proteínas entre todas las muestras (*Figura III-12, panel superior derecho -ver banda 31 kDa-*).

En otros tejidos se ha demostrado que una vía alternativa para la activación de la ruta de señalización intracelular de las MAPK implica la fosforilación en restos de tirosina de la proteína adaptadora c-Crk (845,846). Para establecer si la activación del receptor CCK_A pudiera estimular la asociación de la PYK2/CAK β con la molécula adaptadora c-Crk hemos evaluado la formación de complejos c-Crk-PYK2/CAK β mediante estudios de coimmunoprecipitación, buscando la presencia de ambas proteínas en los inmunoprecipitados obtenidos con un anticuerpo

monoclonal anti-Crk (Figura III-12, panel izquierdo). La estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-8 (1 nM) provoca la rápida formación de un complejo c-Crk–PYK2/CAK β , alcanzándose un efecto máximo a los 2.5 min (Figura III-12, panel superior izquierdo -ver banda 116 kDa-, y panel inferior izquierdo). Las variaciones observadas en la cantidad de PYK2/CAK β recuperada en inmunoprecipitados de c-Crk no se deben a la presencia de mayor o menor cantidad de esta última en los lisados de las muestras estimuladas con CCK-8, porque cuando analizamos estos inmunoprecipitados por Western blotting con el anticuerpo monoclonal anti-Crk, se observan cantidades similares de c-Crk en todas las muestras (Figura III-12, panel superior izquierdo -ver banda 40 kDa-).

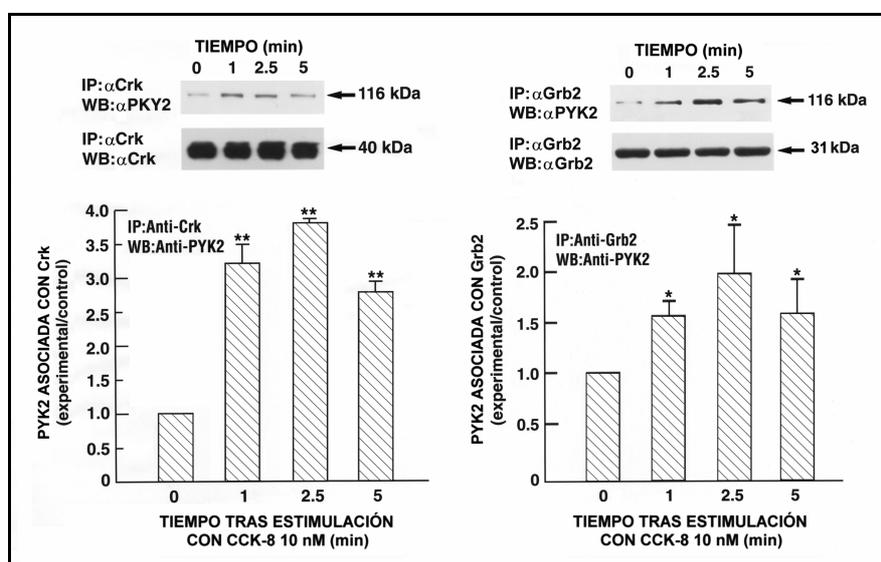


Figura III-12. Efecto de la incubación con CCK-8 (1 nM), en la asociación de PYK2/CAK β con c-Crk endógena (panel izquierdo) o con Grb2 (panel derecho). Los acinos pancreáticos de rata fueron incubados con una concentración 1 nM de CCK-8 durante los tiempos indicados y después se lisaron. Los lisados se inmunoprecipitaron (IP) con un anticuerpo monoclonal anti-Crk (α Crk) (panel izquierdo) o anti-Grb2 (α Grb2) (panel derecho) y los inmunoprecipitados se fraccionaron utilizando geles de poliacrilamida del 10 % y el 14 %, respectivamente. El Western blotting (WB) se realizó con un anticuerpo monoclonal anti-PYK2 (α PYK2) (panel izquierdo y derecho), con un anticuerpo monoclonal anti-Crk (α Crk) (panel izquierdo) y con un anticuerpo monoclonal anti-Grb2 (α Grb2) (panel derecho). Los paneles superiores muestran sendos films para cada proteína representativos de otros tres en duplicado. Los resultados incluidos en los paneles inferiores son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes expresados como el cociente de la cantidad de PYK2/CAK β unida a c-Crk (panel izquierdo) o a Grb2 (panel derecho) tras la estimulación con CCK-8 y la cantidad de PYK2/CAK β unida a esas proteínas en células no estimuladas (* p <0.05, ** p <0.01, con una t de Student para muestras no apareadas).

4. *Discusión*

Varios autores han demostrado recientemente que además de las integrinas (253,788), los lípidos bioactivos (283,366), el estrés celular (radiaciones, luz ultravioleta, cambios osmóticos) (810) y los factores de crecimiento (10,757), hay un gran número de receptores acoplados a proteínas G de membrana que pueden estimular la fosforilación en restos de tirosina y la activación de la tirosina cinasa citoplasmática PYK2/CAK β (10,11,260,283,782,784). En este sentido, algunos de nuestros resultados permiten concluir que la ocupación del receptor CCK_A, en sus estados de alta y baja afinidad, induce la fosforilación en restos de tirosina y la activación de PYK2/CAK β en acinos pancreáticos de rata, sugiriendo que esta proteína puede tener un papel significativo en las vías de señalización intracelulares que son activadas tras la ocupación del receptor CCK_A. Para llegar a esta conclusión nos basamos en las siguientes observaciones:

En primer lugar, cuando utilizamos un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina para realizar la inmunoprecipitación seguido por un *Western blotting* con el anticuerpo que específicamente reconoce PYK2/CAK β , o cuando utilizamos los mismos anticuerpos en orden inverso, encontramos que la CCK-8 induce un marcado incremento en la fosforilación en restos de tirosina de una única banda que muestra inmunoreactividad con PYK2/CAK β .

Segundo, la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β y su activación se producen rápidamente después de añadir CCK-8 a los acinos pancreáticos de rata, mostrando ambos procesos un incremento máximo entre 1 y 2.5 min tras la estimulación.

Tercero, el efecto de la CCK-8 en la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β se produce en un rango de concentraciones similar al que este neuropéptido induce cambios en la concentración del calcio celular (373,477), la generación de inosítoles fosfato (477,660), la secreción enzimática (660), la activación de las rutas de las MAPK (263), la fosforilación en restos de tirosina de la p125^{FAK}, p130^{CAS} y paxilina (477,683) y la incorporación de timidina tritiada (799).

Cuarto, la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK-JMV, un análogo de la CCK, provoca un claro incremento en la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β . Además, la CCK-JMV reduce la capacidad de

la CCK para estimular la fosforilación de PYK2/CAK β , llegando a inhibir la respuesta a la CCK-8 hasta los valores obtenidos utilizando solo CCK-JMV. Teniendo en cuenta que en acinos pancreáticos de rata la CCK-JMV se comporta como un agonista del estado de alta afinidad del receptor CCK_A y como un antagonista del de baja afinidad (264,369,835,836); los resultados descritos demuestran que el 20 % del incremento detectado en la fosforilación en tirosina inducida por CCK en la PYK2/CAK β se debe a la ocupación del receptor CCK_A en su estado de alta afinidad. El 80 % restante depende de la activación del receptor en su estado de baja afinidad. Esta conclusión está ampliamente apoyada por el hecho de que el margen de concentraciones en el que la CCK-8 induce la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β , concuerda con el rango de concentraciones en el que la CCK ocupa el receptor CCK_A en sus estados de alta y baja afinidad (369,477,660).

Como se ha descrito en la introducción, la estimulación de los acinos pancreáticos con CCK produce un incremento en la concentración de calcio intracelular en el que podemos distinguir dos componentes: uno inicial, dependiente de la liberación del calcio de depósitos intracelulares, y uno posterior, relacionado con la entrada de calcio del medio externo (4).

Estudios recientes, realizados en varios tipos celulares utilizando estímulos muy diferentes discrepan sobre cuál de los componentes de la señal de calcio citoplasmático es capaz de iniciar o modular la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β . Así, se ha descrito que la incubación en un medio libre de calcio y con EGTA inhibe parcialmente la fosforilación de la PYK2/CAK β , inducida por angiotensina II o PDGF en células de músculo liso vascular de rata (10), la obtenida tras la activación del receptor T en células Jurkat (791), y la observada tras la ocupación de los receptores P_{2Y2} por UTP en células PC12 (784), sugiriendo todos estos estudios que la entrada de calcio extracelular (*influx*) está implicada, al menos parcialmente, en la regulación de la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β en estas células. Por el contrario, otros autores han encontrado que la estimulación de la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β en células PC12 estimulada por bradiquinina o ácido lisofosfatídico (260,283,791), o la inducida por angiotensina II, tanto en células GN4 de hígado de rata (782) como en células del músculo liso vascular de rata (10), no se modifica por el tratamiento con EGTA en un medio libre de calcio; sin embargo, en estos casos la utilización de un quelante intracelular de calcio, como el BAPTA AM, es capaz de inhibir la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β total o parcialmente, sugiriéndose que la movilización del calcio intracelular juega un importante papel.

Asimismo, se han obtenido resultados contradictorios sobre el papel que juega la PKC en la fosforilación de la PYK2/CAK β . Estudios desarrollados en sistemas celulares muy diversos sugieren que la activación de la PKC modula la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β inducida tras la ocupación de receptores acoplados a la vía de la PLC, sin embargo, otros autores, en modelos diferentes, concluyen lo contrario. Así, se ha descrito que la inhibición de la PKC o la depleción de esta por *down-regulation* (o disminución autoinducida de los niveles celulares de PKC), muestran un efecto mínimo o nulo en la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β cuando es estimulada por bradiquinina en células PC12 (260), o por angiotensina II en fibroblastos cardíacos (811), sugiriendo que la activación de la PKC no está implicada en dicha fosforilación. Por el contrario, otros autores han descrito que los inhibidores de la PKC o la PKC *down-regulation*, permiten inhibir total o parcialmente la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β ; por ejemplo, cuando es estimulada por trombina en plaquetas (254), o tras la activación del receptor P_{2Y2} en células PC12 (784), o cuando es inducida por el PDGF en células del músculo liso aórtico de rata (10). Todos estos estudios concluyen que la activación de la PKC es, sino totalmente, al menos parcialmente, necesaria para que la fosforilación de la PYK2/CAK β pueda producirse.

Los resultados que hemos obtenido sobre este particular nos permiten concluir que en acinos pancreáticos de rata la movilización de calcio desde los depósitos intracelulares inducida por CCK-8, pero no el *influx* de calcio, es responsable de aproximadamente el 50 % de la estimulación máxima en la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β , y también que la activación de la PKC que acontece tras la ocupación del receptor CCK_A es responsable del 50% restante. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que en acinos pancreáticos de rata la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β estimulada tras la ocupación del receptor CCK_A depende en su totalidad de los dos componentes de señalización intracelular activados por la PLC.

El estudio de la regulación de la fosforilación en tirosina y activación de los dos miembros de la familia de tirosinas de adhesión focal, FAK y PYK2, en respuesta a la activación de diferentes tipos de receptores muestra variaciones dependiendo del tejido estudiado y del receptor (10,254,368,757,776). Por ejemplo, la p125^{FAK} no se fosforila o lo hace muy débilmente, mientras que la PYK2/CAK β sufre una marcada fosforilación en restos de tirosina en megacariocitos estimulados con el factor de crecimiento de células primordiales (*cell stem factor*) (776), o en células de músculo liso de rata tratadas con PDGF o angiotensina II (10,757). Al contrario, la fosforilación en tirosina de p125^{FAK}, pero no la

de PYK2/CAK β , es inducida por agregación plaquetaria (254), tras la activación de los receptores de glutamato en secciones de hipocampo de rata (368), o tras la adhesión de fibronectina en células del músculo liso aórtico de rata (757). También se ha descrito que la PYK2/CAK β tiene una distribución tisular más restringida que la p125^{FAK} (364,365,779), deduciéndose en estos estudios que ambas proteínas podrían ser equivalentes funcionales, pero específicos de cada tipo celular que las expresan. Además, en algunos estudios recientes, desarrollados con tejidos que expresan tanto la PYK2/CAK β como la p125^{FAK} se ha sugerido que estas tirosinas cinasas pueden tener funciones distintas, a pesar de que existe una alta homología en la estructura primaria de ambas (320,367,368,757). El hecho de que las células acinares de páncreas expresen de forma endógena ambos miembros de la familia de tirosinas cinasas de adhesión focal, así como, la estimulación de la fosforilación en tirosina, y por tanto de la actividad, de estas cinasas en respuesta a CCK-8 en este mismo tipo celular, hacen de estas células un modelo ideal para estudiar la regulación diferencial de la PYK2/CAK β y de la FAK en respuesta a la ocupación de receptores de membrana acoplados a proteínas G.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos realizado estudios paralelos con PYK2/CAK β y p125^{FAK}, y a su vez, nos hemos apoyado en resultados obtenidos previamente por otros investigadores de nuestro grupo (477). Nuestros resultados señalan que la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β y la de la p125^{FAK} están reguladas diferencialmente en acinos pancreáticos de rata tras la ocupación del receptor CCK_A. Este hecho podría indicar la existencia de funciones diferentes para esas cinasas en este tipo celular, afirmación que está fundamentada en los siguientes resultados:

En primer lugar, la fosforilación en restos de tirosina de PYK2/CAK β inducida por CCK en acinos pancreáticos de rata es más rápida y de mayor amplitud que la descrita previamente para la p125^{FAK} en el mismo tejido y ante el mismo estímulo (264,477).

En segundo lugar, al bloquear el incremento en la [Ca²⁺]_i o al inhibir la actividad de la PKC hemos sido capaces de reducir la fosforilación en tirosina de la PYK2, inducida por CCK en cerca del 50 %, mientras que la fosforilación de la p125^{FAK} no se afecta por estos tratamientos.

En tercer lugar, la inhibición simultánea de la movilización de calcio citoplasmático y de la actividad de la PKC, bloquea completamente la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β estimulada por CCK,

mientras que esta combinación consigue inhibir únicamente el 50 % de la fosforilación de p125^{FAK} estimulada por este neuropéptido.

Estos hallazgos demuestran que la fosforilación en restos de tirosina de la p125^{FAK} que acontece tras la ocupación del receptor CCK_A implica mecanismos dependientes e independientes de la activación de la PKC y del incremento en la [Ca²⁺]_i, mientras que la fosforilación de la PYK2/CAK β esta totalmente controlada por procesos intracelulares dependientes de la activación de la PKC y de la liberación de calcio de los depósitos intracelulares. En estudios realizados en secciones de hipocampo de rata (368) también se describe una regulación diferencial de ambas proteínas, afirmando que la fosforilación de una y otra es regulada de distinta forma por la PKC y por los cambios en la [Ca²⁺]_i, aunque en este tejido, contrariamente a nuestros hallazgos, la ionomicina estimula la fosforilación en restos de tirosina de la p125^{FAK}, pero no de la PYK2/CAK β , mientras que la activación de la PKC por TPA provoca la fosforilación de la PYK2/CAK β pero no de la p125^{FAK}. Estos resultados sugieren que la regulación de estas tirosinas cinasas, tras la activación de las vías intracelulares en respuesta a la ocupación de receptores acoplados a proteínas G de membrana, presenta marcadas diferencias dependientes del tipo celular.

Existen múltiples referencias bibliográficas que establecen una dependencia entre la activación y fosforilación de las tirosinas cinasas de adhesión focal y la organización del citoesqueleto de actina. En estos estudios se expone que la integridad del citoesqueleto de actina es fundamental para que varios neuropéptidos o lípidos bioactivos, como la bombesina o el ácido lisofosfatídico, sean capaces de provocar la fosforilación en restos de tirosina de la p125^{FAK} (316,620,699,847).

En nuestros experimentos con acinos pancreáticos de rata encontramos que la citocalasina D anula completamente la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β inducida por CCK, pero esta fosforilación no se afecta cuando inhibimos la síntesis de los microtúbulos mediante la preincubación de los acinos con colchicina. Nuestros resultados indican, por lo tanto, que la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β inducida por CCK depende de la integridad del citoesqueleto de actina, pero no del mantenimiento de la red de microtúbulos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, que también han encontrado una estrecha relación entre la integridad del citoesqueleto de actina y la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β cuando es inducida por trombina o angiotensina II (10,254,782), tras la activación del EGF-R con PDGF o con el factor de crecimiento de células primordiales (10,776), o tras la estimulación por integrinas (788,794). Asimismo, estos resultados son similares a los obtenidos por nuestro

grupo en el mismo tipo celular y que muestran una clara dependencia de la fosforilación en tirosina de la FAK en respuesta a CCK y EGF y la integridad del citoesqueleto de actina (264,477).

Se han realizado diversos estudios utilizando técnicas inmunocitoquímicas para establecer la distribución celular de la PYK2/CAK β en condiciones basales (253,364,367), encontrándose diferencias dependiendo del tipo celular estudiado. Así, en células embrionarias de pollo (367) la PYK2/CAK β se encuentra distribuida de forma difusa por toda la célula, mostrando una pequeña fracción asociada con las zonas de adhesión focal. En la línea celular CMK de megacariocitos la PYK2/CAK β y la p125^{FAK} se localizan en las zonas de adhesión focal (253); sin embargo, en células COS-7 la PYK2/CAK β aparece asociada con las zonas de contacto intercelular, pero no en las zonas de adhesión focal, en las que si se encuentra la p125^{FAK} (364).

Nuestros resultados demuestran que en condiciones basales la mayor parte de la PYK2/CAK β (77 %) se localiza en la fracción de membrana, mientras que la p125^{FAK} se encuentra mayoritariamente en la fracción citosólica (86 %), es decir, hemos encontrado una localización diferencial para PYK2/CAK β y p125^{FAK} en acinos pancreáticos de rata no estimulados, lo que podría corresponderse con la existencia de una compartimentalización celular que contribuiría a la diferente regulación que presentan estas cinasas tras la ocupación del receptor CCK_A. Otros autores aportan algunos datos que apoyan esta hipótesis; por ejemplo, se ha propuesto que la compartimentalización celular que presentan diferentes cinasas depende de la formación de complejos con el citoesqueleto, lo que favorecería la interacción de esas cinasas con diferentes sustratos y sustancias reguladoras (254,788). Esta propuesta es consistente con nuestros resultados, que muestran una relación muy evidente entre el citoesqueleto y la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β y p125^{FAK}.

Diversos autores han encontrado que tras la activación celular acontecen variaciones en la localización celular de ciertas tirosinas cinasas, como p125^{FAK}, p130^{CAS} o p60^{src} (282,683,842-844). Nuestros resultados concuerdan con esos estudios, ya que hemos detectado que las tirosinas cinasas PYK2/CAK β y p125^{FAK} sufren una redistribución celular después de la activación del receptor CCK_A en acinos pancreáticos de rata. Esta redistribución consiste en un descenso en la cantidad de PYK2/CAK β total (fosforilada o no) en la fracción citosólica, y en un incremento de la p125^{FAK} total en la fracción de membrana. Sin embargo, no hemos detectado un comportamiento recíproco en las fracciones mayoritarias de cada una de las cinasas, es decir, tras la activación no se

detecta un incremento en la cantidad de PYK2/CAK β presente en membrana, ni un descenso en la cantidad de p125^{FAK} del citosol, probablemente porque los cambios que se producen en las fracciones mayoritarias son proporcionalmente mucho más pequeños que los cambios detectados en las minoritarias. Esta es la primera ocasión en que se ha descrito una redistribución de la PYK2/CAK β tras la activación celular, aunque aún no podemos otorgarle un significado biológico a este proceso.

En estudios recientes realizados con ácido lisofosfatídico (283), con factores de crecimiento (848), o con algunos agonistas que actúan mediante receptores acoplados a proteína G, como la Angiotensina II (811,849), el UTP (759,784), la bradiquinina (260,283) y agentes alfa y beta-adrenérgicos (604), se demuestra que la activación de la tirosina cinasa PYK2/CAK β es un regulador intracelular de la capacidad que tienen estos estímulos para activar la vía de señalización intracelular de las MAPK (260,283,604,759,784,791,848).

La vía de las MAPK representa un punto importante de convergencia en la señalización intracelular, especialmente para aquellas señales implicadas en la regulación de la división y el crecimiento celular (21,323,385). Esta cascada está regulada por la fosforilación de las proteínas conocidas como MAPKs, unas serina/treonina cinasas entre las que se incluyen las p38MAPK, las JNK, y las ERK1 y 2 (21,323,385).

En estudios previos realizados en acinos pancreáticos de rata (263,681,682) se ha demostrado que la activación del receptor CCK_A induce la activación de la vía Ras/MAPK mediante un mecanismo que implica la movilización de calcio, la activación de la PKC, y el concurso de tirosinas cinasas. Sin embargo, el mecanismo completo mediante el que la CCK activa esta vía intracelular en acinos pancreáticos de rata no se conoce en su totalidad, y las tirosinas cinasas implicadas en este proceso aún no han sido identificadas. En un estudio reciente desarrollado en acinos pancreáticos de rata (850) se ha demostrado que la CCK induce la formación del complejo Shc-Grb2-SOS, el cual desempeña un papel central en la activación de la cascada Ras/MAPK (323). Sin embargo, se desconoce como la activación del receptor CCK_A conduce a la fosforilación en restos de tirosina de Shc y estimula la formación del complejo Shc-Grb2-SOS. Diversos autores, utilizando otro tipo de estímulos, han demostrado que la activación de la PYK2/CAK β podría ser el paso intermedio responsable de la activación de la vía de las MAPK por diversos mecanismos. Entre estos mecanismos se incluirían la activación de la ruta de Src (283,604), la transactivación del EGF-R (784,849), la estimulación de la ruta de JNK (366,810), y la fosforilación en tirosina de Shc y formación del complejo Shc-Grb2-SOS (260,283,604,811).

Varios de nuestros resultados sugieren que la fosforilación en restos de tirosina y la activación de PYK2/CAK β podría ser un intermediario fundamental para dirigir los sucesos que acontecen tras la activación del receptor CCK_A, es decir, el incremento en el calcio celular y la activación de la PKC, hacia la activación de la vía de señalización intracelular Ras/MAPK:

En primer lugar, hemos observado que la CCK induce una asociación entre PYK2/CAK β y Grb2 dependiente del tiempo de incubación. Estudios anteriores en otros tejidos han demostrado que cuando la PYK2/CAK β está fosforilada en restos de tirosina podría unirse a Grb2, bien directamente por medio de su dominio SH2, o bien indirectamente mediante la fosforilación en tirosina de Shc; e inducir posteriormente la unión entre Grb2 y SOS por dominios SH3, para finalmente promover la activación de la vía Ras/MAPK (11,254,260,283).

En segundo lugar, en el presente estudio hemos demostrado mediante técnicas de coimmunoprecipitación que la activación del receptor CCK_A en acinos pancreáticos de rata provoca la rápida formación de un complejo entre PYK2/CAK β y c-Crk. La proteína c-Crk pertenece a una familia de proteínas adaptadoras cuya estructura está constituida casi exclusivamente por dominios SH2 y SH3, y en la que se incluye el oncogen v-Crk, dos formas de c-Crk (Crk-I y Crk-II) y CrkL. La fosforilación en restos de tirosina de Crk induce su acoplamiento, a través de dominios SH3, con varios factores intercambiadores de nucleótidos de guanina, incluido SOS (319,758,846), cuya activación estimula la vía de señalización intracelular de las MAPK (21,323). Por tanto, la fosforilación en tirosina de la c-Crk ha sido propuesta como una vía alternativa para la estimulación de la vía de Ras/MAPK (452,845,846) por PYK2/CAK β .

En tercer lugar, hemos observado que la estequiometría y los tiempos en que la CCK induce la fosforilación en tirosina y activación de la PYK2/CAK β , son compatibles con lo descrito sobre la capacidad de la CCK para activar la vía de las MAPK en acinos pancreáticos (681,682,850). Concretamente, hemos encontrado que la fosforilación en restos de tirosina de PYK2/CAK β inducida por CCK y la estimulación de su actividad ocurre rápidamente (de 1 a 2.5 min), de forma que precede al incremento máximo en la fosforilación en tirosina de Shc y a la actividad MAPK inducidos por la CCK que, según han descrito otros autores, se produce tras 5 min de incubación (681,682,850). Además, la curva dosis respuesta para la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β obtenida en respuesta a la CCK-8 es similar a la descrita previamente por otros autores para la activación de la MAPK en acinos pancreáticos de

rata (681,682); ambas se encuentran en el rango de concentraciones en el que la CCK-8 induce cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ (477).

Por último, la dependencia de la movilización de calcio y de la activación de la PKC que tiene la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAKβ inducida por CCK, es muy similar a la descrita para la fosforilación en restos de tirosina de Shc (850), y para la activación de la vía de las MAPK (681,682). Así, de igual forma que en la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAKβ la activación de la PKC y el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducen la activación de las vías de señalización de las MAPK en acinos pancreáticos (681,682). Más aún, la activación simultánea de ambos procesos, es decir la activación de la PKC y la movilización del calcio, tiene un efecto sinérgico en la activación de las vías de las MAPK (682), al igual que ocurre con la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAKβ, según hemos descrito anteriormente. Además, hemos observado que la inactivación de la PKC con GF 109203X en acinos pancreáticos de rata inhibe la fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAKβ inducida por la CCK de modo comparable al descrito previamente para la vías de las MAPK (682) y para la estimulación de la fosforilación en restos de tirosina de la Shc (850) cuando son activadas por CCK.

Estos resultados sugieren, en su conjunto, que la PYK2/CAKβ podría ser una de la tirosinas cinasas que intervienen en la activación de la vía de señalización Ras/MAPK tras la ocupación del receptor CCK_A en acinos pancreáticos de rata, actuando según se muestra en el modelo propuesto para explicar la activación de esta vía de señalización intracelular en acinos pancreáticos tras la ocupación del receptor CCK_A (*Figura III-13*).

Como se ha discutido anteriormente este modelo es compatible con la conocida capacidad que la activación del receptor CCK_A tiene para estimular la vía PLC, desencadenando las dos cascadas de señalización intracelular esenciales para la activación de la PYK2/CAKβ, según ha sido indicado anteriormente. Además, hemos demostrado que la activación de la PYK2/CAKβ permite la formación de los complejos Grb2-PYK2/CAKβ y Crk-PYK2/CAKβ, que pudieran ser los responsables de activar la cascada de señalización Ras/MAPK. Si la activación de c-Src está implicada en la activación de la vía de la MAPK a través de PYK2/CAKβ, como ocurre en otros tejidos (283,308,604,851), aún no ha sido establecido en acinos pancreáticos de rata.

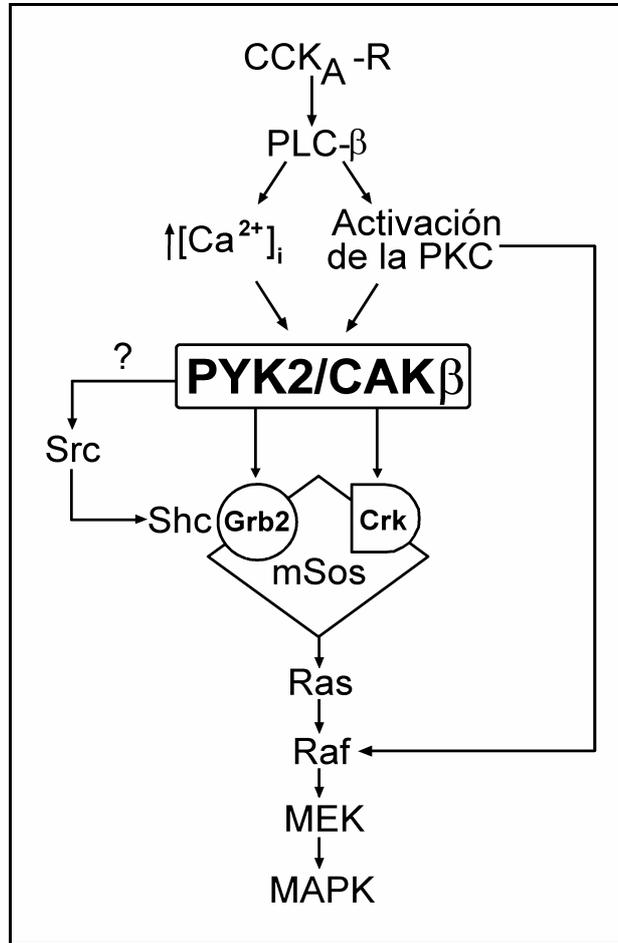


Figura III-13. Modelo propuesto para la activación de la vía de señalización intracelular de las MAPK mediada por el receptor CCK_A en acinos pancreáticos de rata. La ocupación del receptor CCK_A causa la activación de la PLC, que a su vez induce la movilización intracelular de calcio y la activación de la PKC. La estimulación simultánea de ambas cascadas de la PLC provoca la fosforilación y activación de la tirosina cinasa PYK2/CAK β . La activación de la PYK2/CAK β induce la unión de Grb2-SOS o del complejo Crk-SOS a la membrana. Estos complejos provocan la activación de Ras a través de SOS, y la subsiguiente activación de Raf, que inicia la vía de señalización de las MAPK. La PYK2/CAK β podría activar la unión del complejo Grb2-SOS directamente, o hipotéticamente a través de la activación de c-Src, lo que provocaría la fosforilación de la proteína adaptadora Shc. Esta última ruta se muestra con un interrogante porque actualmente no hay evidencia de que los cambios estimulados por CCK mediante PYK2/CAK β impliquen este proceso.

*IV. Familia de las
proteínas cinasas C:
PKC- δ*

1. Introducción

1.1. La familia de las proteínas cinasas C

La célula eucariota es una entidad altamente organizada que es capaz de responder a los cambios extracelulares e intracelulares de forma muy controlada. Los mecanismos por los que la célula responde a estímulos extracelulares (primeros mensajeros) implican inicialmente la transducción de señales a través de la membrana celular. Esta transducción está mediada generalmente por la producción de sustancias bioactivas (segundos mensajeros o mensajeros intracelulares) y por la capacidad de estos para inducir cambios conformacionales en proteínas reguladoras. Muchas de esas proteínas se han identificado como enzimas activadas por mecanismos alostéricos y covalentes. La proteína cinasa C (PKC) es una de estas enzimas. Ésta ejerce su acción fosforilando sustratos específicos, una de las formas más extendidas en las células eucariotas para provocar la modificación química de proteínas de forma covalente (21,196,197).

Existen numerosas referencias en la bibliografía otorgando a esta proteína un papel central en la transducción de señales en la célula. Así, se ha implicado a la PKC en la regulación del crecimiento y diferenciación celular, desarrollo neural, transmisión sináptica, regeneración axonal, contracción y relajación del músculo liso, secreción endocrina y exocrina, desarrollo de tumores, apoptosis y envejecimiento (138-140,852-860). Sin embargo, aún no se conocen completamente los mecanismos de regulación de la PKC y tampoco el papel biológico de sus sustratos.

La PKC fue identificada en 1977 y caracterizada inicialmente como una cinasa que se activaba por mecanismos proteolíticos (fue bautizada como *proteína cinasa M*) (861) y desde entonces ha suscitado un elevado interés, generándose gran cantidad de información que aparece recogida en numerosas revisiones (138-140,852-860).

1.1.1. Clasificación de las PKCs

La PKC es una familia de serina/treonina cinasas, de las que se han identificado hasta la fecha 11 componentes, que difieren en su distribución y nivel de expresión en distintos tejidos, su diferente interacción con lípidos y proteínas, y su distribución intracelular (139,856). Estas 11 isoformas se clasifican en tres grupos atendiendo a su estructura y a sus requerimientos alostéricos (139,856). El primer grupo está formado por las *PKCs convencionales* (cPKC: α , β I, β II y γ) que dependen de calcio y son activadas por fosfolípidos, DAG y ésteres de forbol (TPA). El segundo grupo, o *novel PKCs* (nPKC: δ , ϵ , η y θ), se activan por DAG y TPA pero son insensibles al calcio. El tercer grupo, o *PKCs atípicas* (aPKC: ζ , λ (1) y μ), también son insensibles al calcio y no responden a DAG o TPA (139,856,862). La PKC- ι y la PKC- λ fueron identificadas independientemente en humanos y ratones, respectivamente, pero presentan una alta homología y actualmente son consideradas la misma proteína (139,856,863). La PKC- μ es una PKC de alto peso molecular que posee ciertas características diferenciales del resto, como por ejemplo un hipotético dominio transmembrana, que hacen difícil encuadrarla en cualquiera de las categorías anteriores (139,856,864,865). En el ratón se ha descrito independientemente una proteína cinasa D (PKD) que presenta un alto grado de identidad con la PKC- μ pudiendo ser considerada la misma isoforma (139,856,865,866).

1.1.2. Estructura de las PKCs

Todas las PKC tienen en común la presencia en su estructura de dos regiones muy diferenciadas: un **dominio catalítico**, en el extremo C-terminal con actividad cinasa, y un **dominio regulador** N-terminal (*Gráfico IV-1*). Ambas regiones presentan segmentos altamente conservados (segmentos C, *Gráfico IV-1*) y regiones variables (segmentos V). La región variable V3 situada entre los dos dominios descritos se denomina *región bisagra* y parece ser la zona de la cadena responsable del cambio conformacional que acontece tras la activación (856).

El **dominio catalítico** se extiende desde la región C3 hasta la V5 y es muy similar a dominios catalíticos de otras serinas/treoninas cinasas. Estos dominios contienen secuencias consenso para la unión de ATP, la región de transferencia del fosfato y el sitio de unión del sustrato (228,855,856). El grado de homología en la secuencia de aminoácidos de

la región cinasa para todas las PKCs es de al menos el 50 %, con la excepción de la PKC- μ con un grado de homología menor (856,858,866).

El **dominio regulador** contiene varias regiones que permiten la interacción de la proteína con lípidos y cofactores necesarios para su activación (862,867). La región V1 contiene una secuencia considerada como un pseudosustrato que es muy similar a secuencias de fosforilación para PKCs, excepto porque el residuo serina/treonina diana está sustituido por un aminoácido no fosforilable, generalmente alanina (855,868). En la región C1 (*segmento C1/C1*, *Gráfico IV-1*) de las cPKCs y nPKCs se encuentran dos dominios ricos en cisteína implicados en la unión de DAG, el activador fisiológico de las PKCs, y los ésteres de forbol, como el TPA o el forbol dibutirato (PDBu) (139,856). El dominio C2 (*segmento C2*, *Gráfico IV-1*) está presente sólo en las cPKCs y parece ser responsable de la unión con el calcio, un ion necesario para la activación de estas isoformas. Una región similar a C2 ha sido identificada en las nPKCs, pero perdiendo aminoácidos que se supone son esenciales para la unión de cationes divalentes. Esta secuencia (*segmento C2?*, *Gráfico IV-1*) está presente en el segmento amino terminal de la extensa región V1 de las nPKCs (856,869). Otros autores indican que además de la región C2, los dominios ricos en cisteína también son importantes para la interacción con lípidos dependiente de cationes (870,871). Las aPKCs difieren del resto en que contienen un único dominio rico en cisteína en el dominio regulador y, por tanto, no se activan por DAG o ésteres de forbol.

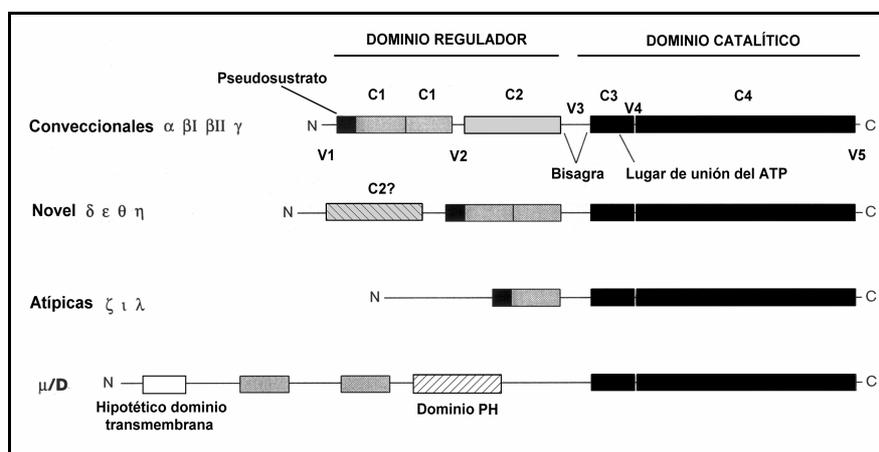


Gráfico IV-1. Estructura de las proteínas cinasas C. Adaptado de (856).

A pesar de que la PKC- μ presenta un dominio catalítico equivalente y dos regiones de cisteína en su dominio regulador, esta isoforma posee características estructurales muy diferentes del resto de PKCs. Entre las características diferenciales más destacables se encuentran: el espacio inusualmente largo entre los dominios de cisteína (74 aa) y su escasa capacidad para unir ésteres de forbol, la presencia de un dominio PH y un hipotético dominio transmembrana en su estructura y, finalmente, la pérdida de la región que actúa como pseudosustrato, lo que podría explicar la actividad cinasa constitutiva que aparentemente presenta en estudios *in vitro* (864,872). Esta isoforma es dependiente de fosfolípidos e independiente de calcio (864,872).

1.1.3. Variación del contenido en isoenzima en función del tejido

Se ha determinado mediante análisis por *Northen* o *Western blot* la distribución de las isoenzimas PKC (esta distribución aparece resumida en la *Tabla IV-1*) (855,873). Las PKC- α , β I, β II, δ , ϵ y ζ parecen ser isoenzimas ubicuas que aparecen en la mayoría o en todos los tejidos (855,873,874). La presencia de la PKC- γ se encuentra restringida al sistema nervioso central y médula espinal (862,873), mientras que la PKC- η se expresa mayoritariamente en la piel, corazón y pulmón y, en menor medida, en el bazo y el cerebro (875,876). La PKC- θ está presente fundamentalmente en el músculo esquelético y células hematopoyéticas y, en menor proporción, en el pulmón, el bazo, la piel y el cerebro (877,878). La PKC- λ / ι se ha encontrado en numerosos tejidos, y es muy abundante en una línea celular embrionaria de carcinoma de ratón (863). Por último, la PKC- μ también se ha encontrado en numerosos tejidos pero se expresa en mayor medida en timo y pulmón (879).

Varios autores han relacionado la variación de los niveles de las PKCs en los diferentes tejidos con diferencias en su expresión; sin embargo, este hecho no ha sido demostrado inequívocamente, teniendo en cuenta que no se ha buscado la causa de estas variaciones a nivel de transcripción génica. En otras palabras, aún se está lejos de tener una idea clara sobre cómo se regula la distribución de estas isoenzimas según el tipo de tejido (139).

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

diferencias entre las células cultivadas y el tipo celular de procedencia (139). El perfil de las isoenzimas en el hígado de rata, que incluye a la PKC- α , β II, δ , ϵ y ζ , es constante, independientemente de que las muestras se obtengan de tejido homogeneizado, de hepatocitos aislados desde tejido no cultivado o de células FAO de hepatoma de rata (880-882). Su contenido en isoenzimas fue similar al de la línea celular HepG2 de hepatoma humano, a excepción de la PKC- δ , que no se detectó (882). Estos resultados sugieren que el estudio de líneas celulares cultivadas puede constituir una buena aproximación para el estudio del perfil de las isoenzimas en los diferentes tipos celulares. Sin embargo, se necesitan bastantes datos sobre el cultivo celular y el tejido de procedencia para determinar si ambos son comparables (139).

El patrón de expresión de las isoformas de la PKC en el hígado de rata no se mantiene en los nódulos pre-neoplásicos y hepatomas, en este caso los niveles de PKC- ϵ son netamente superiores en las muestras de origen patológico que en las del tejido sano (881,882). Otros autores también han encontrado diferencias en el contenido en isoenzimas entre células normales y sus homólogas transformadas. Por ejemplo, el nivel de PKC- β y PKC- α en linfocitos T normales fue superior al encontrado en células T leucémicas de adulto (883). Estos hallazgos sugieren una relación entre el perfil de isoformas de la PKC y la transformación neoplásica (139).

En el tejido nervioso también se ha estudiado en profundidad la distribución de las isoenzimas de la PKC. Las isoenzimas convencionales están presentes en las terminales axónicas y en las dendritas post-sinápticas de los nervios sensoriales, la PKC- δ predomina en los cuerpos neuronales y la PKC- ϵ se concentra en las terminales pre-sinápticas del sistema nervioso central (884,885). También existen importantes variaciones en la localización subcelular de las isoenzimas en el sistema nervioso (884,885). Estos hallazgos confirman que existe una distribución diferencial en función del tipo celular dentro de un tejido (139).

Gardner y cols. (684), utilizando técnicas de *immunoblotting* describieron en 1994 la presencia en los acinos pancreáticos de rata de las isoformas α , δ , ϵ y ζ de la PKC. Sin embargo, en un trabajo posterior publicado en 1995, basándose en técnicas inmunohistoquímicas consideraron la posibilidad de que la PKC- δ no estuviese presente en los acinos pancreáticos y que sus hallazgos iniciales fuesen una consecuencia de la contaminación de las muestras con células beta pancreáticas (886). Sin embargo, investigaciones subsiguientes han establecido que la PKC- δ se encuentra presente en los acinos pancreáticos, aunque con un nivel de

expresión inferior al detectado en las células beta (887). Raffaniello y cols. (887) han caracterizado el perfil de isoformas de la PKC en acinos pancreáticos de rata, encontrando las isoformas inicialmente descritas: α , δ , ϵ y ζ ; además han detectado la isoforma θ en este tipo celular, aunque con niveles muy bajos. Este perfil de expresión se mantiene en las líneas celulares acinares BMRPA.430 y TUC3 (887).

Por su parte, Rodríguez-Martín y cols. (888) han confirmado la presencia de la PKC- δ en acinos pancreáticos, junto con las isoformas α y ϵ . Estos autores han descrito, además, la distribución vesicular de las tres isoformas mencionadas en el polo apical de los acinos pancreáticos.

Isoformas	Pm (kDa)	Nº de Aa	Activadores	Tejido
CPKC				
α	76.8	672	PS, Ca ²⁺ , DAG, FA, 1,25-D ₃ , TPA	Ubicua
β I	76.8	671	PS, Ca ²⁺ , DAG, FA, TPA	Muchos tejidos
β II	76.9	673	PS, Ca ²⁺ , DAG, FA, TPA	Muchos tejidos
γ	77.5	697	PS, Ca ²⁺ , DAG, FA, 1,25-D ₃ , TPA	Nervioso
nPKC				
δ	77.5	674	PS, DAG, PI, FA, TPA	Ubicua
ϵ	83.5	737	PS, DAG, PI, 1,25-D ₃ , TPA	Nervioso, inmune, epitelio, corazón
η	78.0	683	PI, TPA	Nervioso, epitelio
θ	81.6	707	PI, TPA	Ovario, músculo esquelético, plaquetas
APKC				
ζ	67.7	592	PS, FA, PIP ₃ , ceramida, PA	Muchos tejidos
ι/λ	67.2	586	No se conoce	Ubicua
PKC				
μ	115.0	912	No se conoce	Muchos tejidos (timo, pulmón)

Tabla IV-1. Localización subcelular y otras características de las diferentes isoformas de la PKC. FA: ácidos grasos. Adaptado de (855).

1.1.4. Activación de la PKC mediante modificaciones post-translacionales

La PKC no puede ser activada a menos que sea fosforilada post-translacionalmente o co-translacionalmente (889). Se ha demostrado mediante estudios de mutagénesis dirigida que la PKC- α y la PKC- β II son fosforiladas en los residuos homólogos treonina 497 y treonina 500, respectivamente, que forman parte de una estructura denominada *asa de activación (activation loop)* en la entrada del sitio catalítico. Esta región también sufre fosforilación en otras cinasas, como la PKA, la cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2), las MAP cinasas y muchas tirosinas cinasas. Aunque se consideró factible la fosforilación en la PKC- α de la treonina 495 (890,891), más tarde se comprobó que este aminoácido no experimentaba fosforilación (892).

Además del residuo treonina 500 en el asa de activación, la PKC- β II se fosforila en los residuos de treonina 641 y serina 660 en el extremo carboxilo (*Gráfico IV-2*). Se han detectado residuos con grupos hidroxilo en posiciones equivalentes en todos los miembros de la familia PKC, con excepción de la PKC- μ , donde estudios de comparación de secuencia no han detectado los residuos de fosforilación correspondientes en su extremo C-terminal (140,856,892).

La proteína cinasa C recuperada de la fracción celular soluble en detergentes está completamente fosforilada en las dos posiciones del extremo C-terminal, y aproximadamente la mitad del total también se encuentra fosforilada a nivel del asa de activación (892). Según se producen las sucesivas fosforilaciones, la proteína va incrementando su peso molecular hasta alcanzar unos 80 kDa (para las cPKCs) cuando las fosforilaciones se han completado (140,893). La proteína cinasa C en la fracción celular no soluble en detergentes, contiene especies que migran más rápido correspondiéndose con las enzimas no fosforiladas o las fosforiladas exclusivamente en el asa de activación. Ambas migran con un peso molecular aparente de 76 kDa (para las cPKCs) (140,893).

Cuando la treonina 500 de la PKC- β II se sustituye por un residuo no fosforilable, el enzima resultante es inactivo (234,891). La permutación de la treonina 495 en la isoforma α por un residuo ácido produce la expresión de un enzima con actividad catalítica, lo que parece indicar que cualquier carga negativa en el asa de activación es suficiente para alinear correctamente los residuos alrededor de la región catalítica (890,891). También se ha establecido que las proteínas cinasas C no pueden autofosforilarse en estos residuos equivalentes, por lo que debe existir otra cinasa que las fosforile en esta posición (140). Recientemente se ha

descrito que una de las *PKC cinasas* responsables de esta fosforilación es la PDK1 (proteína cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítidos) (894-896). El asa de activación es el primer lugar fosforilado en los mecanismos que convierten a la PKC en un enzima catalíticamente competente; sin embargo, este lugar de fosforilación parece ser inaccesible cuando el pseudosustrato ocupa el sitio activo, por lo que debe encontrarse fuera de esta localización para que ocurra dicha fosforilación (140,897).

Todos estos procesos se han caracterizado más extensamente mediante estudios con fosfatasas. Así, recientemente se ha investigado la desfosforilación diferencial de la isoenzima β II, por subunidades catalíticas de fosfatasas 1 (PP-1) y 2A (PP-2A) (892). La PP-1 desfosforila a los residuos treonina 500, treonina 641 y serina 660, cerca del extremo carboxilo, produciendo una proteína inactiva. Por su parte, la PP-2A desfosforila únicamente a la treonina 500 y a la serina 660 y produce una proteína que puede autofosforilarse para recuperar su funcionalidad (892). Aparentemente, existe discrepancia entre este último hallazgo y las evidencias que demuestran que la treonina 500 experimenta la fosforilación inicial antes de que la PKC llegue a ser activa y que, además, este residuo no se puede autofosforilar (892,897).

Sin embargo, esta divergencia ha sido resuelta: después de la fosforilación en el asa de activación, la PKC se fosforila en el residuo Thr 641 (en el caso de la PKC- β II), probablemente por una reacción de autofosforilación debido a la proximidad del extremo C-terminal con el sitio catalítico (*Gráfico IV-2*) (140). Esta fosforilación aparentemente bloquea a la PKC en una conformación catalíticamente competente, posiblemente porque sitúa al extremo C-terminal lejos del sitio activo (*Gráfico IV-2*) (140). Por tanto, la desfosforilación selectiva del residuo en el asa de activación resulta en un enzima que retiene la actividad catalítica; por el contrario, la desfosforilación en el residuo Thr 641 se corresponde con un enzima no activable (140).

La tercera fosforilación se produce en el residuo Ser 660 y, de nuevo, es una reacción de autofosforilación. Esta fosforilación final se correlaciona con la liberación de la PKC en el citosol, por lo que se le atribuye un papel directo en la localización subcelular de la PKC (*Gráfico IV-2*) (140).

Por tanto, a modo de resumen, las dos reacciones de autofosforilación se producen en el extremo C-terminal y son posteriores a la fosforilación en el asa de activación, la cual depende a su vez de una hipotética PKC cinasa (probablemente PDK1) (895). En células no estimuladas, la mayor parte de la PKC presenta esta triple fosforilación, hecho que sugiere que la fosforilación en estos tres lugares conservados

está implicado en el procesado o maduración del enzima, más que en modular su función en respuesta a señales específicas (140). Sin embargo, la localización subcelular de la PKC podría estar regulada por defosforilaciones en estos tres residuos (140).

1.1.5. Activación de la proteína cinasa C por agonistas

Se desconocen los mecanismos de activación de la PKC, sin embargo, se han establecido en parte los de las cPKC (138,140,853,856,896). Esta parece implicar complejas interacciones entre la cinasa y sus activadores.

En primer lugar se requiere la asociación del enzima con fosfolípidos de la membrana plasmática, en particular con la fosfatidilserina (PtdSer). La PKC se une a la PtdSer en ausencia de cationes metálicos mediante interacciones electroestáticas con los dominios catalítico y regulador (138,140,856). La unión resulta ser más eficiente en presencia de calcio, además, este efecto es modulado de forma dependiente de la concentración (898). Se cree que el calcio puede participar en el acoplamiento con los fosfolípidos de la PKC formando un puente entre ésta y el lípido ácido (899). En ausencia de fosfolípidos, la PKC une un átomo de calcio por molécula, sin embargo, cuando los fosfolípidos están presentes al menos se unen ocho átomos por cada proteína (853). Los lugares de unión del calcio se localizan en la interfase entre la PKC y la membrana plasmática a nivel del dominio C2 (138,853).

La PKC, aunque se encuentre unida con el complejo fosfolípido/calcio, solamente demuestra competencia catalítica cuando se asocia con DAG, que permite la activación completa de la PKC incrementando su afinidad por la PS y disminuyendo los requerimientos de calcio hasta niveles fisiológicos ($<1 \mu\text{M}$) (140,853,856). En ausencia de DAG, la PKC se puede activar cuando las concentraciones de calcio son muy elevadas (aproximadamente cien veces el valor fisiológico) (900). Además, el DAG incrementa la afinidad de la PKC por el sustrato (140,853,856).

Actualmente se piensa que el mecanismo molecular por el que el DAG activa la PKC se fundamenta en la modificación alostérica del enzima por lípidos (140,853,856). En presencia de calcio, la unión de la PtdSer y el DAG al dominio regulador N-terminal de la cPKC induce cambios conformacionales que se acompañan de la disociación de la región pseudosustrato N-terminal inhibidora de su localización en el dominio

catalítico. En este mecanismo el ligando C2 (por ejemplo la PtdSer) actuaría como un anclaje electrostático que permite mantener la PKC en la membrana y las interacciones del DAG y el calcio permitirían separar al pseudosustrato del lugar de unión del sustrato, provocando la activación máxima de la enzima (*Gráfico IV-2*) (140,853,856).

La producción de DAG y la liberación de calcio se estimula de modo transitorio por la hidrólisis del PtdIns(4,5)P₂ cuando se activan las vías de la PLC β por las subunidades α de las proteínas heterotriméricas G_q y G₁₁ (2,4), según se ha descrito en el capítulo I de esta Tesis Doctoral. Por otra parte, la generación del DAG puede tener orígenes alternativos al PtdIns(4,5)P₂, entre los que se incluyen la hidrólisis de la PtdCho, la fosfatidiletanolamina y glicolípidos que contengan inositol (2,4,853). Estas reacciones, que están catalizadas por otras isoformas de la PLC y por la PLD, producen ácido fosfatídico que a su vez puede ser degradado a DAG por una fosfohidrolasa (*véase Gráfico I-3; pág. 23*) (2,4,853).

Después de la estimulación con agonistas se ha detectado en varios tejidos un rápido incremento en la cantidad de DAG celular, por ejemplo en el páncreas de ratón estimulado con varios secretagogos pancreáticos como CCK y bombesina (671). La cantidad de DAG que se produce por la hidrólisis de los lípidos mencionados diferentes del PtdIns(4,5)P₂, es mucho mayor que la generada por la hidrólisis de este último y, además, su producción se mantiene durante más tiempo (*véase Gráfico I-3; pág. 23*) (2,4,853).

La PKC también puede ser activada por fosfoinosítidos como el fosfatidilinositol (PI), el fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP), el fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP₂) y el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), en presencia de calcio y PtdSer (853,901). El PIP, PIP₂ y PIP₃, son sintetizados por la fosforilación secuencial de PI, PIP, PIP₂ por la PI-4 cinasa, PI-5 cinasa y PI-3 cinasa, respectivamente (853,901). La afinidad y potencia de estos fosfoinosítidos activando la PKC se incrementa con el grado de fosforilación de cada uno de ellos, por lo tanto: PIP < PIP₂ < PIP₃ (140,853,856). Se ha propuesto que en presencia de calcio el PIP₃ se une al dominio C1 mediante puentes de hidrógeno dependientes de sus grupos carbonilo y que interacciona electrostáticamente con el dominio C2 y el calcio mediante sus grupos fosfatos; sin embargo, en ausencia de calcio, los grupos fosfatos se podrían unir a grupos básicos de la PKC causando su inactivación (140,853,856).

Por otra parte, en contraste con los estudios previos, otros estudios realizados *in vivo* han demostrado que los fosfoinosítidos PI(3,4)P₂ y el PI(3,4,5)P₃ activan a las nPKCs pero no las cPKC o la PKC- ζ (138,902). La activación por PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃ de las nPKCs es

fisiológicamente importante puesto que estos productos, que dependen de la actividad de la PI3-K, actúan potencialmente como segundos mensajeros específicos de las nPKCs (138,853). Como ya se ha indicado, la PI3-K es activada por factores de crecimiento y por productos de oncogenes (420,422) y, por lo tanto, la generación de PI(3,4)P₂ y el PIP₃ representa un mecanismo por el que las nPKCs pueden mediar las señales intracelulares dependientes de factores de crecimiento y oncogenes (138,853).

Adicionalmente, todas las cPKCs, particularmente las isoenzimas γ y β II, pueden ser activadas por ácidos grasos insaturados de isomería *cis* como por ejemplo el ácido araquidónico, oleico y linoleico, que derivan de la membrana en un proceso catalizado por la PLA₂ (140,853,856). Estos ácidos grasos activan las cPKCs con concentraciones de calcio muy bajas (<1 μ M) o en ausencia de este ion, sin embargo, esta activación está muy facilitada en presencia de zinc (140,853,856). La activación estimulada por ácidos grasos es independiente de PtdSer, este hecho ha sido interpretado por algunos autores como una activación de la PKC independiente de membrana, indicando que los ácidos grasos solubles activan a la PKC soluble para fosforilar diferentes grupos de sustratos (140,853,856). Por otra parte, las nPKCs, particularmente la PKC- δ , también se activan por ácidos grasos, de hecho se activan a concentraciones menores que las cPKCs (140,853,856). En cualquiera de los casos, el mecanismo de activación estos ácidos grasos no se conoce enteramente (140,853,856).

Cantidades micromolares de acilos de cadena larga saturados o insaturados unidos a coenzima A (Acil-CoA) también incrementan la actividad de las cPKCs en presencia de DAG, PtdSer y calcio, pero inhiben la actividad a concentraciones altas no fisiológicas (> 0.5 mM), sugiriéndose que estos Acil-CoAs son importantes moduladores de la actividad de las cPKCs estimulada por la vía PLC/PI (140,853,856).

Otro hecho destacable es que el metabolito central de la hormona esteroidea vitamina D₃, el 1 α ,25-dihidroxicolecalciferol, estimula las isoformas α , γ , y ϵ de la PKC a concentraciones fisiológicas, de forma similar al DAG (140,853,856). Esta activación se ha asociado con la mediación por la PKC de diversos efectos no genómicos estimulados por la hormona (140,853,856). Finalmente, la ceramida, un metabolito directo de la hidrólisis de la esfingomielina, puede activar la PKC- ζ tanto *in vivo* como *in vitro* (140,853,856).

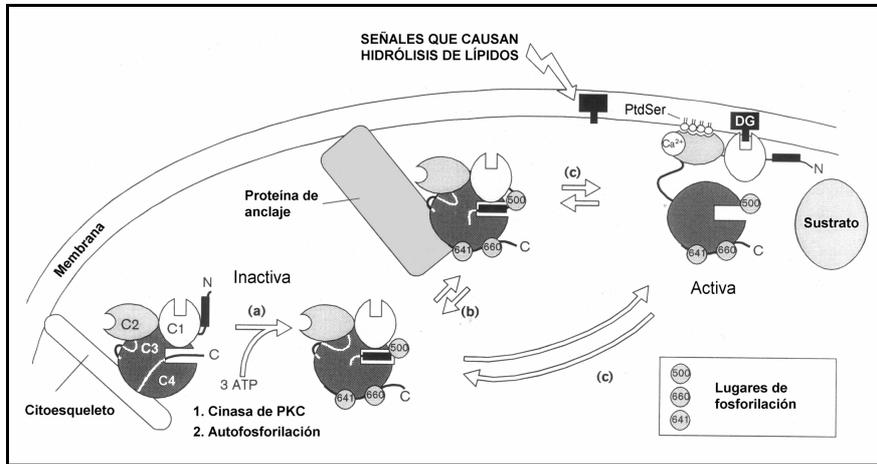


Gráfico IV-2. Modelo de la regulación de la PKC por fosforilación, proteínas específicas y cofactores. Los dominios (C1-C4) de la proteína cinasa C han sido descritos en el texto y aparecen esquematizados en el Gráfico IV-1. Según este modelo, la PKC de nueva síntesis se asocia con elementos del citoesqueleto, en una conformación en la que se encuentra expuesta el asa de activación (representada como un espacio entre el dominio C3 y C4), y la región C-terminal se dispone cerca del sitio de activación. (a) La fosforilación por una hipotética cinasa de PKC en el asa de activación expuesta (Thr 500 en la PKC- β II) alinea los residuos correctamente para el proceso catalítico, permitiendo de esta forma la autofosforilación en dos residuos del extremo C-terminal (Thr 641 y Ser 660 en la PKC- β II). La fosforilación en el primero de esos dos residuos (Thr 641 en la PKC- β II) bloquea la cinasa en una conformación catalíticamente competente, en un proceso que podría implicar el desplazamiento del extremo C-terminal fuera del sitio activo, y, a cambio, la inserción en esta localización de la región pseudosustrato (rectángulo negro N-terminal). La subsiguiente fosforilación en el segundo residuo C-terminal (Ser 660 en la PKC- β II) libera la PKC madura en el citosol; (b) el destino de la PKC madura puede ser regulado por las proteínas de anclaje específicas. La interacción con esas proteínas dispone a la cinasa para una rápida respuesta al segundo mensajero diacilglicerol (DG); (c) la unión del DG al dominio C1 y de la fosfatidilserina (PtdSer) al dominio C2, ocasiona la eliminación del pseudosustrato del lugar activo (la unión de la PtdSer o DG, puede ser requerida o no serlo, o ser facilitada por el paso [b] descrito). Aunque la PKC puede unirse a la membrana por un único dominio (indistintamente el C1 o el C2), ambos deben estar unidos para alcanzar la interacción de máxima afinidad que se acompaña con la retirada del pseudosustrato del sitio activo. El dominio C2 de las PKC convencionales también tiene lugares de unión para calcio, ion que incrementa alostéricamente la afinidad de este dominio por la PtdSer. La interacción de esta forma activada de PKC con proteínas específicas, como las RACKS (receptores para cinasas C activas; no se representan en la figura), podrían posicionar la cinasa en la proximidad de sustratos específicos. Adaptado de (140).

