UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Tesis Doctoral

Inhibición de la Proteína Quinasa C-β mediante RNA antisentido y estudio de su función en la activación de células Jurkat

Memoria que, para optar al grado de Doctora en Biología, presenta

Mª del Carmen Cerviño Gómez

Marzo de 2007

PRIMITIVO BARJA FRANCISCO, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICA:

Que la memoria adjunta, titulada **"Inhibición de la Proteína Quinasa C-β mediante RNA antisentido y estudio de su función en la activación de células Jurkat"**, presentada por Mª del Carmen Cerviño Gómez para optar al grado de Doctora en Biología, ha sido realizada bajo su dirección y que, considerándola concluida, autoriza su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Fdo. Primitivo Barja Francisco

Santiago de Compostela, 26 de marzo de 2007

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en su totalidad en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela, con ayuda de una beca de Tercer Ciclo de la Xunta de Galicia y una beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Durante los años de realización de este trabajo, tuve la suerte de estar rodeada de grandes personas, a las que admiro y respeto, de las que no sólo aprendí cosas relacionadas con la Biología, sino con la vida. A todos estos maestros, mi más profundo agradecimiento. En esta memoria no se recoge sólo mi esfuerzo, ya que no habría sido posible sin vuestra ayuda y vuestro tiempo. Gracias a todos.

A mi director, Primitivo Barja, le agradezco su confianza y apoyo, en lo profesional y en lo personal. Gracias por las conversaciones, las confidencias, el respeto por mi trabajo y mis decisiones y, sobre todo, por portarte como un amigo a pesar de ser un jefe.

Al profesor Manuel Freire Rama le agradezco su lección de generosidad, al aceptarme en su laboratorio y poner a mi disposición sus recursos, tanto materiales como personales. Gracias por acogerme como un miembro más del grupo.

Gracias a mis compañeros-amigos: Willy, Cristina y Conchita, por vuestras lecciones de compañerismo, disciplina, actitud y perspectiva, por vuestra disponibilidad constante para escucharme, animarme, consolarme, ayudarme… Si no fuese por vosotros, todo habría sido mucho más difícil.

A Miguel López Lago, mi predecesor, le agradezco el trabajo adelantado, sus consejos desde la experiencia y su tutoría durante mi estancia en su laboratorio.

Gracias a todos los demás compañeros del departamento de Bioquímica, en el pasado y en el presente, por compartir las alegrías y las decepciones, por los consejos, las sugerencias, los ánimos y la disposición para ayudarme cuando os necesité.

Al área de Biología Celular, gracias por "adoptarme" durante un tiempo, por vuestro apoyo e interés.

A Javier Rodríguez y Juan Viñuela, del Hospital Clínico de Santiago, les agradezco su colaboración en los experimentos de cuantificación de citoquinas y citometría de flujo, respectivamente.

Al profesor Rubén Retuerto le agradezco su enorme ayuda con el análisis estadístico de los resultados de este trabajo.

A Lourdes, compañera de otras fatigas, gracias por las lecciones de optimismo, por las risas en los momentos difíciles y por la confianza incomprensible.

Gracias a Charo y Xandra, por la demostración empírica de que una larga convivencia puede acabar bien, por hacer de nuestro piso una casa y por relativizar los límites de la familia.

A Bea, gracias por la lección de amistad, incondicional y constante, por la paciencia y la confianza. Son demasiados años llenos de agradecimientos para resumir en unas líneas…

A Pablo, gracias por tener lo que me falta y compartirlo conmigo.

Gracias a mi familia, en especial a mis padres, por enseñarme lo más importante y lo que no podría aprender en ningún otro sitio, por hacerlo desde ejemplo y no sólo desde la palabra. Gracias por ser mi referente en la vida.

A mis padres

AIM: Molécula inductora de activación (***A**ctivation **i**nducer **m**olecule*)

AKAP: Proteína de anclaje de la quinasa A (***A** **k**inase **a**nchoring **p**rotein)*

AP-1: Proteína activadora 1 (***A**ctivator **p**rotein **1***)

as-PKCα-pREP3: Vector pREP-3 que contiene un inserto antisentido de PKCα. (También utilizado para hacer referencia a las células transfectadas con él)

as-PKCβ-pREP3: Vector pREP-3 que contiene un inserto antisentido de PKCβ. (También utilizado para hacer referencia a las células transfectadas con él)

ATF: Factores de transcripción activadores (***A**ctivating **t**ranscription **f**actors*)

Bcl: Proteínas cuyo nombre deriva de "linfoma de células B" *(**B** **c**ell **l**ymphoma)*

BCR: Receptor de célula B (***B** **c**ell **r**eceptor*)

Btk: *Bruton's tyrosine kinase*

bZIP: Cremallera de leucina básica (***B**asic **zip**per*)

CalM: Calmodulina

CalN: Calcineurina

Cdc: Ciclina (**C**iclo de **d**ivisión **c**elular)

Cdk: Quinasa dependientes de ciclina *(**C**yclin **d**ependent **k**inase)*

CPA: Célula presentadora de antígeno, también denominada **APC** (***A**ntigen **P**resenting **C**ell*)

CTLA-4: Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (***C**ytotoxic **T** **l**ymphocyte **a**ntigen **4***)

DAG: Diacilglicerol

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMSO: Dimetil sulfóxido

dsRNA: RNA de doble cadena (***d**ouble-**s**tranded **RNA***)

DTT: Ditiotreitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: Ácido etilenglicoltetraacético

ELISA: Análisis inmunosorbente ligado a enzimas (***E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay)*

Elk-1: Gen similar a Ets (***E**ts-**lik**e gene **1***)

ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares (***E**xtracellular signal-**r**egulated **k**inase*)

FasL: Ligando de Fas

Gads: Proteína adaptadora relacionada con Grb2 (***G****rb2-related* ***ad****aptor protein*)

GAP: Proteína activadora de GTPasa (***G****TPase-****a****ctivating* ***p****rotein*)

GEF: Factor de intercambio de nucleótidos de guanina (***G****uanine-nucleotide* ***e****xchange* ***f****actor*)

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (***G****ranulocyte-* ***m****acrophage* ***c****olony-****s****timulating* ***f****actor*)

Grb2: Proteína de unión a receptores de factores de crecimiento (***G****rowth factor* ***r****eceptor* ***b****inding protein* **2**)

GrpL: Proteína del sistema linfoide relacionada con Grb2 *(****G****rb2-****r****elated* ***p****rotein of the* ***l****ymphoid system)*

HRP: Peroxidasa de rábano (***H****orse****r****adish* ***p****eroxidase*)

Hsp: Proteína de choque térmico (***H****eat* ***s****hock* ***p****rotein*)

ICAM: Molécula de adhesión intercelular *(****I****nter****c****ellular* ***a****dhesion* ***m****olecule)*

IFN-γ: Interferón γ

Ig: Inmunoglobulina

I-κB: Inhibidor de NF-κB (***I****nhibitor of NF-****κB***)

IKK: Quinasas de I-κB (***I****-****κ****B* ***k****inase*)

IL: Interleuquina

IL-2R: Receptor de interleuquina 2

IP_3: *myo*-Inositol-1,4,5-trisfosfato (*myo*-**I**nositol-1,4,5-tris**p**hosphate)

ITAM: Motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor (***I****mmunoreceptor* ***t****yrosine-based* ***a****ctivation* ***m****otif)*

Itk: Quinasa de células T inducible por interleuquina-2 (***I****nterleukin-2 inducible* ***T****-cell* ***k****inase)*

JIP: Proteína de interacción con JNK *(****J****NK* ***i****nteracting* ***p****rotein)*

JNK: Quinasas N-terminal de jun (***J****un* ***N****-terminal* ***k****inase*)

LAT: Adaptador para la activación de las células T (***L****inker for* ***a****ctivation of* ***T*** *cells*)

Lck: Tirosina quinasa específica de linfocitos (***L****ympho****c****yte-specific tyrosine kinase*)

LFA-1: Antígeno 1 asociado a la función linfocitaria (***L****ymphocyte* ***F****unction-****A****ssociated Antigen-****1***)

LIP: Proteína de interacción con PKCλ *(PKC-**L**ambda **i**nteracting **p**rotein)*

LT: Linfotoxina

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos (***M**itogen-**a**ctivated **p**rotein **k**inase*)

MARCKS: Sustratos de la quinasa C ricos en alanina, miristoilados (***M**yristoilated, **a**lanine-**r**ich **C**-**k**inase **s**ubstrate*)

MEF: Factor de transcripción cuyo nombre deriva de *Myocyte enhancer factor*

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad (*Major histocompatibility complex)*, denominado también CPH

MKP: Map quinasa fosfatasa (***M**ap **k**inase **p**hosphatase*)

NF-AT: Factor nuclear de células T activadas (***N**uclear **f**actor of **a**ctivated **T** cells*)

NF-κB: Factor nuclear κB (***N**uclear **f**actor **κB***)

NK: Células agresoras naturales (***N**atural **K**iller cells*)

Oct: Proteína de unión al octámero

PC: Fosfatidilcolina (***P**hosphatidyl**c**holine*)

PDK-1: Quinasa-1 dependiente de fosfoinosítidos (*Phosphoinositide-dependent kinase-1*)

PEG: Polietilenglicol

PH: Dominio de homología a plecstrina (**P**lekstrin **h**omology domains)

PI: Fosfatidilinositol (***P**hosphatidyl**i**nositol*)

PI3K: Fosfatidil-inositol 3-quinasa (***P**hosphatidyl-**i**nositol **3**-**k**inase*)

PIP_2: Fosfatidil-inositol-4, 5-bisfosfato (***P**hosphatidyl-**i**nositol- 4, 5-bis**p**hosphate)*. También PtdIns (4,5) BP

PIP_3: Fosfatidil-inositol-3, 4, 5-trisfosfato (***P**hosphatidyl-**i**nositol 3, 4, 5-tris**p**hosphate)*. También PtdIns (3,4,5)

PKA: Proteína quinasa A

PKB: Proteína quinasa B (También llamada Akt)

PKC: Proteína quinasa C

PKCa: PKCs atípicas

PKCc: PKCs convencionales o clásicas

PKCn: PKCs nuevas

PKD: Proteína quinasa D

PKG: Proteína quinasa G

PLC: Fosfolipasa C (***P****hospho****l****ipase* ***C***)

PLD: Fosfolipasa D (***P****hospho****l****ipase* ***D***)

PMA: Forbol miristato acetato (***P****horbol 12-****m****yristate 13-****a****cetate*). También denominado TPA.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

POPOP: 2,2-parafenil-bis-5-feniloxazol

PP2A: Proteína fosfatasa de tipo 2A (***P****rotein* ***p****hosphatase* ***2A***)

PP2B: Proteína fosfatasa de tipo 2B (***P****rotein* ***p****hosphatase* ***2B)***

PPO: 2,5-difeniloxazol

PS: Fosfatidilserina (***P****hosphatidyl****s****erine*)

PTEN: Proteína fosfatasa y homóloga de la tensina

RACK: Receptor de quinasa C activada (***R****eceptor for* ***a****ctivated* ***C*** ***k****inase*)

Raf: Factor activado por ras (***R****as* ***a****ctivated* ***f****actor*)

RasGRP: Proteína liberadora de nucleótidos de guanina de Ras (***Ras*** ***G****uanyl nucleotide* ***R****elease* ***P****rotein*)

RISC: Complejo silenciador inducido por RNA *(****R****NA-****i****nduced* ***s****ilencing* ***c****omplex)*

Rlk: Proteína quinasa similar a receptor (***R****eceptor* ***l****ike protein* ***k****inase*)

RNAi: RNA de interferencia

RNasa H: Ribonucleasa de híbridos (***R****ibo****n****ucle****ase*** ***h****ybrid*)

RT-PCR: Transcripción inversa-PCR (***R****everse-****T****ranscription* ***PCR***)

SAPK: Quinasa activada por estrés (***S****tress* ***A****ctivated* ***P****rotein* ***K****inase*)

SDS: Dodecil sulfato sódico (***S****odium* ***D****odecyl* ***S****ulphate*)

SEK: SAPK/ERK quinasa *(****S****APK/****E****RK* ***K****inase)*

SH2: Dominio de homología src tipo 2 (***s****rc* ***h****omology type* ***2*** *domain*)

SHIP: Fosfatasa del inositol en posición 5′ que contiene un dominio SH2 *(****SH****2-containing* ***i****nositol-5-****p****hosphatase)*

siRNA: Moléculas de RNA de interferencia pequeñas (***s****mall* ***i****nterfering* ***RNA****)*

SLP-76: Fosfoproteína de 76 kD específica de leucocitos que contiene el dominio SH2 *(**S**H2 domain-containing **l**eukocyte-specific **p**hosphoprotein of **76** kD)*

SMAC: Complejo de activación supramolecular (***S**upra**m**olecular **A**ctivation **C**omplex*)

SoS: Proteína cuyo nombre deriva de "Hijo de sevenless" (***S**on **o**f **s**evenless)*

STAT: Transductor de señales y activador de transcripción *(**S**ignal **t**ransducer and **a**ctivator of **t**ranscription)*

STICKs: Sustratos que interaccionan con la quinasa C *(**S**ubstrates **t**hat **i**nteract with **C** **k**inase)*

TAC: Antígeno de activación de las células T (***T**-cell **ac**tivation antigen*)

T_c: Linfocito T citotóxico

TCA: Ácido tricloroacético

TCR: Receptor de célula T (***T** **c**ell **r**eceptor*)

TGF-β: Factor de crecimiento transformante-β (***T**ransforming **g**rowth **f**actor-**β***)

T_h: Linfocito T colaborador (***T** **h**elper*)

TMB: Tetrametilbenzidina

TNF: Factor de necrosis tumoral (***T**umor **n**ecrosis **f**actor*)

TPA: 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (12-*O*-**t**etradecanoyl**p**horbol-13-**a**cetate). También denominado PMA.

TRE: Elemento de respuesta al TPA

Treg: Linfocito T regulador

VCAM: Molécula de adhesión de células vasculares (***V**ascular **c**ell **a**dhesion **m**olecule*)

ZAP-70: Proteína de 70 kD asociada a la cadena ζ del TCR (***Z**eta-chain (TCR) **a**ssociated **p**rotein kinase **70** kDa)*

ZIP: Proteína de interacción con PKCζ *(PKC-**Z**eta **i**nteracting **p**rotein)*

I. Introducción 3

1. La activación de las células T 5

1.1. El reconocimiento antigénico y las señales coestimuladoras 8

1.2. Las cascadas de señalización celular 10

1.2.1. La proteína Ras 10
1.2.2. La familia de GTPasas Rho 11
1.2.3. Metabolismo de los lípidos de inositol 12
1.2.4. Las cascadas de MAP quinasas 13
1.2.5. Activación de factores de transcripción 17

1.3. Marcadores de activación en los linfocitos T 20

1.3.1. IL-2 e IL-2R 20
1.3.2. CD69 22
1.3.3. IFN-γ 22
1.3.4. IL-8 23
1.3.5. TNF-α 23
1.3.6. TNF-β 23

2. La proteína quinasa C (PKC) 24

2.1. Localización de la PKC 26

2.2. Estructura de la PKC 28

2.2.1. Dominio pseudosustrato 29
2.2.2. Dominio C1 29
2.2.3. Dominio C2 30
2.2.4. Región V3 30
2.2.5. Dominio catalítico 30
2.2.6. Región V5 31

2.3. Regulación de la PKC 31

2.3.1. Regulación por fosforilación 31
2.3.2. Regulación por cofactores 33
2.3.2.1. Fosfatidilserina 33
2.3.2.2. DAG y ésteres de forbol 33
2.3.2.3. Ca^{2+} 34
2.3.2.4. Ácidos grasos libres y lisofosfolípidos 34
2.3.2.5. Fosfatidilinosítidos 34
2.3.2.6. Segundos mensajeros inhibidores 34
2.3.3. Regulación por unión a proteínas de anclaje 35
2.3.4. Proteolisis 36

2.4. Sustratos de PKC 39

2.5. Métodos de estudio de la participación de la PKC en la transducción de señales 39

La tecnología antisentido 42

2.6. Funciones específicas de las isoformas de PKC 45

2.7. La PKC en la activación de los linfocitos T 47

La PKCβ y su papel en la activación de las células T 50

II. Antecedentes 55

III. Objetivos 59

IV. Material y Métodos 63

1. Cultivos celulares 63

2. Observación de la morfología celular 64

3. Análisis del número y viabilidad de las células 64

4. Plásmidos 64

5. Preparación de bacterias electrocompetentes 65

6. Transformación de bacterias 66

7. Purificación del plásmido a gran escala (Maxiprep) 66

8. Transfección celular 68

9. Obtención de clones celulares 68

10. Selección de clones con expresión reducida de PKCβ 69

11. Detección de isoenzimas de PKC mediante *Western blot* 71

12. Inmunoprecipitación 71

12.1. Ensayos de actividad quinasa 72

12.2. Análisis de los inmunoprecipitados mediante *Western blot* 73

12.3. Condiciones de inmunoprecipitación de la PKCα 73

12.4. Condiciones de inmunoprecipitación de la PKCβ 74

13. Demostración de la presencia del plásmido mediante PCR en las células transfectadas 74

13.1. Preparación de la muestra 74

13.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 75

14. Análisis de la expresión del mRNA de PKCβ mediante transcripción inversa-PCR (RT-PCR) 76

14.1. Extracción de RNA ... 76
14.2. Síntesis de cDNA ... 77
14.3. PCR ... 77
15. Ensayos de proliferación ... 78
16. Análisis de expresión de antígenos de la superficie celular mediante citometría de flujo ... 78
17. Análisis de la producción de citoquinas mediante ensayos basados en el reconocimiento antígeno-anticuerpo ... 79
17.1. Análisis de la expresión de IL-2 e IFN-γ ... 79
17.2. Análisis de la expresión de IL-8 y TNF-α ... 80
18. Análisis de la producción de citoquinas mediante RT-PCR ... 80
19. Detección de proteínas fosforiladas en tirosina y estudio de la activación de proteínas de las cascadas de MAP quinasas ... 81
20. Análisis estadístico ... 82
V. Resultados ... 85
1. Obtención de líneas celulares con reducción en la expresión de PKCβ ... 87
1.1. Transfección de células Jurkat con los vectores pREP3 y as-PKCβ-pREP3 ... 87
1.2. Obtención y selección de clones control y clones deficientes en PKCβ ... 88
2. Caracterización de la inhibición de PKCβ ... 90
2.1. Análisis de la selectividad de la inhibición de la expresión de PKCβ ... 90
2.2. Inmunoprecipitación de PKCβ en las poblaciones clonales ... 91
2.2.1. Ensayos de actividad quinasa en los inmunoprecipitados ... 91
2.2.2. Análisis de los inmunoprecipitados mediante *Western blot* ... 91
2.3. Análisis de la presencia del plásmido as-PKCβ-pREP3 en los clones antisentido ... 93
2.4. Estudio del efecto del RNA antisentido sobre los niveles de mRNA de PKCβ ... 94
3. Estudio de la morfología y estado de agregación, viabilidad y proliferación de líneas celulares con inhibición selectiva de PKCβ ... 96
3.1. Morfología y estado de agregación de las células ... 96
3.2. Análisis de la viabilidad celular ... 99
3.3. Ensayos de actividad proliferativa ... 99

4. Estudio de la activación en las líneas celulares recombinantes 101

4.1. Expresión de marcadores de activación 102

4.1.1. CD25 102
4.1.2. CD69 104

4.2. Producción de citoquinas 107

4.2.1. IL-2 107
4.2.2. IFN-γ 109
4.2.3. IL-8 109
4.2.4. TNF-α 111
4.2.5. TNF-β 112

4.3. Efecto de la inhibición de PKCβ sobre el patrón de fosforilación en tirosina de las proteínas celulares durante la activación 113

4.4. Efecto de la reducción en la expresión de PKCβ sobre la activación de MAP quinasas de los grupos ERK, p38 y JNK 114

VI. Discusión 123

Inhibición específica de PKCβ en células Jurkat 125

Efectos del RNA antisentido de PKCβ en la biología de las células Jurkat 127

Efectos del vector as-PKCβ-pREP3 en la activación de las células Jurkat 130

La inhibición de PKCβ en las cascadas de señalización celular 138

VII. Conclusiones 147

VIII. Bibliografía 151

IX. Apéndice 173

1. Efecto de la inhibición de la expresión de PKCα mediante RNA antisentido en la activación de MAP quinasas (ERK, JNK y p38) y el factor de transcripción ATF-2 174

2. Secuencia del cDNA de PKCβ1 y PKCβ2 176

3. Secuencia de aminoácidos de PKCβ1 y PKCβ2 181

I. INTRODUCCIÓN

El sistema inmunitario ha evolucionado para proporcionar a los organismos un mecanismo flexible y dinámico que permite responder específicamente a una amplia variedad de antígenos. Para que su actividad sea eficaz, el antígeno debe ser reconocido, provocando una respuesta en las células del sistema inmunitario. Este mecanismo de protección tiene dos componentes que actúan en colaboración: la inmunidad innata, que proporciona herramientas que no son específicas para un antígeno concreto, y la inmunidad adaptativa o específica.

El sistema inmunitario innato constituye la primera línea de defensa frente a la invasión por el patógeno y consta de barreras anatómicas, fisiológicas, fagocíticas e inflamatorias. En esta respuesta participan receptores que reconocen patrones moleculares que están presentes en muchos microorganismos y no en el propio individuo: los receptores tipo Toll y la familia de proteínas Nod. Estos receptores reconocen características estructurales comunes en los microorganismos, y mediante la interacción con proteínas intracelulares transducen señales que provocan un aumento de la expresión de genes que codifican citoquinas y otros mediadores de la inflamación. El complemento, los fagocitos y las células NK (células agresoras naturales), completan esta respuesta.

El sistema inmunitario adaptativo, a diferencia del innato, presenta una gran especificidad por el antígeno. Los linfocitos T y B representan los componentes del sistema inmunitario capaces de reconocer al antígeno específicamente, mediante los receptores que presentan en su superficie: el TCR o receptor de células T, y el BCR o receptor de células B. Estas estructuras presentan una gran variabilidad, debido a las reordenaciones somáticas que experimentan los genes que los codifican, que permiten la formación de millones de receptores antigénicos con especificidad por diferentes antígenos. A diferencia de los linfocitos B, que reconocen al antígeno directamente a través de su receptor, los linfocitos T sólo pueden hacerlo si éste se presenta unido a las moléculas del MHC de la superficie de las células presentadoras de antígeno (Kindt, 2007; Chaplin, 2006).

Los linfocitos T desempeñan un papel vital en la respuesta inmunitaria adaptativa, mediante la que el organismo elimina infecciones bacterianas y virales y destruye células

tumorales. En esta respuesta participan los linfocitos T colaboradores (o $CD4^+$), que promueven, mediante la secreción de citoquinas, la activación de los macrófagos, la producción de anticuerpos por los linfocitos B y la expansión clonal de los linfocitos T citotóxicos (o $CD8^+$). Estos últimos reconocen antígenos virales expresados en la mayoría de células infectadas por virus y, junto con las células NK, los macrófagos y los linfocitos B, median la destrucción de células malignas. Un tercer tipo de linfocitos T está constituido por las células T reguladoras (Treg), que pueden inhibir la proliferación de otras subpoblaciones de células T de forma específica, ya que su respuesta depende de la activación a través del TCR (Kindt, 2007).

La adaptabilidad es la característica principal de este sistema. Sólo aquellos clones con un TCR que presente la afinidad apropiada para un antígeno concreto serán activados por su unión, proliferando y dando lugar a células efectoras. Además, después de la eliminación de la infección, los clones específicos permanecen como linfocitos de memoria, originando una respuesta más rápida ante una segunda exposición al mismo antígeno (Wilkinson y Nixon, 1998).

Las células del sistema inmunitario se activan como resultado de las interacciones entre los inmunorreceptores y sus ligandos correspondientes. Estos receptores reclutan proteínas tirosina quinasas citoplasmáticas, que inician una serie de cascadas de señalización que culminan con la activación celular. Para compensar estos mecanismos activadores, las células también disponen de un sistema que restringe la duración o la intensidad de la señal y que implica, igual que la activación, la actividad de receptores, quinasas, fosfatasas, proteínas adaptadoras y ubiquitina ligasas, siendo imprescindible para el mantenimiento de la función inmunitaria (Koretzky y Boerth, 1999; Samelson, 2002; Veillette *et al*., 2002; Mustelin, 2003).

1. LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS T

La activación es el proceso mediante el cual las células quiescentes sufren cambios que las capacitan para efectuar una respuesta inmunitaria, y que implican la proliferación y diferenciación celular. Durante este proceso, que dura aproximadamente dos semanas, se activan más de cien genes en la célula. Entre estos genes se encuentran los que codifican diversos factores de transcripción, factores de crecimiento y citoquinas, mediadores de migración celular, moléculas implicadas en el contacto entre células, moléculas asociadas con la memoria inmunológica y proteínas que participan en el control de la división celular (Ullman *et al.*, 1990; Crabtree *et al.*, 1994).

La activación de las células T requiere al menos dos estímulos: uno procedente de la interacción entre el TCR y el antígeno y otro proporcionado por correceptores de superficie celular, como el CD28. La unión de estos receptores a sus ligandos provoca la activación de una serie de cascadas de señalización que actúan de forma sinérgica y culminan con la activación de la transcripción del gen de la IL-2 y la proliferación celular (Favero y Lafont, 1998). En la figura I-1 se representan los acontecimientos fundamentales en la activación de los linfocitos T.

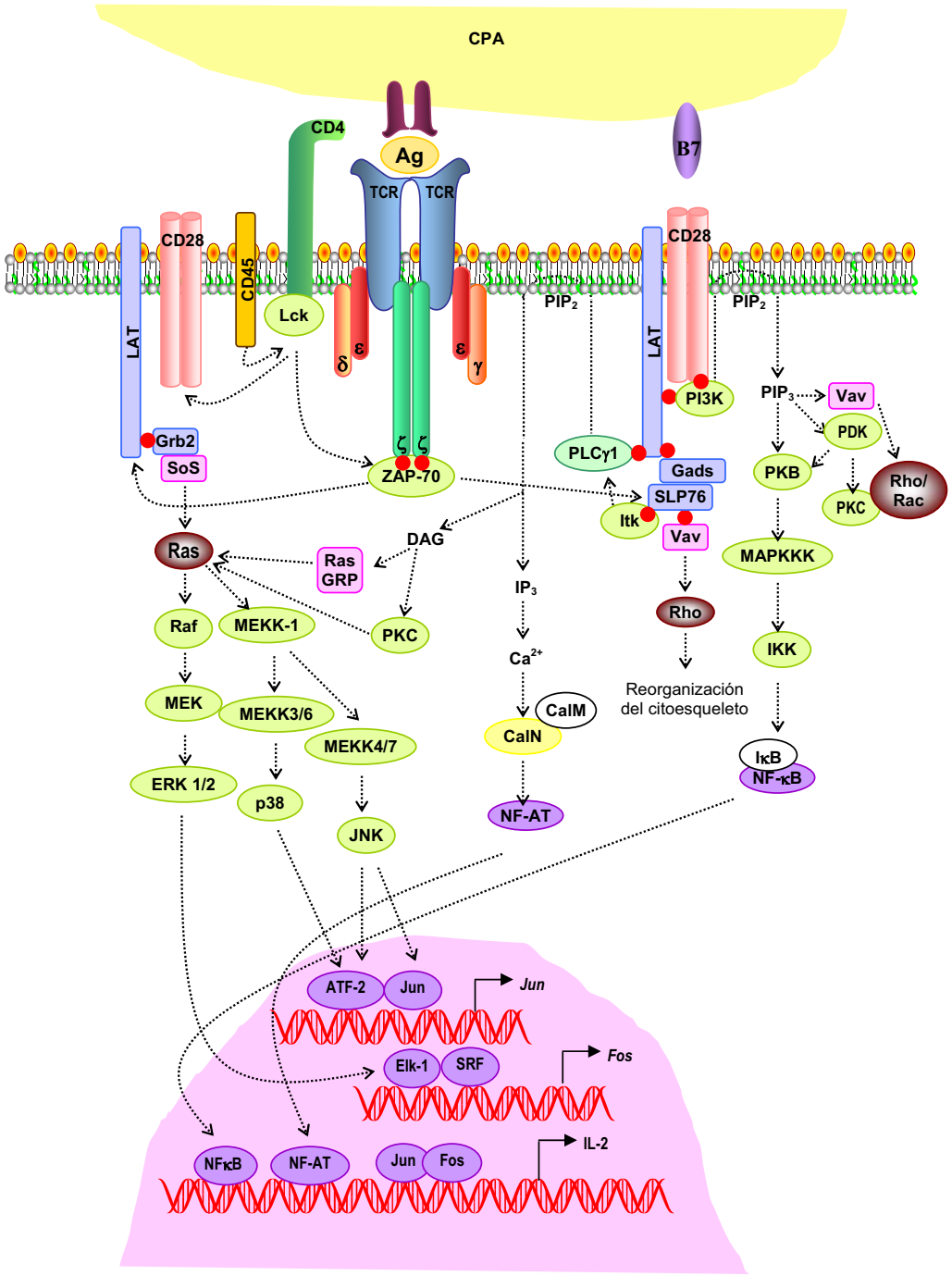
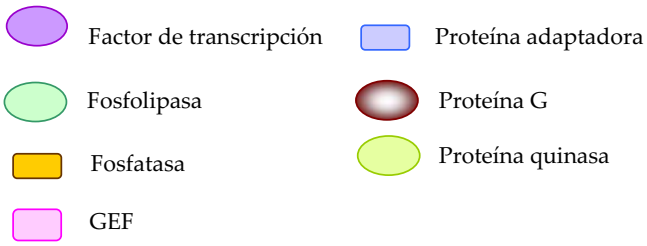

CPA
CD4
Ag
TCR
TCR
B7
CD28
CD45
LAT
Lck
δ
ε
ε
γ
ζ
ζ
PIP2
PIP2
CD28
LAT
PI3K
PIP3
Vav
PDK
PKB
PKC
Rho/
Rac
Grb2
SoS
ZAP-70
PLCγ1
Gads
SLP76
Itk
Vav
Ras
Ras
GRP
DAG
IP3
Rho
MAPKKK
Raf
MEKK-1
PKC
Ca2+
IKK
MEK
MEKK3/6
CaIM
Reorganización
del citoesqueleto
MEKK4/7
CaIN
IκB
NF-κB
ERK 1/2
p38
JNK
NF-AT
ATF-2
Jun
Jun
Elk-1
SRF
Fos
NFκB
NF-AT
Jun
Fos
IL-2

Figura I-1. Principales vías de señalización en la activación de los linfocitos T. En este esquema se resumen las vías de señalización que, comenzando con el reconocimiento antigénico por el TCR, culminan en la síntesis de IL-2. Para su mejor comprensión, se han obviado algunas rutas de señalización del CD28, las rutas inhibidoras y algunas de las proteínas adaptadoras que participan en este proceso. Las moléculas LAT y CD28 se han duplicado para una mayor claridad del esquema. (Adaptado de Lin y Weiss, 2001).



1.1. El reconocimiento antigénico y las señales coestimuladoras

Para que se produzca la activación de la célula T, el TCR debe reconocer al péptido antigénico procesado unido a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I o clase II de la célula presentadora de antígeno.

El TCR está compuesto por seis cadenas polipeptídicas, que se asocian formando dímeros. La especificidad del reconocimiento del antígeno está determinada por las cadenas TCRα y TCRβ, derivadas de un proceso de reordenación génica. Estas cadenas forman un heterodímero, que se une directamente al péptido unido a la molécula de MHC. Una minoría de células T presenta un receptor compuesto por las cadenas TCRγ, similar a TCRβ, y TCRδ, con gran homología en su secuencia al TCRα. La comunicación con las moléculas señalizadoras en el interior de la célula se realiza mediante las cadenas de CD3, que se encuentran formando dímeros: γε, δε y ζζ. Estos péptidos contienen unas secuencias características, denominadas ITAM (motivos de activación basados en tirosina), una en cada cadena γ, ε y δ, y tres en las cadenas ζ. Estas tirosinas son fosforiladas rápidamente por la tirosina quinasa Lck, de la familia de proteínas Src (activada, a su vez, por la fosfatasa CD45), tras la unión del TCR al antígeno (Germain, 2001; Huang y Wange, 2004; Mustelin, 2003). Al fosforilarse, esos residuos de tirosina actúan como sitios de unión para las proteínas que contienen secuencias de tipo SH2 (dominios de homología a Src).

Además de las cascadas de señalización del TCR/CD3, la activación completa de las células T requiere señales coestimuladoras. El correceptor mejor caracterizado de las células T es el CD28, que tras la interacción con sus ligandos, B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), expresados en la célula presentadora de antígeno, potencia la expresión de IL-2 y la proliferación celular (Favero y Lafont, 1998). El CTLA-4 (antígeno 4 de células T citotóxicas) es una molécula que se une a los mismos ligandos que CD28, proporcionando una señal negativa que antagoniza la de CD28 y limita la magnitud y duración de la activación de la célula T (Tseng y Dustin, 2002). El CD28 y el CTLA-4 son glucoproteínas expresadas como homodímeros en las células T, que en sus regiones

citoplasmáticas poseen motivos de tirosina implicados en la transducción de señales y el tráfico de proteínas. Estas dos moléculas presentan diferentes patrones de expresión en los linfocitos T: CD28 se expresa constitutivamente a niveles relativamente constantes en la superficie de las células $CD4^+$ y $CD8^+$. Al contrario, el CTLA-4 se detecta en la superficie celular 24 horas después de la activación de las células T y se une al ligando con mayor afinidad (Chambers y Allison, 1999).

El CD4 y el CD8 son glucoproteínas de membrana expresadas por las células T que se unen a las moléculas de MHC de clase II y de clase I, respectivamente, formando un complejo con el TCR y el ligando unido al MHC. Debido a esto, reciben el nombre de correceptores (Germain, 2001). EL CD4 se expresa sólo en células T colaboradoras (Th), y el CD8 se expresa exclusivamente en células T citotóxicas (Tc). Aunque inicialmente se propuso que actuaban como moléculas de adhesión, potenciando la unión entre el linfocito T y la célula presentadora de antígeno, actualmente se cree que su función principal es la participación activa en la señalización de las células T. Tanto el CD4 como el CD8 participan en la transducción de señales del TCR a través de su asociación con la proteína Lck (Cole y Gao, 2004; König y Zhou, 2004). En el caso de CD4 se ha descrito, además, su implicación en la regulación de los niveles de AMPc en las células estimuladas, mediante la transducción de señales coestimuladoras tras su unión al MHC de clase II (König y Zhou, 2004).

La sinapsis inmunológica, conocida también como SMAC (complejo de activación supramolecular) es una estructura ordenada formada en el lugar de contacto entre el linfocito T y la célula presentadora de antígeno. Esta región, altamente enriquecida en microdominios de membrana con elevada proporción de colesterol y esfingolípidos (denominados *rafts* lipídicos), se caracteriza por presentar una zona central rica en TCR y la proteína quinasa C-θ (PKCθ), rodeados por una zona con abundantes moléculas de adhesión, como LFA-1 (Germain, 2001; Huang y Wange, 2004). Para que se forme la sinapsis inmunológica, debe producirse una reorganización del citoesqueleto de actina y, aunque no es necesaria para la señalización del TCR, sí se precisa para una

señalización prolongada, la producción de IL-2 y la proliferación. Además, puede amplificar señales débiles del TCR o atenuar señales fuertes (Huang y Wange, 2004).

1.2. Las cascadas de señalización celular

Cuando las secuencias ITAM de las subunidades del CD3 se fosforilan, ZAP-70 (una tirosina quinasa de la familia Syk) se une a ellas mediante sus dominios SH2. En ese momento, ZAP-70 se fosforila y activa, permitiendo la fosforilación de sus sustratos: LAT y SLP76. Estas proteínas poseen una función adaptadora, al permitir el ensamblaje de moléculas que participan en la transducción de señales en su localización celular correcta. Mediante estas proteínas se relaciona la señal del receptor antigénico con las cascadas de señalización que actúan durante el proceso de activación de los linfocitos T, siendo las principales las rutas de las familias de proteínas G Rho y Ras. Además, estas proteínas adaptadoras controlan el metabolismo de fosfolípidos de inositol, que regula la concentración de calcio intracelular y la actividad de serina/treonina quinasas (Cantrell, 2002).

El CD28 tiene una cola citoplasmática que, cuando se fosforila en sus residuos de tirosina, proporciona sitios de unión para la PI3K (Fosfatidil Inositol 3 quinasa) y para la molécula adaptadora Grb2 (Wilkinson y Nixon, 1998). Además, la unión del CD28 al B7 puede generar señales independientes del TCR que conducen a la activación de IKK y NF-κB (Marinari *et al.*, 2004).

1.2.1. La proteína Ras

Ras es una familia de proteínas de unión a nucleótidos de guanina que se acumula rápidamente en su forma activa (unida a GTP) en células activadas. Su función es esencial para el desarrollo de las células T en el timo y, en células T periféricas, tiene un papel fundamental en la inducción de genes de citoquinas (Cantrell, 2002).

El ciclo de unión de Ras a nucleótidos de guanina es controlado por las proteínas de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), que promueven la transición entre el estado inactivo (proteína unida a GDP) y el activo (proteína unida a GTP), y las proteínas activadoras de GTPasa (GAP), que estimulan la actividad GTPasa de Ras, provocando la hidrólisis del GTP. La reacción de intercambio de nucleótidos activa Ras, mientras que la actividad GAP la inactiva (Cantrell, 2002). En los linfocitos T, Ras se activa a través de dos proteínas GEF: SoS y RasGRP1, reclutadas por las proteínas adaptadoras Grb2 y LAT, y mediante el segundo mensajero DAG, respectivamente (Roose *et al.*, 2005). LAT no sólo actúa como proteína adaptadora para la ruta de señalización de Ras, sino que también actúa ensamblando distintos complejos: cuando está fosforilada en tirosina interacciona con PLCγ1 (Fosfolipasa Cγ1), reclutándola a la membrana. La proteína adaptadora SLP76 también se une a LAT mediante proteínas adaptadoras tipo Grb2: Gads, GrpL o Grf40 (Cantrell, 2002).

Una vez activada, Ras ejerce sus funciones mediante la unión a diferentes proteínas efectoras, entre las que se encuentran PI3K, MAPKKK1 y Raf, activando así rutas de señalización divergentes (Roose *et al.*, 2005).

1.2.2. La familia de GTPasas Rho

Rac y Rho son proteínas G monoméricas, cuya actividad es estimulada por las proteínas GEF. Aunque las vías de señalización reguladas por Rho no se conocen totalmente, se sabe que participa en las rutas de supervivencia de precursores de células T, y promueve respuestas mediadas por el receptor antigénico en timocitos y linfocitos periféricos. La función de Rac es esencial para la transducción de señales pre-TCR y el control de la selección positiva y negativa de timocitos. Aunque la actividad de Rac y Rho en las células T se manifiesta en modificaciones del citoesqueleto de actina, sus funciones no se limitan a esto, ya que también influyen en la regulación de las proteínas p38 y JNK, y en la activación de factores de transcripción (Cantrell, 2002).

1.2.3. Metabolismo de los lípidos de inositol

La estimulación del TCR provoca la hidrólisis de PI(4,5)BP, catalizada por la PLCγ (fosfolipasa C γ), que produce 1, 4, 5-IP_3 y DAG. El 1, 4, 5-IP_3 inicia un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, y el DAG se une a dominios específicos de ciertas proteínas señalizadoras. Las proteínas de unión a DAG implicadas en la activación de linfocitos incluyen a las serina/treonina quinasas de la familia PKC, PKD y el GEF de Ras GRP (Cantrell, 2002).

La activación de la PLCγ1 por el receptor requiere las actividades de Lck, ZAP-70 y de Tec quinasas, como Rlk e Itk. La interacción entre LAT y SLP76 parece contribuir a la activación de PLCγ1, ya que esta última recluta a la quinasa Itk, coordinando la fosforilación y activación de PLCγ1 (Cantrell, 2002).

Probablemente, los acontecimientos clave de la activación del receptor antigénico son la activación sostenida de Ca^{2+} intracelular y la producción de DAG. Las células T expresan diferentes isoformas de PKC reguladas por DAG y, algunas de ellas, también por Ca^{2+}. Aunque todas presentan un dominio catalítico altamente conservado, las diferencias en su localización celular sugieren diferentes funciones *in vivo*. Las dianas más inmediatas de PKC son desconocidas, pero estudios recientes sugieren su participación en la actividad de las PKD. Esto revela la existencia de una red de señalización entre distintas proteínas de unión a DAG que puede amplificar y diseminar las señales generadas por el receptor en la membrana plasmática (Cantrell, 2002).

Otra enzima que participa en el metabolismo de los fosfatos de inositol es la PI3K, que fosforila PI(4,5)BP produciendo PI(3,4,5)P_3 (PIP_3). Los fosfoinosítidos pueden unirse a los dominios de homología a plecstrina (PH) de proteínas, controlando la actividad y localización celular de diferentes moléculas de transducción de señales. Entre las proteínas con dominios PH que se regulan a través de la actividad PI3K se encuentran Vav (mediante la cual se activan las rutas de Rho y Rac, que coordinan la

organización del citoesqueleto de actina), las quinasas de la familia Tec (como Itk), PKB/Akt y PDK-1, que fosforila los lazos de activación de muchas quinasas de la superfamilia AGC, integrada por PKA, PKG y PKC.

Hay dos rutas de degradación de PIP3 que, por tanto, regulan las rutas activadas por PI3K: la desfosforilación por las fosfatasas PTEN y SHIP (Cantrell, 2001 y 2002).

1.2.4. Las cascadas de MAP quinasas

Las MAP quinasas (MAPK) son proteínas reguladoras de la señalización celular conservadas a lo largo de la evolución, que desempeñan papeles esenciales en las respuestas inmunitarias innata (interviniendo en las rutas de síntesis de citoquinas proinflamatorias) y adaptativa (participando en la activación, diferenciación y función de linfocitos T mediante la producción de citoquinas).

Las principales familias de MAP quinasas en mamíferos son tres: las quinasas activadas por estímulos extracelulares (ERK), las MAP quinasas p38 y las SAPK/JNK (quinasas activadas por estrés o quinasas del extremo NH_2-terminal de c-jun). Todas las MAP quinasas contienen una secuencia de activación Thr-X-Tyr (TXY), y la fosforilación de la treonina y la tirosina es necesaria y suficiente para su activación.

La activación de las MAPK se realiza mediante una cascada de quinasas: las MAPK quinasa quinasas (MAPKKK, MKKK, MAP3K o MEKK) fosforilan residuos de Ser o Thr de las MAPK quinasas (MAPKK, MKK o MEK), que catalizan la fosforilación en Thr o Tyr de las MAPK.

Las proteínas G monoméricas son activadores importantes de las MAP quinasas, Así, la ruta de las ERK puede ser activada por Ras a través de Raf, y las p38 y JNK pueden ser activadas por GTPasas de la familia Rho, entre las que se encuentran Rac y Cdc42 (Dong et al., 2002; Zhang y Dong, 2005)

La familia **ERK** contiene la secuencia TEY (Thr-Glu-Tyr), y sus miembros pueden clasificarse en dos grupos: las MAP quinasas clásicas (ERK1/p44 y ERK2/p42), y las MAP quinasas grandes (ERK3, ERK5, ERK7 y ERK8).

ERK 1/2 son las proteínas más estudiadas de esta familia, y forman parte del módulo que incluye a la MAPKKK Raf-1, B-Raf o A-Raf, que pueden ser activadas por Ras. Las rutas ERK 1/2 se activan en respuesta a muchos estímulos diferentes, incluyendo los factores de crecimiento, citoquinas, infección por virus, ligandos de receptores acoplados a proteínas G, agentes transformante y carcinógenos. Estas proteínas participan en la regulación de la meiosis, mitosis y, en células diferenciadas, presentan diferentes funciones, participando en procesos como el aprendizaje y la memoria en el sistema nervioso central (Johnson y Lapadat, 2002). La mayoría de los estudios realizados sugiere que ERK 1 y 2 son equivalentes en cuanto a su función, a pesar de que la existencia de dos genes para ERK y su activador MEK se ha conservado a lo largo de la evolución, lo que sugiere una diversificación funcional. Los sustratos de las ERK conocidos ascienden a más de 50 proteínas, entre las que se encuentran proteínas del citoesqueleto, quinasas, fosfatasas, enzimas y factores de transcripción (Kolch, 2000).

La familia **JNK/SAPK** contiene la secuencia TPY (Thr-Pro-Tyr), e incluye diez isoformas de 46 y 55 kDa generadas por corte y empalme alternativo a partir de los mensajes codificados por los genes Jnk1, Jnk2 y Jnk3; Jnk1 y Jnk 2 poseen expresión universal, mientras que Jnk3 se expresa únicamente en cerebro, corazón y testículos. Esta ruta participa en muchos procesos fisiológicos, entre los que se encuentran la proliferación celular y la apoptosis, y responde a estímulos diversos: la radiación UV, la hiperosmolaridad, el choque térmico o la presencia de citoquinas, como el TNF-α, la IL-7, IL-3, el factor estimulador del crecimiento de colonias o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Davis, 2000; Bogoyevitch, 2006).

Las MAPKK activadoras de JNK son MKK4 (SEK-1), activada preferentemente por estrés ambiental y MKK7, activada por citoquinas. Entre los sustratos de JNK se

encuentran las proteínas JunB, JunD y ATF-2, que forman parte del factor de transcripción AP-1 (Davis, 2000), el factor de transcripción FOXO4 y receptores hormonales nucleares, además de la proteína adaptadora 14-3-3, la proteína tau asociada a microtúbulos y proteínas mitocondriales de la familia Bcl. Esta variedad de sustratos sugiere que JNK puede intervenir en respuestas celulares muy diferentes; de hecho, además de su participación en la transducción de señales durante la respuesta inmune, se ha demostrado su implicación en procesos fisiológicos y patológicos tan variados como la remodelación ósea, diabetes, enfermedades cardiovasculares o alteraciones neuronales, entre otras (Bogoyevitch, 2006).

La familia de la **p38** presenta la secuencia de activación TGY (Thr-Gly-Tyr) e incluye las proteínas p38 α, β, γ (ERK6, SAPK3) y δ (SAPK4). Las isoformas α y β son universales, mientras que la expresión de las p38 γ y δ depende del tipo de tejido. La señalización por p38 se ha relacionado con respuestas diversas: inflamación, progresión del ciclo celular, aparición de tumores, desarrollo, diferenciación y muerte celular.

Hay dos MAPKK principales en la activación de p38: MKK3 y MKK6, que parecen regular de forma diferencial las isoformas de p38. Además, en tipos celulares concretos, MKK4 (activadora de JNK), también puede participar en la activación de p38. Entre los estímulos extracelulares que activan a p38 se encuentran la radiación UV, el calor, el choque osmótico, citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento. Una vez activada, p38 fosforila numerosos sustratos, entre los que se encuentran varios factores de transcripción, como ATF-1/2 y ATF-6, Elk-1 o NF-AT (Zarubin y Han, 2005).

Aunque durante algún tiempo se creyó que las cascadas de MAPK actuaban de manera lineal, relacionando una señal específica con una respuesta biológica concreta, parece que la comunicación ocurre a través de una red compleja de cascadas señalizadoras, en las que la información también fluye lateralmente entre las diferentes rutas . Así, curso abajo de las MAPK, los módulos señalizadores pueden converger: el

factor de transcripción Elk-1 puede ser activado por ERK, JNK y p38; el factor de trasncripción ATF-2 es regulado por JNK y p38, y c-Jun es diana de JNK y, en algunos casos, ERK (Schaeffer y Weber, 1999). En la figura I-2 se muestran las principales proteínas que intervienen en las cascadas de señalización por MAP quinasas y las relaciones que se establecen entre ellas.

La regulación de la magnitud y duración de la actividad de las MAP quinasas y su inactivación son fundamentales para regular la respuesta inmunitaria. La inactivación de las MAPK se produce a través de la desfosforilación de la treonina y/o tirosina en sus secuencias activadoras. Esta desfosforilación es catalizada por una familia de proteínas denominadas MAPK fosfatasas (MKP), o fosfatasas de especificidad dual. Las MKP presentan diferentes especificidades de sustrato, localizaciones celulares y modos de regulación.

Otro tipo de regulación que afecta a las cascadas de MAP quinasas se debe a la actividad de proteínas de andamiaje (en inglés *scaffold*), que se unen a varias proteínas de la ruta, facilitando su interacción y regulación, o bien impidiéndola al secuestrarlas. Su papel regulador puede ser, por tanto, positivo o negativo. Entre las proteínas de andamiaje conocidas se encuentran las JIP (proteínas de interacción con JNK) (Zhang y Dong, 2005) o KRS (quinasa supresora de Ras), que interacciona con las proteínas Raf-1, MEK y ERK (Kolch, 2000).

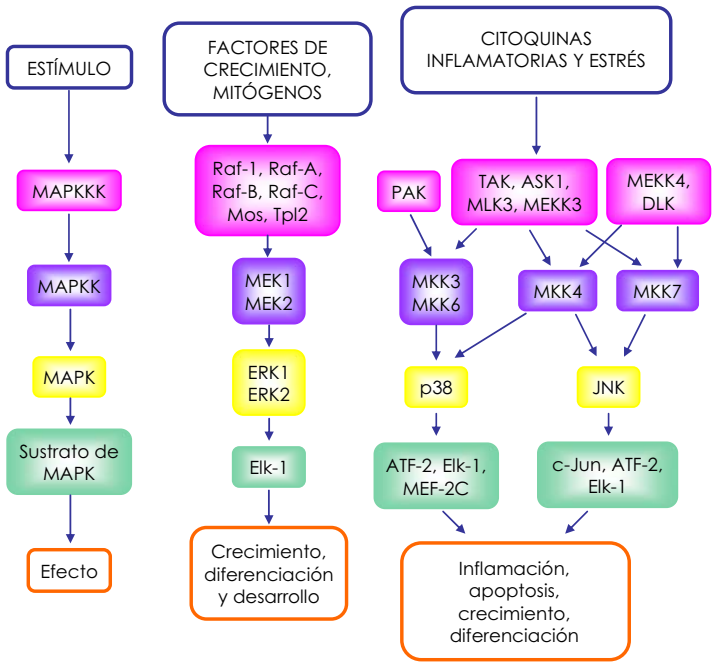


Figura I-2. Principales cascadas de señalización de MAP quinasas en mamíferos.
(Adaptada de Zhang y Dong, 2005)

1.2.5. Activación de factores de transcripción

Los cambios en la expresión génica representan la culminación de la señalización iniciada por la interacción entre el TCR y el antígeno, y son necesarios para que las células T adquieran la capacidad de proliferar y producir citoquinas efectoras. En estas células hay tres factores de transcripción que desempeñan un papel fundamental en la expresión génica: NF-κB, NF-AT y AP-1 (Huang y Wange, 2004).

NF-κB es el nombre genérico de una familia de factores de transcripción que actúan como dímeros y regulan genes implicados en la respuesta inflamatoria e inmunitaria, así como algunos aspectos del crecimiento celular, supervivencia y diferenciación. La familia NF-κB consta de cinco proteínas: Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, NF-κB1(p50 y su precursor p100) y NF-κB2 (p52 y su precursor p100), cada una codificada por un locus diferente (Weil e Israël, 2006). La combinación p50-p65 es la más común de todas las posibles. La unión de la mayoría de los complejos NF-κB

induce la transcripción de los promotores a los que se unen, aunque determinadas combinaciones, como los complejos homodiméricos de p50 o p52, pueden reprimirla.

El factor NF-κB se encuentra mayoritariamente en el citoplasma, retenido por las proteínas inhibidoras I-κBs. La activación del complejo quinasa de I-κB (IKK) fosforila la proteína inhibidora, lo que produce su ubiquitinación y degradación mediada por el proteasoma. La degradación de I-κB desenmascara la señal de localización nuclear de NF-κB, que puede translocarse al núcleo y regular la actividad génica (Moynagh, 2005; Weil e Israël, 2006).

El **NF-AT** es una familia de factores de transcripción que regulan la expresión inducible de muchas citoquinas y receptores de superficie celular, acontecimientos críticos en la respuesta inmunitaria.

Se han identificado cinco miembros de la familia NF-AT: NF-AT1 (NFATp/NFATc2), NF-AT2 (NF-ATc1), NF-AT3 (NF-ATc4), NF-AT4 (NF-ATx/NF-ATc3) y NF-AT5. Todas las proteínas NF-AT presentan un dominio de unión al DNA conservado que está relacionado evolutivamente con las proteínas de la familia Rel/NF-κB.

En células en reposo, las proteínas NF-AT se encuentran en el citoplasma, en un estado fuertemente fosforilado por la actividad consitutiva de las NF-AT quinasas. El aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, debido a la producción de IP_3 por la PLCγ, activa la calcineurina (una Ser/Thr fosfatasa dependiente de Ca^{2+}/calmodulina), que desfosforila a las proteínas NF-AT, permitiendo su translocación al núcleo y la inducción de los genes dependientes de este factor. Para que el NF-AT se mantenga en estado activo, es necesaria una activación prolongada de la calcineurina, ya que la pérdida de su actividad causa la refosforilación de NF-AT y su salida del núcleo. Se ha descrito fosforilación de las proteínas NF-AT por diferentes quinasas (caseína quinasa 1, glucógeno sintasa quinasa-3, p38 o JNK), aunque la principal parece ser la quinasa de doble especificidad regulada por fosforilación en tirosina (DYRK) (Lee y Park, 2006).

El **AP-1** es un factor de transcripción que controla la transcripción basal e inducible de genes que contienen los sitios AP-1, también llamados elementos de respuesta al TPA, o TREs. Con este nombre se describe a una serie de proteínas de las familias Jun (Jun, o c-Jun, JunB y JunD) y Fos (Fos, o c-Fos, FosB, Fra y Fra-2), relacionadas funcional y estructuralmente. Algunos miembros de las subfamilias ATF (ATFa, ATF-2 y ATF-3) y JDP (JDP1 y JDP2), que comparten características estructurales y forman complejas heterodiméricos con las proteínas AP-1 (predominantemente c-Jun) pueden unirse también a esas secuencias (Hess *et al.*, 2004).

Una característica común de estas proteínas es la presencia de un dominio bZIP conservado, que consta de una secuencia básica de unión de DNA, combinada con una cremallera de leucina, responsable de la formación de dímeros. Las proteínas Jun pueden presentarse como homo o heterodímeros, mientras que las proteínas Fos sólo pueden formar heterodímeros, y se unen a Jun potenciando su actividad de unión al DNA.

La regulación de la actividad AP-1 se ejerce a través de cambios en la transcripción de los genes que codifican sus subunidades, el control de la estabilidad de sus mRNAs, el procesamiento post-traduccional, el recambio de subunidades e interacciones específicas entre las proteínas AP-1 y otros factores de transcripción y cofactores. El mecanismo de control post-traduccional mejor conocido es la fosforilación (y activación) por JNK de Jun, JunD y ATF-2 (Hess *et al.*, 2004).

El NF-AT y el AP-1 se unen a determinadas regiones del DNA formando complejos. Esta cooperación se ha demostrado en la región promotora de diferentes genes del sistema inmunitario, entre los que se encuentran el gen de la IL-2, el GM-CSF, la IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, IFN-γ, FasL, CD25 y Cox2 (Macián *et al.*, 2001). Tanto AP-1 como NF-AT pueden unirse a elementos del tipo Rel/NF-κB (Macián *et al.*, 2001; Huang y Wange, 2004).

1.3. Marcadores de activación en los linfocitos T

Con el nombre de marcadores de activación se conoce un grupo de moléculas cuya expresión depende de la activación de los linfocitos T.

Los cambios mejor caracterizados que ocurren en la superficie de las células T tras la activación durante la respuesta inmunitaria son el aumento en la expresión de CD69, receptores de transferrina e IL-2 y reducción en la expresión del TCR. Además, aumenta la síntesis de diferentes factores de crecimiento hematopoyético, como la IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF (Wilkinson y Nixon, 1998). Entre estos acontecimientos, dos tienen especial importancia en la respuesta de las células T al reconocimiento antigénico: la expresión de la IL-2 y de su receptor (IL-2R).

1.3.1. IL-2 e IL-2R

La IL-2 es el principal factor de crecimiento de las células T. Su secreción desencadena la entrada del linfocito en la fase S del ciclo celular y su división, debido probablemente al efecto supresor de la IL-2 sobre inhibidores del ciclo celular que interfieren con la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (cdks) en los puntos de regulación del ciclo. Además de la proliferación de los linfocitos T, la IL-2 activa la proliferación de células B y NK.

El promotor del gen de la IL-2 es una región de aproximadamente 250 pb, localizada en posición 5′ respecto al inicio transcripcional. Esta región integra numerosas rutas señalizadoras que conducen a la síntesis de IL-2 y la activación y proliferación linfocitaria, y a ella se unen factores de transcripción de expresión constitutiva (como Oct) o inducible (como AP-1, NF-AT o NF-κB). Cuando la activación de uno de ellos se bloquea, la expresión de IL-2 se inhibe totalmente, ya que ningún factor de transcripción interacciona con su sitio de unión de forma estable a menos que todos estén presentes (Serfling et al., 1995; Rothenberg y Ward, 1996). En la figura 3 se muestra un esquema del promotor de la IL-2, indicando los factores de transcripción que se unen a él y sus lugares de unión.

Los linfocitos T regulan su respuesta a la IL-2 mediante el control transcripcional de uno de los componentes de su receptor, el IL-2Rα. El receptor de IL-2 completo es un trímero, formado por las subunidades α, β y γ, pero puede presentarse en tres formas diferentes con distintas afinidades: una forma monomérica, de baja afinidad, constituida únicamente por el IL2Rα, un dímero βγ, de afinidad intermedia, y la forma trimérica de alta afinidad. Aunque el heterodímero IL2Rβγ es el responsable de la transducción de señales, el IL2Rα potencia la afinidad por el ligando y sólo la forma trimérica se une a la IL-2 con alta afinidad. Puesto que la cadena α se expresa sólo en células activadas, se conoce también como el antígeno TAC (activación de las células T) (Wilkinson y Nixon, 1998; Kindt *et al.*, 2007). La IL-2 es la responsable de la inducción de la expresión del gen de la cadena α de su receptor, probablemente mediante la inducción del homodímero STAT5, que regula su transcripción. Además, puede inducir también la expresión del gen del TNF-β y posiblemente otros, puesto que se ha descrito que los oncogenes c-myc, c-jun, c-fos, c-myb, bcl-2, pim-1 y c-raf-1 y el gen de la tirosina quinasa Itk son inducidos rápidamente por la señalización de la IL-2 (Herblot *et al.*, 1999).

La IL-2 activa tres rutas de señalización principales: las cascadas de proteínas Ras y MAPK, que participan en la mitogénesis; la ruta PI3K, que participa en la reorganización del citoesqueleto y la ruta Janus quinasa-STAT (Wilkinson y Nixon, 1998).

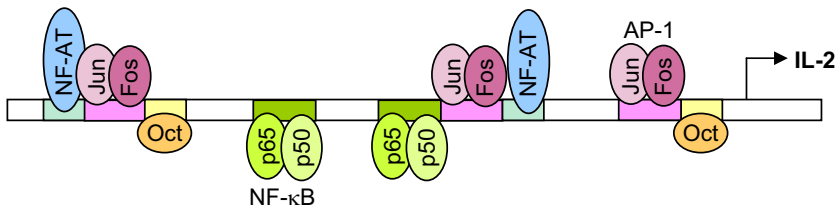


Figura I-3. Esquema del promotor del gen de la IL-2, en el que se indican los lugares de unión a los factores de transcripción que controlan su expresión (adaptado de Baier, 2003).

Aunque son muchas las moléculas cuya expresión se induce tras la unión del TCR al antígeno, se resumen a continuación las características de aquellas cuya síntesis o expresión se ha estudiado en este trabajo.

1.3.2. CD69

El CD69/AIM es una glucoproteína de membrana de tipo II que pertenece a la familia de lectinas de tipo C. La inducción de esta molécula se produce rápidamente tras la activación, especialmente en las células T, por lo que CD69 se considera el marcador más temprano de este proceso (Ziegler *et al.*, 1994). Aunque su papel en la inmunidad aún no se ha determinado, debido a que se desconoce su ligando, su función parece estar relacionada con la transducción de señales, ya que al unirse a anticuerpos específicos induce señales intracelulares, entre las que se encuentra el flujo de Ca^{2+}, la síntesis de citoquinas y sus receptores, el aumento en la expresión de los protooncogenes *c-myc* y *c-fos* y la proliferación celular. La función de CD69 en la activación de las células T puede ser reemplazada por otros receptores, puesto que esta respuesta no se ve alterada en células T de ratones deficientes en esa molécula (Lauzurica *et al.*, 2000). A pesar de que estos estudios sugerían que CD69 era una molécula activadora, trabajos más recientes indican que puede desempeñar un papel regulador negativo en la respuesta inmunitaria a través de la producción de TGF-β (Sancho *et al.*, 2005).

1.3.3. IFN-γ

El IFN-γ es una citoquina producida por las células T, $CD4^+$ y $CD8^+$, y células NK. Su secreción afecta a la activación, crecimiento y diferenciación de células T, B, macrófagos y NK. Esta citoquina induce el aumento de la expresión de las moléculas del MHC, incrementa la presentación antigénica y posee una débil actividad antiviral y antiproliferativa (Kindt *et al.*, 2007).

1.3.4. IL-8

La IL-8 (CXCL8 según la nomenclatura actual) es una quimioquina (citoquina quimiotáctica para los leucocitos), inducida en diferentes tipos celulares por diferentes estímulos, entre los que se encuentran las citoquinas inflamatorias IL-1 y TNF-α o los promotores de tumores. Entre los efectos biológicos de la IL-8 se encuentra la quimiotaxis de neutrófilos y linfocitos T, la regulación de las propiedades de adhesión celular, la activación de neutrófilos y la modulación de la liberación de histamina (Kunsch y Rosen, 1993).

1.3.5. TNF-α

El TNF-α es una citoquina producida por monocitos, macrófagos y por linfocitos T activados, entre otros. Es un potente mediador de la respuesta inmunitaria y la inflamación, que regula el crecimiento y la diferenciación de distintos tipos celulares y posee actividad citotóxica sobre células transformadas (Kindt *et al*., 2007).

1.3.6. TNF-β

El TNF-β, actualmente denominado linfotoxina A (LT-A) pertenece a la superfamilia TNF y, como el TNF-α, desempeña un papel importante en la inmunidad mediada por células y la inflamación. Así, la LT participa en el estallido respiratorio de neutrófilos, fagocitosis y eliminación de microorganismos. También se ha descrito su participación en el estímulo del crecimiento de los linfocitos B, en la promoción de reacciones inflamatorias y daño de tejidos, y como causante de caquexia y síndrome de choque tóxico (Li *et al*., 1999a).

2. LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC)

La proteína quinasa C fue descubierta en el año 1977 por Nishizuka y col., que identificaron en el cerebro de rata una quinasa activada por el tratamiento con calpaína (una proteasa neutra dependiente de calcio). Observaron que la proteolisis de esta enzima generaba dos dominios funcionales: uno hidrofóbico y otro con una actividad catalítica completa que no aparecía en la proenzima; este último recibió el nombre de PKM, ya que el Mg^{2+} era el único cofactor necesario para su activación. Debido a que la activación de la proenzima dependía de Ca^{2+} y fosfolípidos, recibió el nombre de PKC (Ohno y Nishizuka, 2002).

La importancia del descubrimiento de la PKC se hizo evidente al observar que esta enzima era activada por DAG, un producto de la hidrólisis del fosfatidilinositol, durante la estimulación de la célula. Esto llevó a pensar que el DAG podía desempeñar un papel importante como segundo mensajero en la activación de PKC y la transmisión del mensaje extracelular.

El descubrimiento de que los ésteres de forbol promotores de tumores podían sustituir al DAG en su función confirmó la importancia de la PKC en el crecimiento y diferenciación, e introdujo la utilización de este activador como herramienta para el análisis de la función de PKC y de las rutas de señalización DAG-PKC (Castagna *et al.*, 1982; Nishizuka *et al.*, 1984).

Hoy se sabe que la PKC no es una sola enzima, sino una familia compuesta por, al menos, diez isoformas. Esta familia enzimática desempeña un papel importante en la transducción de señales en la célula, y se ha descrito su participación en procesos celulares tan variados como la proliferación y apoptosis (Leszcynski, 1996; Musashi *et al.*, 1999; Cross *et al*., 2000; Gutcher *et al.*, 2003), la diferenciación, la regulación del ciclo celular (Livneh y Fishman, 1997; Black, 2000), el desarrollo nervioso, la transmisión sináptica y la regeneración axonal, contracción y relajación de la musculatura lisa,

secreción endrocrina y exocrina, aparición y desarrollo de tumores o envejecimiento, entre otros (Liu, 1998).

En mamíferos se conocen diez isoformas de PKC, que pueden agruparse en tres clases teniendo en cuenta su estructura y los cofactores que requieren para su activación:

- **PKCs clásicas o convencionales (PKCc)**: Este grupo incluye a las isoformas α, β1, β2 y γ. Son activadas por Ca^{2+}, DAG y PS.
- **PKCs nuevas (PKCn)**: Comprende a los isotipos δ, ε, η/L y θ. Son activadas por DAG y PS, pero no por Ca^{2+}.
- **PKCs atípicas (PKCa)**: Se incluyen en este grupo las isoformas λ/ι y ζ. Son activadas solamente por PS.

Inicialmente, las proteínas PKCμ y PKCν se incluyeron en una cuarta clase de PKCs. Sin embargo, presentan grandes diferencias en el dominio quinasa, muy conservado en todas las PKCs, y en la especificidad para inhibidores y sustratos, por lo que actualmente se consideran miembros de una familia diferente, denominada PKD (Rykx *et al.*, 2003).

Todas las isoformas de PKC son codificadas por genes diferentes, excepto PKCβ1 y β2, que son variantes formadas por corte y empalme alternativo del mismo mRNA. La mayoría de las isoenzimas tiene un peso molecular aparente de 80 kDa, aunque varía entre los 62 kDa y 97 kDa según la isoforma (ver tabla 1), su pH óptimo está entre 7,5 y 8 y su punto isoeléctrico es 5,6 (Liu, 1996).

2.1. Localización de la PKC

Las isoformas de PKC se expresan en distintas proporciones en diferentes tejidos y células. Algunas de ellas están presentes en prácticamente todos los tejidos (como PKCα o PKCδ) y otras muestran una expresión mucho más restringida, como las isoformas γ o θ. En la tabla I-1 se resume la expresión de las isoformas de PKC en tejidos de mamífero.

Las PKCs se han encontrado en diferentes compartimentos celulares, incluyendo membranas celulares, citoesqueleto, núcleo y citosol, en forma tanto activa como inactiva. Así, mediante estudios de inmunofluorescencia se ha determinado la asociación de PKCβ1 a vesículas, de PKCβ2 a microtúbulos, de PKCε a estructuras filamentosas y una distribución citoplasmática difusa de PKCζ en células U937 (Kiley y Parker, 1995). En células REF52, se ha comprobado la asociación de la PKCα con contactos focales, de la PKCδ con filamentos y aparato de Golgi, de la PKCε con microfilamentos, y la presencia difusa de PKCζ en el citoplasma (Jaken, 1997).

En muchos tipos celulares se ha demostrado que la PKC se encuentra en el citoplasma cuando está inactiva, y se transloca a la membrana plasmática cuando se activa. Sin embargo, existen excepciones a este comportamiento; por ejemplo, PKCδ se encuentra casi exclusivamente en la fracción particulada de células en reposo y activadas (Kanashiro y Khalil, 1998) y PKCζ no se transloca a la membrana plasmática tras la activación con ésteres de forbol (Liu, 1996).

Aunque se cree que la localización de las diferentes isoformas de PKC está controlada por la interacción con proteínas de unión (ver apartado 2.3.3), no se descarta la existencia de señales de localización nuclear, que explicaría la presencia de todas las PKCs en este orgánulo (Martelli *et al.*, 1999 y 2006).