1.1.6. Activación constitutiva y degradación proteolítica de la PKC

Se piensa que la región bisagra de las PKCs situada entre el borde de la región V3 y el dominio catalítico es un sitio susceptible de sufrir ruptura proteolítica por tripsina o por las proteasas neutras dependientes de calcio calpain I y II, generando dos fragmentos distintos: el dominio regulador y el catalítico (903-906). Esta fragmentación produce una cinasa constitutivamente activa (904,906). El fragmento cinasa producido *in vivo* podría jugar un papel en el control de las funciones celulares (904,907) si se tiene en cuenta el hecho de que ciertas respuestas celulares que implican el concurso de la PKC pueden ser bloqueadas utilizando el inhibidor de proteasas leupeptin (908). La especificidad del sustrato de este fragmento catalítico también difiere de la que presenta la enzima completa (874,909,910). Otro lugar de ruptura puede encontrarse entre las regiones del pseudosustrato y los dominios con forma de dedo que unen el zinc y, finalmente, parece que la PKC puede ser hidrolizada en un lugar dentro del dominio catalítico (911).

Los mecanismos que eliminan la forma activa de la PKC de la célula implican el concurso de una o más de estas rupturas proteolíticas (139,858,903,912). Esta afirmación está fundamentada por el hecho de que la calpain I y II se activan *in vivo* por concentraciones de calcio de orden micromolar y milimolar, respectivamente, y también por el hecho de que la translocación de la PKC a la membrana parece acelerar la ruptura proteolítica. Aunque aún no se ha establecido como este proceso inicia la degradación proteolítica, la translocación parece limitar o finalizar la actividad cinasa de algún modo. Sin embargo, el fragmento catalítico podría tener actividad cinasa de forma constitutiva, al menos durante algún tiempo, cuando es liberado desde la membrana al citosol o a otros compartimentos subcelulares (139,855,912).

1.1.7. Down-regulation

Cuando la célula es expuesta de forma prolongada a ésteres de forbol se produce la depleción casi completa de algunas isoformas de la PKC, probablemente por mecanismos de proteólisis (855,903). Este proceso, denominado *down-regulation*, ha sido demostrado para la mayoría de las isoformas que unen ésteres de forbol (855,903). Las proteínas del citosol podrían ser degradadas en los proteosomas, mientras que las asociadas con las membranas lo serían en vacuolas o lisosomas

(913). Las isoformas PKC- μ y ζ presentan poca afinidad por los ésteres de forbol y, generalmente, no se afectan por este mecanismo (879,914,915).

Después del tratamiento con TPA, el nivel inicial de PKC- α se ve reducido mediante un incremento neto de la proteólisis sin variaciones en su nivel de síntesis (916). Aunque se ha descrito en algunas ocasiones (917,918) parece que es difícil inducir una *down-regulation* completa de la PKC- α en muchos tipos celulares (853,919). Por el contrario, existen muchas referencias que describen una *down-regulation* completa de la PKC- β en la mayor parte de los tipos celulares (853,855). Sin embargo, en células T el TPA es incapaz de inducir la *down-regulation* de la isoforma β , aunque se trata de un hecho inusual puesto que en este tipo celular el TPA induce un cambio compensatorio en los niveles de ARNm y niveles de síntesis proteica de esta isoforma (860,920).

El efecto de la *down-regulation* en las nPKCs es variable. Las isoformas δ y ϵ han sido eliminadas utilizando este mecanismo en células Swiss 3T3 y C6 (918,921); sin embargo, sólo la isoforma δ de las nPKCs desaparece en células 3T3-F442A por *down-regulation* (919).

La *down-regulation* de la PKC también puede ser inducida por el activador endógeno de esta proteína DAG en muchos tipos celulares. Así, se ha descrito una reducción de la PKC- ϵ en células GH4C1 después de la estimulación con DAG durante 12 horas (922). También se ha observado una *down-regulation* selectiva de la PKC- δ y ϵ cuando se induce de manera sostenida unos niveles altos de DAG por la administración de PDGF o bombesina (915). La exposición de células Swiss 3T3 a un análogo sintético de DAG (1-oleil-2-acetil-sn-glicerol) también induce la *down-regulation* de la PKC- δ y ϵ , mientras que no afecta los niveles de las isoformas α y ζ (915). Como una única dosis de DAG se metaboliza rápidamente para causar la depleción de las diferentes isoenzimas utilizando este activador endógeno se necesitan administraciones repetidas (915).

No se conoce por qué diferentes grupos de isoenzimas sufren la *down-regulation* en distintas líneas celulares, aunque se han apuntado diversas posibilidades. Una de ellas es que ciertas cPKCs pueden estar unidas a las membranas sólo de forma transitoria tras la activación y, por tanto, no ser susceptibles de degradación; es decir, haciéndolo extensible a otras isoformas, estas pueden localizarse en diferentes estructuras en las que su susceptibilidad a la degradación está limitada (923).

Diversos investigadores han sugerido la existencia de una vía común para la degradación de la PKC (903,924,925), al demostrar que mutantes de las isoformas PKC- α y γ en las que se ha eliminado la

actividad cinasa pueden sufrir *down-regulation* si se expresan en un contexto en el que se encuentra alguna isoforma PKC activa (924,926). Otra evidencia que apoya esta teoría es que cuando se expresa en células COS1 una isoforma α mutada en el dominio V3, no se encuentran diferencias en su cinética de *down-regulation* inducida por TPA, cuando se compara con la proteína nativa (925). Por último, aunque la *down-regulation* de las isoformas γ , δ y η transfectadas en *Schizosaccharomyces pombe* es similar a la encontrada en células de mamíferos, parece que el TPA no induce *down-regulation* de PKC- ϵ en *S. pombe* (927); sin embargo, si la PKC- ϵ se expresa en *S. pombe* junto con la PKC- γ o δ , entonces sus niveles se reducen marcadamente y de forma paralela a la *down-regulation* de estas últimas (928). También se ha descrito que la expresión de una PKC- δ mutante sin actividad cinasa no experimenta una *down-regulation* de forma eficaz (914), pero la coexpresión en la misma célula de la proteína mutante δ con la isoforma original, sí que permite la *down-regulation* de la proteína sin actividad cinasa (914). Estos datos sugieren que, incluso en ausencia de actividad cinasa, la unión de TPA y la consecuente unión a la membrana y estructuras del citoesqueleto pueden permitir la *down-regulation* de las PKCs (928). Además, se ha postulado que el tráfico de vesículas detectado en *S. Pombe*, que está estimulado por TPA, se relacionaría con incrementos en la degradación de las PKC (928). Es evidente, que aún no puede determinarse con exactitud si la *down-regulation* de la PKC está regulada por un mecanismo pasivo o puede ser inducida por la translocación (139,912).

1.1.8. Proteínas de anclaje de las PKC

Las formas inactivas de la PKC se encuentran mayoritariamente en el citosol, mientras que sus activadores, de naturaleza hidrofóbica, están presentes en la membrana (929). Se ha determinado mediante estudios basados en ultracentrifugaciones la distribución subcelular de algunas isoformas de la PKC (930-932). Estos estudios demuestran que, tras la estimulación con agonistas, se incrementan los niveles de actividad de la PKC en los precipitados mientras que disminuye en el sobrenadante (929,932). Las formas activas de la PKC se han encontrado asociadas con la membrana plasmática, con elementos del citoesqueleto, con el núcleo y con otros componentes subcelulares (139,932).

Recientemente, se han realizado estudios con técnicas de microscopía confocal, revelando una localización más compleja y específica de las diferentes isoenzimas de la PKC. Estos estudios

demuestran que en células que expresan varias isoformas, la mayoría de ellas se encuentran localizadas en estructuras subcelulares y, tras la activación, mudan su localización a diferentes localizaciones en la célula. Por ejemplo, la PKC- α se localiza en los contactos focales en fibroblastos REF52 no estimulados y transloca al perinúcleo después de la activación (932). La PKC- β II está asociada con estructuras fibrilares en miocitos cardíacos no estimulados y transloca al perinúcleo y a la periferia celular cuando se activa (930,931). Por último, la PKC- δ se encuentra localizada en el área de Golgi en células control y tras la activación transloca al perinúcleo y al núcleo y, en un número reducido de células, también se detecta su distribución difusa por el citoplasma (929). Todos estos resultados sugieren en su conjunto que las isoenzimas PKC se localizan en lugares intracelulares debido a su capacidad de unión con moléculas de anclaje específicas (929).

Las proteínas de anclaje para las isoenzimas de la PKC activas se han denominado como receptores para cinasa C activas (RACK: *receptors for activated C-kinase*). Mochly-Rosen y Gordon (929) han propuesto la existencia de otro grupo de proteínas de anclaje para las formas inactivas de la PKC que han sido denominadas receptores para cinasa C inactivas (RICK: *receptors for inactive C-kinase*).

Se ha propuesto que las funciones únicas de la PKC están determinadas por la unión de las diferentes isoenzimas a proteínas de anclaje específicas, en una estrecha relación con un grupo particular de sustratos e independiente de otros (929).

La primera evidencia sobre la existencia de estas proteínas de anclaje se obtuvo al descubrirse que el tratamiento con tripsina de las membranas inhibe la interacción estable de formas activas de la PKC con dichas membranas (933). Wolf y Sahyoun (934) demostraron posteriormente que la PKC se une a varias proteínas en la fracción celular particulada, identificándose un componente proteico del citoesqueleto celular, de unos 110-115 kDa, que se unía con la PKC en forma dependiente de la PtdSer, aunque no pudo ser caracterizado completamente.

RICKs

Usando técnicas similares Jaken y cols. (932,935) han identificado proteínas de unión de la PKC adicionales, todas ellas son sustrato de la PKC y unen directamente PtdSer. La unión de la PtdSer es un hallazgo constante en este tipo de proteínas de unión, que parece actuar de puente entre la PKC y dichas proteínas (932,935). Entre estas se incluyen la talina, la vinculina, la proteína miristilada rica en alanina sustrato de la cinasa C (MARCK), AKAP79, y algunas otras (932,935,936).

Debido a que la activación de la PKC es dependiente de PtdSer y DAG (además de calcio en algunas isoformas), el hallazgo de que la PtdSer sola es suficiente para unir la PKC a esas proteínas sugiere que no es necesaria una activación completa de la PKC para que se produzca dicha unión (929,932,935). Esta hipótesis parece confirmarse por algunos resultados en los que se ha descrito que la PKC- α se localiza, en situación basal, unida a la talina de los contactos focales en fibroblastos y células renales, tras la estimulación con ésteres de forbol se produce la translocación de esta isoforma (937). La BTK también une todas las isoformas de la PKC de un modo dependiente de lípidos, sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que esta unión está inhibida por ésteres de forbol (911), sugiriendo que la BTK sólo une a la PKC en estado inactivo o no completamente activo (929).

En su conjunto, los resultados descritos sugieren que la relación sustrato/proteína supeditada a la PtdSer, podría ser considerada dependiente de proteínas de unión para PKC inactivas (RICK) (929). Entre algunas de las características predichas para estos RICK se encuentran las siguientes: no necesariamente son sustratos de la PKC, deben demostrar preferencia de unión por formas inactivas de este enzima y, finalmente, los ésteres de forbol u otros activadores de la PKC deben inducir la separación del complejo RICK/PKC (929).

RACKs

Se ha descrito la existencia de varias proteínas que unen sólo la forma activa de la PKC, cumpliendo una serie de criterios, y que se denominan como proteínas receptor para cinasa C activa (RACK) (931). Estas proteínas están presentes en la fracción particulada celular y unen la cinasa C activa de forma selectiva y saturable. En estos casos, un puente de PtdSer parece no ser suficiente para establecer la unión (929,931), sino que se requieren interacciones proteína-proteína directas (142,929). Otra propiedad de esta interacción es que la unión de la PKC al RACK no está inhibida por péptidos sustrato, indicando que el anclaje no se produce en el lugar catalítico o lugares de fosforilación de la PKC (931).

La primera proteína identificada que cumplía todos estos criterios fue denominada RACK1 (931). Esta proteína, de 46 kDa, no es un sustrato de la PKC y, sin embargo, en su presencia la fosforilación de sustratos realizada por la cinasa se incrementa varias veces, sugiriendo que el complejo PKC/RACK1 debe corresponderse con la forma activa de la enzima *in vivo* (929,931). Este RACK1 colocaliza con la forma activa de la PKC- β II en el perinúcleo de miocitos cardiacos (938), por lo que se considera que es el RACK específico de esta isoforma (929).

Se han descrito otros RACKs para las isoformas PKC- ϵ (141,929) y PKC- α (939). Este último, que se denomina PICK1 (proteína 1 de interacción con la cinasa C), es un sustrato de la PKC- α que une el fragmento catalítico de esta isoforma (aa. 302–672) y que está localizado en el perinúcleo celular de modo similar a la forma activa de la PKC- α (939).

1.2. La proteína cinasa C- δ

En 1987, un año después de la clonación de las cPKCs, se clonó el ADNc de la PKC- δ procedente de la librería ADNc del cerebro de rata (940). En 1994 se localizó el gen de la PKC- δ en el cromosoma 3 humano y en el cromosoma 14 de ratón (941) y, en fechas muy recientes, ha sido ubicado en el cromosoma 19 de rata (942). La PKC- δ muestra un 58 % de homología con la PKC- α (943). La PKC- δ fue la primera isoforma de las nPKC en aislarse y purificarse desde el bazo de cerdo: en 1986 se describió el aislamiento de una enzima con estructura de tipo PKC, sin respuesta al Ca^{2+} y que se activaba por éster de forbol/fosfolípidos (944). Esta misma enzima se identificó más tarde como la PKC- δ (945-947).

1.2.1. Estructura de la PKC- δ

Como cualquier miembro de subfamilia de las nPKC, la estructura de la PKC- δ contiene un dominio catalítico en el extremo C-terminal con las regiones C3 y C4 muy conservadas, esenciales para la actividad catalítica y la unión del sustrato; un dominio regulador N-terminal, en el que no se encuentra la región C2 de las cPKC, pero si se localiza la región C1 conteniendo secuencia inhibidora que actúa como pseudosustrato y las dos regiones ricas en cisteína con forma de dedo que unen zinc (140,853,856).

Las secuencias ricas en cisteína de la PKC- δ del dominio C1 no son equivalentes funcionalmente. Así, proteínas de fusión generadas entre la segunda secuencia rica en cisteína (CYS2) de la PKC- δ y la glutatión-s-transferasa unen el éster de forbol PDBu con alta afinidad, mientras que no se detecta unión significativa con la proteína de fusión generada con la región CYS1 (948). Los estudios mutacionales desarrollados en estas regiones indican que CYS2 juega un papel muy

importante en la translocación de la PKC- δ desde el citosol a las membranas celulares cuando es activada por ésteres de forbol (949). Bogi y cols. (949) han descrito que la capacidad no equivalente de unión de distintos ligandos con la región C1 para promover la translocación de la PKC- δ a la membrana, podría tener una importancia funcional, apuntándose una relación entre el patrón de respuesta y la actividad del compuesto como promotor neoplásico.

Realizando estudios de mutagénesis dirigida (949,950) y de cristalografía de rayos X (951) se ha conseguido comprender en detalle la interacción entre los ésteres de forbol y la región CYS2 de la PKC- δ . Mediante esos estudios se sabe ahora que cinco o seis residuos de cisteína y los dos residuos de histidina implicados en la coordinación con el átomo de zinc resultan indispensables para la unión con los ésteres de forbol. Además, mutaciones en otros lugares de la región CYS2 reducen drásticamente la interacción con el ligando (951). En la hendidura localizada en el extremo de CYS2 se piensa que se encuentran los lugares de interacción con los ésteres de forbol, concretamente los oxígenos de C-3, C-4, y C-20 del ligando formarían puentes de hidrógeno con grupos de la cadena principal de la proteína, cuya orientación está controlada por un grupo de residuos altamente conservado (951). Los ésteres de forbol ocuparían su lugar como una especie de capucha sobre la hendidura de CYS2 formando una superficie hidrofóbica explicando como el activador permite la inserción de la PKC- δ en la membrana (951).

1.2.2. Purificación y caracterización de la PKC- δ

La PKC- δ fue la primera isoenzima nPKC en aislarse desde un tejido. En 1986 se describió el aislamiento de una enzima con estructura de tipo PKC, sin respuesta al Ca^{2+} y que se activaba por éster de forbol/fosfolípidos (945,946), que más tarde se identificó como PKC- δ . La enzima nativa se purificó desde bazo de cerdo y pudo ser caracterizada (947). La enzima que estaba siendo estudiada unía TPA con alta afinidad ($K_d = 9.6 \text{ nM}$) y pudo activarse *in vitro* para fosforilar sustratos o sufrir autofosforilación, utilizando ésteres de forbol (o DAG) junto con fosfatidilserina (PtdSer), pero no por calcio más PS, al contrario que las cPKCs (952). La activación también se detectó utilizando distintos ácidos grasos insaturados, particularmente con ácido araquidónico (952). La afinidad que la PKC- δ nativa presenta por distintos cofactores y sustratos la diferenciaba de alguna forma de las PKCs convencionales (952).

Desde aquel primer aislamiento, tanto la PKC- δ nativa como la recombinante se han purificado parcial o completamente desde otros tejidos, como cerebro de rata (953), células hematopoyéticas de ratón (954), células COS1 transfectadas con ADNc que codifica la PKC- δ de rata (955) o de ratón (956), células de insectos infectadas con baculovirus que contenían el ADNc de la PKC- δ humana (957) y también desde bacterias transfectadas con ADNc de la PKC- δ de rata (958). Las características de las distintas preparaciones de la PKC- δ no se diferenciaron significativamente (952).

La PKC- δ se ha encontrado en muchos tejidos y tipos celulares (873,959). La expresión de esta enzima se regula ontogenéticamente, si se considera que la concentración de PKC- δ en la epidermis y cerebro de ratones experimenta un incremento significativo entre los días 7 y 14 posteriores al nacimiento (959). Chen y Hillman (960,961) investigaron la expresión de la PKC- δ y de otras isoformas en cerebelo de rata, mediante técnicas inmunohistoquímicas, observando su existencia de modo temporal en la glía y, posteriormente, en grupos determinados de neuronas. De este modo, la expresión de la PKC- δ se asoció a actividades específicas en estas células.

La PKC- δ , al igual que otras isoenzimas de los grupos de las cPKCs y nPKCs, se activa *in vivo* por el DGA producido tras la activación de fosfolipasas (915). Existen pocas referencias sobre la activación selectiva e individual de las isoenzimas de la PKC, a pesar de que se conocen diferentes moléculas de señalización como son los factores de crecimiento, hormonas y citoquinas que modifican su actividad. Se ha descrito la activación de las nPKCs δ y ϵ , pero no de la cPKC- α , por estimulación mitogénica de fibroblastos 3Y1 de rata (962) y se cree que la activación selectiva de la PKC- δ participa en el sobrecrecimiento de neuritas inducido por el factor de crecimiento de nervios (NGF) (963). Por otro lado, los ácidos grasos insaturados con isomería *cis* activan a las c y nPKCs *in vitro* en plaquetas, pero es el ácido oleico el que activa principalmente a la PKC- δ (899,964). En ninguno de estos casos se conoce aún el mecanismo de la activación aparentemente selectiva de la PKC- δ (952,964).

Al igual que en el caso de otras PKCs, la PKC- δ es degradada *in vivo* por proteólisis, tras la activación con TPA (952). Además, esta degradación se produce por agonistas fisiológicos que promueven la liberación de DAG, como la bombesina y el PDGF y, también, por el propio DAG (915). Esta *down-regulation* se produce a través de la proteosoma ubiquitín (912). El tratamiento con TPA de la piel de ratón provoca *down-regulation* de la PKC- δ epidermal con una vida media en

torno 8 horas, seguida por una recuperación completa a las 72 h (959). Shih y Floyd-Smith (965) han descrito que el TPA induce en la línea celular A20 de linfoma A de ratón no sólo la *down-regulation* de proteína PKC- δ , sino que también existe una *down-regulation* de su ARNm a nivel transcripcional y postranscripcional. La *down-regulation* de la PKC- δ en células Swiss 3T3 parece depender del ciclo celular, operando únicamente en la fase G0/G1 (966). Paradójicamente, el briostatin 1, una lactona macrocíclica aislada de *Bugula nerutina* que se comporta como activador de la PKC- δ , protege a esta isoforma, pero no a otras, frente a la *down-regulation* inducida por TPA en queratinocitos de ratón (967). Dicha protección se observa en un rango de concentraciones de 100 nM a 1 μ M, mientras que a concentraciones inferiores a 1 nM, el propio briostatin 1 promueve *down-regulation* de la PKC- δ de modo similar al TPA (967). Estudios realizados en quimeras recíprocas, formadas al intercambiar los dominios regulador y catalítico de la PKC- α y PKC- δ , han concluido que el dominio catalítico de la PKC- δ le confiere la protección del briostatin 1 frente a la *down-regulation* y que éste contiene los determinantes específicos de isoforma, implicados en el efecto único del briostatin 1 sobre la PKC- δ (968).

1.2.3. Fosforilaciones de la PKC- δ

La PKC- δ parece diferir de otras PKCs en los mecanismos de regulación post-translacional. Como ya se ha indicado, la PKC- α y la PKC- β II requieren para su activación una fosforilación en el residuo de treonina 497 y 500, respectivamente, en la región de la proteína denominada *asa de activación* (890,891). Recientemente se ha descrito que la *PKC cinasa*, responsable de esta fosforilación, es la PDK1 (proteína cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítidos) (894-896). Esta cinasa parece que no está presente en bacterias, lo que explicaría que la PKC- α no pueda ser expresada mediante técnicas de recombinación como enzima activa en estos microorganismos (969). Stempka y cols. (958) demostraron que la PKC- δ sí podía ser expresada en bacterias en su forma activa; además, la PKC- δ recombinante purificada parcialmente desde esas bacterias muestra una actividad específica muy similar a la que muestra la PKC- δ nativa purificada del bazo de cerdo (958).

Por otra parte, se ha demostrado por mutagénesis dirigida que la fosforilación en la treonina 505 de la PKC- δ no es esencial para su activación, al contrario de lo que ocurre en la PKC- α y β II, que necesitan una fosforilación en las treoninas equivalentes (treonina 497 y 500,

respectivamente) para adquirir competencia catalítica (970). La carga negativa necesaria en el asa de activación (891) para promover la actividad catalítica de la PKC- δ , probablemente depende del ácido glutámico 500 puesto que si se sustituye este aminoácido por valina se pierde un 80 % de su actividad cinasa (970). Estos resultados no excluyen que la actividad cinasa de la PKC- δ sea modulada mediante fosforilaciones por otras cinasas (o autofosforilaciones), pero sí indican que la PKC- δ y otras PKCs se regulan diferencialmente por mecanismos postranslacionales (138,852,952).

Como otras muchas proteínas cinasas, las PKCs tienen mecanismos de autofosforilación aunque su papel funcional es aún materia de debate. Particularmente, la PKC- δ purificada del bazo porcino muestra un alto potencial de autofosforilación *in vitro* que es alrededor de cuatro veces el de las cPKCs (971). Los estudios realizados sobre la autofosforilación *in vitro* de la PKC- δ sugieren que la cinasa contiene dos nuevos residuos de fosfoserina y uno de fosfotreonina, después de que la autofosforilación tenga lugar (947). La PKC- δ utiliza no sólo ATP como nucleótido donante de grupos fosfato para la autofosforilación *in vitro*, sino que el GTP también puede ejercer este papel, y además de forma mucho más eficiente que el ATP: la actividad de la PKC- δ para la autofosforilación en presencia de GTP es alrededor de 24 veces superior que la de las cPKC (en presencia de ATP, solo es cuatro veces superior) (971).

Se sabe que la PKC- β II puede ser fosforilada *in vivo* en los residuos treonina 641 y serina 660 (892,897), pero aún no se han demostrado inequívocamente los lugares de autofosforilación *in vivo* de la PKC- δ , aunque recientemente se han realizado importantes aproximaciones. Así, estudios de mutagénesis dirigida, intercambiando la serina 643 de la cadena peptídica por alanina, parecen indicar que éste es un lugar de autofosforilación *in vivo* de la PKC- δ , si se comparan los niveles de fosforilación de la proteína original con los del mutante (972); sin embargo, estos datos no indican si la serina 643 es autofosforilada o fosforilada por otra proteína cinasa, aunque Stempka y cols. (970) han identificado la serina 643 como un lugar de autofosforilación *in vitro* de la PKC- δ mediante espectrometría de masas MALDI de péptidos obtenidos por digestión trípica de PKC- δ recombinante procedente de bacterias o de células de insectos infectadas por vaculovirus. Li y cols. (972) también describen que la pérdida de este aminoácido parece comprometer la actividad enzimática de la PKC- δ ; sin embargo, en contraste con estos datos, Stempka y cols. (970) no fueron capaces de demostrar pérdida de la actividad cinasa después de la mutación de serina 643 por alanina. Por lo tanto, el papel de la autofosforilación de la PKC- δ no está claro, sobre

todo si se tiene en cuenta que es probable la existencia de lugares adicionales de (auto)fosforilación aún no identificados (140,952,970).

Fosforilación en residuos de tirosina

La PKC- δ fue la primera isoforma de las PKCs en la que se demostró una modulación funcional por fosforilación en restos de tirosina (973). En esta línea se ha descrito que la tirosina cinasa Src fosforila la PKC- δ *in vitro* (973), pero requiere la presencia de un activador, como el TPA, lo que parece implicar que la fosforilación está restringida a la forma activa de la PKC- δ , posiblemente porque los lugares de fosforilación en tirosina se exponen solamente después de un cambio conformacional inducido por la activación (973,974). La fosforilación en restos de tirosina incrementa el peso molecular de la PKC- δ y parece modificar su actividad frente a algunos sustratos (973).

También se ha demostrado *in vivo* la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ en respuesta al tratamiento de las células con varios agentes, como por ejemplo el TPA, el PDGF, el TGF α , el carbacol, la sustancia P, los ligandos del receptor IgE, el ATP o el UTP extracelulares, y el H₂O₂ (12,759,974-978), o bien en respuesta a la transfección de queratinocitos de rata con el oncogen Ha-ras (979) o tras la activación del receptor BCR en células B (980).

Konishi y cols. (978) y Kadotani y cols. (981) han descrito que la fosforilación en tirosina de la PKC- δ *in vivo* crea una enzima modificada que es activa sin cofactores lipídicos o, al menos, con una concentración muy baja de éstos. También se ha descrito que el tratamiento con H₂O₂ no sólo induce la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ , sino que también estimula la fosforilación en tirosina y la actividad de las isoformas α , β I, γ , ϵ y ζ de la PKC (978). En contraste con estos estudios, algunos autores han encontrado que la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ disminuye su actividad (976,977,979). De todas formas, se ha demostrado mediante estudios realizados *in vitro* que la fosforilación en restos de tirosina puede elevar o disminuir la actividad de la PKC- δ en función del sustrato empleado en el ensayo de actividad (978). En otras palabras, la fosforilación en restos de tirosina podría regular la especificidad de la cinasa frente a un sustrato determinado (139,952). Por ejemplo, la fosforilación de la PKC- δ dependiente de la activación del receptor de alta afinidad de la IgE, está disminuida cuando se utiliza como sustrato la cadena peptídica γ de este receptor, pero no lo está cuando se utilizan histonas o la MBP como sustrato para la reacción cinasa (977,978).

Se han publicado varios trabajos que establecen una relación entre la fosforilación en tirosina de la PKC- δ y la actividad de la tirosina cinasa c-Src. En primer lugar, Zang y cols. (285,982) han descrito la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ inducida por c-Src tanto *in vitro* como *in vivo*; además demuestran la asociación de la PKC- δ con v-Src y la fosforilación en tirosina y activación de la PKC- δ en fibroblastos transformados por v-Src. Más recientemente, se ha demostrado en la línea de células humanas de cáncer de mama MCF-7 la asociación con Src y la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ , sin la sobreexpresión previa de cualquiera de las dos proteínas (284). Aunque existen evidencias que demuestran que la activación del EGF-R provoca la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ no se ha podido establecer que la actividad tirosina cinasa (intrínseca) de este receptor sea capaz de fosforilar en tirosina a la PKC- δ *in vitro*, en una reacción cinasa clásica (973). Esta incapacidad del EGF-R para fosforilar en tirosina directamente a la PKC- δ parece indicar que la fosforilación inducida tras la activación de este receptor estaría mediada por Src (973).

Recientemente se ha demostrado que la tirosina cinasa c-Abl también puede asociarse con la PKC- δ en diversos tipos celulares, como por ejemplo en células MCF-7, células U-937, y células de leucemia mieloide HL-60 (983). El tratamiento de cualquiera de esas líneas celulares con agentes que causan daño genómico, como radiaciones ionizantes, se asocia con la fosforilación en tirosina de la PKC- δ dependiente de c-Abl, y con la translocación de la PKC- δ al núcleo. Estos datos sugieren en conjunto que, posiblemente además de Src, la Abl es una tirosina cinasa de la PKC- δ *in vivo* (983).

Los lugares de fosforilación en tirosina más probables de la PKC- δ son los residuos de tirosina 52, 187, 512 y 523 (952,978). Todos ellos parecen ser fosforilables *in vivo*, aunque aún no se ha demostrado este hecho inequívocamente (952).

1.2.4. Funciones biológicas de la PKC- δ

Para esclarecer la función biológica de la PKC- δ se han aplicado diversos métodos, casi todos ellos basados en dos aproximaciones experimentales totalmente opuestas, aunque complementarias. Una de ellas se fundamenta en la eliminación diferencial de esta enzima, manteniendo los niveles celulares de las demás isoformas de la PKC; la otra se basa en la *sobreexpresión* diferencial de la PKC- δ . En ambos casos

se obtienen resultados al analizar los efectos de estos protocolos en alguna de las funciones celulares, bien porque se exagera o porque desaparece.

Para estudiar el papel que las diferentes PKCs tienen en la célula se puede promover la *down-regulation* de las distintas isoformas utilizando TPA o briostatín, con el objetivo de eliminar o mantener alguna de ellas, y de esta forma atribuirle la respuesta fisiológica inducida, o la pérdida de determinada función después del tratamiento. Este método se ha utilizado para demostrar que la PKC- δ está implicada en la estimulación del intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ en células C6 (984), en la hidrólisis de fosfoinosítidos y formación de PGE2 (985), y en la diferenciación de queratinocitos (967). De forma similar se ha demostrado que la activación selectiva de la PKC- δ puede jugar un papel importante en las señales inductoras de la neuritogénesis en células PC12 (963). Sin embargo, aunque se haya comprobado cuidadosamente la especificidad, duración y amplitud de la *down-regulation*, parece ser que este método no es lo suficientemente selectivo para realizar este tipo de estudios funcionales (139,986). El efecto del TPA es múltiple y, por tanto, no se puede excluir la posibilidad de que la respuesta celular observada o la ausencia de esta, sea la consecuencia de la *down-regulation* de la PKC o bien sea un efecto colateral del TPA (139).

Como alternativa se puede anular la función celular de la PKC- δ utilizando protocolos de biología molecular e ingeniería genética, para inducir modificaciones en la proteína que la hacen enzimáticamente incompetente. Utilizando estas técnicas se han desarrollado mutantes dominantes negativos que expresan una PKC- δ modificada que carece de la región de la proteína que une ATP; es decir, expresan una enzima que no es activa (986). También puede ser suprimida la expresión de las PKCs por el tratamiento de las células con oligonucleótidos *antisense* frente a las diferentes isoformas (987), teniendo en cuenta que en algunos casos los *antisense* son aplicables no sólo a células o cultivos celulares, sino a animales de experimentación por vía sistémica, con las ventajas e inconvenientes que este factor aporta a la interpretación de los efectos fisiológicos detectados (988). Aunque estos protocolos implican una complejidad metodológica muy superior, son mucho más específicos que la *down-regulation* inducida por TPA o por activadores específicos de las diferentes isoformas y se han utilizado con bastante éxito para determinar el papel de la PKC- δ en diversas funciones celulares. Por ejemplo, estudios desarrollados con mutantes dominantes negativos, que inducen una PKC- δ sin la región que une ATP, han permitido implicar a la PKC- δ en la diferenciación de los fibroblastos NIH 3T3 (986). Los *antisense* se han utilizado para demostrar la que la PKC- δ participa en la

diferenciación de líneas celulares eritroleucémicas (989) y en la activación adrenérgica del cotransportador Na-K-2Cl (990).

Otro método utilizado para estudiar las funciones de la PKC- δ consiste en el desarrollo de clones celulares estables que sobreexpresan esta isoforma, mediante la transfección con los correspondientes vectores de expresión. Los cambios en los procesos celulares observados, con o sin el tratamiento de las células transfectadas con TPA, son atribuidos a la mediación de la PKC- δ . De todas formas, la sobreexpresión de una proteína en determinados tipos celulares no siempre permite atribuirle un carácter fisiológico relevante. Por ejemplo, la sobreexpresión de cualquiera de las isoenzimas de la PKC puede sobrecargar la capacidad celular endógena de las RACKs u otras proteínas de unión del enzima, lo que provocaría una localización no específica y la fosforilación generalizada de sustratos (854). Varios grupos de investigación han desarrollado protocolos para sobreexpresar PKC- δ en diferentes líneas celulares, describiendo que este hecho se acompaña de una inhibición del crecimiento en varios tipos celulares; por ejemplo, en células CHO (991), en células del músculo liso (992), en fibroblastos NIH 3T3 (993), en células de glioma humano (994) y en células endoteliales de capilares (995). En todos estos estudios se han descrito efectos adicionales atribuidos a la sobreexpresión de la PKC- δ , más o menos acentuados por el tratamiento con TPA, como por ejemplo cambios en la morfología celular, descenso de la densidad celular y supresión de la expresión de la ciclina G₁. La sobreexpresión de las isoformas δ y α de la PKC, pero no de las isoformas β I, ϵ , η o ζ , induce en la línea de células mieloides de ratón 32D la diferenciación a macrófagos maduros tras el tratamiento con TPA (996) o PDGF (997). Se ha demostrado mediante la sobreexpresión de quimeras recíprocas δ y ϵ , que el dominio catalítico de la PKC- δ media la diferenciación inducida por TPA en estas células (998). También se ha descrito que la sobreexpresión de la PKC- δ incrementa la entrada de fósforo dependiente de sodio en células NIH 3T3 (999). Utilizando la sobreexpresión diferencial de distintas isoformas de la PKC, se ha demostrado que la PKC- δ , pero no las isoformas β I, ϵ o ζ , inhibe la vía de señalización STAT mediante las cinasas Bmx (1000). Más aún, se ha descrito que la PKC- δ y la PKC- α intervienen en la transcripción de los genes inducibles por TPA a través de las secuencias AP-1 y no AP-1 (1001), parece ser que utilizando una vía de señalización dependiente de Ras (1002). En contraposición a estos hallazgos, la PKC- δ activa la señal MEK-ERK de forma independiente de Ras y dependiente de Raf, según se demuestra por la expresión de un mutante constitutivamente activo de PKC- δ (502).

Como protocolo alternativo a la transfección de células con el gen que codifica la expresión de PKC- δ y su consiguiente sobreexpresión, esta enzima puede ser introducida directamente en células permeabilizadas. Mediante la aplicación de este procedimiento se ha demostrado que la PKC- δ está implicada en la exocitosis (1003).

Además de la implicación de la PKC- δ en la regulación y diferenciación de células en crecimiento, esta isoforma podría jugar un importante papel en los procesos de apoptosis y de desarrollo tumoral. Emoto y cols. (904,907,1004) demostraron que la apoptosis inducida en células de leucemia mieloide humanas por TNF α , ara-C, anticuerpo anti-Fas o radiaciones, se asocia con la activación proteolítica de la PKC- δ por una proteasa de tipo ICE (*ICE-like*), generando un fragmento con actividad cinasa de 40 kDa (aminoácidos 331 al 676). También establecieron que la proteasa responsable de la hidrólisis en cisteína de la PKC- δ era la CPP32 y que la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas⁽⁷⁾ Bcl-2 y Bcl-X_L puede suprimir la generación proteolítica de ese fragmento con actividad cinasa. La implicación en los mecanismos inductores de apoptosis de un fragmento activo obtenido tras la proteólisis de la PKC- δ en el extremo carboxilo, ha quedado perfectamente establecido por los estudios desarrollados por Mizuno y cols. (905). Estos autores demostraron que la sobreexpresión del fragmento de la PKC- δ con actividad catalítica inducía cambios fenotípicos asociados con la apoptosis, que no eran detectados tras la sobreexpresión de la PKC- δ completa o del fragmento sin actividad cinasa. Sin embargo, Mizuno y cols. también han encontrado fenómenos de apoptosis tras la ruptura proteolítica de otras isoformas de las nPKC, como la PKC- ϵ y θ , mientras que no se ha detectado este proceso en la PKC- α , la PKC- β o la PKC- ζ , (905). Otros autores también han descrito la generación de fragmentos activos por proteólisis de diversas nPKC, sin embargo no todos ellos tendrían la misma capacidad para inducir la apoptosis celular, en particular, la sobreexpresión de un fragmento catalítico activo de la PKC- μ no parece ser letal para la célula (906). Se ha

⁽⁷⁾ La familia de proteínas Bcl-2 (Bcl: *B-cell chronic lymphocytic leukemia*) incluye a proteínas reguladoras de las señales de supervivencia y muerte celular, que comparten un dominio homólogo (dominio BH) por el cuál homo- o heterodimerizan. El balance apoptosis/supervivencia celular está regulado por el balance relativo de las proteínas proapoptóticas de esta familia (Bax, Bcl-X_S, Bak, Bad y Bcl-2) y las antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 y Dad-1) y su heterodimerización. Por ejemplo, la forma no fosforilada de Bad es capaz de dimerizar con Bcl-2 y Bcl-X_L, neutralizando los efectos antiapoptóticos de estas últimas. Cuando Bad es fosforilada por la cinasa Akt/PKB (dependiente de la PI3-K) se une con proteínas 14-3-3, y quizá otros factores, que suprimen su actividad proapoptótica.

observado que la ceramida induce en células HL60 la translocación de la PKC- δ y ϵ , y se considera que este hecho es un prerrequisito para la activación proteolítica de esas cinasas que conduciría al desarrollo de la apoptosis (1005). El mecanismo final por el que el fragmento catalítico de la PKC- δ puede contribuir al desarrollo de mecanismos apoptóticos se está investigando. Se sabe que el fragmento catalítico de la PKC- δ puede fosforilar la proteína cinasa dependiente de ADN (DNA-PK), lo que ocasionaría la inactivación de esta última (1006). Como la DNA-PK es esencial para reparar las rupturas en la doble hélice del ADN, la interacción descrita entre el fragmento catalítico de la PKC- δ y la DNA-PK podría contribuir a la fragmentación del ADN detectada cuando la célula sufre procesos apoptóticos (1006). Estudios muy recientes asocian la actividad de la PKC- δ con la apoptosis celular, sin que exista una activación proteolítica previa, es decir, sin el concurso del fragmento con actividad cinasa de 40 kDa. En ellos se sugiere que la simple activación alostérica de la PKC- δ por TPA es suficiente para inducir la apoptosis (1007).

Otra de las importantes funciones biológicas de la PKC- δ se relaciona con su capacidad para inhibir la transformación neoplásica temprana o el desarrollo tumoral (952). El papel que la PKC- δ parece desempeñar en los fenómenos de apoptosis, podría contribuir a explicar los mecanismos intracelulares que conducen al control del desarrollo tumoral a través de esta cinasa (952). Las referencias bibliográficas que asocian a la PKC- δ con los mecanismos antiproliferativos son numerosas. Así, la sobreexpresión de la PKC- δ en el hígado de ratas alimentadas con dietas hipoproteicas se correlaciona con una inhibición del desarrollo de las lesiones preneoplásicas asociadas con la hepatocarcinogénesis inducida con dietilnitrosamina en la rata (1008). Por otra parte, la expresión de la PKC- δ en queratinocitos humanos está reducida significativamente en mutantes que sobreexpresan Ras (1009). La inducción por TPA de un fenotipo neoplásico en fibroblastos de rata que sobreexpresan c-Src parece ser debida a la depleción de la PKC- δ , y a su falta de actividad (1010), ya que este fenómeno puede ser reproducido en mutantes dominante negativo de la PKC- δ y tras el tratamiento con rottlerin, un inhibidor específico de la PKC- δ (1010). Además, el briostatín 1, un agente que selectivamente inhibe la *down-regulation* de la PKC- δ inducida por TPA (967), bloquea el desarrollo tumoral inducido por TPA en la epidermis de ratón (1011).

Aún no se conocen con detalle las implicaciones biológicas de la fosforilación en tirosina de la PKC- δ , aunque estudios recientes relacionan esta fosforilación con los mecanismos antiproliferativos. Así, la

fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ inducida por TPA podría ser una señal para su degradación proteolítica, de modo que se eliminaría la protección frente al desarrollo tumoral (952). Esta fosforilación en restos de tirosina podría ser causada en la célula por ciertas tirosinas cinasas, como por ejemplo Src, que induce la *down-regulation* de la PKC- δ , según se demuestra en algunos estudios (285). Contrariamente, otros autores han publicado muy recientemente un estudio desarrollado en fibroblastos Swiss NIH 3T3 utilizando técnicas de mutagénesis dirigida, en el que apuntan la posibilidad de que la fosforilación en el residuo tirosina 155 es esencial para el mantenimiento de los efectos antiproliferativos de la PKC- δ en estas células (1012).

Otra evidencia que implica a la PKC- δ en la protección frente al desarrollo tumoral ha sido establecida recientemente por Reddig y cols. (1013), que han demostrado una reducción muy evidente en la formación de tumores cutáneos inducida por agentes cancerígenos en ratones transgénicos que sobreexpresan PKC- δ en la epidermis.

Es previsible que el uso de nuevas técnicas de ingeniería genética permitan conocer nuevos detalles sobre la función de la PKC- δ . Una de estas técnicas se basa en el uso de ratones *knockout*, es decir ratones transgénicos que no presentan el gen específico de alguna proteína. Ya se han utilizado este tipo de ratones con la PKC- γ , encontrando que el ratón mutante sólo tiene afectada su coordinación motora (1014). Además, Los estudios desarrollados sobre la regulación de la PKC en organismos evolutivamente distantes, como animales inferiores y plantas, pueden ayudar a caracterizar las funciones primitivas de la diferentes isoformas de la PKC, que probablemente son las únicas indispensables (139).

Se han identificado recientemente inhibidores específicos para las PKCs (841,1015-1018). Entre ellos, el rottlerin ha demostrado tener una elevada especificidad para la PKC- δ (1010,1018,1019), sin embargo, aún no se conoce un inhibidor absolutamente específico para esta isoforma, puesto que elevadas concentraciones de rottlerin también reduce la actividad de otras isoformas (1016,1018,1019). Los compuestos K252a y Gö 6976, ambos derivados de la estaurosporina, son capaces de inhibir diferencialmente distintos subgrupos de isoformas, presentando una capacidad de inhibición mayor para las isoformas dependientes de Ca^{2+} que para las independientes (1020,1021). También se han descrito activadores e inhibidores selectivos de la PKC- μ (872), de la PKC- α (1022) y de la PKC- γ (1018). El desarrollo de inhibidores químicos de las diferentes isoformas de las PKCs constituye un importante campo de investigación en la última década para el desarrollo de terapias frente a procesos tumorales y/o apoptóticos, u otros fenómenos patológicos

mediados por las PKCs (1023,1024). Aunque probablemente es necesario asociar estas terapias con otros procedimientos, su potencial terapéutico es muy elevado (1024).

1.2.5. Sustratos y proteínas de unión de la PKC- δ

Aunque se conoce un gran número de proteínas que son fosforiladas por la PKC, no sabe con exactitud cuáles son fosforiladas selectivamente por una determinada isoforma de la PKC (853,935). Existen dos mecanismos que permiten a una isoenzima de la PKC, como la PKC- δ , fosforilar a una proteína sustrato selectivamente y, por tanto, transducir una señal dependiente de cada isoenzima. Una isoenzima determinada podría reconocer una secuencia consenso de una proteína sustrato, que no sería reconocida, o lo sería escasamente, por otra isoenzima diferente (853,935). De forma alternativa, o conjuntamente con este hecho, la colocalización de la enzima con su sustrato en determinados compartimentos celulares podría determinar la actividad de esa isoforma sobre ese sustrato (752,853,935).

Se ha identificado al factor de elongación 1- α de eucariotas (eEF-1 α) como ejemplo de sustrato proteico con un lugar específicamente reconocido por la PKC- δ , que sería fosforilado en treonina específicamente por esta isoforma (952). Parece que el péptido formado por los residuos 422-443 del factor de transcripción eEF-1 α , que contiene el lugar de fosforilación, es un sustrato absolutamente específico de la PKC- δ (1025). Un único aminoácido básico situado en la proximidad del lugar de fosforilación es esencial para el reconocimiento específico y la fosforilación de este péptido por la PKC- δ ; la sustitución por alanina de este aminoácido anula los niveles de fosforilación del péptido por PKC- δ (1025). Además, la inserción de aminoácidos básicos adicionales en la cercanía del lugar de fosforilación origina una pérdida de la selectividad que muestra la PKC- δ para este péptido (1025). Distintos autores han descrito la fosforilación y la activación del eEF-1 α tras la estimulación de células intactas con TPA (1026,1027).

La cadena γ del receptor de alta afinidad de la IgE es otro sustrato específico de la PKC- δ (1028). Este sustrato es fosforilado *in vivo* en residuos de treonina tras la activación de la PKC, en un proceso que se correlaciona con la endocitosis del receptor. Sin embargo, el lugar de

fosforilación aún no se ha identificado y se desconocen los aminoácidos esenciales para el reconocimiento específico (1028).

También se ha descrito un lugar de fosforilación específico para la PKC- δ en la troponina I puesto que esta isoforma es la única de entre todas las PKCs capaz de fosforilar esta proteína en serina 23 y serina 24, como hace la PKA, aunque la PKC- α y la PKC- δ también fosforilan troponina I en residuos serina 43 y serina 45 (1029).

La PKC- δ ha demostrado fosforilar eficientemente la proteína 25/27 de choque térmico (HSP25/27) (1030). Este sustrato también es fosforilado por la PKC- α , aunque en menor medida, mientras que otras isoformas no muestran ninguna capacidad para fosforilar la HSP (1030). El hecho de que la HSP25/27 esté más fosforilada en cuerpos lúteos de rata obtenidos en la fase tardía de la gestación parece tener un significado fisiológico, puesto que en este estadio de desarrollo la PKC- δ es más abundante y activa (1030).

Parece que la especificidad del sustrato anteriormente descrita juega un papel menos esencial que la colocalización de las isoformas específicas con un determinado sustrato para entender la fosforilación diferencial entre las distintas PKCs (929). Para facilitar la compartimentación de las isoformas de la PKC, existen diferentes proteínas de unión o proteínas de anclaje (RACKs, AKAPs, etc.) que tienen especificidad por cada isoforma y por el sustrato (138,752,929,935).

Se conoce muy poco acerca de la localización de la PKC- δ o de su translocación a compartimentos celulares para conseguir la fosforilación de un sustrato específico. De modo general, los datos acumulados parecen indicar una asociación de la PKC- δ con estructuras nucleares y del citoesqueleto, aunque en la mayoría de los casos no se conocen las proteínas específicas que actuarían como sustrato (929,952). Así, se ha descrito una localización nuclear o perinuclear de esta isoforma en secciones de piel (959) y en células de cerebro bovino (1031). En cultivos celulares de origen neuronal se ha encontrado la PKC- δ en el nucleolo (1032). También se ha descrito que existe una redistribución de la PKC- δ desde regiones perinucleares y compartimentos citoplasmáticos hacia el citoesqueleto tras la activación de una línea celular de células T humana (1033). De igual forma, se ha demostrado una asociación inducida por TPA entre estructuras del citoesqueleto y la PKC- δ en células beta pancreáticas; asociación que estaría inhibida por el ácido oleico que, en cambio, estimula la asociación de esta isoenzima con la membrana (1034). Este hecho parece indicar que distintos activadores de la PKC- δ pueden promover diferentes localizaciones subcelulares de esta isoforma (1034).

Abundando en la localización diferencial de la PKC- δ se ha descrito que esta proteína colocaliza con el sustrato vimentina en el citosol y en las regiones perinucleares de células HL60 (1035). Otras investigaciones han demostrado en fibroblastos Swiss 3T3 la translocación de la PKC- δ y su posterior asociación con proteínas de las zonas de adhesión focal, como la p125^{FAK}, cuando las células son estimuladas por LPA o bombesina; además, estos efectos estarían mediados por Rho A (476).

No se conoce casi nada sobre las proteínas que específicamente unen PKC- δ y que podrían jugar un papel importante en la especificidad de los efectos celulares de esa isoforma. Como ya se ha indicado, se han descrito RACKs específicos de la PKC- β II y ϵ , además existen evidencias sobre la existencia de receptores para cinasas C inactivas (RICKs) que tendrían características similares a las proteínas de anclaje de la proteína cinasa dependiente de AMPc (AKAPs); sin embargo, aún no se conocen RACKs o RICKs específicos de la PKC- δ (929)

Los trabajos desarrollados por Jaken y cols. (932,1036) indican que el dominio regulador de la PKC- δ (y de otras isoenzimas) está implicado en la interacción con otras proteínas. Así, estos autores han descrito un lugar de unión en la PKC- δ para un posible RACK específico, que estaría localizado en el dominio V1 amino terminal (aminoácidos 1-142). Este dominio se asemejaría a las regiones del dominio C2 de las cPKCs que se conoce interaccionan con RACKs. Los trabajos de Johnson y cols. (1037) parecen apoyar la hipótesis de la existencia de un hipotético RACK específico de la PKC- δ , al demostrar que un péptido complementario al dominio PKC- δ descrito, previene selectivamente la translocación de esta isoforma después de la activación celular. De manera similar se ha descrito la unión de la proteína GAP-43, sustrato de la PKC, al dominio descrito (1038). Otras proteínas, como las MARCKS (1039) y la SRBC (1040), además de ser fosforiladas por la PKC- δ y por otras isoformas, también pueden unirse al dominio regulador de la PKC- δ con una afinidad muy elevada, por lo que se apunta hacia la capacidad de esas proteínas para actuar como receptores de la PKC (952).

También se ha descrito la asociación de la PKC- δ con otros componentes celulares. En particular, se ha descrito una interacción de la PKC- δ con la PI3-K mediante estudios de coimmunoprecipitación. Esta asociación no se produce con otras PKCs y está modulada por la activación celular, aunque se desconoce su significado fisiológico (431).

2. Objetivos

Con los antecedentes bibliográficos expuestos nos propusimos alcanzar los siguientes objetivos:

Primero:

Corroborar la presencia y localización subcelular de la isoforma δ de la proteína cinasa C en acinos pancreáticos de rata y determinar si la ocupación del receptor CCK_A induce su fosforilación en restos de tirosina y activación.

Segundo:

Determinar las vías intracelulares implicadas en la regulación de la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ en respuesta a la ocupación del receptor A de la CCK en acinos pancreáticos de rata.

Tercero:

Comprobar si la fosforilación en tirosina de la PKC- δ en respuesta a la ocupación del receptor A de la CCK en acinos pancreáticos de rata modifica la translocación y actividad de esta cinasa.

3. Resultados

3.1. Efecto de la activación del receptor CCK_A y del éster de forbol TPA en la fosforilación en residuos de tirosina y en la actividad de la PKC- δ

Para estudiar la fosforilación en residuos de tirosina de la PKC- δ inducida tras la ocupación del receptor CCK_A incubamos los acinos pancreáticos con CCK-8 10 nM durante 2.5 min, porque otros autores han descrito previamente que esta concentración, utilizada con ese tiempo de incubación, es capaz de estimular la translocación de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata (684,684). Además, los acinos se incubaron durante 5 min con el éster de forbol TPA (1 μ M), para obtener un control positivo sobre la activación y fosforilación de esta isoforma. Otros autores (12) han descrito previamente en otros tipos celulares que el TPA utilizado en esas condiciones es capaz de estimular la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ .

Los lisados celulares totales, procedentes de los acinos pancreáticos incubados como se ha descrito, se sometieron a inmunoprecipitación con un anticuerpo policlonal anti-PKC- δ y después se analizaron mediante *Western blotting* con un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (4G10). Tras este procedimiento, se observa una única banda correspondiente a una proteína fosforilada en tirosina, con un peso molecular aparente de unos 78 kDa, que presenta inmunoreactividad con PKC- δ . Esta banda sólo se aprecia en los lisados procedentes de los acinos tratados con los agonistas (*Figura IV-1, panel superior -líneas 2 y 3-*), mientras que en los acinos control aparentemente no se detecta fosforilación en tirosina de esta proteína (*Figura IV-1, panel superior -línea 1-*). Después de ésta primera incubación se eliminó el anticuerpo anti-fosfotirosina de la membrana y se realizó una segunda incubación con el anticuerpo específico anti-PKC- δ (el mismo utilizado en la inmunoprecipitación), que no tiene inmunoreactividad cruzada con otras isoformas de la PKC. Este anticuerpo puso de manifiesto que el tratamiento de los acinos pancreáticos durante los tiempos indicados con

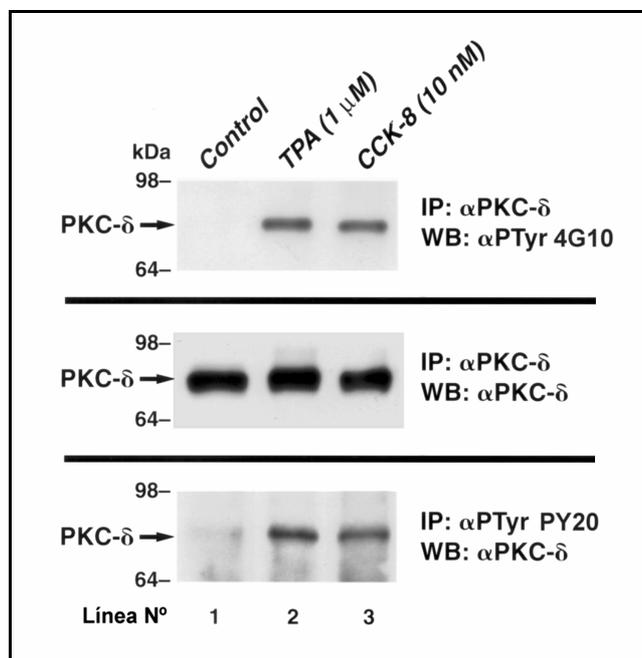


Figura IV-1. Efecto de la CCK-8 en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ en acinos pancreáticos. Los acinos pancreáticos se incubaron durante 5 min en presencia de TPA 1 μ M (Línea 2), durante 2.5 min en presencia de CCK-8 10 nM (Línea 3), o en ausencia de ambos agonistas (Línea 1); después fueron lisados según se describe en el capítulo "Materiales y métodos". Los lisados celulares totales se inmunoprecipitaron (IP) con el anticuerpo policlonal anti-PKC- δ (α PKC- δ , paneles superior e intermedio) o con el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina PY20 (α PTyr PY20, panel inferior). Los inmunoprecipitados fueron analizados por Western blotting (WB) utilizando un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina 4G10 (α PTyr 4G10, panel superior) o policlonal anti-PKC- δ (α PKC- δ , paneles intermedio e inferior). La posición de los pesos moleculares correspondientes a las proteínas estándar aparece señalada a la izquierda. También se señala a la izquierda de los films la banda con peso molecular aparente de 78 kDa, que presenta inmunoreactividad con PKC- δ . Los films son representativos de tres experimentos independientes.

CCK-8 o TPA, no afecta a los niveles celulares de PKC- δ . También permite apreciar que se ha utilizado una cantidad equiparable de proteínas en las diferentes muestras (Figura IV-1, panel intermedio -comparar líneas 1 a 3-).