Grupo	Isoforma	Peso molecular (kDa)	Número de aminoácidos	Activadores	Distribución en tejidos
PKCc	α	76,8	672	PS, Ca^{2+}, DAG, PMA, FA, lyso PC	Universal. Expresión alta en células T
	βI	76,8	671	PS, Ca^{2+}, DAG, PMA, FA, lyso PC	Algunos tejidos
	βII	76,9	673	PS, Ca^{2+}, DAG, PMA, FA, lyso PC	Muchos tejidos
	γ	77,5	697	PS, Ca^{2+}, DAG, PMA, FA, lyso PC	Tejido nervioso
PKCn	δ	77,7	674	PS, DAG, PMA, FA, PI	Universal. Expresión alta en células T
	ε	83,5	737	PS, DAG, PMA, PI	Tejido nervioso, sistema inmunitario, epitelio, corazón. Expresión alta en células T
	η/L	78	683	PS, DAG, PMA, PI, PIP3, sulfato de colesterol	Tejidos nervioso y epitelial. Expresión alta en células T
	θ	81,6	707	PS, DAG, PMA, PI	Ovario, músculo esquelético, plaquetas, monocitos, células T
PKCa	ζ	67,7	592	PS, FA, PIP3, ceramida, PA	Universal
	λ/ι	67,2	586	¿?	Muchos tejidos

Tabla I-1. Isoformas de PKC en tejidos de mamífero (Nishizuka, 1995; Dekker *et al.*, 1995; Liu, 1996; Baier, 2003)

PS: Fosfatidilserina, DAG: Diacilglicerol, PMA: Forbol miristato acetato, FA: Ácidos grasos, PC: Fosfatidilcolina, PI: Fosfatidilinositol, PIP_3: Fosfatidil-inositol-3,4,5-trisfosfato, PA: Ácido fosfatídico

2.2. Estructura de la PKC

Las proteínas de la familia PKC constan de una sola cadena polipeptídica, con una región N-terminal reguladora y una región C-terminal catalítica. Estas regiones están separadas por una secuencia "bisagra", que se vuelve muy sensible a la proteolisis cuando la enzima está unida a la membrana plasmática. Como consecuencia de esa ruptura se generan dos fragmentos: el correspondiente a la región reguladora, de aproximadamente 30 kDa, y la PKM, de aproximadamente 50 kDa, correspondiente a la región catalítica y constitutivamente activa (Liu, 1996). La estructura de las diferentes subfamilias de PKC se representa en la figura I-4.

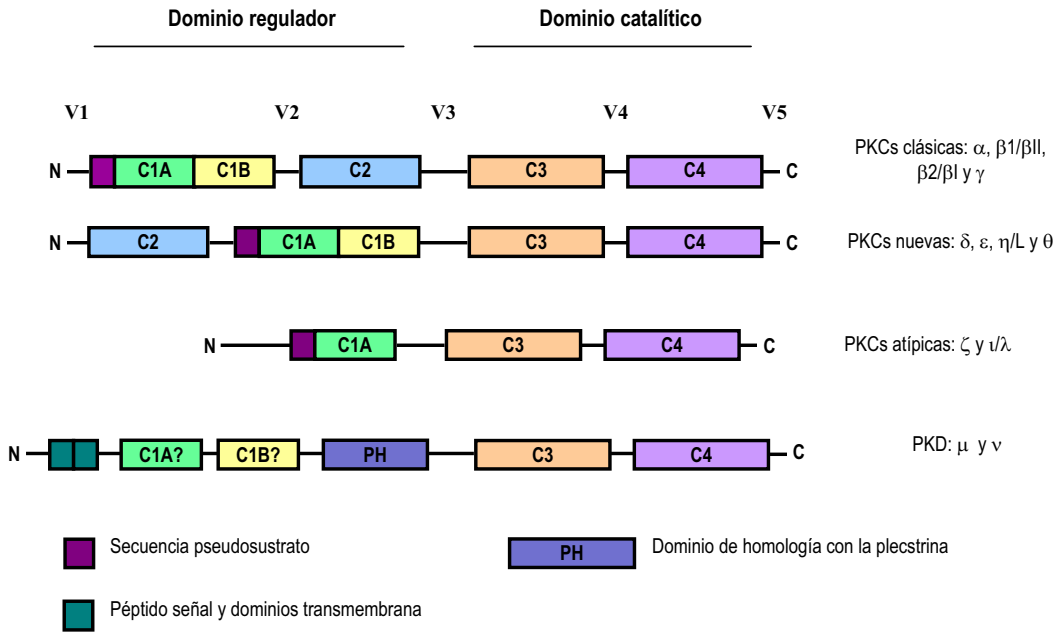


Figura I-4. Estructura de las subfamilias de PKC y la familia PKD. Las formas β1/βII y β2/βI corresponden a las variantes humana/de rata, respectivamente. Las formas η/L y ι/λ corresponden a las variantes humana/de ratón (Toker, 1998 ; Tan y Parker, 2003).

La PKC consta de cuatro regiones conservadas (C1-C4) y cinco regiones variables (V1-V5). La región amino-terminal es la reguladora y se une a fosfolípidos, ésteres de forbol o DAG y Ca^{2}. La mitad carboxilo-terminal, que contiene los dominios C3 y C4, comprende el dominio quinasa y su secuencia muestra una gran homología con otras proteínas quinasas (Kanashiro y Khalil, 1998).

La región reguladora de la PKC contiene un dominio autoinhibidor, el pseudosustrato, y otros dos dominios que controlan su unión a componentes específicos de la membrana plasmática: el dominio C1 (presente en todas las isoenzimas) y C2 (presente en las PKCs nuevas y clásicas).

A continuación se resumen las características fundamentales de las regiones que participan en la regulación de la actividad PKC.

2.2.1. *Dominio pseudosustrato*

El dominio pseudosustrato se encuentra en la región reguladora de la PKC, entre 13 y 30 residuos antes de la primera región C1 (Soderling, 1990). Su secuencia es similar a la del sustrato, pero presenta una Ala en lugar de la Ser a la que se une el grupo fosfato, por lo que no puede ser fosforilada. La PKC es regulada intraestéricamente por este dominio, que ocupa el sitio de unión al sustrato, impidiendo la actividad enzimática (Newton, 2001)

2.2.2. *Dominio C1*

El dominio C1 (dominio 1 de homología con PKC) se define como un miembro de la superfamilia de dominios ricos en Cys, y se denomina típico o atípico según su capacidad de unirse o no a DAG/ésteres de forbol. Es una región de 50 o 51 aminoácidos, con un patrón característico de Cys e His, que configura el lugar de coordinación de dos iones Zn^{2+}, y forma un sitio de unión para DAG o ésteres de forbol. En las PKCs clásicas y nuevas se presenta como una repetición en tándem (subdominios C1A y C1B). Las PKCs atípicas sólo presentan un dominio que no se une

a DAG, relacionado con la interacción con ceramida y con interacciones proteína-proteína (Newton, 2001; Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006).

Hay una gran variedad de proteínas diferentes a la PKC que contienen en su secuencia dominios C1, tanto típicos (por ejemplo, las quimerinas, Unc-13 y Ras-GRP) como atípicos (por ejemplo, las DAG quinasas y un grupo de proteínas que interaccionan con proteínas G monoméricas, como Raf) (Mellor y Parker, 1998; Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006).

2.2.3. *Dominio C2*

Los dominios C2 contienen entre 30 y 100 aminoácidos. En las PKC clásicas, la coordinación de Ca^{2+} en este dominio aumenta la afinidad de la PKC por membranas aniónicas, mientras que en las isoformas nuevas este dominio se une en algunos casos a fosfolípidos cargados negativamente de forma independiente de Ca^{2+}, y en otras ocasiones media interacciones proteína-proteína. Estos dominios pueden encontrarse también en proteínas que no están relacionadas con la familia PKC, como las fosfolipasas y GAPs (Newton, 2001; Mellor y Parker, 1998; Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006).

2.2.4. *Región V3*

Esta región, denominada también "bisagra", separa el dominio regulador del dominio catalítico de la PKC. Es una secuencia sensible a la ruptura proteolítica por tripsina o por las proteasas neutras dependientes de Ca^{2+} calpaína I y II, que provoca la formación de la quinasa constitutivamente activa. Algunos estudios indican que esta región puede estar implicada en la localización nuclear de la PKCα (Hug y Sarre, 1993).

2.2.5. *Dominio catalítico*

El dominio catalítico de la PKC (que incluye las regiones C3 y C4) presenta una gran homología en su secuencia (aproximadamente el 40%) al de la proteína quinasa A (Newton, 2001). La región C3 contiene una secuencia de unión a ATP similar a la que

presentan otras quinasas, y la región C4 contiene los sitios de unión al sustrato y de transferencia del grupo fosfato (Liu, 1998).

La secuencia carboxilo-terminal de la PKC es esencial para su regulación, ya que en ella se encuentra el sitio de unión a la quinasa que activa la PKC (PDK-1). Además, en esta región se encuentra una secuencia que regula la localización celular de la enzima (Liu, 1998; Newton, 2001).

2.2.6. *Región V5*

La región V5, de aproximadamente 50 aminoácidos, interviene en la regulación de la actividad quinasa. Esta secuencia parece desempeñar una función importante en la localización de la enzima, ya que las isoformas PKCβI y βII, que difieren únicamente en esta región, presentan diferente localización celular. La región V5 también parece ser determinante de la localización, translocación y función biológica de las isoformas PKCδ y PKCε (Wang *et al.*, 2004). Además, en V5 se encuentran sitios que, al fosforilarse, controlan la fosforilación de la enzima en regiones reguladoras (Mellor y Parker, 1998).

2.3. Regulación de la PKC

La actividad de la PKC se regula mediante varios mecanismos: modificación covalente por fosforilación, que confiere a la enzima capacidad catalítica; regulación alostérica, por unión a cofactores; regulación intraestérica (autoinhibición por el sitio pseudosustrato); interacción con proteínas que la sitúan cerca de sus reguladores y sustratos y degradación proteolítica (Newton, 1997, 2001; Liu, 1998).

2.3.1. *Regulación por fosforilación*

Todas las isoformas de PKC se regulan mediante una serie de fosforilaciones en aminoácidos Ser o Thr en el dominio catalítico de la enzima, catalizadas por la PDK-1 y por la propia PKC.

La primera fosforilación, catalizada por la PDK-1, se produce en una Ser o Thr en una posición cercana al sitio activo, denominada lazo de activación. Esta fosforilación sitúa correctamente los aminoácidos para la catálisis y desenmascara la entrada del lugar de unión al sustrato. Para que se produzca la activación de la enzima, ésta debe ser autofosforilada en otras dos posiciones conservadas: una en el denominado motivo de giro, y otra en el motivo hidrofóbico (Parekh, 2000; Newton, 2001; Toker, 2004).

La fosforilación de PKC regula su función enzimática. En el caso de las PKCc y PKCn, actúa de manera sinérgica con la unión a DAG, pero en las PKCa podría ser el único mecanismo regulador, ya que estas isoenzimas no se unen a DAG. Sin embargo, parece que la fosforilación podría actuar, en estos casos, en conjunto con otras señales, como la generación de ceramida, que activa a PKCζ (Toker, 2004).

- **Regulación de la PKC por fosforilación de Tyr**

Además de fosforilarse en los aminoácidos Ser/Thr de su dominio catalítico, la PKC también se fosforila en tirosina en determinadas condiciones, como el estrés oxidativo. La PKCδ es la isoforma en que se ha descrito con mayor detalle esta fosforilación, que se produce en varias Tyr de las regiones catalítica y reguladora. En general, se cree que la fosforilación de tirosinas del dominio catalítico aumenta la actividad quinasa de la enzima, mientras que la fosforilación en tirosinas de la región reguladora influye sobre la función que realiza sin modificar su actividad quinasa (Steinberg, 2004).

Se considera que la fosforilación de tirosinas de las PKCn es un mecanismo regulador bajo ciertas condiciones fisiológicas, en particular aquellas que median la señalización apoptótica (Toker, 2004).

- **Regulación por desfosforilación**

El control de la activación de la PKC por fosforilación refleja el balance entre la fosforilación por PDK-1, la autofosforilación y la actividad de fosfatasas.

Aunque no se conoce el mecanismo de regulación de PKC por fosfatasas, se ha relacionado este proceso con la proteína fosfatasa 2A (PP2A). Las PP2A y PP2B se han identificado asociadas a PKC formando complejos (Toker, 2004); la PP2A se ha relacionado además con la degradación proteolítica de la PKC y con un proceso de desfosforilación que permite que la enzima adquiera la capacidad de autofosforilación, al menos en la isoforma PKCβ1 (Sim y Scott, 1999).

2.3.2. *Regulación por cofactores*

2.3.2.1. Fosfatidilserina

La fosfatidilserina es un aminofosfolípido que se encuentra exclusivamente en la cara citoplasmática de la membrana. En ausencia de diacilglicerol, la PKC presenta poca selectividad por la fosfatidilserina, pero la presencia de DAG aumenta su afinidad por esa molécula. El dominio C1 es el que confiere a la PKC la especificidad por la fosfatidilserina, aunque no se conoce la región concreta que conduce a este reconocimiento (Newton, 2001 y 2004).

2.3.2.2. DAG y ésteres de forbol

Los ésteres de forbol y el diacilglicerol provocan un gran aumento en la afinidad de la PKC por la membrana. Aunque los dos ligandos regulan la PKC mediante el mismo mecanismo, sus efectos son diferentes, ya que los ésteres de forbol son metabolizados con mucha más lentitud que el DAG, provocando una activación más prolongada y potente.

El DAG que activa a la PKC puede ser producido por dos rutas diferentes: la hidrólisis del PIP_2 catalizada por la PLC, que produce IP_3 y DAG, y la hidrólisis de fosfatidilcolina, catalizada por la PLD. En este caso se producen ácido fosfatídico y colina, y el ácido fosfatídico es convertido en DAG por acción de una fosfomonoesterasa (Liu, 1998; Newton, 2001).

2.3.2.3. Ca^{2+}

El IP_3 generado por la hidrólisis de PIP_2 provoca la movilización de Ca^{2+} intracelular. Este catión facilita la translocación de la PKC, incrementando la afinidad de su dominio C2 por los lípidos aniónicos. El aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular no es indispensable para la translocación y activación, si se produce una unión suficientemente fuerte a través del dominio C1.

El DAG y el Ca^{2+} tienen un efecto sinérgico sobre la activación del enzima, y la presencia de uno de ellos reduce la cantidad del otro necesaria para la activación de la enzima (Newton, 2001).

2.3.2.4. *Ácidos grasos libres y lisofosfolípidos*

Los ácidos grasos cis-insaturados sinergizan con el DAG y la PS en la activación de PKCc, y son activadores potentes de las PKCn. Los lisofosfolípidos también potencian la activación de PKC dependiente de DAG. Hay también otros metabolitos bioactivos formados a partir del ácido araquidónico que activan a la PKC (Liu, 1998).

2.3.2.5. *Fosfatidilinosítidos*

El PIP_2 es un activador de PKC similar al DAG, y el PI puede sustituir a la PS como cofactor (Liu, 1998).

2.3.2.6. *Segundos mensajeros inhibidores*

Varios compuestos que participan en el metabolismo de esfingolípidos complejos son segundos mensajeros inhibidores para la PKC. La esfingosina interfiere con la unión a PS, o se une al sitio de unión al DAG o ésteres de forbol. Los gangliósidos y otros esfingolípidos también inhiben la PKC (Liu, 1998).

2.3.3. *Regulación por unión a proteínas de anclaje*

Las isoenzimas que integran la familia PKC presentan relativamente pocas diferencias en su especificidad por sustratos y su sensibilidad a activadores. Sin embargo, las diferentes isoformas desempeñan funciones específicas en la célula. La localización celular diferencial de los distintos isotipos parece ser la explicación a esta especificidad (Mochly-Rosen y Gordon, 1998; Jaken, 2004).

La localización celular de la PKC está regulada por proteínas de anclaje o proteínas adaptadoras, que mantienen a la PKC cerca de sus sustratos, de reguladores de la actividad, como fosfatasas o quinasas, o de compartimentos intracelulares específicos. Se ha descrito un gran número de proteínas de unión a PKC, que pueden ser específicas para una o varias isoformas; algunas de ellas se unen a formas inactivas de la enzima, mientras que otras se unen a formas activas. Dentro del primer grupo se encuentran las proteínas adaptadoras de la familia AKAP, que sitúan a la PKC fosforilada pero inactiva cerca de sus sustratos. Dentro del segundo se encuentran las proteínas de la familia RACK, que anclan la PKC fosforilada y activa a localizaciones celulares específicas. Algunas de estas proteínas adaptadoras son, además, sustratos de PKC, como las STICKs (Mochly-Rosen y Gordon, 1998; Ron y Kazanietz, 1999; Sim y Scott, 1999; Jaken, 1997, 2004; Newton, 2001).

RACKs: Aunque estas proteínas no son sustratos de PKC, al unirse a ella aumentan la fosforilación de sus sustratos. Se han identificado dos formas: RACK1, que se une específicamente a PKCβII, y RACK2, que interacciona únicamente con PKCε.

STICKs: Estas proteínas se unen a PKC utilizando PS como "puente", y son fosforiladas por ella. En este grupo se incluyen las MARCKs y las adducinas (proteínas del citoesqueleto implicadas en la interacción entre actina y espectrina.

Proteínas de andamiaje: Son proteínas que agrupan a otras proteínas señalizadoras, permitiendo la interacción entre diferentes cascadas de señalización. Entre ellas se encuentran la caveolina (dirige a diferentes proteínas, entre las que se encuentran

PKCα y PKCζ, a las caveolas), las AKAPs, p62/ZIP (proteína de unión a PKCζ), INAD (que ensambla proteínas que participan en la fototransducción en *Drosophila*) y las proteínas 14-3-3, que pueden inhibir o potenciar la actividad PKC.

Proteínas del citoesqueleto: Algunas proteínas citoesqueletales interaccionan específicamente con isoformas de PKC. Así, la PKCζ se une específicamente a tubulina y PKCε y βII a F-actina.

Otras proteínas de unión: Hay otras proteínas de unión a PKC que no encajan en los grupos anteriores por su secuencia o por sus características funcionales. Entre éstas se encuentran las proteínas LIP (proteína de interacción con PKCλ, que activa a esta isoforma de manera específica), PAR-4, que interacciona con las PKCs atípicas y participa en respuestas apoptóticas, la neuromodulina y Src, que se unen a PKCδ, Nef, que interacciona con PKCθ en linfocitos T, activándola y sindecán-4, que provoca la localización de PKCα en los contactos focales y la activa (Ron y Kazanietz, 1999; Moscat y Díaz-Meco, 2000; Liu, 1996; Jaken, 1997 y 2004).

Los dominios que median la unión a proteínas de anclaje en la PKC se encuentran en diferentes regiones. Se han encontrado secuencias que participan en las interacciones proteína-PKC en los dominios C1, C2 y en las regiones variables de PKC (Mochly-Rosen y Gordon, 1998).

2.3.4. *Proteolisis*

La región bisagra de la PKC, entre la región V3 y el dominio catalítico es un sitio sensible a la proteolisis, que genera dos fragmentos: el dominio regulador y el dominio quinasa (PKM). Esta fragmentación, favorecida por el cambio conformacional que provoca la activación y asociación a la membrana de la PKC, da lugar a la formación de una quinasa activada constitutivamente, al verse libre del dominio regulador (Liu, 1998; Goode, 2004).

Aunque los primeros estudios realizados relacionaron la proteolisis con la activación de la PKC, hoy se considera un proceso inactivador. El interés en la proteolisis de PKC se potenció al observar que los ésteres de forbol, que ejercían su efecto a través de la activación de PKC, provocaban la reducción en la cantidad de PKC en la célula. Este efecto, que se cree que ocurre, al menos en parte, por un aumento en la proteolisis de PKC, se llamó "down-regulation". Hay indicios de que este proceso de degradación puede generar formas alternativas de PKC que realicen funciones adicionales o complementarias a las del holoenzima intacto, provocando una respuesta celular diferente a la que ocurriría al activar a la PKC completa (Goode, 2004).

La degradación proteolítica de la PKC en respuesta a los ésteres de forbol promotores de tumores se produce por medio de la ruta ubiquitina-proteasoma. La degradación por marcaje con ubiquitina es una respuesta fisiológica, que requiere que la PKC esté activada y que se produce también en respuesta al DAG. Todo parece indicar que este es un mecanismo de regulación de la actividad PKC mediante retroalimentación negativa (Lu *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2000).

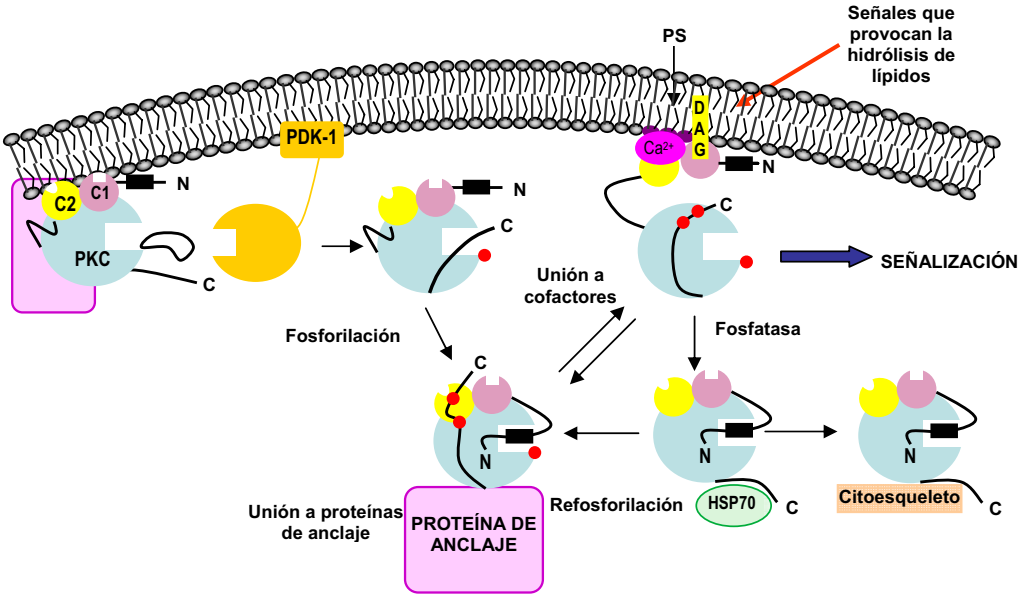


Figura I-5. Modelo de regulación de la PKC por fosforilación, región pseudosustrato, unión a cofactores e interacciones con proteínas de anclaje. La proteína recién sintetizada, e inactiva, se asocia con la membrana plasmática, donde es fosforilada por la PDK-1. Esta fosforilación desencadena dos reacciones de autofosforilación, tras las cuales la enzima se libera al citoplasma, donde se mantiene en estado inactivo debido a la interacción con el pseudosustrato. La producción de DAG y la movilización de Ca^{2+}, en el caso de las isoformas convencionales, activan alostéricamente a la PKC. La unión de sus dominios C1 y C2 a la membrana plasmática provoca la liberación del pseudosustrato del sitio activo, permitiendo la unión del sustrato y la catálisis. Además de la regulación por fosforilación y cofactores, la actividad de la PKC se regula mediante la interacción con proteínas de anclaje, que determinan su localización celular. En su conformación activa, la PKC es desfosforilada rapidamente. La chaperona Hsp70 se une al motivo de giro desfosforilado y estabiliza la PKC, permitiendo su refosforilación. En ausencia de Hsp70, o como resultado de la activación crónica, la PKC desfosforilada se acumula en la fracción insoluble en detergente, donde puede ser degradada (Newton, 2001 y 2003).

● *Grupo fosfato*

2.4. Sustratos de PKC

La PKC cataliza la transferencia de un grupo γ-fosfato del ATP al grupo hidroxilo libre de una serina o, con menor frecuencia, treonina en las proteínas sustrato. Los sustratos de PKC contienen motivos en su secuencia que determinan la especificidad de la quinasa. Esas secuencias pueden ser: S*/T*XK/R, K/RXXS*/T*, K/RXXS*/T*XK/R, K/RXS*/T* o K/RXS*/T*XK/R, donde X representa a cualquier aminoácido (Liu, 1996).

A pesar de la existencia de una secuencia consenso, las secuencias de fosforilación óptimas para cada isoenzima son diferentes y similares a la secuencia pseudosustrato, lo que podría explicar por qué diferentes isoenzimas fosforilan diferentes sustratos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Nishikawa, 1997).

Se conoce un gran número de proteínas que son fosforiladas por PKC *in vitro* e *in vivo*, entre las que se encuentran receptores de factores de crecimiento, canales iónicos, factores de transcripción y traducción, la neuromodulina, las MARCKS (sustratos de la quinasa C miristoilados ricos en alanina), receptores colaminérgicos y acetilcolinérgicos, dinamina I (proteína de unión a GTP), proteínas del citoesqueleto y algunos productos de proto-oncogenes, como $p21^{ras}$ o I-κB (Liu, 1996; Nishikawa, 1997; Kanashiro y Khalil, 1998).

2.5. Métodos de estudio de la participación de la PKC en la transducción de señales

El estudio de las rutas de transducción de señales entraña una gran complejidad, ya que diferentes vías se solapan y entrecruzan. A esto hay que añadir que en las cascadas de señalización participan isoformas proteicas con gran homología estructural y funcional, lo que dificulta la determinación de la función de cada una de ellas (Koller, 2000). Estos problemas son evidentes en el caso del análisis de las isoformas de la PKC.

Uno de los métodos más utilizados para intentar determinar la función de PKC es la **utilización de ésteres de forbol**. Su empleo reveló la importancia de la PKC en el

proceso de activación de los linfocitos T (Wilkinson y Nixon, 1998) y ésta fue considerada durante mucho tiempo el único receptor celular de los ésteres de forbol.

Los **sistemas de sobreexpresión**, en los que una proteína determinada, o un derivado de ésta (por ejemplo un mutante dominante negativo, o un mutante con actividad constitutiva), se expresan a niveles inusualmente altos, también se han utilizado para el estudio de la PKC. Sin embargo, al analizar los resultados de estas investigaciones, hay que tener en cuenta que la sobreexpresión de proteínas presenta el problema de que puede alterar las interacciones con otras proteínas (determinadas, en gran medida, por su concentración) o su localización celular (Koller, 2000).

Una limitación que presenta el uso de **mutantes dominantes negativos** (es decir, proteínas alteradas que afectan a la actividad del producto génico normal) es que no puede evitar las interacciones entre proteínas, ya que normalmente la mutación afecta a sitios distintos a los implicados en éstas (Koller, 2000). El mismo problema se presenta en el caso de utilizar quinasas en las que se ha suprimido la actividad del dominio catalítico ("*kinase dead*").

Los **inhibidores** han sido muy utilizados en el estudio de las enzimas que participan en las cascadas de señalización. Su limitación fundamental es la inespecificidad que presentan, ya que las proteínas que catalizan reacciones químicas similares poseen regiones altamente conservadas.

En el caso de la PKC se ha descrito un gran número de moléculas inhibidoras, con diferente grado de especificidad (Hu, 1996), que se han utilizado en multitud de trabajos con el propósito de investigar las funciones específicas de diferentes isoformas. Estos inhibidores pueden clasificarse según su mecanismo de acción: moléculas que se unen al sitio de interacción con ésteres de forbol o fosfolípidos (como la esfingosina o la calfostina C), moléculas que compiten por el sitio de unión al péptido o inhibidores que compiten con el ATP, entre los que se encuentran la H7, la estaurosporina, K252, los indocarbazoles o las bisindolmaleimidas (Nixon, 1997; Kanashiro y Khalil, 1998).

Entre los inhibidores más específicos se encuentra el LY333531, inhibidor competitivo de la unión a ATP específico de la isoforma β. La rottlerina ha sido considerada durante mucho tiempo un inhibidor específico de PKCδ; sin embargo, se ha demostrado que actúa también sobre PKCα y sobre otras quinasas diferentes a PKC: MAP quinasas, caseína quinasa II, PKA y calmodulina quinasa III (Way, 2000; Spitaler y Cantrell, 2004).

Variantes del uso de inhibidores, que se han utilizado con el objetivo de reducir la actividad de diferentes isoformas de PKC, son la utilización de **péptidos pseudosustrato (**Barja *et al.*, 1994**)** o de **anticuerpos específicos**, que podrían inhibir específicamente las isoenzimas contra las cuales se dirigen (Szamel *et al.*, 1993 y 1997).

Los **sistemas génicos *knockout*** estudian la función de una proteína alterando la función del gen que la codifica e impidiendo su expresión por completo en todo el organismo. Aunque pueden proporcionar mucha información, también presentan inconvenientes. Un aspecto que hay que tener en cuenta al utilizar ratones *knockout* es que no existe la certeza de que los fenotipos observados se deban a defectos durante el desarrollo, a la pérdida de la actividad enzimática en el tejido adulto o a defectos en el reclutamiento o formación de complejos señalizadores. En el caso de la PKC, no puede excluirse tampoco la existencia de funciones compensatorias o complementarias de otras isoformas. En la tabla I-2 se resumen las principales aportaciones sobre la función de PKC en la respuesta inmunitaria obtenidas a través del uso de ratones *knockout*.

Isoforma de PKC eliminada	Fenotipo
α	Defecto en las células T
β	Defectos en células B, neutrófilos y mastocitos
γ	No se expresa en tejidos del sistema imunitario
δ	Células B y mastocitos hiperproliferativos, alteración en la inducción de la anergia de las células B
ε	Defecto en la activación de macrófagos
η	.....
θ	Defecto en la señalización por el TCR
ζ	Defecto en la señalización por el BCR
λ/ι	Letal

Tabla I-2. Resumen del efecto sobre la respuesta inmunitaria de la eliminación de genes de isoformas específicas en ratones. (Tomado de Tan y Parker, 2003 y Baier, 2003).

- **La tecnología antisentido**

Una alternativa a los métodos anteriores es la utilización de moléculas antisentido. Esta estrategia se basa en los mecanismos de hibridación de los ácidos nucleicos, su estructura y función. Los oligonucleótidos antisentido son secuencias de nucleótidos complementarias a las del mRNA que codifica la proteína objeto de estudio, por lo que se unen con gran afinidad y selectividad a él. La inhibición puede ejercerse mediante varios mecanismos: impidiendo el corte y empalme, evitando la traducción, al interferir con el ensamblaje de los ribosomas, o a través de la RNasa H endógena, que reconoce los dúplex de RNA y degrada la cadena de mRNA (Koller, 2000). Este método ofrece además la posibilidad de conseguir la inactivación continua de un gen particular, insertando el molde de DNA en orientación antisentido en un vector de expresión, de manera que la molécula se exprese en la célula permanentemente (Strauss, 1997) (ver figura I-6). Se supera así el problema que planteaba el estudio de proteínas de vida

media muy larga, que puede requerir varios días para observar una reducción significativa en sus niveles (Koller, 2000).

Una de las ventajas más importantes que tiene el uso del RNA antisentido es que puede inhibir proteínas sin restricciones con respecto a su localización celular o su función, y no es necesario conocer la secuencia completa del gen para conseguir una inhibición efectiva (Bennet y Cowsert, 1999; Koller, 2000).

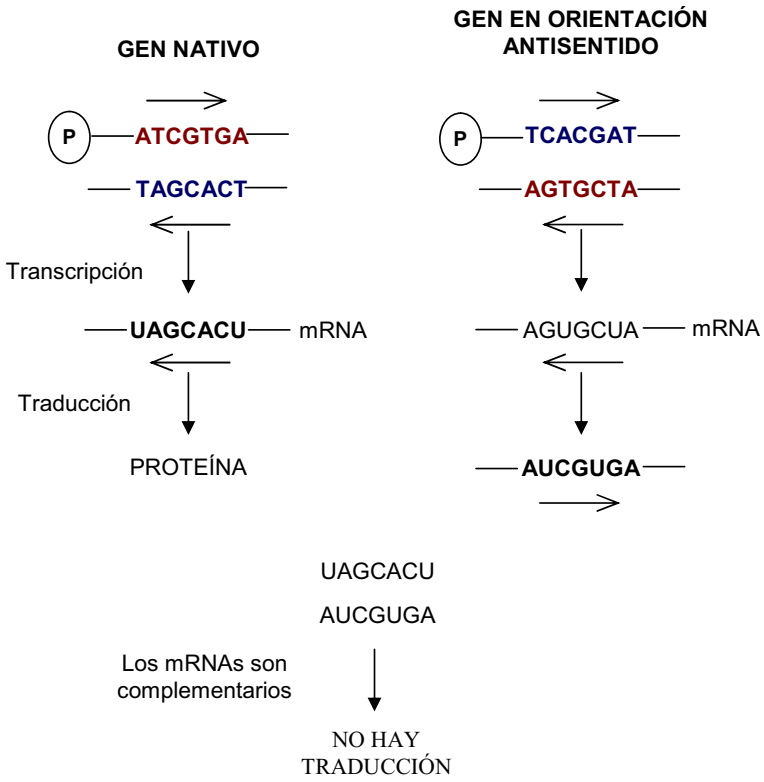


Figura I-6. Esquema del efecto de la introducción de un gen en orientación antisentido

La técnica del RNA antisentido, a pesar de sus ventajas, presenta también algunas limitaciones como herramienta de estudio. Así, el hecho de que el uso del antisentido produzca un efecto, no implica necesariamente que el experimento haya funcionado, ya que se han detectado efectos del RNA antisentido que no se deben a la inhibición de la expresión de la proteína de interés. Por otro lado, el hecho de que no se aprecie un efecto no quiere decir que la inhibición no haya tenido éxito. Hay que tener en cuenta que los genomas eucariotas son redundantes, por lo que es posible que otros genes puedan suplir la carencia gen silenciado (en el caso de las familias isoenzimáticas, es muy probable que esto ocurra). Existe además la posibilidad de que pequeñas cantidades del producto génico pueden ser suficientes para realizar la función, impidiendo que se detecte el fenotipo mutado (Nellen y Lichtenstein, 1997).

En los últimos años, el **RNA de interferencia** (RNAi) ha sido utilizado con profusión para silenciar un producto génico, con muy buenos resultados de especificidad e inhibición. La técnica del RNAi consiste en suprimir la expresión de un gen introduciendo en la célula un RNA de doble cadena, dsRNA, que contiene la secuencia del gen cuya expresión se desea evitar. De manera resumida, la actuación del RNAi se produce en tres pasos: en primer lugar, el dsRNA se escinde en fragmentos de 21 a 25 nucleótidos (siRNA), en los que dos nucleótidos sobresalen en sus extremos 3'. Esta ruptura es catalizada por una enzima denominada Dicer. A continuación, los fragmentos de siRNA se ensamblan en un complejo denominado RISC (complejo silenciador inducido por RNA). Durante la formación de este complejo, el dúplex de RNA se desenrolla, liberándose una de las hebras y permaneciendo la otra unida a las proteínas que lo forman. Esta cadena se apareará con el mRNA diana (con una secuencia complementaria a la suya), y el dúplex recién formado será cortado en el centro de la secuencia por una RNasa denominada Slicer, impidiendo así su traducción.