Obtuvimos unos resultados muy similares a los descritos cuando inmunoprecipitamos las proteínas fosforiladas en restos tirosina de los lisados de acinos pancreáticos, utilizando el anticuerpo anti-fosfotirosina (PY20), y después buscamos la presencia de la PKC- δ entre las proteínas fosforiladas mediante un *Western blotting* con el anticuerpo policlonal

anti-PKC- δ (*Figura IV-1, panel inferior*). Con este protocolo, complementario al utilizado en primer lugar, se aprecia de nuevo un incremento evidente en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ después del tratamiento con CCK-8 o TPA (*Figura IV-1, panel inferior -líneas 2 y 3-*). Tampoco se apreciaron niveles detectables de fosforilación de la PKC- δ en los acinos no tratados (*Figura IV-1, panel inferior -línea 1-*).

La fosforilación en tirosina de la PKC- δ se produce de forma rápida tras estimular los acinos pancreáticos con CCK-8 10 nM: la fosforilación alcanza un 59 ± 9 % del máximo en 30 seg, y es máxima después de 2.5-5 min, con un incremento de 46 ± 9 veces el valor basal (en 2.5 min). A partir de los 5 min de incubación con CCK-8, la fosforilación en tirosina desciende ligera y paulatinamente; sin embargo, después de 30 min de incubación con CCK-8 10 nM la fosforilación en tirosina de la PKC- δ se mantiene en niveles de aproximadamente el 75 % del valor máximo, muy lejos del valor basal (*Figura IV-2, panel superior*).

El efecto que la CCK-8 ejerce en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ es dependiente de la concentración, según se aprecia en la curva dosis–efecto para esta fosforilación en acinos pancreáticos de rata incubados con diferentes concentraciones de este neuropéptido (*Figura IV-2, panel inferior*). En esta curva se aprecia que el efecto de la CCK-8 es detectable a partir de la concentración 0.1 nM, tiene la EC_{50} en 0.96 ± 0.25 nM, y su efecto máximo se produce con 100 nM.

Cuando los acinos pancreáticos se incuban con TPA 1 μ M también se estimula rápidamente la fosforilación en tirosina de la PKC- δ . Esta fosforilación alcanza un 69 ± 9 % del valor máximo en 1 min y llega al máximo a los 5 min, con un incremento de 42 ± 14 veces el valor basal. En este caso, la fosforilación en tirosina de la PKC- δ desciende progresivamente a partir de los 10 min de incubación y después de 30 min la PKC- δ presenta una fosforilación de aproximadamente el 55 % del valor máximo (*Figura IV-3, panel superior*), permaneciendo también lejos de los niveles basales.

El tratamiento de los acinos pancreáticos con TPA estimula la fosforilación en tirosina de la PKC- δ de forma dependiente de la concentración empleada. En la curva dosis–efecto realizada en acinos pancreáticos de rata estimulados con diferentes concentraciones de TPA, se aprecia que el efecto del TPA en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ es detectable a partir de la concentración 30 nM y su efecto máximo se produce con 10 μ M (*Figura IV-3, panel inferior*).

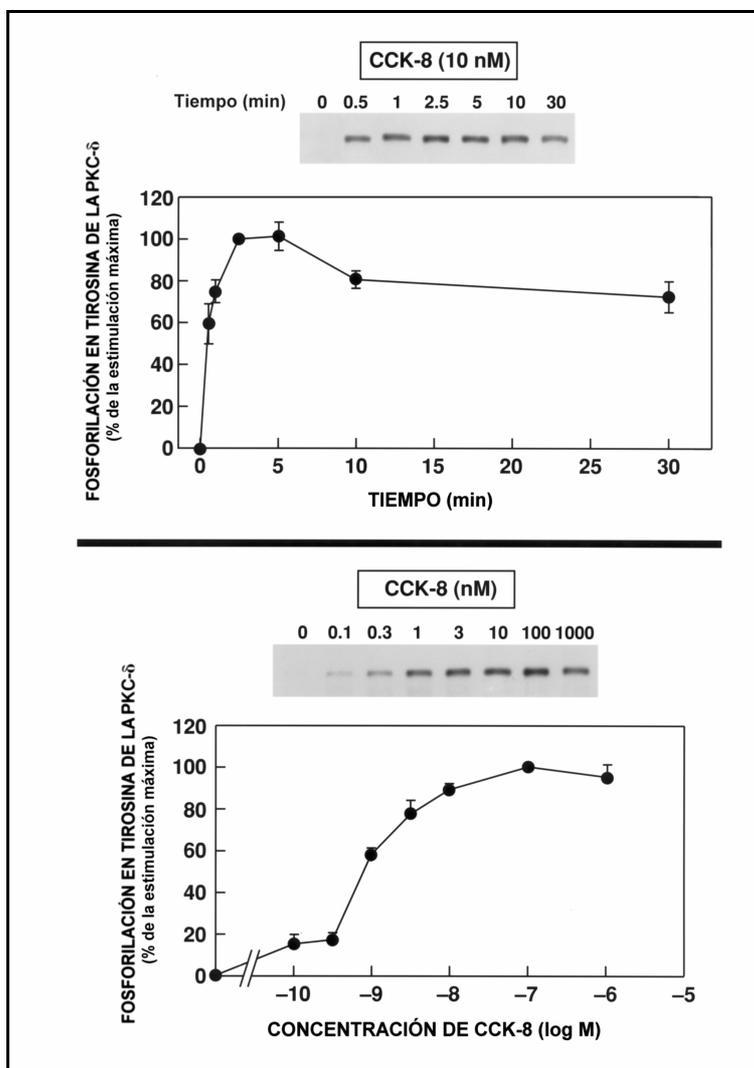


Figura IV-2. Curva de tiempo (panel superior) y curva dosis-efecto (panel inferior) de la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ inducida por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata. Los acinos fueron estimulados durante el tiempo indicado con las concentraciones señaladas de CCK-8, y después se lisaron. Los lisados celulares totales se inmunoprecipitaron con el anticuerpo policlonal anti-PKC- δ , y después fueron analizados por Western blotting utilizando el anticuerpo primario anti-fosfotirosina 4G10 (condiciones descritas en "Materiales y métodos"). En el panel superior se muestra el film de un experimento típico, obtenido con CCK-8 10 nM en los tiempos indicados. Los valores mostrados en el gráfico inferior son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes y están expresados como porcentaje del incremento máximo, obtenido tras 2.5 min de incubación. En el panel inferior se muestra un film obtenido tras incubar los acinos durante 2.5 min con las concentraciones indicadas de CCK-8. Este resultado es representativo de 3 más en duplicado. Los valores mostrados en el gráfico son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes y están expresados como porcentaje del incremento máximo, obtenido tras incubar los acinos durante 2.5 min con la concentración 100 nM de CCK-8.

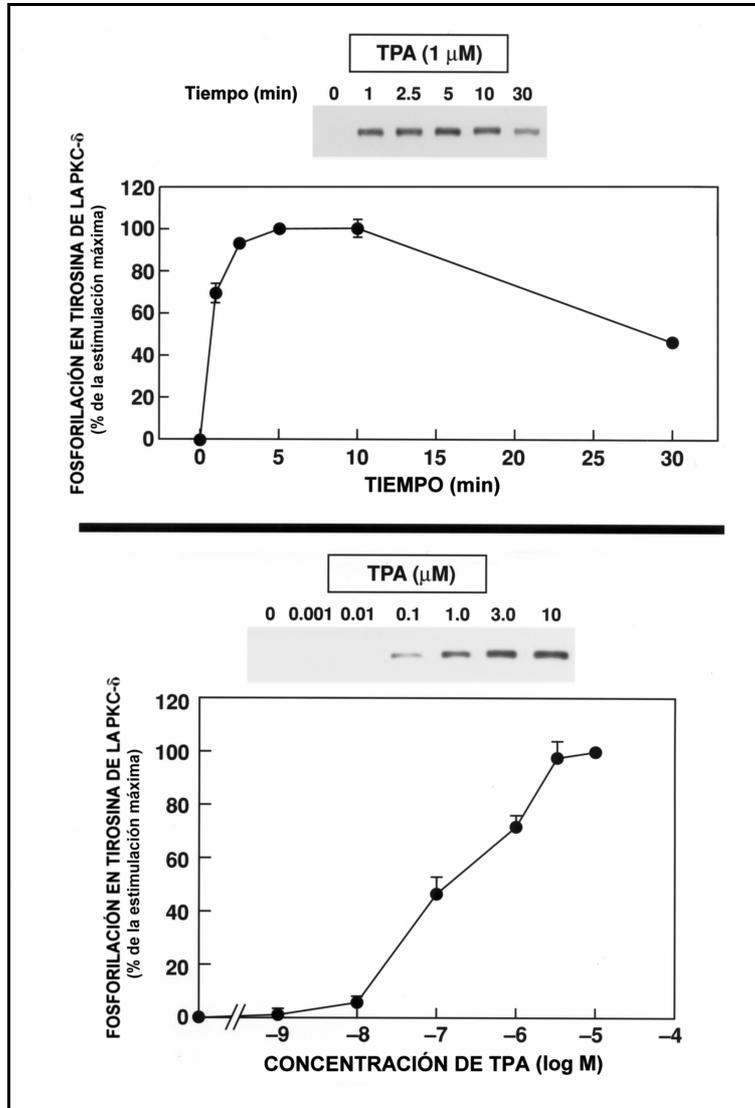


Figura IV-3. Curva de tiempo (panel superior) y curva dosis-efecto (panel inferior) de la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ inducida por el éster de forbol TPA en acinos pancreáticos de rata. Los acinos fueron estimulados durante el tiempo indicado con las concentraciones señaladas de TPA, y después se lisaron. En el panel superior se muestra el film de un experimento típico, obtenido con TPA 1 μ M en los tiempos indicados. Los valores mostrados en el gráfico inferior de este panel son la media \pm EEM de cuatro experimentos y están expresados como porcentaje del incremento máximo, obtenido tras 5 min de incubación. En el film del panel inferior se muestran los resultados obtenidos en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ tras incubar los acinos pancreáticos durante 5 min con las concentraciones indicadas de TPA. Este resultado es representativo de 3 más en duplicado. Los valores mostrados en el gráfico son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes y están expresados como porcentaje del incremento máximo, obtenido tras incubar los acinos durante 5 min con la concentración 10 μ M de TPA.

Hace una década se estableció que el incremento en la fosforilación de la PKC se acompañaba con un incremento en su actividad cinasa, y que ambos procesos se modulaban de forma paralela (1041); sin embargo, aún hoy en día se desconoce la implicación exacta de la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ en su actividad (952,974,978). Este aspecto se abordará con detenimiento en el apartado IV.3.3, en el que describimos la relación que hemos encontrado entre la fosforilación en tirosina, la translocación y la actividad cinasa de la PKC- δ . Ahora adelantamos que la ocupación del receptor CCK_A en acinos pancreáticos de rata no sólo estimula la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ , sino que también induce un incremento de su actividad cinasa.

Así, tras incubar los acinos pancreáticos con CCK-8 10 nM durante 2.5 min se detecta un incremento de 2.09 ± 0.13 veces la actividad basal (Figura IV-4, línea 3). Este aumento de actividad es muy similar al inducido por el éster de forbol TPA (1 μ M), que fue utilizado como control positivo para la estimulación de la actividad. En este caso obtuvimos un incremento de 2.10 ± 0.08 veces el valor basal (Figura IV-4, -comparar líneas 2 y 3-).

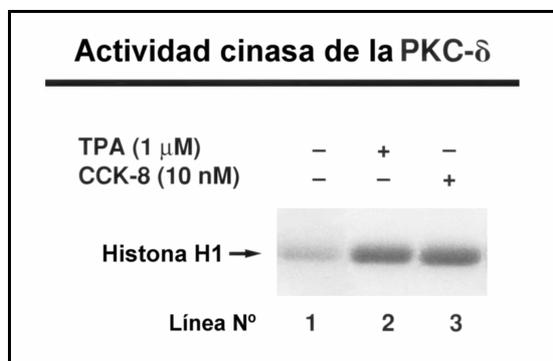


Figura IV-4. Efecto de la CCK-8 en la actividad de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se incubaron en ausencia de agonistas (Línea 1), durante 5 min en presencia de TPA 1 μ M (Línea 2), o durante 2.5 min en presencia de CCK-8 (Línea 3); después se lisaron y se inmunoprecipitó PKC- δ . La actividad cinasa se determinó en los inmunoprecipitados según el procedimiento descrito en el apartado "Materiales y métodos". La autoradiografía que aparece en la figura muestra la banda del sustrato utilizado (Histona H1) y es representativa de otras tres en duplicado.

De nuevo hay que hacer referencia a la existencia de dos estados de afinidad del receptor CCK_A, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad (397,663). Parece establecido que cada estado de afinidad se comporta diferencialmente en algunas de las respuestas celulares que acontecen tras la ocupación del receptor, al menos en la secreción enzimática estimulada por la CCK (671). Para caracterizar el estado de afinidad del receptor CCK_A que media los efectos inducidos por CCK-8 en los acinos pancreáticos de rata es habitual utilizar el análogo de la colecistocinina JMV-180 (ó CCK-JMV), porque, en la rata, este péptido se comporta como un agonista del estado de alta afinidad del receptor y un antagonista del estado de baja afinidad (369,668,835,836).

Con el objetivo caracterizar el estado de afinidad del receptor CCK_A que media la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ , preincubamos los acinos pancreáticos durante 2.5 min con CCK-JMV 0.1 y 1 μ M. En estas concentraciones se ha descrito que este péptido consigue la completa activación del receptor CCK_A en su estado de alta afinidad, y la inhibición del de baja (668).

En los acinos pancreáticos preincubados con 0.1 y 1 μ M de CCK-JMV no se aprecia un incremento detectable en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ comparado con los acinos control (*Figura IV-5, panel superior -comparar líneas 1, 2 y 3-*). Cuando utilizamos combinaciones de CCK-JMV 1 μ M y CCK-8 10 nM se aprecia una reducción del $76 \pm 8\%$ en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ estimulada por la CCK-8 utilizada en solitario (*Figura IV-5 panel superior -comparar líneas 4 y 5-, y panel inferior*). Cuando analizamos los datos obtenidos con una t de Student para muestras no apareadas, esta reducción demostró diferencias estadísticamente significativas, con una $p < 0.01$.

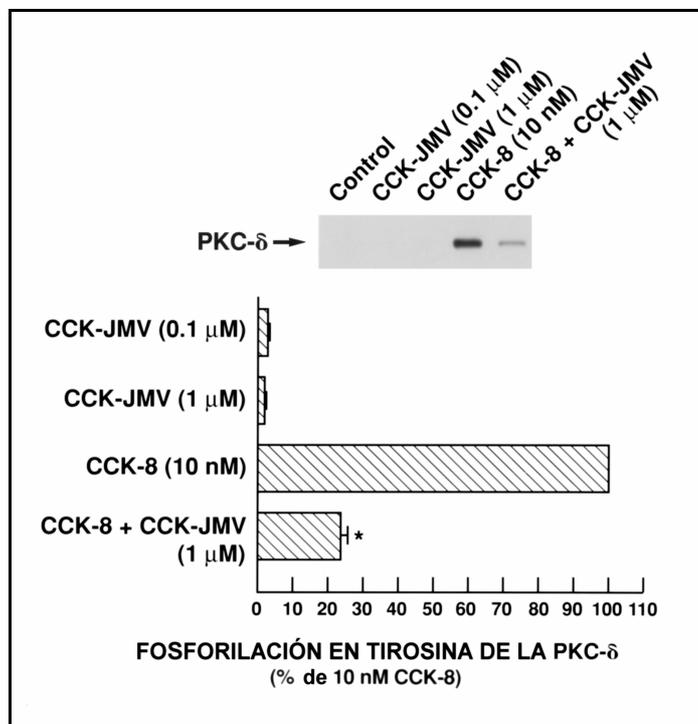


Figura IV-5. Efectos de la CCK-8 y la CCK-JMV, de forma individual o en combinación, en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata. Los acinos fueron estimulados durante 2.5 min con dos concentraciones de CCK-JMV (0.1 μ M y 1 μ M) y con CCK-8 10 nM en ausencia o presencia de CCK-JMV 1 μ M, y después se lisaron. La fosforilación en tirosina de PKC- δ se determinó como aparece descrito en "Materiales y métodos". En el panel superior se muestra un film representativo de otros tres en duplicado. El panel inferior muestra los resultados obtenidos en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ , expresados como porcentaje del incremento máximo obtenido con 10 nM de CCK-8. Los valores son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes en duplicado. El asterisco indica diferencias significativas para los resultados obtenidos tras la combinación de CCK-8 con CCK-JMV, comparados con los valores obtenidos para la CCK-8 (10 nM) utilizada en solitario (* $p < 0.01$ con una *t* de Student para muestras no apareadas).

3.2. Estudio de los mecanismos intracelulares que median la fosforilación en residuos de tirosina de la PKC- δ : función de la PKC- α

La PI3-K es una enzima que fosforila el anillo de inositol de los PtdIns en posición 3 (420). Diversos autores han descrito que los productos de esta enzima, PtdIns(3,4)P₂ y PtdIns(3,4,5)P₃, pueden activar *in vitro* las isoformas nPKC y aPKC (139). Por otra parte existen algunas evidencias experimentales que ponen de manifiesto una relación entre la actividad de la PI3-K y la PKC- δ (431), que no parece depender de la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ . Para establecer si esta fosforilación está condicionada por la actividad de la PI3-K, preincubamos los acinos pancreáticos con dos inhibidores de esta enzima que actúan con un mecanismo de inhibición diferente: la wortmanina, que bloquea la actividad catalítica; y el LY 294002, que actúa en el lugar de unión del ATP (802,1042,1043).

Se ha descrito en numerosas referencias que la actividad de la PI3-K es sensiblemente inhibida por concentraciones de LY 294002 $\leq 100 \mu\text{M}$ y por la wortmanina en concentraciones $\leq 100 \text{nM}$ (802,1042,1043). El pretratamiento durante 30 min en presencia o ausencia de wortmanina $1 \mu\text{M}$, o durante 1 hora con LY 294002 $100 \mu\text{M}$ no modifica la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ cuando es estimulada por CCK-8 (10 nM) (*Figura IV-6, -comparar líneas 4 a 6 en el panel superior-, y panel inferior*). Este pretratamiento tampoco afecta a los niveles basales de fosforilación de la PKC- δ (*Figura IV-6, -comparar líneas 1 a 3 en el panel superior-, y panel inferior*)

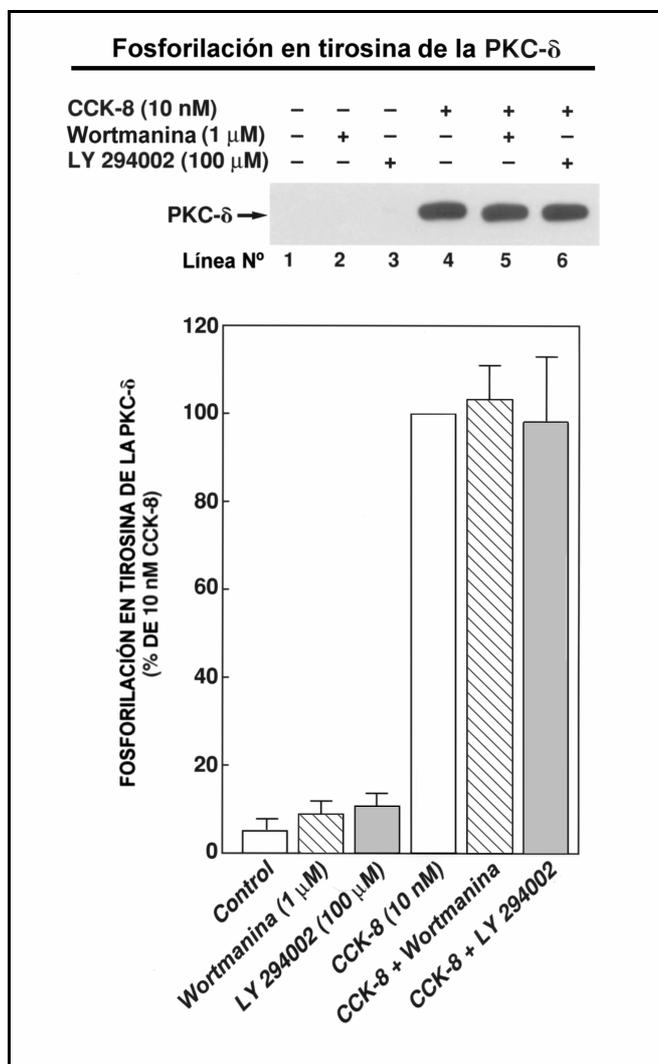


Figura IV-6. Efecto de los inhibidores de la PI3-K, wortmanina y LY 294002, en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se pretrataron con wortmanina (1 μ M) durante 30 min o con LY 294002 (100 μ M) durante 1 hora; después se incubaron durante 2.5 min con CCK-8 10 nM. La fosforilación en tirosina de PKC- δ se determinó según los procedimientos descritos en el capítulo II. En el panel superior se muestra un film representativo de tres más en duplicado. Los datos recogidos en el panel inferior son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes expresados como porcentaje de la respuesta máxima obtenida con CCK-8 10 nM. Las comparaciones estadísticas se realizaron por medio de una *t* de Student para muestras no apareadas, no obteniéndose diferencias significativas.

Como ya se ha indicado en capítulos precedentes, la activación del receptor CCK_A estimula la activación de la PLC a través de proteínas G heterotriméricas de membrana. Una vez activa, la PLC hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-difosfato para liberar Ins(1,4,5)P₃ y DAG. Estos mensajeros intracelulares provocan a su vez el incremento de la [Ca²⁺]_i y la activación de la PKC, respectivamente (4).

Está perfectamente establecida la independencia del calcio de las nPKC para su actividad (856,1016), incluida la PKC- δ (944,945,955,956). Estos estudios realizados *in vitro*, parecen indicar que la presencia o ausencia de calcio no modifica la actividad de las nPKC; sin embargo, no se conoce la relación entre la movilización intracelular de este ion con la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ , cuando es inducida por agonistas. Con el objetivo de establecer la posible relación entre la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ y la movilización intracelular de calcio, utilizamos el ionóforo del calcio A23187 y la tapsigargina, para provocar un incremento transitorio en la concentración citosólica de este ion.

El ionóforo A23187 (1 μ M) y la tapsigargina (1 μ M) (*Figura IV-7*), utilizados en las condiciones experimentales en que previamente se ha demostrado que aumentan la [Ca²⁺]_i (839,840), no tienen efecto en la fosforilación de la PKC- δ . Es decir, la movilización de calcio citosólico procedente de los depósitos intracelulares, no es capaz de estimular la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ (*Figura IV-7, panel superior -comparar líneas 1 a 3-, y panel inferior*). El A23187 y la tapsigargina tampoco muestran ningún efecto en la fosforilación de la PKC- δ cuando es inducida por TPA 0.1 μ M (*Figura IV-7, panel superior -comparar líneas 4 a 7-, y panel inferior*).

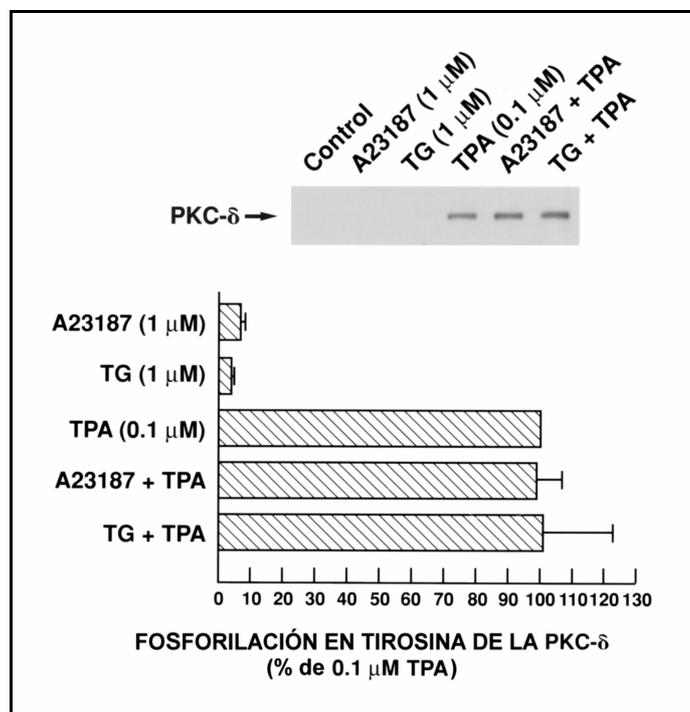
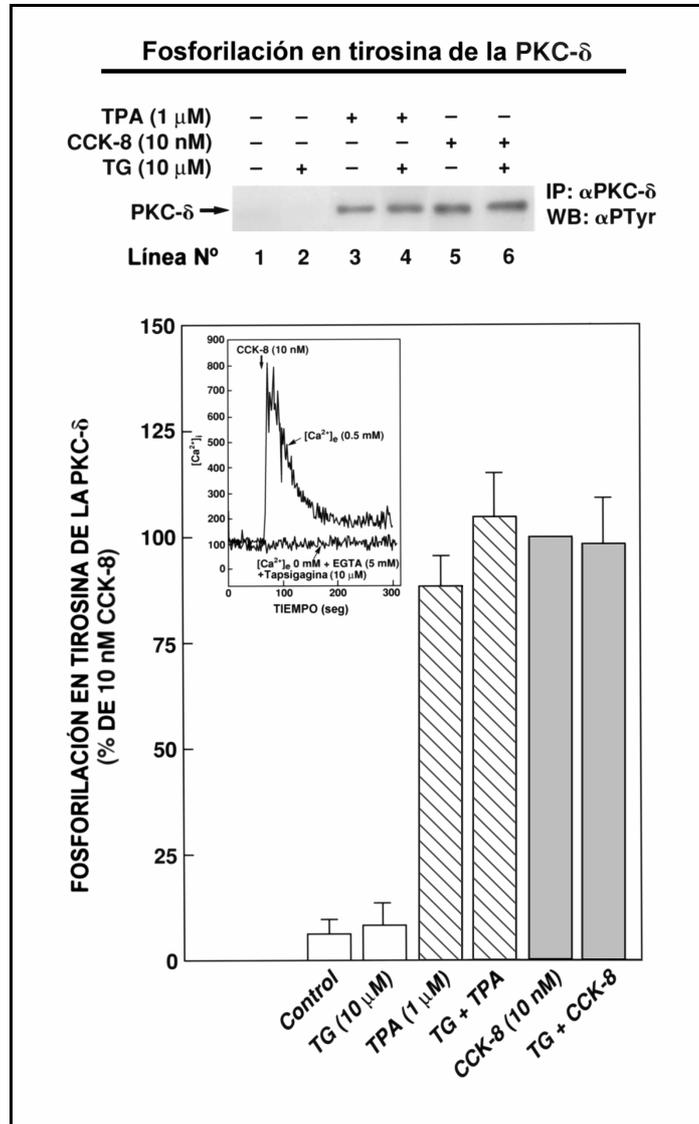


Figura IV-7. Efecto del ionóforo del calcio A23187 o la tapsigargina, solos o en combinación con el éster de forbol TPA, en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos de rata fueron incubados durante 5 min con los agentes indicados; la fosforilación en tirosina de la PKC- δ se determinó como aparece descrito en el apartado "Materiales y métodos". En el panel superior se muestra un experimento típico representativo de otros tres en duplicado. Los resultados que aparecen en el panel inferior son la media \pm EEM de cuatro experimentos diferentes, expresados como el porcentaje del incremento sobre el control en la fosforilación en tirosina de PKC- δ causado por 0.1 μ M de TPA.

Una vez establecido que la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ no es estimulada por el incremento de calcio citosólico, nos propusimos caracterizar completamente la independencia de esta isoforma de la movilización de calcio intracelular, eliminando la capacidad de la célula para producir dicho incremento. El pretratamiento de los acinos pancreáticos con tapsigargina (10 μ M) durante 30 min en un medio libre de calcio anula la movilización de este ion inducida por CCK-8 10 nM (*Figura IV-8, ver recuadro*). Este pretratamiento no modifica el patrón de fosforilación estimulado por CCK-8 10 nM durante 2.5 min (*Figura IV-8, panel superior -comparar líneas 5 y 6-, y panel inferior*) ni por TPA 1 μ M durante 5 min (*Figura IV-8, panel superior -comparar líneas 3 y 4-, y panel inferior*).

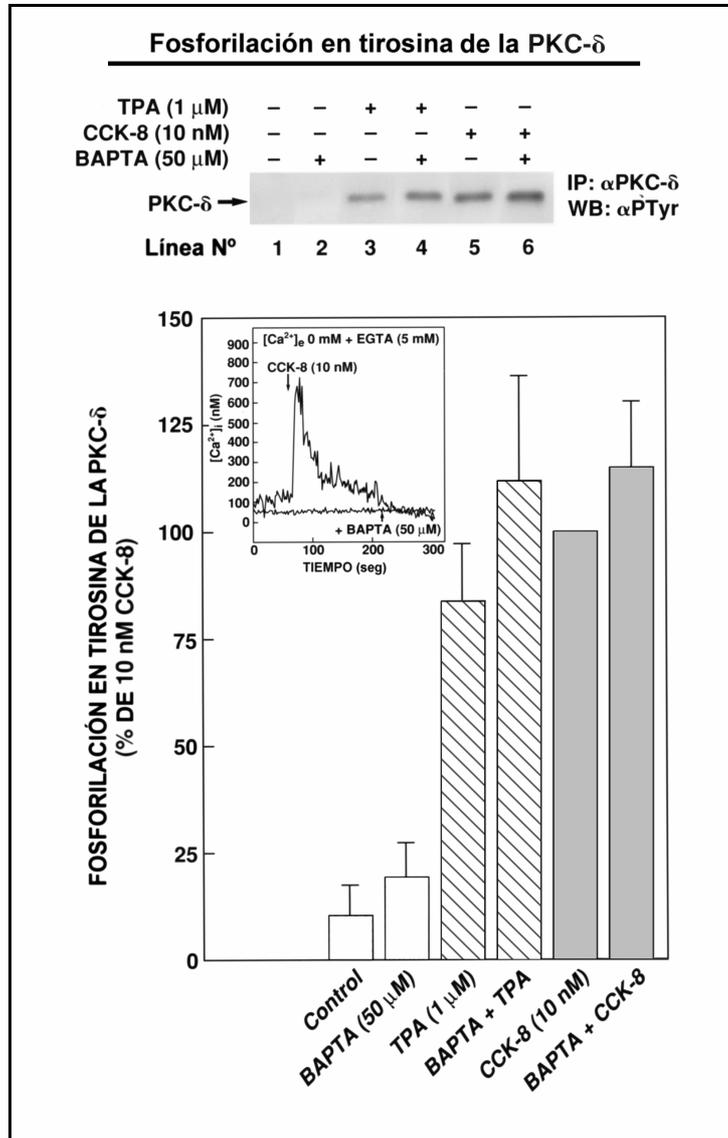


(Véase página siguiente)

Figura IV-8. Efecto de la depleción de los depósitos intracelulares de calcio por la tapsigargina (TG), en el incremento en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ inducida por CCK-8 o TPA en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos fueron preincubados durante 30 min a 37 °C con tapsigargina (TG) (10 μ M) en un tampón de incubación libre de calcio (conteniendo EGTA 5 mM), y después se incubaron durante 2.5 min adicionales en ausencia o presencia de CCK-8 (10 nM), o durante 5 min en ausencia o presencia de TPA (1 μ M). Para determinar la fosforilación en restos de tirosina de PKC- δ en los lisados acinares y la $[Ca^{2+}]_i$ en suspensiones acinares se utilizaron los procedimientos descritos en el capítulo "Materiales y métodos". En el panel superior se muestra un film representativo de tres experimentos más en duplicado. En el panel inferior se representan los resultados con la media \pm EEM de cuatro experimentos en duplicado, expresados como el porcentaje del incremento sobre el basal de la fosforilación en tirosina de la PKC- δ obtenido con CCK-8 10 nM en un medio con calcio. En el gráfico se incluye un recuadro con dos registros de la $[Ca^{2+}]_i$, a lo largo del tiempo, obtenidos tras estimular la suspensión acinar con CCK-8 10 nM en un medio con calcio (Registro: $[Ca^{2+}]_e$ 0.5 mM), o después de pretratar los acinos con tapsigargina 10 μ M en un medio sin calcio (Registro: $[Ca^{2+}]_e$ 0 mM + EGTA 5 mM + Tapsigargina 10 μ M). Las medias se compararon con una *t* de Student para muestras no apareadas, y no mostraron diferencias significativas entre las muestras no tratadas y las pretratadas con tapsigargina.

Una vez caracterizada la independencia de la movilización de calcio intracelular para la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ examinamos, a continuación, el papel que la presencia de calcio intracelular juega en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ .

El BAPTA AM es un quelante intracelular de calcio que reduce la concentración citosólica de este ion a niveles subfisiológicos, impidiendo, además, la movilización de este ion desde depósitos celulares. La preincubación de los acinos pancreáticos con BAPTA AM 50 μ M durante 30 min en un medio libre de calcio con EGTA 5 mM, impide la movilización de calcio intracelular después del tratamiento con CCK-8, además, los niveles citosólicos de calcio están por debajo de los niveles basales (*Figura IV-9, véase recuadro*). El pretratamiento con este inhibidor, en las condiciones descritas, no afecta significativamente la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ inducida por la CCK-8 10 nM durante 2.5 min (*Figura IV-9, panel superior -comparar líneas 5 y 6-*), ni tampoco afecta a la estimulada por una concentración 1 μ M de TPA durante 5 min (*Figura IV-9, panel superior -comparar líneas 3 y 4-*).



(Véase página siguiente)

Figura IV-9. Efecto del BAPTA AM, un quelante intracelular de calcio, en el incremento en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ inducida por CCK-8 o TPA en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos fueron preincubados durante 30 min a 37 °C con BAPTA AM (50 μ M) en un tampón de incubación sin calcio (conteniendo EGTA 5 mM), y después se incubaron durante 2.5 min adicionales en ausencia o presencia de CCK-8 (10 nM), o durante 5 min en ausencia o presencia de TPA (1 μ M). Para determinar la fosforilación en restos de tirosina de PKC- δ en los lisados acinares y la $[Ca^{2+}]_i$ en suspensiones acinares se utilizaron los procedimientos descritos en el capítulo "Materiales y métodos". En el panel superior se muestra un film representativo de tres experimentos más en duplicado. En el panel inferior se muestra un gráfico con la media \pm EEM de cuatro experimentos en duplicado expresados como porcentaje del incremento sobre el basal de la fosforilación en tirosina de la PKC- δ obtenido con CCK-8 10 nM en un medio con calcio. En el gráfico se incluye un recuadro con dos registros de la $[Ca^{2+}]_i$ a lo largo del tiempo, obtenidos tras estimular la suspensión acinar con CCK-8 10 nM en un medio sin calcio (Registro: $[Ca^{2+}]_e$ 0 mM + EGTA 5 mM), o después de pretratar los acinos con BAPTA AM 50 μ M en un medio sin calcio (Registro: + BAPTA 50 μ M).

Para investigar si la integridad de las conexiones del citoesqueleto es un requisito para la estimulación por CCK-8 de la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ utilizamos citocalasina D, un agente que selectivamente desorganiza el citoesqueleto de actina.

La preincubación de los acinos pancreáticos durante 2 horas con citocalasina D a una concentración 3 μ M ha demostrado inhibir la fosforilación en tirosina de diversas proteínas asociadas a las estructuras focales en este tipo celular (264,369,477,683). Sin embargo, el pretratamiento con citocalasina D en las condiciones descritas, no modifica significativamente la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ estimulada durante 2.5 min por CCK-8 10 nM (*Figura IV-10, panel superior -comparar líneas 5 y 6-, y panel inferior*), ni tampoco la estimulada cuando se activa directamente esta isoforma con el éster de forbol TPA durante 5 min con una concentración 1 μ M (*Figura IV-10, panel superior -comparar líneas 3 y 4-, y panel inferior*).

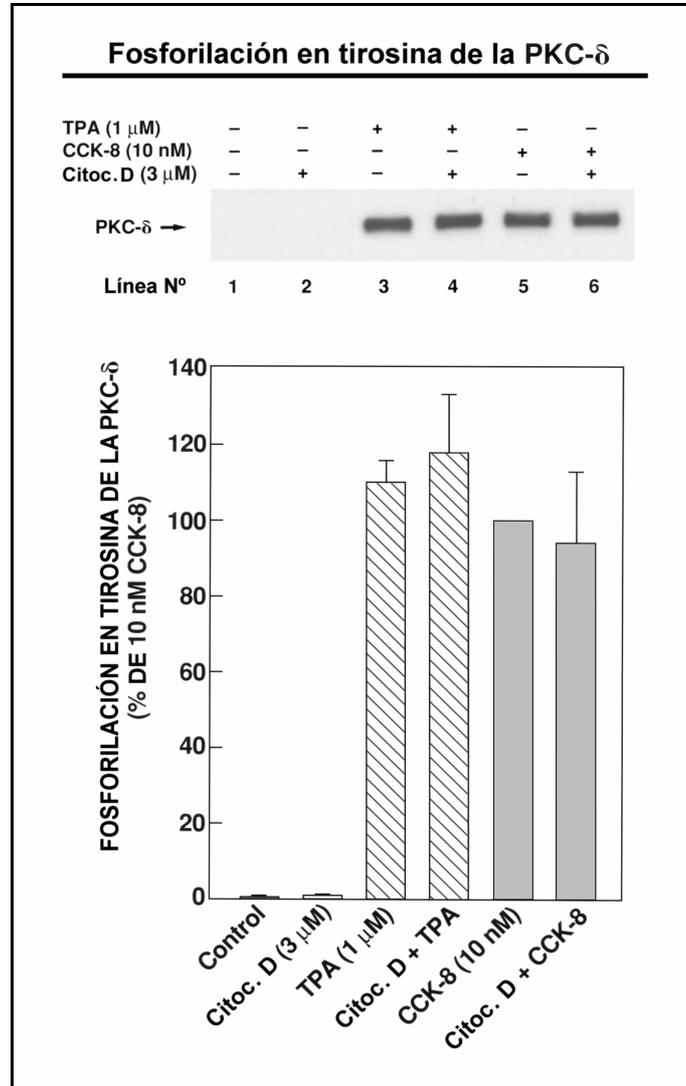


Figura IV-10. Efecto de la citocalasina D en la fosforilación en tirosina de PKC- δ inducida por CCK-8 y TPA en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se pretrataron durante 2 horas a 37 °C en ausencia o presencia de citocalasina D 3 μ M (Citoc. D). Después se incubaron durante 2.5 min en ausencia o presencia de CCK-8 10 nM, o durante 5 min en ausencia o presencia de TPA 1 μ M. La fosforilación en tirosina de PKC- δ se determinó como se describe en el capítulo "Materiales y métodos". En el panel superior se muestra un film representativo de otros tres en duplicado. Los resultados que aparecen en el panel inferior son la media \pm EEM de cuatro experimentos diferentes, los valores de CCK-8 y los de TPA están expresados como el porcentaje del incremento sobre el control en la fosforilación en tirosina de PKC- δ causado por 10 nM de CCK-8. Las comparaciones estadísticas se realizaron por medio de una t de Student para muestras no apareadas y no mostraron diferencias significativas.

Clásicamente se ha considerado que el GF 109203X es un inhibidor específico y general de la proteína cinasa C. Sin embargo, existen estudios donde se demuestra que posee mayor especificidad por las isoformas clásicas (501,841,1015). El pretratamiento de los acinos pancreáticos durante 2 horas con una concentración 5 μ M de GF 109203X inhibe la fosforilación en tirosina estimulada con TPA de diversas proteínas en este tipo celular (264,369,477,701). Interesantemente, este procedimiento incrementa significativamente la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 10 nM durante 2.5 min (*Figura IV-11, panel superior -comparar líneas 5 y 6-*) y por TPA 1 μ M durante 5 min (*Figura IV-11, panel superior -comparar líneas 3 y 4-*).

La fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ inducida por CCK-8 en células preincubadas con GF 109203X 5 μ M, se incrementa 2.03 ± 0.32 veces (*Figura IV-11, panel inferior*) respecto del máximo efecto inducido por 10 nM de CCK-8 en ausencia del inhibidor. Cuando las células son preincubadas con este mismo inhibidor y estimuladas con TPA 1 μ M la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ se incrementa 1.72 ± 0.47 veces (*Figura IV-11, panel inferior*), comparado con el incremento inducido por TPA 1 μ M en células no pretratadas.

Para comprobar si este hallazgo se corresponde con la inhibición selectiva de las isoformas clásicas de la PKC utilizamos inhibidores específicos de este grupo de proteínas. Diversos autores han descrito que el Gö 6976 es uno de los inhibidores que actúa con especificidad y potencia en las cPKC (1017,1021). Estos autores han establecido una IC₅₀ de 2.3 nM (2-6 nM) para la PKC- α (la única isoforma clásica presente en acinos pancreáticos), mientras que no demuestra ninguna inhibición en la isoforma δ . En otros tipos celulares se ha obtenido una completa inhibición de la isoforma α de la PKC preincubando las células con una concentración 10 μ M de este inhibidor durante 2 horas (1016).

La preincubación de los acinos pancreáticos de rata durante 2 horas con una concentración 10 μ M de Gö 6976 incrementa significativamente la fosforilación en tirosina de la PKC- δ inducida por CCK-8 10 nM (*Figura IV-12, panel superior -comparar líneas 5 y 6-*) o por el éster de forbol TPA 1 μ M (*Figura IV-12, panel superior -comparar líneas 3 y 4-*). El incremento detectado en la fosforilación estimulada por CCK-8 10 nM en células preincubadas con Gö 6976 10 μ M es 2.82 ± 0.59 veces el valor obtenido en ausencia del inhibidor (*Figura IV-12, panel inferior*). Cuando las células son preincubadas con Gö 6976 y estimuladas con una concentración 1 μ M de TPA durante 5 min, se detecta un incremento en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ es 2.11 ± 0.66 veces el valor obtenido sin inhibidor (*Figura IV-12, panel inferior*).

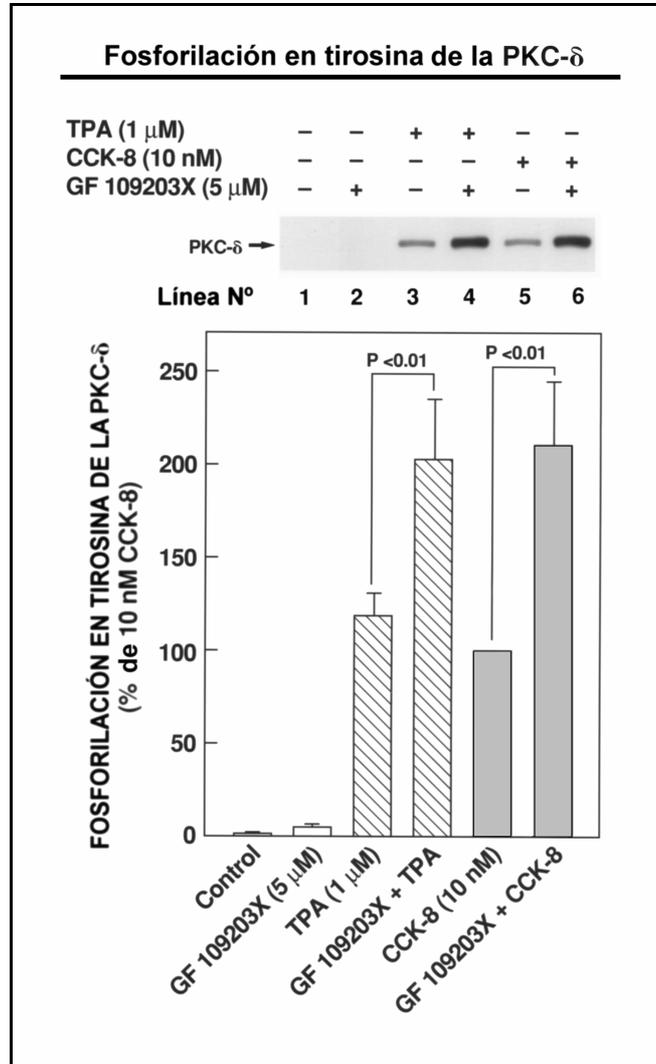


Figura IV-11. Efecto del inhibidor general de las PKCs, GF 109203X, en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 o TPA en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se preincubaron durante 2 horas a 37 °C en ausencia o presencia de GF 109203X (5 μ M); a continuación se incubaron durante 2.5 min en ausencia o presencia de CCK-8 10 nM, o durante 5 min en ausencia o presencia de TPA 1 μ M y se lisaron. La fosforilación en tirosina de PKC- δ se determinó según se describe en el capítulo "Materiales y métodos". En el panel superior se muestra un film representativo de otros tres en duplicado. Los resultados que aparecen en el panel inferior son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes, expresados como porcentaje del incremento sobre el control en la fosforilación en tirosina de PKC- δ causado por 10 nM de CCK-8. Las comparaciones estadísticas se realizaron por medio de una t de Student para muestras no apareadas.

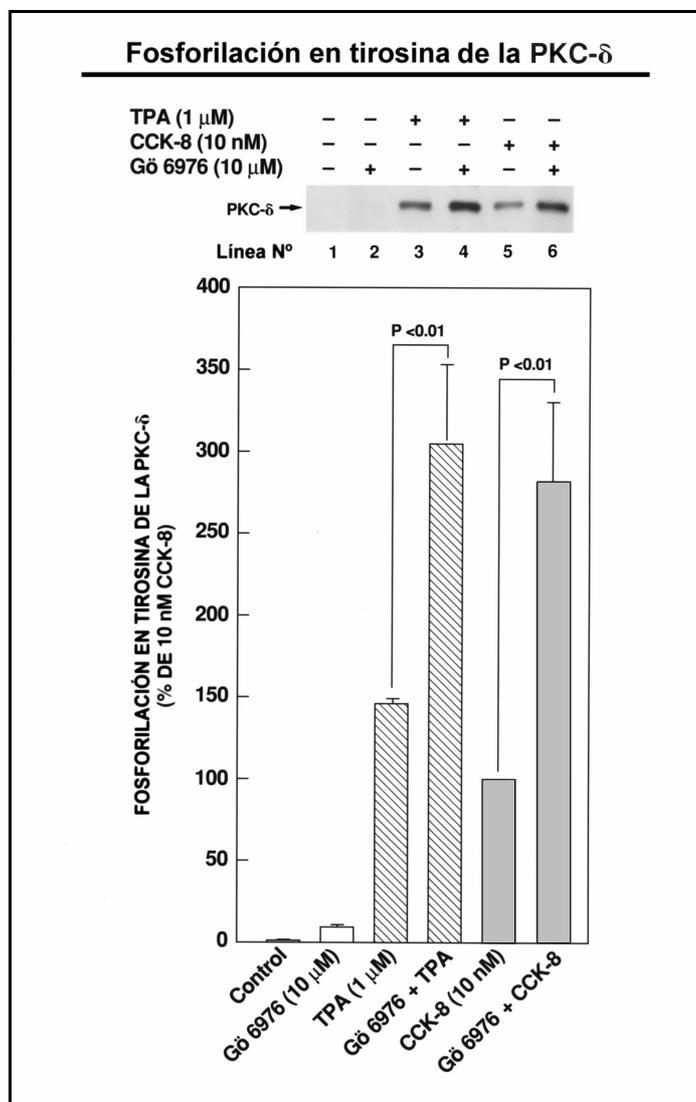


Figura IV-12. Efecto del inhibidor de las cPKC, Gö 6976, en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 o TPA en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se preincubaron durante 2 horas a 37 °C en ausencia o presencia de Gö 6976 (10 μ M); a continuación se incubaron durante 2.5 min en ausencia o presencia de CCK-8 10 nM, o durante 5 min en ausencia o presencia de TPA 1 μ M y se lisaron. La fosforilación en tirosina de PKC- δ se determinó según se describe en el capítulo "Materiales y métodos". En el panel superior se muestra un film representativo de otros tres en duplicado. Los resultados que aparecen en el panel inferior son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes, expresados como porcentaje del incremento sobre el control en la fosforilación en tirosina de PKC- δ causado por 10 nM de CCK-8. Las comparaciones estadísticas se realizaron por medio de una t de Student para muestras no apareadas.

Finalmente, hemos utilizado una tercera aproximación para caracterizar si el efecto potenciador de la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ , estimulada por CCK-8 y TPA en acinos pancreáticos pretratados con GF 109203X o Gö 6976, se debe a la inhibición de isoformas clásicas de la PKC. Para ello, utilizamos el safingol, un inhibidor específico de la PKC- α , que es la única isoforma del grupo de las PKC clásicas presente en este tipo celular. La IC₅₀ para este inhibidor, que es proporcionada por la compañía suministradora del compuesto, es de 30-40 μ M (hay variaciones dependiendo del tipo celular). Sin embargo, diversos autores han demostrado una clara inhibición de la actividad de esta isoforma a partir de 10 μ M (1022,1024).

Para comprobar la eficacia del inhibidor determinamos la actividad cinasa de la PKC- α en acinos pancreáticos de rata mediante una técnica radioactiva estándar. El resultado mostró un incremento neto de 1.69 ± 0.13 en la actividad de la PKC- α tras la incubación durante 5 min con 1 μ M de TPA. La preincubación de los acinos durante 2 horas con una concentración 10 μ M de safingol mostró una inhibición prácticamente completa de la actividad de la PKC- α (Figura IV-13, -comparar líneas 2 y 4-).

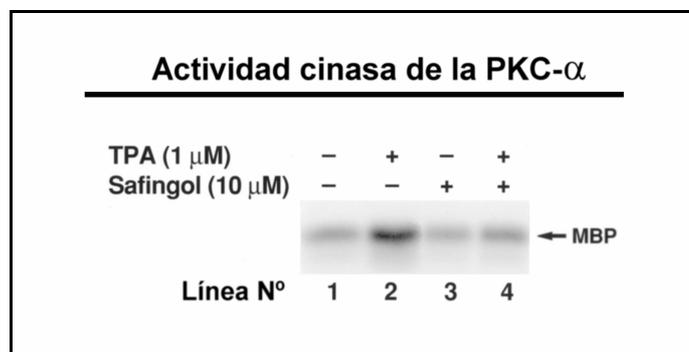


Figura IV-13. Efecto del safingol, un inhibidor específico de la PKC- α , en la actividad de esta isoforma de la PKC estimulada por TPA en acinos pancreáticos de rata. En la figura se muestra un experimento de la actividad de la isoforma α de la PKC, representativo de otros tres en triplicado. Los acinos pancreáticos se pretrataron durante 2 horas a 37 °C en ausencia (Líneas 1 y 2) o presencia de safingol 10 μ M (Líneas 3 y 4), y se incubaron durante 5 min adicionales en ausencia (Líneas 1 y 3) o presencia de TPA 1 μ M (Líneas 2 y 4); después se lisaron y se inmunoprecipitó PKC- α . La actividad cinasa se determinó en los inmunoprecipitados según el procedimiento descrito en el capítulo "Materiales y métodos". En la autoradiografía se muestra la banda del sustrato utilizado (MBP).

La preincubación de los acinos pancreáticos de rata durante 2 horas con una concentración 10 μ M de safingol incrementa significativamente la fosforilación en tirosina de la PKC- δ inducida por CCK-8 10 nM (*Figura IV-14, panel superior -comparar líneas 5 y 6-*) o por el éster de forbol TPA 1 μ M (*Figura IV-14, panel superior -comparar líneas 3 y 4-*). El incremento detectado en la fosforilación estimulada por CCK-8 10 nM en células preincubadas con safingol 10 μ M es 1.75 ± 0.23 veces el valor obtenido en ausencia del inhibidor (*Figura IV-14, panel inferior*). Cuando las células son preincubadas con safingol y estimuladas con 1 μ M de TPA durante 5 min, se detecta un incremento en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ de 2.49 ± 0.44 veces el valor obtenido sin inhibidor (*Figura IV-14, panel inferior*).

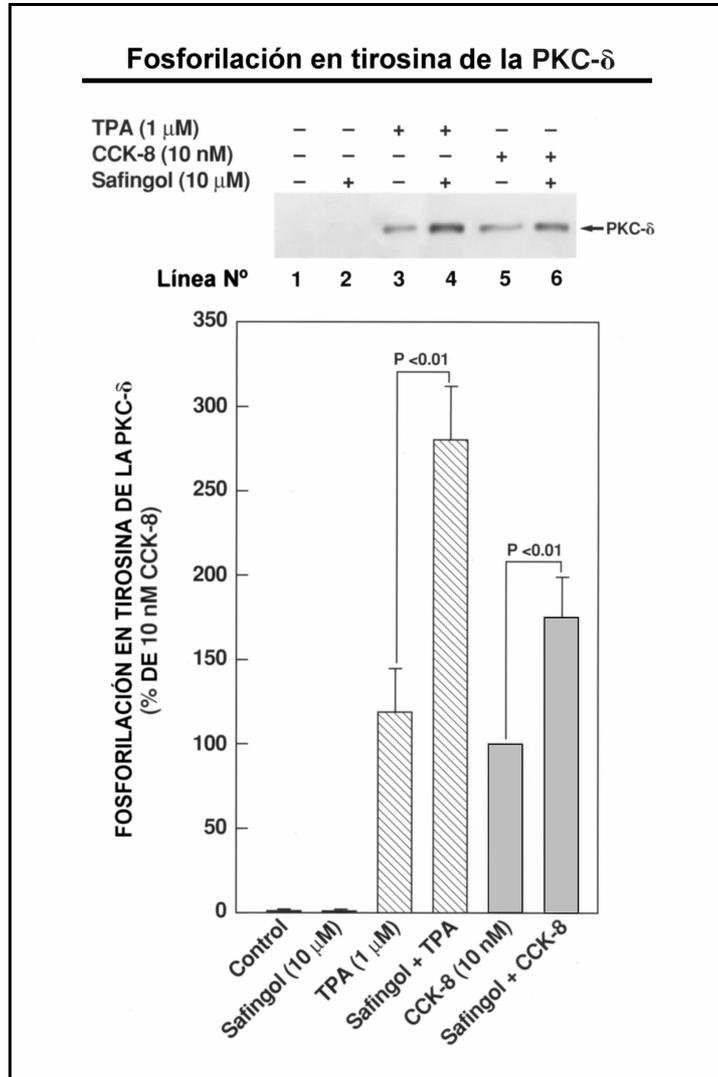


Figura IV-14. Efecto del inhibidor específico de la PKC- α , safingol, en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 o TPA en acinos pancreáticos de rata. En la figura se representan los resultados obtenidos en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ después de incubar los acinos pancreáticos sin inhibidores (Líneas 1, 3 y 5), o de pretratarlos durante 2 horas a 37 °C con safingol 10 μ M (Líneas 2, 4 y 6); e incubarlos a continuación durante 2.5 min adicionales con CCK-8 10 nM (Líneas 5 y 6), o durante 5 min con TPA 1 μ M (Líneas 3 y 4). En el panel superior se muestra un film representativo de otros tres en duplicado. Los resultados representados en el panel inferior son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes, expresados como el porcentaje del incremento sobre el control en la fosforilación en tirosina de PKC- δ causado por CCK-8 10 nM. Las comparaciones estadísticas se realizaron por medio de una t de Student para muestras no apareadas.

3.3. Relación entre los procesos de translocación, activación y fosforilación en tirosina de la PKC- δ en acinos pancreáticos

Se ha descrito que la activación celular induce la translocación de múltiples isoformas de la proteína cinasa C, desde su localización en condiciones basales hacia una nueva situación subcelular donde ejercen sus funciones. En la mayoría de los tipos celulares la PKC- δ se encuentra en el estado basal en el citoplasma, y tras su activación por diversos agonistas que actúan a través de proteínas G, factores de crecimiento, etc., o bien por su estimulación directa por ésteres de forbol transloca hacia la fracción particulada celular (929,952). En acinos pancreáticos de rata esta situación se mantiene y la isoforma δ de la PKC sufre un proceso de translocación desde el citoplasma hacia la membrana cuando las células son estimuladas con TPA (886). Sin embargo, no se ha descrito en este tipo celular el patrón de translocación de la PKC- δ ante estímulos fisiológicos como la CCK-8. De igual forma, tanto en acinos pancreáticos como en las otras células donde se ha estudiado, se desconoce la implicación funcional de la fosforilación en restos de tirosina de esta isoforma en su translocación.

En acinos pancreáticos de rata no estimulados, la PKC- δ se encuentra prácticamente en su totalidad en la fracción citosólica: 94.9 ± 2.15 %; mientras que en membrana y núcleo esta proteína es prácticamente indetectable (3.2 ± 3.6 % y 1.4 ± 0.4 % del total, respectivamente) (*Figura IV-15, panel superior -comparar líneas 1, 4 y 7-, y panel inferior -barras control-*). Tras la incubación durante 2.5 min con CCK-8 10 nM se detecta un descenso del 42.1 ± 6.1 % en la fracción citosólica, y un incremento en la fracción de membrana y nuclear del 27.3 ± 9.8 % y 14.8 ± 3.6 %, respectivamente (*Figura IV-15, panel superior -comparar líneas 3, 6 y 9-, y panel inferior -barras CCK-8 10 nM-*). Por su parte, la incubación de los acinos pancreáticos durante 5 min con el éster de forbol TPA 1 μ M induce la completa translocación de esta isoforma desde el citoplasma hacia las fracciones particuladas. La PKC- δ que transloca tras el tratamiento con TPA se distribuye hacia la membrana (64.6 ± 5.5 %) y el núcleo (35.3 ± 3.6 %) (*Figura IV-15, panel superior -comparar líneas 2, 5 y 8-, y panel inferior -barras TPA 1 μ M-*).