En diferentes tipos celulares (no en el caso de mamíferos) se produce un mecanismo de amplificación del dsRNA. En estas células, la cadena liberada del siRNA durante la formación del RISC sirve de cebador para una RNA polimerasa RNA

dependiente, que utiliza el mRNA como molde para sintetizar un nuevo dsRNA (Brantl, 2002; Bantounas *et al.*, 2004; Szweykowska-Kulivíska *et al.*, 2003).

A pesar de sus ventajas, la técnica del RNAi presenta también incovenientes. Su utilización no excluye la posibilidad de que la célula sobreexprese proteínas que suplan la actividad de la que se ha suprimido, cuando el RNAi se introduce de forma prolongada en la célula. Un problema adicional son los posibles efectos secundarios de su introducción en la célula; por ejemplo, en células de mamífero, la introducción de dsRNA induce la producción de interferón, que reduce la síntesis proteica general (Bantounas *et al.*, 2004).

Debido a los inconvenientes que presenta cada uno de estos métodos, cada vez son más numerosos los estudios en los que se utiliza la combinación de estrategias diferentes para tratar de superar sus limitaciones.

2.6. Funciones específicas de las isoformas de PKC

La función biológica específica de las isoformas de la PKC depende de su actividad catalítica y localización celular (Shirai y Saito, 2002). Aunque de forma general la actividad de las diferentes isoformas de PKC se ha relacionado con un gran número de procesos celulares, mencionaremos aquellos en los que su participación ha sido ampliamente contrastada.

La PKCα es un isotipo de expresión universal que participa en una gran variedad de funciones celulares: proliferación, apoptosis, diferenciación, motilidad e inflamación. Las respuestas inducidas por activación o sobreexpresión de PKCα varían dependiendo del tipo celular y de las condiciones de estudio. Así, en algunos tipos celulares participa en el crecimiento, mientras que en otros interviene en la detención del ciclo y diferenciación celular (Nakashima, 2002).

Las isoformas de PKC β1 y β2 se expresan también en muchos tejidos. Hay dos funciones en las que su participación está bien determinada: la transducción de señales

por inmunorreceptores y por receptores de insulina (Kawakami, 2002). En el apartado 2.7 se incluye una descripción más exhaustiva de esta isoforma y su implicación en la activación de los linfocitos T.

La PKCγ se expresa exclusivamente en el cerebro y la médula espinal, y se encuentra únicamente en las neuronas. En estas células, participa en diferentes funciones: potenciación y depresión a largo plazo, aprendizaje, coordinación motora y activación de los receptores de opiáceos. Se ha observado que mutaciones puntuales en este gen pueden contribuir a la aparición de retinitis pigmentosa y a la enfermedad de Parkinson (Saito, 2002).

La isoforma PKCδ se expresa también de forma universal, y se ha demostrado su intervención en el control del crecimiento celular, diferenciación y apoptosis (Kikkawa, 2002). Los estudios en ratones *knockout* deficientes en la expresión de esta isoforma sugieren su implicación en la función inmunitaria y biología vascular (Steinberg, 2004).

La PKCε regula varias funciones fisiológicas, entre las que se encuentran la activación de los sistemas nervioso, endocrino, exocrino, inflamatorio e inmunitario. Su activación controlada desempeña un papel protector en el desarrollo de la isquemia cardíaca y la enfermedad de Alzheimer, mientras que su activación crónica desencadena enfermedades como la diabetes o el desarrollo de tumores malignos (Akita, 2002).

La PKCη es una isoforma que se expresa en cantidades elevadas en tejidos epiteliales. Esta isoforma es la única activada específicamente por sulfato de colesterol y sulfatida, que son metabolitos de colesterol y cerebrósido, respectivamente. Su sobreexpresión induce la detención del ciclo celular en la fase G1 y la diferenciación de queratinocitos. Los estudios realizados con esta isoforma desvelaron su posible papel protector frente al desarrollo tumoral y su implicación en el desarrollo de las células B (Kashiwagi, 2002).

La expresión de PKCθ se reduce a linfocitos T y músculo. Esta isoforma participa en la activación de células T maduras, como se describe en el apartado 2.7.

La isoforma atípica PKCζ regula rutas de señalización celular inducidas por diferentes estímulos; interviene en la señalización de MAP quinasas, en la activación del factor de transcripción NF-κB, la señalización por la proteína quinasa S6 ribosomal y en la determinación de la polaridad celular (Hirai, 2003).

La PKCλ es otra isoforma atípica de PKC que interviene, igual que PKCζ, en el establecimiento de la polaridad celular y que, como aquélla, se relaciona con el control del crecimiento y la supervivencia celular, a través de la regulación de rutas de señalización que activan a AP-1 y NF-κB (Toker, 1998; Moscat y Díaz-Meco, 2000; Suzuki, 2003).

Debido a la implicación de diferentes isoformas de PKC en importantes procesos biológicos, como la proliferación o la apoptosis, se ha propuesto la utilización de algunas de ellas como dianas terapéuticas en el tratamiento de diversas patologías. Entre los estudios realizados, cabe destacar la evaluación de inhibidores de las isoformas PKCα y β para su empleo en la terapia antitumoral contra diferentes tipos de cáncer (por ejemplo, el inhibidor de PKCβ LY317615 se ha utilizado en ensayos clínicos para el tratamiento de gliomas y linfomas) (Koivunen *et al.*, 2006).

2.7. La PKC en la activación de los linfocitos T

Los linfocitos T contienen al menos ocho isotipos de PKC (α, β, δ, ε, η, θ , ι y ζ), lo que dificulta la determinación de sus funciones específicas. La utilización de los ésteres de forbol como activadores específicos de PKC ha contribuido a la confusión existente con respecto a sus funciones, ya que hay diferentes moléculas que pueden ser activadas por ellos además de PKC. De hecho, se cree que el fuerte efecto de los ésteres de forbol en la activación de las células T podría deberse a su participación en la actividad de p21ras a través de GRP-Ras, más que a través de la activación de PKC (Baier, 2004).

Aunque hay muchos estudios que demuestran la implicación de la PKC en la activación, diferenciación, adhesión celular, motilidad y muerte celular de las células T inducida por la activación, no se sabe exactamente cual es su papel en estos procesos.

Todavía se desconocen las funciones específicas de las isoformas de PKC, las proteínas adaptadoras a las que se unen en las células T y cuales son sus sustratos. En la figura I-7 se resumen los principales acontecimientos relacionados con la actividad linfocitaria en los que participa la PKC, y cuales son las isoformas que intervienen en cada uno de ellos (Baier, 2004).

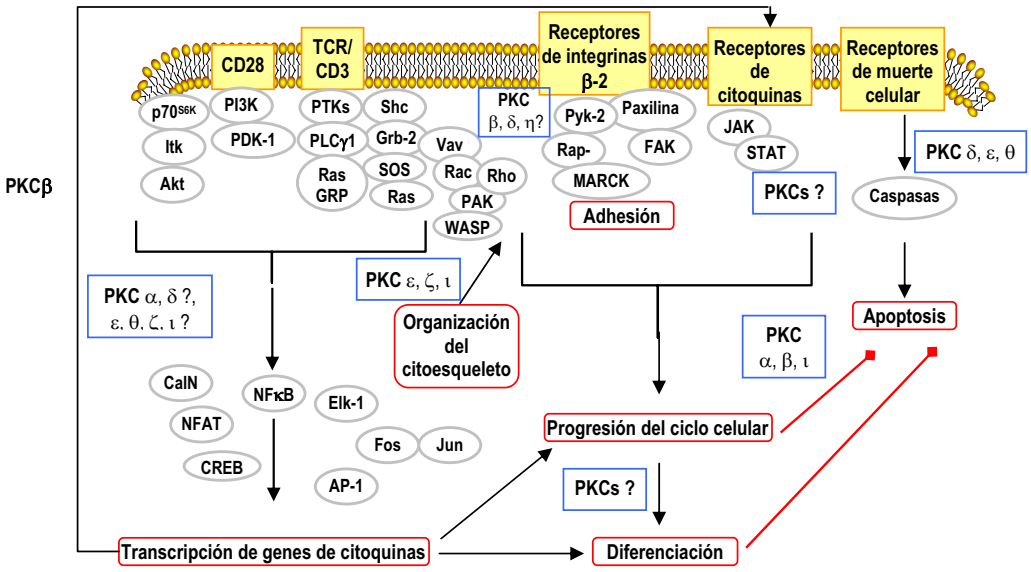


Figura I-7. Esquema de la participación de diferentes isoformas de PKC en la actividad de linfocitos T, en el que se indican las proteínas implicadas en diferentes procesos celulares y las isoformas de PKC que se han relacionado con ellos (Baier, 2004).

Rutas inhibidoras

La observación de que los ésteres de forbol inducían la translocación de PKC en los linfocitos T, y que esto se relacionaba con su capacidad para inducir la expresión de IL-2 e IL-2R, llevó a asumir que esta enzima desempeñaba un papel clave en la activación de las células T. Posteriormente, mediante el uso de inhibidores de PKC se demostró su participación en la proliferación de las células T en respuesta a la activación por el antígeno y en la síntesis de IL-2 e IL-2R. Sin embargo, estos estudios no proporcionaban

información sobre la función específica de las diferentes isoformas de PKC, por lo que fue necesario recurrir a otro tipo de análisis, que se resumen a continuación.

Mediante la utilización de anticuerpos específicos de isoenzima se demostró el papel de PKCβ en la síntesis de IL-2 y de PKCα en la expresión de su receptor (el IL-2R) (Szamel *et al.*, 1993 y 1997) y utilizando secuencias pseudosustrato específicas para las isoformas α, γ, δ y ε, se observó reducción en la actividad PKC y en la expresión de IL-2R y TNF-β en células Jurkat (Barja *et al.*, 1994) .

Experimentos de sobreexpresión demostraron que la PKCα interviene en la respuesta de las células T a la activación, y de PKCβ en la selección de linfocitos en el timo y la activación de células T maduras (Wilkinson y Nixon, 1998). La expresión de proteínas constitutivamente activas también ha aportado datos interesantes con respecto a la participación de isoformas específicas en la respuesta de células T, al relacionarse la PKCα y la PKCε con la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF-AT1 y PKCε con la activación de NF-κB (Genot *et al.*, 1995).

El papel de PKCθ en la activación de las células T se demostró mediante la generación de ratones *knockout*. Las células T deficientes en PKCθ presentan defectos en la respuesta al estímulo, debido a la falta de activación de los factores NF-AT, NF-κB y AP-1 (revisado en Altman *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2000; Altman y Villalba, 2002; Isakov y Altman, 2002; Manicassamy *et al.*, 2006; Sedwick y Altman, 2004). Otros estudios demostraron, mediante sobreexpresión o inhibición de esta enzima, su implicación en la activación de AP-1 y NF-κB en respuesta a señales coestimuladoras (Tan y Parker, 2003). Además de estas funciones, se ha descrito la intervención de la PKCθ en la activación de JNK y SEK1/MKK4 (Altman *et al.*, 2000).

Las isoformas de PKC α, ι y ζ también se han relacionado con las cascadas de señalización que activan el factor de transcripción NF-κB (Baier, 2004). En el caso de PKCα se ha descrito su papel en la activación de I-κB en la misma ruta de señalización

que PKCθ, pero ocupando una posición más próxima al receptor que ésta (Trushin *et al.*, 2003).

A pesar de que diversos trabajos sugieren la participación de PKCε en el proceso de activación de células T (Szamel, 1998; Genot, 1995), los experimentos realizados en células T procedentes de un ratón *knockout* para esta isoforma no mostraron alteraciones en la activación de NF-κB, proliferación o secreción de IL-2, ni en la expresión de los marcadores de activación CD25, CD69 y CD44 (Gruber *et al.*, 2005).

El uso de la tecnología antisentido ha demostrado la implicación de PKCα en la síntesis de IL-2 y TNF-α, la expresión del IL-2R y su intervención en la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF-AT (López-Lago *et al.*, 1999) y de PKCζ en la activación de NFκB y la de PI3K inducida por IL-2 (Wilkinson y Nixon, 1998).

- **La PKCβ y su papel en la activación de las células T**

El gen que codifica la PKC da lugar, mediante un proceso de corte y empalme alternativo (representado en la figura I-8), a dos variantes diferentes, denominadas PKCβI (de 671 aminoácidos) y PKCβII (de 673 aminoácidos), que difieren únicamente en los últimos 50 ó 52 aminoácidos de su secuencia, respectivamente (Blobe *et al.*, 1993). La expresión de estas isoformas varía en función del tipo celular y, aunque algunas células expresan las dos, hay otras en las que sólo aparece una de ellas. En el apéndice se muestran las secuencias aminoacídica y del cDNA de las dos variantes de PKCβ.

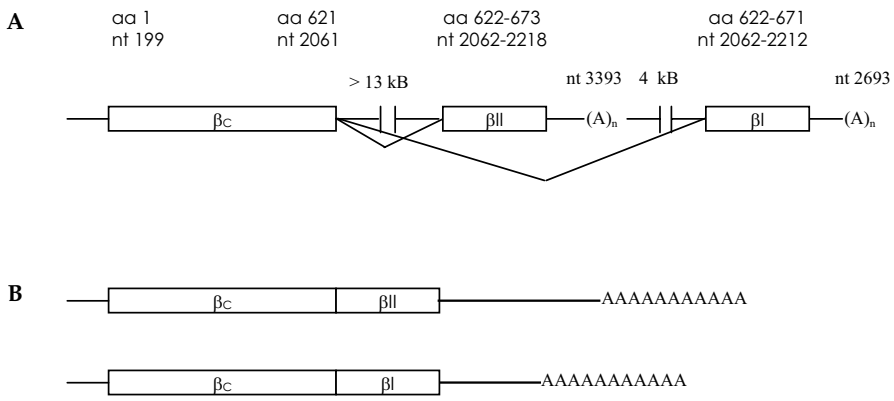


Figura I-8. Representación esquemática de la estructura del gen de PKCβ y los mRNA que se transcriben a partir de él. A. PKCβI corresponde al producto de 671 aa y PKCβII al de 673 aa. Las secuencias codificantes se representan mediante rectángulos, y las no codificantes mediante líneas. La figura excluye los intrones comunes a ambas variantes, y los exones comunes se agrupan con el nombre βc. La numeración de los nucleótidos comienza con el sitio de inicio transcripcional. Los nucleótidos 1-2061 son comunes a la PKCβI y PKCβII.
B. Estructura del mRNA maduro de PKCβI y PKCβII (Blobe *et al.,* 1993*).*

Hay dos procesos de transducción de señales en los que la participación de PKCβ está relativamente bien caracterizada: la señalización de los inmunorreceptores y de los receptores de insulina (Kawakami *et al.*, 2002). Este resumen sobre sus funciones se centrará en el primero, al estar estrechamente relacionado con este trabajo.

La PKCβ parece desempeñar un papel fundamental en la actividad de los linfocitos B. Los primeros indicios de esta función se obtuvieron mediante la generación de un ratón *knockout* que no expresaba esta isoenzima. En estos ratones se observaron deficiencias serias con respecto a la producción de linfocitos B e inmunoglobulinas, mientras que la actividad de los linfocitos T no se veía alterada (Leitges *et al.*, 1996).

La participación de la PKCβ en la proliferación dependiente del BCR fue analizada por dos grupos independientes, utilizando linfocitos procedentes de ratones deficientes en PKCβ. Sus estudios demostraron que la PKCβ realizaba una función esencial en la fosforilación del IKKα, participando en la activación del NF-κB que induce el BCR a través de la tirosina quinasa Btk (Saijo *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2002). Estos resultados

revelaron que el papel de PKCβ en la señalización del BCR es muy similar al de PKCθ en la señalización del TCR (Lin *et al.*, 2000). La comparación entre estas dos rutas señalizadoras se muestra en la figura I-9.

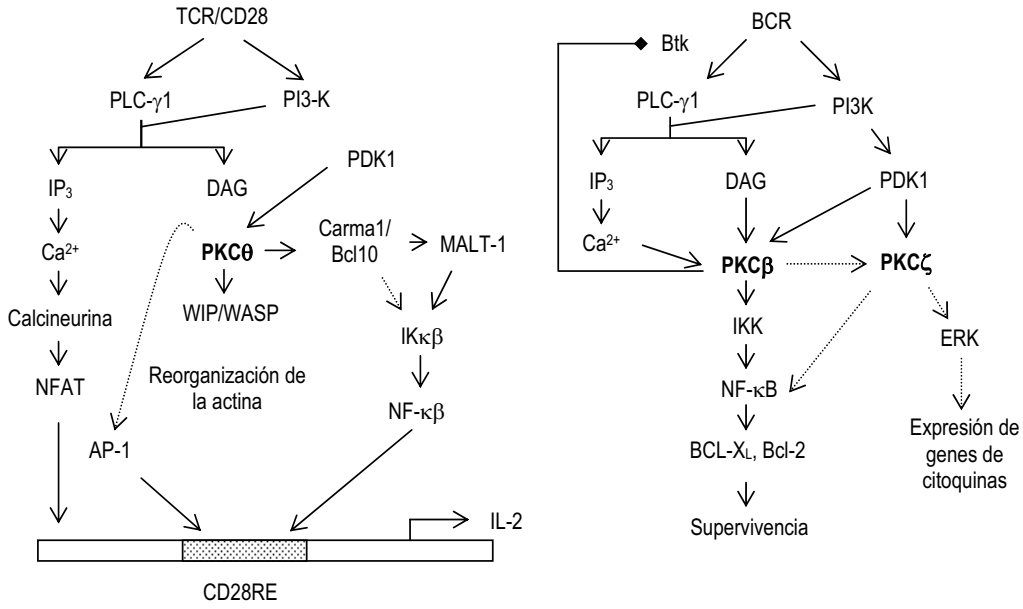


Figura I-9. Comparación de las rutas señalizadoras en linfocitos T y B en las que participan la PKCθ y la PKCβ, respectivamente (Tan *et al.*, 2003).

Ruta inhibidora

A pesar de que los estudios sobre la participación de PKCβ en la activación de células T utilizando ratones *knockout* no evidenciaron alteraciones debidas a la deficiencia en esa isoenzima (Leitges *et al.*, 1996 y Thuille *et al.*, 2004), varios trabajos demostraron su implicación en diferentes aspectos de la activación de linfocitos T. Así, la PKCβ se relacionó con la inducción de la expresión y secreción de IL-2, la activación de MAPK, la expresión del IL-2R, la producción de TNF-β y la migración celular (Freire-Moar *et al.*, 1992; Szamel *et al.*, 1993 y 1995; Volkov *et al.*, 1998 y 2001; Long *et al.*, 2001; Dreikhausen *et al.*, 2003).

II. ANTECEDENTES

El proyecto de investigación en el que se enmarca este trabajo se planteó con el fin de asignar funciones específicas a dos isoformas calcio-dependientes de la PKC (PKCα y PKCβ) en el proceso de activación de los linfocitos T, utilizando como modelo de estudio células Jurkat (una línea leucémica humana de linfocitos T).

Los orígenes del proyecto se fundamentaban en los análisis de la expresión de isoenzimas de PKC en esta línea celular (Freire-Moar *et al.*, 1991) y un primer intento de estudiar su función en la activación, utilizando péptidos pseudosustrato dirigidos contra isoformas concretas. Esta aproximación no permitió alcanzar el objetivo esperado, puesto que los péptidos utilizados no eran capaces de actuar de forma isoespecífica, aunque sí reducían la actividad PKC o alteraban el patrón de respuesta a la activación (Barja *et al.*, 1994).

Posteriormente, utilizando la metodología del RNA antisentido como estrategia para la inhibición selectiva de la expresión de PKCα y PKCβ, se generaron fragmentos de cDNA de la secuencia N-terminal de estas dos isoformas en células Jurkat y se clonaron en orientación antisentido en el vector episomal pREP-3 (Freire-Moar *et al.*, 1992), con el objetivo de reducir la expresión de cada una de ellas. Para analizar el efecto de esta inhibición se determinó la respuesta de las células a la activación, considerando los siguientes aspectos: expresión de la cadena de alta afinidad del IL-2R y producción de IL-2 y TNF (α y β). La respuesta al estímulo de las células deficientes en PKCα y PKCβ sugería papeles opuestos para estas isoformas con respecto a la expresión de IL-2R y TNF-β, que disminuía en las poblaciones con reducción en la expresión de PKCα y aumentaba en las poblaciones deficientes en PKCβ. Con respecto a la producción de IL-2 y TNF-α, su efecto era similar, ya que se reducía en las dos poblaciones celulares (Freire-Moar *et al.*, 1992; López-Lago, tesis doctoral). Sin embargo, no pudo demostrarse que el efecto observado se correlacionase con una reducción específica en la expresión de la isoforma correspondiente, probablemente debido a que las poblaciones utilizadas eran heterogéneas y las células diferían en el nivel de expresión de RNA antisentido. Por esta razón, y para poder demostrar que existía una correlación entre la inhibición de PKCα o

PKCβ y el efecto observado, se hacía necesaria la obtención de poblaciones homogénas con respecto a la expresión de la cada una de las isoformas. Esto se llevó a cabo obteniendo, en primer lugar, clones de células Jurkat con reducción en la expresión de PKCα. Estas células presentaban alteraciones en su morfología (más irregular que la de las células control) y agregación (reducida con respecto al control), además de una actividad proliferativa menor (López-Lago, tesis doctoral). Con respecto a la activación, los resultados obtenidos concordaban con los que se habían obtenido en las poblaciones totales: reducción en la expresión de IL-2Rα, inhibición en la expresión de TNF-α y en la transcripción de IL-2 (López-Lago *et al.*, 1999). Se analizó también en estas células la activación de las ERK, independiente de PKC, y la participación de PKCα en la regulación de los factores de transcripción AP-1, NF-AT y NF-κB, que intervienen en la transcripción del gen de la IL2. La reducción de los niveles de PKCα en las células Jurkat disminuía la activación transcripcional de AP-1 y NF-AT, pero no afectaba a NF-κB. Estos resultados se complementaron con el análisis de las rutas de activación de las MAP quinasas JNK y p38, que no mostró diferencias significativas en la activación de estas proteínas, excepto en el caso de MKK6, la proteína activadora de p38 (datos inéditos).

III. OBJETIVOS

Una vez analizados los efectos de la inhibición en la expresión de PKCα sobre diferentes acontecimientos de la activación de células Jurkat, y teniendo en cuenta el posible papel opuesto para PKCβ que sugerían algunos de los resultados preliminares descritos en el apartado "Antecedentes", nos propusimos llevar a cabo el trabajo que aquí se presenta. En él se pretende determinar la participación específica de la PKCβ en procesos similares a los estudiados en las células deficientes en PKCα para, de forma comparativa, poder aclarar las funciones desempeñadas por cada una de las isoformas en los mismos acontecimientos de la activación y confirmar su posible papel antagónico. Este planteamiento se plasma en los objetivos que se enumeran a continuación:

1. Obtención de líneas celulares con expresión específicamente reducida de la isoforma PKCβ.

2. Análisis de la morfología, estado de agregación y proliferación de las líneas celulares con inhibición selectiva de PKCβ.

3. Estudio de la activación de las líneas celulares recombinantes, que incluye el análisis de la expresión de marcadores de activación (CD69 y receptor de IL-2), expresión de citoquinas (IL-2, IFN-γ, IL-8, TNF-α y TNF-β), patrón de fosforilación en tirosina y activación de las rutas de MAP quinasas (ERK, JNK y p38).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

Las células Jurkat E6.1 (una línea leucémica de células T humanas) se obtuvieron de la ECACC (*European Collection of Cell Cultures*). Su cultivo se realizó a 37 °C y 5% de CO_2 en una atmósfera humidificada, utilizando medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma), suplementado con 2 g/l de $NaHCO_3$, 100 μg/ml de estreptomicina (Sigma), 100 UI/ml de penicilina (Sigma) y 10% de suero fetal bovino (Klinus). Antes de su uso, el suero fetal bovino se calentó en un baño a 56 °C durante 30 minutos para inactivar el complemento. El cultivo de los clones transfectados con los plásmidos pREP-3 y as-PKCβ-pREP3 se realizó utilizando el mismo medio de cultivo, al que se añadieron 400 μg/ml de higromicina B (Calbiochem), empleada como antibiótico de selección.

Para evitar el efecto de un elevado número de pases, los cultivos se renovaron regularmente (aproximadamente cada tres meses) a partir de alícuotas almacenadas en nitrógeno líquido. Las células se congelaron a una concentración de entre 5 y 10 x 10^6 células/ml en un medio compuesto por un 90% de suero fetal bovino y 10% de DMSO (Sigma) como criopreservante, manteniéndolas a -80 °C durante 24 horas, antes de introducirlas en nitrógeno líquido utilizando criotubos de Nunc. Los cultivos a partir de las células congeladas se iniciaron mediante calentamiento en un baño a 37 °C con agitación suave, centrifugando posteriormente las células a baja velocidad (1200 rpm en una centrífuga Beckman CS-6R) para retirar el DMSO del medio de cultivo, resuspendiéndolas a continuación en muy poco volumen de medio de cultivo RPMI-1640 (de 2 a 5 ml) hasta que se observó crecimiento celular; en ese momento, las células se diluyeron para mantenerlas a las concentraciones recomendadas (entre 2 x 10^5 y 1 x 10^6 células/ml) en frascos de cultivo Costar. Todos los experimentos se realizaron utilizando células en fase de crecimiento exponencial, que se lavaron en PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM; KH_2PO_4 1,5 mM) antes de su uso.

2. Observación de la morfología celular

Los cultivos de los diferentes clones se observaron durante su fase de crecimiento exponencial en un microscopio invertido con contraste de fases Olympus IX50 (Japón). Las fotografías se tomaron con una cámara Olympus DP-10.

3. Análisis del número y viabilidad de las células

El recuento del número de células se realizó directamente a partir del cultivo utilizando una cámara de Neubauer. En todos los casos, se determinó la viabilidad celular mediante la tinción de la muestra en proporción 1:1 con azul tripán (Sigma), un colorante vital que atraviesa únicamente la membrana plasmática de las células muertas.

4. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo, pREP3 y as-β-pREP3 fueron una donación del Dr. J. M. Freire-Moar, del Department of Molecular Immunology, Syntex Discovery Research, Palo Alto, CA.

El plásmido pREP3 (figura IV-1) es un vector episomal derivado del virus de Epstein-Barr, que se replica extracromosómicamente en las células eucariotas. Este plásmido posee un gen de resistencia a ampicilina, que permite la selección de las bacterias eficientemente transformadas, y otro de resistencia a higromicina, que posibilita la selección de las células eucariotas eficientemente transfectadas (Groger *et al.*, 1989).

Para obtener el vector recombinante as-PKCβ-pREP3 se introdujo en el plásmido pREP3 un fragmento del cDNA de PKCβ, de 297 pares de bases, en orientación antisentido. El fragmento introducido corresponde a la secuencia comprendida entre las bases -7 y 290 del cDNA de las células Jurkat, amplificado mediante PCR utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de rata de esta proteína (Freire-Moar *et al.*, 1992).

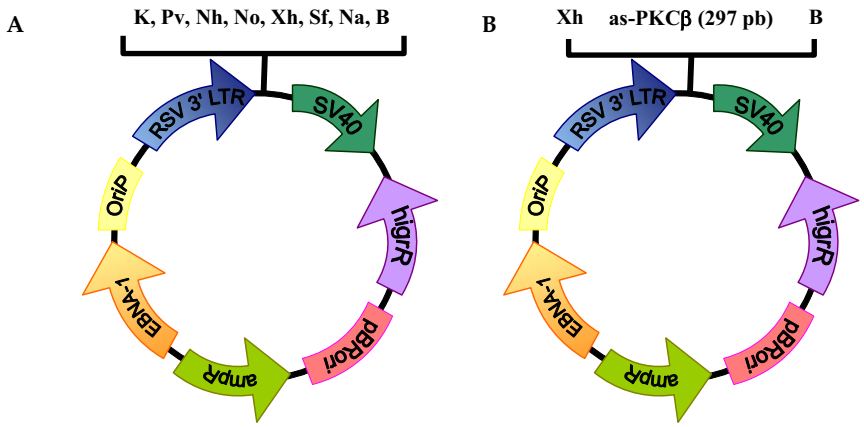


Figura IV-1. Vectores pREP-3 (A) y as-PKCβ-pREP-3 (B)
RSV 3' LTR: Promotor constitutivo del virus del sarcoma de Rous (RSV)
SV40: Elementos procesadores del RNA procedentes del virus de simio 40 (SV40)
higrR: Gen de resistencia a higromicina
pBRori: Origen de replicación del plásmido pBR220
ampR: Gen de resistencia a ampicilina
EBNA-1: Antígeno nuclear 1 del virus de Epstein Barr
oriP: Origen de replicación en eucariotas

K: *Kpn*I, **Pv:** *Pvu*II, **Nh:** *Nhe*I, **No:** *Not*I, **Xh:** *Xho*I, **Sf:** *Sfi*I, **Na:** *Nae*I, **B:** *Bam*HI

5. Preparación de bacterias electrocompetentes

Para la obtención de bacterias capaces de incorporar el plásmido mediante electroporación, se inocularon 5 ml de un cultivo de bacterias DH5α, realizado durante doce horas, en 500 ml de medio LB (bacto-triptona a 10 g/l, extracto de levadura a 5 g/l y NaCl a 10 g/l, pH 7), manteniéndolo en agitación hasta que alcanzó la densidad adecuada (A_{600}= 0,2-0,4). Posteriormente, se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 xg y el sedimento obtenido se resuspendió en agua destilada estéril fría, centrifugando en las mismas condiciones y retirando el sobrenadante. El proceso de resuspensión en agua destilada fría y centrifugación se repitió una vez más, y el sedimento de esta centrifugación se resuspendió en 10 ml de glicerol al 10% estéril. Se centrifugó de nuevo,

y el sedimento obtenido se resuspendió en 1 ml de glicerol al 10%. Las bacterias se mantuvieron en hielo entre las centrifugaciones, que se realizaron a 4 °C.

6. Transformación de bacterias

Las bacterias se transformaron mediante electroporación con 15 μg de los plásmidos pREP3 y as-PKCβ-pREP3. La electroporación se realizó en cubetas de 0,2 cm (BioRad), utilizando un electroporador BioRad. Los parámetros utilizados en la electroporación fueron 1000 OHMs, 25 μF y 1,8 KV. Una vez transformadas, las bacterias se cultivaron durante una hora a 37 °C en medio LB sin ampicilina, para permitir la expresión del gen de resistencia, y se cultivaron después en una placa de LB (con bacto-agar a 15 g/l) al que se añadió ampicilina a 100 μg/ml .

Una de las colonias obtenidas de cada tipo se utilizó para realizar la extracción del plásmido mediante maxiprep, como se describe a continuación.

7. Purificación del plásmido a gran escala (Maxiprep)

La purificación del plásmido se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en Sambrook y Russell (2001). Para ello, las bacterias se cultivaron en agitación en medio LB con ampicilina hasta que la A_{600} alcanzó el valor 0,6. Se inocularon 25 ml de este cultivo a 250 ml de LB, y se incubaron toda la noche a 37 °C. Posteriormente, las bacterias se centrifugaron a 2500 xg durante 15 minutos a 4 °C y se retiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 50 ml de STE frío (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM) y se repitió la centrifugación anterior. A continuación, las bacterias se sometieron al protocolo de lisis alcalina. Para ello, el sedimento obtenido en el paso anterior se resuspendió en 5 ml de disolución 1 (glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8; EDTA 10 mM), añadiendo a continuación 2 ml de disolución 2 (NaOH 0,2 N; SDS al 1%) y mezclando el contenido. La mezcla se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente, y pasado ese tiempo se añadieron 10 ml de solución 3 fría (acetato potásico 5 M al 60% y ácido acético glacial al 11,5% en agua), agitando de nuevo. La mezcla se mantuvo

10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 2500 xg durante 15 minutos a 4 °C. Después de esta centrifugación el sobrenadante se filtró a través de una gasa, y al filtrado se le añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos, se mezcló y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrigugó la mezcla a 3000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sedimento se lavó con etanol de 70° a -20 °C, que se retiró rápidamente con una pipeta Pasteur, disolviendo el sedimento lavado en 5 ml de TE (Tris 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM).

A la disolución de ácidos nucleicos se le añadió un volumen de LiCl 5M, se mezcló bien y se centrifugó a 12000 xg durante 10 minutos a 4 °C, para eliminar el RNA de alto peso molecular. Al sobrenadante obtenido se le añadió un volumen de isopropanol, mezclando y centrifugando después a 12000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente para precipitar los ácidos nucleicos. Tras decantar el sobrenadante, el sedimento obtenido se resuspendió en 700 µl de TE con RNasa pancreática a 20 µg/ml, manteniendo la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se añadió un volumen de NaCl 1,6 M con PEG 8000 al 13%, mezclando en un vórtex para recuperar posteriormente el DNA plasmídico mediante centrifugación a 12000 xg durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se eliminó por aspiración y el sedimento se disolvió en 500 µl de TE.

A continuación, se realizó la extracción fenol-cloroformo para eliminar los restos de proteínas. A la suspensión anterior se le añadió un volumen de fenol saturado, mezclando en vórtex un minuto y centrifugando a 12000 xg durante cinco minutos. Se retiró la fase acuosa y se le añadió un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, mezclando en vórtex un minuto y centrifugando a 12000 xg durante dos minutos. Se retiró la fase acuosa y se mezcló con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, repitiendo la mezcla y centrifugación anteriores. A la fase acuosa obtenida se le añadieron 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M y dos volúmenes de etanol puro, dejando la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos y recuperando el DNA plasmídico por centrifugación a 12000 xg a 4 °C. El sobrenadante se retiró por aspiración y al sedimento

se le añadieron 200 µl de etanol de 70° a 4 °C, mezclando en un vórtex y centrifugando a 12000 xg durante dos minutos. El sobrenadante se eliminó por aspiración y el sedimento se dejó secar al aire, resuspendiéndolo en ese momento en 500 µl de TE. La concentración del plásmido se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm, y la disolución del plásmido se almacenó -20 °C.

8. Transfección celular

La introducción del vector en las células Jurkat se realizó mediante electroporación. Para obtener una población de células que pudieran ser utilizadas como control, 10^7 células se transfectaron con 15 µg del plásmido pREP3 sin inserto, en 300 µl de medio de electroporación: RPMI con suero y sin antibióticos. La misma cantidad de células fue electroporada con 15 µg del plásmido as-PKCβ-pREP3, con el objetivo de obtener una población de células que mostrase una expresión de PKCβ reducida.