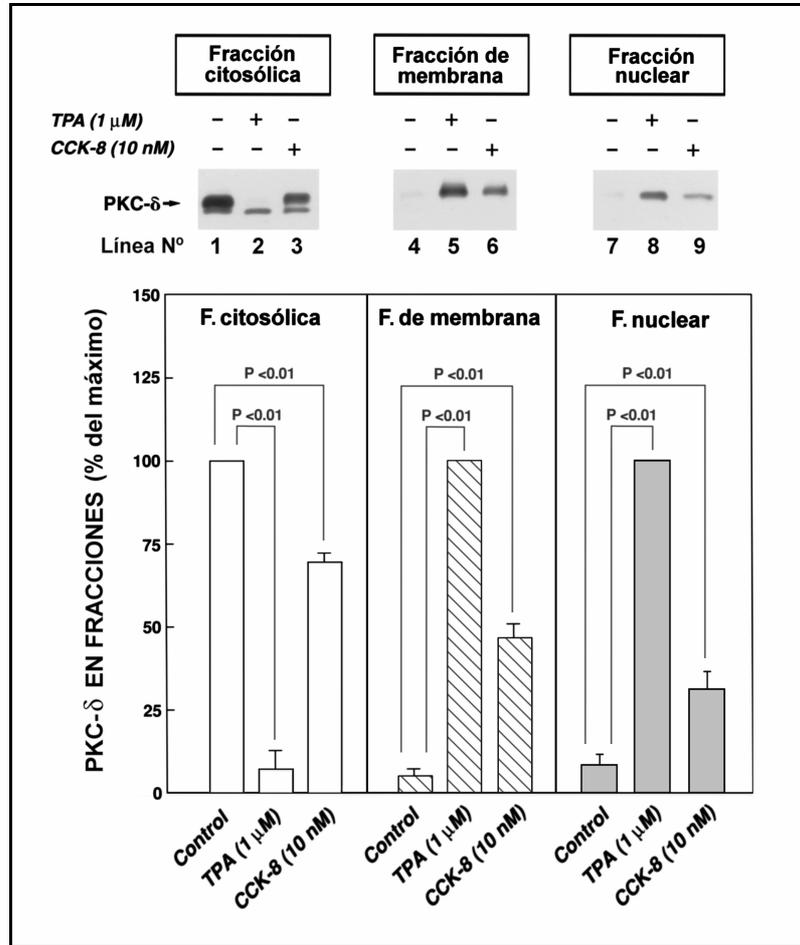


Figura IV-15. Efecto de la CCK-8 y del TPA en la redistribución de la PKC- δ entre las fracciones subcelulares de acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se incubaron durante 2.5 min en ausencia o presencia de CCK-8 10 nM, o durante 5 min en ausencia o presencia de TPA 1 μ M. Los lisados de las fracciones subcelulares (10 μ g por muestra) se analizaron sin realizar inmunoprecipitación previa mediante Western blotting con un anticuerpo policlonal anti-PKC- δ , tal y como aparece descrito en "Materiales y métodos". En el panel superior se muestran tres films, cada uno representativo de otros tres más en duplicado para cada fracción. En el panel inferior se muestra la concentración relativa de la PKC- δ en cada una de las fracciones en condiciones basales (control), y después del tratamiento con los agonistas. Los resultados se han normalizado como porcentaje respecto a la máxima cantidad de la proteína detectada en cada fracción. En la **fracción citosólica** el máximo nivel de PKC- δ se localiza en acinos no estimulados (control), normalizándose a 100 %; los valores de los tratamientos con CCK-8 y TPA se expresan en esta fracción respecto a este. Para las **fracciones de membrana y nuclear** el valor normalizado 100 % de la PKC- δ se corresponde con los valores obtenidos tras el tratamiento con TPA; los valores control y los obtenidos después del tratamiento con CCK-8 se normalizan respecto al primero. Los valores son la media \pm EEM (n = 4). Las comparaciones estadísticas se realizaron por medio de una t de Student para muestras no apareadas.

Tanto el éster de forbol TPA (1 μ M) como el neuropéptido CCK-8 (100 nM) estimulan la translocación de la PKC- δ a las fracciones de membrana y núcleo de una forma muy rápida. Tras 1 min de incubación con TPA 1 μ M la translocación de la PKC- δ a la membrana es el 87.2 ± 18.6 % de la máxima detectada, máximo que se obtiene a los 5 min (*Figura IV-16, panel superior -comparar líneas 2-5-, y panel inferior -curva TPA 1 μ M-*). Después de 15 min de incubación con el éster de forbol, los valores de PKC- δ presentes en membrana permanecen elevados, representando el 92.6 ± 16.7 % del máximo (*Figura IV-16, panel superior -línea 5-, y panel inferior*).

La CCK-8 tiene un patrón de translocación a la membrana diferente puesto que después de la incubación de los acinos pancreáticos con una concentración 10 nM de este neuropéptido se alcanza el máximo de translocación en 1 min (*Figura IV-16, panel superior -línea 6-, y panel inferior -curva CCK 10 nM-*), detectándose posteriormente un rápido descenso de esta isoforma presente en la fracción de membrana, alcanzando el 27.6 ± 9.3 % a los 15 min (*Figura IV-16, panel superior -comparar líneas 6-9-, y panel inferior*).

Las características temporales en la translocación de la PKC- δ a la fracción nuclear estimulada por TPA es equiparable a la descrita para la fracción de membrana. Así, el TPA, con una concentración 1 μ M, induce una rápida translocación de esta isoforma, alcanzando aproximadamente el 70 % de la cantidad máxima en 1 min, para llegar al máximo a los 5 min (*Figura IV-17, panel superior -comparar líneas 2-5-, y panel inferior*). La cantidad de PKC- δ detectada en la fracción nuclear durante el tratamiento con este compuesto se mantiene elevada a lo largo del tiempo, detectándose valores superiores al 95 % del máximo después de 15 min de incubación (*Figura IV-17, panel superior -línea 5-, y panel inferior*).

La CCK-8, con una concentración 10 nM, estimula la translocación a la fracción nuclear de la PKC- δ de forma similar a la descrita para la fracción de membrana. Este neuropéptido induce el máximo de translocación después de 1 min de incubación (*Figura IV-17, panel superior -línea 6-, y panel inferior*). De igual forma, los valores presentes en esta fracción descienden rápidamente hasta alcanzar aproximadamente el 50 % de la cantidad máxima detectada en esta fracción después de 15 min (*Figura IV-17, panel superior -comparar líneas 6-9-, y panel inferior*).

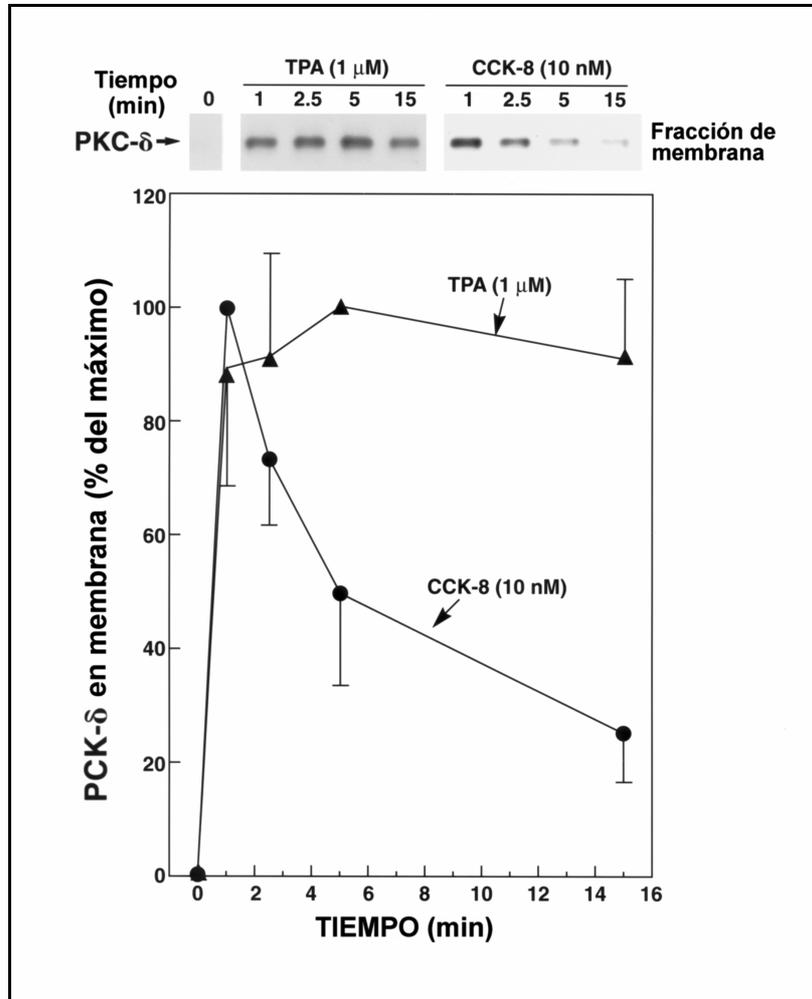


Figura IV-16. Curva de tiempo estimulada por CCK-8 y TPA para la translocación de la PKC- δ a la fracción de membrana en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se incubaron durante los tiempos indicados en ausencia o presencia de CCK-8 10 nM, o en ausencia o presencia de TPA 1 μ M. Los lisados de la fracción de membrana (10 μ g por muestra) se analizaron sin realizar inmunoprecipitación previa mediante Western blotting con un anticuerpo policlonal anti-PKC- δ , según se describe en el capítulo II. En el panel superior se muestran films representativos de otros tres más en duplicado para cada tratamiento. En el panel inferior se muestra la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes expresados como porcentaje de la cantidad máxima de PKC- δ detectada en la fracción de membrana después de cada tratamiento. Ese nivel máximo se alcanzó después de 1 min de incubación con CCK-8 10 nM, y después de 5 min de incubación con TPA 1 μ M.

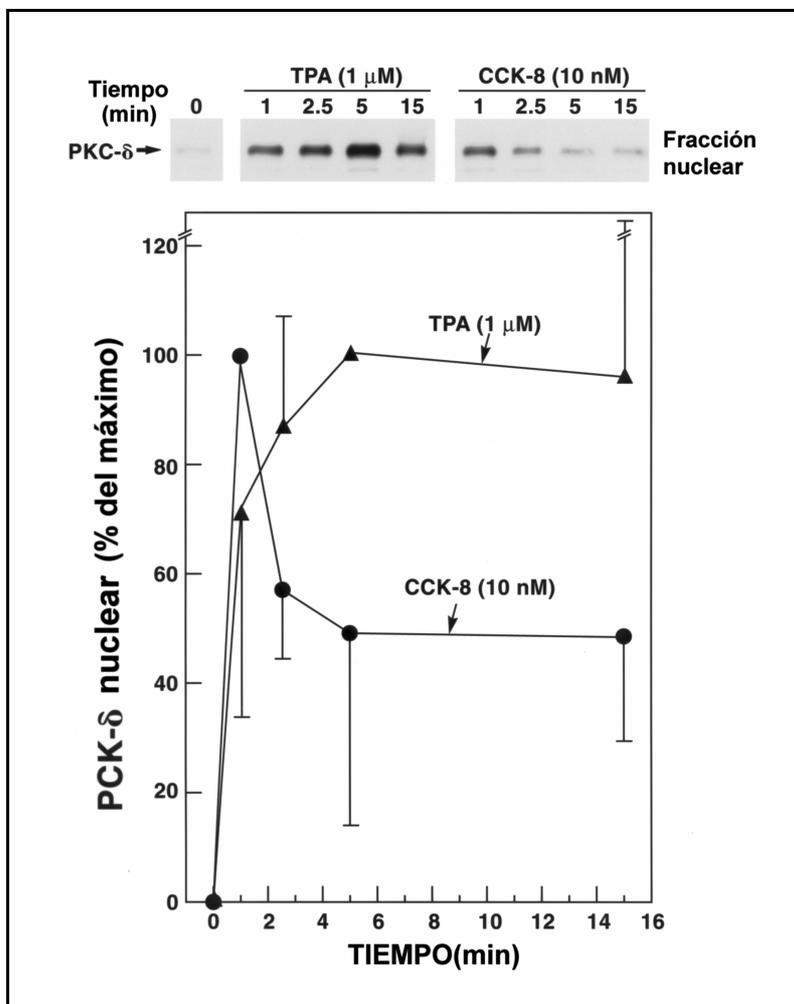


Figura IV-17. Curva de tiempo estimulada por CCK-8 y TPA para la translocación de la PKC- δ a la fracción nuclear en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se incubaron durante los tiempos indicados en ausencia o presencia de CCK-8 10 nM, o en ausencia o presencia de TPA 1 μ M. Los lisados de la fracción nuclear (10 μ g por muestra) se analizaron sin realizar inmunoprecipitación previa mediante Western blotting con un anticuerpo policlonal anti-PKC- δ , según se describe en el capítulo II. En el panel superior se muestran films representativos de otros tres más en duplicado para cada tratamiento. En el panel inferior se muestra la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes expresados como porcentaje de la cantidad máxima de PKC- δ detectada en la fracción de membrana después de cada tratamiento. Ese nivel máximo se alcanzó después de 1 min de incubación con CCK-8 10 nM, y después de 5 min cuando los acinos pancreáticos se incubaron con TPA 1 μ M.

Como se ha comentado previamente, la CCK-8 estimula la actividad cinasa de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata. Además, induce su fosforilación en restos de tirosina de forma dependiente del tiempo y la concentración, y estimula su translocación desde el citoplasma hacia las fracciones de membrana y nuclear. No se ha estudiado, hasta el momento, la hipotética interacción existente entre estos tres eventos relacionados con la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata.

El rottlerin es un compuesto que ha demostrado ser un potente inhibidor específico de la PKC- δ (1018,1019). La IC₅₀ descrita para esta isoforma es de 3-6 μ M, mientras que para las isoformas α , β , y γ es de 30-42 μ M, siendo aún más elevada para el resto de isoformas. En los diversos tipos celulares en los que se ha comprobado sus efectos ha demostrado ser efectivo con una concentración cercana a 10 μ M (1018,1019).

Ya se ha indicado que la CCK-8 (10 nM) y el TPA (1 μ M) estimulan la actividad de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata, obteniéndose después de 2.5 y 5 min un incremento neto de 2.09 ± 0.13 y 2.10 ± 0.08 veces la actividad basal, respectivamente (*Figura IV-18, panel superior -comparar líneas 2 y 3 con el control, línea 1-, y panel inferior*). La preincubación de los acinos pancreáticos de rata durante 3 horas con rottlerin 6 μ M es capaz de inhibir casi completamente la actividad cinasa de la PKC- δ estimulada por CCK-8 10 nM (*Figura IV-18, panel superior -comparar líneas 3 y 6-, y panel inferior*) o por TPA 1 μ M (*Figura IV-18, panel superior -comparar líneas 2 y 5-, y panel inferior*), sin alterar los niveles basales de actividad (*Figura IV-18, panel superior -comparar líneas 1 y 4-, y panel inferior*).

Este mismo tratamiento, sin embargo, no afecta la translocación de la PKC- δ desde el citoplasma hacia la membrana y el núcleo. Así, la preincubación de los acinos pancreáticos de rata durante 3 horas con rottlerin 6 μ M no tiene efecto sobre la distribución basal de la PKC- δ (*Figura IV-19, paneles citoplasma, membrana, núcleo -comparar líneas 1 y 4-*). La translocación de la PKC- δ a la membrana y al núcleo, estimulada por una concentración 10 nM de CCK-8 en acinos pretratados con rottlerin 6 μ M durante 3 horas, es equivalente a la estimulada por este neuropéptido en acinos pancreáticos no pretratados (*Figura IV-19, paneles citoplasma, membrana, núcleo -comparar líneas 3 y 6-*). De igual forma, la translocación de la PKC- δ hacia la membrana y el núcleo, inducida por el éster de forbol TPA 1 μ M, no muestra diferencias entre los acinos preincubados 3 horas con rottlerin 6 μ M y los acinos no pretratados (*Figura IV-19, paneles citoplasma, membrana, núcleo -comparar líneas 2 y 5-*).

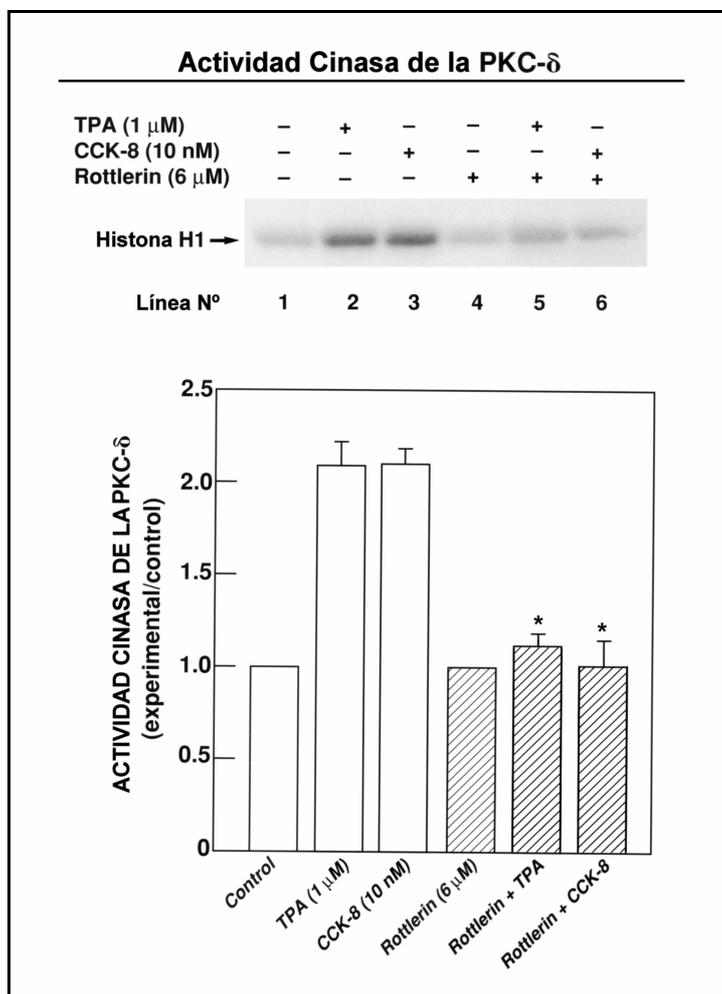


Figura IV-18. Efecto del rottlerin en la actividad de la PKC- δ estimulada por CCK-8 y TPA en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se preincubaron durante 3 horas a 37 °C en ausencia (Líneas 1 a 3) o presencia de rottlerin 6 μ M (Líneas 4 a 6); a continuación se incubaron durante 2.5 min en ausencia o presencia de CCK-8 10 nM (Líneas 3 y 6), o durante 5 min en ausencia o presencia de TPA 1 μ M (Líneas 2 y 5); después se lisaron y se inmunoprecipitó PKC- δ . La actividad cinasa de esta isoforma se determinó en los inmunoprecipitados según el procedimiento descrito en el capítulo "Materiales y métodos". En el panel superior se muestra una autoradiografía de la banda del sustrato utilizado (histona H1). Esta autoradiografía es representativa de tres más. En el panel inferior se representa la media \pm EEM obtenida de cuatro experimentos independientes. La actividad cinasa se expresa como el cociente del valor experimental, obtenido en la fosforilación del sustrato histona H1 tras la estimulación de los acinos con CCK-8 o TPA, y el valor control, obtenido en acinos a los que no se les añadió el agonista. El asterisco indica diferencias significativas para los valores de actividad estimulados por CCK-8 y TPA tras la preincubación con rottlerin, comparados con los valores obtenidos para esos mismos tratamientos sin el inhibidor (* $p < 0.01$ con una *t* de Student para muestras no apareadas).

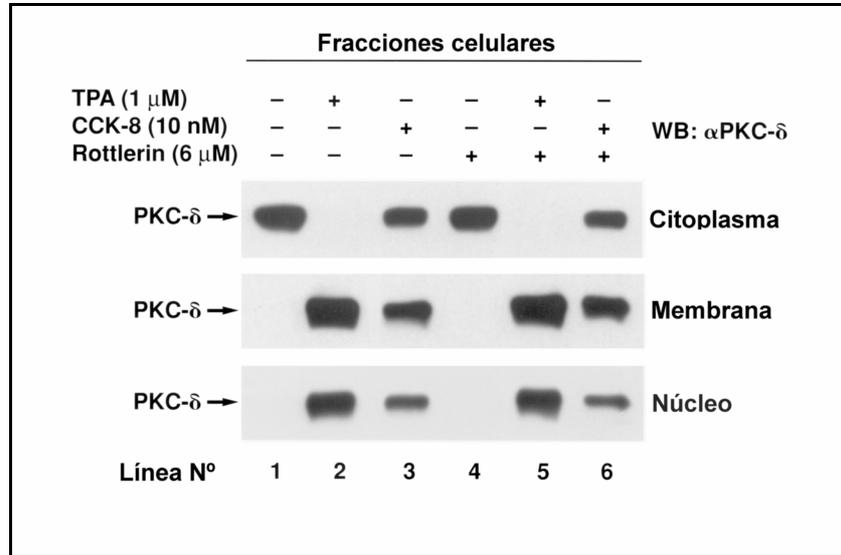


Figura IV-19. Efecto del inhibidor específico de la PKC- δ , rottlerin, en la redistribución de esta isoforma de la PKC entre las fracciones subcelulares de acinos pancreáticos de rata estimulados con CCK-8 o TPA. Los acinos pancreáticos se preincubaron durante 3 horas a 37 °C en ausencia (Líneas 1 a 3) o presencia de rottlerin 6 μ M (Líneas 4 a 6); a continuación se incubaron durante 2.5 min en ausencia o presencia de CCK-8 10 nM (Líneas 3 y 6), o durante 5 min en ausencia o presencia de TPA 1 μ M (Líneas 2 y 5) y se lisaron. Los lisados de las fracciones subcelulares se analizaron mediante Western blotting según se describe en el capítulo "Materiales y métodos". En la figura se muestran tres films, cada uno representativo de otros tres más en duplicado para cada fracción.

Para establecer si la actividad cinasa de la PKC- δ es un prerequisite para su fosforilación en residuos de tirosina, cuantificamos dicha fosforilación en acinos pancreáticos de rata preincubados durante 3 horas con una concentración 6 μ M del inhibidor específico de esta isoforma, rottlerin. En estos experimentos comprobamos que la inhibición de la actividad de la PKC- δ se acompaña con un descenso significativo de su fosforilación en tirosina. Este descenso es del 59.2 ± 18.7 % cuando los acinos pretratados con el inhibidor son estimulados durante 2.5 min con CCK-8 10 nM, respecto de la fosforilación obtenida en acinos control (Figura IV-20, panel superior -comparar líneas 5 y 6-, y panel inferior). Cuando se estimulan los acinos pancreáticos con TPA 1 μ M durante 5 min, se observa una inhibición del 71.6 ± 6.16 % en la fosforilación detectada en los preincubados con el inhibidor comparada con la obtenida en los acinos control (Figura IV-20, panel superior -comparar líneas 3 y 4-, y panel inferior).

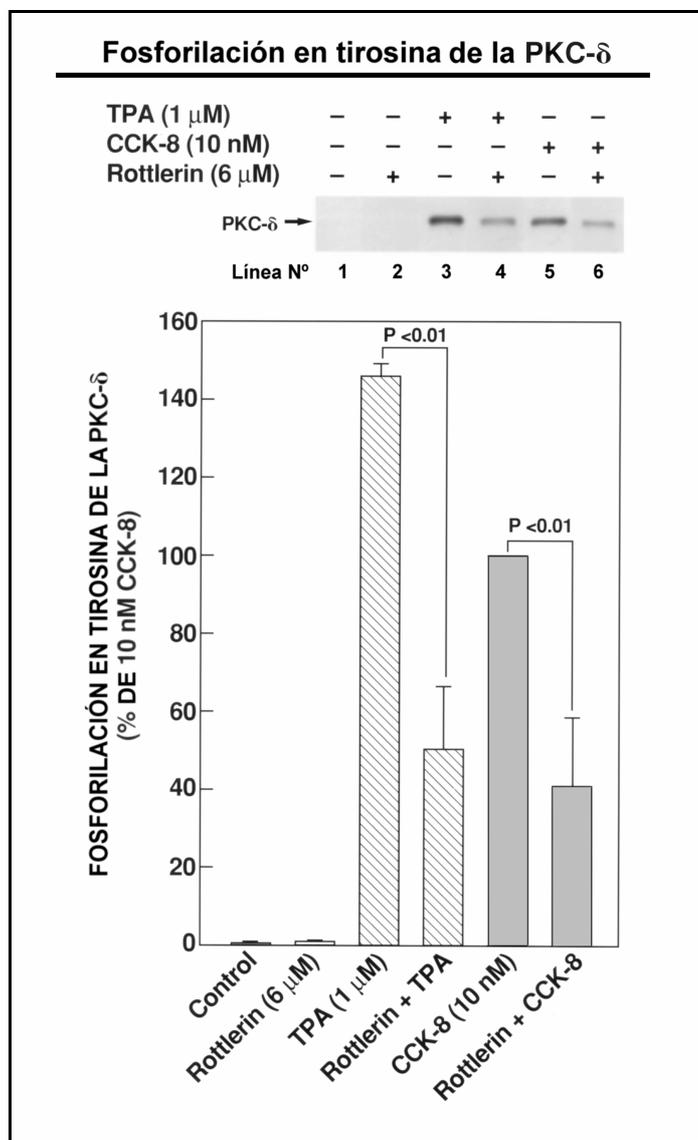


Figura IV-20. Efecto del rottlerin en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 y TPA en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se pretrataron con rottlerin 6 μ M durante 3 horas; después se incubaron durante 2.5 min con CCK-8 10 nM o 5 min con TPA 1 μ M. La fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ se determinó según los procedimientos descritos en el capítulo II. En el panel superior se muestra un film representativo de tres más en duplicado. Los datos recogidos en el panel inferior son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes expresados como porcentaje de la respuesta máxima obtenida con CCK-8 10 nM. Las comparaciones estadísticas se realizaron por medio de una t de Student para muestras no apareadas.

Posteriormente, caracterizamos la relación existente entre la fosforilación, la activación y la translocación desde una aproximación opuesta. Para ello, inhibimos la fosforilación en residuos de tirosina de la PKC- δ y evaluamos el patrón de translocación y de actividad enzimática de esta isoforma.

Se han comercializado diversos inhibidores de las tirosinas cinasas entre los que se encuentra la tirfostina B44, que es considerada como una de las más potentes y específicas (1044). La IC₅₀ de este compuesto es variable dependiendo de la tirosina cinasa evaluada, pero suele ser menor que la de otros inhibidores de estas enzimas (1044). Por ejemplo, para el EGF-R y Src muestra una IC₅₀ 25 veces menor que la de la genisteína (1044).

Cuando preincubamos durante 1 hora los acinos pancreáticos con una concentración 300 μ M de B44, tratamiento que ha demostrado su efectividad en este tipo celular en repetidas ocasiones (263,683,687), la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 10 nM durante 2.5 min está inhibida un 72.9 ± 22.5 % respecto de los acinos no pretratados (*Figura IV-21, panel superior, -comparar líneas 5 y 6-, y panel inferior*); de igual forma, cuando la fosforilación es estimulada por TPA 1 μ M, la inhibición en los acinos pretratados es del 66.8 ± 17.9 % respecto de las células control (*Figura IV-21, panel superior, -comparar líneas 3 y 4-, y panel inferior*).

Sin embargo, el pretratamiento de los acinos pancreáticos con B44 en las condiciones descritas, no modifica la redistribución de la PKC- δ en las fracciones subcelulares estimulada por la incubación durante 2.5 min con CCK-8 10 nM (*Figura IV-22, paneles citoplasma, membrana, núcleo -comparar líneas 3 y 6-*), ni la inducida por la incubación durante 5 min con TPA 1 μ M (*Figura IV-22, paneles citoplasma, membrana, núcleo -comparar líneas 2 y 5-*). De igual forma, la localización basal de la PKC- δ , que es casi exclusivamente citoplasmática, no se ve modificada por el pretratamiento con B44 (*Figura IV-22, paneles citoplasma, membrana, núcleo -comparar líneas 1 y 3-*).

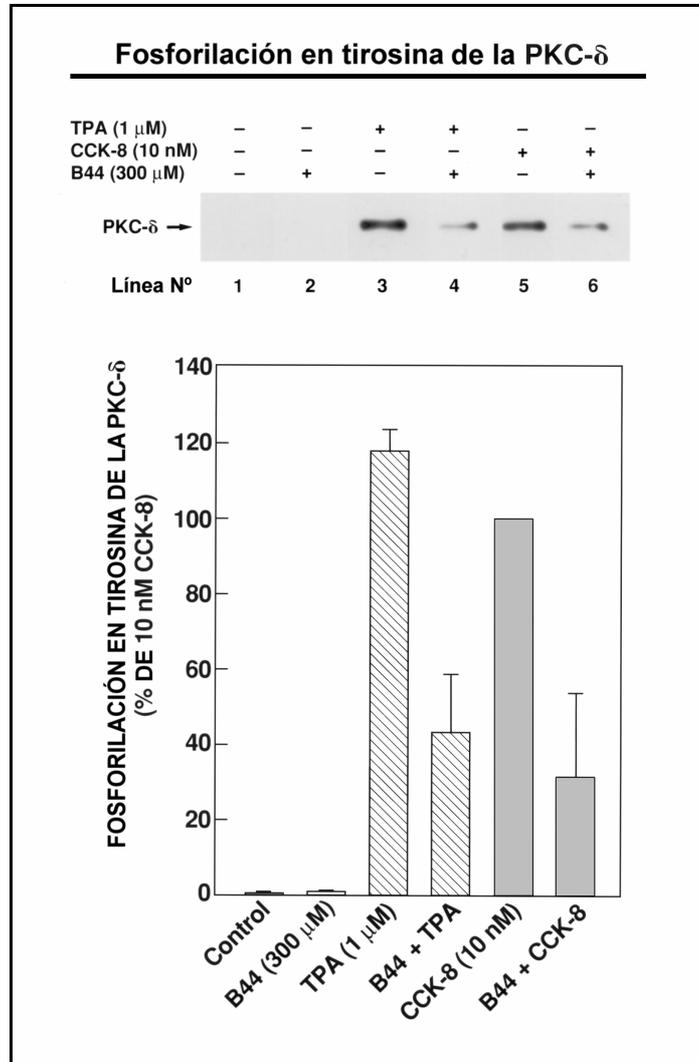


Figura IV-21. Efecto del inhibidor de las tirosinas cinasas, B44, en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 y TPA en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se pretrataron con B44 300 μ M durante 1 hora, y después se incubaron durante 2.5 min con CCK-8 10 nM, o durante 5 min con TPA 1 μ M. La fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ se determinó según los procedimientos descritos en el capítulo II. En el panel superior se muestra un film representativo de tres más en duplicado. Los datos recogidos en el panel inferior son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes expresados como porcentaje de la respuesta máxima obtenida con CCK-8 10 nM.

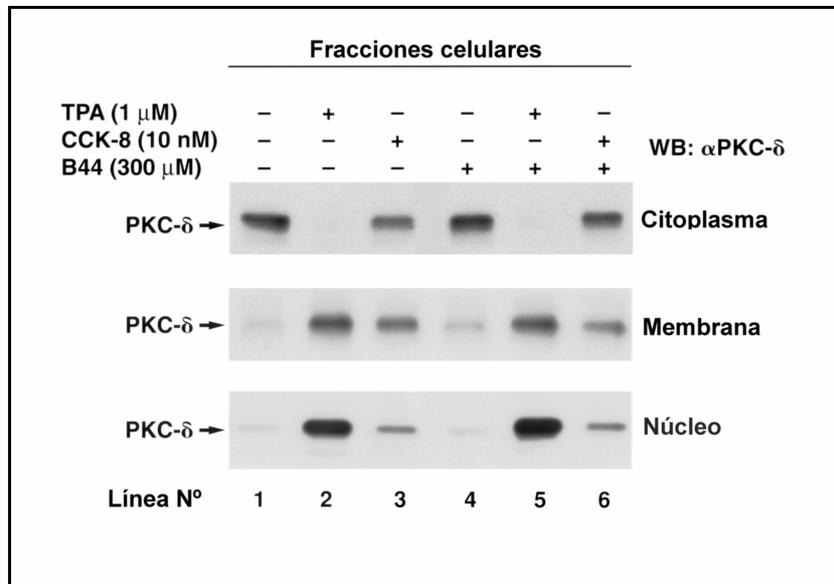


Figura IV-22. Efecto de la tirfostina B44 en la redistribución de la PKC- δ entre las fracciones subcelulares de acinos pancreáticos de rata estimulados con CCK-8 o TPA. Los acinos pancreáticos se preincubaron durante 1 hora a 37 °C en ausencia (Líneas 1 a 3) o presencia del inhibidor de las tirosinas cinasas B44 (300 μ M) (Líneas 4 a 6); a continuación se incubaron durante 2.5 min en ausencia o presencia de CCK-8 10 nM (Líneas 3 y 6), o durante 5 min en ausencia o presencia de TPA 1 μ M (Líneas 2 y 5) y se lisaron. Los lisados de las fracciones subcelulares se analizaron sin realizar inmunoprecipitación previa mediante Western blotting con un anticuerpo policlonal anti-PKC- δ , según se describe en el capítulo "Materiales y métodos". En la figura se muestran tres films, cada uno representativo de otros tres más en duplicado para cada fracción.

El pretratamiento durante 1 hora con una concentración 300 μ M de B44 tampoco modifica la actividad de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata estimulados con CCK-8 o TPA. Así, los valores de actividad estimulados por CCK 10 nM durante 2.5 min en acinos pretratados con el inhibidor de las tirosinas cinasas, son de 1.96 ± 0.06 veces la actividad basal, sin demostrar diferencias significativa con la detectada en los acinos control (2.09 ± 0.13) (Figura IV-23, panel superior, -comparar líneas 3 y 6-, y panel inferior). El tratamiento durante 5 min con TPA 1 μ M incrementa 2.07 ± 0.13 veces la actividad basal en acinos preincubados con B44, incremento que es muy similar al detectado en acinos pancreáticos no pretratados (2.10 ± 0.08) (Figura IV-23, panel superior, -comparar líneas 2 y 5-, y panel inferior).

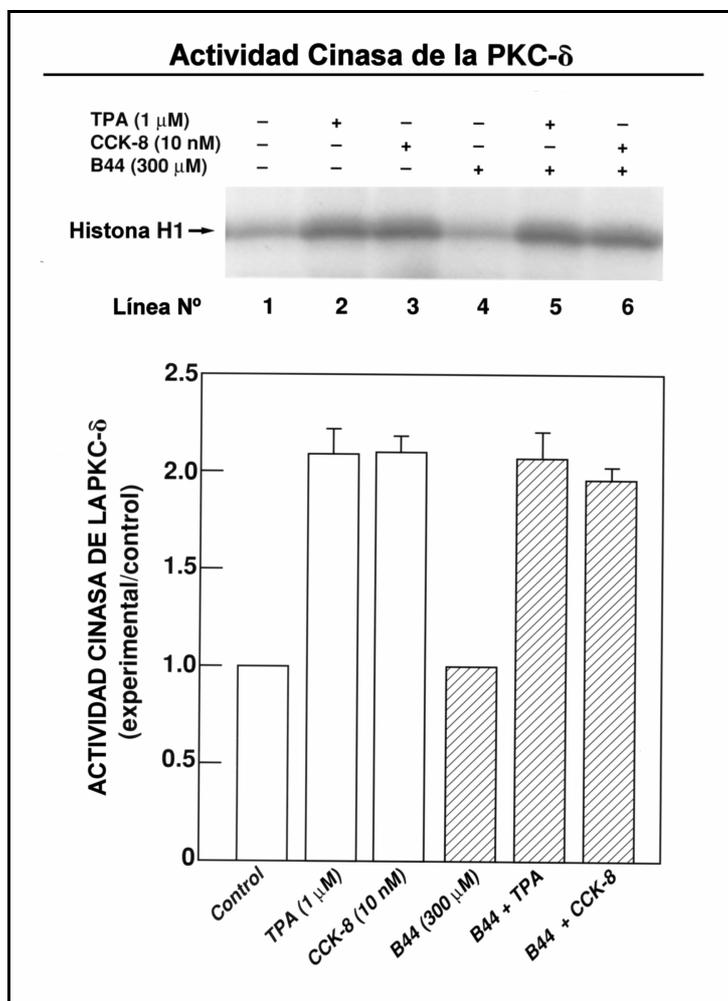
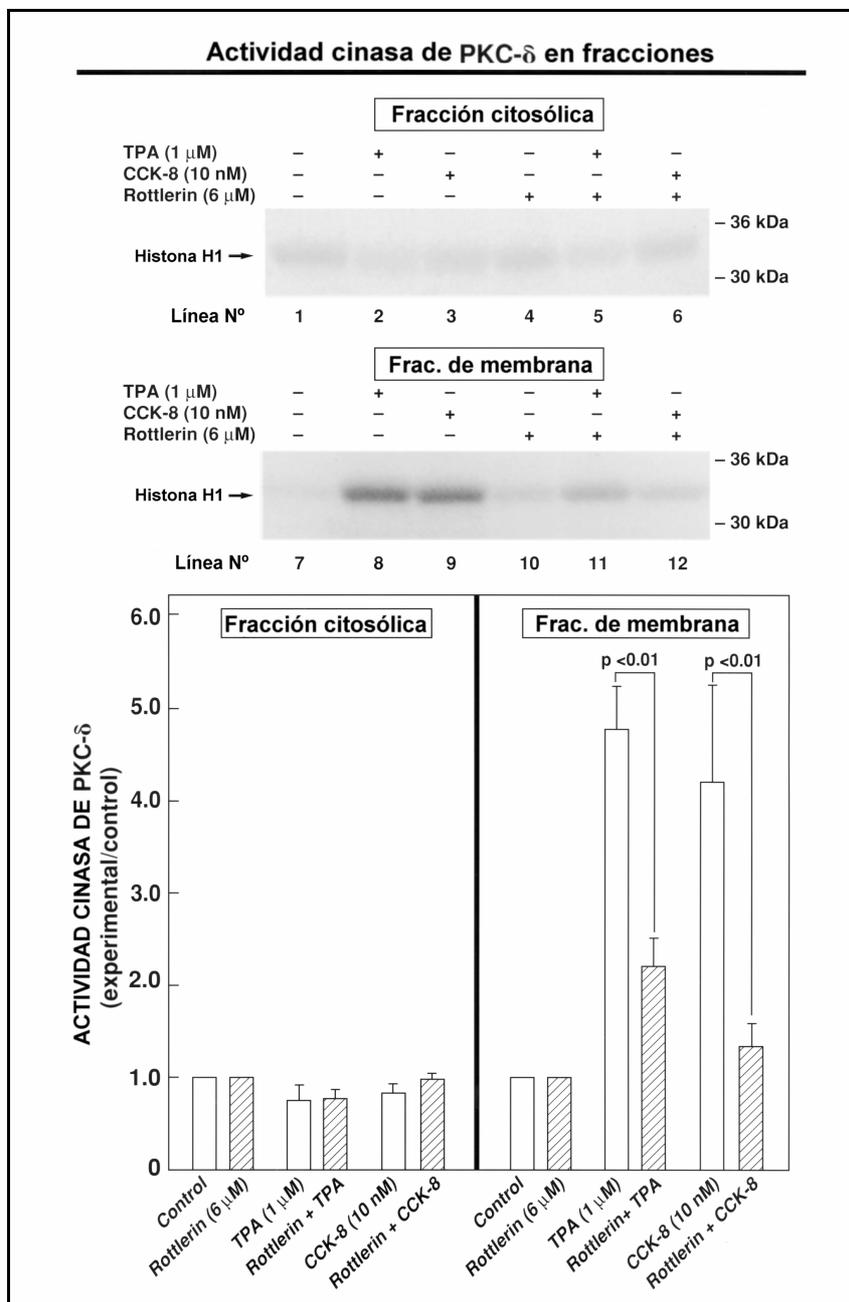


Figura IV-23. Efecto del inhibidor de las tirosinas cinasas, B44, en la actividad de la PKC- δ estimulada por CCK-8 y TPA en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se preincubaron durante 1 hora a 37 °C en ausencia (Líneas 1 a 3) o presencia de B44 300 μ M (Líneas 4 a 6); a continuación se incubaron durante 2.5 min en ausencia o presencia de CCK-8 10 nM (Líneas 3 y 6), o durante 5 min en ausencia o presencia de TPA 1 μ M (Líneas 2 y 5). La actividad cinasa de la PKC- δ se determinó en los inmunoprecipitados según el procedimiento descrito en el capítulo "Materiales y métodos". En el panel superior se muestra una autoradiografía de la banda del sustrato utilizado (histona H1). Esta autoradiografía es representativa de tres más. En el gráfico del panel inferior se representa la media \pm EEM obtenida de cuatro experimentos independientes. La actividad cinasa se expresa como el cociente del valor experimental, obtenido en la fosforilación del sustrato histona H1 tras la estimulación de los acinos con CCK-8 o TPA, y el valor control, obtenido en acinos a los que no se les añadió el agonista. Las comparaciones estadísticas se realizaron por medio de una *t* de Student para muestras no apareadas, no obteniéndose diferencias significativas entre las muestras no tratadas y las pretratadas con B44.

El mecanismo de activación de las isoformas clásicas implica un proceso de translocación previa desde su situación en condiciones basales hacia las membrana biológicas donde interaccionan con PtdSer y DAG, en un proceso dependiente de calcio. Este mecanismo no ha sido establecido rigurosamente para las nPKCs aunque diversos autores han caracterizado una dependencia similar de estas isoformas de las membranas biológicas, pero en este caso el proceso es independiente de los incrementos de calcio citosólico (140,856,952).

Cuando el ensayo de actividad cinasa de la isoforma δ de la proteína cinasa C se efectúa en las fracciones subcelulares citoplasmática y de membrana los valores de actividad detectados son muy esclarecedores. En primer lugar, no existe actividad cinasa detectable en la fracción no particulada en los acinos pancreáticos de rata no estimulados, y tampoco en los que han sido tratados durante 2.5 min con CCK-8 10 nM o durante 5 min con TPA 1 μ M (*Figura IV-24, panel superior, -comparar líneas 1-6-, y panel inferior izquierdo*). Cuando el ensayo de la actividad cinasa se realiza con las muestras obtenidas en la fracción de membrana de acinos pancreáticos de rata, tampoco se detecta actividad cinasa de la PKC- δ en acinos no estimulados (*Figura IV-24, panel intermedio, -líneas 7 y 10-, y panel inferior derecho*). Sin embargo, el tratamiento durante 2.5 min con CCK-8 10 nM o durante 5 min con TPA 1 μ M, inducen un manifiesto incremento en la actividad de esta isoforma, que es de 4.21 ± 1.05 y 4.78 ± 0.47 veces el nivel basal, respectivamente (*Figura IV-24, panel intermedio, -líneas 8 y 9-, y panel inferior derecho*). Estos incrementos netos son mayores que los detectados en los ensayos de actividad con lisados acinares totales, probablemente porque el nivel basal de actividad en las fracciones de membrana es aún más bajo que los niveles basales detectados cuando el ensayo cinasa se realiza en presencia de todos los componentes subcelulares.

Cuando las células son preincubadas durante 3 horas con el rottlerin, el inhibidor específico de la PKC- δ , los valores de actividad detectados en membrana estimulados por el tratamiento con CCK-8 se han reducido el 81.50 ± 9.61 % comparados con los detectados en células control (*Figura IV-24, panel intermedio, -comparar líneas 9 y 12-, y panel inferior derecho*). De igual forma, la actividad estimulada por TPA 1 μ M en la fracción de membrana de células preincubadas con rottlerin está inhibida el 63.53 ± 10.34 % respecto a las células no pretratadas (*Figura IV-24, panel intermedio, -comparar líneas 8 y 11-, y panel inferior derecho*).



(Véase página siguiente)

Figura IV-24. Efecto del rottlerin en la actividad de la PKC- δ estimulada por CCK-8 y TPA en las fracciones citosólica y de membrana de acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se preincubaron durante 3 horas a 37 °C en ausencia o presencia de rottlerin 6 μ M; a continuación se incubaron durante 2.5 min en ausencia o presencia de CCK-8 10 nM, o durante 5 min en ausencia o presencia de TPA 1 μ M; después se lisaron y se obtuvieron las fracciones subcelulares donde se inmunoprecipitó PKC- δ . La actividad cinasa de esta isoforma se determinó en los inmunoprecipitados de las fracciones subcelulares según el procedimiento descrito en el capítulo "Materiales y métodos". En el panel superior se muestran dos autoradiografías de la banda sustrato utilizado (histona H1) obtenidas en la fracción citosólica y en la de membrana. Esta autoradiografía es representativa de tres más para cada una de las fracciones. En el panel inferior se representa la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes. La actividad cinasa se expresa como el cociente del valor experimental, obtenido en la fosforilación del sustrato histona H1 tras la estimulación de los acinos con CCK-8 o TPA, y el valor control, obtenido en acinos a los que no se les añadió el agonista. Las comparaciones estadísticas se realizaron con una *t* de Student para muestras no apareadas.

Diversos autores han descrito que la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ en estudios *in vitro* requiere la presencia de un activador, como el TPA, lo que parece implicar que la fosforilación está restringida a la forma activa de la tirosina (973,974).

Cuando se caracteriza el grado de fosforilación en tirosina de la PKC- δ en las fracciones subcelulares citoplasmática y de membrana de acinos pancreáticos de rata, los hallazgos obtenidos son equiparables a los descritos para la actividad cinasa de esta proteína. En primer lugar, en la fracción citoplasmática de acinos pancreáticos no estimulados, o tras su estimulación durante 2.5 min con CCK-8 10 nM o durante 5 min con TPA 1 μ M, no se detecta fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ (Figura IV-25, panel superior -líneas 1 a 6-).

En la fracción de membrana de acinos pancreáticos de rata no estimulados, independientemente de la preincubación con el inhibidor B44, tampoco se detecta fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ (Figura IV-25, panel inferior -líneas 7 y 8-). Sin embargo, el tratamiento durante 2.5 min con CCK-8 10 nM o durante 5 min con TPA 1 μ M, inducen un manifiesto incremento en la fosforilación de esta isoforma (Figura IV-25, panel inferior -líneas 9 y 11-). Este incremento es muy similar al detectado en los lisados acinares totales.

Cuando las células son preincubadas durante 1 hora con una concentración 300 μ M del inhibidor de las tirosinas cinasas B44, la fosforilación en tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 10 nM en la fracción de membrana está reducida, comparada con la fosforilación estimulada por el neuropéptido en células no preincubadas con B44 (Figura IV-25, panel inferior -comparar líneas 11 y 12-). Esta inhibición es similar a la detectada cuando la fosforilación se cuantifica en lisados celulares totales. De igual forma, la fosforilación inducida por TPA 1 μ M

en la fracción de membrana de células preincubadas con B44 está inhibida respecto a las células no pretratadas (*Figura IV-25, panel inferior-comparar líneas 9 y 10-*). De nuevo, la inhibición observada es similar a la que se produce cuando la fosforilación se cuantifica en lisados celulares totales.

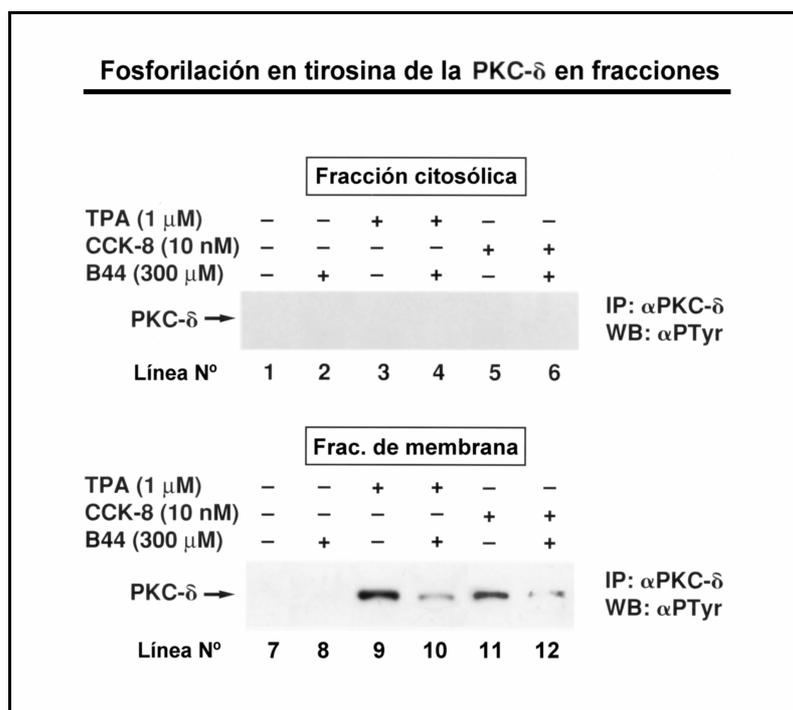


Figura IV-25. Efecto de la tirfostina B44 en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK-8 y TPA en las fracciones citosólica y de membrana de acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se pretrataron en ausencia (líneas impares) o presencia de B44 300 μ M durante 1 hora (líneas pares) y después se incubaron durante 2.5 min con CCK-8 10 nM (líneas 5, 6, 11 y 12), o durante 5 min con TPA 1 μ M (líneas 3, 4, 9 y 10). Los lisados de las fracciones subcelulares, obtenidas según el procedimiento descrito en "Materiales y métodos", se inmunoprecipitaron (IP) con un anticuerpo policlonal anti-PKC- δ (α PKC- δ). Los inmunoprecipitados obtenidos fueron analizados por Western blotting (WB) utilizando un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina 4G10 (α PTyr). En el panel superior y e inferior se muestra un film representativo de otros tres más en duplicado para la fracción citosólica y de membrana, respectivamente.

3.4. Acercamiento a la posible función de la isoforma δ de la proteína cinasa C

Diversos autores (476) han descrito que la PKC- δ se localiza en los contactos focales e interacciona con las proteínas tirosinas cinasas de estas estructuras. Sin embargo, aún no se ha establecido el papel funcional que la PKC- δ desarrolla en los contactos focales. También se ha descrito la asociación de la PKC- δ con otras proteínas del citoesqueleto, como la vimentina, una proteína estructural de los filamentos intermedios (1035).

El pretratamiento de las células acinares pancreáticas durante 3 horas con rottlerin 6 μ M no demuestra efecto significativo sobre la fosforilación basal en residuos de tirosina de la tirosina cinasa FAK ni de su sustrato paxilina (*Figura IV-26, panel superior -comparar líneas 1 y 2-, y panel inferior*); sin embargo, inhibe completamente la fosforilación de ambas proteínas cuando es estimulada durante 2.5 min por CCK-8 10 nM (*Figura IV-26, panel superior -comparar líneas 3 y 4-, y panel inferior*) o durante 5 min por TPA 1 μ M (*Figura IV-26, panel superior -comparar líneas 5 y 6-, y panel inferior*).

Al contrario que en el caso de la PKC- δ , cuando bloqueamos la actividad de la isoforma α de la PKC mediante el pretratamiento durante 2 horas con una concentración 10 μ M del inhibidor específico safingol, la fosforilación en tirosina de las proteínas de las adhesiones focales p125^{FAK} y paxilina no está afectada, ni en condiciones basales (*Figura IV-27, panel superior -comparar líneas 1 y 2-, y panel inferior*), ni tampoco cuando los acinos pancreáticos son estimulados durante 2.5 min con CCK-8 10 nM (*Figura IV-27, panel superior -comparar líneas 3 y 4-, y panel inferior*) o durante 5 min con TPA 1 μ M (*Figura IV-27, panel superior -comparar líneas 5 y 6-, y panel inferior*).

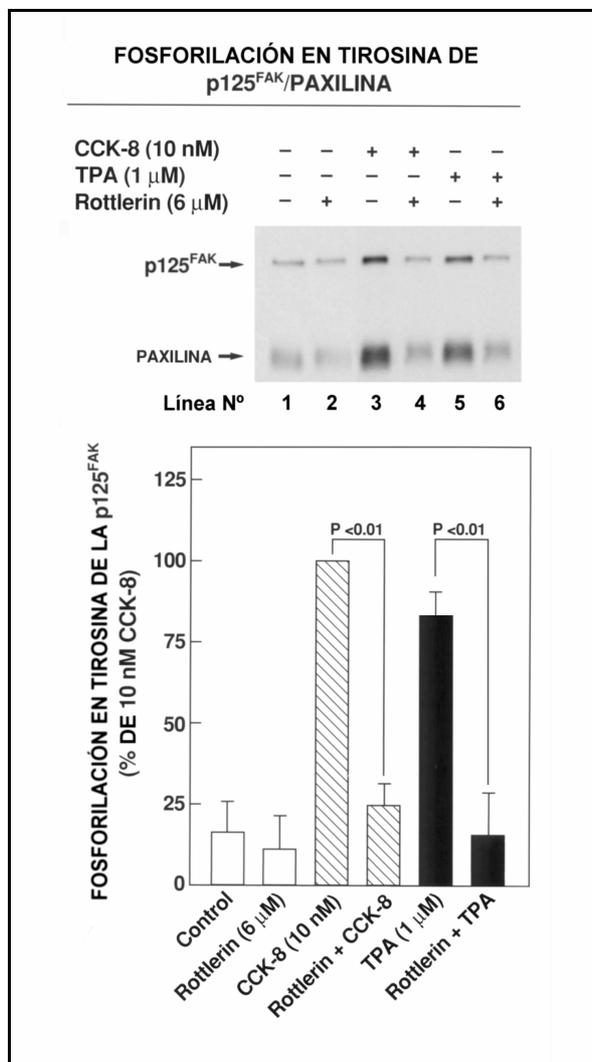


Figura IV-26. Efecto del rottlerin en la fosforilación en restos de tirosina de la p125^{FAK} y la paxilina estimuladas por CCK-8 y TPA en acinos pancreáticos de rata. Los acinos pancreáticos se pretrataron con rottlerin 6 μ M durante 3 horas; después se incubaron durante 2.5 min adicionales con CCK-8 10 nM o 5 min con TPA 1 μ M. La fosforilación en restos de tirosina de la p125^{FAK} y la paxilina se determinó según los procedimientos descritos en el capítulo II. En el panel superior se muestra un film representativo de tres más en duplicado. Los datos recogidos en el panel inferior son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes, expresados como el porcentaje del incremento sobre el control en la fosforilación en tirosina de la p125^{FAK} inducida por CCK-8 10 nM. Las comparaciones estadísticas se realizaron por medio de una t de Student para muestras no apareadas.

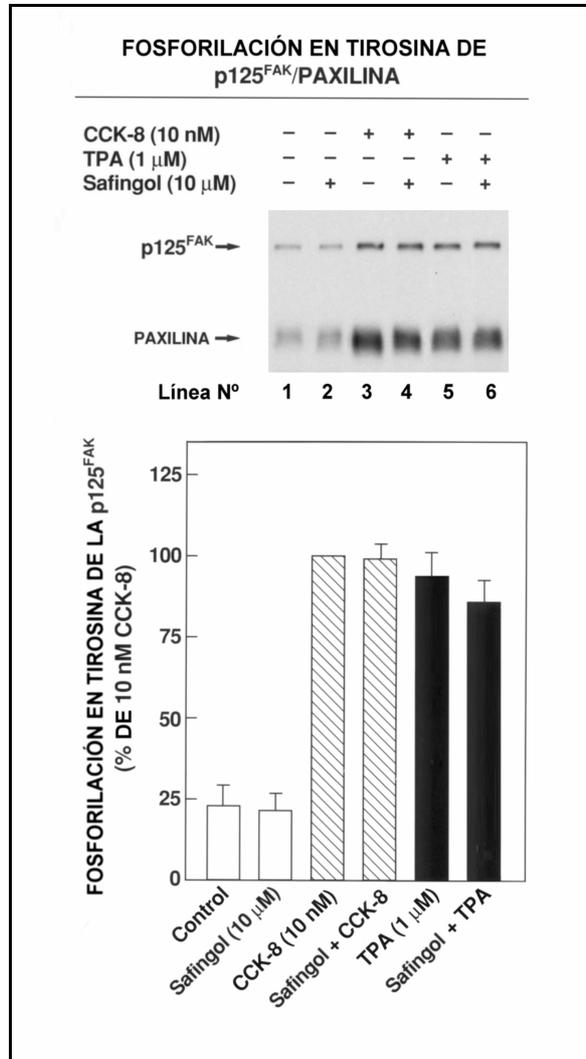


Figura IV-27. Efecto del inhibidor específico de la PKC- α , safingol, en la fosforilación en tirosina de la p125^{FAK} y la paxilina estimuladas por CCK-8 o TPA en acinos pancreáticos de rata. En la figura se representan los resultados obtenidos en la fosforilación en tirosina de la p125^{FAK} y paxilina después de incubar los acinos pancreáticos sin inhibidores (Líneas 1, 3 y 5) o de pretratarlos durante 2 horas a 37 °C con safingol 10 μ M (Líneas 2, 4 y 6). A continuación se incubaron durante 2.5 min adicionales con CCK-8 10 nM (Líneas 5 y 6), o durante 5 min con TPA 1 μ M (Líneas 3 y 4). En el panel superior se muestra un film representativo de otros tres en duplicado. Los resultados representados en el panel inferior son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes, expresados como el porcentaje del incremento sobre el control en la fosforilación en tirosina de la p125^{FAK} inducida por CCK-8 10 nM.

4. *Discusión*

Existen referencias contradictorias en la bibliografía sobre la presencia de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata. Diversos autores, utilizando técnicas de *Western blotting* e inmunohistoquímicas, han evidenciado la presencia de esta cinasa en acinos pancreáticos y en cultivos celulares derivados de este tipo celular (684,887,888). Sin embargo, no siempre ha sido posible detectar la presencia de esta cinasa en acinos pancreáticos (886). Nuestros resultados, basados en el aislamiento de acinos pancreáticos y la realización de un *Western blotting* con anticuerpos específicos anti-PKC- δ , apoyan los resultados anteriores que señalan la presencia de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata.