La electroporación se realizó a temperatura ambiente, en cubetas de 0,4 cm (BioRad) utilizando un electroporador BioRad con extensor de capacitancia, a 250 V y 960 µF. Tras la electroporación, las células se llevaron a 20 ml de medio de cultivo completo, y se incubaron a 37 °C durante 48 horas, para permitir la expresión del gen de resistencia a higromicina. Transcurrido ese tiempo, las células se recogieron y se resuspendieron en medio RPMI con 400 µg/ml de higromicina B, a una concentración de $2,5 \times 10^5$ células/ml. Las células se mantuvieron en estas condiciones durante 15 días, para seleccionar aquéllas eficientemente transfectadas y, a continuación, se procedió a su clonación, con el fin de obtener poblaciones homogéneas.

9. Obtención de clones celulares

La clonación se realizó mediante dilución límite en placas de 96 pocillos (Costar), utilizando medio de cultivo completo acondicionado (con un 50% de sobrenadante de cultivos de células Jurkat filtrado a través de un filtro Millipore de 0,22 µm), suplementado con un 30% de suero fetal bovino y 400 µg/ml de higromicina B. A partir de

este momento, se seleccionaron aquellos cultivos en los que se observaba proliferación a partir de una célula inicial.

10. Selección de clones con expresión reducida de PKCβ

Con la finalidad de seleccionar los clones que mostrasen mayor inhibición en la expresión de PKCβ, se cuantificaron mediante *Western blot* los niveles de esta proteína presentes en los diferentes clones. Las células se contaron, y el mismo número de células de cada clon se lisó en tampón de carga: Tris-HCl 120 mM, pH 6,8; glicerol al 20%; β-Mercaptoetanol al 10% y SDS al 4%, pasando la muestra diez veces a través de una jeringuilla de 1 ml e hirviéndola durante 5 minutos antes de cargarla en un mini-gel de poliacrilamida del 8%. La electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes (Tris 25 mM; glicina 192 mM y SDS al 0,1 %) utilizando el equipo Miniprotean II (BioRad) y como marcadores de peso molecular los *Precision Protein Standards (Broad Range)* de BioRad.

Tras la separación electroforética de la muestra, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell), mediante un sistema de transferencia en tanque, utilizando el equipo Mini-Transblot (BioRad) y un tampón compuesto por Tris 25 mM; glicina 192 mM y metanol al 20%. La transferencia se realizó durante dos horas a 100 V o toda la noche a 30 V, en los dos casos a 4 °C.

En algunas ocasiones, las membranas se tiñeron en una solución de Ponceau S (Sigma), compuesta por Ponceau S 2% en TCA 30% y ácido sulfosalicílico 30%, con el fin de comprobar la transferecia de las proteínas a la membrana y verificar que la carga proteica era similar en los distintos canales del gel. La tinción se retiró mediante lavados con TBS-T en agitación.

Las membranas se bloquearon, para evitar la unión inespecífica del anticuerpo, durante 2 horas a temperatura ambiente (o toda la noche a 4 °C) mediante incubación en agitación en tampón TBS-T (Tris 100 mM; NaCl 1,5 M y Tween-20 al 0,5%) con leche

desnatada en polvo al 5 %. Después de esta incubación, se realizaron dos lavados rápidos con TBS-T, uno de 15 minutos y dos de cinco minutos en agitación.

Para detectar la PKCβ se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-PKCβ (Transduction Laboratories) a 1 μg/ml. La incubación se realizó durante dos horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, indistintamente. Después de esta incubación, la membrana se lavó como se indicó anteriormente.

Las membranas se incubaron durante una hora con un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con peroxidasa (HRP) (Amersham) diluido 1:5000 en TBS-T. Después de esta incubación, las membranas se lavaron otra vez. Tras los lavados, las membranas se trataron con los reactivos de quimioluminiscencia ECL (Amersham) durante un minuto, y se revelaron en una placa fotográfica (Fuji), utilizando revelador y fijador de Kodak (*Kodak GBX Developer and Replenisher* y *Kodak GBX Fixer and Replenisher*, respectivamente).

Para demostrar que las diferencias observadas en la intensidad de las bandas inmunorreactivas de PKCβ no eran causadas por variaciones en la cantidad de proteína cargada en el gel, se comprobó que la expresión de actina en las muestras era similar, utilizando las membranas previamente empleadas en la detección de PKCβ. Los primeros anticuerpos utilizados se retiraron, tras dos lavados de las membranas en TBS-T durante 10 minutos en agitación, mediante la incubación durante 30 minutos a 65 °C y en agitación ocasional con el siguiente tampón: SDS al 2 %; β-Mercaptoetanol 100 nM y Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8. Transcurrido ese tiempo, se repitieron los lavados en TBS-T. A continuación, las membranas se bloquearon y se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-actina obtenido en cabra (Santa Cruz Biotech.) a 0,3 μg/ml durante 2 horas en agitación y a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-cabra-HRP obtenido en conejo, a una dilución 1:5000 (Chemicon).

La cuantificación de la expresión de PKCβ y actina se llevó a cabo mediante la densitometría de las bandas obtenidas tras la inmunodetección, utilizando el programa VISAGE, Versión 4.6P ©1993 (Millipore Corporation).

11. Detección de isoenzimas de PKC mediante *Western Blot*

Para comprobar que la reducción en la expresión de PKCβ era específica y no afectaba a la expresión de otras isoformas de PKC presentes en las células Jurkat, se realizaron experimentos de *Western Blot*, siguiendo el protocolo indicado en el apartado anterior y utilizando anticuerpos específicos para cada una de las isoformas. El mismo número de células de cada clon se lisó en tampón de muestra, y la concentración proteica del lisado se determinó mediante el método de Lowry, utilizando el reactivo *DC Protein Assay* (BioRad). En un gel de poliacrilamida del 8 % se cargaron 50 μg de proteína, que se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti-PKCα (Santa Cruz Biotech) y anti-PKC-β, -δ, -ε, -ι, -θ y -ζ (Transduction Laboratories) a 1 μg/ml. Como en el caso anterior, como control adicional de la carga proteica, se realizó la inmunodetección de la actina, utilizando un anticuerpo específico.

12. Inmunoprecipitación

Las células de cada clon se resuspendieron en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; EGTA 10 mM; EDTA 5 mM; NP-40 al 1%; PMSF 1 mM; DTT 1 mM; leupeptina a 5 μg/μl; aprotinina a 5 μg/μl; benzamidina 10 mM; NaF 10 mM y Na_3VO_4 1 mM) a una concentración de 1×10^7 a 2×10^7 células/ml y se lisaron durante 30 minutos en hielo, con agitación ocasional en vórtex, pasando después la muestra por una jeringuilla de 1 ml. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 10000 xg a 4 °C durante 10 minutos y la concentración de proteína en el sobrenadante se determinó utilizando el reactivo *DC Protein Assay*.

Las inmunoprecipitaciones se realizaron utilizando proteína A unida a sefarosa o proteína G unida a agarosa (Sigma), teniendo en cuenta la afinidad de los anticuerpos correspondientes por una u otra. La proteína A/G, hidratada y lavada según las instrucciones proporcionadas por el fabricante, se resuspendió en RIPA en proporción 1:1.

Todos los pasos de la inmunoprecipitación se realizaron a 4 °C para preservar la actividad de la enzima, que se analizó inmediatamente después.

En todos los casos, previamente a la inmunoprecipitación de la muestra, se realizó el acoplamiento entre el anticuerpo correspondiente, anti-PKCβ o anti-PKCα, (5 μg) y la proteína A/G en RIPA (30 μl por muestra) durante toda la noche en agitación. Los extractos proteicos se incubaron durante una hora a 4 °C con 10 μl de proteína A/G sin acoplar al anticuerpo, para retirar proteínas que pudieran unirse a la proteína A/G de forma inespecífica. Tras esta incubación, las muestras se centrifugaron y el sedimento obtenido, que contenía las proteínas unidas inespecíficamente a la proteína A/G, se trató de la misma manera que los inmunoprecipitados, con el objetivo de usarlo como blanco en los ensayos de actividad posteriores. El sobrenadante se incubó en agitación orbital durante cuatro horas con el anticuerpo correspondiente unido a proteína A/G. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron durante dos minutos a 10000 xg, recogiendo los inmunoprecipitados, que se sometieron a dos lavados de 10 minutos cada uno con 1 ml de RIPA (mediante resuspensión y centrifugación posterior a 10000 xg durante dos minutos, seguidos de otros dos lavados iguales con 1 ml de NaCl 150 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Tras el último lavado, se retiró el sobrenadante, utilizándose la matriz (proteína A-sefarosa o proteína G-agarosa unida a la PKC) en los ensayos de actividad quinasa.

12.1. Ensayos de actividad quinasa *in vitro*

Los experimentos de actividad quinasa se realizaron con productos comerciales específicos para analizar la actividad PKC (*Protein kinase C Biotrak enzyme assay system*, Amersham Biosciences), utilizando γ-^{32}P-ATP (Amersham Biosciences). La cuantificación de la actividad de PKCβ se realizó en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 proporcionado por el fabricante, que contenía todos los componentes necesarios para la reacción: Ca^{2+}, fosfatidilserina y PMA, DTT y el péptido sustrato específico para PKC (un octapéptido del factor de crecimiento epidérmico), a los que se añadió el ATP marcado con ^{32}P en tampón Mg^{2+} a una concentración de 0,5 μCi por reacción. La

reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 30 minutos, tras los cuales se añadió a cada muestra tampón de parada.

Las muestras se depositaron sobre discos de papel B81, se dejaron secar a temperatura ambiente cinco minutos y se lavaron con ácido ortofosfórico 75 mM durante 20 minutos, cambiando el tampón de lavado al menos dos veces. Después de los lavados, los discos de papel se secaron en una estufa a 55 °C-60 °C durante 10 minutos.

La radiactividad de las muestras se leyó durante dos minutos utilizando líquido de centelleo (PPO al 0,5% y POPOP al 0,02% en tolueno:tritón 2:1) en un contador Beckman LS6000TA.

Como control positivo se introdujo en cada experimento la actividad de los lisados celulares utilizados como muestra para la inmunoprecipitación, realizando la reacción en las mismas condiciones y sustituyendo el inmunoprecipitado por 25 µl de la muestra correspondiente.

12.2. Análisis de los inmunoprecipitados mediante *Western blot*

En los casos en que el resultado de la inmunoprecipitación se visualizó mediante *Western blot*, el inmunoprecipitado se resuspendió en tampón de muestra, se hirvió y centrifugó a 10000 xg durante un minuto, sometiendo el sobrenadante a SDS-PAGE, siguiendo el protocolo descrito en apartados anteriores. Posteriormente, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se incubó con los anticuerpos correspondientes y se reveló siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

12.3. Condiciones de inmunoprecipitación de la PKCα

Para la inmunoprecipitación de PKCα se utilizaron cantidades variables de extracto proteico (desde 900 µg hasta 1,5 mg), y se probaron tres anticuerpos diferentes: los anticuerpos policlonales anti-PKCα (Gibco) y anti-PKCα (Santa Cruz

Biotech.) y el anticuerpo monoclonal anti-PKCα (Upstate). En los experimentos realizados con el primer anticuerpo se empleó proteína A unida a sefarosa para realizar la inmunoprecipitación. En el caso de los otros dos, la inmunoprecipitación se realizó con proteína G unida a agarosa, teniendo en cuenta la afinidad que presentaban las IgG correspondientes por la proteína A o la proteína G.

12.4. Condiciones de inmunoprecipitación de la PKCβ

Se utilizaron cantidades comprendidas entre 450 μg y 2,5 mg, con tres anticuerpos diferentes: anti-PKCβ (Transduction Lab.), anti-PKCβ (Gibco) y anti-PKCβI (Santa Cruz Biotech.). La inmunoprecipitación se llevó a cabo utilizando proteína G unida a agarosa con el primer anticuerpo y proteína A unida a sefarosa con los otros dos.

13. Demostración de la presencia del plásmido as-PKCβ-pREP3 mediante PCR en las células transfectadas

13.1. Preparación de la muestra

La determinación de la presencia del vector as-PKCβ-pREP3 en las células establemente transfectadas se llevó a cabo empleando la reacción en cadena de la polimerasa. La obtención del DNA plasmídico que se utilizaría como molde se realizó siguiendo diferentes procedimientos, que se describen a continuación.

El primer método usado fue la lisis de las células en una solución hipotónica a alta temperatura, empleando un bajo número de células, puesto que la presencia de restos celulares podría inhibir la reacción de polimerización. Se recogieron 10^4 células de cada clon, que se resuspendieron en 25 μl de agua destilada y se incubaron a 95 °C durante cinco minutos. A continuación, las muestras se centrifugaron durante tres minutos a 10000 xg para eliminar los restos celulares, y se emplearon diferentes volúmenes del sobrenadante para llevar a cabo la amplificación del DNA. Puesto que

no se obtuvieron resultados positivos mediante este método, se probaron otros alternativos.

El segundo método utilizado consistió en la lisis de las células con un tampón que contenía detergentes no iónicos y proteinasa K (KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; Mg Cl_2 2,5 mM; gelatina a 0,1 mg/ml; Nonidet P40 0,45%; Tween-20 al 0,45% y proteinasa K a 0,06 μg/ml). Las células se resuspendieron en el tampón de lisis a una concentración de 6 x 10^6 células/ml y se incubaron a 55 °C durante una hora. Finalmente, se incubaron a 95 °C durante 10 minutos para inactivar la proteinasa.

El último método utilizado, que proporcionó los mejores resultados, fue la purificación del plásmido utilizando el *QIAprep Spin Miniprep kit*, de Quiagen, siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

13.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los cebadores utilizados en la PCR (sintetizados por Genset SA) fueron los siguientes: 5'-CCTGGATCCGCGCAAGATGGCTGACC-3', que hibrida con el fragmento de PKCβ clonado en el vector, y 5'-GAATCTGCTTAGGGTTAGGCG-3', que hibrida con la región LTR del plásmido. La utilización de estos oligonucleótidos permite la amplificación de una región de aproximadamente 700 pares de bases.

En la reacción de PCR se utilizaron cantidades variables de DNA como molde, en función del método de extracción de DNA utilizado y el clon celular. Se prepararon 12,5 μl de mezcla de reacción en tampón de reacción NH_4 1x, con $MgCl_2$ 1,5 mM; dNTPs 200 μM; Taq polimerasa 0,025 U/μl (Bioline) y cebadores 0,2 μM.

La amplificación se realizó en el termociclador Gene Amp PCR System (Applied Biosystems). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 3 minutos de desnaturalización inicial a 95 °C, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante un minuto, hibridación a 55 °C durante un minuto y extensión a 72 °C

durante treinta segundos. La reacción se completó con cinco minutos de extensión final a 72 °C.

El producto amplificado se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 %, con bromuro de etidio a 0,4 µg/ml, utilizando TBE 0,5x (Tris 44,5 mM; ácido bórico 44,5 mM y EDTA 1mM) como tampón de electroforesis. Para comprobar el tamaño de las bandas obtenidas se utilizaron los marcadores de peso molecular *EZ Load 100 pb rulers* (BioRad). En todas las reacciones se utilizó como control la amplificación de 0,25 ng del plásmido as-PKCβ-pREP3. Los geles se visualizaron y fotografiaron en un GelDoc EQ (BioRad).

14. Análisis de la expresión del mRNA de PKCβ mediante transcripción inversa-PCR (RT-PCR)

14.1. Extracción de RNA

Las células procedentes de cada uno de los clones se recogieron y se lavaron con PBS, y la extracción de RNA se realizó utilizando el Tri Reagent™ (Sigma).

La lisis se llevó a cabo utilizando 1 ml de reactivo por cada 10 x 10^6 células, pasando la muestra varias veces por una punta de pipeta. El homogenado se centrifugó a 16000 xg durante 10 minutos a 4 °C para eliminar material insoluble. El sobrenadante se recogió y se mantuvo durante cinco minutos a temperatura ambiente, para conseguir la disociación completa de los complejos de nucleoproteína. Por cada mililitro de reactivo Tri se añadieron 0,2 ml de cloroformo, se agitaron los tubos con fuerza y la muestra se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 16000 xg durante 15 minutos a 4 °C, obteniéndose tres fases: una fase orgánica (que contenía proteínas), una interfase (que contenía DNA) y una fase acuosa (que contenía RNA). Se recogió la fase acuosa y se le añadió 1/10 de su volumen de isopropanol. La muestra se dejó cinco minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 16000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se

añadió isopropanol (0,5 ml por cada ml de reactivo de lisis). La muestra se mezcló, se dejó 10 minutos a temperatura ambiente y se repitió la centrifugación anterior para precipitar el RNA. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento de RNA se lavó añadiendo la misma cantidad de etanol al 75% que de reactivo de lisis inicial. La mezcla se agitó en un vórtex y se centrifugó a 7500 x g durante cinco minutos a 4 °C. El sedimento se dejó secar al aire y se resuspendió en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato).

Todos los reactivos utilizados garantizaban la ausencia de RNasa y las disoluciones se prepararon tratando el agua con DEPC (Sigma).

14.2. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó mediante retrotranscripción a partir de 1 μg de RNA. El RNA se incubó con 3,5 μM de cebadores oligo $(dT)_{23}$ durante 10 minutos a 10 °C. Las muestras se enfriaron en hielo y se incubaron a 25 °C durante 15 minutos en el tampón de reacción, que contenía dNTPs 500 μM, inhibidor de RNasa a 1 U/μl y transcriptasa inversa (*enhanced AMV reverse transcriptase*) a 1U/ml. Finalmente, las muestras se incubaron durante 50 minutos a 50 °C. Todos los reactivos utilizados se compraron a Sigma.

14.3. PCR

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando como molde el cDNA obtenido en la reacción anterior, y la mezcla de reacción fue la misma que la indicada en el apartado de detección del plásmido.

Los cebadores empleados amplifican un fragmento de 505 pares de bases del cDNA de PKCβ humano (común a las variantes 1 y 2 de PKCβ) y su secuencia es la siguiente: 5'-TAAGGGGGCTGGATCTCTTT-3' y 5'-AAATTGCCATCGGTCTGTTC-3'. Estos oligonucleótidos, que se diseñaron con el programa Primer 3 Input (primer3_www.cgi v 0.2), del Whitehead Institute for Biomedical Research,

Cambridge, MD, USA (Rozen y Skaletsky, 2000), fueron sintetizados por Genosys (Sigma). Las condiciones de PCR empleadas fueron: tres minutos de desnaturalización a 95 °C, 30 ciclos que incluían un paso de desnaturalización de un minuto a 95 °C, un minuto de hibridación a 64 °C y un minuto de elongación a 72 °C. La reacción se finalizó con cinco minutos de elongación a 72 °C.

Los productos de la PCR se visualizaron como se indicó en el apartado de detección del plásmido.

15. Ensayos de proliferación

Los cultivos se ajustaron a una densidad de 5 x 10^4 células/ml en medio completo en una placa de 96 pocillos de fondo plano (Costar). Transcurridas 1, 2 y 3 horas, la proliferación se midió utilizando un ensayo comercial (Cell Titer 96© Aquous One Solution Cell Proliferation Assay, de Promega), que permite determinar el número de células viables, utilizando una sal de tetrazolio que es reducida por el NADPH o NADH producidos en reacciones de deshidrogenación de las células metabólicamente activas. Al reducirse, da lugar a un producto coloreado (formazán), soluble en el medio de cultivo y cuya producción es, por tanto, directamente proporcional al número de células vivas. La cantidad de este producto se midió leyendo la absorbancia de la muestra a 490 con un Microplate Reader model 680 (BioRad).

16. Análisis de expresión de antígenos de la superficie celular mediante citometría de flujo

Las células, a una concentración de 10^6/ml, se estimularon con PMA (Sigma) a una concentración de 10 ng/ml en combinación con el ionóforo de calcio ionomicina (Calbiochem) a 0,5 μg/ml para estudiar la expresión de la cadena α del receptor de IL-2 (CD25). Para la detección del marcador CD69, la misma concentración de células se estimuló con 50 ng/ml de PMA. Después de 16 horas, las células se recogieron, se lavaron con PBS, y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad con los anticuerpos

monoclonales correspondientes: anti-CD25 conjugado con ficoeritrina (Dako) a dilución 1:20, o anti-CD69 conjugado con aloficocianina (Caltag) a dilución 1:100. Tras lavar las células con PBS, la muestra se analizó con un citómetro FACScalibur (Beckton Dickinson). El análisis de los resultados se realizó con el programa Win MDI.

17. Análisis de la producción de citoquinas mediante ensayos basados en el reconocimiento antígeno-anticuerpo

17.1. Análisis de la expresión de IL-2 e IFN-γ

Las células, a una densidad de 10^6/ml, se incubaron durante 16 horas en medio que contenía PMA a 1 ng/ml e ionomicina 1μM para el estudio de expresión de IL-2. En el caso del IFN-γ, el estímulo se realizó con PMA a 10 ng/ml e ionomicina 1μM. La concentración de citoquina en el sobrenadante de los cultivos se cuantificó mediante ELISA utilizando anticuerpos específicos (Diaclon).

Los experimentos de ELISA se realizaron en placas de 96 pocillos (*CovaLink*, de Nunc). Los pocillos se incubaron con el anticuerpo de captura (anti-IL-2 o anti-IFN-γ) durante toda la noche a 4 °C. Después de dos lavados con tampón de lavado (PBS con Tween al 0,05%), los pocillos se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (PBS con BSA al 5%).

Los sobrenadantes del cultivo de cada clon (diluidos 1:10 en el caso de la IL-2 y sin diluir para el análisis del IFN-γ) se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente con un anticuerpo biotinilado que reconocía el IFN-γ, o durante una hora en el caso de la IL-2. Transcurrido ese tiempo, la placa se lavó con tampón de lavado tres veces, y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con estreptavidina ligada a peroxidasa (estreptavidina-HRP). Tras tres lavados, se reveló la presencia de la citoquina con TMB (tetrametil benzidina), incubando la placa en oscuridad hasta la aparición de color. En este momento se paró la reacción añadiendo H_2SO_4 1M, y se leyó la absorbancia de los pocillos a 450 nm, con un filtro de referencia de 630 nm. Las

cantidades de anticuerpo, estreptavidina y TMB utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante.

La concentración de citoquina se cuantificó realizando una recta patrón con concentraciones conocidas de cada una de ellas, que se trataron igual que las muestras. Las concentraciones utilizadas de IFN-γ cubrían el rango 0-400 pg/ml, y las de IL-2 0-1000 pg/ml.

Las absorbancias se leyeron en un Microplate Reader model 680 (BioRad).

17.2. Análisis de la expresión de IL-8 y TNF-α

Las células, a una densidad de 10^6/ml se incubaron durante 16 horas en medio de cultivo RPMI-1640 con PMA a 10 ng/ml e ionomicina a 0,5 μg/ml. Transcurrido ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y las concentraciones de las citoquinas se determinaron en el Complejo Hospitalario de la Universidad de Santiago utilizando el analizador IMMULITE ® (Diagnostic Products Corporation), que cuantifica la concentración de citoquina mediante un ensayo luminiscente basado en el reconocimiento antígeno-anticuerpo.

18. Análisis de la producción de citoquinas mediante RT-PCR

Las células se incubaron en medio de cultivo RPMI-1640 completo que contenía ionomicina PMA a 1 ng/ml e ionomicina 1 μM durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo, se lavaron con PBS y la extracción de RNA se realizó utilizando el Tri Reagent™ (Sigma), siguiendo el mismo protocolo que en la RT-PCR realizada para analizar la expresión del mRNA de PKCβ.

Los cebadores empleados para la detección del TNF-β se diseñaron con el programa Primer 3 Input, los utilizados para detectar la IL-2 se tomaron de Dreikhausen *et al.* (2003), y los que amplifican el fragmento de actina se tomaron de Long *et al.* (2001); todos los cebadores fueron sintetizados por Genosys (Sigma). Las condiciones de PCR y el tamaño de los fragmentos amplificados se indican en la tabla IV-1.

Todas las reacciones de amplificación se iniciaron con un paso de desnaturalización inicial, a 94 °C o 95 °C durante cinco minutos (según corresponda a cada muestra) y se finalizaron con cinco minutos de extensión a 72 °C.

cDNA AMPLIFICADO (pb)	CEBADORES	PROGRAMA
IL-2 (457 pb)	5'-ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT-3'	Desnaturalización: 94 ºC, 1 minuto Hibridación: 60 ºC, 1 minuto Elongación: 72 ºC, 1 minuto 30 ciclos
	5'-GTTAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC-3'	
TNF-β (610 pb)	5'-ATGACACCACCTGAACGTCTCTTC-3'	Desnaturalización: 94 ºC, 1 minuto Hibridación: 60 ºC, 1 minuto Elongación: 72 ºC, 1 minuto 30 ciclos
	5'-CGAAGGCTCCAAAGAAGACAGTACT-3'	
Actina (210 pb)	5'-TACATGGCTGGGGTGTTGAA-3'	Desnaturalización: 95 ºC, 1 minuto Hibridación: 55 ºC, 45 segundos (aumentando 0.5 ºC en cada ciclo) Elongación: 72 ºC, 2 minutos 30 ciclos

Tabla IV-1. Condiciones empleadas en las reacciones de PCR para amplificar fragmentos del DNA de la IL-2, el TNFβ y la actina

19. Detección de proteínas fosforiladas en tirosina y estudio de la activación de proteínas de las cascadas de MAP quinasas

El análisis de las proteínas fosforiladas en tirosina y de la activación de proteínas de la cascada de MAP quinasas se realizó mediante *Western blot*, empleando anticuerpos que reconocen a la fosfotirosina, en el primer caso, y a la forma fosforilada de la proteína que se corresponde con la forma activa de la misma, en el segundo.

Las células, a una concentración de 10^6/ml, se incubaron durante una noche en medio de cultivo sin suero, para evitar la activación celular dependiente de éste. Posteriormente, las células se estimularon en medio sin suero durante 10 minutos con PMA 100 nM para detectar la activación de las quinasas ERK 1/2, o durante 15 minutos con PMA a 50 ng/ml e ionomicina a 0,5 μg/ml para el resto de las proteínas, ya que las

quinasas de las familias JNK y p38 requieren una señal de calcio para su activación (Su *et al*., 1994).

El protocolo usado para el *Western blot* de las MAP quinasas y las proteínas fosforiladas en tirosina fue el mismo que se indicó en apartados anteriores, con la única diferencia de que el gel de poliacrilamida utilizado fue del 12%.

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anti-fosfo-ERK 1/2 (BioEngland Labs.), anti-fosfo-SAPK, anti-fosfo-p38, anti-fosfo-ATF-2 (Cell Signaling) y anti-fosfo-tirosina (Beckton Dickinson) a dilución 1:1000. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-conejo-HRP de Amersham diluido 1:5000.

Para establecer un control de carga, la misma membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-actina a 0,3 μg/ml y un anticuerpo secundario anti-cabra-HRP a dilución 1:5000.

20. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de la varianza de una vía en los casos en los que los resultados se ajustaban a una distribución normal.

En los casos en los que los resultados no se ajustaban a una distribución normal, su análisis se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para determinar si las diferencias que presentaba cada uno de los clones deficientes en PKCβ con respecto al grupo control eran significativas, se aplicó el test de Dunn.

V. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo, en el que se pretende inhibir de forma específica la expresión de la PKCβ y examinar algunos de los efectos que esa inhibición pueda provocar en el proceso de activación de los linfocitos T, se presentan según el esquema que se muestra a continuación:

1. Obtención de líneas celulares con reducción en la expresión de PKCβ

1.1. Transfección de células Jurkat con los vectores pREP3 y as-PKCβ-pREP3.

1.2. Obtención y selección de clones control y clones deficientes en la expresión de la PKCβ.

2. Caracterización de la inhibición de PKCβ

2.1. Análisis de la selectividad de la inhibición de la expresión de PKCβ, mediante la determinación de la expresión de diferentes isoformas de PKC en los clones deficientes en PKCβ.

2.2. Inmunoprecipitación de PKCβ en los clones control y as-PKCβ-pREP3.

2.2.1. Ensayos de actividad quinasa en los inmunoprecipitados.

2.2.2. Análisis de los inmunoprecipitados mediante *Western blot.*

2.3. Análisis de la presencia del plásmido as-PKCβ-pREP3 en los clones transfectados con el vector antisentido.

2.4. Estudio del efecto del RNA antisentido sobre los niveles de mRNA de PKCβ.

3. Estudio de la morfología y estado de agregación, viabilidad y proliferación de líneas celulares con inhibición selectiva de PKCβ

3.1. Morfología y estado de agregación de las células.

3.2. Análisis de la viabilidad celular.

3.3. Ensayos de actividad proliferativa.

4. Estudio de la activación en las líneas celulares recombinantes

4.1. Expresión de marcadores de activación en la superficie celular: CD25 y CD69.

4.2. Producción de citoquinas: IL-2, IL-8, IFN-γ, TNF-α y TNF-β.

4.3. Efecto de la inhibición de PKCβ sobre el patrón de fosforilación en tirosina de las proteínas celulares durante la activación.

4.4. Efecto de la reducción de la expresión de PKCβ sobre la activación de MAP quinasas de los grupos ERK, p38 y JNK durante la activación.

1. OBTENCIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON REDUCCIÓN EN LA EXPRESIÓN DE PKCβ

Para estudiar la participación de la PKCβ en la activación de células T, nos propusimos inhibir de forma específica la expresión de esta isoforma y relacionar su ausencia con cambios en la respuesta de las células al proceso de activación. Se escogió la tecnología antisentido como herramienta de trabajo para reducir su expresión de forma selectiva y así comprobar su participación específica en la activación de células Jurkat.

1.1. Transfección de células Jurkat con los vectores pREP3 y as-PKCβ-pREP3

Los plásmidos pREP3 y as-PKCβ-pREP3 se introdujeron en la población de células Jurkat mediante electroporación, como se describió en el apartado de "Material y métodos". El vector pREP3 contiene un gen de resistencia al antibiótico higromicina B, lo que permite seleccionar las células que han sido eficientemente transfectadas y que, por tanto, serán resistentes a la presencia del antibiótico en el medio de cultivo.

Puesto que la resistencia de las líneas celulares a la presencia de antibiótico es variable, previamente se determinó la concentración de antibiótico óptima para el cultivo de las células, es decir, la mínima concentración a la que no se observa crecimiento celular. La concentración de antibiótico que se utilizó fue 400 μg/ml, al comprobar que impedía el crecimiento de las células Jurkat tras 15 días en cultivo.

1.2. Obtención y selección de clones control y clones deficientes en PKCβ

Transcurridos los 15 días precisos para la selección, las células resistentes se sometieron al proceso de dilución límite, con el fin de obtener clones: poblaciones homogéneas derivadas de una sola célula. Debido a la dificultad que presentan las células para crecer en condiciones de baja densidad y, especialmente, para proliferar a partir de una sola célula, se hizo necesario enriquecer el medio de cultivo utilizado, por lo que además de un 30% de suero fetal bovino, se añadió al medio RPMI-1640 un 50% de sobrenadante procedente de cultivos de células Jurkat. Se obtuvieron 20 clones de células control, transfectadas con el vector pREP3, y 21 clones de células antisentido, transfectadas con el vector as-PKCβ-pREP3.

Del conjunto de los clones transfectados con el plásmido as-PKCβ-pREP3, se seleccionaron aquellos que en los experimentos de W*estern blot* mostraron menor expresión de PKCβ con respecto a los clones control, cuyos niveles de PKCβ se compararon con los de las células Jurkat sin transfectar, con el objetivo de evitar la selección de controles que sobreexpresasen PKCβ. Los clones control seleccionados se denominaron c1, c2 y c3, y los clones deficientes en la expresión de PKCβ se corresponden con as1, as2 y as3.

La inmunodetección (en la figura V-1.A se muestra el resultado de un experimento representativo de los realizados) permitió demostrar la reducción en la expresión de la PKCβ en los clones antisentido con respecto a los controles. Para demostrar que las diferencias no se deben a una carga proteica desigual en el gel, la membrana se incubó también con el anticuerpo anti-actina (figura V-1.B). El resultado del análisis densitométrico de las bandas (figura V-1.C) muestra una inhibición en la expresión de PKCβ que corresponde aproximadamente al 40% (as1), 50% (as2) y 60% (as3) con respecto al promedio de la expresión en los controles.

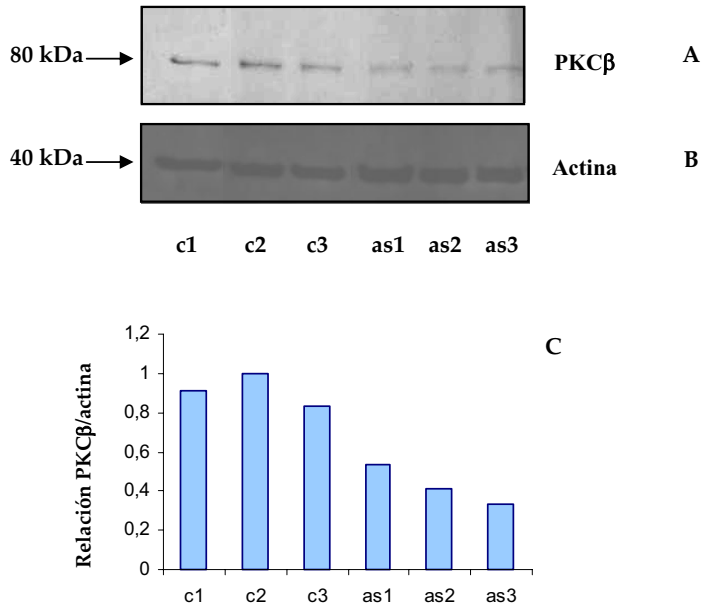


Figura V-1. Análisis mediante *Western blot* de la expresión de PKCβ en las células transfectadas con los vectores pREP3 y as-PKCβ-pREP3. La figura muestra los niveles de expresión de PKCβ (A) y actina (B) en las células control (c1, c2 y c3) y antisentido (as1, as2 y as3). Se cargaron 50 µg de proteína en un gel de acrilamida del 8% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se incubó con un anticuerpo específico anti-PKCβ. En la gráfica C se representan los datos correspondientes al análisis densitométrico de las bandas de PKCβ, mostrados en relación a la intensidad de la banda de actina correspondiente y normalizados con respecto al máximo, al que se asignó el valor 1.

2. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE PKCβ

2.1. Análisis de la selectividad de la inhibición de la expresión de PKCβ

Para demostrar que la reducción en la expresión de PKCβ por los clones transfectados con el vector as-PKCβ-pREP3 era selectiva, se comprobó la expresión de otras isoformas de PKC expresadas en las células Jurkat: α, δ, ε, ι, θ y ζ. En los experimentos de *Western blot* (un resultado representativo se muestra en la figura V-2) no se detectaron variaciones en la expresión de estas isoformas. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas tampoco reveló diferencias significativas entre la expresión de las isoformas de PKC de los clones control y los clones deficientes en PKCβ. Puede concluirse, por tanto, que la inhibición en la expresión de PKCβ inducida en los clones antisentido es específica, ya que no afecta a la expresión de otras isoformas de PKC expresadas en las células Jurkat.

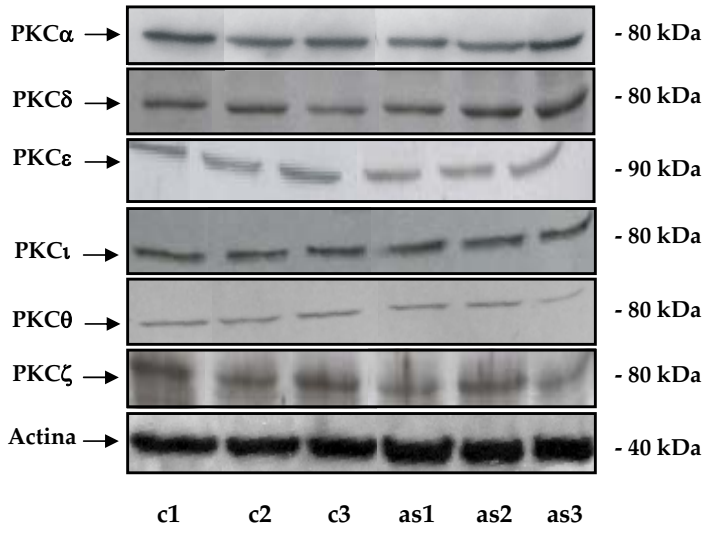


Figura V-2. Análisis mediante *Western blot* de la expresión de las isoformas PKCα, δ, ε, ι, θ y ζ en las células pREP-3 y as-PKCβ-pREP3. Se cargaron 50 μg de proteína por canal en un gel de acrilamida del 8 %, y, tras la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con los anticuerpos correspondientes a cada isoforma. Para comprobar que la cantidad de proteína cargada en los canales era similar, las mismas membranas se incubaron con el anticuerpo anti-actina. Las bandas obtenidas se revelaron utilizando el sistema de detección ECL de Amersham.

2.2. Inmunoprecipitación de PKCβ en las poblaciones clonales

2.2.1. Ensayos de actividad quinasa en los inmunoprecipitados

Una vez demostrada la reducción en la expresión de PKCβ en los clones as1, as2 y as3, nos propusimos analizar si este descenso se acompañaba de una disminución en la actividad enzimática de esta isoforma, mediante inmunoprecipitación y ensayos de actividad quinasa de los inmunoprecipitados, utilizando el protocolo descrito en el apartado "Material y métodos". A pesar de numerosos intentos, utilizando concentraciones crecientes de proteína y diferentes anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales y procedentes de diferentes casas comerciales, no fue posible detectar una actividad significativa PKCβ en nuestras células. Contrariamente, experimentos paralelos en los que se inmunoprecipitó la PKCα, mostraron una elevada actividad quinasa en esas células, demostrando que el método empleado es eficaz en la determinación de la actividad de una isoforma concreta de PKC.

2.2.2. Análisis de los inmunoprecipitados mediante *Western blot*

La incapacidad para detectar actividad enzimática PKCβ mediante los ensayos anteriores nos llevó a plantear la alternativa de analizar la presencia de dicha isoforma en los inmunoprecipitados mediante *western blot*, utilizando para ello extractos proteicos de los clones as2 y c2, representativos de los clones deficientes en PKCβ y los clones control, respectivamente. Los resultados, que se presentan en la figura V-3.A, muestran una fuerte reducción en la PKCβ inmunoprecipitada en el extracto del clon as2, al compararlo con la proteína inmunoprecipitada en la muestra de c2. Experimentos paralelos, en los que se detectó por *Western blot* la PKCα inmunoprecipitada en estos mismos clones (figura V-3.B), no mostraron diferencias significativas en la expresión de esta isoforma por el clon deficiente en PKCβ y el clon control. Estos resultados corroboran la selectividad de la inhibición

por el RNA antisentido, ya que el plásmido as-PKCβ-pREP3, que reduce la expresión de PKCβ, no afecta a los niveles de expresión de la isoforma PKCα.

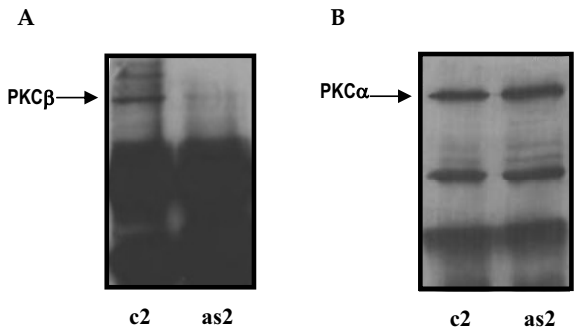


Figura V-3. Detección mediante *Western blot* de las proteínas PKCβ y PKCα inmunoprecipitadas con anti-PKCβ y anti-PKCα.

Los inmunoprecipitados se resuspendieron en tampón de carga 5x y se sometieron a SDS-PAGE. La transferencia a membranas de nitrocelulosa y la inmunodetección se realizaron según lo descrito en el apartado "Material y Métodos" para ambas isoformas. **A.** La inmunoprecipitación se realizó utilizando 2,6 mg de muestra y 5 μg de anticuerpo anti-PKCβ unido a proteína G-agarosa. **B.** La inmunoprecipitación se realizó utilizando 625 mg de muestra y 5 μg de anticuerpo anti-PKCα unido a proteína A-sefarosa.

2.3. Análisis de la presencia del plásmido as-PKCβ-pREP3 en los clones antisentido

Para comprobar que los clones con inhibición específica de PKCβ seleccionados contenían el plásmido as-PKCβ-pREP3, y que la expresión reducida de esta isoforma podía atribuirse a su efecto, se realizaron experimentos de PCR según se describió en "Material y métodos". Los oligonucleótidos utilizados como cebadores, diseñados para hibridar con una región del plásmido pREP3 y una región de la secuencia antisentido, amplifican un fragmento de aproximadamente 700 pb. Como control positivo, se analizó la amplificación del plásmido as-PKCβ-pREP3 purificado por maxiprep a partir de los cultivos bacterianos, utilizando como molde 0,25 ng del mismo.

La figura V-4 muestra la amplificación del plásmido en los clones as1 y as2, en los que se observa una banda de la longitud esperada, coincidente además con el tamaño de la banda amplificada en el control positivo. En el clon as3, a pesar de que presenta una fuerte reducción en la expresión de PKCβ, no fue posible visualizar mediante PCR la presencia del plásmido. La dificultad en la amplificación de as3 (observada también en el análisis del clon as1) podría tener su justificación en varios factores. En primer lugar, es posible que haya muy poca cantidad de plásmido incorporado, dificultando así su extracción; otra posibilidad es que la contaminación con elevadas cantidades de DNA celular inhiba la amplificación del plásmido. A estas dificultades se suma la gran diferencia en la Tm de los dos cebadores (53 °C y 72 °C), que dificulta la optimización de las condiciones de amplificación.

A pesar de este resultado y que no pueda asegurarse de forma clara que en as3 la expresión de PKCβ se deba al efecto del vector antisentido, consideramos interesante seguir trabajando con este clon, ya que en cualquier caso presenta menos expresión de esta isoforma con respecto a los controles y podría reforzar los resultados obtenidos en los clones as1 y as2.

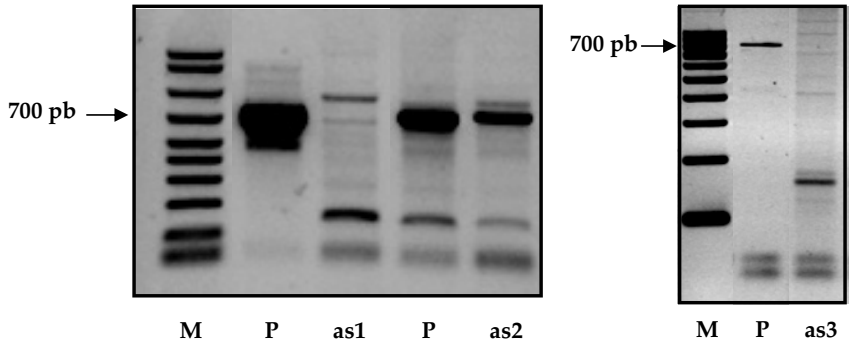


Figura V-4. Detección de la presencia del plásmido as-β-pREP3 mediante PCR.

La extracción de los plásmidos presentes en los clones as1, as2 y as3 se realizó utilizando el *QIAprep Spin Miniprep Kit*, de Qiagen. Para la amplificación se utilizaron diferentes cantidades del plásmido y los cebadores específicos indicados en el apartado "Material y métodos".

***M:** Marcadores de peso molecular, **P:** plásmido as-PKCβ-pREP3 purificado*

2.4. Estudio del efecto del RNA antisentido sobre los niveles de mRNA de PKCβ

Para obtener información acerca del mecanismo molecular responsable de la inhibición de la expresión de PKCβ mediada por el RNA antisentido y determinar si la disminución en la expresión de PKCβ es precedida de un descenso en los niveles del mRNA que la codifica, se analizó mediante RT-PCR la expresión del mRNA de PKCβ en los diferentes clones. Los resultados, presentados en la figura V.5.A, muestran una fuerte disminución en la expresión del mRNA de PKCβ en las células as-PKCβ-pREP3. Esta reducción no se debe a una variación en la cantidad de DNA molde amplificado, ya que la amplificación de un fragmento del cDNA de actina, mostrada en la figura V.5.B, es similar en todos los clones.

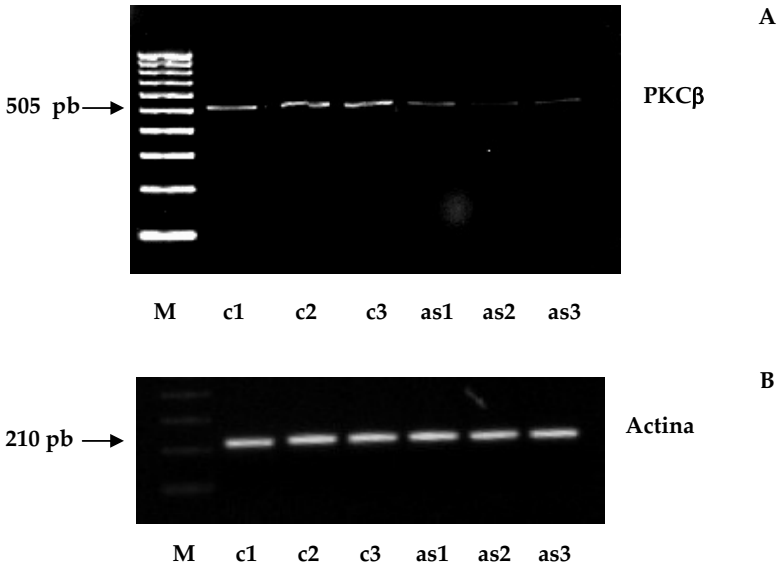


Figura V-5. Análisis mediante RT-PCR de la expresión de mRNA de PKCβ (A) y actina (B) en las diferentes poblaciones de células. El cDNA de cada clon se obtuvo por retrotranscripción de 1 μg de RNA total; los cebadores utilizados, indicados en el apartado "Material y Métodos", amplifican una región de 505 pb en el caso de la PKCβ y 210 pb en el caso de la actina, empleada como control.
M: *marcadores de peso molecular*

3. ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA Y ESTADO DE AGREGACIÓN, VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON INHIBICIÓN SELECTIVA DE PKCβ

3.1. Morfología y estado de agregación de las células

Una característica relevante del crecimiento de las células Jurkat en cultivo es la formación de agregados celulares. Esta propiedad, que se evidenció al observar al microscopio nuestros cultivos, se manifestó especialmente en los clones as2 y as3, en los que los agregados se apreciaban en los cultivos a simple vista.

Para registrar esta apreciación, los clones se cultivaron a una densidad inicial de 5×10^5 células/ml y, durante la fase de crecimiento exponencial, se observaron con un microscopio invertido y se fotografiaron. Las imágenes, que se muestran en las figuras V-6.A y V-6.B, muestran que los clones antisentido (as1, as2 y as3) presentan una tendencia a formar más agregados celulares que, además, contienen un mayor número de células que los formados por los clones control (c1, c2 y c3), que crecen más aislados. Con respecto a la morfología, no se apreciaron diferencias entre las células de los diferentes clones (morfología irregular o existencia de un mayor número de prolongaciones).

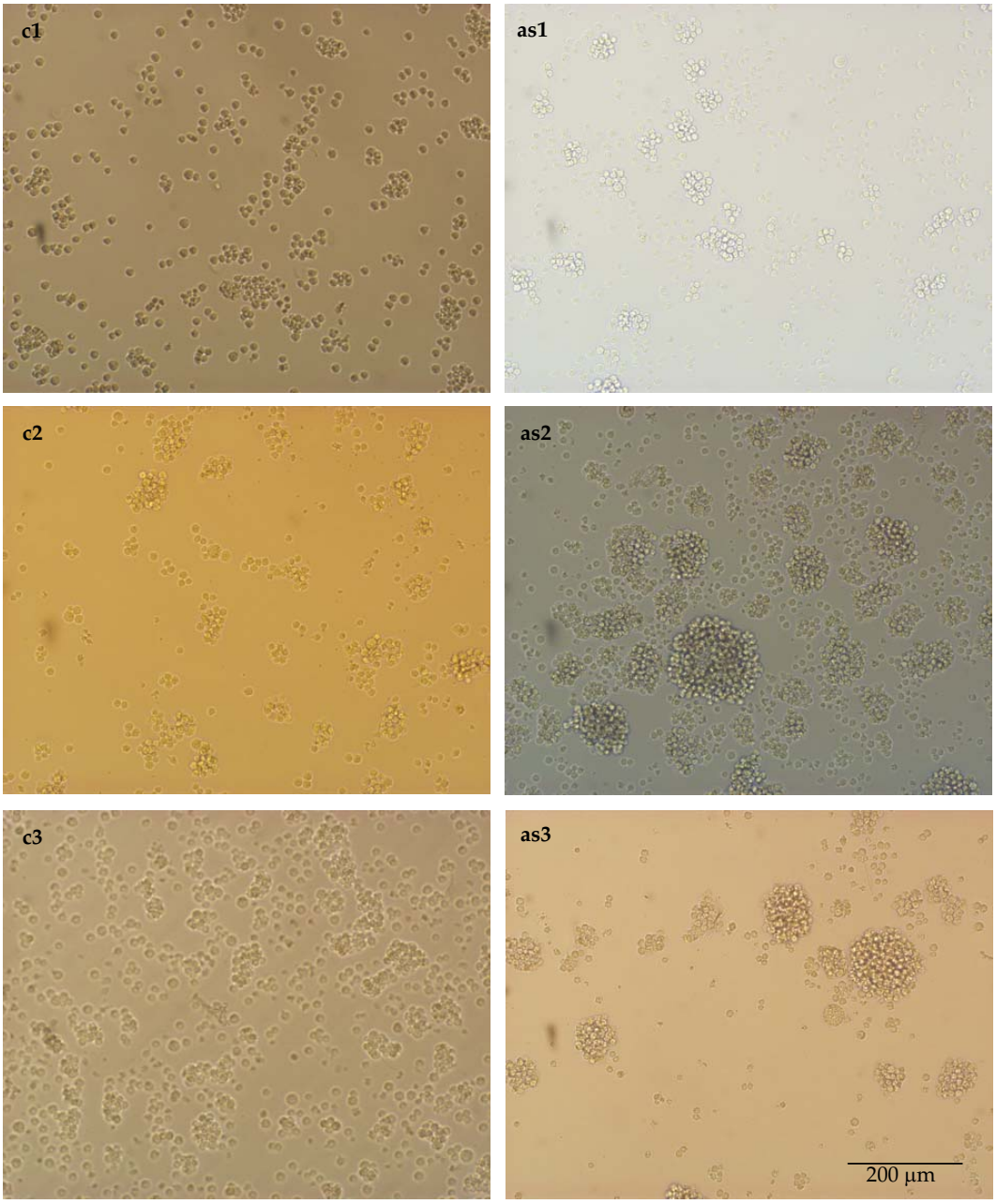


Figura V-6.A. Fotografías de cultivos de los clones pREP-3 y as-PKCβ-pREP3

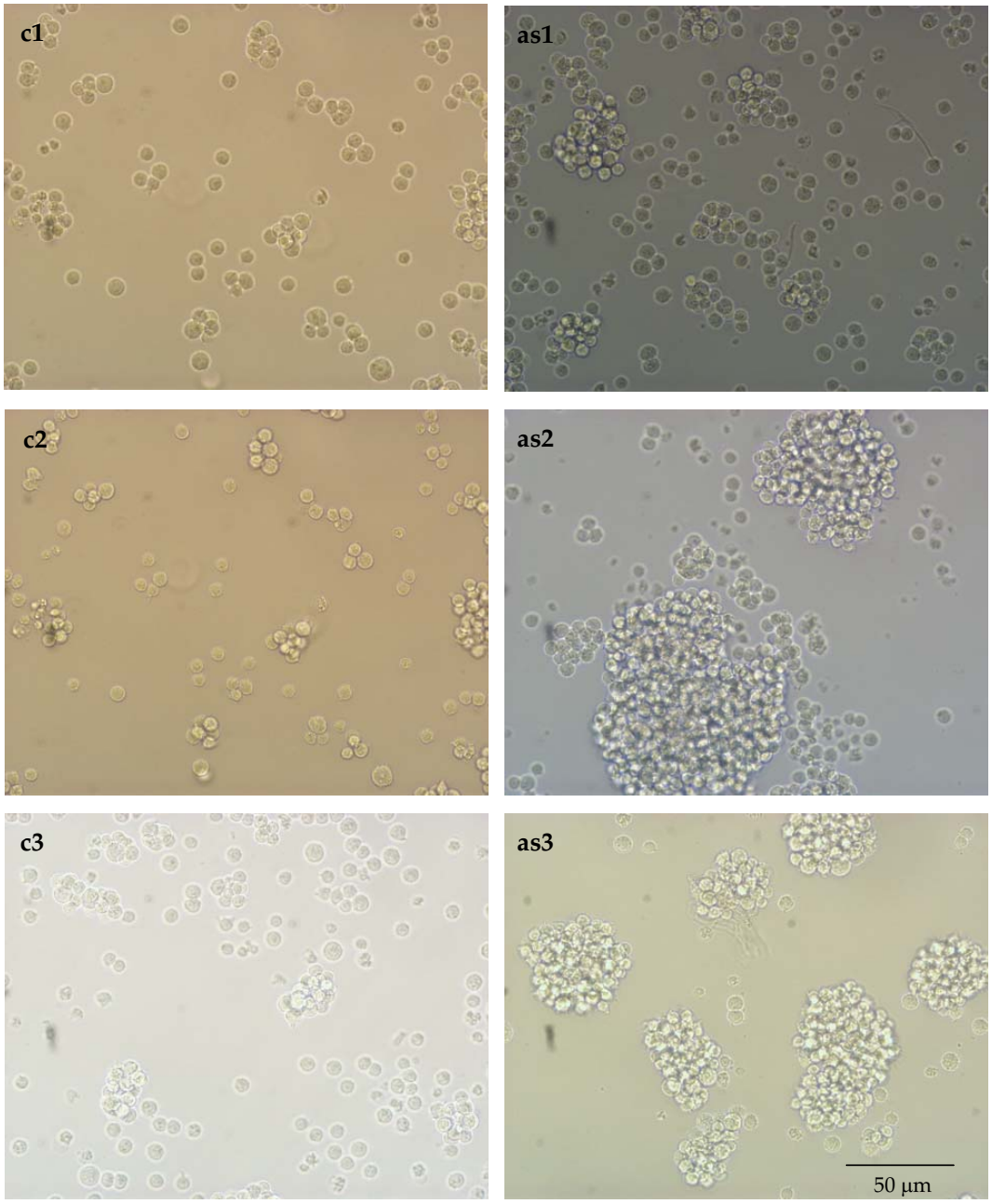


Figura V-6.B. Fotografías de cultivos de los clones pREP-3 y as-PKCβ-pREP3

3.2. Análisis de la viabilidad celular

Para determinar si la inhibición selectiva de la expresión de PKCβ en los clones que contienen el plásmido as-PKCβ-pREP3 afectaba a la viabilidad de las células, se cuantificó ésta mediante la tinción con azul tripán de las células obtenidas a partir de los cultivos correspondientes y el recuento en una cámara de Neubauer. Los resultados, que se muestran en la tabla V-1, no indican un efecto significativo de la reducción en la expresión de PKCβ sobre la viabilidad de las células transfectadas.

CLON CELULAR	VIABILIDAD (%)
c1	94,43 ± 4,09
c2	91,2 ± 3,52
c3	86,33 ± 4,17
as1	94,26 ± 3,9
as2	91,78 ± 1,49
as3	90,17 ± 3,46

Tabla V-1. Viabilidad celular. En la tabla se muestra la viabilidad media de los diferentes clones en cultivo, acompañada de la desviación típica correspondiente. Los resultados corresponden a la media de cinco recuentos independientes.

3.3. Ensayos de actividad proliferativa

Con el fin de comprobar si la reducción específica en los niveles de PKCβ afectaba a la actividad proliferativa basal (es decir, en ausencia de estímulo) de los clones, se cuantificó la proliferación de las células mediante un ensayo colorimétrico. Partiendo de la misma densidad celular, los diferentes clones se incubaron con una sal de tetrazolio, que se reduce debido a la actividad metabólica celular, dando lugar a un compuesto coloreado, cuya producción es directamente proporcional a la cantidad de células viables. Los resultados obtenidos tras 1, 2 y 3 horas en cultivo, mostrados en la figura V-7, no muestran diferencias significativas en la actividad celular atribuibles a la reducción de la expresión de PKCβ.

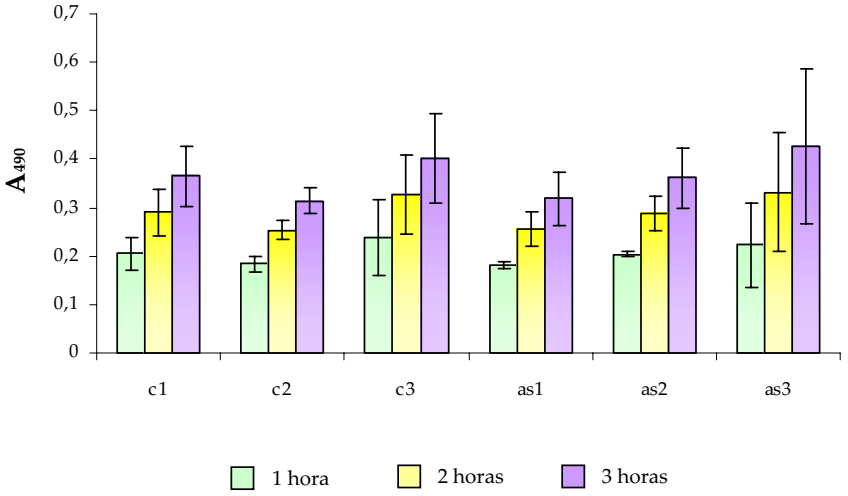


Figura V-7. Análisis de la proliferación celular. En la gráfica se muestran los resultados de los ensayos de actividad metabólica en los diferentes clones, a partir de una concentración inicial de 5 x 10^4 células. Los resultados corresponden a las medias y desviaciones típicas de las absorbancias (leídas a 490 nm) medidas en tres experimentos independientes.

4. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN EN LAS LÍNEAS CELULARES RECOMBINANTES

La activación de los linfocitos T se produce en respuesta a la unión del TCR/CD3 al antígeno y a las señales desencadenadas por las moléculas coestimuladoras, principalmente CD28. En el laboratorio, es posible simular este estímulo mediante la adición al medio de cultivo de ésteres de forbol en combinación con ionóforos de Ca^{2+}, o anticuerpos anti-CD3 y lectinas (Hughes-Fulford *et al.*, 2005). A pesar de que la estimulación mediante anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 se considera más similar al estímulo fisiológico, en nuestro caso se realizó la activación con PMA (solo o en combinación con ionomicina), teniendo en cuenta que en experimentos preliminares de nuestro grupo no se obtuvo una respuesta significativa al estímulo con el anticuerpo anti-CD3.

Uno de los primeros pasos conocidos en la cascada de señalización de las células T tras su activación es la inducción de la actividad tirosina quinasa, seguida por otros acontecimientos, entre los que se encuentran la activación de las familias de MAP quinasas y el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Borovsky *et al.*, 2002). Entre las moléculas cuya expresión se induce tras la activación de las células T se encuentran la IL-2 y la cadena α de su receptor de alta afinidad (el CD25), el CD69, el TNF-α y -β, la IL-8 y el IFN-γ. En la mayor parte de estos procesos se ha descrito la participación de PKC, aunque no está claro o no se conoce cuáles son las isoformas responsables de cada uno de esos acontecimientos.

A continuación se describen los análisis realizados sobre la implicación de la PKCβ en estos acontecimientos de la activación en las células Jurkat.

4.1. Expresión de marcadores de activación

El CD25 y el CD69 son dos moléculas presentes en la superficie linfocitaria que se utilizan como marcadores de activación, ya que su expresión aumenta muy rápidamente tras el estímulo de las células. Para estudiar posibles diferencias en la activación de las células control y las células deficientes en PKCβ, se analizó mediante citometría de flujo la expresión de estas dos moléculas en su superficie.

4.1.1. CD25

El CD25 es la cadena α del receptor de IL-2 (IL-2Rα), una de las moléculas expresadas en células T activadas. La IL-2Rα humana, también denominada antígeno Tac, es una glucoproteína de 55 kDa (p55) con capacidad de unirse a la IL-2.

La participación de la PKC en la inducción de la expresión del CD25 se ha descrito en numerosos trabajos, aunque existe controversia con respecto a las isoformas que participan en este proceso. Para determinar la posible implicación de PKCβ en la expresión de este marcador, analizamos su presencia en la superficie de las células pREP3 y as-PKCβ-pREP3 tras estimularlas con PMA e ionomicina, ya que la adición de ionóforo de Ca^{2+} aumenta la expresión del receptor con respecto al estímulo con ésteres de forbol solamente (Altman *et al.*, 1992).

Para cuantificar la expresión del IL-2Rα se utilizó un anticuerpo acoplado a ficoeritrina que lo reconoce específicamente y permite analizar su presencia en las células mediante citometría de flujo. Los resultados de un experimento representativo se presentan en la figura V-8, y el análisis cuantitativo de los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos en tres experimentos independientes se muestra en la tabla V-2. Estos datos sugieren que la PKCβ desempeña un papel negativo en la regulación de la expresión del CD25, ya que la reducción en su expresión provoca un aumento significativo en la expresión del receptor de alta afinidad de la IL-2 en la superficie celular.

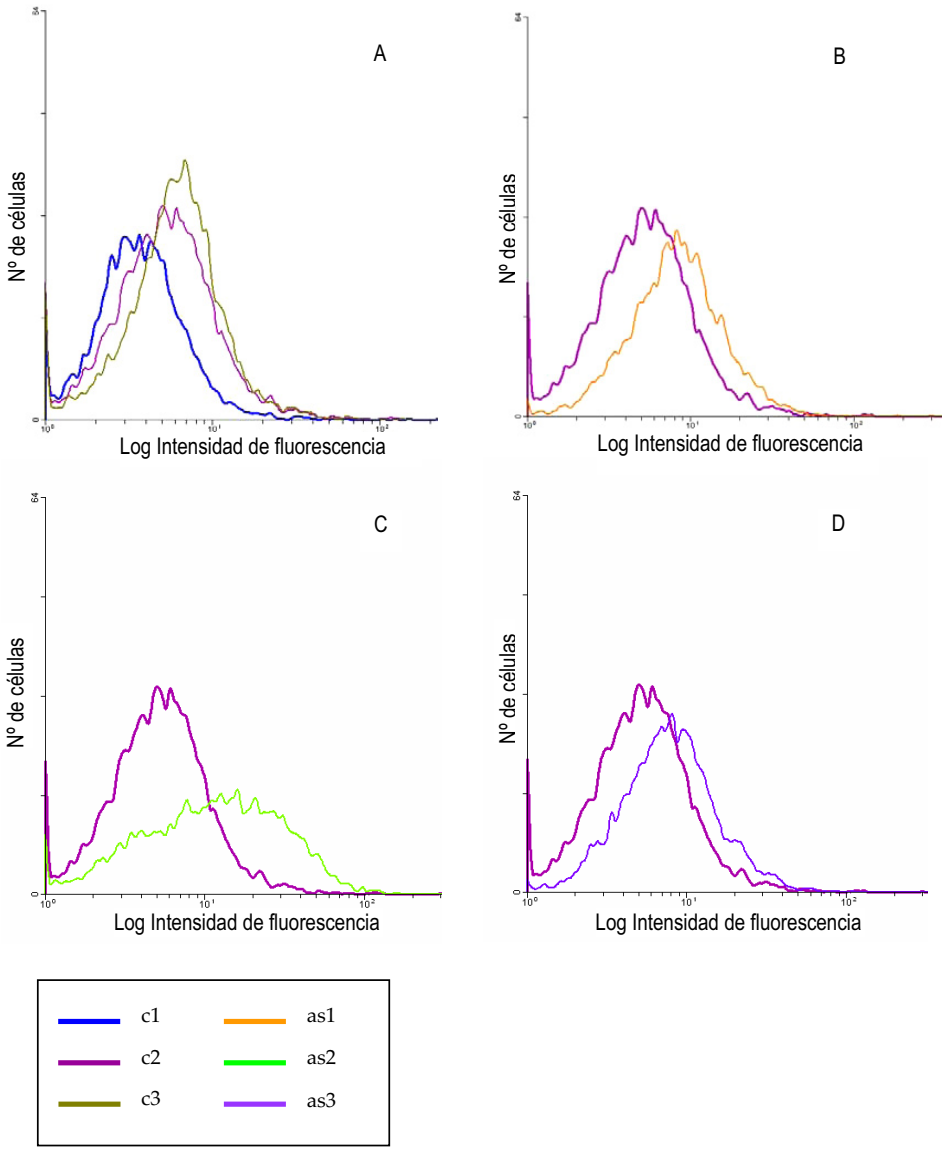


Figura V-8. Expresión de CD25 en las células transfectadas con los vectores pREP3 y as-PKCβ-pREP3. Las células, a una concentración de 10^6 células/ml se estimularon con PMA a 10 ng/ml e ionomicina a 0,5 µg/ml durante 16 horas. Las células se marcaron con un anticuerpo anti-CD25 conjugado con ficoeritrina, y la expresión de esta molécula se analizó mediante citometría de flujo. En la imagen A se muestran las gráficas correspondientes a la expresión de CD25 en los clones control. Entre ellos, se seleccionó el que mostraba una intensidad media más próxima a la media de los tres controles (c2) y se comparó con los clones as-PKCβ-pREP3 as1 (B), as2 (C) y as3 (D).

Las gráficas representan los resultados de un experimento representativo de un total de tres realizados, en los que se analizó una media de 5000 células.

CD25	
Incremento de la intensidad media de fluorescencia de los clones antisentido con respecto a la media de los clones control (%)	
As1	70,12 ± 29,44
As2	130,87 ± 16,8
As3	51,1 ± 9,78

Tabla V-2. Análisis cuantitativo de la expresión del marcador CD25.

En la tabla se expresa el porcentaje de incremento de la expresión de CD25 (cuantificada como intensidad media de fluorescencia) en los clones as-PKCβ-pREP-3 con respecto a la media de los clones pREP-3. Los datos corresponden a la media y desviación estándar de tres experimentos realizados.

4.1.2. CD69

El CD69 es una glucoproteína de membrana cuya expresión es rápidamente inducida tras la unión de las células T al antígeno, considerándose el marcador más temprano de su activación. Puesto que se ha descrito que la expresión y la función de CD69 en linfocitos depende de la activación de la proteína quinasa C (Cebrián et al., 1989), y para tratar de determinar si la isoforma PKCβ está implicada en ese proceso, examinamos la expresión de CD69 en la superficie de los clones control y los clones deficientes en PKCβ mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo anti-CD69 acoplado al fluorocromo aloficocianina. Las células utilizadas para el análisis de expresión del CD69 se trataron con PMA como único estímulo, ya que la activación de la ruta del Ca^{2+} no parece afectar a la expresión de este marcador de activación.

Los resultados (figura V-9 y tabla V-3) muestran un descenso significativo de la expresión de CD69 en la membrana celular de los clones as-PKCβ-pREP3 con respecto a los clones control, por lo que esta enzima parece desempeñar un papel positivo en la expresión de este marcador de activación en la superficie de las células Jurkat.