Está muy descrito en la bibliografía la función como serina/treonina cinasa de las diferentes isoformas de la PKC (140,856). Asimismo, está muy establecido el incremento de esta actividad cinasa en respuesta al DAG y a los esteres de forbol (138,139). Trabajos recientes han señalado una relación de diferentes isoformas de la PKC con la vía de las tirosinas cinasas; así, el tratamiento con H₂O₂ de células COS-7 produjo un aumento de la fosforilación en tirosina de las isoformas de la PKC- α , β I, γ , δ y ϵ acompañado de un incremento en la actividad serina/treonina de estas isoformas (978). En este aspecto, de las diferentes isoformas de la PKC, la isoforma δ es la que se ha descrito que presenta una mayor interrelación con la vía de las tirosinas cinasas; numerosos autores han evidenciado la fosforilación en tirosina de esta enzima en diversos tipos celulares y en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos (12,974-976,1045,1046). El tratamiento de células acinares de glándula parótida de rata con carbacol y sustancia P, compuestos caracterizados como secretagogos en estas células, incrementa la fosforilación en tirosina de la PKC- δ de forma dependiente del tiempo y la concentración (12,1045). Asimismo, la estimulación de plaquetas humanas con trombina se acompaña con un evidente incremento en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ (1046); finalmente, se ha descrito que la ocupación de los receptores de factores de crecimiento también induce un incremento de la fosforilación en tirosina de la PKC- δ en cultivos primarios de queratinocitos (975,976).

En acinos pancreáticos de rata, nuestros resultados demuestran que la PKC- δ se fosforila en tirosina, en respuesta al tratamiento con CCK, de forma dependiente del tiempo y la concentración. Se observó un

incremento significativo a los 30 seg del tratamiento con CCK y la respuesta máxima se obtuvo a los 2.5 min con una concentración 10 nM de este neuropéptido. La incubación de los acinos pancreáticos con CCK en estas mismas condiciones produjo un claro incremento en la actividad serina/treonina cinasa de la PKC- δ . Aunque este último resultado era esperable, teniendo en cuenta que ya ha sido descrito el incremento de DAG en células acinares pancreáticas en respuesta a CCK (684); sin embargo, en esta Tesis Doctoral se describe por primera vez un efecto directo de este neuropéptido en la actividad de una isoforma de la PKC, la PKC- δ .

Como ya se ha comentado en varias ocasiones a lo largo de esta Tesis Doctoral, el receptor A de la CCK, único presente en acinos pancreáticos de rata (373), presenta dos estados de afinidad, los cuales están acoplados con diferentes vías de transducción de señales intracelulares (373). Para identificar cual de los estados de afinidad del receptor CCK_A esta implicado en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK, hemos utilizado el péptido JMV-180, así como un estudio comparativo de la curva dosis-respuesta a este neuropéptido. Nuestros resultados indican que esta fosforilación esta mediada por el estado de baja afinidad del receptor CCK_A:

1.- la curva dosis-efecto de fosforilación en tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK, esta claramente desplazada hacia un rango de concentraciones superior, si lo comparamos con las curvas de incrementos en calcio, liberación de inosítoles fosfato, secreción de amilasas (373,477,660) y la fosforilación en restos de tirosina de la p125^{FAK}, p130^{CAS}, paxilina (477,683) y PYK2/CAK β (ver apartado resultados del capítulo III), efectos, todos ellos, mediados por la estimulación de los estados de alta y baja afinidad del receptor CCK_A;

2.- el rango de concentraciones en el que la CCK produce una estimulación de la fosforilación en tirosina de la PKC- δ se corresponde con el rango de ocupación del receptor de baja afinidad (369,373), determinado por estudios de unión (*binding*) en membranas de células acinares pancreáticas de rata (369,373);

3.- la CCK-JMV, un agonista del estado de alta afinidad del receptor CCK_A en acinos pancreáticos de rata (373,835,836), no tiene efecto en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ ;

4.- el tratamiento simultaneo con CCK-JMV y CCK-8 produce una inhibición del incremento observado en la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ estimulado con CCK de más del 75 %; en estas condiciones, la CCK-JMV se comporta con un antagonista del estado de

baja afinidad del receptor CCK_A en acinos pancreáticos de rata (373,835,836).

Uno de los objetivos de la línea de investigación que sigue nuestro grupo, como se aprecia en las publicaciones realizadas en los últimos años (264,369,477,683,701), es el estudio de las vías intracelulares que relacionan la ocupación del receptor A en acinos pancreáticos de rata y el incremento en la fosforilación en restos de tirosina de diferentes proteínas. Siguiendo esta argumentación, discutiremos a continuación las vías intracelulares que mediarían el incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de la PKC- δ en respuesta a CCK en acinos pancreáticos de rata.

Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que la fosforilación en tirosina de diversas proteínas, como la p125^{FAK}, la paxilina o la p130^{CAS}, esta incrementada por los tratamientos celulares que estimulan la movilización de calcio citosólico (264,369,477,683,701). Además, hemos demostrado que la fosforilación en restos de tirosina de estas proteínas en respuesta a CCK se produce por mecanismos dependientes e independientes de calcio (264,369,477,683,701). Por otra parte, como ya se ha indicado en esta tesis doctoral en el apartado referente a PYK2, la fosforilación de esta proteína es altamente dependiente de la movilización de calcio intracelular. Sin embargo, nuestros resultados desligan la fosforilación de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata de los aumentos de calcio en el citosol, producidos por el tratamiento con ionóforo o tapsigargina. Asimismo, demostramos que la fosforilación en tirosina de la PKC- δ , en acinos pancreáticos de rata y en respuesta a CCK, es independiente de la movilización intracelular de calcio. Nuestros resultados sostienen la independencia de la fosforilación en tirosina de la PKC- δ de la vía de la PLC, activada en respuesta a la ocupación del receptor A de la CCK, que conduce a la movilización de calcio intracelular y, en último término, implican una regulación diferencial de la fosforilación en tirosina de diversas proteínas estimulada por CCK-8 en acinos pancreáticos de rata.

Además del incremento intracelular de calcio, la estimulación de la PLC tras la ocupación del receptor A de la CCK produce un incremento transitorio en la concentración intracelular de DAG (4,684) que, como esta perfectamente establecido, es un activador de las formas clásicas y novel de la PKC (138,139). Como es sabido, los esteres de forbol reproducen los efectos del DAG en la activación de ambos grupos de PKCs (138,139). Teniendo en cuenta estos antecedentes, el siguiente paso ha sido el determinar la implicación de esta segunda rama de la activación de la PLC en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata, para lo cuál hemos utilizado el éster de forbol TPA

así como inhibidores específicos de las diferentes isoformas de la PKC. Publicaciones anteriores demuestran que el tratamiento de diferentes tipos celulares con TPA incrementa la fosforilación en tirosina de la PKC- δ , aunque en estos trabajos no se ha estudiado la implicación de esta vía en la fosforilación de esta proteína estimulada por agonistas (12,974-976,1045,1046). En acinos pancreáticos de rata, el tratamiento con TPA produce un incremento general en la fosforilación en tirosina de diversas proteínas (701). En concreto, nuestro grupo ha demostrado una estimulación en la fosforilación en tirosina de la p125^{FAK}, paxilina y p130^{CAS} en respuesta al tratamiento de los acinos pancreáticos con TPA (701).

El tratamiento de los acinos pancreáticos de rata con TPA incrementó, de forma dependiente del tiempo y la concentración, la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ , esta respuesta estuvo acompañada con un aumento en la actividad serina/treonina cinasa de esta enzima, confirmando la eficacia del tratamiento con TPA.

En publicaciones precedentes (264,369,477,683,701) y en esta Tesis Doctoral, se ha demostrado que la activación del receptor CCK_A estimula la fosforilación en tirosina de la p125^{FAK}, la paxilina y p130^{CAS} (264,369,477,683,701) y de la PYK2/CAK β (véase *Apartado III de esta Tesis Doctoral*), por vías dependientes e independientes de la PKC. Siguiendo el protocolo utilizado por nuestro grupo para el estudio de la implicación de las diferentes vías intracelulares en la fosforilación en tirosina de proteínas estimulada por CCK en acinos pancreáticos de rata, nuestro siguiente paso fue la utilización de un inhibidor clásico de las PKCs, el GF 109203X, y el estudio de su efecto en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK. Paradójicamente, el efecto encontrado con este tratamiento, lejos de inhibir la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ en respuesta a CCK o TPA, se acompañaba con un incremento en dicha fosforilación de aproximadamente el doble. Una revisión bibliográfica más exhaustiva indicó que el GF 109203X puede actuar como un inhibidor mucho más potente de las cPKC que de las nPKC (501,841,1015), lo que podría explicar los resultados obtenidos. La hipótesis que se nos planteó fue la de una diferente regulación por las isoformas clásicas y noveles de la PKC de la fosforilación en tirosina de la PKC- δ en respuesta a la CCK en acinos pancreáticos de rata. En concreto, nos planteamos un posible efecto negativo de la activación de las isoformas cPKC en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK.

La comprobación de esta hipótesis se realizó utilizando un inhibidor específico de las cPKC, Gö 6976 (1016,1021); así como, uno

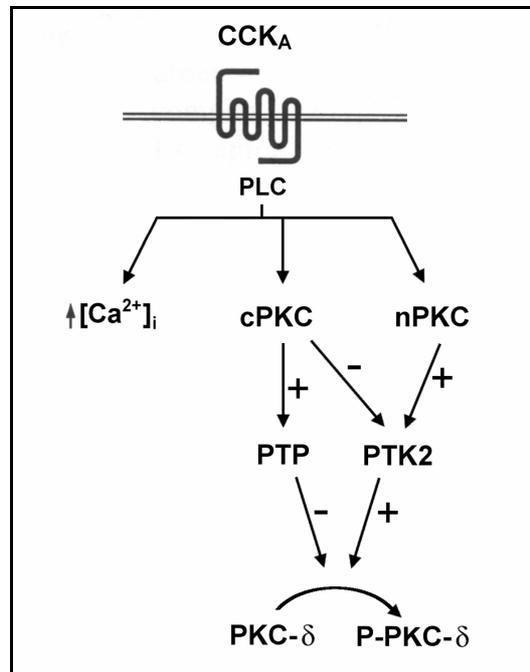
específico de la PKC- α , única isoforma de las cPKC identificada en acinos pancreáticos (684,887,888), el inhibidor elegido fue el safangol (501,1016,1022). Está bien descrito que ambos inhibidores no tienen efecto en la actividad de las nPKC (501,1016); en acinos pancreáticos de rata, el tratamiento con safangol no inhibe la actividad de la PKC- δ estimulada por CCK o TPA. Los resultados obtenidos confirman nuestra hipótesis inicial, puesto que la fosforilación en tirosina de la PKC- δ en respuesta a CCK se encuentra elevada de forma significativa tras el tratamiento de los acinos pancreáticos con ambos inhibidores y, por lo tanto, tras el bloqueo de las cPKCs. El efecto del safangol se confirmó al demostrar la inhibición de la actividad cinasa de la PKC- α en acinos pancreáticos estimulados con TPA y preincubados con este inhibidor.

Se ha descrito que un incremento en la concentración de los productos de la PI3-K, PtdIns(3,4)P₂ y PtdIns(3,4,5)P₃, estimula la actividad de las nPKCs (139,902). También se ha demostrado que la PI3-K, mediante la activación de la PDK1, interviene en la fosforilación en serina de diversas isoformas de la PKC, incluida la PKC- δ (895). Por otra parte, aunque existe controversia, ciertos resultados apuntan a que la CCK estimularía la actividad de la PI3-K en acinos pancreáticos (4,676).

Para comprobar si la modificación del metabolismo de los fosfoinosítidos regula la fosforilación en tirosina de la PKC- δ en respuesta a CCK en acinos pancreáticos de rata, hemos utilizado dos inhibidores de esta ruta: LY 294002 y wortmanina; ambos, a las concentraciones utilizadas, inhiben la actividad de la PI3-K y PI4-K (802,1042,1043) aunque por mecanismos diferentes, el primero inhibe la unión del ATP y el segundo bloquea la actividad catalítica (802,1042,1043). Nuestros resultados disocian el metabolismo de los fosfatidilinosítoles del incremento en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK.

Resultados anteriores de nuestro grupo demuestran que para la fosforilación en tirosina estimulada por CCK de diversas proteínas en acinos pancreáticos, p125^{FAK}, paxilina y p130^{CAS} es necesario el mantenimiento de la organización del citoesqueleto de actina (264,369,477,683,701). Hallazgos similares se han obtenido en esta Tesis en relación con la estimulación de la fosforilación en tirosina de PYK2. Sin embargo, nuestros resultados señalan que la fosforilación en tirosina de la PKC- δ en respuesta a CCK en acinos pancreáticos de rata es independiente del citoesqueleto de actina.

Teniendo en cuenta lo expuesto hasta el momento, proponemos el siguiente esquema:



1.- la fosforilación en tirosina de la PKC- δ en respuesta a CCK en acinos pancreáticos se produce por mecanismos independientes de calcio y dependientes de la activación de las PKCs;

2.- la activación de las cPKC en acinos pancreáticos de rata tiene un efecto negativo en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ ;

3.- la inhibición observada tras la activación de las cPKC pudiera estar mediada vía inhibición de la tirosina, o tirosinas, cinasa que fosforila la PKC- δ en respuesta a CCK, o bien, por la activación de una tirosina fosfatasa, vía cPKC, la cual, defosforilaría la PKC- δ ;

4.- la fosforilación en tirosina de la PKC- δ en respuesta a CCK es independiente de la activación de las cinasas de lípidos PI3-K y PI4-K;

5.- la desorganización del citoesqueleto de actina no afectaría a la fosforilación en restos de tirosina de esta cinasa en respuesta a CCK en acinos pancreáticos de rata.

Esta es la primera vez en la que se describe una relación directa entre la activación de la cPKC y la fosforilación en tirosina de la PKC- δ ; asimismo, hay muy pocos trabajos en los que se demuestre la existencia de una relación funcional entre las isoformas clásicas y noveles de la PKC. El significado de lo aquí descrito es difícil de interpretar. En un

trabajo reciente (1047) se describe que la sobreexpresión de la PKC- α en una línea celular de linfoma de células B de ratón produce una elevación en los niveles tanto de la PKC- δ como de su ARNm, proponiendo estos autores la existencia de una regulación cruzada entre ambas isoformas de la PKC. Por otro lado, se ha demostrado que un incremento en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ , mediada por la activación de la tirosina cinasa Src, en células NIH3T3 y en otras líneas celulares derivadas de fibroblastos de rata, produce un aumento en la degradación proteolítica de la PKC- δ (285,982,1048).

Nuestros resultados y los obtenidos por los autores mencionados nos permiten especular con la posibilidad de que la PKC- α podría estar implicada en la regulación de los niveles celulares de la PKC- δ en acinos pancreáticos de rata al modificar su grado de fosforilación en tirosina. Esta hipótesis se basa en la capacidad de la PKC- α de inhibir la fosforilación en tirosina de la PKC- δ , teniendo en cuenta que un aumento de la fosforilación en tirosina de la PKC- δ estaría relacionado directamente con un incremento en la degradación de esta cinasa, como se ha demostrado en otros tipos celulares (285,982,1048).

Diversos autores, en estudios *in vitro*, han descrito que la fosforilación en tirosina de la PKC- δ , por la tirosina cinasa Src, se produce únicamente en presencia de un activador de la primera como es el TPA, proponiendo que los lugares de fosforilación solo son accesibles por cambios conformacionales inducidos por la activación de la PKC- δ (952,973). *In vivo*, diferentes trabajos muestran un colocalización en membrana de las formas activa y fosforilada en tirosina de la PKC- δ , sin embargo no demuestran la necesidad de su activación como requisito para su fosforilación en tirosina (952,1045). Asimismo, existe una clara controversia acerca de la relación entre activación y fosforilación en tirosina de la PKC- δ ; así, diversos autores demuestran que la fosforilación en tirosina aumenta la actividad de esta enzima (974,981,1045); sin embargo, otros autores muestran una clara reducción en su actividad tras la fosforilación en tirosina (976,977,979). Un tercer grupo argumenta que la fosforilación en tirosina no afecta a la actividad de la PKC- δ , sino que los efectos encontrados por los grupos anteriores dependen del tipo de sustrato utilizado (973,978). Por último, Barbazuk y cols. (1049) han demostrado que el tratamiento de células B con TPA induce la translocación del PKC- δ a membrana, y por tanto su activación, pero no su fosforilación en tirosina.

Si tenemos en cuenta la hipótesis presentada anteriormente, acerca de la relación entre fosforilación en tirosina y degradación de la PKC- δ , y el hecho de que la activación de las PKC es un paso anterior y necesario

para su *down-regulation* (285,952,1010,1048), parece lógico suponer que la fosforilación en tirosina de esta cinasa es un proceso posterior y dependiente de su activación. En los siguientes párrafos nos proponemos demostrar, en células acinares pancreáticas y en respuesta a la CCK, la relación existente entre los tres procesos que consideramos claves en la funcionalidad de la PKC- δ : translocación, activación y fosforilación en tirosina.

Como se ha descrito anteriormente en otros tipos celulares (853,929-931) y en acinos pancreáticos (684,888), la PKC- δ se localiza mayoritariamente en el citosol de células no estimuladas. Sin embargo, esta distribución no es universal, ya que en fibroblastos RAT6 (1050) y células mesangiales renales (1051), la PKC- δ se asocia mayoritariamente con la fracción particulada. La estimulación con agonistas o con TPA, produce la translocación de esta cinasa a membrana (684,915,1052). Nuestros resultados confirman la localización citosólica de la PKC- δ en acinos pancreáticos no estimulados. Asimismo, hemos encontrado una rápida translocación a membrana de la PKC- δ estimulada por CCK o TPA, lo cual está de acuerdo con resultados previos obtenidos por otros autores en diferentes tipos celulares y con diversos estímulos (684,915,1052).

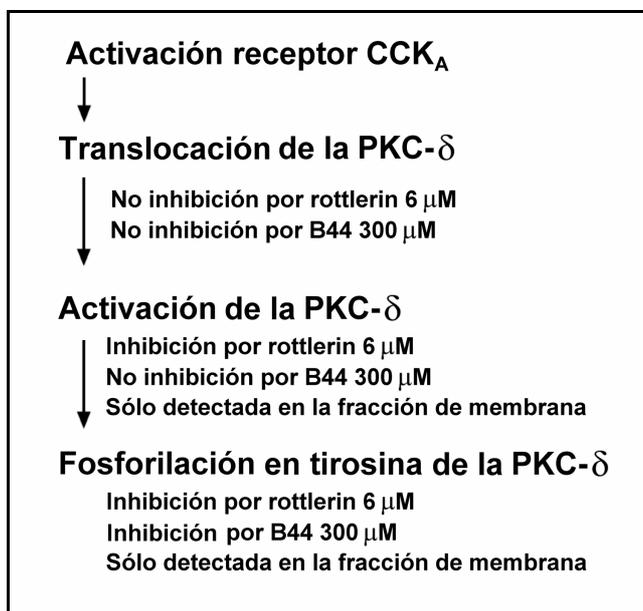
Numerosos estudios han demostrado que la asociación con la membrana de las PKCs es un paso previo a su activación (138,140,856); asimismo, se ha señalado que la forma activa de estas cinasas localiza, principalmente, en membrana (138,140,856). Nuestros resultados en acinos pancreáticos y en respuesta a CCK o TPA apoyan esta teoría; así, la forma activa de la PKC- δ se localizó exclusivamente en membrana de acinos estimulados. Además, la incubación de los acinos pancreáticos con un inhibidor específico de la PKC- δ , como es el rottlerin (1019), no tiene efecto en la translocación observada tras el tratamiento de los acinos pancreáticos con CCK o TPA. Sin embargo, el pretratamiento de los acinos pancreáticos con este inhibidor bloquea la activación de la PKC- δ en respuesta a CCK o TPA tanto en lisados totales como en fracciones de membrana. Estos resultados contradicen, en parte, los obtenidos por Pollo y cols. (684), que en este tipo celular y midiendo actividad total de la PKC, obtuvieron una mayor actividad en fracciones de citosol comparada con fracciones de membrana en células en reposo y esta señal no se modificó tras el tratamiento con CCK.

Como hemos dicho anteriormente, no está establecida claramente la relación existente entre activación y fosforilación en tirosina de la PKC- δ *in vivo* (973,976-978,981,1045). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, apuntan a una colocalización de la forma activa y

fosforilada en tirosina en las fracciones de membrana de los acinos pancreáticos tratados con CCK o TPA. La translocación y activación de la PKC- δ en respuesta a CCK en acinos pancreáticos de rata no fueron dependientes de la fosforilación en tirosina de esta cinasa, ya que el tratamiento de los acinos pancreáticos con un inhibidor de la fosforilación en tirosina, como ha demostrado ser el B44 en este tipo celular (264,701,797), no modifica ni la translocación ni la activación de la PKC- δ en respuesta a CCK o TPA en estas células. Esta independencia de la fosforilación en tirosina de los dos procesos mencionados no es achacable a una falta de efecto de este inhibidor, puesto que la fosforilación en tirosina de esta isoforma tras la estimulación con CCK o TPA aparece claramente inhibida por el pretratamiento con el B44 tanto en lisados totales como en fracciones de membrana.

En diversos tipos celulares (983,1053-1055) se ha descrito la localización/translocación de la PKC- δ a núcleo, si bien su significado funcional no está claro. En acinos pancreáticos y en respuesta a CCK y TPA se produce una clara translocación de la PKC- δ a fracciones nucleares. La cantidad de proteína obtenida en estas fracciones nucleares no nos ha permitido realizar estudios para determinar si la PKC- δ nuclear se encuentra activa y/o fosforilada en tirosina, esto hace difícil extraer conclusiones de esta translocación. Sin embargo, abre una interesante vía de estudio para trabajos posteriores.

En resumen, nuestros resultados indican claramente que el proceso de translocación de la PKC- δ en respuesta a CCK o TPA, no depende ni de su actividad ni de su grado de fosforilación en tirosina, que la activación se produce solo en la membrana y, además, es un proceso previo a la fosforilación en tirosina de esta isoforma en acinos pancreáticos de rata, estimulados con CCK o TPA. La interdependencia de estos tres eventos observados en referencia a la PKC- δ tras la ocupación del receptor A de la CCK en acinos pancreáticos de rata se resume en el siguiente esquema:



Nuestros resultados pueden ofrecer argumentos a los autores que han especulado con la posibilidad de utilizar la fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ como índice de su actividad (952,974,978); sin embargo, aunque se puede afirmar que si la proteína está fosforilada en restos de tirosina se encuentra activa, es muy arriesgado afirmar lo contrario, puesto que también hemos demostrado que la inhibición de la fosforilación en restos de tirosina, utilizando la tirfostina B44, no modifica la actividad de esta proteína. En otras palabras, se detecta actividad en proteína no fosforilada en tirosina; por lo tanto, establecer una relación directa entre la fosforilación en restos de tirosina y la actividad de la PKC- δ presenta serios inconvenientes.

Un razonamiento parecido puede hacerse si se quiere relacionar inequívocamente la translocación de la PKC- δ con su actividad: la relocalización de la PKC- δ en las fracciones de membrana o nuclear no implica necesariamente actividad cinasa, puesto que hemos demostrado que la inhibición de la actividad cinasa de la PKC- δ por el inhibidor específico rottlerin, no modifica su patrón de translocación.

De hecho, el patrón de translocación de la PKC- δ a las fracciones de membrana o nuclear después de la ocupación del receptor CCK_A o de la administración del éster de forbol TPA, no ha sido modificado por ninguno de los tratamientos seguidos para inhibir diversos procesos o vías de señalización intracelulares. Esto parece indicar que la translocación es

el proceso más inmediato que acontece en la PKC- δ tras la estimulación celular, y que es independiente del estado activo del enzima y de la fosforilación en tirosina de la PKC- δ o de la activación de tirosinas cinasas.

Aunque no es un objetivo de esta Tesis Doctoral, no hemos podido sustraernos a la pregunta de la posible función de la PKC- δ en acinos pancreáticos. Resultados preliminares, mostrados en esta Tesis, demuestran que el pretratamiento de los acinos pancreáticos con rottlerin anula la fosforilación en tirosina de la p125^{FAK} y de la paxilina estimulada por CCK. Este efecto no se observó tras el tratamiento de los acinos con el inhibidor específico de la PKC- α , safingol. Una inhibición de estas características en la fosforilación en tirosina de la p125^{FAK} y de la paxilina, en acinos y en respuesta a CCK, solo ha sido obtenido tras la desorganización del citoesqueleto de actina con citocalasina D (369,477,683,701), lo que nos permite especular con la posibilidad de que la fosforilación en tirosina de la p125^{FAK} y de la paxilina, tras la activación del receptor A de la CCK en acinos pancreáticos de rata, estaría modulada por un mecanismo intracelular dependiente de la reorganización del citoesqueleto de actina mediada por la activación de la PKC- δ .

En otros tipos celulares se ha apuntado una posible función reguladora del citoesqueleto de actina por la PKC- δ ; así, se ha demostrado la asociación de esta cinasa con el citoesqueleto de actina y su localización en las adhesiones focales (476), su asociación con la vimentina, una proteína estructural de los filamentos intermedios (1035) y se ha propuesto la HSP25/27 como un sustrato específico de esta isoforma de las PKCs (1030). Asimismo, en un trabajo reciente, se demuestra que la expresión de HSP25/27 regula los cambios en el citoesqueleto de actina en respuesta a la ocupación del receptor A de la CCK en células CHO (1056). Estas observaciones, en su conjunto, sugieren una posible función de la PKC- δ en la regulación del citoesqueleto de actina en acinos pancreáticos de rata. Comprendemos que esta aseveración es altamente especulativa y que es necesario la realización de nuevos experimentos, con la utilización de diferentes aproximaciones experimentales, para poder confirmar o desechar esta hipótesis.

V. Discusión general

Como hemos demostrado en esta Tesis Doctoral la ocupación del receptor A de la CCK produce un incremento claro en la fosforilación en restos de tirosina y en la actividad de la PKC- δ y de la PYK2/CAK β ; por lo tanto, cabe suponer que esta ocupación estimularía la activación, en acinos pancreáticos, de tirosinas cinasas que mediarían este proceso. En este apartado de la Tesis nos proponemos discutir las similitudes y diferencias en la regulación de estas tirosinas cinasas implicadas en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ y de la PYK2/CAK β .

Nuestros resultados apuntan a que la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β , bien sea mediada por otra tirosina cinasa o por un proceso de autofosforilación, y la de PKC- δ , ésta claramente mediada por la activación de una tirosina cinasa, es un proceso regulado de forma diferente tras la ocupación del receptor CCK_A en acinos pancreáticos de rata:

1.- Cuando se estimula un incremento en la concentración intracelular de calcio por el tratamiento con tapsigargina o con un ionóforo se produce un aumento en la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β y no de PKC- δ .

2.- La eliminación de la movilización intracelular de calcio en respuesta a la ocupación del receptor CCK_A, mediante el pretratamiento de los acinos pancreáticos con tapsigargina o con BAPTA AM, inhibe la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β en un 50%; sin embargo, este mismo tratamiento no presentó efecto alguno en la fosforilación en tirosina de PKC- δ .

3.- El pretratamiento de los acinos pancreáticos con el éster de forbol TPA, induce un claro incremento, dependiente del tiempo y de la concentración, en la fosforilación en tirosina de ambas proteínas.

4.- Un incremento en la concentración intracelular de calcio, junto con la activación de la PKC, tiene un efecto sinérgico en la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β , efecto no observado en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ .

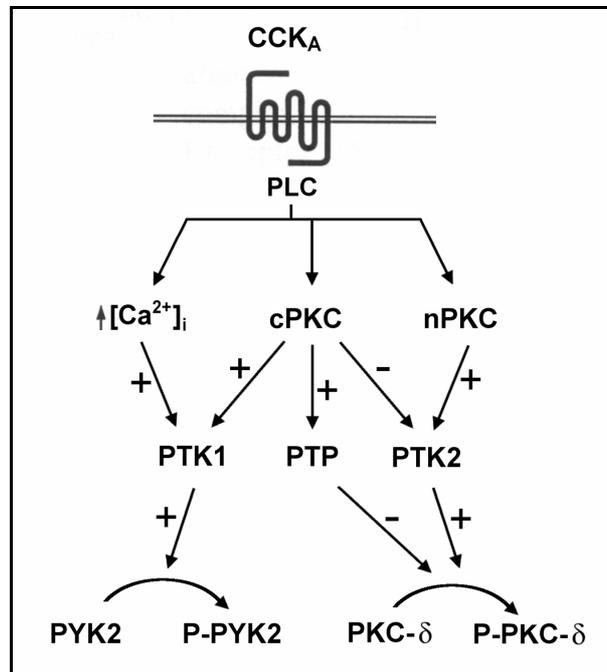
5.- La utilización de un inhibidor de las cPKCs, GF 109203X, produce una reducción del 50 % en la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β estimulada por CCK. Por el contrario, este tratamiento aumentó la fosforilación en tirosina de la PKC- δ en más del 200 %. La inhibición de la PKC- α produjo un incremento similar en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ estimulada por CCK.

6.- La inhibición de ambas vías, incremento en la concentración intracelular de calcio y activación de la PKC, anula la fosforilación en

tirosina de la PYK2/CAK β en acinos pancreáticos de rata en respuesta a CCK.

En resumen, el aumento en la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β estimulada por CCK, en acinos pancreáticos de rata, es un proceso dependiente de la movilización intracelular de calcio y de la activación de las cPKC. Sin embargo, nuestros resultados apuntan a que el proceso de fosforilación en tirosina de la PKC- δ , es independiente de calcio y está regulado de forma dual por las diferentes isoformas de la PKC, clásicas y novel; esto es, existirían procesos activadores e inhibidores de la fosforilación en tirosina dependiendo del tipo de isoforma activada. Así, el tratamiento de los acinos pancreáticos con TPA, un activador de las isoformas clásicas y noveles de la PKC, estimula la fosforilación en tirosina de la PKC- δ . Sin embargo, la inactivación de las isoformas clásicas de la PKC, principalmente la isoforma α de la PKC (única cPKC encontrada en acinos pancreáticos), incrementa significativamente la fosforilación en tirosina de la PKC- δ estimulada por el tratamiento de los acinos pancreáticos de rata con TPA.

Estos resultados nos permiten sugerir que la activación del receptor A de la CCK tendría un efecto dual en la fosforilación en tirosina de la PKC- δ , por un lado estimularía esta fosforilación en tirosina vía activación de las nPKC, en esta tesis hemos demostrado que la ocupación del receptor activa una de las isoformas de la nPKCs; sin embargo, existiría asimismo una vía inhibidora mediada por las cPKCs (PKC- α). Existen dos posibles explicaciones a esta vía inhibidora, por un lado, la activación de las cPKCs puede inhibir la PTK que fosforila en tirosina la PKC- δ . Por otro lado, podemos explicar este efecto por la activación de una tirosina fosfatasa por las cPKCs, que defosforilaría la PKC- δ ; de todas formas, ambas vías no son incompatibles, incluso se puede argumentar que la activación de la tirosina fosfatasa tuviera un efecto inhibitor en la PTK. La relación descrita aparece esquematizada en la siguiente figura:



Si intentásemos explicar esta regulación diferente de los procesos de fosforilación en tirosina, un primer punto a tener en cuenta es la diferencia observada en la respuesta a la ocupación de los dos estados de afinidad del receptor CCK_A. Así, nuestros resultados indican que la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β esta mediada por la ocupación de los estados de alta y baja afinidad del receptor CCK_A; sin embargo, la fosforilación en tirosina de la PKC- δ en respuesta a la CCK en acinos pancreáticos esta mediada exclusivamente por la ocupación del estado de baja afinidad del receptor CCK_A. Como ya se ha descrito en la introducción de esta Tesis Doctoral la ocupación de los diferentes estados de afinidad del receptor CCK_A induce, fundamentalmente, la producción de DAG y la movilización de calcio, si bien el origen de ambos es diferente dependiendo del estado de afinidad activado. Este origen distinto puede corresponderse con la regulación diferencial de la fosforilación en tirosina de ambas cinasas.

Finalmente, nos gustaría hacer referencia en esta discusión al efecto que el pretratamiento de los acinos pancreáticos con citocalasina D tiene en la fosforilación en tirosina de PYK2/CAK β y de PKC- δ . En la primera proteína este tratamiento es inhibitorio y en la segunda no muestra efecto. Pensamos que estos resultados están relacionados con la posible implicación existente entre la regulación del citoesqueleto de actina y las

funciones de ambas cinasas. Mientras que la activación de la PKC- δ se ha descrito como una posible vía reguladora de la organización del citoesqueleto de actina (*véase la discusión específica de la PKC- δ*), y por tanto parecería poco probable que la desorganización del citoesqueleto influyera en la activación/fosforilación en tirosina de esta proteína. Sin embargo, está muy establecida la estrecha relación existente entre la organización del citoesqueleto de actina y los procesos de activación/fosforilación de las PTK de adhesión focal, por lo que era esperable, como demuestran nuestros resultados, la inhibición de la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β en acinos pretratados con citocalasina D.

Lo expuesto en los párrafos precedentes nos permite sugerir que la ocupación de un receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas sin actividad tirosina cinasa intrínseca, como es el receptor CCK_A, en un mismo modelo celular, suspensiones de acinos aislados de páncreas de rata, puede activar diferentes tirosinas cinasas no receptor y, por tanto, regular la fosforilación en tirosina de diversas proteínas lo que implicaría la incorporación, a las ya conocidas, de nuevas vías de transducción estímulo-efecto tras la activación de este receptor; vías que posiblemente permitan explicar las funciones de este receptor relacionadas con la organización del citoesqueleto, desarrollo y diferenciación celular, apoptosis y crecimiento, entre otras.

VI. Conclusiones

Primera:

La ocupación del receptor CCK_A estimula la fosforilación en restos de tirosina de las proteínas cinasas PYK2/CAK β y PKC- δ en acinos pancreáticos de rata.

Segunda:

La fosforilación en restos de tirosina de la PYK2/CAK β estimulada por la ocupación del receptor A de la CCK en acinos pancreáticos de rata está mediada por mecanismos intracelulares dependientes de la movilización de calcio intracelular y de la activación de la proteína cinasa C. Esto implica que la fosforilación en tirosina de la PYK2/CAK β y de la p125^{FAK} está regulada por vías intracelulares diferentes tras la ocupación del receptor CCK_A en acinos pancreáticos de rata.

Tercera:

La tirosina cinasa PYK2/CAK β , mediante la formación de complejos con proteínas adaptadoras, relaciona la ocupación del receptor CCK_A con la activación de las vías de las MAP cinasas en acinos pancreáticos de rata.

Cuarta:

La fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ en respuesta a la ocupación del receptor A de la CCK en acinos pancreáticos de rata es independiente de la movilización de calcio citosólico y está regulada de forma negativa por la activación de la isoforma α de la PKC.

Quinta:

La fosforilación en restos de tirosina de la PKC- δ está restringida a su conformación activa localizada en las membranas biológicas, es por tanto un proceso posterior a la translocación y activación de esta cinasa en respuesta a la ocupación de receptor A de la CCK en acinos pancreáticos de rata.

VII. Bibliografía

1. **Tsai MJ y O'Malley BW** (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:451–486.
2. **Berne RM y Levy MN** (1998). Receptores de membrana, segundos mensajeros y vías de transducción de señal, en *Fisiología celular*, 2ª ed. pp. 59–73. Harcourt-Brace (Div. Interamericana), Madrid.
3. **Leemput-Coutrez M, Camus J, y Christophe J** (1973). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases of the rat pancreas. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **54**(1):182–190.
4. **Yule DI y Williams JA** (1994). Stimulus-secretion coupling in the pancreatic acinus, en *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, vol. 2, 3ª ed. (Johnson LR, Jacobson ED, Christensen J, Alpers DH, y Walsh JH, eds.) pp. 1447–1472. Raven Press, New York.
5. **Berridge MJ** (1993). Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature* **365**(6445):388–389.
6. **Burnham DB, McChesney DJ, Thurston KC, y Williams JA** (1984). Interaction of cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide on function of mouse pancreatic acini in vitro. *J. Physiol (Lond)* **349**:475-82:475–482.
7. **Zachary I, Gil J, Lehmann W, Sinnott-Smith J, y Rozengurt E** (1991). Bombesin, vasopressin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation in intact Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**(11):4577–4581.
8. **Gutkind JS y Robbins KC** (1992). Activation of transforming G protein-coupled receptors induces rapid tyrosine phosphorylation of cellular proteins, including p125FAK and the p130 v-src substrate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **188**(1):155–161.
9. **van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, y Lefkowitz RJ** (1996). Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **17**(6):698–714.
10. **Brinson AE, Harding T, Diliberto PA, He Y, Li X, Hunter D, Herman B, Earp HS, y Graves LM** (1998). Regulation of a calcium-dependent tyrosine kinase in vascular smooth muscle cells by angiotensin II and platelet-derived growth factor. Dependence on calcium and the actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry* **273**(3):1711–1718.
11. **Felsch JS, Cachero TG, y Peralta EG** (1998). Activation of protein tyrosine kinase PYK2 by the m1 muscarinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**(9):5051–5056.
12. **Soltoff SP y Toker A** (1995). Carbachol, substance P, and phorbol ester promote the tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta in salivary gland epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **270**(22):13490–13495.

13. **Zachary I, Sinnett-Smith J, y Rozengurt E** (1992). Bombesin, vasopressin, and endothelin stimulation of tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Identification of a novel tyrosine kinase as a major substrate. *Journal of Biological Chemistry* **267**(27):19031–19034.
14. **Leeb-Lundberg LM y Song XH** (1991). Bradykinin and bombesin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation of a 120-kDa group of proteins in Swiss 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* **266**(12):7746–7749.
15. **Seufferlein T, Withers DJ, Mann D, y Rozengurt E** (1996). Dissociation of mitogen-activated protein kinase activation from p125 focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells stimulated by bombesin, lysophosphatidic acid, and platelet-derived growth factor. *Mol. Biol. Cell* **7**(12):1865–1875.
16. **Duan RD, Wagner AC, Yule DI, y Williams JA** (1994). Multiple inhibitory effects of genistein on stimulus-secretion coupling in rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **266**(2 Pt 1):G303–G310.
17. **Zachary I y Rozengurt E** (1992). Focal adhesion kinase (p125FAK): a point of convergence in the action of neuropeptides, integrins, and oncogenes. *Cell* **71**(6):891–894.
18. **Kinoshita F, Ueno A, Miwa Y, Nishino M, y Inoue H** (1996). Protein tyrosine kinase inhibitors promote amylase secretion and inhibit ornithine decarboxylase induction in sialagogue-stimulated rat parotid explants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **223**(1):170–174.
19. **Rivard N, Rydzewska G, Lods JS, Martinez J, y Morisset J** (1994). Pancreas growth, tyrosine kinase, PtdIns 3-kinase, and PLD involve high-affinity CCK-receptor occupation. *Am. J. Physiol* **266**(1 Pt 1):G62–G70.
20. **Dhanasekaran N, Heasley LE, y Johnson GL** (1995). G protein-coupled receptor systems involved in cell growth and oncogenesis. *Endocr. Rev.* **16**(3):259–270.
21. **Hunter T** (1998). The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **353**(1368):583–605.
22. **Hepler JR y Gilman AG** (1992). G proteins. *Trends Biochem. Sci.* **17**(10):383–387.
23. **Ridley AJ** (1994). Signal transduction through the GTP-binding proteins Rac and Rho. *J. Cell Sci. Suppl* **18**:127–131.
24. **Ridley AJ** (1995). Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**(1):24–30.
25. **Linder ME, Middleton P, Hepler JR, Taussig R, Gilman AG, y Mumby SM** (1993). Lipid modifications of G proteins: alpha subunits are palmitoylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**(8):3675–3679.
26. **Casey PJ** (1995). Protein lipidation in cell signaling. *Science* **268**(5208):221–225.
27. **Boutin JA** (1997). Myristoylation. *Cell Signal.* **9**(1):15–35.

28. **Birnbaumer L** (1992). Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell* **71**(7):1069–1072.
29. **Clapham DE y Neer EJ** (1993). New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* **365**(6445):403–406.
30. **Taussig R, Quarmby LM, y Gilman AG** (1993). Regulation of purified type I and type II adenylylcyclases by G protein beta gamma subunits. *Journal of Biological Chemistry* **268**(1):9–12.
31. **Exton JH** (1997). Cell signalling through guanine-nucleotide-binding regulatory proteins (G proteins) and phospholipases. *Eur. J. Biochem.* **243**(1-2):10–20.
32. **Hamm HE y Gilchrist A** (1996). Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol* **8**:189–196.
33. **Simon MI, Strathmann MP, y Gautam N** (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**(5007):802–808.
34. **Matozaki T, Sakamoto C, Nagao M, Nishizaki H, y Baba S** (1988). G protein in stimulation of PI hydrolysis by CCK in isolated rat pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol* **255**(5 Pt 1):E652–E659.
35. **Meldrum E, Parker PJ, y Carozzi A** (1991). The PtdIns-PLC superfamily and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1092**(1):49–71.
36. **Picatoste F, Sarri E, y Claro E** (1996). Proteínas G: fosfolipasas, en *Receptores para neurotransmisores. Métodos en estructuras moleculares y función*, vol. 7 (García JA, eds.) pp. 345–362. Citran-Ediciones en Neurociencia, Barcelona.
37. **Berridge MJ** (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochemical Journal* **220**(2):345–360.
38. **Exton JH** (1994). Messenger molecules derived from membrane lipids. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**(2):226–229.
39. **Rhee SG, Kim H, Suh PG, y Choi WC** (1991). Multiple forms of phosphoinositide-specific phospholipase C and different modes of activation. *Biochemical Society Transactions* **19**(2):337–341.
40. **Exton JH** (1994). Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu. Rev. Physiol* **56**:349–69:349–369.
41. **Williams RL** (1999). Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**(2-3):255–267.
42. **Kim BY, Kang DO, Oh WK, Kim JH, Choi YK, Jang JS, Suh PG, Ryu SH, Mheen TI, y Ahn JS** (2000). Involvement of SH2-SH2-SH3 domain of phospholipase cgamma1 in NF-kappaB signaling. *FEBS Letters* **472**(1):45–49.
43. **Pawson T y Gish GD** (1992). SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* **71**(3):359–362.

44. **Pawson T** (1995). Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. *Nature* **373**(6514):477–478.
45. **Pawson T** (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**(6515):573–580.
46. **Manzoli L, Billi AM, Faenza I, Matteucci A, Martelli AM, Peruzzi D, Falconi M, Rhee SG, Gilmour RS, y Cocco L** (1999). Nuclear phospholipase C: a novel aspect of phosphoinositide signalling. *Anticancer Res.* **19**(5A):3753–3756.
47. **Lee SB y Rhee SG** (1995). Significance of PIP2 hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**(2):183–189.
48. **Rhee SG** (1994). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C by G protein., en *Signal-activated phospholipases* (Liscovitch M, eds.) pp. 1–12. R.G. Landes Co., Austin.
49. **Margolis B, Rhee SG, Felder S, Mervic M, Lyall R, Levitzki A, Ullrich A, Zilberstein A, y Schlessinger J** (1989). EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signaling. *Cell* **57**(7):1101–1107.
50. **Meisenhelder J, Suh PG, Rhee SG, y Hunter T** (1989). Phospholipase C-gamma is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro. *Cell* **57**(7):1109–1122.
51. **Carpenter G y Ji Q** (1999). Phospholipase C-gamma as a signal-transducing element. *Exp. Cell Res.* **253**(1):15–24.
52. **Nishibe S, Wahl MI, Hernandez-Sotomayor SM, Tonks NK, Rhee SG, y Carpenter G** (1990). Increase of the catalytic activity of phospholipase C-gamma 1 by tyrosine phosphorylation. *Science* **250**(4985):1253–1256.
53. **Goldschmidt-Clermont PJ, Kim JW, Machesky LM, Rhee SG, y Pollard TD** (1991). Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science* **251**(4998):1231–1233.
54. **Kim HK, Kim JW, Zilberstein A, Margolis B, Kim JG, Schlessinger J, y Rhee SG** (1991). PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC-gamma 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell* **65**(3):435–441.
55. **Ullrich A y Schlessinger J** (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**(2):203–212.
56. **Schlessinger J y Ullrich A** (1992). Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **9**(3):383–391.
57. **Fantl WJ, Johnson DE, y Williams LT** (1993). Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:453–81:453–481.
58. **Rao GN, Delafontaine P, y Runge MS** (1995). Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* **270**(46):27871–27875.

59. **Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F, y Inagami T** (1998). Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* **273**(15):8890–8896.
60. **Mattingly RR y Macara IG** (1996). Phosphorylation-dependent activation of the Ras-GRF/CDC25Mm exchange factor by muscarinic receptors and G-protein beta gamma subunits. *Nature* **382**(6588):268–272.
61. **Faure M, Voyno-Yasenetskaya TA, y Bourne HR** (1994). cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *Journal of Biological Chemistry* **269**(11):7851–7854.
62. **Luttrell LM, Daaka Y, y Lefkowitz RJ** (1999). Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:177–183.
63. **Sugden PH y Clerk A** (1997). Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal.* **9**(5):337–351.
64. **Piiper A, Stryjek-Kaminska D, Klengel R, y Zeuzem S** (1997). CCK, carbachol, and bombesin activate distinct PLC-beta isoenzymes via Gq/11 in rat pancreatic acinar membranes. *Am. J. Physiol* **272**(1 Pt 1):G135–G140.
65. **Hepler JR, Kozasa T, Smrcka AV, Simon MI, Rhee SG, Sternweis PC, y Gilman AG** (1993). Purification from Sf9 cells and characterization of recombinant Gq alpha and G11 alpha. Activation of purified phospholipase C isozymes by G alpha subunits. *Journal of Biological Chemistry* **268**(19):14367–14375.
66. **Kozasa T, Hepler JR, Smrcka AV, Simon MI, Rhee SG, Sternweis PC, y Gilman AG** (1993). Purification and characterization of recombinant G16 alpha from Sf9 cells: activation of purified phospholipase C isozymes by G-protein alpha subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**(19):9176–9180.
67. **Lee SB, Shin SH, Hepler JR, Gilman AG, y Rhee SG** (1993). Activation of phospholipase C-beta 2 mutants by G protein alpha q and beta gamma subunits. *Journal of Biological Chemistry* **268**(34):25952–25957.
68. **Allen V, Swigart P, Cheung R, Cockcroft S, y Katan M** (1997). Regulation of inositol lipid-specific phospholipase cdelta by changes in Ca²⁺ ion concentrations. *Biochemical Journal* **327**(Pt 2):545–552.
69. **Hodson EA, Ashley CC, Hughes AD, y Lymn JS** (1998). Regulation of phospholipase C-delta by GTP-binding proteins-rhoA as an inhibitory modulator. *Biochim. Biophys. Acta* **1403**(1):97–101.

70. **Chaudhry A, Conway BR, Laychock SG, y Rubin RP** (1989). Analysis of the regulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate synthesis by arachidonic acid in exocrine pancreas. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**(2):488–495.
71. **Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM, y Schwartz MA** (1994). The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* **79**(3):507–513.
72. **Majerus PW** (1992). Inositol phosphate biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* **61:225-50**:225–250.
73. **Berridge MJ y Irvine RF** (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341**(6239):197–205.
74. **Rubin RP, Godfrey PP, Chapman DA, y Putney JW, Jr.** (1984). Secretagogue-induced formation of inositol phosphates in rat exocrine pancreas. Implications for a messenger role for inositol trisphosphate. *Biochemical Journal* **219** (2):655–659.
75. **Rowley WH, Sato S, Huang SC, Collado-Escobar DM, Beaven MA, Wang LH, Martinez J, Gardner JD, y Jensen RT** (1990). Cholecystokinin-induced formation of inositol phosphates in pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **259**(4 Pt 1):G655–G665.
76. **Fasolato C, Innocenti B, y Pozzan T** (1994). Receptor-activated Ca²⁺ influx: how many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol. Sci.* **15** (3):77–83.
77. **Miyazaki S** (1995). Inositol trisphosphate receptor mediated spatiotemporal calcium signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**(2):190–196.
78. **Clapham DE** (1995). Calcium signaling. *Cell* **80**(2):259–268.
79. **Waltz B y Baumann O** (1989). *Calcium-sequestering cell organelles: in situ localization, morphological and functional characterization* (Fischer G, eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
80. **Ansah TA, Molla A, y Katz S** (1984). Ca²⁺-ATPase activity in pancreatic acinar plasma membranes. Regulation by calmodulin and acidic phospholipids. *Journal of Biological Chemistry* **259**(21):13442–13450.
81. **Muallem S** (1989). Calcium transport pathways of pancreatic acinar cells. *Annu. Rev. Physiol* **51**:83–105.
82. **Gonzalez A, Pariente JA, Salido GM, y Camello PJ** (1997). Intracellular pH and calcium signalling in rat pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch.* **434**(5):609–614.
83. **Gonzalez A, Camello PJ, Pariente JA, y Salido GM** (1997). Free cytosolic calcium levels modify intracellular pH in rat pancreatic acini. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **230**(3):652–656.
84. **Pandol SJ y Schoeffield-Payne MS** (1987). The agonist-sensitive calcium pool in the pancreatic acinar cell. *Journal of Biological Chemistry* **262** :16963–16968.

-
85. **Dormer RL y Williams JA** (1981). Secretagogue-induced changes in subcellular Ca²⁺ distribution in isolated pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **240**(2):G130–G140.
 86. **Yule DI y Gallacher DV** (1988). Oscillations of cytosolic calcium in single pancreatic acinar cells stimulated by acetylcholine. *FEBS Letters* **239** :358–362.
 87. **Tsunoda Y, Stuenkel EL, y Williams JA** (1990). Oscillatory mode of calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol* **258**(1 Pt 1):C147–C155.
 88. **Toescu EC, Lawrie AM, Petersen OH, y Gallacher DV** (1992). Spatial and temporal distribution of agonist-evoked cytoplasmic Ca²⁺ signals in exocrine acinar cells analysed by digital image microscopy. *EMBO J.* **11**(4):1623–1629.
 89. **Woods NM, Cuthbertson KR, y Cobbold PH** (1986). Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature* **319**:600–602.
 90. **Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, y Schulz I** (1983). Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306**(5938):67–69.
 91. **Guse AH, DaSilva CP, Berg I, Skapenko AL, Weber K, Heyer P, Hohenegger M, Ashamu GA, Schulze-Koops H, Potter BV, y May GW** (1999). Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* **398**:70–73.
 92. **Thorn P, Gerasimenko OV, y Petersen OH** (1994). Cyclic ADP-ribose regulation of ryanodine receptors involved in agonist evoked cytosolic Ca²⁺ oscillations in pancreatic acinar cells. *EMBO J.* **13**:2038–2043.
 93. **Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Belan PV, y Petersen OH** (1996). Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell* **84**(3):473–480.
 94. **Lee HC y Aarhus R** (1995). A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP ribose. *Journal of Biological Chemistry* **270**:2152–2157.
 95. **Genazzani AA, Mezna M, Dickey D, Michelangeli F, y Walseth TF** (1997). Pharmacological properties of the Ca²⁺ -release mechanism sensitive to NAADP in the sea urchin egg. *Br. J. Pharmacol.* **121**:1489–1495.
 96. **Bak J, White P, Tmar G, Missiaen L, Genazzani AA, y Galione A** (1999). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate triggers Ca²⁺ release from brain microsomes. *Curr. Biol.* **9**:751–754.
 97. **Cancela JM, Churchill GC, y Galione A** (1999). Coordination of agonist-induced Ca²⁺-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature* **398**:74–76.

98. **Lee HC y Aarhus R** (1991). Wide distribution of an enzyme that catalyzes the hydrolysis of cyclic ADP-ribose. *Biochim. Biophys. Acta* **1164**:68–74.
99. **Supattapone S, Worley PF, Baraban JM, y Sneyder SH** (1988). Solubilization, purification and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *Journal of Biological Chemistry* **263**:1534–1540.
100. **Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, y Mikoshiba K** (1989). Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* **342**:32–38.
101. **Sudhof TC, Newton CL, Archer BT, Ushkaryov V, y Mignery GA** (1991). Structure of a novel IP3 receptor. *EMBO J.* **10**:3199–3206.
102. **Blondel O, Takeda J, Heilwig J, Seino S, y Bell GI** (1993). Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract and other tissues. *Journal of Biological Chemistry* **268**:11356–11363.
103. **Ogami Y, Kimura T, Arita Y, y Nawata H** (1989). The relationship between free cytosolic calcium and amylase release in rat pancreatic acini. *Jpn. J. Physiol* **39**(4):571–584.
104. **Nathanson MH, Fallon MB, Padfield PJ, y Maranto AR** (1994). Localization of type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the Ca²⁺ waves trigger zone of pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry* **269**:4693–4696.
105. **Lee MG, Xu X, Zeng W, Diaz J, Wojcikiewicz RJ, Kuo TH, Wuytack F, Racymakers L, y Muallem S** (1997). Polarized expression of Ca²⁺ channels in pancreatic and salivary gland cells. *Journal of Biological Chemistry* **272**:15765–15770.
106. **Irvine RF** (1990). 'Quantal' Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Letters* **263**(1):5–9.
107. **Kuno M y Gardner P** (1987). Ion channels activated by inositol 1,4,5-trisphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes. *Nature* **326**:301–304.
108. **Gillemette G, Balla T, Baukal AJ, y Catt KJ** (1988). Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and calcium mobilization in hepatic plasma membrane fraction. *Journal of Biological Chemistry* **262**:4541–4548.
109. **Delisle L, Pittet D, Potter BV, Lew PD, y Welsh MJ** (1992). InsP₃ and Ins(1,3,4,5)P₄ act in synergic to stimulate influx of extracellular Ca²⁺ in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol* **262**:C1456–C1463.
110. **Clapham DE** (1992). Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca²⁺-permeable channel. *Nature* **355**:356–358.
111. **Hoth M y Penner R** (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**:353–356.

112. **Fasolato C, Hoth M, Matthews G, y Penner R** (1993). Ca^{2+} and Mn^{2+} influx through receptor-mediated activation of nonspecific cation channels in mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:3068–3072.
113. **Bahnon TD, Pandol SJ, y Dionne VE** (1993). Cyclic GMP modulates depletion-activated Ca^{2+} entry in pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry* **268**:10808–10812.
114. **Parekh AB, Fleig A, y Penner R** (1997). The store-operated calcium current I(CRAC): nonlinear activation by InsP_3 and dissociation from calcium release. *Cell* **89**:973–980.
115. **Irvine RF** (1992). Inositol phosphates and Ca^{2+} entry: toward a proliferation or a simplification? *FASEB J.* **6**:3085–3091.
116. **Randriamampita C y Tsien RY** (1993). Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* **364**(6440):809–814.
117. **Parekh AB, Terlau H, y Stühmer W** (1994). Depletion of InsP_3 stores activates a Ca^{2+} and K^{+} current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature* **364**:814–818.
118. **Zweifach A y Lewis RS** (1995). Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. *J. Gen. Physiol.* **105**:209–226.
119. **Zweifach A y Lewis RS** (1995). Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **270**:14445–14451.
120. **Parekh AB** (1998). Slow feedback inhibition of calcium release-activated calcium current by calcium entry. *Journal of Biological Chemistry* **273**:14925–14932.
121. **Parekh AB y Penner R** (1995). Depletion-activated calcium current is inhibited by protein kinase in RBL-2H3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:7907–7911.
122. **Yule DI, Lawrie AM, y Gallacher DV** (1991). Acetylcholine and cholecystokinin induce different patterns of oscillating calcium signals in pancreatic acinar cells. *Cell Calcium* **12**(2-3):145–151.
123. **Petersen CC, Toescu EC, y Petersen OH** (1991). Different patterns of receptor-activated cytoplasmic Ca^{2+} oscillations in single pancreatic acinar cells: dependence on receptor type, agonist concentration and intracellular Ca^{2+} buffering. *EMBO J.* **10**(3):527–533.
124. **Toescu EC** (1995). Temporal and spatial heterogeneities of Ca^{2+} signalling: mechanism and physiological roles. *Am. J. Physiol.* **269**:G173–G185.
125. **Yule DI y Williams JA** (1992). U73122 inhibits Ca^{2+} oscillations in response to cholecystokinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry* **267**(20):13830–13835.

126. **Wakui M, Potter BV, y Petersen OH** (1989). Pulsatile intracellular calcium release does not depend on fluctuations in inositol trisphosphate concentration. *Nature* **339**(6222):317–320.
127. **Saluja AK, Dawra RK, Lerch MM, y Steer ML** (1992). CCK-JMV-180, an analog of cholecystokinin, releases intracellular calcium from an inositol trisphosphate-independent pool in rat pancreatic acini. *Journal of Biological Chemistry* **267**(16):11202–11207.
128. **Klee CB, Ni WC, Draetta GF, y Newton DL** (1986). Different modes of interaction of calmodulin with its target enzymes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **8 Suppl 8:S52-6:S52–S56**.
129. **Colbran RJ, Schworer CM, Hashimoto Y, Fong YL, Rich DP, Smith MK, y Soderling TR** (1989). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochemical Journal* **258**(2):313–325.
130. **Bissonnette M, Kuhn D, y de Lanerolle P** (1989). Purification and characterization of myosin light-chain kinase from the rat pancreas. *Biochemical Journal* **258**(3):739–747.
131. **Burnham DB, Soling HD, y Williams JA** (1988). Evaluation of myosin light chain phosphorylation in isolated pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **254**(1 Pt 1):G130–G134.
132. **Nairn AC, Bhagat B, y Palfrey HC** (1985). Identification of calmodulin-dependent protein kinase III and its major Mr 100,000 substrate in mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**(23):7939–7943.
133. **Gorelick FS, Cohn JA, Freedman SD, Delahunt NG, Gershoni JM, y Jamieson JD** (1983). Calmodulin-stimulated protein kinase activity from rat pancreas. *J. Cell Biol.* **97**(4):1294–1298.
134. **Hwang J, Bragado MJ, Duan RD, y Williams JA** (1996). Protein phosphatase inhibitors potentiate Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rat pancreatic acinar cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **225**(2):520–524.
135. **Nairn AC y Palfrey HC** (1987). Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *Journal of Biological Chemistry* **262**(36):17299–17303.
136. **Billah MM y Anthes JC** (1990). The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochemical Journal* **269**(2):281–291.
137. **Nishizuka Y** (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**(7):484–496.
138. **Quest AF** (1996). Regulation of protein kinase C: a tale of lipids and proteins. *Enzyme Protein* **49**(5-6):231–261.
139. **Liu WS y Heckman CA** (1998). The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal.* **10**(8):529–542.
140. **Newton AC** (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**(2):161–167.