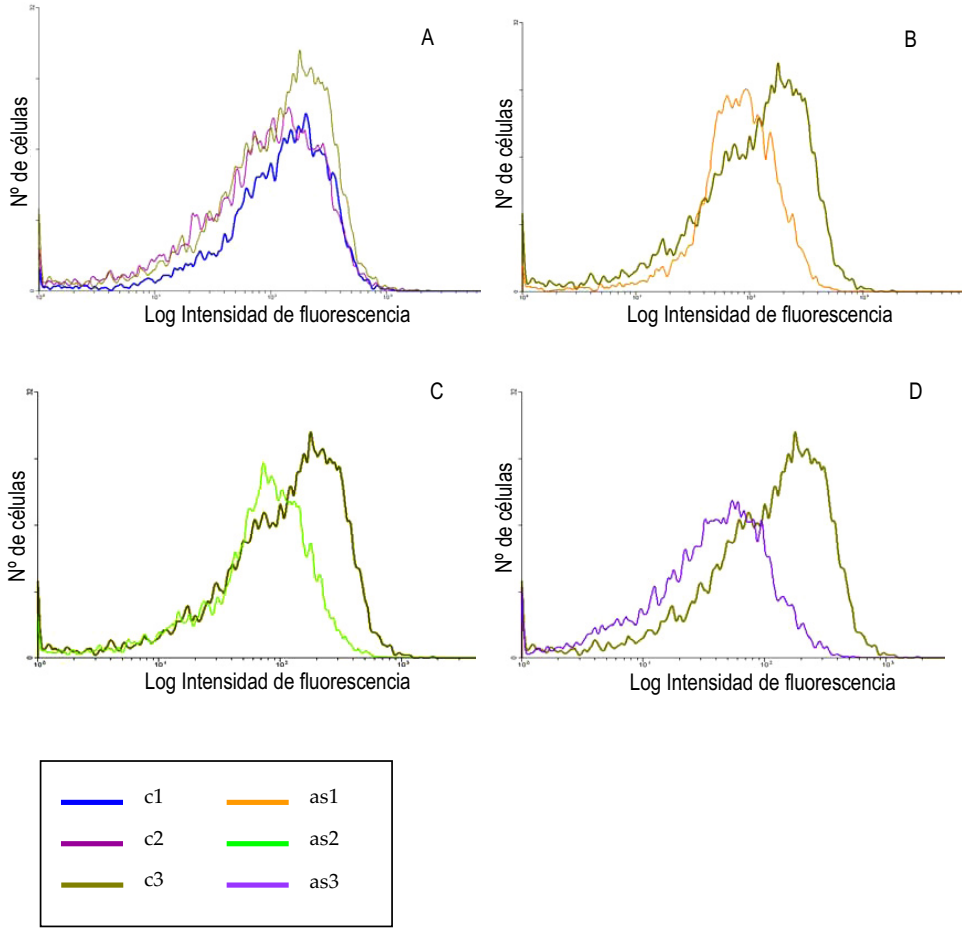


Figura V-9. Expresión de CD69 en las células pREP3 y as-β-pREP3. Las células (10^6 células/ml) se estimularon con PMA a 50 ng/ml durante 16 horas, se marcaron con un anticuerpo anti-CD69 conjugado con aloficocianina y la expresión de esta molécula se analizó mediante citometría de flujo. En A se muestran las gráficas correspondientes a la expresión de CD69 en los clones pREP3. Entre ellos, se seleccionó el que mostraba una intensidad media más próxima a la media de los tres controles (c3) y se comparó con los clones as1 (B), as2 (C) y as3 (D). Las gráficas representan los resultados de un experimento representativo de un total de tres realizados, en los que se analizó una media de 5000 células.

CD69	
Reducción de la intensidad media de fluorescencia de los clones antisentido con respecto a la media de los clones control (%)	
as1	28,12 ± 10,21
as2	35,16 ± 1,19
as3	62,32 ± 2,44

Tabla V-3. Análisis cuantitativo de la expresión del marcador CD69.

En la tabla se expresa el porcentaje de disminución de la expresión de CD69 (cuantificada como intensidad media de fluorescencia) en los clones as-PKCβ-pREP-3 con respecto a la media de los clones pREP-3. Los datos corresponden a la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

4.2. Producción de citoquinas

4.2.1. IL-2

La IL-2 es una citoquina producida por los linfocitos T que induce la proliferación linfocitaria, permite la proliferación prolongada de los clones de células T específicos para un antígeno y potencia la actividad de las células Tc y algunas células NK.

La secreción de IL-2 por las células deficientes en PKCβ se comparó con la de los clones control mediante ELISA, valorando la concentración de esta citoquina en los sobrenadantes de los cultivos, tras estimular las células con PMA e ionomicina durante 16 horas.

En la figura IV-10 se muestran los resultados de un experimento representativo del total de los realizados, en el que se aprecia un descenso significativo en la cantidad de IL-2 secretada por los clones as2 y as3. La secreción de IL-2 por as1, a pesar de ser muy inferior a la de c1 y c3, no puede considerarse significativamente reducida, al aplicar el método de Dunn de comparación múltiple frente al grupo control.

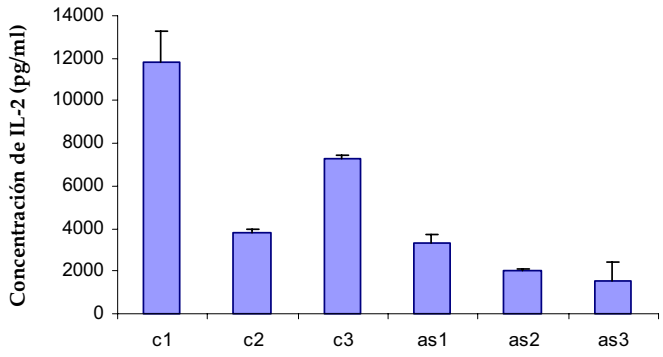


Figura V-10. Expresión de IL-2 por las células pREP-3 y as-PKCβ-pREP3. Se estimularon 10^6 células/ml con PMA a 1 ng/ml e ionomicina 1 μM durante 16 horas, y la concentración de IL-2 en el sobrenadante se determinó mediante ELISA. El experimento mostrado, en el que se utilizaron muestras por triplicado, es representativo de un total de cuatro realizados.

Algunos estudios sugieren que la disminución en la producción de IL-2 en células que expresan niveles más bajos de PKCβ se debe a su participación en la regulación de la secreción de esta citoquina por la célula, no en la regulación de su síntesis (Long *et al.*, 2001). Para tratar de comprobarlo, se examinó mediante RT-PCR la presencia del mRNA que codifica a la IL-2 en las células estimuladas. La intensidad de las bandas amplificadas, presentadas en la figura IV-11.A, muestra que, en general, la expresión del producto amplificado es mayor en los clones control que en los clones con expresión reducida de PKCβ. Estos resultados presentan una gran correlación con los obtenidos en los experimentos de ELISA, ya que el clon c2, que mostraba menor liberación de IL-2 al medio de cultivo que los controles c1 y c3, también expresa niveles más bajos del mRNA de la IL-2; del mismo modo, el clon as1, que secretaba mayor cantidad de IL-2 en comparación con los otros clones deficientes en PKCβ, presenta también mayor expresión de su mRNA. Por tanto, los resultados obtenidos en estos dos experimentos sugieren que la reducción de los niveles de PKCβ no afecta, al menos exclusivamente, al control de la secreción de IL-2, sino que influye sobre el control de su síntesis.

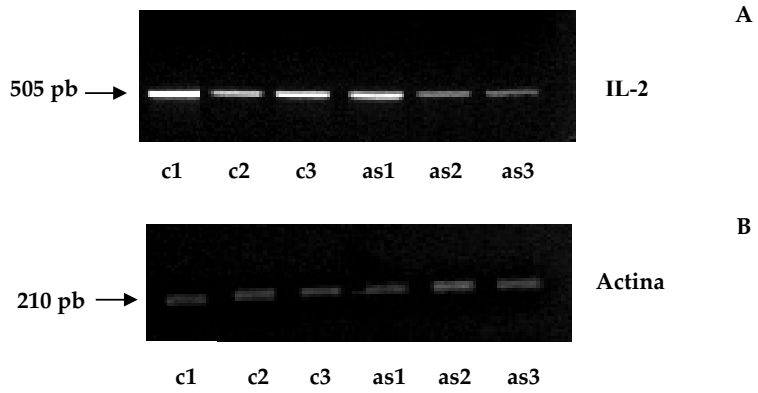


Figura V-11. Detección mediante RT-PCR del mRNA de IL-2 en las células pREP-3 y as-PKCβ-pREP3. Las células utilizadas en los experimentos de cuantificación de la secreción de IL-2 por ELISA se emplearon en la determinación de la expresión de IL-2 mediante RT-PCR. En la figura A se muestran las bandas correspondientes a la amplificación de un fragmento del cDNA de la IL-2. En la figura B se muestran las bandas correspondientes a la amplificación de un fragmento del cDNA de la actina, utilizada como control de cuantificación.

4.2.2. IFN-γ

Los experimentos de expresión de IFN-γ mediante ELISA no permitieron detectar esta citoquina en los clones c2 y c3. Entre los clones transfectados con el vector as-PKCβ-pREP3, sólo los clones as2 y as3 expresaban IFN-γ, en una concentración inferior a la de c1 (aproximadamente la mitad). Por lo tanto, a partir de estos resultados no puede atribuirse a PKCβ ningún efecto sobre la expresión de IFN-γ en estas células, y las variaciones observadas parecen deberse a diferencias entre los clones independientes del grado de expresión de PKCβ.

4.2.3. IL-8

Durante la activación, las células T no sólo adquieren la capacidad de desempeñar la respuesta inmune, sino que además pueden dirigirse a lugares concretos y migrar en respuesta a la presencia de determinadas moléculas, como la IL-8 (Crabtree *et al.*, 1994). Puesto que esta molécula se produce en respuesta a la activación de las células T, y se ha descrito la participación de PKC (y en concreto

la isoforma β) en la regulación de su síntesis, nos propusimos analizar si la reducción en la expresión de PKCβ en las células Jurkat afectaba a la producción de esta citoquina.

Los resultados obtenidos en los experimentos de cuantificación de IL-8 mostraron una gran variabilidad con respecto a la producción de esta citoquina por los clones control, aunque en todos ellos se observó una mayor secreción de IL-8 por los clones pREP-3 que por los as-PKCβ-pREP3. Debido a esta variabilidad, en la figura V-12 se muestra un experimento representativo de un total de tres realizados.

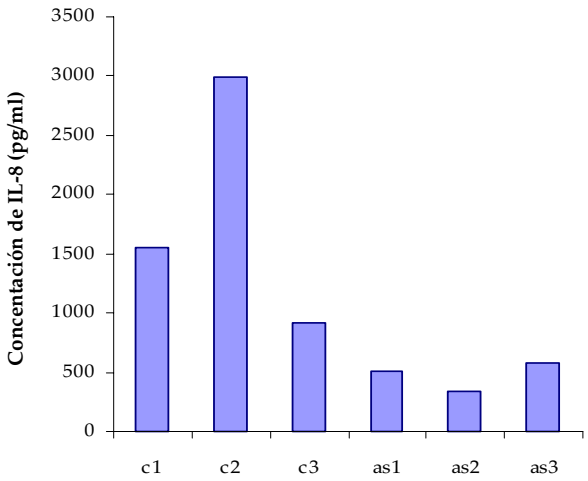


Figura V-12. Expresión de IL-8 por las células pREP-3 y as-PKCβ-pREP3. Se estimularon 10^6 células/ml con PMA a 10 ng/ml e ionomicina a 0,5 μg/ml durante 16 horas, y la concentración de IL-8 en el sobrenadante se determinó utilizando el sistema IMMULITE. El experimento mostrado es representativo de un total de tres realizados.
La concentración de IL-8 en el medio de cultivo es indetectable, por lo que no se muestra en la gráfica.

4.2.4. TNF-α

El gen del factor de necrosis tumoral α (TNF-α) se transcribe rápidamente tras la activación en linfocitos B y T, produciendo una citoquina con efecto citotóxico.

La participación de PKC en la expresión de TNF-α se ha descrito en varios trabajos. Con el objetivo de determinar si PKCβ interviene en la expresión de esta citoquina, se estudió la producción de TNF-α en las células pREP3 y as-PKCβ-pREP3, estimuladas de igual manera que en la determinación de la producción de las citoquinas anteriores

Los resultados de los análisis de la secreción de TNF-α (figura V-13), no permiten deducir ningún efecto de la reducción en la expresión de PKCβ sobre la producción de TNF-α, ya que su concentración en el medio de cultivo es muy elevada con respecto a la observada en los sobrenadantes analizados. Por otra parte, el clon c1 muestra unos niveles inusualmente altos de concentración de TNF-α, que no se corresponden con los de los otros clones utilizados como control.

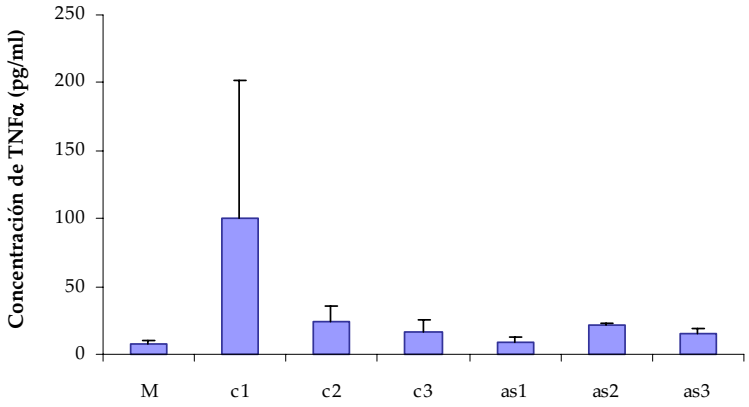


Figura V-13. Expresión de TNF-α por las células pREP-3 y as-β-pREP3. Se estimularon 10^6 células/ml con PMA a 10 ng/ml e ionomicina a 0,5 μg/ml durante 16 horas, y la concentración de esta citoquina en el sobrenadante se determinó utilizando el equipo IMMULITE. En la gráfica se presentan la media y la desviación típica correspondiente a tres experimentos independientes. M representa la concentración de esta citoquina en el medio de cultivo.

4.2.5. TNF-β

El TNF-β es una proteína secretada que puede ser producida, entre otros, por linfocitos T activados, y la PKC parece desempeñar un papel en el control de su expresión (Freire-Moar *et al.*, 1992; Barja *et al.*, 1994). Para investigar la posible participación de la PKCβ en la síntesis de esta citoquina, la presencia del mRNA de TNF-β en las células se estudió mediante RT-PCR, a partir del RNA extraído de los clones control y los clones con inhibición en la expresión de PKCβ, utilizando cebadores específicos que amplifican una región del cDNA del TNF-β de 610 pb. Los resultados (figura V-14) muestran un patrón inverso al obtenido en el caso de la IL-2: los clones antisentido presentan mayor expresión de TNF-β que los clones control, con las excepciones de los clones c2 (que muestra una producción mucho más elevada que los otros controles) y el as1, que produce niveles significativamente inferiores a los de los otros clones as.

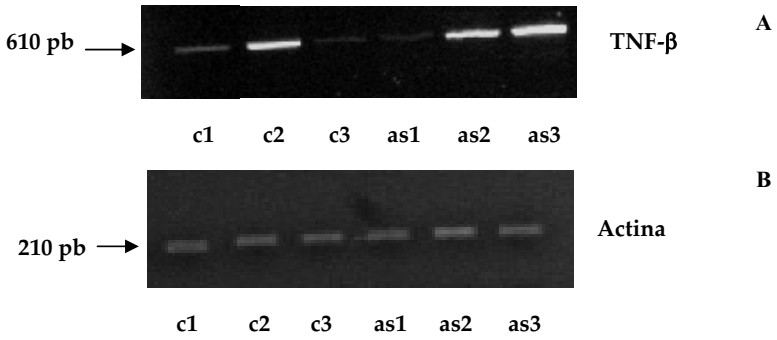


Figura V-14. Detección mediante RT-PCR del mRNA de TNF-β en las células pREP-3 y as-PKCβ-pREP3. Las células utilizadas en los experimentos de expresión de IL-2 por ELISA se emplearon para determinar la expresión de TNF-β mediante RT-PCR. En la figura A se muestran las bandas correspondientes a la amplificación del fragmento de TNF-β y en la figura B se muestran las obtenidas en la amplificación de un fragmento de actina, utilizada como control de cuantificación.

4.3. Efecto de la inhibición de PKCβ sobre el patrón de fosforilación en tirosina de las proteínas celulares durante la activación

Puesto que diferentes acontecimientos en la transducción de señales de activación en los linfocitos T se caracterizan por la activación de proteínas tirosina quinasas, examinamos la presencia de proteínas fosforiladas en tirosina en extractos proteicos de los clones transfectados con los plásmidos pREP-3 y as-PKCβ-pREP3, mediante *Western blot* y utilizando un anticuerpo específico que reconoce a la tirosina fosforilada. En estos experimentos (figura V-15) no detectamos ninguna variación en el patrón de fosforilación de tirosinas en las células deficientes en PKCβ con respecto a los controles.

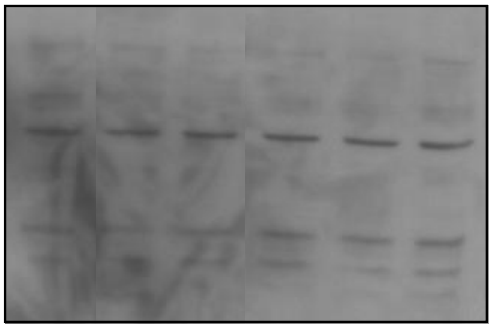


Figura V-15. Expresión de proteínas con tirosinas fosforiladas. Las células, cultivadas a una densidad de 10^6 células/ml, se estimularon con PMA a 50 ng/ml e ionomicina a 0,5 µg/ml durante 15 minutos. Se cargaron 20 µg de proteína por canal en un gel de acrilamida del 10%. La detección de las formas fosforiladas de las proteínas se realizó mediante *Westen blot*, utilizando un anticuerpo fosfoespecífico. La comprobación de que la carga proteica en cada canal era similar se realizó mediante la tinción de la membrana con Ponceau S (no mostrado).

4.4. Efecto de la reducción en la expresión de PKCβ sobre la activación de MAP quinasas de los grupos ERK, p38 y JNK

Las MAP quinasas son proteínas que participan en la señalización celular, desempeñando papeles esenciales en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Puesto que se ha descrito su participación en la producción de diferentes citoquinas, analizamos su activación para comprobar si las variaciones observadas en la producción de IL-2, TNF-α y TNF-β podrían deberse a efectos de la inhibición de la PKCβ sobre la activación de estas proteínas. Las células control y antisentido se estimularon (ver "Material y métodos") y se sometieron a experimentos de *Western blot*, utilizando anticuerpos que detectan la forma fosforilada de proteínas representantes de las tres rutas principales de MAP quinasas: ERK, p38 y JNK.

Los resultados del estudio de la activación de las ERK, representados en la figura V-16.A, no muestran diferencias claras entre los clones con expresión reducida de PKCβ y los clones control, lo que se corrobora con los valores densitométricos de las bandas obtenidas, representados en la gráfica V-16.B.

Los experimentos realizados para analizar la activación de la p38 (figura V-17) tampoco muestran diferencias significativas entre los clones control y clones as-PKCβ-pREP3.

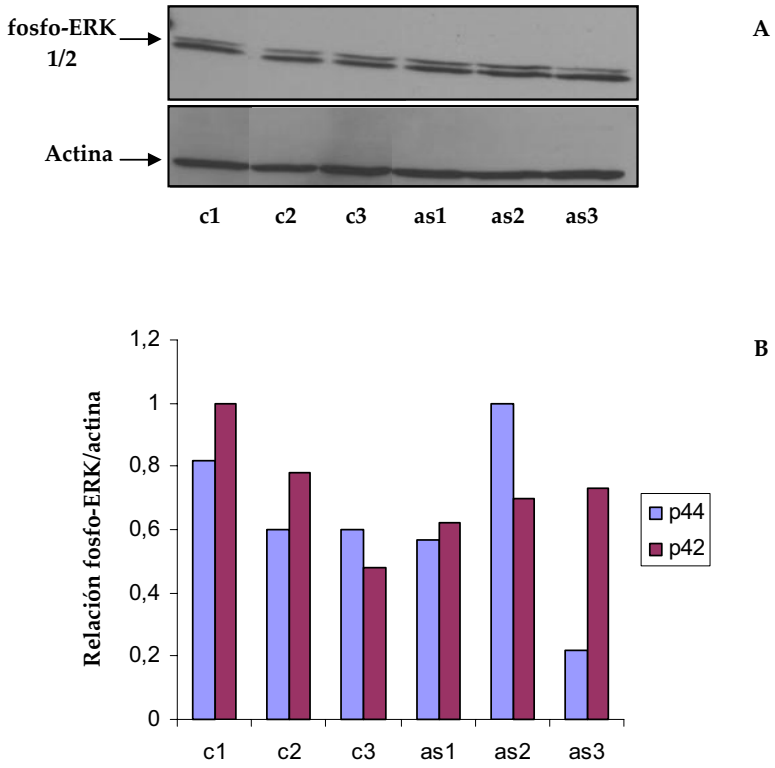


Figura V-16. Expresión de la forma activa de las ERK1 (p44) y ERK2 (p42). Las células, cultivadas a una densidad de 10^6 células/ml, se estimularon con PMA 100 nM durante 10 minutos. Se cargaron 20 µg de proteína por canal en un gel de acrilamida del 10%. La detección mediante *Western blot* de la forma activa de las ERK (presentada en la figura A) se realizó incubando la membrana con un anticuerpo fosfoespecífico. Para comprobar que la carga proteica en los canales era similar, las membranas se trataron e incubaron con un anticuerpo anti-actina. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas se presenta en la figura B. La intensidad de las bandas de las ERK se muestra en relación a la banda de actina correspondiente, asignando el valor uno al máximo y expresando los demás con respecto a éste.

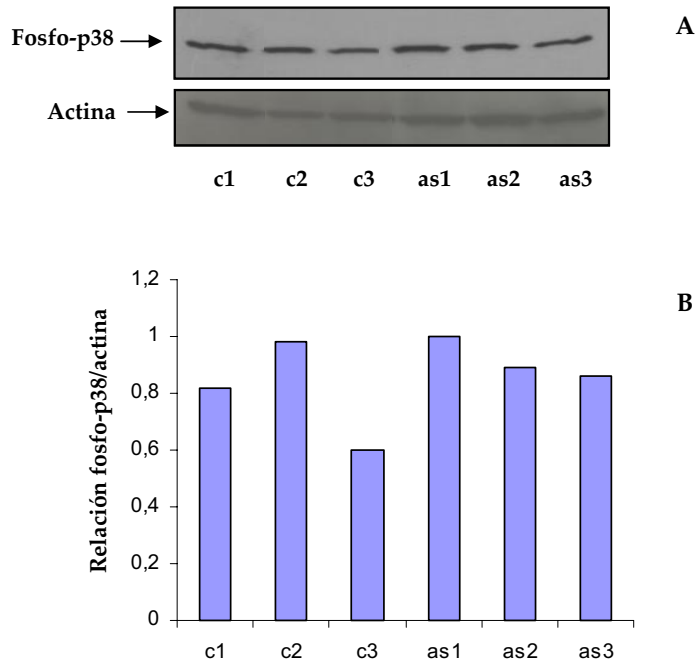


Figura V-17. Expresión de la forma activa de la proteína p38. Las células, a una concentración de 10^6 células/ml, se estimularon con PMA a 50 ng/ml e ionomicina a 0,5 µg/ml durante 15 minutos. Se cargaron 30 µg de proteína por canal en un gel de acrilamida del 10%, y la detección mediante *Western blot* de la forma fosforilada de p38 se realizó incubando la membrana con un anticuerpo fosfoespecífico, utilizando la inmunodetección de actina en la misma membrana como control de carga en el gel (A). En la figura B se representa el resultado de los análisis densitométricos correspondientes, expresados como relación entre la intensidad de la banda de fosfo-p38 y la banda correspondiente de actina, y mostrados en relación al máximo, al que se asignó el valor uno.

El análisis de la activación de las JNK, que se presenta a continuación (figura V-18.A), muestra que la JNK1 experimenta un incremento en su estado de activación en las células deficientes en PKCβ, como corrobora el análisis densitométrico de las bandas correspondientes (figura V-18.B).

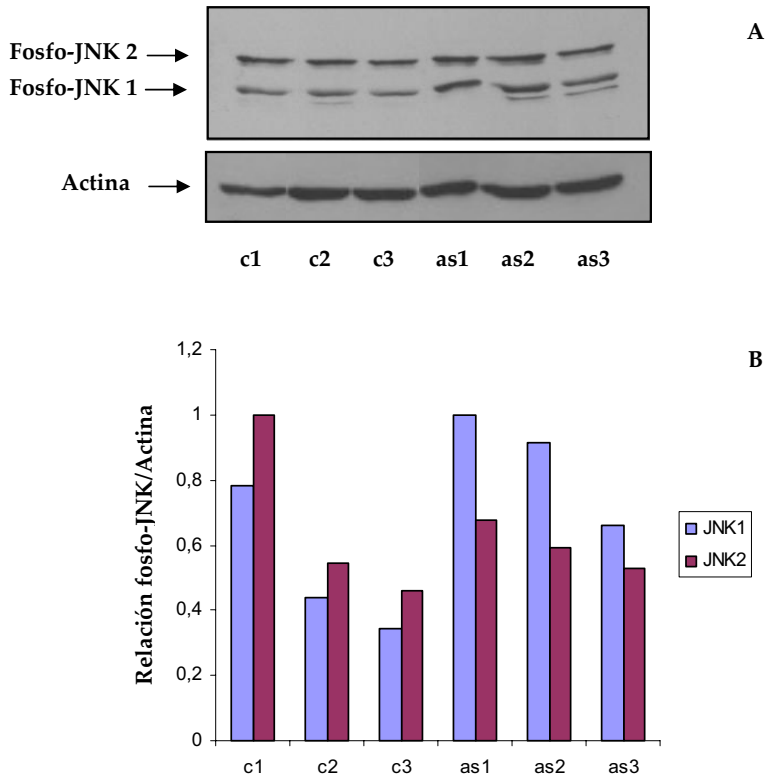


Figura V-18. Expresión de las formas activas de las proteínas JNK1 (p46) y JNK2 (p54) Las células se estimularon con PMA e ionomicina, según lo descrito en el apartado "Material y métodos". La figura A muestra las bandas de fosfo-JNK obtenidas en un experimento representativo de tres realizados, sobre las bandas correspondientes a la detección de actina en la misma membrana, presentadas como control de carga. En la figura B se muestra la relación entre el valor obtenido en la densitometría de la banda fosfo-JNK y la banda correspondiente de actina. El resultado se normalizó asignando al máximo el valor uno.

Teniendo en cuenta que, de las tres MAP quinasas analizadas, sólo la JNK (concretamente la JNK1) experimentaba alteraciones en su estado de activación en las células deficientes en PKCβ, examinamos el estado de activación de uno de sus sustratos: el factor de transcripción ATF-2 (figura V-19).

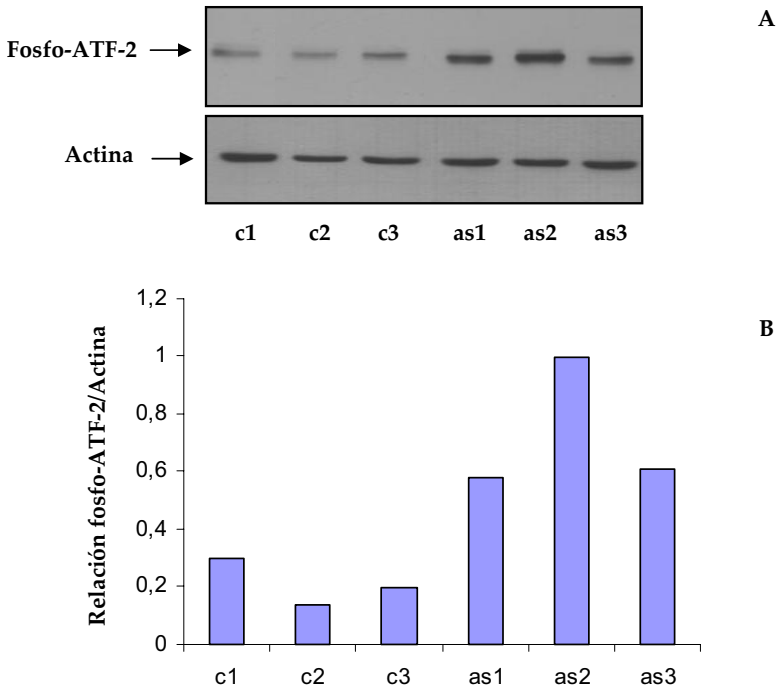


Figura V-19. Expresión de la forma activa de la proteína ATF-2. Para la detección de la forma fosforilada del ATF-2, se siguió el procedimiento utilizado en el análisis de la activación de JNK y p38. En la figura A se muestra el resultado de un experimento representativo de tres realizados, y en la figura B se presenta el análisis densitométrico de las bandas de fosfo-ATF-2 mostradas en A, expresado en relación a la intensidad de la banda de actina y en referencia al máximo, al que se asignó el valor uno.

Los resultados de los experimentos de *Western blot*, además de los datos obtenidos mediante la densitometría de las bandas inmunorreactivas, no muestran ninguna variación significativa en el estado de activación de las ERK 1/2, p38 o JNK2 como consecuencia de la reducción en la expresión de PKCβ. Sin embargo, en el análisis de la activación de las JNK1 y ATF-2 sí se observó un aumento en los niveles de la forma activa en las células deficientes en PKCβ. Estas dos proteínas presentan un grado de fosforilación significativamente superior en los clones deficientes en PKCβ que en los clones utilizados como control. Estos resultados muestran un papel negativo de la PKCβ en la activación de la JNK1 y el ATF-2, ya que la reducción de la expresión de PKCβ provoca un aumento en el estado de activación de esas dos proteínas.

El conjunto de los resultados obtenidos en el análisis de la activación de MAP quinasas sugiere que algunos de los efectos derivados de la reducción en los niveles de expresión de PKCβ podrían estar regulados a través de la ruta JNK-ATF-2.

VI. DISCUSIÓN

La proteína quinasa C es una familia multienzimática que participa en la transduccción de señales de gran variedad de procesos celulares. El hecho de que una misma célula exprese varias isoformas de PKC, y que diferentes células y tejidos presenten un patrón de expresión isoenzimática específico, ha despertado el interés en estudiar sus funciones, y averiguar si éstas son redundantes o existen papeles específicos para cada una de ellas.

Uno de los aspectos en los que la participación de las PKCs ha sido demostrada es la activación de los linfocitos T. Sin embargo, y a pesar de los numerosos estudios llevados a cabo, todavía no se ha determinado completamente la implicación de las diferentes isoformas que expresan estas células y la labor concreta que realiza cada una de ellas en ese proceso.

En este trabajo pretendemos determinar el papel de la PKCβ en acontecimientos concretos de la activación de las células Jurkat. La elección de esta isoenzima se debe a que trabajos previos de nuestro grupo, centrados en el estudio de la implicación de los isotipos clásicos de PKC (α y β) en este aspecto de la actividad de las células T, sugerían la participación de las dos isoformas y parecían mostrar que sus funciones eran antagónicas en determinados acontecimientos de la activación (Freire-Moar *et al.*, 1992; López-Lago, tesis doctoral; López-Lago *et al.*, 1999). Trabajos de otros autores corroboran la participación de PKCβ y PKCα en el proceso de activación de los linfocitos T (Altman *et al.*, 1992; Szamel *et al.*, 1990, 1993, 1995, 1997 y 1998; Dreikhausen *et al.*, 2003).

Aunque la mayor parte de los datos que relacionaban la actividad de la PKC con el control de diferentes procesos celulares se obtuvieron mediante la utilización de ésteres de forbol como activadores, estos resultados presentan varias limitaciones: no permiten distinguir si una o varias isoformas son las responsables de ese proceso, y no puede afirmarse con total certeza que esos efectos se deban a la actividad de PKC, ya que se ha demostrado que los ésteres de forbol son activadores de otras enzimas (Ron y Kazanietz, 1999). Entre los diversos métodos que permiten estudiar de forma específica la función de

una isoforma de PKC concreta, la tecnología antisentido ha demostrado ser uno de los más eficaces. La especificidad de la inhibición que produce se manifiesta en su actuación precisa sobre una proteína, cuya secuencia puede diferir en muy pocos aminoácidos de otra similar. Éste es el caso de los miembros de familias isoenzimáticas, como ocurre en el caso de las formas calcio-dependientes de la PKC en las que nosotros estamos interesados. El proceso consiste en introducir en la célula una secuencia de RNA complementaria a la del mRNA correspondiente a la proteína objeto de estudio, que al unirse a él bloquea su expresión. El RNA puede incluirse de forma transitoria, como pequeños oligonucleótidos, o puede expresarse de forma estable, insertando la secuencia de DNA correspondiente ligada a un vector de expresión. Esta metodología fue la elegida para iniciar el proyecto de investigación en el que se incluye este trabajo. El plásmido pREP3, que había sido utilizado por otros investigadores para inhibir con efectividad la expresión del oncogén N-myc en líneas celulares neuroectodérmicas (Whitesell *et al.*, 1991), fue empleado por nuestro grupo para introducir en células Jurkat fragmentos antisentido dirigidos contra las isoformas α y β de PKC y, posteriormente, obtener poblaciones clonales de células deficientes en PKCα (Freire-Moar *et al.*, 1992; López-Lago *et al.*, 1999). Este mismo plásmido se utilizó en este trabajo para obtener células con reducción específica en la expresión de PKCβ.

Como modelo celular seleccionamos la línea leucémica de células T Jurkat, muy utilizada en estudios de activación, y que también había sido empleada por nuestro grupo en los estudios de PKCα. Esto permitiría realizar un análisis comparativo de la participación de las dos isoformas calcio-dependientes de PKC expresadas en células Jurkat. Estos estudios son de gran interés, debido a la gran similitud que presentan PKCα y PKCβ, y también debido a que en muchas ocasiones es difícil determinar si las funciones de diferentes isoenzimas son redundantes, complementarias o antagónicas, puesto que su estudio se realiza en modelos celulares diferentes.

A pesar de que las células Jurkat se han utilizado tradicionalmente como modelo de células T, y han permitido la identificación de muchas moléculas implicadas en la

respuesta normal de estas células (Abraham y Weiss, 2004), se comportan de forma distinta en varios aspectos de la actividad celular con respecto a los linfocitos T no tumorales. Esto se debe, al menos en parte, a que estas células no expresan las fosfatasas PTEN y SHIP, que intervienen en la desfosforilación del PtdIns(3,4,5)P_3, por lo que esta línea muestra activación constitutiva de los efectores de PI3K y elevados niveles de PtdIns(3,4,5)P_3, que afectan a diferentes aspectos de la fisiología celular, entre los que se encuentra el metabolismo de la actina (Astoul *et al.*, 2001). Además, se ha descrito que las células Jurkat presentan niveles de expresión de las isoformas clásicas de PKC diferentes a los de las células T periféricas, al mostrar mayores niveles de PKCα y niveles más bajos de PKCβ (Lucas *et al.*, 1990). Estos aspectos deben ser considerados a la hora de valorar los resultados obtenidos en células Jurkat y extenderlos a la totalidad de las células T.