141. **Csukai M y Mochly-Rosen D** (1999). Pharmacologic modulation of protein kinase C isozymes: the role of RACKs and subcellular localisation. *Pharmacological Research* **39**(4):253–259.
142. **Mochly-Rosen D, Smith BL, Chen CH, Disatnik MH, y Ron D** (1995). Interaction of protein kinase C with RACK1, a receptor for activated C-kinase: a role in beta protein kinase C mediated signal transduction. *Biochemical Society Transactions* **23**(3):596–600.
143. **Asaoka Y, Nakamura S, Yoshida K, y Nishizuka Y** (1992). Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends Biochem. Sci.* **17**(10):414–417.
144. **Exton JH** (1994). Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1212**(1):26–42.
145. **Saito M y Kanfer J** (1973). Solubilization and properties of a membrane-bound enzyme from rat brain catalyzing a base-exchange reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **53**(2):391–398.
146. **Exton JH** (1997). Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation, and function. *Physiol Rev.* **77**(2):303–320.
147. **Massenburg D, Han JS, Liyanage M, Patton WA, Rhee SG, Moss J, y Vaughan M** (1994). Activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factors 1,5, and 6: separation of ADP-ribosylation factor-dependent and oleate-dependent enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**(24):11718–11722.
148. **Rivard N, Rydzewska G, Lods JS, y Morisset J** (1995). Novel model of integration of signaling pathways in rat pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol* **269**(3 Pt 1):G352–G362.
149. **Ohguchi K, Banno Y, Nakashima S, y Nozawa Y** (1996). Regulation of membrane-bound phospholipase D by protein kinase C in HL60 cells. Synergistic action of small GTP-binding protein RhoA. *Journal of Biological Chemistry* **271** (8):4366–4372.
150. **Olson SC y Lambeth JD** (1996). Biochemistry and cell biology of phospholipase D in human neutrophils. *Chem. Phys. Lipids* **80**(1-2):3–19.
151. **Brown HA, Gutowski S, Moomaw CR, Slaughter C, y Sternweis PC** (1993). ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* **75**(6):1137–1144.
152. **Boman AL y Kahn RA** (1995). Arf proteins: the membrane traffic police? *Trends Biochem. Sci.* **20**(4):147–150.
153. **Cockcroft S y Taylor JA** (1987). Fluoroaluminates mimic guanosine 5'-[gamma-thio]triphosphate in activating the polyphosphoinositide phosphodiesterase of hepatocyte membranes. Role for the guanine nucleotide regulatory protein Gp in signal transduction. *Biochemical Journal* **241**(2):409–414.
154. **Dennis EA** (1994). Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry* **269**(18):13057–13060.

155. **Glaser KB, Mobilio D, Chang JY, y Senko N** (1993). Phospholipase A2 enzymes: regulation and inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**(3):92–98.
156. **Nishizuka Y y Nakamura S** (1995). Lipid mediators and protein kinase C for intracellular signalling. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol Suppl* **1**:S202-3:S202–S203.
157. **Tsunoda Y y Owyang C** (1995). High-affinity CCK receptors are coupled to phospholipase A2 pathways to mediate pancreatic amylase secretion. *Am. J. Physiol* **269**(3 Pt 1):G435–G444.
158. **Masliah J, Berguerand M, y Bereziat G** (1996). Coupling of seven transmembrane domains receptors cytosolic PLA2: role of G proteins and protein kinases. *C. R. Seances Soc. Biol Fil.* **190**(4):417–423.
159. **Nixon AB, Seeds MC, Bass DA, Smitherman PK, O'Flaherty JT, Daniel LW, y Wykle RL** (1997). Comparison of alkylacylglycerol vs. diacylglycerol as activators of mitogen-activated protein kinase and cytosolic phospholipase A2 in human neutrophil priming. *Biochim. Biophys. Acta* **1347**(2-3):219–230.
160. **Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, y Knopf JL** (1991). A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* **65**(6):1043–1051.
161. **Asaoka Y, Yoshida K, Sasaki Y, y Nishizuka Y** (1993). Potential role of phospholipase A2 in HL-60 cell differentiation to macrophages induced by protein kinase C activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**(11):4917–4921.
162. **Lehr M y Griessbach K** (2000). Involvement of different protein kinases and phospholipases A2 in phorbol ester (TPA)-induced arachidonic acid liberation in bovine platelets. *Mediators. Inflamm.* **9**(1):31–34.
163. **Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, y Davis RJ** (1993). cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**(2):269–278.
164. **Seger R y Krebs EG** (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**(9):726–735.
165. **Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, y Pouyssegur J** (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **122**(5):1079–1088.
166. **Ricupero D, Taylor L, y Polgar P** (1993). Interactions of bradykinin, calcium, G-protein and protein kinase in the activation of phospholipase A2 in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Agents and Actions* **40**(1-2):110–118.
167. **Hack N, Clayman P, y Skorecki K** (1990). A role for G-proteins in the epidermal growth factor stimulation of phospholipase A2 in rat kidney mesangial cells. *Biosci. Rep.* **10**(4):353–362.

168. **Wessel K, Resch K, y Kaever V** (1989). Aluminium fluoride enhances phospholipase A2 activity and eicosanoid synthesis in macrophages. *Eicosanoids* **2**(4):223–227.
169. **Gerritsen ME y Mannix RJ** (1990). G-proteins and phospholipase activation in endothelial cells. *Adv. Exp. Med. Biol* **275:115-24**:115–124.
170. **Rosenstock M, Danon A, y Rimón G** (1996). Dual regulation of PLA2 and PGI2 production by G proteins in bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol* **271**(2 Pt 1):C555–C562.
171. **Puri RN** (1998). Phospholipase A2: its role in ADP- and thrombin-induced platelet activation mechanisms. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **30**(10):1107–1122.
172. **Tsunoda Y y Owyang C** (1995). The regulatory site of functional GTP binding protein coupled to the high affinity cholecystokinin receptor and phospholipase A2 pathway is on the G beta subunit of Gq protein in pancreatic acini. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **211**(2):648–655.
173. **Tsunoda Y y Owyang C** (1994). A newly cloned phospholipase A2-activating protein elicits Ca²⁺ oscillations and pancreatic amylase secretion via mediation of G protein beta/phospholipase A2/arachidonic acid cascades. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **203**(3):1716–1724.
174. **Tsunoda Y y Owyang C** (1993). Differential involvement of phospholipase A2/arachidonic acid and phospholipase C/phosphoinositol pathways during cholecystokinin receptor activated Ca²⁺ oscillations in pancreatic acini. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **194**(3):1194–1202.
175. **Dickerson CD y Weiss ER** (1995). The coupling of pertussis toxin-sensitive G proteins to phospholipase A2 and adenylyl cyclase in CHO cells expressing bovine rhodopsin. *Exp. Cell Res.* **216**(1):46–50.
176. **Jung H y Reme C** (1994). Light-evoked arachidonic acid release in the retina: illuminance/duration dependence and the effects of quinacrine, mellitin and lithium. Light-evoked arachidonic acid release. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **232**(3):167–175.
177. **Zajic G y Schacht J** (1983). Cytochemical demonstration of adenylyl cyclase with strontium chloride in the rat pancreas. *J. Histochem. Cytochem.* **31**(1):25–28.
178. **Taussig R, Iniguez-Lluhi JA, y Gilman AG** (1993). Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. *Science* **261**(5118):218–221.
179. **Larner J** (1988). Insulin-signaling mechanisms. Lessons from the old testament of glycogen metabolism and the new testament of molecular biology. *Diabetes* **37**(3):262–275.
180. **Racker E** (1983). Resolution and reconstitution of biological pathways from 1919 to 1984. *Fed. Proc.* **42**(12):2899–2909.

181. **Villar-Palasi C** (1968). The hormonal regulation of glycogen metabolism in muscle. *Vitam. Horm.* **26:65-118**:65–118.
182. **Jensen RT, Tatemoto K, Mutt V, Lemp GF, y Gardner JD** (1981). Actions of a newly isolated intestinal peptide PHI on pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **241**(6):G498–G502.
183. **Raufman JP, Malhotra R, y Singh L** (1991). PACAP-38, a novel peptide from ovine hypothalamus, is a potent modulator of amylase release from dispersed acini from rat pancreas. *Regul. Pept.* **36**(1):121–129.
184. **Lajas AI, Pariente JA, y Salido GM** (1995). Histamine and the cAMP pathway in the guinea-pig pancreas. *Cell Signal.* **7**(1):57–60.
185. **Willems PH, Tilly RH, y de Pont JJ** (1987). Pertussis toxin stimulates cholecystokinin-induced cyclic AMP formation but is without effect on secretagogue-induced calcium mobilization in exocrine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta* **928**(2):179–185.
186. **Gardner JD, Sutliff VE, Walker MD, y Jensen RT** (1983). Effects of inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase on actions of cholecystokinin, bombesin, and carbachol on pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **245**(5 Pt 1):G676–G680.
187. **Matsumoto T y Kanno T** (1984). Potentiation of cholecystokinin-induced exocrine secretion by either electrical stimulation of the vagus nerve or exogenous VIP administration in the guinea pig pancreas. *Peptides* **5**(2):285–289.
188. **Gardner JD y Jackson MJ** (1977). Regulation of amylase release from dispersed pancreatic acinar cells. *J. Physiol (Lond)* **270**(2):439–454.
189. **Alcon S, Rosado JA, Garcia LJ, Pariente JA, Salido GM, y Pozo MJ** (1996). Secretin potentiates guinea pig pancreatic response to cholecystokinin by a cholinergic mechanism. *Can. J. Physiol Pharmacol.* **74**(12):1342–1350.
190. **Taylor SS** (1989). cAMP-dependent protein kinase. Model for an enzyme family. *Journal of Biological Chemistry* **264**(15):8443–8446.
191. **Taylor SS, Buechler JA, y Yonemoto W** (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **59:971-1005**:971–1005.
192. **Ederveen AG, van der Leest JV, Emst-de Vries SE, y de Pont JJ** (1989). Phosphorylation of low molecular mass cytosolic proteins by protein kinase C and protein kinase A in the rabbit exocrine pancreas. *Eur. J. Biochem.* **185**(2):461–468.
193. **Nigam SK y Blobel G** (1989). Cyclic AMP-dependent protein kinase in canine pancreatic rough endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **264**(28):16927–16932.
194. **Jensen RT y Gardner JD** (1978). Cyclic nucleotide-dependent protein kinase activity in acinar cells from guinea pig pancreas. *Gastroenterology* **75**(5):806–816.

-
195. **Pandol SJ y Schoeffield-Payne MS** (1990). Cyclic GMP mediates the agonist-stimulated increase in plasma membrane calcium entry in the pancreatic acinar cell. *Journal of Biological Chemistry* **265**(22):12846–12853.
 196. **Schenk PW y Snaar-Jagalska BE** (1999). Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1449**(1):1–24.
 197. **Hunter T** (1995). Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**:225–236.
 198. **Fischer EH y Krebs EG** (1955). Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *Journal of Biological Chemistry* **216**:121–132.
 199. **Krebs EG, Graves DJ, y Fischer EH** (1959). Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase. *Journal of Biological Chemistry* **234**:2867–2873.
 200. **Mumby SM** (1997). Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:148–154.
 201. **Collett MS y Erikson RL** (1978). Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **75**(4):2021–2024.
 202. **Levinson AD, Oppermann H, Levintow L, Varmus HE, y Bishop JM** (1978). Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell* **15**(2):561–572.
 203. **Brugge JS y Erikson RL** (1977). Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature* **269**(5626):346–348.
 204. **Purchio AF, Erikson E, Brugge JS, y Erikson RL** (1978). Identification of a polypeptide encoded by the avian sarcoma virus src gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **75**(3):1567–1571.
 205. **Eckhart W, Hutchinson MA, y Hunter T** (1979). An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell* **18**(4):925–933.
 206. **Hunter T y Sefton BM** (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**(3):1311–1315.
 207. **Sefton BM, Hunter T, Beemon K, y Eckhart W** (1980). Evidence that the phosphorylation of tyrosine is essential for cellular transformation by Rous sarcoma virus. *Cell* **20**(3):807–816.
 208. **Witte ON, Dasgupta A, y Baltimore D** (1980). Abelson murine leukaemia virus protein is phosphorylated in vitro to form phosphotyrosine. *Nature* **283**(5750):826–831.

209. **Ushiro H y Cohen S** (1980). Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *Journal of Biological Chemistry* **255**(18):8363–8365.
210. **Ek B, Westermark B, Wasteson A, y Heldin CH** (1982). Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation by platelet-derived growth factor. *Nature* **295**(5848):419–420.
211. **Kasuga M, Karlsson FA, y Kahn CR** (1982). Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* **215**(4529):185–187.
212. **Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, y Woodgett JR** (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**(6345):670–674.
213. **Woodgett JR, Pulverer BJ, Nikolakaki E, Plyte S, Hughes K, Franklin CC, y Kraft AS** (1993). Regulation of jun/AP-1 oncoproteins by protein phosphorylation. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **28:261-9**:261–269.
214. **Courtneidge SA** (1985). Activation of the pp60c-src kinase by middle T antigen binding or by dephosphorylation. *EMBO J.* **4**(6):1471–1477.
215. **Cooper JA y King CS** (1986). Dephosphorylation or antibody binding to the carboxy terminus stimulates pp60c-src. *Mol. Cell Biol.* **6**(12):4467–4477.
216. **Cooper JA y Howell B** (1993). The when and how of Src regulation. *Cell* **73**(6):1051–1054.
217. **Liu X, Brodeur SR, Gish G, Songyang Z, Cantley LC, Laudano AP, y Pawson T** (1993). Regulation of c-Src tyrosine kinase activity by the Src SH2 domain. *Oncogene* **8**(5):1119–1126.
218. **van der GP y Pawson T** (1995). The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* **20**(7):277–280.
219. **Margolis B, Borg JP, Straight S, y Meyer D** (1999). The function of PTB domain proteins. *Kidney Int.* **56**(4):1230–1237.
220. **Snow DM y Hart GW** (1998). Nuclear and cytoplasmic glycosylation. *Int. Rev. Cytol.* **181:43-74**:43–74.
221. **Clarke S** (1992). Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu. Rev. Biochem.* **61:355-86**:355–386.
222. **Cox AD y Der CJ** (1997). Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras? *Biochim. Biophys. Acta* **1333**(1):F51–F71.
223. **Aletta JM, Cimato TR, y Ettinger MJ** (1998). Protein methylation: a signal event in post-translational modification. *Trends Biochem. Sci.* **23**(3):89–91.
224. **Seabra MC** (1998). Membrane association and targeting of prenylated Ras-like GTPases. *Cell Signal.* **10**(3):167–172.

-
225. **Resh MD** (1996). Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cell Signal.* **8**(6):403–412.
226. **Jackson SP y Tjian R** (1988). O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* **55**(1):125–133.
227. **Hanks SK y Quinn AM** (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.* **200:38-62**:38–62.
228. **Hanks SK, Quinn AM, y Hunter T** (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**(4861):42–52.
229. **Neet K y Hunter T** (1996). Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families. *Genes Cells* **1**(2):147–169.
230. **Zinda MJ y Singleton CK** (1998). The hybrid histidine kinase dhkB regulates spore germination in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* **196**(2):171–183.
231. **Popov KM, Hawes JW, y Harris RA** (1997). Mitochondrial alpha-ketoacid dehydrogenase kinases: a new family of protein kinases. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **31:105-11**:105–111.
232. **Johnson LN, Lowe ED, Noble ME, y Owen DJ** (1998). The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Letters* **430**(1-2):1–11.
233. **Taylor SS, Radzio-Andzelm E, y Hunter T** (1995). How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *FASEB J.* **9**(13):1255–1266.
234. **Taylor SS y Radzio-Andzelm E** (1994). Three protein kinase structures define a common motif. *Structure.* **2**(5):345–355.
235. **Hubbard SR, Wei L, Ellis L, y Hendrickson WA** (1994). Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* **372**(6508):746–754.
236. **Lee J y Pilch PF** (1994). The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am. J. Physiol* **266**(2 Pt 1):C319–C334.
237. **Bolen JB** (1993). Nonreceptor tyrosine protein kinases. *Oncogene* **8**(8):2025–2031.
238. **Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, Takahashi K, Nakamura H, Suzuki J, Nagai K, Yamada T, Nakamura S, y Yamamura H** (1991). Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* **266**(24):15790–15796.
239. **Hanks SK y Hunter T** (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**(8):576–596.

240. **Resh MD** (1993). Interaction of tyrosine kinase oncoproteins with cellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1155**(3):307–322.
241. **Thomas SM y Brugge JS** (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**:513-609:513–609.
242. **Gutkind JS** (1998). The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *Journal of Biological Chemistry* **273**(4):1839–1842.
243. **Stephens EV, Kalinec G, Brann MR, y Gutkind JS** (1993). Transforming G protein-coupled receptors transduce potent mitogenic signals in NIH 3T3 cells independent on cAMP inhibition or conventional protein kinase C. *Oncogene* **8** (1):19–26.
244. **Campbell GS, Pang L, Miyasaka T, Saltiel AR, y Carter-Su C** (1992). Stimulation by growth hormone of MAP kinase activity in 3T3-F442A fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **267**(9):6074–6080.
245. **Paul A, Wilson S, Belham CM, Robinson CJ, Scott PH, Gould GW, y Plevin R** (1997). Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal.* **9**(6):403–410.
246. **Davis RJ** (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry* **268**(20):14553–14556.
247. **DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, Kinetz E, Compton DL, Rojas E, Park JS, Smith C, DiStefano PS, Glass DJ, Burden SJ, y Yancopoulos GD** (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* **85**(4):501–512.
248. **Glass DJ, DeChiara TM, Stitt TN, DiStefano PS, Valenzuela DM, y Yancopoulos GD** (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation and is a functional receptor for agrin. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **61**:435-44:435–444.
249. **Gould KL y Nurse P** (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**(6245):39–45.
250. **Morla AO, Draetta G, Beach D, y Wang JY** (1989). Reversible tyrosine phosphorylation of *cdc2*: dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis. *Cell* **58**(1):193–203.
251. **Baskaran R, Dahmus ME, y Wang JY** (1993). Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**(23):11167–11171.
252. **Baskaran R, Chiang GG, y Wang JY** (1996). Identification of a binding site in c-Ab1 tyrosine kinase for the C-terminal repeated domain of RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.* **16**(7):3361–3369.

-
253. **Li J, Avraham H, Rogers RA, Raja S, y Avraham S** (1996). Characterization of RAFTK, a novel focal adhesion kinase, and its integrin-dependent phosphorylation and activation in megakaryocytes. *Blood* **88**(2):417–428.
254. **Raja S, Avraham S, y Avraham H** (1997). Tyrosine phosphorylation of the novel protein-tyrosine kinase RAFTK during an early phase of platelet activation by an integrin glycoprotein IIb-IIIa-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **272**(16):10941–10947.
255. **Mariot P, O'Sullivan AJ, Brown AM, y Tatham PE** (1996). Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor protein (RhoGDI) inhibits exocytosis in mast cells. *EMBO J.* **15**(23):6476–6482.
256. **Norman JC, Price LS, Ridley AJ, y Koffer A** (1996). The small GTP-binding proteins, Rac and Rho, regulate cytoskeletal organization and exocytosis in mast cells by parallel pathways. *Mol. Biol. Cell* **7**(9):1429–1442.
257. **Price LS, Norman JC, Ridley AJ, y Koffer A** (1995). The small GTPases Rac and Rho as regulators of secretion in mast cells. *Curr. Biol.* **5**(1):68–73.
258. **Lowell CA y Soriano P** (1996). Knockouts of Src-family kinases: stiff bones, wimpy T cells, and bad memories. *Genes Dev.* **10**(15):1845–1857.
259. **Chackalaparampil I, Peri A, Nemir M, Mckee MD, Lin PH, Mukherjee BB, y Mukherjee AB** (1996). Cells in vivo and in vitro from osteopetrotic mice homozygous for c-src disruption show suppression of synthesis of osteopontin, a multifunctional extracellular matrix protein. *Oncogene* **12**(7):1457–1467.
260. **Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, y Schlessinger J** (1995). Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca²⁺-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* **376**(6543):737–745.
261. **Tsai W, Morielli AD, y Peralta EG** (1997). The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. *EMBO J.* **16**(15):4597–4605.
262. **Jayaraman T, Ondrias K, Ondriasova E, y Marks AR** (1996). Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science* **272**(5267):1492–1494.
263. **Duan RD y Williams JA** (1994). Cholecystokinin rapidly activates mitogen-activated protein kinase in rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **267**(3 Pt 1):G401–G408.
264. **Garcia LJ, Rosado JA, Tsuda T, y Jensen RT** (1997). CCK causes rapid tyrosine phosphorylation of p125FAK focal adhesion kinase and paxillin in rat pancreatic acini. *Biochim. Biophys. Acta* **1358**(2):189–199.
265. **Marshall CJ** (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**(2):179–185.

266. **Brown MT y Cooper JA** (1996). Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta* **1287**(2-3):121–149.
267. **Storms RW y Bose HR, Jr.** (1989). Oncogenes, protooncogenes, and signal transduction: toward a unified theory? *Adv. Virus Res.* **37:1-34**:1–34.
268. **Bolen JB y Brugge JS** (1997). Leukocyte protein tyrosine kinases: potential targets for drug discovery. *Annu. Rev. Immunol.* **15:371-404**:371–404.
269. **Lee J, Wang Z, Luoh SM, Wood WI, y Scadden DT** (1994). Cloning of FRK, a novel human intracellular SRC-like tyrosine kinase-encoding gene. *Gene* **138**(1-2):247–251.
270. **Thuveson M, Albrecht D, Zurcher G, Andres AC, y Ziemiecki A** (1995). *iyk*, a novel intracellular protein tyrosine kinase differentially expressed in the mouse mammary gland and intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **209**(2):582–589.
271. **Robbins SM, Quintrell NA, y Bishop JM** (1995). Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol. Cell Biol.* **15**(7):3507–3515.
272. **Resh MD** (1994). Myristylation and palmitylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* **76**(3):411–413.
273. **Mayer BJ, Ren R, Clark KL, y Baltimore D** (1993). A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* **73**(4):629–630.
274. **Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, y Baltimore D** (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* **259**(5098):1157–1161.
275. **Cohen GB, Ren R, y Baltimore D** (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* **80**(2):237–248.
276. **Liu X, Marengere LE, Koch CA, y Pawson T** (1993). The v-Src SH3 domain binds phosphatidylinositol 3'-kinase. *Mol. Cell Biol.* **13**(9):5225–5232.
277. **Turner CE** (1994). Paxillin: a cytoskeletal target for tyrosine kinases. *Bioessays* **16**(1):47–52.
278. **Turner CE** (1998). Paxillin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**(9):955–959.
279. **Cobb BS, Schaller MD, Leu TH, y Parsons JT** (1994). Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK. *Mol. Cell Biol.* **14**(1):147–155.
280. **Polte TR y Hanks SK** (1997). Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs. *Journal of Biological Chemistry* **272**(9):5501–5509.

-
281. **Harte MT, Hildebrand JD, Burnham MR, Bouton AH, y Parsons JT** (1996). p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *Journal of Biological Chemistry* **271** (23):13649–13655.
282. **Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, Ogawa S, Tanaka T, Mano H, Yazaki Y, y Hirai H** (1994). A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J.* **13**(16):3748–3756.
283. **Dikic I, Tokiwa G, Lev S, Courtneidge SA, y Schlessinger J** (1996). A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* **383**(6600):547–550.
284. **Shanmugam M, Krett NL, Peters CA, Maizels ET, Murad FM, Kawakatsu H, Rosen ST, y Hunzicker-Dunn M** (1998). Association of PKC delta and active Src in PMA-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* **16**(13):1649–1654.
285. **Zang Q, Lu Z, Curto M, Barile N, Shalloway D, y Foster DA** (1997). Association between v-Src and protein kinase C delta in v-Src-transformed fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **272**(20):13275–13280.
286. **Cooper JA, Gould KL, Cartwright CA, y Hunter T** (1986). Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science* **231**(4744):1431–1434.
287. **Xu W, Harrison SC, y Eck MJ** (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* **385**(6617):595–602.
288. **Pawson T** (1997). New impressions of Src and Hck. *Nature* **385**(6617):582–3, 585.
289. **Sicheri F, Moarefi I, y Kuriyan J** (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* **385**(6617):602–609.
290. **MacAuley A y Cooper JA** (1990). Acidic residues at the carboxyl terminus of p60c-src are required for regulation of tyrosine kinase activity and transformation. *New Biol.* **2**(9):828–840.
291. **Kaplan KB, Bibbins KB, Swedlow JR, Arnaud M, Morgan DO, y Varmus HE** (1994). Association of the amino-terminal half of c-Src with focal adhesions alters their properties and is regulated by phosphorylation of tyrosine 527. *EMBO J.* **13**(20):4745–4756.
292. **Kmiecik TE y Shalloway D** (1987). Activation and suppression of pp60c-src transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell* **49**(1):65–73.
293. **Reynolds AB, Vila J, Lansing TJ, Potts WM, Weber MJ, y Parsons JT** (1987). Activation of the oncogenic potential of the avian cellular src protein by specific structural alteration of the carboxy terminus. *EMBO J.* **6**(8):2359–2364.

294. **Imamoto A y Soriano P** (1993). Disruption of the csk gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice. *Cell* **73**(6):1117–1124.
295. **Nada S, Yagi T, Takeda H, Tokunaga T, Nakagawa H, Ikawa Y, Okada M, y Aizawa S** (1993). Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. *Cell* **73**(6):1125–1135.
296. **Cooper JA** (1990). Oncogenes and anti-oncogenes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**(2):285–295.
297. **Parsons JT y Weber MJ** (1989). Genetics of src: structure and functional organization of a protein tyrosine kinase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **147:79-127**:79–127.
298. **Kamps MP y Sefton BM** (1986). Neither arginine nor histidine can carry out the function of lysine-295 in the ATP-binding site of p60src. *Mol. Cell Biol* **6**(3):751–757.
299. **Kamps MP, Buss JE, y Sefton BM** (1986). Rous sarcoma virus transforming protein lacking myristic acid phosphorylates known polypeptide substrates without inducing transformation. *Cell* **45**(1):105–112.
300. **Erpel T, Superti-Furga G, y Courtneidge SA** (1995). Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions. *EMBO J.* **14**(5):963–975.
301. **Wang HC y Parsons JT** (1989). Deletions and insertions within an amino-terminal domain of pp60v-src inactivate transformation and modulate membrane stability. *J. Virol.* **63**(1):291–302.
302. **DeClue JE y Martin GS** (1989). Linker insertion-deletion mutagenesis of the v-src gene: isolation of host- and temperature-dependent mutants. *J. Virol.* **63**(2):542–554.
303. **Kaplan KB, Swedlow JR, Morgan DO, y Varmus HE** (1995). c-Src enhances the spreading of src^{-/-} fibroblasts on fibronectin by a kinase-independent mechanism. *Genes Dev.* **9**(12):1505–1517.
304. **Schlaepfer DD, Hauck CR, y Sieg DJ** (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Prog. Bioph. Mol. Biol* **71**:435–478.
305. **Kaplan DR, Whitman M, Schaffhausen B, Pallas DC, White M, Cantley L, y Roberts TM** (1987). Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85 kd phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity. *Cell* **50**(7):1021–1029.
306. **Cowley S, Paterson H, Kemp P, y Marshall CJ** (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **77**(6):841–852.
307. **Daub H, Wallasch C, Lanckenau A, Herrlich A, y Ullrich A** (1997). Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.* **16**(23):7032–7044.

308. **Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, y Lefkowitz RJ** (1997). Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *Journal of Biological Chemistry* **272**(7):4637–4644.
309. **Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, y Ahn NG** (1994). Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* **265**(5174):966–970.
310. **Wan Y, Kurosaki T, y Huang XY** (1996). Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors. *Nature* **380**(6574):541–544.
311. **Calalb MB, Polte TR, y Hanks SK** (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol. Cell Biol.* **15**(2):954–963.
312. **Li X, Dy RC, Cance WG, Graves LM, y Earp HS** (1999). Interactions between two cytoskeleton-associated tyrosine kinases: calcium-dependent tyrosine kinase and focal adhesion tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* **274**(13):8917–8924.
313. **Shen Z, Batzer A, Koehler JA, Polakis P, Schlessinger J, Lydon NB, y Moran MF** (1999). Evidence for SH3 domain directed binding and phosphorylation of Sam68 by Src. *Oncogene* **18**(33):4647–4653.
314. **Nermut MV, Eason P, Hirst EM, y Kellie S** (1991). Cell/substratum adhesions in RSV-transformed rat fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **193**(2):382–397.
315. **Kellie S, Horvath AR, Felice G, Anand R, Murphy C, y Westwick J** (1993). The interaction of the tyrosine kinase pp60src with membrane and cytoskeletal components. *Symp. Soc. Exp. Biol* **47:267-82**:267–282.
316. **Hanks SK y Polte TR** (1997). Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays* **19**(2):137–145.
317. **Otey CA** (1996). pp125FAK in the focal adhesion. *Int. Rev. Cytol.* **167:161-83**:161–183.
318. **Turner CE, Schaller MD, y Parsons JT** (1993). Tyrosine phosphorylation of the focal adhesion kinase pp125FAK during development: relation to paxillin. *J. Cell Sci.* **105**(Pt 3):637–645.
319. **Vuori K, Hirai H, Aizawa S, y Ruoslahti E** (1996). Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases. *Mol. Cell Biol.* **16**(6):2606–2613.
320. **Xiong W y Parsons JT** (1997). Induction of apoptosis after expression of PYK2, a tyrosine kinase structurally related to focal adhesion kinase. *J. Cell Biol.* **139**(2):529–539.
321. **Vanhaesebroeck B, Stein RC, y Waterfield MD** (1996). The study of phosphoinositide 3-kinase function. *Cancer Surv.* **27:249-70**:249–270.

322. **Chen Y, Grall D, Salcini AE, Pelicci PG, Pouyssegur J, y Obberghen-Schilling E** (1996). Shc adaptor proteins are key transducers of mitogenic signaling mediated by the G protein-coupled thrombin receptor. *EMBO J.* **15**(5):1037–1044.
323. **Cobb MH y Goldsmith EJ** (1995). How MAP kinases are regulated. *Journal of Biological Chemistry* **270**(25):14843–14846.
324. **Robinson MJ y Cobb MH** (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:180–186.
325. **Broome MA y Hunter T** (1996). Requirement for c-Src catalytic activity and the SH3 domain in platelet-derived growth factor BB and epidermal growth factor mitogenic signaling. *J. Biol Chem.* **271**(28):16798–16806.
326. **Kefalas P, Brown TR, y Brickell PM** (1995). Signalling by the p60c-src family of protein-tyrosine kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **27**(6):551–563.
327. **Landgren E, Blume-Jensen P, Courtneidge SA, y Claesson-Welsh L** (1995). Fibroblast growth factor receptor-1 regulation of Src family kinases. *Oncogene* **10**(10):2027–2035.
328. **Twamley-Stein GM, Pepperkok R, Ansorge W, y Courtneidge SA** (1993). The Src family tyrosine kinases are required for platelet-derived growth factor-mediated signal transduction in NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**(16):7696–7700.
329. **Roche S, Koegl M, Barone MV, Roussel MF, y Courtneidge SA** (1995). DNA synthesis induced by some but not all growth factors requires Src family protein tyrosine kinases. *Mol. Cell Biol* **15**(2):1102–1109.
330. **Barone MV y Courtneidge SA** (1995). Myc but not Fos rescue of PDGFR signalling block caused by kinase-inactive Src. *Nature* **378**(6556):509–512.
331. **Taylor SJ y Shalloway D** (1996). Src and the control of cell division. *Bioessays* **18**(1):9–11.
332. **Fumagalli S, Totty NF, Hsuan JJ, y Courtneidge SA** (1994). A target for Src in mitosis. *Nature* **368**(6474):871–874.
333. **Roche S, Fumagalli S, y Courtneidge SA** (1995). Requirement for Src family protein tyrosine kinases in G2 for fibroblast cell division. *Science* **269**(5230):1567–1569.
334. **Morgan DO, Kaplan JM, Bishop JM, y Varmus HE** (1989). Mitosis-specific phosphorylation of p60c-src by p34cdc2-associated protein kinase. *Cell* **57** (5):775–786.
335. **Shenoy S, Choi JK, Bagrodia S, Copeland TD, Maller JL, y Shalloway D** (1989). Purified maturation promoting factor phosphorylates pp60c-src at the sites phosphorylated during fibroblast mitosis. *Cell* **57**(5):763–774.

-
336. **Muto M, Yoshimura M, Okayama M, y Kaji A** (1977). Cellular transformation and differentiation. Effect of Rous sarcoma virus transformation on sulfated proteoglycan synthesis by chicken chondrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**(10):4173–4177.
337. **Yoshimura M, Iwasaki Y, y Kaji A** (1981). In vitro differentiation of chicken embryo skin cells transformed by Rous sarcoma virus. *J. Cell Physiol* **109**(3):373–385.
338. **Alema S y Tato F** (1987). Interaction of retroviral oncogenes with the differentiation program of myogenic cells. *Adv. Cancer Res.* **49:1-28**:1–28.
339. **Alema S, Casalbore P, Agostini E, y Tato F** (1985). Differentiation of PC12 pheochromocytoma cells induced by v-src oncogene. *Nature* **316**(6028):557–559.
340. **Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, y Turner C** (1988). Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4:487-525**:487–525.
341. **Burridge K y Chrzanowska-Wodnicka M** (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12:463-518**:463–518.
342. **Kanner SB, Reynolds AB, Vines RR, y Parsons JT** (1990). Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**(9):3328–3332.
343. **Weng Z, Taylor JA, Turner CE, Brugge JS, y Seidel-Dugan C** (1993). Detection of Src homology 3-binding proteins, including paxillin, in normal and v-Src-transformed Balb/c 3T3 cells. *J. Biol Chem.* **268**(20):14956–14963.
344. **Burridge K, Turner CE, y Romer LH** (1992). Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell Biol.* **119**(4):893–903.
345. **Schlaepfer DD y Hunter T** (1996). Signal transduction from the extracellular matrix—a role for the focal adhesion protein-tyrosine kinase FAK. *Cell Struct. Funct.* **21**(5):445–450.
346. **Grant SG, Karl KA, Kiebler MA, y Kandel ER** (1995). Focal adhesion kinase in the brain: novel subcellular localization and specific regulation by Fyn tyrosine kinase in mutant mice. *Genes Dev.* **9**(15):1909–1921.
347. **Schaller MD** (1996). The focal adhesion kinase. *J. Endocrinol.* **150**(1):1–7.
348. **Hamasaki K, Mimura T, Morino N, Furuya H, Nakamoto T, Aizawa S, Morimoto C, Yazaki Y, Hirai H, y Nojima Y** (1996). Src kinase plays an essential role in integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate p130Cas. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **222**(2):338–343.

349. **Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, y Zhang Z** (1994). Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol. Cell Biol* **14**(12):8333–8342.
350. **Campbell FR** (1986). Ultrastructural studies of intercellular contacts (junctions) in bone marrow. A review. *Scan Electron Microsc.*(Pt 2):621–629.
351. **Reynolds AB, Herbert L, Cleveland JL, Berg ST, y Gaut JR** (1992). p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene* **7**(12):2439–2445.
352. **Munari-Silem Y y Rousset B** (1996). Gap junction-mediated cell-to-cell communication in endocrine glands--molecular and functional aspects: a review. *Eur. J. Endocrinol.* **135**(3):251–264.
353. **Azarnia R, Reddy S, Kmiecik TE, Shalloway D, y Loewenstein WR** (1988). The cellular src gene product regulates junctional cell-to-cell communication. *Science* **239**(4838):398–401.
354. **Crow DS, Beyer EC, Paul DL, Kobe SS, y Lau AF** (1990). Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts. *Mol. Cell Biol* **10**(4):1754–1763.
355. **Soriano P, Montgomery C, Geske R, y Bradley A** (1991). Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* **64**(4):693–702.
356. **Yagi T, Aizawa S, Tokunaga T, Shigetani Y, Takeda N, y Ikawa Y** (1993). A role for Fyn tyrosine kinase in the suckling behaviour of neonatal mice. *Nature* **366**(6457):742–745.
357. **Stein PL, Vogel H, y Soriano P** (1994). Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes Dev.* **8**(17):1999–2007.
358. **Lowell CA, Niwa M, Soriano P, y Varmus HE** (1996). Deficiency of the Hck and Src tyrosine kinases results in extreme levels of extramedullary hematopoiesis. *Blood* **87**(5):1780–1792.
359. **Yagi T, Shigetani Y, Furuta Y, Nada S, Okado N, Ikawa Y, y Aizawa S** (1994). Fyn expression during early neurogenesis in mouse embryos. *Oncogene* **9**(9):2433–2440.
360. **Umemori H, Sato S, Yagi T, Aizawa S, y Yamamoto T** (1994). Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signalling. *Nature* **367**(6463):572–576.
361. **Molina TJ, Kishihara K, Siderovski DP, van Ewijk W, Narendran A, Timms E, Wakeham A, Paige CJ, Hartmann KU, y Veillette A** (1992). Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature* **357**(6374):161–164.

-
362. **Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, y Parsons JT** (1992). pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**(11):5192–5196.
363. **Parsons JT, Schaller MD, Hildebrand J, Leu TH, Richardson A, y Otey C** (1994). Focal adhesion kinase: structure and signalling. *J. Cell Sci. Suppl* **18:109-13**:109–113.
364. **Sasaki H, Nagura K, Ishino M, Tobioka H, Kotani K, y Sasaki T** (1995). Cloning and characterization of cell adhesion kinase beta, a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily. *Journal of Biological Chemistry* **270**(36):21206–21219.
365. **Avraham S, London R, Fu Y, Ota S, Hiregowdara D, Li J, Jiang S, Pasztor LM, White RA, y Groopman JE** (1995). Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain. *Journal of Biological Chemistry* **270**(46):27742–27751.
366. **Yu H, Li X, Marchetto GS, Dy R, Hunter D, Calvo B, Dawson TL, Wilm M, Anderegg RJ, Graves LM, y Earp HS** (1996). Activation of a novel calcium-dependent protein-tyrosine kinase. Correlation with c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase activation. *Journal of Biological Chemistry* **271**(47):29993–29998.
367. **Schaller MD y Sasaki T** (1997). Differential signaling by the focal adhesion kinase and cell adhesion kinase beta. *Journal of Biological Chemistry* **272**(40):25319–25325.
368. **Siciliano JC, Toutant M, Derkinderen P, Sasaki T, y Girault JA** (1996). Differential regulation of proline-rich tyrosine kinase 2/cell adhesion kinase beta (PYK2/CAKbeta) and pp125(FAK) by glutamate and depolarization in rat hippocampus. *Journal of Biological Chemistry* **271**(46):28942–28946.
369. **Garcia LJ y Jensen RT** (1999). Tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin by cholecystokinin and other neuropeptides. *Avd. Mol. Cell. Endocrinol.* **3**:119–153.
370. **Carpenter G** (1987). Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu. Rev. Biochem.* **56:881-914**:881–914.
371. **Hardie DG** (1991). Cell surface receptors. Signal transduction, en *Biochemical messengers: hormones, neurotransmitters and growth factors* (Hardie DG, eds.) pp. 147–187. Chapman & Hall, London.
372. **Podolsky DK** (1994). Peptide growth factors in the gastrointestinal tract, en *Physiology of the Gastrointestinal Tract, vol. 2, 3ª ed.* (Johnson LR, Jacobson ED, Christensen J, Alpers DH, y Walsh JH, eds.) pp. 129–168. Raven Press, New York.

373. **Jensen RT** (1994). Receptors on pancreatic acinar cells, en *Physiology of the Gastrointestinal Tract, vol. 2, 3ª ed.* (Johnson LR, Jacobson ED, Christensen J, Alpers DH, y Walsh JH, eds.) pp. 1377–1446. Raven Press, New York.
374. **Riese DJ y Stern DF** (1998). Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* **20**:41–48.
375. **Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, y Ullrich A** (1999). Epidermal growth factors receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Cell Biol* **11**:184–189.
376. **Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchell A, y Grinpukel S** (1990). Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol* **258**(3 Pt 1):C408–C415.
377. **Logsdon CD y Williams JA** (1983). Epidermal growth factor binding and biologic effects on mouse pancreatic acini. *Gastroenterology* **85**(2):339–345.
378. **Logsdon CD** (1986). Stimulation of pancreatic acinar cell growth by CCK, epidermal growth factor, and insulin in vitro. *Am. J. Physiol* **251**(4 Pt 1):G487–G494.
379. **Korc M, Matrisian LM, Planck SR, y Magun BE** (1983). Binding of epidermal growth factor in rat pancreatic acini. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **111**(3):1066–1073.
380. **Logsdon CD y Williams JA** (1984). Intracellular Ca²⁺ and phorbol esters synergistically inhibit internalization of epidermal growth factor in pancreatic acini. *Biochemical Journal* **223**(3):893–900.
381. **Lajas AI, Pozo MJ, Salido GM, Singh J, y Pariente JA** (1996). Secretory activity and trophic effects of epidermal growth factor in the rat pancreas. *Arch. Physiol Biochem.* **104**(3):293–299.
382. **Profrock A, Schnefel S, y Schulz I** (1991). Receptors for insulin interact with Gi-proteins and for epidermal growth factor with Gi- and Gs-proteins in rat pancreatic acinar cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **175**:380–386.
383. **Profrock A, Piiper A, Eckhardt L, y Schulz I** (1991). Epidermal growth factor inhibits both cholecystokinin octapeptide-induced inositol 1,4,5-trisphosphate production and [CA²⁺]_i increase in rat pancreatic acinar cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **180**(2):900–906.
384. **Rankin S y Rozengurt E** (1994). Platelet-derived growth factor modulation of focal adhesion kinase (p125FAK) and paxillin tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Bell-shaped dose response and cross-talk with bombesin. *Journal of Biological Chemistry* **269**(1):704–710.
385. **Malarkey K, Belham CM, Paul A, Graham A, McLees A, Scott PH, y Plevin R** (1995). The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochemical Journal* **309**(Pt 2):361–375.

-
386. **Ebert M, Yokoyama M, Friess H, Kobrin MS, Buchler MW, y Korc M** (1995). Induction of platelet-derived growth factor A and B chains and over-expression of their receptors in human pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **62**(5):529–535.
387. **Dionne CA, Jaye M, y Schlessinger J** (1991). Structural diversity and binding of FGF receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **638**:161-6:161–166.
388. **Chandrasekar B y Korc M** (1991). Basic fibroblast growth factor is a calcium-mobilizing secretagogue in rat pancreatic acini. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **177**(1):166–170.
389. **Lajas AI, Pozo MJ, Salido GM, y Pariente JA** (1998). Effect of basic fibroblast growth factor on cholecystokinin-induced amylase release and intracellular calcium increase in male rat pancreatic acinar cells. *Biochem. Pharmacol.* **55**(6):903–908.
390. **Sankaran H, Iwamoto Y, Korc M, Williams JA, y Goldfine ID** (1981). Insulin action in pancreatic acini from streptozotocin-treated rats. II. Binding of ¹²⁵I-insulin to receptors. *Am. J. Physiol* **240**(1):G63–G68.
391. **Okabayashi Y, Otsuki M, Nakamura T, Koide M, Hasegawa H, Okutani T, y Kido Y** (1990). Regulatory effect of cholecystokinin on subsequent insulin binding to pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **258**(4 Pt 1):E562–E568.
392. **Bruzzone R, Trimble ER, Gjinovci A, y Renold AE** (1984). Glucose-insulin interactions on exocrine secretion from the perfused rat pancreas. *Gastroenterology* **87**(6):1305–1312.
393. **Kanno T y Saito A** (1976). The potentiating influences of insulin on pancreozymin-induced hyperpolarization and amylase release in the pancreatic acinar cell. *J. Physiol (Lond)* **261**(3):505–521.
394. **Saito A, Williams JA, y Kanno T** (1980). Potentiation of cholecystokinin-induced exocrine secretion by both exogenous and endogenous insulin in isolated and perfused rat pancreata. *J. Clin. Invest* **65**(4):777–782.
395. **Singh J** (1985). Mechanism of action of insulin on acetylcholine-evoked amylase secretion in the mouse pancreas. *J. Physiol (Lond)* **358**:469-82:469–482.
396. **Juma LM, Singh J, Pallot DJ, Salido GM, y Adeghate E** (1997). Interactions of islet hormones with acetylcholine in the isolated rat pancreas. *Peptides* **18**(9):1415–1422.
397. **Williams JA, Sankaran H, Korc M, y Goldfine ID** (1981). Receptors for cholecystokinin and insulin in isolated pancreatic acini: hormonal control of secretion and metabolism. *Fed. Proc.* **40**(10):2497–2502.
398. **Feller SM, Posern G, Voss J, Kardinal C, Sakkab D, Zheng J, y Knudsen BS** (1998). Physiological signals and oncogenesis mediated through Crk family adapter proteins. *J. Cell Physiol* **177**(4):535–552.

399. **Baldin V** (2000). 14-3-3 proteins and growth control. *Prog. Cell Cycle Res.* **4:49-60**:49–60.
400. **Vihinen M y Smith CI** (1998). Interactions between SH2 and SH3 domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **242(2)**:351–356.
401. **White MF** (1994). The IRS-1 signaling system. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**:47–54.
402. **Lemmon MA, Falasca M, Ferguson KM, y Schlessinger J** (1997). Regulatory recruitment of signalling molecules to the cell membrane by pleckstrin homology domains. *Trends Cell Biol.* **7**:237–242.
403. **Sudol M, Chen HI, Bougeret C, Einbond A, y Bork P** (1995). Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Letters* **369(1)**:67–71.
404. **Sudol M** (1996). Structure and function of the WW domain. *Prog. Biophys. Mol. Biol* **65(1-2)**:113–132.
405. **Einbond A y Sudol M** (1996). Towards prediction of cognate complexes between the WW domain and proline-rich ligands. *FEBS Letters* **384(1)**:1–8.
406. **Sudol M** (1996). The WW module competes with the SH3 domain? *Trends Biochem. Sci.* **21**:161–163.
407. **Cowburn D** (1997). Peptide recognition by PTB and PDZ domains. *Curr. Opin. Struct. Biol* **7(6)**:835–838.
408. **Hata Y, Nakanishi H, y Takai Y** (1998). Synaptic PDZ domain-containing proteins. *Neurosci. Res.* **32(1)**:1–7.
409. **Kornau HC, Seeburg PH, y Kennedy MB** (1997). Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7(3)**:368–373.
410. **Bonfini L, Migliaccio E, Pelicci G, Lanfrancone L, y Pelicci PG** (1996). Not all Shc's roads lead to Ras. *Trends Biochem. Sci.* **21(7)**:257–261.
411. **Buday L** (1999). Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1422(2)**:187–204.
412. **Osada S, Kao AW, Ceresa BP, Blaikie P, Margolis B, y Pessin JE** (1997). The 66-kDa Shc isoform is a negative regulator of the epidermal growth factor-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry* **272**:28042–28049.
413. **Migliaccio E, Mele S, Salcini AE, Pelicci G, Lai KM, Superti-Furga G, Pawson T, DiFiore PP, Lanfranco L, y Pelicci PG** (1997). Opposite effects of p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *EMBO J.* **16**:706–716.
414. **Li S, Janosch P, Tanji M, Rosenfeld GC, Waymire JC, Mischak H, Kolch W, y Sedivy JM** (1995). Regulation of Raf-1 kinase activity by the 14-3-3 family of proteins. *EMBO J.* **14(4)**:685–696.

415. **Michaud NR, Fabian JR, Mathes KD, y Morrison DK** (1995). 14-3-3 is not essential for Raf-1 function: identification of Raf-1 proteins that are biologically activated in a 14-3-3- and Ras-independent manner. *Mol. Cell Biol.* **15**(6):3390–3397.
416. **Suen KL, Bustelo XR, y Barbacid M** (1995). Lack of evidence for the activation of the Ras/Raf mitogenic pathway by 14-3-3 proteins in mammalian cells. *Oncogene* **11**(5):825–831.
417. **Feng GS, Ouyang YB, Hu DP, Shi ZQ, Gentz R, y Ni J** (1996). Grap is a novel SH3-SH2-SH3 adaptor protein that couples tyrosine kinases to the Ras pathway. *Journal of Biological Chemistry* **271**(21):12129–12132.
418. **Garrington TP y Johnson GL** (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:211–218.
419. **Raitano AB, Whang YE, y Sawyers CL** (1997). Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1333**(3):F201–F216.
420. **Vanhaesebroeck B, Leervers SJ, Panayotou G, y Waterfield MD** (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* **22**:267–272.
421. **Duronio V, Scheid MP, y Ettinger SL** (1998). Downstream signalling events regulated by phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Cell Signal.* **10**(4):233–239.
422. **Leervers SJ, Vanhaesebroeck B, y Waterfield MD** (1999). Signalling through phosphoinositide 3-kinase: the lipids take the central stage. *Curr. Opin. Cell Biol* **11**:219–225.
423. **Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, y Nurnberg B** (1995). Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* **269**(5224):690–693.
424. **McIlroy J, Chen D, Wjasow C, Michaeli T, y Backer JM** (1997). Specific activation of p85-p110 phosphatidylinositol 3'-kinase stimulates DNA synthesis by ras- and p70 S6 kinase-dependent pathways. *Mol. Cell Biol* **17**(1):248–255.
425. **Rodriguez-Viciana P, Marte BM, Warne PH, y Downward J** (1996). Phosphatidylinositol 3' kinase: one of the effectors of Ras. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol Sci.* **351**(1336):225–231.
426. **Hawes BE, Luttrell LM, van Biesen T, y Lefkowitz RJ** (1996). Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* **271**(21):12133–12136.
427. **Bos JL** (1995). A target for phosphoinositide 3-kinase: Akt/PKB. *Trends Biochem. Sci.* **20**(11):441–442.

428. **Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamp NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, y Hemmings BA** (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *Journal of Biological Chemistry* **272**:31515–31524.
429. **Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR, y Hawkins PT** (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr. Biol* **8**:684–691.
430. **Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, y Thomas G** (1998). Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* **279**:707–710.
431. **Ettinger SL, Lauener RW, y Duronio V** (1996). Protein kinase C delta specifically associates with phosphatidylinositol 3-kinase following cytokine stimulation. *Journal of Biological Chemistry* **271**(24):14514–14518.
432. **Tsunoda Y, Yoshida H, Africa L, Steil GJ, y Owyang C** (1996). Src kinase pathways in extracellular Ca(2+)-dependent pancreatic enzyme secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **227**(3):876–884.
433. **Macara IG, Lounsbury KM, Richards SA, McKiernan C, y Bar-Sagi D** (1996). The Ras superfamily of GTPases. *FASEB J.* **10**(5):625–630.
434. **Aspenström P** (1999). Effectors for the Rho GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:95–102.
435. **Symons M** (1997). Rho family GTPases. *Insights* **3**(1):3–5.
436. **Barbacid M** (1987). ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**:779–827:779–827.
437. **Mccormick F** (1995). Ras-related proteins in signal transduction and growth control. *Mol. Reprod. Dev.* **42**(4):500–506.
438. **Cox AD, Hisaka MM, Buss JE, y Der CJ** (1992). Specific isoprenoid modification is required for function of normal, but not oncogenic, Ras protein. *Mol. Cell Biol* **12**(6):2606–2615.
439. **Lowy DR y Willumsen BM** (1993). Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:851–91:851–891.
440. **Pai EF, Krenzel U, Petsko GA, Goody RS, Kabsch W, y Wittinghofer A** (1990). Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* **9**(8):2351–2359.
441. **Zhang K, Noda M, Vass WC, Papageorge AG, y Lowy DR** (1990). Identification of small clusters of divergent amino acids that mediate the opposing effects of ras and Krev-1. *Science* **249**(4965):162–165.
442. **Nur EKM, Sizeland A, D'Abaco G, y Maruta H** (1992). Asparagine 26, glutamic acid 31, valine 45, and tyrosine 64 of Ras proteins are required for their oncogenicity. *J. Biol. Chem.* **267**(3):1415–1418.

-
443. **Goldfarb M, Shimizu K, Perucho M, y Wigler M** (1982). Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* **296**(5856):404–409.
444. **Bos JL** (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**(17):4682–4689.
445. **Gawler DJ** (1998). Points of convergence between Ca²⁺ and Ras signalling pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1448**:171–182.
446. **Boguski MS y McCormick F** (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**(6456):643–654.
447. **Chardin P, Camonis JH, Gale NW, van Aelst L, Schlessinger J, Wigler MH, y Bar-Sagi D** (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* **260**(5112):1338–1343.
448. **Bowtell D, Fu P, Simon M, y Senior P** (1992). Identification of murine homologues of the Drosophila son of sevenless gene: potential activators of ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**(14):6511–6515.
449. **Shou C, Farnsworth CL, Neel BG, y Feig LA** (1992). Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21. *Nature* **358**(6384):351–354.
450. **Cen H, Papageorge AG, Zippel R, Lowy DR, y Zhang K** (1992). Isolation of multiple mouse cDNAs with coding homology to Saccharomyces cerevisiae CDC25: identification of a region related to Bcr, Vav, Dbl and CDC24. *EMBO J.* **11**(11):4007–4015.
451. **Fam NP, Fan WT, Wang Z, Zhang LJ, Chen H, y Moran MF** (1997). Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras. *Mol. Cell Biol* **17**(3):1396–1406.
452. **Tanaka S, Morishita T, Hashimoto Y, Hattori S, Nakamura S, Shibuya M, Matuoka K, Takenawa T, Kurata T, Nagashima K, y Matsuda M** (1994). C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**(8):3443–3447.
453. **Okada S y Pessin JE** (1996). Interactions between Src homology (SH) 2/SH3 adapter proteins and the guanylnucleotide exchange factor SOS are differentially regulated by insulin and epidermal growth factor. *J. Biol Chem.* **271**(41):25533–25538.
454. **Byrne JL, Paterson HF, y Marshall CJ** (1996). p21Ras activation by the guanine nucleotide exchange factor Sos, requires the Sos/Grb2 interaction and a second ligand-dependent signal involving the Sos N-terminus. *Oncogene* **13**(10):2055–2065.
455. **Porfiri E y McCormick F** (1996). Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by phosphorylation of the ras exchange factor hSOS1. *J. Biol Chem.* **271**(10):5871–5877.

456. **Shou C, Wurmser A, Suen KL, Barbacid M, Feig LA, y Ling K** (1995). Differential response of the Ras exchange factor, Ras-GRF to tyrosine kinase and G protein mediated signals. *Oncogene* **10**(10):1887–1893.
457. **Sturani E, Abbondio A, Branduardi P, Ferrari C, Zippel R, Martegani E, Vanoni M, y Denis-Donini S** (1997). The Ras Guanine nucleotide Exchange Factor CDC25Mm is present at the synaptic junction. *Exp. Cell Res.* **235**(1):117–123.
458. **Buchsbaum R, Telliez JB, Goonesekera S, y Feig LA** (1996). The N-terminal pleckstrin, coiled-coil, and IQ domains of the exchange factor Ras-GRF act cooperatively to facilitate activation by calcium. *Mol. Cell Biol* **16**(9):4888–4896.
459. **Pronk GJ y Bos JL** (1994). The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochim. Biophys. Acta* **1198**(2-3):131–147.
460. **Gawler DJ, Zhang LJ, Reedijk M, Tung PS, y Moran MF** (1995). CaLB: a 43 amino acid calcium-dependent membrane/phospholipid binding domain in p120 Ras GTPase-activating protein. *Oncogene* **10**(5):817–825.
461. **Chen HJ, Rojas-Soto M, Oguni A, y Kennedy MB** (1998). A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* **20**(5):895–904.
462. **Hall A** (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* **249**(4969):635–640.
463. **Leevers SJ, Paterson HF, y Marshall CJ** (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**(6479):411–414.
464. **Stokoe D, Macdonald SG, Cadwallader K, Symons M, y Hancock JF** (1994). Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* **264**(5164):1463–1467.
465. **Symons M** (1996). Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. *Trends Biochem. Sci.* **21**(5):178–181.
466. **Takai Y, Sasaki T, Tanaka K, y Nakanishi H** (1995). Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.* **20**(6):227–231.
467. **Hart MJ, Sharma S, elMasry N, Qiu RG, McCabe P, Polakis P, y Bollag G** (1996). Identification of a novel guanine nucleotide exchange factor for the Rho GTPase. *Journal of Biological Chemistry* **271**(41):25452–25458.
468. **Oloffson B** (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal.* **11**(8):545–554.
469. **Kaibuchi K, Kuroda S, Fukata M, y Nakagawa H** (1999). Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTP-ases. *Curr. Opin. Cell Biol* **11**:591–596.
470. **Tapon N y Hall A** (1997). Roc, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:86–92.

-
471. **Defilippi P, Venturino M, Gulino D, Duperray A, Boquet P, Fiorentini C, Volpe G, Palmieri M, Silengo L, y Tarone G** (1997). Dissection of pathways implicated in integrin-mediated actin cytoskeleton assembly. Involvement of protein kinase C, Rho GTPase, and tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **272**(35):21726–21734.
472. **Olson MF, Ashworth A, y Hall A** (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**(5228):1270–1272.
473. **Coso OA, Chiariello M, Kalinec G, Kyriakis JM, Woodgett J, y Gutkind JS** (1995). Transforming G protein-coupled receptors potently activate JNK (SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* **270**(10):5620–5624.
474. **Gutkind JS, Crespo P, Xu N, Teramoto H, y Coso OA** (1997). The pathway connecting m2 receptors to the nucleus involves small GTP-binding proteins acting on divergent MAP kinase cascades. *Life Sci.* **60**(13-14):999–1006.
475. **Watanabe G, Saito Y, Madaule P, Ishizaki T, Fujisawa K, Morii N, Mukai H, Ono Y, Kakizuka A, y Narumiya S** (1996). Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein raphilin as targets of small GTPase Rho. *Science* **271**(5249):645–648.
476. **Barry ST y Critchley DR** (1994). The RhoA-dependent assembly of focal adhesions in Swiss 3T3 cells is associated with increased tyrosine phosphorylation and the recruitment of both pp125FAK and protein kinase C-delta to focal adhesions. *J. Cell Sci.* **107**(Pt 7):2033–2045.
477. **Garcia LJ, Rosado JA, Gonzalez A, y Jensen RT** (1997). Cholecystokinin-stimulated tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin is mediated by phospholipase C-dependent and -independent mechanisms and requires the integrity of the actin cytoskeleton and participation of p21rho. *Biochemical Journal* **327**(Pt 2):461–472.
478. **Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, y Karin M** (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* **7**(11):2135–2148.
479. **Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, y Woodgett JR** (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**(6476):156–160.
480. **Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, Troppmair J, y Rapp UR** (1994). The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem. Sci.* **19**(11):474–480.
481. **Morrison DK** (1995). Mechanisms regulating Raf-1 activity in signal transduction pathways. *Mol. Reprod. Dev.* **42**(4):507–514.
482. **Bogoyevitch MA, Marshall CJ, y Sugden PH** (1995). Hypertrophic agonists stimulate the activities of the protein kinases c-Raf and A-Raf in cultured ventricular myocytes. *Journal of Biological Chemistry* **270**(44):26303–26310.

483. **Wixler V, Smola U, Schuler M, y Rapp U** (1996). Differential regulation of Raf isozymes by growth versus differentiation inducing factors in PC12 pheochromocytoma cells. *FEBS Letters* **385**(3):131–137.
484. **Pritchard CA, Samuels ML, Bosch E, y McMahon M** (1995). Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* **15**(11):6430–6442.
485. **Wu X, Noh SJ, Zhou G, Dixon JE, y Guan KL** (1996). Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**(6):3265–3271.
486. **Lenormand P, McMahon M, y Pouyssegur J** (1996). Oncogenic Raf-1 activates p70 S6 kinase via a mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *Journal of Biological Chemistry* **271**(26):15762–15768.
487. **Lange-Carter CA, Pleiman CM, Gardner AM, Blumer KJ, y Johnson GL** (1993). A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* **260**(5106):315–319.
488. **Blank JL, Gerwins P, Elliott EM, Sather S, y Johnson GL** (1996). Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathways involving mitogen-activated protein kinase and c-Jun kinase. *Journal of Biological Chemistry* **271**(10):5361–5368.
489. **Yan M y Templeton DJ** (1994). Identification of 2 serine residues of MEK-1 that are differentially phosphorylated during activation by raf and MEK kinase. *J. Biol Chem.* **269**(29):19067–19073.
490. **Minden A, Lin A, McMahon M, Lange-Carter C, Derijard B, Davis RJ, Johnson GL, y Karin M** (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* **266**(5191):1719–1723.
491. **Ghosh S, Strum JC, Sciorra VA, Daniel L, y Bell RM** (1996). Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**(14):8472–8480.
492. **Burgering BM y Bos JL** (1995). Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biochem. Sci.* **20**(1):18–22.
493. **Avruch J, Zhang XF, y Kyriakis JM** (1994). Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem. Sci.* **19**(7):279–283.
494. **Ghosh S, Xie WQ, Quest AF, Mabrouk GM, Strum JC, y Bell RM** (1994). The cysteine-rich region of raf-1 kinase contains zinc, translocates to liposomes, and is adjacent to a segment that binds GTP-ras. *Journal of Biological Chemistry* **269**(13):10000–10007.

-
495. **Jelinek T, Dent P, Sturgill TW, y Weber MJ** (1996). Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* **16**(3):1027–1034.
496. **Dent P, Reardon DB, Morrison DK, y Sturgill TW** (1995). Regulation of Raf-1 and Raf-1 mutants by Ras-dependent and Ras-independent mechanisms in vitro. *Mol. Cell Biol.* **15**(8):4125–4135.
497. **Cleghon V y Morrison DK** (1994). Raf-1 interacts with Fyn and Src in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* **269** (26):17749–17755.
498. **Dent P, Reardon DB, Wood SL, Lindorfer MA, Graber SG, Garrison JC, Brautigam DL, y Sturgill TW** (1996). Inactivation of raf-1 by a protein-tyrosine phosphatase stimulated by GTP and reconstituted by Galphai/o subunits. *Journal of Biological Chemistry* **271**(6):3119–3123.
499. **Morrison DK, Heidecker G, Rapp UR, y Copeland TD** (1993). Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *Journal of Biological Chemistry* **268**(23):17309–17316.
500. **Dent P, Jelinek T, Morrison DK, Weber MJ, y Sturgill TW** (1995). Reversal of Raf-1 activation by purified and membrane-associated protein phosphatases. *Science* **268**(5219):1902–1906.
501. **Chen N, Ma W, Huang C, y Dong Z** (1999). Translocation of protein kinase Cepsilon and protein kinase Cdelta to membrane is required for ultraviolet B-induced activation of mitogen-activated protein kinases and apoptosis. *J. Biol Chem.* **274**(22):15389–15394.
502. **Ueda Y, Hirai S, Osada S, Suzuki A, Mizuno K, y Ohno S** (1996). Protein kinase C delta activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *Journal of Biological Chemistry* **271**(38):23512–23519.
503. **Yamaguchi K, Ogita K, Nakamura S, y Nishizuka Y** (1995). The protein kinase C isoforms leading to MAP-kinase activation in CHO cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **210**(3):639–647.
504. **Marquardt B, Frith D, y Stabel S** (1994). Signalling from TPA to MAP kinase requires protein kinase C, raf and MEK: reconstitution of the signalling pathway in vitro. *Oncogene* **9**(11):3213–3218.
505. **Marx J** (1993). Two major signal pathways linked. *Science* **262**(5136):988, 990–
506. **Peraldi P, Frodin M, Barnier JV, Calleja V, Scimeca JC, Filloux C, Calothy G, y Van Obberghen E** (1995). Regulation of the MAP kinase cascade in PC12 cells: B-Raf activates MEK-1 (MAP kinase or ERK kinase) and is inhibited by cAMP. *FEBS Letters* **357**(3):290–296.
507. **Catling AD, Schaeffer HJ, Reuter CW, Reddy GR, y Weber MJ** (1995). A proline-rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for raf binding and regulates MEK function. *Mol. Cell Biol.* **15**(10):5214–5225.

508. **Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, y Cowley S** (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J.* **13**(7):1610–1619.
509. **Pages G, Brunet A, L'Allemain G, y Pouyssegur J** (1994). Constitutive mutant and putative regulatory serine phosphorylation site of mammalian MAP kinase kinase (MEK1). *EMBO J.* **13**(13):3003–3010.
510. **Zheng CF y Guan KL** (1994). Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J.* **13**(5):1123–1131.
511. **Haystead TA, Dent P, Wu J, Haystead CM, y Sturgill TW** (1992). Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Letters* **306**(1):17–22.
512. **Cheng M, Boulton TG, y Cobb MH** (1996). ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **271**(15):8951–8958.
513. **Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, y Yancopoulos GD** (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**(4):663–675.
514. **Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, y Cobb MH** (1990). An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* **249**(4964):64–67.
515. **Marais R, Wynne J, y Treisman R** (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* **73**(2):381–393.
516. **Wadman IA, Hsu HL, Cobb MH, y Baer R** (1994). The MAP kinase phosphorylation site of TAL1 occurs within a transcriptional activation domain. *Oncogene* **9**(12):3713–3716.
517. **Dubois MF, Nguyen VT, Dahmus ME, Pages G, Pouyssegur J, y Bensaude O** (1994). Enhanced phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II upon serum stimulation of quiescent cells: possible involvement of MAP kinases. *EMBO J.* **13**(20):4787–4797.
518. **Traverse S, Gomez N, Paterson H, Marshall C, y Cohen P** (1992). Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochemical Journal* **288**(Pt 2):351–355.
519. **Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Jr., y Sonenberg N** (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* **371**(6500):762–767.

-
520. **Sturgill TW, Ray LB, Erikson E, y Maller JL** (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* **334**(6184):715–718.
521. **Peraldi P, Zhao Z, Filloux C, Fischer EH, y Van Obberghen E** (1994). Protein-tyrosine-phosphatase 2C is phosphorylated and inhibited by 44-kDa mitogen-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**(11):5002–5006.
522. **Halloran SM y Vulliet PR** (1994). Microtubule-associated protein kinase-2 phosphorylates and activates tyrosine hydroxylase following depolarization of bovine adrenal chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry* **269** (49):30960–30965.
523. **Erickson AK, Payne DM, Martino PA, Rossomando AJ, Shabanowitz J, Weber MJ, Hunt DF, y Sturgill TW** (1990). Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **265**(32):19728–19735.
524. **Ray LB y Sturgill TW** (1987). Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**(6):1502–1506.
525. **Anderson NG, Li P, Marsden LA, Williams N, Roberts TM, y Sturgill TW** (1991). Raf-1 is a potential substrate for mitogen-activated protein kinase in vivo. *Biochemical Journal* **277**(Pt 2):573–576.
526. **Saito Y, Gomez N, Campbell DG, Ashworth A, Marshall CJ, y Cohen P** (1994). The threonine residues in MAP kinase kinase 1 phosphorylated by MAP kinase in vitro are also phosphorylated in nerve growth factor-stimulated rat pheochromocytoma (PC12) cells. *FEBS Letters* **341**(1):119–124.
527. **Brunet A, Pages G, y Pouyssegur J** (1994). Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS Letters* **346**(2-3):299–303.
528. **Buday L, Warne PH, y Downward J** (1995). Downregulation of the Ras activation pathway by MAP kinase phosphorylation of Sos. *Oncogene* **11**(7):1327–1331.
529. **Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, y Matsumoto K** (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* **270**(5244):2008–2011.
530. **Moriguchi T, Kuroyanagi N, Yamaguchi K, Gotoh Y, Irie K, Kano T, Shirakabe K, Muro Y, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E, y Hagiwara M** (1996). A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase 6 and MKK3. *J. Biol. Chem.* **271**(23):13675–13679.

531. **Coso OA, Teramoto H, Simonds WF, y Gutkind JS** (1996). Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway. *J. Biol Chem.* **271**(8):3963–3966.
532. **Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, y Karin M** (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**(7):1147–1157.
533. **Bagrodia S, Derijard B, Davis RJ, y Cerione RA** (1995). Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol Chem.* **270**(47):27995–27998.
534. **Zhang S, Han J, Sells MA, Chernoff J, Knaus UG, Ulevitch RJ, y Bokoch GM** (1995). Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J. Biol Chem.* **270**(41):23934–23936.
535. **Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, y Gutkind JS** (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**(7):1137–1146.
536. **Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, y Hall A** (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**(3):401–410.
537. **Qiu RG, Chen J, Kirn D, McCormick F, y Symons M** (1995). An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* **374**(6521):457–459.
538. **Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao ZS, y Lim L** (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* **367**(6458):40–46.
539. **Bagrodia S, Taylor SJ, Creasy CL, Chernoff J, y Cerione RA** (1995). Identification of a mouse p21Cdc42/Rac activated kinase. *J. Biol Chem.* **270**(39):22731–22737.
540. **Frost JA, Xu S, Hutchison MR, Marcus S, y Cobb MH** (1996). Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Mol. Cell Biol* **16**(7):3707–3713.
541. **Davis RJ** (1994). MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* **19**(11):470–473.
542. **Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, y Davis RJ** (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol Chem.* **270**(13):7420–7426.
543. **Doza YN, Cuenda A, Thomas GM, Cohen P, y Nebreda AR** (1995). Activation of the MAP kinase homologue RK requires the phosphorylation of Thr-180 and Tyr-182 and both residues are phosphorylated in chemically stressed KB cells. *FEBS Letters* **364**(2):223–228.

-
544. **Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, Kyriakis JM, y Zon LI** (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* **372**(6508):794–798.
545. **Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, y Davis RJ** (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**(5198):682–685.
546. **Lin A, Minden A, Martinetto H, Claret FX, Lange-Carter C, Mercurio F, Johnson GL, y Karin M** (1995). Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* **268**(5208):286–290.
547. **Matsuda S, Kawasaki H, Moriguchi T, Gotoh Y, y Nishida E** (1995). Activation of protein kinase cascades by osmotic shock. *J. Biol Chem.* **270**(21):12781–12786.
548. **Meier R, Rouse J, Cuenda A, Nebreda AR, y Cohen P** (1996). Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated-protein kinase kinase homologues in PC12 and KB cells. *Eur. J. Biochem.* **236**(3):796–805.
549. **Moriguchi T, Kawasaki H, Matsuda S, Gotoh Y, y Nishida E** (1995). Evidence for multiple activators for stress-activated protein kinase/c-Jun amino-terminal kinases. Existence of novel activators. *J. Biol Chem.* **270**(22):12969–12972.
550. **Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, y Davis RJ** (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell Biol* **16**(3):1247–1255.
551. **Han J, Lee JD, Jiang Y, Li Z, Feng L, y Ulevitch RJ** (1996). Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J. Biol Chem.* **271**(6):2886–2891.
552. **Stein B, Brady H, Yang MX, Young DB, y Barbosa MS** (1996). Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase kinase cascade. *J. Biol Chem.* **271**(19):11427–11433.
553. **Ip YT y Davis RJ** (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol* **10**:205–219.
554. **Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, y Pouyssegur J** (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J. Biol Chem.* **271**(34):20608–20616.
555. **Reszka AA, Seger R, Diltz CD, Krebs EG, y Fischer EH** (1995). Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**(19):8881–8885.

556. **Lu Q, Paredes M, Zhang J, y Kosik KS** (1998). Basal extracellular signal-regulated kinase activity modulates cell-cell and cell-matrix interactions. *Mol. Cell Biol* **18**(6):3257–3265.
557. **Sakata N, Patel HR, Terada N, Aruffo A, Johnson GL, y Gelfand EW** (1995). Selective activation of c-Jun kinase mitogen-activated protein kinase by CD40 on human B cells. *J. Biol Chem.* **270**(51):30823–30828.
558. **Westwick JK, Weitzel C, Leffert HL, y Brenner DA** (1995). Activation of Jun kinase is an early event in hepatic regeneration. *J. Clin. Invest* **95** (2):803–810.
559. **Hsueh YP y Lai MZ** (1995). c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase is sensitive to cAMP inhibition in T lymphocytes. *J. Biol Chem.* **270**(30):18094–18098.
560. **Heidenreich KA y Kummer JL** (1996). Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase by insulin in cultured fetal neurons. *J. Biol Chem.* **271**(17):9891–9894.
561. **Oka H, Chatani Y, Hoshino R, Ogawa O, Kakehi Y, Terachi T, Okada Y, Kawaichi M, Kohno M, y Yoshida O** (1995). Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **55**(18):4182–4187.
562. **Bansal A, Ramirez RD, y Minna JD** (1997). Mutation analysis of the coding sequences of MEK-1 and MEK-2 genes in human lung cancer cell lines. *Oncogene* **14**(10):1231–1234.
563. **Xu X, Heidenreich O, Kitajima I, McGuire K, Li Q, Su B, y Nerenberg M** (1996). Constitutively activated JNK is associated with HTLV-1 mediated tumorigenesis. *Oncogene* **13**(1):135–142.
564. **Franklin CC y Kraft AS** (1995). Constitutively active MAP kinase kinase (MEK1) stimulates SAP kinase and c-Jun transcriptional activity in U937 human leukemic cells. *Oncogene* **11**(11):2365–2374.
565. **Virdee K y Tolkovsky AM** (1995). Activation of p44 and p42 MAP kinases is not essential for the survival of rat sympathetic neurons. *Eur. J. Neurosci.* **7**(10):2159–2169.
566. **Sano M, Kohno M, y Iwanaga M** (1995). The activation and nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinases (ERK-1 and -2) appear not to be required for elongation of neurites in PC12D cells. *Brain Res.* **688**(1-2):213–218.
567. **Creedon DJ, Johnson EM, y Lawrence JC** (1996). Mitogen-activated protein kinase-independent pathways mediate the effects of nerve growth factor and cAMP on neuronal survival. *J. Biol Chem.* **271**(34):20713–20718.
568. **English JD y Sweatt JD** (1996). Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. *J. Biol Chem.* **271**(40):24329–24332.

-
569. **Lechner C, Zahalka MA, Giot JF, Moller NP, y Ullrich A** (1996). ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**(9):4355–4359.
570. **Heasley LE, Storey B, Fanger GR, Butterfield L, Zamarripa J, Blumberg D, y Maue RA** (1996). GTPase-deficient G alpha 16 and G alpha q induce PC12 cell differentiation and persistent activation of cJun NH2-terminal kinases. *Mol. Cell Biol* **16**(2):648–656.
571. **Kharbanda S, Pandey P, Ren R, Mayer B, Zon L, y Kufe D** (1995). c-Abl activation regulates induction of the SEK1/stress-activated protein kinase pathway in the cellular response to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *J. Biol Chem.* **270**(51):30278–30281.
572. **Pandey P, Raingeaud J, Kaneki M, Weichselbaum R, Davis RJ, Kufe D, y Kharbanda S** (1996). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by c-Abl-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol Chem.* **271**(39):23775–23779.
573. **Wang XZ y Ron D** (1996). Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* **272** (5266):1347–1349.
574. **Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, y Greenberg ME** (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**(5240):1326–1331.
575. **Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, y Karin M** (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* **87**(3):565–576.
576. **Gardner AM y Johnson GL** (1996). Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol Chem.* **271**(24):14560–14566.
577. **Su B, Jacinto E, Hibi M, Kallunki T, Karin M, y Ben Neriah Y** (1994). JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* **77**(5):727–736.
578. **Enslin H, Tokumitsu H, Stork PJ, Davis RJ, y Soderling TR** (1996). Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**(20):10803–10808.
579. **Grammer AC, Swantek JL, McFarland RD, Miura Y, Geppert T, y Lipsky PE** (1998). TNF receptor-associated factor-3 signaling mediates activation of p38 and Jun N-terminal kinase, cytokine secretion, and Ig production following ligation of CD40 on human B cells. *J. Immunol.* **161**(3):1183–1193.

580. **Swantek JL, Cobb MH, y Geppert TD** (1997). Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol. Cell Biol* **17**(11):6274–6282.
581. **Frodin M, Sekine N, Roche E, Filloux C, Prentki M, Wollheim CB, y Van Obberghen E** (1995). Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *J. Biol Chem.* **270**(14):7882–7889.
582. **Reuter CW, Catling AD, Jelinek T, y Weber MJ** (1995). Biochemical analysis of MEK activation in NIH3T3 fibroblasts. Identification of B-Raf and other activators. *Journal of Biological Chemistry* **270**(13):7644–7655.
583. **Rossomando AJ, Dent P, Sturgill TW, y Marshak DR** (1994). Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is negatively regulated by threonine phosphorylation. *Mol. Cell Biol* **14**(3):1594–1602.
584. **Bokemeyer D, Sorokin A, Yan M, Ahn NG, Templeton DJ, y Dunn MJ** (1996). Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by the stress-activated protein kinase signaling pathway but not by extracellular signal-regulated kinase in fibroblasts. *J. Biol Chem.* **271**(2):639–642.
585. **Kramer RM, Roberts EF, Um SL, Borsch-Haubold AG, Watson SP, Fisher MJ, y Jakubowski JA** (1996). p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J. Biol Chem.* **271**(44):27723–27729.
586. **Graves LM, Bornfeldt KE, Sidhu JS, Argast GM, Raines EW, Ross R, Leslie CC, y Krebs EG** (1996). Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase A through a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human arterial smooth muscle cells. *J. Biol Chem.* **271**(1):505–511.
587. **Ludwig S, Engel K, Hoffmeyer A, Sithanandam G, Neufeld B, Palm D, Gaestel M, y Rapp UR** (1996). 3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways. *Mol. Cell Biol* **16**(12):6687–6697.
588. **Cohen P y Cohen PT** (1989). Protein phosphatases come of age. *Journal of Biological Chemistry* **264**(36):21435–21438.
589. **Neel BG y Tonks NK** (1997). Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol* **9**:193–204.
590. **Keyse SM** (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:186–192.
591. **Bialojan C y Takai A** (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochemical Journal* **256**(1):283–290.

-
592. **Burnham DB** (1985). Characterization of Ca²⁺-activated protein phosphatase activity in exocrine pancreas. *Biochemical Journal* **231**(2):335–341.
593. **Wagner AC, Schafer C, y Williams JA** (1992). Effects of calyculin A on amylase release in streptolysin-O permeabilized acinar cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **189**(3):1606–1612.
594. **Toivola DM, Goldman RD, Garrod DR, y Eriksson JE** (1997). Protein phosphatases maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments. *J. Cell Sci.* **110**(Pt 1):23–33.
595. **Jena BP, Padfield PJ, Ingebritsen TS, y Jamieson JD** (1991). Protein tyrosine phosphatase stimulates Ca(2+)-dependent amylase secretion from pancreatic acini. *Journal of Biological Chemistry* **266**(27):17744–17746.
596. **Shifrin VI, Davis RJ, y Neel BG** (1997). Phosphorylation of protein tyrosine phosphatase PTP-1B on identical sites suggests activation of a common signalling pathway during mitosis and stress response in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* **272**:2957–2962.
597. **Heldin CH** (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80**(2):213–223.
598. **Margolis BL, Lax I, Kris R, Dombalagian M, Honegger AM, Howk R, Givol D, Ullrich A, y Schlessinger J** (1989). All autophosphorylation sites of epidermal growth factor (EGF) receptor and HER2/neu are located in their carboxyl-terminal tails. Identification of a novel site in EGF receptor. *Journal of Biological Chemistry* **264**(18):10667–10671.
599. **Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, y Lechleider RJ** (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**(5):767–778.
600. **Ji QS y Carpenter G** (2000). Role of basal calcium in the EGF activation of MAP kinases. *Oncogene* **19**(14):1853–1856.
601. **Pellegrini S y Dusanter-Fourt I** (1997). The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur. J. Biochem.* **248**(3):615–633.
602. **Damsky CH y Werb Z** (1992). Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**(5):772–781.
603. **Clark EA y Brugge JS** (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**(5208):233–239.
604. **Della Rocca GJ, van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM, y Lefkowitz RJ** (1997). Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *Journal of Biological Chemistry* **272** (31):19125–19132.

605. **Strosberg AD** (1991). Structure/function relationship of proteins belonging to the family of receptors coupled to GTP-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **196**(1):1–10.
606. **Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, y Hebert SC** (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**(6455):575–580.
607. **Erickson JR, Wu JJ, Goddard JG, Tigyi G, Kawanishi K, Tomei LD, y Kiefer MC** (1998). Edg-2/Vzg-1 couples to the yeast pheromone response pathway selectively in response to lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **273**(3):1506–1510.
608. **Fukushima N, Kimura Y, y Chun J** (1998). A single receptor encoded by *vzg-1/lpA1/edg-2* couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**(11):6151–6156.
609. **Crespo P, Xu N, Simonds WF, y Gutkind JS** (1994). Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **369**(6479):418–420.
610. **Koch WJ, Hawes BE, Allen LF, y Lefkowitz RJ** (1994). Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**(26):12706–12710.
611. **Alblas J, van Corven EJ, Hordijk PL, Milligan G, y Moolenaar WH** (1993). Gi-mediated activation of the p21ras-mitogen-activated protein kinase pathway by alpha 2-adrenergic receptors expressed in fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **268**(30):22235–22238.
612. **van Corven EJ, Hordijk PL, Medema RH, Bos JL, y Moolenaar WH** (1993). Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**(4):1257–1261.
613. **Winitz S, Russell M, Qian NX, Gardner A, Dwyer L, y Johnson GL** (1993). Involvement of Ras and Raf in the Gi-coupled acetylcholine muscarinic m2 receptor activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase and MAP kinase. *Journal of Biological Chemistry* **268**(26):19196–19199.
614. **van Biesen T, Hawes BE, Luttrell DK, Krueger KM, Touhara K, Porfiri E, Sakaue M, Luttrell LM, y Lefkowitz RJ** (1995). Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* **376**(6543):781–784.
615. **Cazaubon SM, Ramos-Morales F, Fischer S, Schweighoffer F, Strosberg AD, y Couraud PO** (1994). Endothelin induces tyrosine phosphorylation and GRB2 association of Shc in astrocytes. *Journal of Biological Chemistry* **269**(40):24805–24809.

-
616. **Linseman DA, Benjamin CW, y Jones DA** (1995). Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* **270**(21):12563–12568.
617. **Daub H, Weiss FU, Wallasch C, y Ullrich A** (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**(6565):557–560.
618. **Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, y Wetzker R** (1997). Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* **275**(5298):394–397.
619. **Herrlich A, Daub H, Knebel A, Herrlich P, Ullrich A, Schultz G, y Gudermann T** (1998). Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**(15):8985–8990.
620. **Sinnett-Smith J, Zachary I, Valverde AM, y Rozengurt E** (1993). Bombesin stimulation of p125 focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation. Role of protein kinase C, Ca²⁺ mobilization, and the actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry* **268**(19):14261–14268.
621. **Hordijk PL, Verlaan I, van Corven EJ, y Moolenaar WH** (1994). Protein tyrosine phosphorylation induced by lysophosphatidic acid in Rat-1 fibroblasts. Evidence that phosphorylation of map kinase is mediated by the Gi-p21ras pathway. *Journal of Biological Chemistry* **269**(1):645–651.
622. **Rodriguez-Fernandez JL y Rozengurt E** (1998). Bombesin, vasopressin, lysophosphatidic acid, and sphingosylphosphorylcholine induce focal adhesion kinase activation in intact Swiss 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* **273**(30):19321–19328.
623. **Slack BE** (1998). Tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase by activation of muscarinic m3 receptors is dependent on integrin engagement by the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**(13):7281–7286.
624. **Rodriguez-Fernandez JL y Rozengurt E** (1996). Bombesin, bradykinin, vasopressin, and phorbol esters rapidly and transiently activate Src family tyrosine kinases in Swiss 3T3 cells. Dissociation from tyrosine phosphorylation of p125 focal adhesion kinase. *Journal of Biological Chemistry* **271**(44):27895–27901.
625. **Luttrell LM, Daaka Y, Della Rocca GJ, y Lefkowitz RJ** (1997). G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases. *Journal of Biological Chemistry* **272**(50):31648–31656.
626. **Dikic I, Dikic I, y Schlessinger J** (1998). Identification of a new Pyk2 isoform implicated in chemokine and antigen receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* **273**(23):14301–14308.

627. **Freedman NJ y Lefkowitz RJ** (1996). Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog. Horm. Res.* **51**:319-51; discussion 352-3:319-351.
628. **Lefkowitz RJ** (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *Journal of Biological Chemistry* **273**(30):18677-18680.
629. **Ferguson SS, Downey WE, III, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, y Caron MG** (1996). Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **271**(5247):363-366.
630. **Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, y Benovic JL** (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**(6599):447-450.
631. **Pearse BM, Smith CJ, y Owen DJ** (2000). Clathrin coat construction in endocytosis. *Curr. Opin. Struct. Biol* **10**(2):220-228.
632. **Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, y Lefkowitz RJ** (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**(5402):655-661.
633. **Vieira AV, Lamaze C, y Schmid SL** (1996). Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* **274**(5295):2086-2089.
634. **Chow JC, Condorelli G, y Smith RJ** (1998). Insulin-like growth factor-I receptor internalization regulates signaling via the Shc/mitogen-activated protein kinase pathway, but not the insulin receptor substrate-1 pathway. *Journal of Biological Chemistry* **273**(8):4672-4680.
635. **Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Ferguson SS, Caron MG, y Lefkowitz RJ** (1998). Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **273**(2):685-688.
636. **Anderson RG** (1998). The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:199-225:199-225.
637. **Baber NS, Dourish CT, y Hill DR** (1989). The role of CCK caerulein, and CCK antagonists in nociception. *Pain* **39**(3):307-328.
638. **Harro J, Vasar E, y Bradwejn J** (1993). CCK in animal and human research on anxiety. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**(6):244-249.
639. **Moran TH y Schwartz GJ** (1994). Neurobiology of cholecystokinin. *Crit Rev. Neurobiol.* **9**(1):1-28.
640. **Owyang C** (1996). Physiological mechanisms of cholecystokinin action on pancreatic secretion. *Am. J. Physiol* **271**(1 Pt 1):G1-G7.

-
641. **Jorpes JE y Mutt V** (1969). Clinical aspects of the gastrointestinal hormones secretin and cholecystokinin. *Scand. J. Gastroenterol.* **4**(1):49–57.
642. **Solomon TE** (1994). Control of exocrine pancreatic secretion, en *Physiology of the Gastrointestinal Tract, 3ª ed.* (Johnson LR, Jacobson ED, Christensen J, Alpers DH, y Walsh JH, eds.) pp. 1499–1530. Raven Press, New York.
643. **Meyer BM, Werth BA, Beglinger C, Hildebrand P, Jansen JB, Zach D, Rovati LC, y Stalder GA** (1989). Role of cholecystokinin in regulation of gastrointestinal motor functions. *Lancet* **2**(8653):12–15.
644. **Dockray GJ** (1979). Comparative biochemistry and physiology of gut hormones. *Annu. Rev. Physiol* **41:83-95**:83–95.
645. **Marx M, Gómez G, Lonovics J, y Thompson JC** (1987). Cholecystokinin, en *Gastrointestinal endocrinology* (Thompson JC, Greeley GH, Rayford PL, y Towersend CM, eds.) pp. 213–222. McGraw-Hill, New York.
646. **Lu L y Logsdon CD** (1992). CCK, bombesin, and carbachol stimulate c-fos, c-jun, and c-myc oncogene expression in rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **263**(3 Pt 1):G327–G332.
647. **Feurle GE, Hamscher G, y Firat AE** (1995). The role of CCK and its analogues in the organogenesis of the fetal rat pancreas. *Pancreas* **10**(3):281–286.
648. **Dagorn JC, La Bella A, Lahaie RG, y Sarles H** (1984). Modifications in pancreatic enzyme proportions following secretory stimulations. *Digestion* **29**(3):152–157.
649. **Debas HT y Grossman MI** (1973). Pure cholecystokinin: pancreatic protein and bicarbonate response. *Digestion* **9**(6):469–481.
650. **Brown JC, Harper AA, y Scratcherd T** (1967). Potentiation of secretin stimulation of the pancreas. *J. Physiol (Lond)* **190**(3):519–530.
651. **Murillo A y Lopez MA** (1971). Contribution to the study of hormonal regulation of pancreatic secretin in the rabbit. *Rev. Esp. Fisiol.* **27**(2):131–138.
652. **Salido GM, Raggi L, y Madrid JA** (1986). Efectos de la secretina y colecistokinina-pancreozimina exógenas sobre la secreción pancreática exocrina en el pollo. *Avances En Ciencias Veterinarias* **1**:35–40.
653. **Sewell WA y Young JA** (1975). Secretion of electrolytes by the pancreas of the anaesthetized rat. *J. Physiol (Lond)* **252**(2):379–396.
654. **Mangos JA, McSherry NR, Nousia-Arvanitakis S, y Irwin K** (1973). Secretion and transductal fluxes of ions in exocrine glands of the mouse. *Am. J. Physiol* **225**(1):18–24.
655. **Lee PC** (1979). Effect of CCK-octapeptide and secretin on amylase secretion in isolated rat pancreatic acinar cells. *Digestion* **19**(1):6–14.

656. **Camello PJ y Salido GM** (1993). Inhibitory interactions between stimulus-secretion pathways in the exocrine rat pancreas. *Biochem. Pharmacol.* **46** (6):1005–1009.
657. **Konturek SJ, Bilski J, Tasler J, y Laskiewicz J** (1985). Gut hormones in stimulation of gastroduodenal alkaline secretion in conscious dogs. *Am. J. Physiol* **248**(6 Pt 1):G687–G691.
658. **Lankisch PG** (1980). Trophic effects of gastrointestinal hormones. *Clin. Gastroenterol.* **9**(3):773–784.
659. **Pozo MJ, Salido GM, y Madrid JA** (1990). Action of cholecystokinin on the dog sphincter of Oddi: influence of anti-cholinergic agents. *Arch. Int. Physiol Biochim.* **98**(6):353–360.
660. **Jensen RT, Wank SA, Rowley WH, Sato S, y Gardner JD** (1989). Interaction of CCK with pancreatic acinar cells. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**(10):418–423.
661. **Yu DH, Noguchi M, Zhou ZC, Villanueva ML, Gardner JD, y Jensen RT** (1987). Characterization of gastrin receptors on guinea pig pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **253**(6 Pt 1):G793–G801.
662. **Fourmy D, Zahidi A, Pradayrol L, Vayssette J, y Ribet A** (1984). Relationship of CCK/gastrin receptor binding to amylase release in dog pancreatic acini. *Regul. Pept.* **10**(1):57–68.
663. **Sankaran H, Goldfine ID, Deveney CW, Wong KY, y Williams JA** (1980). Binding of cholecystokinin to high affinity receptors on isolated rat pancreatic acini. *Journal of Biological Chemistry* **255**(5):1849–1853.
664. **Robberecht P, Deschodt-Lackman M, Morgat JL, y Christophe J** (1978). The interaction of caerulein with the rat pancreas. 3. Structural requirements for in vitro binding of caerulein-like peptides and its relationship to increased calcium outflux, adenylate cyclase activation, and secretion. *Eur. J. Biochem.* **91**(1):39–48.
665. **Huang SC, Yu DH, Wank SA, Mantey S, Gardner JD, y Jensen RT** (1989). Importance of sulfation of gastrin or cholecystokinin (CCK) on affinity for gastrin and CCK receptors. *Peptides* **10**(4):785–789.
666. **Anastasi A, Erspamer V, y Endean R** (1968). Isolation and amino acid sequence of caerulein, the active decapeptide of the skin of hyla caerulea. *Arch. Biochem. Biophys.* **125**(1):57–68.
667. **Howard JM, Knight M, Jensen RT, y Gardner JD** (1984). Discovery of a cholecystokinin analogue with partial agonist activity. *Am. J. Physiol* **247**(3 Pt 1):G261–G264.
668. **Stark HA, Sharp CM, Sutliff VE, Martinez J, Jensen RT, y Gardner JD** (1989). CCK-JMV-180: a peptide that distinguishes high-affinity cholecystokinin receptors from low-affinity cholecystokinin receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1010**(2):145–150.

-
669. **Gardner JD y Jensen RT** (1993). Receptors for secretagogues on pancreatic acinar cells, en *The exocrine pancreas: biology, pathobiology and diseases*, 2ª ed. (Go V, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber H, y Scheele GA, eds.) pp. 151–166. Raven Press, New York.
670. **Matozaki T, Goke B, Tsunoda Y, Rodriguez M, Martinez J, y Williams JA** (1990). Two functionally distinct cholecystokinin receptors show different modes of action on Ca²⁺ mobilization and phospholipid hydrolysis in isolated rat pancreatic acini. Studies using a new cholecystokinin analog, JMV-180. *Journal of Biological Chemistry* **265**(11):6247–6254.
671. **Pandol SJ y Schoeffield MS** (1986). 1,2-Diacylglycerol, protein kinase C, and pancreatic enzyme secretion. *Journal of Biological Chemistry* **261** (10):4438–4444.
672. **Wank SA, Jensen RT, y Gardner JD** (1988). Kinetics of binding of cholecystokinin to pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **255**(1 Pt 1):G106–G112.
673. **Fourmy D, Zahidi A, Fabre R, Guidet M, Pradayrol L, y Ribet A** (1987). Receptors for cholecystokinin and gastrin peptides display specific binding properties and are structurally different in guinea-pig and dog pancreas. *Eur. J. Biochem.* **165**(3):683–692.
674. **Gardner JD y Jensen RT** (1981). Physiology of pancreatic enzyme secretion in vitro, en *Physiology of the Digestive Tract* (Johnson LR, eds.) pp. 831–871. Raven Press, New York.
675. **Lambert M, Diem BN, y Christophe J** (1991). Functional and molecular characterization of CCK receptors in the rat pancreatic acinar cell line AR 4-2J. *Regul. Pept.* **32**(2):151–167.
676. **Williams JA** (1997). Pancreatic acinar cell intracellular signaling mechanism. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **13**:369–374.
677. **Rivard N, Guan D, Solomon TE, Turkelson D, Petitchrec D, y Morisset J** (1991). Negative control by sandostatin on pancreatic and duodenal growth: a possible implication of insulin-like growth factor I. *Regul. Pept.* **34**:13–23.
678. **Solomon TE, Vanier MT, y Morisset J** (1983). Cell site and time course of DNA synthesis in pancreas after caerulein and secretin. *Am. J. Physiol.* **245**:G99–G105.
679. **Pearson K, Scott D, y Torrance B** (1977). Effects of partial surgical pancreatectomy in rats. I. Pancreatic regeneration. *Gastroenterology* **72**:469–473.
680. **Pap A, Boros L, y Hajnal F** (1991). Essential role of cholecystokinin in pancreatic regeneration after 60% distal resection in rats. *Pancreas* **6**:412–418.
681. **Duan RD, Zheng CF, Guan KL, y Williams JA** (1995). Activation of MAP kinase kinase (MEK) and Ras by cholecystokinin in rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **268**(6 Pt 1):G1060–G1065.

682. **Dabrowski A, Grady T, Logsdon CD, y Williams JA** (1996). Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **271**(10):5686–5690.
683. **Ferris HA, Tapia JA, Garcia LJ, y Jensen RT** (1999). CCKA receptor activation stimulates p130(Cas) tyrosine phosphorylation, translocation, and association with Crk in rat pancreatic acinar cells. *Biochemistry* **38**(5):1497–1508.
684. **Pollo DA, Baldassare JJ, Honda T, Henderson PA, Talkad VD, y Gardner JD** (1994). Effects of cholecystokinin (CCK) and other secretagogues on isoforms of protein kinase C (PKC) in pancreatic acini. *Biochim. Biophys. Acta* **1224** (1):127–138.
685. **Taniguchi T, Takahashi K, Murayama T, Ito M, Iwata N, Chihara K, Sasaki T, Takai Y, y Matsui T** (1996). Cholecystokinin-B/gastrin receptors mediate rapid formation of actin stress fibers. *Oncogene* **12**(6):1357–1360.
686. **Seufferlein T, Withers DJ, Broad S, Herget T, Walsh JH, y Rozengurt E** (1995). The human CCKB/gastrin receptor transfected into rat1 fibroblasts mediates activation of MAP kinase, p74raf-1 kinase, and mitogenesis. *Cell Growth Differ.* **6**(4):383–393.
687. **Piiper A, Stryjek-Kaminska D, Stein J, Caspary WF, y Zeuzem S** (1994). Tyrphostins inhibit secretagogue-induced 1,4,5-IP₃ production and amylase release in pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **266**(3 Pt 1):G363–G371.
688. **Lutz MP, Sutor SL, Abraham RT, y Miller LJ** (1993). A role for cholecystokinin-stimulated protein tyrosine phosphorylation in regulated secretion by the pancreatic acinar cell. *Journal of Biological Chemistry* **268**(15):11119–11124.
689. **Cox ME, Ely CM, Catling AD, Weber MJ, y Parsons SJ** (1996). Tyrosine kinases are required for catecholamine secretion and mitogen-activated protein kinase activation in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* **66**(3):1103–1112.
690. **Wheeler-Jones CP, May MJ, Morgan AJ, y Pearson JD** (1996). Protein tyrosine kinases regulate agonist-stimulated prostacyclin release but not von Willebrand factor secretion from human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical Journal* **315**(Pt 2):407–416.
691. **Konrad RJ, Dean RM, Young RA, Billings PC, y Wolf BA** (1996). Glucose-induced tyrosine phosphorylation of p125 in beta cells and pancreatic islets. A novel proximal signal in insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry* **271**(39):24179–24186.
692. **Purushotham KR y Humphreys-Beher MG** (1995). The role of phosphotyrosine signaling pathway in a parotid gland proliferation and function. *Crit Rev. Oral Biol. Med.* **6**(2):119–131.

693. **Yule DI, Kim ET, y Williams JA** (1994). Tyrosine kinase inhibitors attenuate "capacitative" Ca²⁺ influx in rat pancreatic acinar cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **202**(3):1697–1704.
694. **Zimmermann P, Schnefel S, Zeuzem S, Profrock A, Haase W, y Schulz I** (1992). Effects of agonists on p21ras and ras-related proteins in rat pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol* **263**(3 Pt 1):G396–G406.
695. **Profrock A, Zimmermann P, y Schulz I** (1992). Bombesin receptors interact with Gi and p21ras proteins in plasma membranes from rat pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol* **263**(2 Pt 1):G240–G247.
696. **Zeuzem S, Stryjek-Kaminska D, Caspary WF, Stein J, y Piiper A** (1994). Effect of a Rab3A effector domain-related peptide, CCK, and EGF in permeabilized pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **267**(3 Pt 1):G350–G356.
697. **Ohnishi H, Ernst SA, Wys N, McNiven M, y Williams JA** (1996). Rab3D localizes to zymogen granules in rat pancreatic acini and other exocrine glands. *Am. J. Physiol* **271**(3 Pt 1):G531–G538.
698. **Yonei SG, Oishi K, y Uchida MK** (1995). Regulation of exocytosis by the small GTP-binding protein Rho in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Gen. Pharmacol.* **26**(7):1583–1589.
699. **Leeb-Lundberg LM, Song XH, y Mathis SA** (1994). Focal adhesion-associated proteins p125FAK and paxillin are substrates for bradykinin-stimulated tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* **269**(39):24328–24334.
700. **Shattil SJ, Haimovich B, Cunningham M, Lipfert L, Parsons JT, Ginsberg MH, y Brugge JS** (1994). Tyrosine phosphorylation of pp125FAK in platelets requires coordinated signaling through integrin and agonist receptors. *Journal of Biological Chemistry* **269**(20):14738–14745.
701. **Rosado JA, Salido GM, Jensen RT, y Garcia LJ** (1998). Are tyrosine phosphorylation of p125(FAK) and paxillin or the small GTP binding protein, rho, needed for CCK-stimulated pancreatic amylase secretion? *Biochim. Biophys. Acta* **1404**(3):412–426.
702. **Peikin SR, Rottman AJ, Batzri S, y Gardner JD** (1978). Kinetics of amylase release by dispersed acini prepared from guinea pig pancreas. *Am. J. Physiol* **235**(6):E743–E749.
703. **Jensen RT, Charlton CG, Adachi H, Jones SW, O'Donohue TL, y Gardner JD** (1983). Use of 125I-secretin to identify and characterize high-affinity secretin receptors on pancreatic acini. *Am. J. Physiol* **245**(2):G186–G195.
704. **Baur H, Kaspersek S, y Pfaff E** (1975). Criteria of viability of isolated liver cells. *Hoppe Seylers. Z. Physiol Chem.* **356**(6):827–838.
705. **Gryniewicz G, Poenie M, y Tsien RY** (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **260**(6):3440–3450.

706. **Williams DA, Fogarty KE, Tsien RY, y Fay FS** (1985). Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. *Nature* **318**(6046):558–561.
707. **Tsien RY, Rink TJ, y Poenie M** (1985). Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* **6**(1-2):145–157.
708. **Southern EM** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503–517.
709. **Alwine JC, Kemp DJ, y Stark GR** (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxy-methyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**:5350–5354.
710. **Towbin H, Staehelin T, y Gordon J** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**(9):4350–4354.
711. **Gershoni JM y Palade GE** (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* **131**(1):1–15.
712. **Gershoni JM, Davis FE, y Palade GE** (1985). Protein blotting in uniform or gradient electric fields. *Anal. Biochem.* **144**(1):32–40.
713. **Gershoni JM** (1994). Introduction and basic set-up for protein transfer, en *Protein blotting. A practical approach* (Dumbar BS, eds.) pp. 1–12. Oxford University Press, Oxford.
714. **Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, y Korsmeyer SJ** (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**(6299):334–336.
715. **Bradford MM** (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.
716. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, y Watson JD** (1989). The cytoskeleton, en *Molecular biology of the cell, 2ª ed.* (Robertson M, eds.) pp. 613–680. Garland Publishing, New York.
717. **Bray D y White JG** (1988). Cortical flow in animal cells. *Science* **239**(4842):883–888.
718. **Bray D, Heath J, y Moss D** (1986). The membrane-associated 'cortex' of animal cells: its structure and mechanical properties. *J. Cell Sci. Suppl* **4:71-88**:71–88.
719. **Amos LA y Baker TS** (1979). The three-dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature* **279**(5714):607–612.
720. **Amos LA** (1985). Structure of muscle filaments studied by electron microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **14**:291-313:291–313.
721. **Schroeder TE** (1973). Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **70**(6):1688–1692.

-
722. **Byers HR y Fujiwara K** (1982). Stress fibers in cells in situ: immunofluorescence visualization with antiactin, antimyosin, and anti-alpha-actinin. *J. Cell Biol.* **93**(3):804–811.
723. **Korn ED** (1982). Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol Rev.* **62**(2):672–737.
724. **Kreis TE y Birchmeier W** (1980). Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. *Cell* **22**(2 Pt 2):555–561.
725. **Burridge K** (1981). Are stress fibres contractile? *Nature* **294**(5843):691–692.
726. **Allen RD** (1987). The microtubule as an intracellular engine. *Sci. Am.* **256**(2):42–49.
727. **Salmon ED, McKeel M, y Hays T** (1984). Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle in vivo measured by blocking polymerization with colchicine. *J. Cell Biol.* **99**(3):1066–1075.
728. **De Brabander M, Geuens G, Nuydens R, Willebrords R, Aerts F, y De Mey J** (1986). Microtubule dynamics during the cell cycle: the effects of taxol and nocodazole on the microtubule system of Pt K2 cells at different stages of the mitotic cycle. *Int. Rev. Cytol.* **101:215-74**:215–274.
729. **Geiger B** (1987). Intermediate filaments. Looking for a function. *Nature* **329**(6138):392–393.
730. **Osborn M y Weber K** (1983). Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest* **48**(4):372–394.
731. **Geisler N y Weber K** (1988). Phosphorylation of desmin in vitro inhibits formation of intermediate filaments; identification of three kinase A sites in the aminoterminal head domain. *EMBO J.* **7**(1):15–20.
732. **Gorelick FS y Jamieson JD** (1994). The pancreatic acinar cell: structure-function relationship, en *Physiology of the Gastrointestinal Tract, 3ª ed.* (Johnson LR, Jacobson ED, Christensen J, Alpers DH, y Walsh JH, eds.) pp. 1089–1109. Raven Press, New York.
733. **O'Konski MS y Pandol SJ** (1993). Cholecystokinin JMV-180 and caerulein effects on the pancreatic acinar cell cytoskeleton. *Pancreas* **8**(5):638–646.
734. **Luna EJ y Hitt AL** (1992). Cytoskeleton--plasma membrane interactions. *Science* **258**(5084):955–964.
735. **Schmid A y Hall MN** (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**:305–338.
736. **Bridgman PC y Reese TS** (1984). The structure of cytoplasm in directly frozen cultured cells. I. Filamentous meshworks and the cytoplasmic ground substance. *J. Cell Biol.* **99**(5):1655–1668.
737. **Kolega J** (1986). Effects of mechanical tension on protrusive activity and microfilament and intermediate filament organization in an epidermal epithelium moving in culture. *J. Cell Biol.* **102**(4):1400–1411.

738. **Malawista SE y De Boisfleury CA** (1982). The cytokineplast: purified, stable, and functional motile machinery from human blood polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* **95**(3):960–973.
739. **Chang A y Jamieson JD** (1989). Structural and secretory polarity in the pancreatic acinar cell, en *The Gastrointestinal System, vol. 3* (Schultz SG, Forte JG, y Rauner BB, eds.) pp. 531–548. American Physiology Society, Bethesda MD.
740. **Jungermann J, Lerch MM, Weidenbach H, Lutz MP, Kruger B, y Adler G** (1995). Disassembly of rat pancreatic acinar cell cytoskeleton during supramaximal secretagogue stimulation. *Am. J. Physiol* **268**(2 Pt 1):G328–G338.
741. **O'Konski MS y Pandol SJ** (1990). Effects of caerulein on the apical cytoskeleton of the pancreatic acinar cell. *J. Clin. Invest* **86**(5):1649–1657.
742. **Muallem S, Kwiatkowska K, Xu X, y Yin HL** (1995). Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J. Cell Biol.* **128**(4):589–598.
743. **Vuori K** (1998). Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *J. Membr. Biol.* **165**:191–199.
744. **Sastry SK y Horwitz AF** (1993). Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**(5):819–831.
745. **Hynes RO** (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**(1):11–25.
746. **Otey CA, Pavalko FM, y Burridge K** (1990). An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J. Cell Biol.* **111**(2):721–729.
747. **Drenckhahn D, Beckerle M, Burridge K, y Otto J** (1988). Identification and subcellular location of talin in various cell types and tissues by means of [125I]vinculin overlay, immunoblotting and immunocytochemistry. *Eur. J. Cell Biol.* **46**(3):513–522.
748. **Jones P, Jackson P, Price GJ, Patel B, Ohanion V, Lear AL, y Critchley DR** (1989). Identification of a talin binding site in the cytoskeletal protein vinculin. *J. Cell Biol.* **109**(6 Pt 1):2917–2927.
749. **Chen Q, Kinch MS, Lin TH, Burridge K, y Juliano RL** (1994). Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* **269**(43):26602–26605.
750. **Davis S, Lu ML, Lo SH, Lin S, Butler JA, Druker BJ, Roberts TM, An Q, y Chen LB** (1991). Presence of an SH2 domain in the actin-binding protein tensin. *Science* **252**(5006):712–715.
751. **Sadler I, Crawford AW, Michelsen JW, y Beckerle MC** (1992). Zyxin and cCRP: two interactive LIM domain proteins associated with the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **119**(6):1573–1587.

752. **Keenan C y Kelleher D** (1998). Protein kinase C and the cytoskeleton. *Cell Signal*. **10**(4):225–232.
753. **Schwartz MA y Baron V** (1999). Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**(2):197–202.
754. **Juliano RL y Haskill S** (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **120**(3):577–585.
755. **Rosado JA y Sage SO** (2000). The actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry. *J. Physiol (Lond)* **526**(Pt 2):221–229.
756. **Bellis SL, Miller JT, y Turner CE** (1995). Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *Journal of Biological Chemistry* **270**(29):17437–17441.
757. **Zheng C, Xing Z, Bian ZC, Guo C, Akbay A, Warner L, y Guan JL** (1998). Differential regulation of Pyk2 and focal adhesion kinase (FAK). The C-terminal domain of FAK confers response to cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry* **273**(4):2384–2389.
758. **Knudsen BS, Feller SM, y Hanafusa H** (1994). Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk. *Journal of Biological Chemistry* **269**(52):32781–32787.
759. **Soltoff SP, Avraham H, Avraham S, y Cantley LC** (1998). Activation of P2Y2 receptors by UTP and ATP stimulates mitogen-activated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **273**(5):2653–2660.
760. **Gong MC, Fujihara H, Somlyo AV, y Somlyo AP** (1997). Translocation of rhoA associated with Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry* **272**(16):10704–10709.
761. **Denhardt DT** (1996). Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochemical Journal* **318**(Pt 3):729–747.
762. **McNamee HP, Ingber DE, y Schwartz MA** (1993). Adhesion to fibronectin stimulates inositol lipid synthesis and enhances PDGF-induced inositol lipid breakdown. *J. Cell Biol.* **121**(3):673–678.
763. **Chen HC y Guan JL** (1994). Stimulation of phosphatidylinositol 3'-kinase association with focal adhesion kinase by platelet-derived growth factor. *Journal of Biological Chemistry* **269**(49):31229–31233.
764. **Chrzanowska-Wodnicka M y Burridge K** (1994). Tyrosine phosphorylation is involved in reorganization of the actin cytoskeleton in response to serum or LPA stimulation. *J. Cell Sci.* **107**(Pt 12):3643–3654.
765. **Wilson L, Carrier MJ, y Kellie S** (1995). pp125FAK tyrosine kinase activity is not required for the assembly of F-actin stress fibres and focal adhesions in cultured mouse aortic smooth muscle cells. *J. Cell Sci.* **108**(Pt 6):2381–2391.

766. **Defilippi P, Retta SF, Olivo C, Palmieri M, Venturino M, Silengo L, y Tarone G** (1995). p125FAK tyrosine phosphorylation and focal adhesion assembly: studies with phosphotyrosine phosphatase inhibitors. *Exp. Cell Res.* **221**(1):141–152.
767. **Lyman S, Gilmore A, Burridge K, Gidwitz S, y White GC** (1997). Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is independent of focal adhesion formation or integrin activation. Studies with activated and inhibitory beta3 cytoplasmic domain mutants. *Journal of Biological Chemistry* **272**(36):22538–22547.
768. **Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, y Yamamoto T** (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* **377**(6549):539–544.
769. **Leung T, Manser E, Tan L, y Lim L** (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *Journal of Biological Chemistry* **270**(49):29051–29054.
770. **Leung T, Chen XQ, Manser E, y Lim L** (1996). The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol. Cell Biol.* **16**(10):5313–5327.
771. **Hartwig JH, Bokoch GM, Carpenter CL, Janmey PA, Taylor LA, Toker A, y Stossel TP** (1995). Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* **82**(4):643–653.
772. **Dash D, Aepfelbacher M, y Siess W** (1995). The association of pp125FAK, pp60Src, CDC42Hs and Rap1B with the cytoskeleton of aggregated platelets is a reversible process regulated by calcium. *FEBS Letters* **363**(3):231–234.
773. **Fincham VJ, Wyke JA, y Frame MC** (1995). v-Src-induced degradation of focal adhesion kinase during morphological transformation of chicken embryo fibroblasts. *Oncogene* **10**(11):2247–2252.
774. **Guan JL y Shalloway D** (1992). Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature* **358**(6388):690–692.
775. **Abedi H y Zachary I** (1997). Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **272**(24):15442–15451.
776. **Hiregowdara D, Avraham H, Fu Y, London R, y Avraham S** (1997). Tyrosine phosphorylation of the related adhesion focal tyrosine kinase in megakaryocytes upon stem cell factor and phorbol myristate acetate stimulation and its association with paxillin. *Journal of Biological Chemistry* **272**(16):10804–10810.

-
777. **Hanks SK, Calalb MB, Harper MC, y Patel SK** (1992). Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**(18):8487–8491.
778. **Schaller MD, Borgman CA, y Parsons JT** (1993). Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. *Mol. Cell Biol.* **13**(2):785–791.
779. **Mitaka T, Shindoh M, Mochizuki Y, Sasaki H, Ishino M, Matsuya M, Ninomiya T, y Sasaki T** (1997). Restricted expression of cell adhesion kinase-beta in rat tissues. *Am. J. Pathol.* **150**(1):267–281.
780. **Hildebrand JD, Schaller MD, y Parsons JT** (1995). Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol. Biol. Cell* **6**(6):637–647.
781. **Tachibana K, Sato T, D'Avirro N, y Morimoto C** (1995). Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. *J. Exp. Med.* **182**(4):1089–1099.
782. **Li X y Earp HS** (1997). Paxillin is tyrosine-phosphorylated by and preferentially associates with the calcium-dependent tyrosine kinase in rat liver epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **272**(22):14341–14348.
783. **Tapia JA, Camello C, Jensen RT, y Garcia LJ** (1999). EGF stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and paxillin in rat pancreatic acini by phospholipase C-independent process that depends on phosphatidylinositol 3-kinase, the small GTP-binding protein, p21rho, and the integrity of the actin cytoskeleton. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1448**:486–499.
784. **Soltoff SP** (1998). Related adhesion focal tyrosine kinase and the epidermal growth factor receptor mediate the stimulation of mitogen-activated protein kinase by the G-protein-coupled P2Y2 receptor. Phorbol ester or [Ca²⁺]_i elevation can substitute for receptor activation. *Journal of Biological Chemistry* **273**(36):23110–23117.
785. **Rozengurt E** (1995). Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes. *Cancer Surv.* **24:81-96**:81–96.
786. **Chen YH, Pouyssegur J, Courtneidge SA, y Obberghen-Schilling E** (1994). Activation of Src family kinase activity by the G protein-coupled thrombin receptor in growth-responsive fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **269**(44):27372–27377.
787. **Polte TR y Hanks SK** (1995). Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**(23):10678–10682.

788. **Manie SN, Beck AR, Astier A, Law SF, Canty T, Hirai H, Druker BJ, Avraham H, Haghayeghi N, Sattler M, Salgia R, Griffin JD, Golemis EA, y Freedman AS** (1997). Involvement of p130(Cas) and p105(HEF1), a novel Cas-like docking protein, in a cytoskeleton-dependent signaling pathway initiated by ligation of integrin or antigen receptor on human B cells. *Journal of Biological Chemistry* **272**(7):4230–4236.
789. **Akiyama SK, Yamada SS, Yamada KM, y LaFlamme SE** (1994). Transmembrane signal transduction by integrin cytoplasmic domains expressed in single-subunit chimeras. *Journal of Biological Chemistry* **269**(23):15961–15964.
790. **Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, y Yamada KM** (1995). Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J. Cell Biol* **131**(3):791–805.
791. **Ganju RK, Hatch WC, Avraham H, Ona MA, Druker B, Avraham S, y Groopman JE** (1997). RAFTK, a novel member of the focal adhesion kinase family, is phosphorylated and associates with signaling molecules upon activation of mature T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **185**(6):1055–1063.
792. **Okazaki H, Zhang J, Hamawy MM, y Siraganian RP** (1997). Activation of protein-tyrosine kinase Pyk2 is downstream of Syk in FcepsilonRI signaling. *Journal of Biological Chemistry* **272**(51):32443–32447.
793. **Sabri A, Govindarajan G, Griffin TM, Byron KL, Samarel AM, y Lucchesi PA** (1998). Calcium- and protein kinase C-dependent activation of the tyrosine kinase PYK2 by angiotensin II in vascular smooth muscle. *Circ. Res.* **83**(8):841–851.
794. **Li X, Hunter D, Morris J, Haskill JS, y Earp HS** (1998). A calcium-dependent tyrosine kinase splice variant in human monocytes. Activation by a two-stage process involving adherence and a subsequent intracellular signal. *Journal of Biological Chemistry* **273**(16):9361–9364.
795. **Avraham H, Park SY, Schinkmann K, y Avraham S** (2000). RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signal.* **12**(3):123–133.
796. **Seufferlein T y Rozengurt E** (1994). Lysophosphatidic acid stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130. Signaling pathways and cross-talk with platelet-derived growth factor. *Journal of Biological Chemistry* **269**(12):9345–9351.
797. **Rosado JA, Salido GM, y Garcia LJ** (2000). Activation of m3 muscarinic receptors induces rapid tyrosine phosphorylation of p125(FAK), p130(cas), and paxillin in rat pancreatic acini. *Arch. Biochem. Biophys.* **377**(1):85–94.
798. **Polte TR, Naftilan AJ, y Hanks SK** (1994). Focal adhesion kinase is abundant in developing blood vessels and elevation of its phosphotyrosine content in vascular smooth muscle cells is a rapid response to angiotensin II. *J. Cell Biochem.* **55**(1):106–119.

-
799. **Hoshi H y Logsdon CD** (1993). Both low- and high-affinity CCK receptor states mediate trophic effects on rat pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol* **265**(6 Pt 1):G1177–G1181.
800. **Battey J y Wada E** (1991). Two distinct receptor subtypes for mammalian bombesin-like peptides. *Trends Neurosci.* **14**(12):524–528.
801. **Tallett A, Chilvers ER, MacKinnon AC, Haslett C, y Sethi T** (1996). Neuropeptides stimulate tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity in small cell lung cancer cell lines. *Peptides* **17**(4):665–673.
802. **Rosado JA, Salido GM, y Garcia LJ** (2000). A role for phosphoinositides in tyrosine phosphorylation of p125 focal adhesion kinase in rat pancreatic acini. *Cell Signal.* **12**(3):173–182.
803. **Charlesworth A, Broad S, y Rozengurt E** (1996). The bombesin/GRP receptor transfected into Rat-1 fibroblasts couples to phospholipase C activation, tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin and cell proliferation. *Oncogene* **12**(6):1337–1345.
804. **Pillay TS, Sasaoka T, y Olefsky JM** (1995). Insulin stimulates the tyrosine dephosphorylation of pp125 focal adhesion kinase. *Journal of Biological Chemistry* **270**(3):991–994.
805. **Knight JB, Yamauchi K, y Pessin JE** (1995). Divergent insulin and platelet-derived growth factor regulation of focal adhesion kinase (pp125FAK) tyrosine phosphorylation, and rearrangement of actin stress fibers. *Journal of Biological Chemistry* **270**(17):10199–10203.
806. **Yamauchi K, Milarski KL, Saltiel AR, y Pessin JE** (1995). Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**(3):664–668.
807. **Abedi H, Dawes KE, y Zachary I** (1995). Differential effects of platelet-derived growth factor BB on p125 focal adhesion kinase and paxillin tyrosine phosphorylation and on cell migration in rabbit aortic vascular smooth muscle cells and Swiss 3T3 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **270**(19):11367–11376.
808. **Kumagai N, Morii N, Fujisawa K, Yoshimasa T, Nakao K, y Narumiya S** (1993). Lysophosphatidic acid induces tyrosine phosphorylation and activation of MAP-kinase and focal adhesion kinase in cultured Swiss 3T3 cells. *FEBS Letters* **329**(3):273–276.
809. **Haimovich B, Regan C, DiFazio L, Ginalis E, Ji P, Purohit U, Rowley RB, Bolen J, y Greco R** (1996). The FcγRII receptor triggers pp125FAK phosphorylation in platelets. *Journal of Biological Chemistry* **271**(27):16332–16337.
810. **Tokiwa G, Dikic I, Lev S, y Schlessinger J** (1996). Activation of Pyk2 by stress signals and coupling with JNK signaling pathway. *Science* **273**(5276):792–794.

811. **Murasawa S, Mori Y, Nozawa Y, Masaki H, Maruyama K, Tsutsumi Y, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Iwasaka T, Inada M, y Matsubara H** (1998). Role of calcium-sensitive tyrosine kinase Pyk2/CAKbeta/RAFTK in angiotensin II induced Ras/ERK signaling. *Hypertension* **32**(4):668–675.
812. **Li X, Yu H, Graves LM, y Earp HS** (1997). Protein kinase C and protein kinase A inhibit calcium-dependent but not stress-dependent c-Jun N-terminal kinase activation in rat liver epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **272**(23):14996–15002.
813. **Zhou W, Povoski SP, y Bell RH, Jr.** (1995). Characterization of cholecystokinin receptors and messenger RNA expression in rat pancreas: evidence for expression of cholecystokinin-A receptors but not cholecystokinin-B (gastrin) receptors. *J. Surg. Res.* **58**(3):281–289.
814. **Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, y van der GP** (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372**(6508):786–791.
815. **Katagiri K y Matsuura S** (1971). Antitumor activity of cytochalasin D. *J. Antibiot. (Tokyo)* **24**(10):722–723.
816. **Sekine A, Fujiwara M, y Narumiya S** (1989). Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **264**(15):8602–8605.
817. **Rankin S, Morii N, Narumiya S, y Rozengurt E** (1994). Botulinum C3 exoenzyme blocks the tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin induced by bombesin and endothelin. *FEBS Letters* **354**(3):315–319.
818. **Duong LT, Lakkakorpi PT, Nakamura I, Machwate M, Nagy RM, y Rodan GA** (1998). PYK2 in osteoclasts is an adhesion kinase, localized in the sealing zone, activated by ligation of alpha(v)beta3 integrin, and phosphorylated by src kinase. *J. Clin. Invest* **102**(5):881–892.
819. **Sieg DJ, Ilic D, Jones KC, Damsky CH, Hunter T, y Schlaepfer DD** (1998). Pyk2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pyk2 does not fully function to enhance FAK- cell migration. *EMBO J.* **17**(20):5933–5947.
820. **Schlaepfer DD y Hunter T** (1998). Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol* **8**(4):151–157.
821. **De Nichilo MO y Yamada KM** (1996). Integrin alpha v beta 5-dependent serine phosphorylation of paxillin in cultured human macrophages adherent to vitronectin. *Journal of Biological Chemistry* **271**(18):11016–11022.
822. **Brown MC, Perrotta JA, y Turner CE** (1996). Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J. Cell Biol.* **135**(4):1109–1123.

-
823. **Turner CE y Miller JT** (1994). Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *J. Cell Sci.* **107**(Pt 6):1583–1591.
824. **Schaller MD y Parsons JT** (1995). pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol. Cell Biol.* **15**(5):2635–2645.
825. **Woods A y Couchman JR** (1992). Protein kinase C involvement in focal adhesion formation. *J. Cell Sci.* **101**(Pt 2):277–290.
826. **Woods A, Couchman JR, Johansson S, y Hook M** (1986). Adhesion and cytoskeletal organisation of fibroblasts in response to fibronectin fragments. *EMBO J.* **5**(4):665–670.
827. **Schwartz MA, Toksoz D, y Khosravi-Far R** (1996). Transformation by Rho exchange factor oncogenes is mediated by activation of an integrin-dependent pathway. *EMBO J.* **15**(23):6525–6530.
828. **Renshaw MW, Toksoz D, y Schwartz MA** (1996). Involvement of the small GTPase rho in integrin-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **271**(36):21691–21694.
829. **Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, y Ingber DE** (1997). Geometric control of cell life and death. *Science* **276**(5317):1425–1428.
830. **Hungerford JE, Compton MT, Matter ML, Hoffstrom BG, y Otey CA** (1996). Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis. *J. Cell Biol* **135**(5):1383–1390.
831. **Xu LH, Owens LV, Sturge GC, Yang X, Liu ET, Craven RJ, y Cance WG** (1996). Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth Differ.* **7**(4):413–418.
832. **Ilic D, Almeida EA, Schlaepfer DD, Dazin P, Aizawa S, y Damsky CH** (1998). Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J. Cell Biol* **143**(2):547–560.
833. **Levkau B, Herren B, Koyama H, Ross R, y Raines EW** (1998). Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *J. Exp. Med.* **187**(4):579–586.
834. **Crouch DH, Fincham VJ, y Frame MC** (1996). Targeted proteolysis of the focal adhesion kinase pp125 FAK during c-MYC-induced apoptosis is suppressed by integrin signalling. *Oncogene* **12**(12):2689–2696.
835. **Galas MC, Lignon MF, Rodriguez M, Mendre C, Fulcrand P, Laur J, y Martinez J** (1988). Structure-activity relationship studies on cholecystokinin: analogues with partial agonist activity. *Am. J. Physiol.* **254**(2 Pt 1):G176–G182.

836. **Sato S, Stark HA, Martinez J, Beaven MA, Jensen RT, y Gardner JD** (1989). Receptor occupation, calcium mobilization, and amylase release in pancreatic acini: effect of CCK-JMV-180. *Am. J. Physiol* **257**(2 Pt 1):G202–G209.
837. **Bragado MJ, San Roman JI, Gonzalez A, Garcia LJ, Lopez MA, y Calvo JJ** (1996). Impairment of intracellular calcium homeostasis in the exocrine pancreas after caerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Clin. Sci. (Colch.)* **91**(6):365–369.
838. **Kitsukawa Y, Felley C, Metz DC, y Jensen RT** (1994). Thapsigargin defines roles of Ca²⁺ in initial, sustained, and potentiated stimulation of pepsinogen secretion. *Am. J. Physiol* **266**(4 Pt 1):G613–G623.
839. **Metz DC, Patto RJ, Mrozinski JE, Jr., Jensen RT, Turner RJ, y Gardner JD** (1992). Thapsigargin defines the roles of cellular calcium in secretagogue-stimulated enzyme secretion from pancreatic acini. *Journal of Biological Chemistry* **267**(29):20620–20629.
840. **Krims PE y Pandol SJ** (1988). Free cytosolic calcium and secretagogue-stimulated initial pancreatic exocrine secretion. *Pancreas* **3**(4):383–390.
841. **Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, Duhamel L, Charon D, y Kirilovski J** (1991). The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **266**(24):15771–15781.
842. **Nakamoto T, Sakai R, Honda H, Ogawa S, Ueno H, Suzuki T, Aizawa S, Yazaki Y, y Hirai H** (1997). Requirements for localization of p130cas to focal adhesions. *Mol. Cell Biol.* **17**(7):3884–3897.
843. **Ojaniemi M y Vuori K** (1997). Epidermal growth factor modulates tyrosine phosphorylation of p130Cas. Involvement of phosphatidylinositol 3'-kinase and actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry* **272**(41):25993–25998.
844. **Schraw W y Richmond A** (1995). Melanoma growth stimulatory activity signaling through the class II interleukin-8 receptor enhances the tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate, p130, and a 70-kilodalton protein. *Biochemistry* **34**(42):13760–13767.
845. **Blakesley VA, Beitner-Johnson D, Van Brocklyn JR, Rani S, Shen-Orr Z, Stannard BS, Spiegel S, y LeRoith D** (1997). Sphingosine 1-phosphate stimulates tyrosine phosphorylation of Crk. *Journal of Biological Chemistry* **272**(26):16211–16215.
846. **Matsuda M, Hashimoto Y, Muroya K, Hasegawa H, Kurata T, Tanaka S, Nakamura S, y Hattori S** (1994). CRK protein binds to two guanine nucleotide-releasing proteins for the Ras family and modulates nerve growth factor-induced activation of Ras in PC12 cells. *Mol. Cell Biol.* **14**(8):5495–5500.

-
847. **Aktorics K, Weller U, y Chhatwal GS** (1987). Clostridium botulinum type C produces a novel ADP-ribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin. *FEBS Letters* **212**(1):109–113.
848. **Hatch WC, Ganju RK, Hiregowdara D, Avraham S, y Groopman JE** (1998). The related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) is tyrosine phosphorylated and participates in colony-stimulating factor-1/macrophage colony-stimulating factor signaling in monocyte-macrophages. *Blood* **91**(10):3967–3973.
849. **Li X, Lee JW, Graves LM, y Earp HS** (1998). Angiotensin II stimulates ERK via two pathways in epithelial cells: protein kinase C suppresses a G-protein coupled receptor-EGF receptor transactivation pathway. *EMBO J.* **17**(9):2574–2583.
850. **Dabrowski A, VanderKuur JA, Carter-Su C, y Williams JA** (1996). Cholecystokinin stimulates formation of shc-grb2 complex in rat pancreatic acinar cells through a protein kinase C-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **271**(43):27125–27129.
851. **Luttrell LM, Hawes BE, van Biesen T, Luttrell DK, Lansing TJ, y Lefkowitz RJ** (1996). Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* **271**(32):19443–19450.
852. **Mellor H y Parker PJ** (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochemical Journal* **332**(Pt 2):281–292.
853. **Liu JP** (1996). Protein kinase C and its substrates. *Mol. Cell Endocrinol.* **116**(1):1–29.
854. **Casabona G** (1997). Intracellular signal modulation: a pivotal role for protein kinase C. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **21**(3):407–425.
855. **Hug H y Sarre TF** (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochemical Journal* **291**(Pt 2):329–343.
856. **Newton AC** (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry* **270**(48):28495–28498.
857. **Newton AC** (1996). Protein kinase C: ports of anchor in the cell. *Curr. Biol.* **6**(7):806–809.
858. **Parker PJ y Dekker LV** (1997). *Protein kinase C*. Springer, London.
859. **Marks F y Gschwendt M** (1997). Protein kinase C, en *Protein Phosphorylation* (Marks F, eds.) pp. 81–116. VCH, Weinheim.
860. **Blobe GC, Stribling S, Obeid LM, y Hannun YA** (1996). Protein kinase C isoenzymes: regulation and function. *Cancer Surv.* **27:213-48**:213–248.

861. **Takai Y, Kishimoto A, Inoue M, y Nishizuka Y** (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *Journal of Biological Chemistry* **252**(21):7603–7609.
862. **Nishizuka Y** (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**(5082):607–614.
863. **Akimoto K, Mizuno K, Osada S, Hirai S, Tanuma S, Suzuki K, y Ohno S** (1994). A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *Journal of Biological Chemistry* **269** (17):12677–12683.
864. **Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P, y Pfizenmaier K** (1994). PKC ζ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *Journal of Biological Chemistry* **269**(8):6140–6148.
865. **Rozengurt E, Sinnott-Smith J, Van Lint J, y Valverde AM** (1995). Protein kinase D (PKD): a novel target for diacylglycerol and phorbol esters. *Mutat. Res.* **333**(1-2):153–160.
866. **Valverde AM, Sinnott-Smith J, Van Lint J, y Rozengurt E** (1994). Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**(18):8572–8576.
867. **Burns DJ y Bell RM** (1991). Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *Journal of Biological Chemistry* **266**(27):18330–18338.
868. **House C y Kemp BE** (1990). Protein kinase C pseudosubstrate prototope: structure-function relationships. *Cell Signal.* **2**(2):187–190.
869. **Sossin WS y Schwartz JH** (1993). Ca²⁺-independent protein kinase C δ contain an amino-terminal domain similar to the C2 consensus sequence. *Trends Biochem. Sci.* **18**(6):207–208.
870. **Luo JH y Weinstein IB** (1993). Calcium-dependent activation of protein kinase C. The role of the C2 domain in divalent cation selectivity. *Journal of Biological Chemistry* **268**(31):23580–23584.
871. **Luo JH, Kahn S, O'Driscoll K, y Weinstein IB** (1993). The regulatory domain of protein kinase C beta 1 contains phosphatidylserine- and phorbol ester-dependent calcium binding activity. *Journal of Biological Chemistry* **268** (5):3715–3719.
872. **Johannes FJ, Prestle J, Dieterich S, Oberhagemann P, Link G, y Pfizenmaier K** (1995). Characterization of activators and inhibitors of protein kinase C μ . *Eur. J. Biochem.* **227**(1-2):303–307.
873. **Wetsel WC, Khan WA, Merchenthaler I, Rivera H, Halpern AE, Phung HM, Negro-Vilar A, y Hannun YA** (1992). Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J. Cell Biol.* **117**(1):121–133.

-
874. **Schaap D y Parker PJ** (1990). Expression, purification, and characterization of protein kinase C-epsilon. *Journal of Biological Chemistry* **265** (13):7301–7307.
875. **Osada S, Mizuno K, Saido TC, Akita Y, Suzuki K, Kuroki T, y Ohno S** (1990). A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *Journal of Biological Chemistry* **265**(36):22434–22440.
876. **Bacher N, Zisman Y, Berent E, y Livneh E** (1991). Isolation and characterization of PKC-eta, a new member of the protein kinase C-related gene family specifically expressed in lung, skin, and heart. *Mol. Cell Biol.* **11**(1):126–133.
877. **Baier G, Telford D, Giampa L, Coggeshall KM, Baier-Bitterlich G, Isakov N, y Altman A** (1993). Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *Journal of Biological Chemistry* **268**(7):4997–5004.
878. **Osada S, Mizuno K, Saido TC, Suzuki K, Kuroki T, y Ohno S** (1992). A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol. Cell Biol.* **12**(9):3930–3938.
879. **Rennecke J, Johannes FJ, Richter KH, Kittstein W, Marks F, y Gschwendt M** (1996). Immunological demonstration of protein kinase C mu in murine tissues and various cell lines. Differential recognition of phosphorylated forms and lack of down-regulation upon 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment of cells. *Eur. J. Biochem.* **242**(2):428–432.
880. **Sesca E, Perletti GP, Binasco V, Chiara M, y Tessitore L** (1996). Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase 2 and CTP-phosphocholine cytidyltransferase expressions are related with protein kinase C isozymes in developmental liver growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **229**(1):158–162.
881. **Perletti G, Tessitore L, Sesca E, Pani P, Dianzani MU, y Piccinini F** (1996). Epsilon PKC acts like a marker of progressive malignancy in rat liver, but fails to enhance tumorigenesis in rat hepatoma cells in culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **221**(3):688–691.
882. **Ducher L, Croquet F, Gil S, Davy J, Feger J, y Brehier A** (1995). Differential expression of five protein kinase C isoenzymes in FAO and HepG2 hepatoma cell lines compared with normal rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **217**(2):546–553.
883. **Hidaka M, Nakakuma H, Kawaguchi T, Nagakura S, Horikawa K, Okuno Y, Kagimoto T, y Takatsuki K** (1992). Altered expression of protein kinase C in adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Hematol.* **56**(2):135–141.

884. **Usuda N, Kong Y, Hagiwara M, Uchida C, Terasawa M, Nagata T, y Hidaka H** (1991). Differential localization of protein kinase C isozymes in retinal neurons. *J. Cell Biol.* **112**(6):1241–1247.
885. **Kose A, Saito N, Ito H, Kikkawa U, Nishizuka Y, y Tanaka C** (1988). Electron microscopic localization of type I protein kinase C in rat Purkinje cells. *J. Neurosci.* **8**(11):4262–4268.
886. **Bastani B, Yang L, Baldassare JJ, Pollo DA, y Gardner JD** (1995). Cellular distribution of isoforms of protein kinase C (PKC) in pancreatic acini. *Biochim. Biophys. Acta* **1269**(3):307–315.
887. **Raffaniello RD, Nam J, Cho I, Lin J, Bao LY, Michl J, y Raufman JP** (1998). Protein kinase C isoform expression and function in transformed and non-transformed pancreatic acinar cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **246**(1):166–171.
888. **Rodríguez-Martín E, Boyano-Adanez MC, Bodega G, Martín M, Hernández C, Quin Y, Vadillo M, y Arilla-Ferreiro E** (1999). Redistribution of protein kinase C isoforms in rat pancreatic acini during lactation and weaning. *FEBS Letters* **445**(2-3):356–360.
889. **Pears C, Stabel S, Cazaubon S, y Parker PJ** (1992). Studies on the phosphorylation of protein kinase C- α . *Biochemical Journal* **283**(Pt 2):515–518.
890. **Cazaubon S, Bornancin F, y Parker PJ** (1994). Threonine-497 is a critical site for permissive activation of protein kinase C α . *Biochemical Journal* **301**(Pt 2):443–448.
891. **Orr JW y Newton AC** (1994). Requirement for negative charge on "activation loop" of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **269**(44):27715–27718.
892. **Keränen LM, Dutil EM, y Newton AC** (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr. Biol.* **5**(12):1394–1403.
893. **Cazaubon SM y Parker PJ** (1993). Identification of the phosphorylated region responsible for the permissive activation of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **268**(23):17559–17563.
894. **Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, y Toker A** (1998). Regulation of protein kinase C ζ by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.* **8**(19):1069–1077.
895. **Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, y Parker PJ** (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**(5385):2042–2045.
896. **Dutil EM, Toker A, y Newton AC** (1998). Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr. Biol.* **8**(25):1366–1375.

-
897. **Tsutakawa SE, Medzihradzky KF, Flint AJ, Burlingame AL, y Koshland DE, Jr.** (1995). Determination of in vivo phosphorylation sites in protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **270**(45):26807–26812.
898. **Bazzi MD y Nelsestuen GL** (1993). Protein kinase C and annexins: unusual calcium response elements in the cell. *Cell Signal.* **5**(4):357–365.
899. **Khan WA, Blobe G, Halpern A, Taylor W, Wetsel WC, Burns D, Loomis C, y Hannun YA** (1993). Selective regulation of protein kinase C isoenzymes by oleic acid in human platelets. *Journal of Biological Chemistry* **268**(7):5063–5068.
900. **Nishizuka Y** (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**(4761):305–312.
901. **Kochs G, Hummel R, Fiebich B, Sarre TF, Marme D, y Hug H** (1993). Activation of purified human protein kinase C alpha and beta I isoenzymes in vitro by Ca²⁺, phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemical Journal* **291**(Pt 2):627–633.
902. **Toker A, Meyer M, Reddy KK, Falck JR, Aneja R, Aneja S, Parra A, Burns DJ, Ballas LM, y Cantley LC** (1994). Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P₂ and PtdIns-3,4,5-P₃. *Journal of Biological Chemistry* **269**(51):32358–32367.
903. **Kishimoto A, Mikawa K, Hashimoto K, Yasuda I, Tanaka S, Tominaga M, Kuroda T, y Nishizuka Y** (1989). Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). *Journal of Biological Chemistry* **264**(7):4088–4092.
904. **Emoto Y, Manome Y, Meinhardt G, Kisaki H, Kharbanda S, Robertson M, Ghayur T, Wong WW, Kamen R, y Weichselbaum R** (1995). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J.* **14**(24):6148–6156.
905. **Mizuno K, Noda K, Araki T, Imaoka T, Kobayashi Y, Akita Y, Shimonaka M, Kishi S, y Ohno S** (1997). The proteolytic cleavage of protein kinase C isotypes, which generates kinase and regulatory fragments, correlates with Fas-mediated and 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **250**(1):7–18.
906. **Endo K, Oki E, Biedermann V, Kojima H, Yoshida K, Johannes FJ, Kufe D, y Datta R** (2000). Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C micro by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents. *Journal of Biological Chemistry* **275** (24):18476–18481.
907. **Ghayur T, Hugunin M, Talanian RV, Ratnofsky S, Quinlan C, Emoto Y, Pandey P, Datta R, Huang Y, Kharbanda S, Allen H, Kamen R, Wong W, y Kufe D** (1996). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J. Exp. Med.* **184**(6):2399–2404.

908. **Pontremoli S, Michetti M, Melloni E, Sparatore B, Salamino F, y Horecker BL** (1990). Identification of the proteolytically activated form of protein kinase C in stimulated human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**(10):3705–3707.
909. **Burns DJ, Bloomenthal J, Lee MH, y Bell RM** (1990). Expression of the alpha, beta II, and gamma protein kinase C isozymes in the baculovirus-insect cell expression system. Purification and characterization of the individual isoforms. *Journal of Biological Chemistry* **265**(20):12044–12051.
910. **Dekker LV y Parker PJ** (1994). Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem. Sci.* **19**(2):73–77.
911. **Lehel C, Olah Z, Jakab G, Szallasi Z, Petrovics G, Harta G, Blumberg PM, y Anderson WB** (1995). Protein kinase C epsilon subcellular localization domains and proteolytic degradation sites. A model for protein kinase C conformational changes. *Journal of Biological Chemistry* **270**(33):19651–19658.
912. **Lu Z, Liu D, Hornia A, Devonish W, Pagano M, y Foster DA** (1998). Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell Biol.* **18**(2):839–845.
913. **Pryer NK, Wuestehube LJ, y Schekman R** (1992). Vesicle-mediated protein sorting. *Annu. Rev. Biochem.* **61**:471-516:471–516.
914. **Parker PJ, Bosca L, Dekker L, Goode NT, Hajibagheri N, y Hansra G** (1995). Protein kinase C (PKC)-induced PKC degradation: a model for down-regulation. *Biochemical Society Transactions* **23**(1):153–155.
915. **Olivier AR y Parker PJ** (1994). Bombesin, platelet-derived growth factor, and diacylglycerol induce selective membrane association and down-regulation of protein kinase C isotypes in Swiss 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* **269**(4):2758–2763.
916. **Young S, Parker PJ, Ullrich A, y Stabel S** (1987). Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochemical Journal* **244**(3):775–779.
917. **Greif H, Ben Chaim J, Shimon T, Bechor E, Eldar H, y Livneh E** (1992). The protein kinase C-related PKC-eta gene product is localized in the cell nucleus. *Mol. Cell Biol.* **12**(3):1304–1311.
918. **Chen CC** (1993). Protein kinase C alpha, delta, epsilon and zeta in C6 glioma cells. TPA induces translocation and down-regulation of conventional and new PKC isoforms but not atypical PKC zeta. *FEBS Letters* **332**(1-2):169–173.
919. **MacKenzie S, Fleming I, Houslay MD, Anderson NG, y Kilgour E** (1997). Growth hormone and phorbol esters require specific protein kinase C isoforms to activate mitogen-activated protein kinases in 3T3-F442A cells. *Biochemical Journal* **324**(Pt 1):159–165.

-
920. **Obeid LM, Blobe GC, Karolak LA, y Hannun YA** (1992). Cloning and characterization of the major promoter of the human protein kinase C beta gene. Regulation by phorbol esters. *Journal of Biological Chemistry* **267**(29):20804–20810.
921. **Olivier AR y Parker PJ** (1992). Identification of multiple PKC isoforms in Swiss 3T3 cells: differential down-regulation by phorbol ester. *J. Cell Physiol* **152**(2):240–244.
922. **Akita Y, Ohno S, Yajima Y, y Suzuki K** (1990). Possible role of Ca²⁺-independent protein kinase C isozyme, nPKC epsilon, in thyrotropin-releasing hormone-stimulated signal transduction: differential down-regulation of nPKC epsilon in GH4C1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **172**(1):184–189.
923. **Kiley SC, Jaken S, Whelan R, y Parker PJ** (1995). Intracellular targeting of protein kinase C isoenzymes: functional implications. *Biochemical Society Transactions* **23**(3):601–605.
924. **Freisewinkel I, Riethmacher D, y Stabel S** (1991). Downregulation of protein kinase C-gamma is independent of a functional kinase domain. *FEBS Letters* **280**(2):262–266.
925. **Junco M, Webster C, Crawford C, Bosca L, y Parker PJ** (1994). Protein kinase C V3 domain mutants with differential sensitivities to m-calpain are not resistant to phorbol-ester-induced down-regulation. *Eur. J. Biochem.* **223**(1):259–263.
926. **Pears C y Parker PJ** (1991). Down-regulation of a kinase defective PKC-alpha. *FEBS Letters* **284**(1):120–122.
927. **Goode NT, Hajibagheri MA, Warren G, y Parker PJ** (1994). Expression of mammalian protein kinase C in *Schizosaccharomyces pombe*: isotype-specific induction of growth arrest, vesicle formation, and endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **5**(8):907–920.
928. **Goode NT, Hajibagheri MA, y Parker PJ** (1995). Protein kinase C (PKC)-induced PKC down-regulation. Association with up-regulation of vesicle traffic. *Journal of Biological Chemistry* **270**(6):2669–2673.
929. **Mochly-Rosen D y Gordon AS** (1998). Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J.* **12**(1):35–42.
930. **Disatnik MH, Buraggi G, y Mochly-Rosen D** (1994). Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp. Cell Res.* **210**(2):287–297.
931. **Mochly-Rosen D, Khaner H, y Lopez J** (1991). Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**(9):3997–4000.
932. **Liao L, Hyatt SL, Chapline C, y Jaken S** (1994). Protein kinase C domains involved in interactions with other proteins. *Biochemistry* **33**(5):1229–1233.

933. **Gopalakrishna R, Barsky SH, Thomas TP, y Anderson WB** (1986). Factors influencing chelator-stable, detergent-extractable, phorbol diester-induced membrane association of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **261** :16438–16445.
934. **Wolf M y Sahyoun N** (1986). Protein kinase C and phosphatidylserine bind to Mr 110,000/115,000 polypeptides enriched in cytoskeletal and postsynaptic density preparations. *Journal of Biological Chemistry* **261**:13327–13332.
935. **Jaken S** (1996). Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**(2):168–173.
936. **Klauck TM, Faux MC, Labudda K, Langeberg LK, Jaken S, y Scott JD** (1996). Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science* **271**(5255):1589–1592.
937. **Dong L, Stevens JL, y Jaken S** (1993). Transformation-sensitive localization of alpha-protein kinase C at cell-cell contacts in rat renal proximal tubule epithelial cells. *Cell Growth Differ.* **4**(10):793–798.
938. **Ron D, Luo J, y Mochly-Rosen D** (1995). C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **270**(41):24180–24187.
939. **Staudinger J, Zhou J, Burgess R, Elledge SJ, y Olson EN** (1995). PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system. *J. Cell Biol.* **128**(3):263–271.
940. **Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, y Nishizuka Y** (1987). Identification of three additional members of rat protein kinase C family: delta-, epsilon- and zeta-subspecies. *FEBS Letters* **226**(1):125–128.
941. **Huppi K, Siwarski D, Goodnight J, y Mischak H** (1994). Assignment of the protein kinase C delta polypeptide gene (PRKCD) to human chromosome 3 and mouse chromosome 14. *Genomics* **19**(1):161–162.
942. **Kurkinen KM, Keinanen RA, Karhu R, y Koistinaho J** (2000). Genomic structure and chromosomal localization of the rat protein kinase Cdelta-gene. *Gene* **242**(1-2):115–123.
943. **Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, y Nishizuka Y** (1988). The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. *Journal of Biological Chemistry* **263**(14):6927–6932.
944. **Gschwendt M, Kittstein W, y Marks F** (1986). A novel type of phorbol ester-dependent protein phosphorylation in the particulate fraction of mouse epidermis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **137**(2):766–774.
945. **Gschwendt M, Kittstein W, Horn F, Leibersperger H, y Marks F** (1989). A phorbol ester and phospholipid-activated, calcium-unresponsive protein kinase in mouse epidermis: characterization and separation from protein kinase C. *J. Cell Biochem.* **40**(3):295–307.

946. **Gschwendt M, Leibersperger H, y Marks F** (1989). Differentiative action of K252a on protein kinase C and a calcium-unresponsive, phorbol ester/phospholipid-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **164**(3):974–982.
947. **Leibersperger H, Gschwendt M, y Marks F** (1990). Purification and characterization of a calcium-unresponsive, phorbol ester/phospholipid-activated protein kinase from porcine spleen. *Journal of Biological Chemistry* **265**(27):16108–16115.
948. **Hunn M y Quest AF** (1997). Cysteine-rich regions of protein kinase Cdelta are functionally non-equivalent. Differences between cysteine-rich regions of non-calcium-dependent protein kinase Cdelta and calcium-dependent protein kinase Cgamma. *FEBS Letters* **400**(2):226–232.
949. **Bogi K, Lorenzo PS, Szallasi Z, Acs P, Wagner GS, y Blumberg PM** (1998). Differential selectivity of ligands for the C1a and C1b phorbol ester binding domains of protein kinase Cdelta: possible correlation with tumor-promoting activity. *Cancer Res.* **58**(7):1423–1428.
950. **Kazanietz MG, Wang S, Milne GW, Lewin NE, Liu HL, y Blumberg PM** (1995). Residues in the second cysteine-rich region of protein kinase C delta relevant to phorbol ester binding as revealed by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **270**(37):21852–21859.
951. **Zhang G, Kazanietz MG, Blumberg PM, y Hurley JH** (1995). Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell* **81**(6):917–924.
952. **Gschwendt M** (1999). Protein kinase C delta. *Eur. J. Biochem.* **259**(3):555–564.
953. **Ogita K, Miyamoto S, Yamaguchi K, Koide H, Fujisawa N, Kikkawa U, Sahara S, Fukami Y, y Nishizuka Y** (1992). Isolation and characterization of delta-subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**(5):1592–1596.
954. **Mischak H, Bodenteich A, Kolch W, Goodnight J, Hofer F, y Mushinski JF** (1991). Mouse protein kinase C-delta, the major isoform expressed in mouse hemopoietic cells: sequence of the cDNA, expression patterns, and characterization of the protein. *Biochemistry* **30**(32):7925–7931.
955. **Olivier AR y Parker PJ** (1991). Expression and characterization of protein kinase C-delta. *Eur. J. Biochem.* **200**(3):805–810.
956. **Mizuno K, Kubo K, Saido TC, Akita Y, Osada S, Kuroki T, Ohno S, y Suzuki K** (1991). Structure and properties of a ubiquitously expressed protein kinase C, nPKC delta. *Eur. J. Biochem.* **202**(3):931–940.
957. **Aris JP, Basta PV, Holmes WD, Ballas LM, Moomaw C, Rankl NB, Blobel G, Loomis CR, y Burns DJ** (1993). Molecular and biochemical characterization of a recombinant human PKC-delta family member. *Biochim. Biophys. Acta* **1174**(2):171–181.

958. **Stempka L, Girod A, Muller HJ, Rincke G, Marks F, Gschwendt M, y Bossemeyer D** (1997). Phosphorylation of protein kinase Cdelta (PKCdelta) at threonine 505 is not a prerequisite for enzymatic activity. Expression of rat PKCdelta and an alanine 505 mutant in bacteria in a functional form. *Journal of Biological Chemistry* **272**(10):6805–6811.
959. **Leibersperger H, Gschwendt M, Gernold M, y Marks F** (1991). Immunological demonstration of a calcium-unresponsive protein kinase C of the delta-type in different species and murine tissues. Predominance in epidermis. *Journal of Biological Chemistry* **266**(22):14778–14784.
960. **Chen S y Hillman DE** (1993). Compartmentation of the cerebellar cortex by protein kinase C delta. *Neuroscience* **56**(1):177–188.
961. **Chen S y Hillman DE** (1994). Immunohistochemical localization of protein kinase C delta during postnatal development of the cerebellum. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **80**(1-2):19–25.
962. **Ohno S, Mizuno K, Adachi Y, Hata A, Akita Y, Akimoto K, Osada S, Hirai S, y Suzuki K** (1994). Activation of novel protein kinases C delta and C epsilon upon mitogenic stimulation of quiescent rat 3Y1 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **269**(26):17495–17501.
963. **O'Driscoll KR, Teng KK, Fabbro D, Greene LA, y Weinstein IB** (1995). Selective translocation of protein kinase C-delta in PC12 cells during nerve growth factor-induced neuritogenesis. *Mol. Biol. Cell* **6**(4):449–458.
964. **Khan WA, Blobe GC, y Hannun YA** (1995). Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. *Cell Signal.* **7**(3):171–184.
965. **Shih NY y Floyd-Smith G** (1996). Protein kinase C-delta mRNA is down-regulated transcriptionally and post-transcriptionally by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Journal of Biological Chemistry* **271**(27):16040–16046.
966. **Olivier AR, Hansra G, Pettitt TR, Wakelam MJ, y Parker PJ** (1996). The co-mitogenic combination of transforming growth factor beta 1 and bombesin protects protein kinase C-delta from late-phase down-regulation, despite synergy in diacylglycerol accumulation. *Biochemical Journal* **318**(Pt 2):519–525.
967. **Szallasi Z, Denning MF, Smith CB, Dlugosz AA, Yuspa SH, Pettit GR, y Blumberg PM** (1994). Bryostatin 1 protects protein kinase C-delta from down-regulation in mouse keratinocytes in parallel with its inhibition of phorbol ester-induced differentiation. *Mol. Pharmacol.* **46**(5):840–850.
968. **Lorenzo PS, Bogi K, Acs P, Pettit GR, y Blumberg PM** (1997). The catalytic domain of protein kinase Cdelta confers protection from down-regulation induced by bryostatin 1. *Journal of Biological Chemistry* **272**(52):33338–33343.

-
969. **Filipuzzi I, Fabbro D, y Imber R** (1993). Unphosphorylated alpha-PKC exhibits phorbol ester binding but lacks protein kinase activity in vitro. *J. Cell Biochem.* **52**(1):78–83.
970. **Stempka L, Schnolzer M, Radke S, Rincke G, Marks F, y Gschwendt M** (1999). Requirements of protein kinase cdelta for catalytic function. Role of glutamic acid 500 and autophosphorylation on serine 643. *Journal of Biological Chemistry* **274**(13):8886–8892.
971. **Gschwendt M, Kittstein W, Kielbassa K, y Marks F** (1995). Protein kinase C delta accepts GTP for autophosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **206**(2):614–620.
972. **Li W, Zhang J, Bottaro DP, y Pierce JH** (1997). Identification of serine 643 of protein kinase C-delta as an important autophosphorylation site for its enzymatic activity. *Journal of Biological Chemistry* **272**(39):24550–24555.
973. **Gschwendt M, Kielbassa K, Kittstein W, y Marks F** (1994). Tyrosine phosphorylation and stimulation of protein kinase C delta from porcine spleen by src in vitro. Dependence on the activated state of protein kinase C delta. *FEBS Letters* **347**(1):85–89.
974. **Li W, Mischak H, Yu JC, Wang LM, Mushinski JF, Heidaran MA, y Pierce JH** (1994). Tyrosine phosphorylation of protein kinase C-delta in response to its activation. *Journal of Biological Chemistry* **269**(4):2349–2352.
975. **Li W, Yu JC, Michieli P, Beeler JF, Ellmore N, Heidaran MA, y Pierce JH** (1994). Stimulation of the platelet-derived growth factor beta receptor signaling pathway activates protein kinase C-delta. *Mol. Cell Biol.* **14**(10):6727–6735.
976. **Denning MF, Dlugosz AA, Threadgill DW, Magnuson T, y Yuspa SH** (1996). Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. *Journal of Biological Chemistry* **271**(10):5325–5331.
977. **Haleem-Smith H, Chang EY, Szallasi Z, Blumberg PM, y Rivera J** (1995). Tyrosine phosphorylation of protein kinase C-delta in response to the activation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E modifies its substrate recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**(20):9112–9116.
978. **Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, y Nishizuka Y** (1997). Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**(21):11233–11237.
979. **Denning MF, Dlugosz AA, Howett MK, y Yuspa SH** (1993). Expression of an oncogenic rasHa gene in murine keratinocytes induces tyrosine phosphorylation and reduced activity of protein kinase C delta. *Journal of Biological Chemistry* **268**(35):26079–26081.

980. **Popoff IJ y Deans JP** (1999). Activation and tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta in response to B cell antigen receptor stimulation. *Mol. Immunol.* **36**(15-16):1005–1016.
981. **Kadotani M, Nishiuma T, Nanahoshi M, Tsujishita Y, Ogita K, Nakamura S, Kikkawa U, y Asaoka Y** (1997). Characterization of tyrosine-phosphorylated delta isoform of protein kinase C isolated from Chinese hamster ovary cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **121**(6):1047–1053.
982. **Zang Q, Frankel P, y Foster DA** (1995). Selective activation of protein kinase C isoforms by v-Src. *Cell Growth Differ.* **6**(11):1367–1373.
983. **Yuan ZM, Utsugisawa T, Ishiko T, Nakada S, Huang Y, Kharbanda S, Weichselbaum R, y Kufe D** (1998). Activation of protein kinase C delta by the c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Oncogene* **16**(13):1643–1648.
984. **Chen CC y Wu ML** (1995). Protein kinase C isoform delta is involved in the stimulation of the Na(+)-H+ exchanger in C6 glioma cells. *Mol. Pharmacol.* **48**(6):995–1003.
985. **Duyster J, Schwende H, Fitzke E, Hidaka H, y Dieter P** (1993). Different roles of protein kinase C-beta and -delta in arachidonic acid cascade, superoxide formation and phosphoinositide hydrolysis. *Biochemical Journal* **292**(Pt 1):203–207.
986. **Li W, Yu JC, Shin DY, y Pierce JH** (1995). Characterization of a protein kinase C-delta (PKC-delta) ATP binding mutant. An inactive enzyme that competitively inhibits wild type PKC- delta enzymatic activity. *Journal of Biological Chemistry* **270**(14):8311–8318.
987. **McGraw K, McKay R, Miraglia L, Boggs RT, Pribble JP, Muller M, Geiger T, Fabbro D, y Dean NM** (1997). Antisense oligonucleotide inhibitors of isozymes of protein kinase C: in vitro and in vivo activity, and clinical development as anti-cancer therapeutics. *Anti-Cancer Drug Design* **12**(5):315–326.
988. **Dean NM y McKay R** (1994). Inhibition of protein kinase C-alpha expression in mice after systemic administration of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**(24):11762–11766.
989. **Pessino A, Passalacqua M, Sparatore B, Patrone M, Melloni E, y Pontremoli S** (1995). Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of delta protein kinase C expression accelerates induced differentiation of murine erythroleukaemia cells. *Biochemical Journal* **312**(Pt 2):549–554.
990. **Liedtke CM y Cole T** (1997). Antisense oligodeoxynucleotide to PKC-delta blocks alpha 1-adrenergic activation of Na-K-2Cl cotransport. *Am. J. Physiol.* **273**(5 Pt 1):C1632–C1640.
991. **Watanabe T, Ono Y, Taniyama Y, Hazama K, Igarashi K, Ogita K, Kikkawa U, y Nishizuka Y** (1992). Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**(21):10159–10163.

-
992. **Fukumoto S, Nishizawa Y, Hosoi M, Koyama H, Yamakawa K, Ohno S, y Morii H** (1997). Protein kinase C delta inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by suppressing G1 cyclin expression. *Journal of Biological Chemistry* **272**(21):13816–13822.
993. **Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron G, Schaehtle C, Kazanietz MG, Blumberg PM, Pierce JH, y Mushinski JF** (1993). Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *Journal of Biological Chemistry* **268**(9):6090–6096.
994. **Mishima K, Ohno S, Shitara N, Yamaoka K, y Suzuki K** (1994). Opposite effects of the overexpression of protein kinase C gamma and delta on the growth properties of human glioma cell line U251 MG. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **201**(1):363–372.
995. **Harrington EO, Loffler J, Nelson PR, Kent KC, Simons M, y Ware JA** (1997). Enhancement of migration by protein kinase C α and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase C δ in capillary endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **272**(11):7390–7397.
996. **Mischak H, Pierce JH, Goodnight J, Kazanietz MG, Blumberg PM, y Mushinski JF** (1993). Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C- α and - δ and not by protein kinase C- β II, - ϵ , - ζ , and - η . *Journal of Biological Chemistry* **268**(27):20110–20115.
997. **Li W y Pierce JH** (1996). Protein kinase C- δ , an important signaling molecule in the platelet-derived growth factor beta receptor pathway. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **211:55-65**:55–65.
998. **Wang QJ, Acs P, Goodnight J, Giese T, Blumberg PM, Mischak H, y Mushinski JF** (1997). The catalytic domain of protein kinase C- δ in reciprocal delta and epsilon chimeras mediates phorbol ester-induced macrophage differentiation of mouse promyelocytes. *Journal of Biological Chemistry* **272**(1):76–82.
999. **Lehel C, Olah Z, Mischak H, Mushinski JF, y Anderson WB** (1994). Overexpressed protein kinase C- δ and - ϵ subtypes in NIH 3T3 cells exhibit differential subcellular localization and differential regulation of sodium-dependent phosphate uptake. *Journal of Biological Chemistry* **269**(7):4761–4766.
1000. **Saharinen P, Ekman N, Sarvas K, Parker P, Alitalo K, y Silvennoinen O** (1997). The Bmx tyrosine kinase induces activation of the Stat signaling pathway, which is specifically inhibited by protein kinase C δ . *Blood* **90**(11):4341–4353.
1001. **Tseng CP, Kim YJ, Kumar R, y Verma AK** (1994). Involvement of protein kinase C in the transcriptional regulation of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-inducible genes modulated by AP-1 or non-AP-1 transacting factors. *Carcinogenesis* **15**(4):707–711.

1002. **Hirai S, Izumi Y, Higa K, Kaibuchi K, Mizuno K, Osada S, Suzuki K, y Ohno S** (1994). Ras-dependent signal transduction is indispensable but not sufficient for the activation of AP1/Jun by PKC delta. *EMBO J.* **13**(10):2331–2340.
1003. **Ozawa K, Yamada K, Kazanietz MG, Blumberg PM, y Beaven MA** (1993). Different isozymes of protein kinase C mediate feedback inhibition of phospholipase C and stimulatory signals for exocytosis in rat RBL-2H3 cells. *Journal of Biological Chemistry* **268**(4):2280–2283.
1004. **Emoto Y, Kisaki H, Manome Y, Kharbanda S, y Kufe D** (1996). Activation of protein kinase Cdelta in human myeloid leukemia cells treated with 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Blood* **87**(5):1990–1996.
1005. **Sawai H, Okazaki T, Takeda Y, Tashima M, Sawada H, Okuma M, Kishi S, Umehara H, y Domae N** (1997). Ceramide-induced translocation of protein kinase C-delta and -epsilon to the cytosol. Implications in apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **272**(4):2452–2458.
1006. **Bharti A, Kraeft SK, Gounder M, Pandey P, Jin S, Yuan ZM, Lees-Miller SP, Weichselbaum R, Weaver D, Chen LB, Kufe D, y Kharbanda S** (1998). Inactivation of DNA-dependent protein kinase by protein kinase Cdelta: implications for apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **18**(11):6719–6728.
1007. **Fujii T, Garcia-Bermejo ML, Bernabo JL, Caamano J, Ohba M, Kuroki T, Li L, Yuspa SH, y Kazanietz MG** (2000). Involvement of protein kinase C delta (PKCdelta) in phorbol ester-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. Lack of proteolytic cleavage of PKCdelta. *Journal of Biological Chemistry* **275** (11):7574–7582.
1008. **La Porta CA y Comolli R** (1995). Over-expression of protein kinase C delta is associated with a delay in preneoplastic lesion development in diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* **16**(5):1233–1238.
1009. **Geiges D, Marks F, y Gschwendt M** (1995). Loss of protein kinase C delta from human HaCaT keratinocytes upon ras transfection is mediated by TGF alpha. *Exp. Cell Res.* **219**(1):299–303.
1010. **Lu Z, Hornia A, Jiang YW, Zang Q, Ohno S, y Foster DA** (1997). Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta. *Mol. Cell Biol.* **17** (6):3418–3428.
1011. **Gschwendt M, Furstenberger G, Rose-John S, Rogers M, Kittstein W, Pettit GR, Herald CL, y Marks F** (1988). Bryostatins 1, an activator of protein kinase C, mimics as well as inhibits biological effects of the phorbol ester TPA in vivo and in vitro. *Carcinogenesis* **9**(4):555–562.
1012. **Acs P, Beheshti M, Szallasi Z, Li L, Yuspa SH, y Blumberg PM** (2000). Effect of a tyrosine 155 to phenylalanine mutation of protein kinase cdelta on the proliferative and tumorigenic properties of NIH 3T3 fibroblasts. *Carcinogenesis* **21**(5):887–891.

1013. **Reddig PJ, Dreckschmidt NE, Ahrens H, Simsiman R, Tseng CP, Zou J, Oberley TD, y Verma AK** (1999). Transgenic mice overexpressing protein kinase Cdelta in the epidermis are resistant to skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* **59**(22):5710–5718.
1014. **Chen C, Kano M, Abeliovich A, Chen L, Bao S, Kim JJ, Hashimoto K, Thompson RF, y Tonegawa S** (1995). Impaired motor coordination correlates with persistent multiple climbing fiber innervation in PKC gamma mutant mice. *Cell* **83**(7):1233–1242.
1015. **Wilkinson SE, Parker PJ, y Nixon JS** (1993). Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochemical Journal* **294**(Pt 2):335–337.
1016. **Hofmann J** (1997). The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J.* **11**(8):649–669.
1017. **Keenan C, Goode N, y Pears C** (1997). Assay to determine the isoform specificity of protein kinase C inhibitors. *Biochemical Society Transactions* **25**(4):S591–
1018. **Keenan C, Goode N, y Pears C** (1997). Isoform specificity of activators and inhibitors of protein kinase C gamma and delta. *FEBS Letters* **415**(1):101–108.
1019. **Gschwendt M, Muller HJ, Kielbassa K, Zang R, Kittstein W, Rincke G, y Marks F** (1994). Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **199**(1):93–98.
1020. **Gschwendt M, Furstenberger G, Leibersperger H, Kittstein W, Lindner D, Rudolph C, Barth H, Kleinschroth J, Marme D, y Schachtele C** (1995). Lack of an effect of novel inhibitors with high specificity for protein kinase C on the action of the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse skin in vivo. *Carcinogenesis* **16**(1):107–111.
1021. **Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marme D, y Schachtele C** (1993). Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *Journal of Biological Chemistry* **268** (13):9194–9197.
1022. **Sachs CW, Safa AR, Harrison SD, y Fine RL** (1995). Partial inhibition of multidrug resistance by safinol is independent of modulation of P-glycoprotein substrate activities and correlated with inhibition of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **270**(44):26639–26648.
1023. **Bradshaw D, Hill CH, Nixon JS, y Wilkinson SE** (1993). Therapeutic potential of protein kinase C inhibitors. *Agents and Actions* **38**(1-2):135–147.
1024. **Caponigro F, French RC, y Kaye SB** (1997). Protein kinase C: a worthwhile target for anticancer drugs? *Anti-Cancer Drugs* **8**(1):26–33.

1025. **Kielbassa K, Muller HJ, Meyer HE, Marks F, y Gschwendt M** (1995). Protein kinase C delta-specific phosphorylation of the elongation factor eEF-alpha and an eEF-1 alpha peptide at threonine 431. *Journal of Biological Chemistry* **270**(11):6156–6162.
1026. **Venema RC, Peters HI, y Traugh JA** (1991). Phosphorylation of valyl-tRNA synthetase and elongation factor 1 in response to phorbol esters is associated with stimulation of both activities. *Journal of Biological Chemistry* **266**(18):11993–11998.
1027. **Venema RC, Peters HI, y Traugh JA** (1991). Phosphorylation of elongation factor 1 (EF-1) and valyl-tRNA synthetase by protein kinase C and stimulation of EF-1 activity. *Journal of Biological Chemistry* **266**(19):12574–12580.
1028. **Germano P, Gomez J, Kazanietz MG, Blumberg PM, y Rivera J** (1994). Phosphorylation of the gamma chain of the high affinity receptor for immunoglobulin E by receptor-associated protein kinase C-delta. *Journal of Biological Chemistry* **269**(37):23102–23107.
1029. **Jideama NM, Noland TA, Jr., Raynor RL, Blobe GC, Fabbro D, Kazanietz MG, Blumberg PM, Hannun YA, y Kuo JF** (1996). Phosphorylation specificities of protein kinase C isozymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sites within these proteins and regulation of myofilament properties. *Journal of Biological Chemistry* **271**(38):23277–23283.
1030. **Maizels ET, Peters CA, Kline M, Cutler RE, Jr., Shanmugam M, y Hunzicker-Dunn M** (1998). Heat-shock protein-25/27 phosphorylation by the delta isoform of protein kinase C. *Biochemical Journal* **332**(Pt 3):703–712.
1031. **Rosenberger U, Shakibaei M, y Buchner K** (1995). Localization of non-conventional protein kinase C isoforms in bovine brain cell nuclei. *Biochemical Journal* **305**(Pt 1):269–275.
1032. **Beckmann R, Lindschau C, Haller H, Hucho F, y Buchner K** (1994). Differential nuclear localization of protein kinase C isoforms in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Eur. J. Biochem.* **222**(2):335–343.
1033. **Keenan C, Kelleher D, y Long A** (1995). Regulation of non-classical protein kinase C isoenzymes in a human T cell line. *Eur. J. Immunol.* **25**(1):13–17.
1034. **Knutson KL y Hoenig M** (1996). Regulation of distinct pools of protein kinase C delta in beta cells. *J. Cell Biochem.* **60**(1):130–138.
1035. **Owen PJ, Johnson GD, y Lord JM** (1996). Protein kinase C-delta associates with vimentin intermediate filaments in differentiated HL60 cells. *Exp. Cell Res.* **225**(2):366–373.
1036. **Liao L, Ramsay K, y Jaken S** (1994). Protein kinase C isozymes in progressively transformed rat embryo fibroblasts. *Cell Growth Differ.* **5**(11):1185–1194.

1037. **Johnson JA, Gray MO, Chen CH, y Mochly-Rosen D** (1996). A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function. *Journal of Biological Chemistry* **271**(40):24962–24966.
1038. **Dekker LV y Parker PJ** (1997). Regulated binding of the protein kinase C substrate GAP-43 to the V0/C2 region of protein kinase C-delta. *Journal of Biological Chemistry* **272**(19):12747–12753.
1039. **Fujise A, Mizuno K, Ueda Y, Osada S, Hirai S, Takayanagi A, Shimizu N, Owada MK, Nakajima H, y Ohno S** (1994). Specificity of the high affinity interaction of protein kinase C with a physiological substrate, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate. *Journal of Biological Chemistry* **269**(50):31642–31648.
1040. **Izumi Y, Hirai S, Tamai Y, Fujise-Matsuoka A, Nishimura Y, y Ohno S** (1997). A protein kinase Cdelta-binding protein SRBC whose expression is induced by serum starvation. *Journal of Biological Chemistry* **272**(11):7381–7389.
1041. **Mitchell FE, Marais RM, y Parker PJ** (1989). The phosphorylation of protein kinase C as a potential measure of activation. *Biochemical Journal* **261**(1):131–136.
1042. **Arcaro A y Wymann MP** (1993). Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochemical Journal* **296**(Pt 2):297–301.
1043. **Yano H, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y, Nonomura Y, y Matsuda Y** (1993). Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol Chem.* **268**(34):25846–25856.
1044. **Girault JA** (1994). Protein kinases and phosphatases. *Neurotransmissions* **10**(3):1–6.
1045. **Bradford MD y Soltoff SP** (1998). Involvement of protein kinases and phosphatases in tyrosine phosphorylation of PKCdelta in rat parotid acinar cells exposed to secretory stimuli. *European Journal of Morphology* **36 Suppl**:176–180.
1046. **Moussazadeh M y Haimovich B** (1998). Protein kinase C-delta activation and tyrosine phosphorylation in platelets. *FEBS Letters* **438**(3):225–230.
1047. **Romanova LY, Alexandrov IA, Nordan RP, Blagosklonny MV, y Mushinski JF** (1998). Cross-talk between protein kinase C-alpha (PKC-alpha) and -delta (PKC- delta): PKC-alpha elevates the PKC-delta protein level, altering its mRNA transcription and degradation. *Biochemistry* **37**(16):5558–5565.
1048. **Blake RA, Garcia-Paramio P, Parker PJ, y Courtneidge SA** (1999). Src promotes PKCdelta degradation. *Cell Growth Differ.* **10**(4):231–241.
1049. **Barbazuk SM y Gold MR** (1999). Protein kinase C-delta is a target of B-cell antigen receptor signaling. *Immunol. Lett.* **69**(2):259–267.

1050. **Borner C, Guadagno SN, Fabbro D, y Weinstein IB** (1992). Expression of four protein kinase C isoforms in rat fibroblasts. Distinct subcellular distribution and regulation by calcium and phorbol esters. *Journal of Biological Chemistry* **267**(18):12892–12899.
1051. **Huwiler A, Fabbro D, Stabel S, y Pfeilschifter J** (1992). Immunocharacterization of delta- and zeta-isoenzymes of protein kinase C in rat renal mesangial cells. *FEBS Letters* **300**(3):259–262.
1052. **Baldassare JJ, Henderson PA, Burns D, Loomis C, y Fisher GJ** (1992). Translocation of protein kinase C isozymes in thrombin-stimulated human platelets. Correlation with 1,2-diacylglycerol levels. *Journal of Biological Chemistry* **267**(22):15585–15590.
1053. **Knutson KL y Hoenig M** (1997). Subnuclear localization of protein kinase C delta in beta cells. *Biochem. Mol. Med.* **62**(1):50–57.
1054. **Olah Z, Lehel C, Anderson WB, Brenneman DE, y van Agoston D** (1994). Subnanomolar concentration of VIP induces the nuclear translocation of protein kinase C in neonatal rat cortical astrocytes. *Journal of Neuroscience Research* **39**(4):355–363.
1055. **Wang QJ, Bhattacharyya D, Garfield S, Nacro K, Marquez VE, y Blumberg PM** (1999). Differential localization of protein kinase C delta by phorbol esters and related compounds using a fusion protein with green fluorescent protein. *Journal of Biological Chemistry* **274**(52):37233–37239.
1056. **Schafer C, Clapp P, Welsh MJ, Benndorf R, y Williams JA** (1999). HSP27 expression regulates CCK-induced changes of the actin cytoskeleton in CHO-CCK-A cells. *Am. J. Physiol* **277**(6 Pt 1):C1032–C1043.