Inhibición específica de PKCβ en células Jurkat

En los estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, antes mencionados, se observó que las poblaciones de células Jurkat transfectadas con los plásmidos as-PKCα-pREP3 y as-PKCβ-pREP3 diferían de las poblaciones control (transfectadas con el vector pREP3 vacío) en su respuesta al estímulo por PMA e ionomicina. A pesar de las diferencias observadas, que afectaban a la expresión del IL-2R y la producción de las citoquinas IL-2 y TNF-α, no fue posible demostrar la reducción en los niveles de expresión de la isoforma de PKC correspondiente. Posiblemente esto se debiera a la heterogeneidad de las poblaciones con respecto a la incorporación del vector episomal y su expresión en las células transfectadas. Para demostrar la existencia de una correlación entre los efectos obtenidos y la reducción específica en la expresión de PKCα y PKCβ, se hacía necesaria la obtención de poblaciones clonales homogéneas en los niveles de expresión de las isoformas de PKC correspondientes. Este proceso se llevó a cabo, en primer lugar, con las poblaciones transfectadas con PKCα y con el vector vacío, obteniéndose dos clones de células Jurkat con una inhibición en la expresión de PKCα de aproximadamente el 60% y el 80% (López-Lago *et al.*, 1999) con respecto a los clones utilizados como controles. En este trabajo realizamos el mismo procedimiento con las células transfectadas con los

plásmidos pREP-3 y as-PKCβ-pREP3. Mediante dilución límite se obtuvieron 20 clones control y 21 clones antisentido. De todos estos, se seleccionaron los que, según lo observado en experimentos de *Western blot*, manifestaban mayor reducción en la expresión de PKCβ con respecto a los controles. El porcentaje de inhibición obtenido en este caso estaba comprendido entre el 40% y el 60%, según el clon. Este descenso era menos drástico que el observado en el caso de la PKCα estudiada previamente, quizás debido a la menor expresión de esta isoforma en las células Jurkat, a la menor eficacia del fragmento antisentido introducido, o a una posible reducción de la viabilidad celular como consecuencia de la inhibición de la expresión de PKCβ (aunque esta última posibilidad parece poco probable, a juzgar por la literatura y nuestros propios análisis sobre la viabilidad de los cultivos as-PKCβ-pREP3). Los resultados de los experimentos de *Western blot* en los que se analizó la expresión de otras isoformas de PKC en las células confirmaron la especificidad del RNA antisentido en la reducción de la expresión de PKCβ, y los análisis mediante esta misma técnica de los inmunoprecipitados de PKCβ y PKCα refuerzan el carácter selectivo de la inhibición.

El RNA antisentido puede ejercer su acción inhibidora mediante diferentes mecanismos: impidiendo el corte y empalme, evitando la traducción, al interferir con el ensamblaje de los ribosomas o a través de la RNasa H endógena, que reconoce los dúplex de RNA y degrada la cadena de mRNA. También puede afectar a la estabilidad del mRNA o impedir la salida del dúplex mRNA-asRNA desde el núcleo (Hildebrant, 1997). La reducción específica en los niveles de expresión de PKCβ en los clones as1, as2 y as3 se correlaciona con una disminución de los niveles del mRNA que la codifica, lo que sugiere que la actuación del RNA antisentido no se limita a un efecto sobre la traducción de la proteína, y que es posible que se produzca la degradación del dúplex por la RNasa H. Estos resultados, sin embargo, no excluyen otras posibles vías de actuación del fragmento antisentido.

La expresión y la regulación de las isoformas de PKC en linfocitos T y en líneas leucémicas, entre ellas las Jurkat, ha sido ampliamente estudiada, y se ha demostrado la

presencia de las isoformas α, β, δ, ε, η, θ, ι y ζ (Shearmann *et al.*, 1988; Sawamura *et al.*, 1989; Lucas *et al.*, 1990; Freire-Moar *et al.*, 1991; Terajima *et al.*, 1992; Tsutsumi *et al.*, 1993; Tarantino *et al.*, 1994). A pesar de la existencia de numerosos estudios, los datos disponibles con respecto a la expresión de las isoformas β1 y β2 por las células T, y en concreto por las células Jurkat, son confusos. Así, hay trabajos que indican que únicamente expresan la isoforma β1 (Lucas *et al.*, 1990), mientras que otros afirman que las dos están presentes en estas células (Tarantino *et al.*, 1994). A esta controversia se añade el hecho de que la variante PKCβI en rata sea homóloga a la PKCβ2 humana, y la variante PKCβII en rata sea homóloga a la PKCβ1 humana, existiendo una gran confusión en la nomenclatura utilizada por los autores de diferentes trabajos. Por esta razón, analizamos por RT-PCR la presencia del mRNA de PKCβ1 y PKCβ2, amplificando el cDNA con cebadores diseñados para reconocer la región diferencial de las dos isoformas, observando que ambas variantes están presentes en nuestras células (resultados no mostrados).

Un aspecto importante a tener en cuenta en la interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo es que las dos variantes de PKCβ (PKCβ1 y PKCβ2) son generadas por corte y empalme alternativo en la trasncripción de un mismo gen. Estas isoformas se diferencian únicamente en sus últimos 50 (PKCβ1) o 52 (PKCβ2) residuos. El fragmento antisentido que utilizamos para inhibir la expresión de PKCβ corresponde a la región que codifica parte de la secuencia N-terminal de la enzima, común a ambas isoformas, por lo que el RNA antisentido actuaría sobre las dos, y no es posible determinar a partir de nuestras observaciones si los efectos observados se deben a su actividad sobre PKCβ1, PKCβ2 o ambas.

Efectos del RNA antisentido de PKCβ en la biología de las células Jurkat

La primera evidencia de los efectos de la inhibición de la expresión de PKCβ en la actividad de células Jurkat se apreció al observar determinados aspectos de su actividad en ausencia de estímulo: viabilidad, proliferación y morfología.

No se apreció en estas células ningún efecto de la inhibición en la PKCβ sobre su viabilidad y proliferación. La determinación de la actividad proliferativa de las células Jurkat en ausencia de estímulo realizada previamente en clones de células Jurkat deficientes en PKCα por nuestro grupo, mostraba una disminución en la proliferación relacionada con la reducción en la expresión de esa isoforma de PKC, un hecho relevante teniendo en cuenta que se trata de células leucémicas (López-Lago, tesis doctoral). La comparación de estos resultados sugiere, por lo tanto, la participación diferencial de dos isoformas de PKC muy similares en un mismo proceso, estudiado en el mismo tipo celular y utilizando la misma metodología.

Esta no es la primera vez que se describe la participación diferencial de isoformas de PKC en la proliferación celular. Esta familia multienzimática se ha relacionado con la regulación del crecimiento y diferenciación en distintos tipos de células, y varios estudios sugieren que sus isoformas pueden tener efectos únicos u opuestos en la proliferación, aunque su actuación depende del tipo celular analizado. Así, en la línea R6 de fibroblastos embrionarios de rata, se demostró la participación de las isoformas α y βI en el crecimiento, con un papel promotor de PKCβI e inhibidor de PKCα (Borner *et al.*, 1995). Resultados similares se obtuvieron en queratinocitos HaCaT, en los que se observó inhibición de la proliferación celular por las isoformas de PKC α y δ, e incremento de la proliferación por la actividad de las isoformas β y ε (Papp *et al.*, 2004). Sin embargo, en tumores gástricos, la supresión por RNA antisentido de PKCα y β1 inhibe el crecimiento (Jiang *et al.*, 2004). En células de músculo liso se ha observado incluso un efecto antagónico sobre el crecimiento de las dos isoformas de PKC más similares: la PKCβI, inhibidora de la proliferación y la PKCβII, promotora de la división (Yamamoto *et al.*, 1998). En conjunto, todos estos datos demuestran que las distintas isoformas de PKC ejercen efectos específicos dependientes del tipo celular en que se estudian, por lo que es posible que no influyan sobre la maquinaria de división, sino sobre las rutas específicas que controlan la división en esas células.

A pesar de que la PKC se ha relacionado también con la apoptosis celular, y por tanto, con la reducción de la viabilidad celular (Behrens *et al.*, 1995) no se detectó en las células deficientes en PKCβ ninguna alteración a este respecto.

Una diferencia evidente entre los cultivos de células Jurkat deficientes en PKCβ y los clones control es su estado de agregación. Mientras en los controles las células se encuentran disgregadas o formando grupos de pocas células, en las poblaciones que contienen el vector as-PKCβ-pREP3 forman agregados más numerosos, especialmente en el caso de los clones as2 y as3. La formación de agregados depende de la motilidad de las células, de la frecuencia con la que unas células colisionan con otras y de la fuerza de las uniones intercelulares que se establecen entre ellas, que está condicionada a su vez por la concentración de receptores en su superficie y por la afinidad por los ligandos presentes en las otras células (Neelamegham *et al.*, 1997). Estos acontecimientos están subordinados en gran medida a la actividad del citoesqueleto y las proteínas de adhesión celular. Entre las moléculas que participan en la agregación celular se encuentra la integrina LFA-1, expresada únicamente en leucocitos, que media la adherencia de estas células al endotelio o a otros leucocitos mediante su unión a las moléculas de superficie ICAM. Otra molécula implicada en la adhesión celular es la glucoproteína CD99, que induce la agregación homotípica mediante un mecanismo independiente de la actividad LFA-1/ ICAM-1. La actividad de la proteína quinasa C parece participar en la unión mediada por estas moléculas (Katagiri *et al.*, 2000, Kasinrerk *et al.*, 2000), por lo que la morfología que presentan los clones deficientes en PKCβ podría deberse a una alteración de las rutas que median la adhesión y motilidad en estas células, que podría implicar a las moléculas LFA-1 y/o CD99. Otros autores han demostrado la interacción de PCKβ con moléculas asociadas a los microtúbulos (Kiley y Parker, 1995) y con el citoesqueleto de actina (Blobe *et al.*, 1996), y se ha demostrado también la participación de PKCβI en la locomoción mediada por LFA-1 de células Jurkat activadas (Volkov *et al.*, 1998 y 2001). Todos estos trabajos sugieren la participación de PKC, y en concreto PKCβ, en la motilidad y agregación de los linfocitos T.

Efectos del vector as-PKCβ-pREP3 en la activación de las células Jurkat

Una vez analizada la participación de la PKCβ en determinados aspectos del crecimiento de las células Jurkat en ausencia de estímulo, estudiamos su papel en acontecimientos concretos de la activación linfocitaria: la expresión de marcadores de activación y la producción de citoquinas.

El CD69 y el IL-2Rα son dos de los primeros marcadores expresados tras la unión al antígeno, y fueron seleccionados para comprobar el efecto de la reducción en la expresión de PKCβ en los acontecimientos tempranos de la activación de las células Jurkat. La implicación de la PKC en la inducción de estos antígenos había sido determinada previamente por varios grupos de investigación, incluido el nuestro en el caso del IL-2R .

Nuestros datos demuestran que la PKCβ interviene en la expresión de CD69 por las células Jurkat en respuesta al estímulo con PMA, ya que la presencia de este marcador en la superficie celular está reducida con respecto a los clones control.

La expresión de CD69 se ha relacionado con la actividad de PKC en diferentes tipos celulares a partir del estímulo con DAG, ésteres de forbol y sus derivados, y del empleo de inhibidores de PKC, considerados en aquel momento específicos para esta enzima (estaurosporina o H7) (Cebrián *et al.*, 1989; Borrego *et al.*, 1993). Posteriormente, se estudió la implicación de isoformas de PKC en la expresión de este marcador a partir de la utilización de mutantes constitutivamente activos de PKCα, ε y ζ, demostrándose que ninguna de estas isoenzimas participa en la expresión de CD69 (Genot *et al.*, 1995). Por lo que sabemos, nuestro trabajo constituye la primera referencia explícita a un papel regulador específico de la PKCβ en la expresión de esta molécula en la células T, aunque un papel regulador similar se sugirió para la isoforma PKCθ (Thuille *et al.*, 2004).

La implicación de PKCβ en la expresión del CD69 fue estudiada también por Thuille et al., usando timocitos procedentes de un ratón deficiente en PKCβ estimulados con anti-CD3 y anti-CD28. Estos autores no apreciaron diferencias significativas en los

niveles de expresión de este antígeno de superficie con respecto a lo observado en timocitos normales. Este mismo grupo demostró, en células deficientes en PKCε, que la ausencia de esta isoforma no afectaba a la expresión del CD69 (Gruber *et al.*, 2005). Aunque estos resultados no coinciden con los nuestros, las diferencias podrían deberse tanto a la utilización de estímulos distintos como al empleo de timocitos, ya que en numerosas ocasiones se han encontrado resultados contradictorios al comparar acontecimientos de la activación de células Jurkat y linfocitos T no tumorales.

El análisis de la expresión de CD25 en las células con expresión reducida de PKCβ sugiere un papel negativo para esta isoforma, ya que su expresión aumenta en los clones deficientes en PKCβ. Como ocurría en el análisis de la expresión de CD69, nuestros resultados no coinciden con los de Thuille *et al.*, que concluyen que esta isoforma no participa en la expresión del IL-2Rα en la superficie de los linfocitos deficientes en PKCβ. De la misma forma que en el caso anterior, las diferencias se relacionan, probablemente, con las condiciones experimentales utilizadas.

Otros autores, a partir del estudio del células leucémicas en las que no se expresa PKCβ, dedujeron que esta proteína no participaba en la inducción de la expresión del CD25 en células T estimuladas con ésteres de forbol (Koretzky *et al.*, 1989). Es interesante destacar que en la bibliografía consultada no existe ningún trabajo que sugiera un papel positivo de PKCβ en la expresión del receptor de alta afinidad de la IL-2, a excepción del realizado por Aggarwal *et al.*, 1994, en el que utilizaron un agonista considerado específico para PKCβ1, aunque estudios posteriores demostraron que no se cumplía esa especificidad *in vivo* (Kiley *et al.*, 1994).

La participación de la PKC en la regulación de la expresión del IL-2Rα en células T se dedujo a partir de estudios en los que se utilizaban ésteres de forbol como activadores (Altman *et al.*, 1992), y mediante la utilización de péptidos inhibidores de PKC (Ioannides *et al.*, 1990; Barja *et al.*, 1994), pero en estos trabajos no se aportaba información sobre la participación de isoformas concretas de PKC. La expresión de la cadena α del IL-2R inducida por ésteres de forbol fue estudiada por nuestro grupo (tal y como se indicó

anteriormente) en poblaciones totales de células Jurkat transfectadas independientemente con los plásmidos as-PKCα-pREP3 y as-PKCβ-pREP3 (Freire-Moar *et al.*, 1992). Los resultados mostraban un efecto antagónico de las dos isoformas sobre la expresión del receptor, que aumentaba en respuesta a la inhibición de PKCβ y disminuía con la expresión de PKCα. El mismo resultado obtenido en cada una de las poblaciones totales (Freire-Moar *et al., 1992)* se obtuvo en clones de células Jurkat con reducción en la expresión de la PKCα (López-Lago *et al.*, 1999) y PKCβ (resultados aquí mostrados). A partir de las observaciones de estos tres trabajos en conjunto, puede concluirse la función antagónica de las dos isoformas de PKC clásicas presentes en las células Jurkat con respecto a la expresión del CD25: un papel positivo para PKCα (ya que su inhibición reduce la expresión del IL-2R) y un papel negativo para PKCβ (puesto que su disminución se acompaña de un incremento de la expresión del receptor). Este papel antagónico, por lo que observamos en la bibliografía publicada, es la primera vez que se sugiere.

Los efectos apreciados en los clones con expresión reducida de PKCβ, con respecto a la expresión de los marcadores de superficie CD69 e IL-2R, parecen ser específicos, ya que no se observan alteraciones en la expresión de otras moléculas de membrana, como el CD2 y el CD3 (Freire-Moar *et al.*, 1992) o el CD4 y CD8 (observación personal).

La producción de las citoquinas IL-2, IL-8, TNF-α, TNF-β e IFN-γ se ha relacionado en diversos trabajos con la actividad de la proteína quinasa C en linfocitos T, por lo que analizamos el papel de PKCβ en su síntesis. En células deficientes en PKCβ, estimuladas con PMA e ionomicina, la expresión de IL-2 e IL-8 se encuentra reducida con respecto a los controles, mientras que la producción de TNF-β se ve incrementada. No se observó en estas células una variación significativa con respecto a la producción de TNF-α, y la participación en la secreción de IFN-γ no pudo ser determinada, ya que no se detectó esta citoquina en los sobrenadantes de la mayor parte de los clones.

Un aspecto interesante observado en estos experimentos es la diferencia entre la expresión de citoquinas por los clones que utilizamos como control y la población de

células Jurkat no transfectadas. Concretamente, las células Jurkat secretan menos IL-2 que las células transfectadas, y cantidades superiores de IFN-γ. Es posible que estas diferencias se deban a la selección de las células en el proceso de cultivo en presencia de antibióticos y en la clonación. Puesto que la IL-2 es una citoquina que promueve la proliferación y supervivencia linfocitaria, es probable que las células que secretasen mayor cantidad de IL-2 creciesen con más facilidad al someterlas al procedimiento de dilución límite. En el caso del IFN-γ, el efecto es el contrario, y las células Jurkat mostraron concentraciones muy superiores a las de los controles, en los que su presencia fue indetectable.

Un efecto de la clonación de las células Jurkat es la selección de clones con características particulares que pueden diferir de la población original de la cual proceden. Se ha descrito que las células cancerosas, y en particular las células Jurkat, presentan poca estabilidad genética, lo que genera una gran heterogeneidad tras la subclonación. Este mismo efecto se observa tras cultivos prolongados y al seleccionar células con resistencia a fármacos (Parson *et al.*, 2005). La heterogeneidad observada en nuestros clones podría ser una consecuencia de este efecto, al seleccionarse las células por su resistencia al antibiótico higromicina C y a que el proceso de clonación por dilución límite y la selección de clones posterior alargan considerablemente el tiempo de cultivo de las células (al menos 3 meses).

La IL-2, el principal factor de crecimiento para las células T activadas por el antígeno, es la citoquina cuya expresión por las células Jurkat está mejor caracterizada. Nuestros resultados muestran que la secreción de IL-2 en las células deficientes en PKCβ es inferior a la liberación por los clones utilizados como controles. Una respuesta similar había sido observada en estudios anteriores de nuestro grupo, utilizando las poblaciones totales de células Jurkat transfectadas con el vector as-PKCβ-pREP3 (López-Lago, tesis doctoral). Con respecto a la producción de esta citoquina, la función de PKCα y PKCβ parece ser similar, ya que el mismo efecto observado en las células con expresión de PKCβ

reducida se apreció en las poblaciones transfectadas con el vector as-PKCα-pREP3 y en los clones obtenidos a partir de ellas (López-Lago, tesis doctoral; López-Lago *et al.*, 1999).

La implicación de PKCβ en la secreción de IL-2 fue estudiada por otros grupos de investigación con resultados contradictorios. Así, el análisis de líneas leucémicas deficientes en PKCβ llevó a Koretzky *et al.* (1989) a desechar la participación de esta isoforma en este proceso, mientras que el uso de otras líneas deficientes en esta isoforma (Kelleher y Long, 1992) o inhibidores específicos (Hassan *et al.*, 1997) sugería su intervención en la producción de esta citoquina. En otro trabajo se postuló la implicación de PKCβ1 en la producción de IL-2 a partir del uso de un agonista de esta isoforma (Aggarwal *et al.*, 1994), aunque posteriormente se demostró que éste no era específico *in vivo* (Kiley *et al.*, 1994).

El análisis comparativo de la participación de las dos isoformas calcio-dependientes de PKC en la secreción de IL-2 por las células Jurkat fue realizada también por otros investigadores. El efecto de la inhibición de PKCα y PKCβ sobre la producción de IL-2, utilizando oligonucleótidos antisentido, se estudió en células Jurkat estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 (Dreikhausen *et al.*, 2003). Los resultados de este trabajo coinciden con los nuestros con respecto a PKCβ: la inhibición de su expresión provoca la reducción en la secreción de la IL-2. Sin embargo, la disminución en la expresión de PKCα se relacionaba con un aumento en la producción de IL-2, contrastando con lo publicado por López-Lago *et al.* (1999). El mismo grupo había estudiado anteriormente la expresión de IL- 2 y su receptor en linfocitos, concluyendo que la expresión de estas dos moléculas se regula de forma diferente, y que la de la IL-2 requiere una activación de la PKC más prolongada que la expresión de su receptor (Szamel *et al.*, 1990). Análisis posteriores les llevaron a concluir que PKCβ es la isoforma responsable de la expresión de IL-2, y PKCα participa en la inducción del IL-2R (Szamel *et al.*, 1995). Estos resultados fueron confirmados mediante la introducción de anticuerpos anti-PKCα y anti-PKCβ en estas células (Szamel *et al.*, 1997), y estudios más exhaustivos utilizando la misma metodología, pero incluyendo otras isoformas de PKC, permitieron asociar a PKCα y θ con la inducción

de la expresión del IL-2R y a PKCβ, PKCδ y, en menor medida, PKCε en la expresión de la IL-2 (Szamel *et al.*, 1998).

Los resultados aportados por Thuille *et al.*, 2004, contrastan con los nuestros y con los de Szamel *et al.* en relación a la participación de PKCβ en la producción de IL2, ya que no detectaron ningún efecto causado por la deficiencia en PKCβ o de la sobreexpresión de sus dos isoformas sobre la producción de IL-2 en linfocitos T. Sin embargo, sí observaron alteraciones al sobreexpresar de PKCθ y PKCα, aunque antagónicas: PKCθ estimulaba su síntesis y PKCα la reducía.

Utilizando la línea linfocitaria HUT78, deficiente en PKCβ, Long *et al.* (2001) concluyeron que esta enzima no interviene en la transcripción ni en la traducción de la IL-2, sino en su secreción. Nuestras observaciones, sin embargo, contradicen esta afirmación, ya que el nivel de IL-2 liberada por las células, analizado por ELISA, se correlacionaba con los niveles de mRNA detectados por RT-PCR. Por tanto, nuestros datos sugieren la participación de PKCβ en la síntesis de IL-2, aunque no puede descartarse que afecte también a su liberación por las células. Otros trabajos apoyan la implicación de PKCβ en la producción, y no sólo la secreción, de IL-2 por las células T (Dreikhausen *et al.*, 2001), sugiriendo que la expresión diferencial de los isotipos clásicos de PKC por la línea celular HUT78 (que sólo expresa PKCα) y las células Jurkat (que expresan la PKCα y β) implica una regulación diferente de la síntesis de IL2 por estas células. El hecho de que las células Jurkat precisen un estímulo de PMA e ionomicina para producir IL2, mientras que las HUT78 responden al estímulo de PMA solo, apoya la implicación de una isoforma no clásica de PKC en la producción de IL-2 en estas células.

Un aspecto interesante a comentar con respecto a la expresión de IL-2 y de su receptor en nuestras células es el hecho de que, a pesar de que la IL-2 induce la aparición en la membrana de su propio receptor, en las células Jurkat deficientes en PKCβ que estudiamos, la producción de IL-2 se encuentra reducida, al mismo tiempo que aumenta la expresión de su receptor. Una posible explicación de este hecho es que esta isoforma de PKC participe en la regulación de cada una de estas moléculas de manera independiente.

Otra citoquina producida en el proceso de activación linfocitaria, y cuya producción se ha relacionado con la activación de la PKC, es el TNF-α (Renier *et al.*, 1994; Kontny *et al.*, 1999; Steube *et al.*, 1995).

En nuestros clones no fue posible demostrar una alteración en la producción de esta citoquina que pudiera asociarse con la reducción en la expresión de PKCβ; sin embargo, experimentos anteriores de nuestro grupo, utilizando poblaciones totales de células Jurkat transfectadas con el plásmido as-PKCβ-pREP3, sugerían un efecto positivo de la expresión de esta isoforma sobre la producción del TNF-α, coincidiendo con el resultado obtenido en poblaciones totales transfectadas con el plásmido as-PKCα-pREP3 y en los clones de células Jurkat obtenidos a partir de ellas (López-Lago, tesis doctoral; López-Lago *et al.*, 1999).

La implicación de las isoformas α y β de PKC en la producción de TNF-α por mastocitos y macrófagos ha sido descrita por Kawakami *et al.* (2003), Foey y Brennan (2004) y Abdel-Raheem *et al.* (2005). Es posible que el método que nosotros utilizamos para determinar la producción de esta citoquina no presentase la sensibilidad suficiente, ya que no se observaron diferencias importantes entre los niveles de TNF-α en los sobrenadantes de los cultivos y los detectados en el propio medio de cultivo utilizado, tomando como referencia los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo aplicando el mismo estímulo (López-Lago *et al.*, 1999).

En este trabajo se cuantificó también la secreción de IL-8 por las células as-PKCβ-pREP3 estimuladas con ésteres de forbol e ionomicina, y los resultados obtenidos sugieren que esta enzima regula la expresión de la IL-8 de forma positiva. La secreción de IL-8 ha sido relacionada con la expresión y actividad PKC en diferentes células, y la participación de la PKCβII en la inducción de la expresión de IL-8 se ha demostrado mediante el uso de un inhibidor considerado específico de PKCβ (Zhang *et al.*, 2005).

La implicación de otras isoformas de PKC en la regulación de la síntesis de IL-8 también ha sido descrita en varias publicaciones. La PKCδ interviene en la producción de

IL-8 en células de colon o de epitelio bronquial, aunque con efecto promotor en el primer caso (Koon *et al.*, 2005) e inhibidor en el segundo (Cummings *et al.*, 2004). El efecto inhibidor se ha descrito también en células de epitelio bronquial para PKCλ, y el opuesto para PKCζ (Cummings *et al.*, 2004). Otros autores han demostrado el papel positivo de PKCα sobre la producción de IL-8 en células de colon (Zhao *et al.*, 2005).

El IFN-γ es una citoquina que desempeña un papel importante en la promoción de mecanismos específicos de defensa cuya producción está finamente regulada. La PKC parece estar relacionada con este mecanismo regulador, según se describió en diferentes trabajos (Li *et al.*, 1998; Bonilla *et al.*, 2005). Sin embargo, fuimos incapaces de detectar producción de esta citoquina en nuestros cultivos, a pesar de que se ha demostrado la producción de IFN-γ por células Jurkat estimuladas con PMA e ionomicina (Penix *et al.*, 1993).

El TNF-β es otra de las citoquinas producidas por linfocitos T tras la activación, y la participación de la PKC en su secreción se dedujo a partir de estudios en los que la PKC se inhibía mediante péptidos pseudosustrato (Barja *et al.*, 1994). Nuestros resultados, aunque muestran cierta variabilidad en la expresión de esta molécula, indican que las células con inhibición específica de PKCβ producen más TNF-β, siguiendo un patrón de expresión opuesto al de la IL-2. Estos mismos resultados habían sido obtenidos por nuestro grupo en poblaciones totales de células Jurkat transfectadas con el plásmido as-PKCβ-pREP3, sugiriendo de nuevo el papel antagónico de las isoformas α y β de PKC en un aspecto concreto de la activación de las células Jurkat, ya que el efecto observado en poblaciones transfectadas con el plásmido as-PKCα-pREP3 era el opuesto (Freire-Moar *et al.*, 1992).

No resulta sorprendente que la inhibición de PKCβ produzca efectos similares en la inducción de diferentes citoquinas, puesto que se ha descrito que los promotores de muchos genes inducibles que las codifican, como los de la IL-2, IL-8, TNF-α, (GM)-CSF, IL-3 e IFN-γ, presentan una gran similitud (Weschler *et al.*, 1994). De esta forma, la modificación de la unión de los factores de transcripción que pudiera verse alterada por la

reducción de la expresión de PKCβ les afectaría a todos en el mismo sentido. Es posible, sin embargo, que haya elementos diferenciales en sus promotores, lo que explicaría los distintos efectos sobre su expresión, e incluso que en alguno de ellos estén modificados procesos diferentes a la transcripción, por ejemplo su secreción, como se sugirió en el caso de la IL-2.

Al interpretar los resultados publicados por distintos autores en relación a la participación de las isoformas α y β de PKC en la inducción de los marcadores de activación o la producción de citoquinas, hay que tener en cuenta la variabilidad de tipos celulares utilizados como modelo de estudio por cada uno de ellos, que puede implicar la expresión de diferentes isoformas de PKC en estas células; por otro lado, en estos estudios la estimulación de estas células se realiza a través de vías alternativas (estímulo del receptor antigénico con o sin coestímulo del CD28, utilización de PMA sólo o en combinación con ionomicina, etc.) Es conveniente, además, tener presente la inespecificidad de los activadores o inhibidores enzimáticos, y que las líneas celulares seleccionadas por su deficiencia en una enzima determinada pueden presentar otras alteraciones desconocidas que afecten a los procesos que se están estudiando.

La inhibición de PKCβ en las cascadas de señalización celular

La transducción de señales a partir del TCR se produce a través de una cascada de proteínas tirosina quinasas, que vinculan al TCR con, al menos, dos moléculas: Ras y la PLCγ1. Ahnadi *et al*. (2000) sugirieron la relación entre la actividad de la PKC y la fosforilación en tirosina, tras realizar experimentos en los que la activación crónica con PMA provocaba la degradación de las isoformas clásicas y nuevas de PKC, observándose una reducción en el patrón de fosforilación de tirosinas. Sin embargo, en nuestros resultados no observamos ninguna alteración en ese patrón, tras estimular las células con PMA e ionomicina, atribuible a la expresión diferencial de PKCβ por ellas.

Las MAP quinasas son una familia de serina-treonina quinasas implicadas en diferentes procesos de transducción de señales eucariotas, incluyendo el control de la

proliferación y diferenciación celular, o la síntesis de citoquinas (algunas de las cuales participan en estos acontecimientos). Diferentes proteínas de las rutas de MAP quinasas se han relacionado con la producción de algunas citoquinas y antígenos de superficie marcadores de la activación estudiados en este trabajo, tanto en células T (Dumont *et al.*, 1998; Rincón *et al.*, 1998 y 2001; Hoffmeyer *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2002; Li *et al.*, 1999a y 1999b; Zhang y Dong, 2005) como en otros tipos celulares (Zhu *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2005).

La relación entre la activación de las MAP quinasas y la actividad de la familia PKC se ha descrito en numerosos trabajos, en los que se ha demostrado que algunas de sus isoenzimas parecen activar a las primeras, tanto en linfocitos T (Genot *et al.*, 1995; Gaffari-Tabrizi *et al.*, 1999; Dreikhausen *et al.*, 2003) como en células de otros tipos (Young *et al.*, 1996; Schönwaser *et al.*, 1998; Corbit *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2005). En este trabajo tratamos de averiguar si la señal procedente del PMA, o de éste en combinación con la ionomicina, que son estímulos activadores para las ERK 1/2, el primero, y las JNK y p38, el segundo, requiere la participación de la PKCβ y, de esta manera, relacionar la reducción en la expresión de esta isoforma con una alteración paralela de la actividad de las rutas que controlan las MAP quinasas mencionadas. Centramos nuestros análisis en las tres proteínas terminales de las cascadas de MAP quinasas más importantes: ERK 1/2, JNK y p38. Los resultados obtenidos no mostraron alteraciones en la activación de las ERK o de p38, pero en los clones as1, as2 y as3 sí se apreció un incremento significativo en los niveles de la forma fosforilada de la JNK p46. Analizamos posteriormente una de las dianas de esta enzima: la proteína ATF-2, que participa en la formación del factor de transcripción AP-1, y observamos también un aumento importante en su nivel de activación. A partir de estos resultados puede concluirse que, en nuestras células, la activación de las proteínas ERK 1/2 por el PMA y de p38 por el PMA en combinación con la ionomicina es independiente de PKCβ. Al contrario, la ruta que activa a la JNK sí se ve afectada por la inhibición de esta isoforma, que parece reprimir su activación, ya que la deficiencia en los niveles de expresión de PKCβ es paralela a una fuerte activación de las proteínas JNK1 y ATF-2.

La participación de la PKCα en la activación de las ERK 1/2 había sido examinada con anterioridad por nuestro grupo en los clones de células Jurkat deficientes en este isotipo, sin apreciar ningún efecto de la reducción en su expresión sobre la activación de estas MAP quinasas. Esto sugería la posible influencia de otras quinasas en la transducción de señales hacia los factores de transcripción AP-1 y NF-AT, que presentaban menor actividad en estas células que en los controles utilizados (López-Lago, tesis doctoral). Para comprobar si las proteínas implicadas en ese proceso eran otros miembros de la familia de MAP quinasas (como JNK o p38), analizamos el estado de activación de estas enzimas en las células Jurkat deficientes en PKCα (ver apéndice). Sin embargo, no detectamos tampoco en ellas diferencias significativas en los niveles de expresión de las formas fosforiladas (activas) de las JNK ni de p38, y tampoco de su diana ATF-2, implicada en la formación del AP-1, lo que sugiere que deben existir otras proteínas responsables de la transmisión de esa señal. Una vez más, nuestros datos están de acuerdo con la participación diferencial de las dos isoformas clásicas de PKC en un mismo proceso de la activación linfocitaria, teniendo en cuenta que el grado de actividad de las JNK1 y ATF-2 está modificado en las células Jurkat deficientes en PKCβ, pero no en las que presentan inhibición de PKCα.

Los trabajos de Dreikhausen *et al.* (2003) mostraron también el efecto de la inhibición de PKCα y β, mediante oligonucleótidos antisentido o inhibidores específicos, sobre la activación de las proteínas ERK, JNK y p38 en células Jurkat y linfocitos de sangre periférica. En su caso, sí observaron reducción en la actividad de las proteínas ERK en las células con inhibición de PKCα y β, y de MKK4 y su sustrato, JNK, en las células con inhibición de PKCβ. Estos hallazgos contrastan con los nuestros, que sugieren un papel inhibidor de PKCβ con respecto a la actividad de JNK y no muestran relación entre la actividad PKCα y ERK. Sus resultados y los nuestros sí coinciden en el caso de p38, cuya actividad no se ve afectada por la reducción en la expresión de ninguna de las PKCs analizadas.

Aunque la implicación de diferentes isoformas de PKC en la activación de las ERK ha sido demostrada en numerosos trabajos, la vía de señalización concreta que las relaciona no está completamente aclarada. Entre los mecanismos de activación sugeridos se encuentra la fosforilación activadora de diferentes miembros de la ruta de activación de las ERK por las isoformas de PKC, como la activación directa de Raf-1 por PKCα y PKCε en células NIH3T3 y células COS (Kolch *et al.*, 1993; Cai *et al.*, 1997), la activación de la proteínas Ras-GRP mediante fosforilación por PKCθ en células T (Roose *et al.*, 2005) y células B (Zheng *et al.*, 2005), o la fosforilación de la proteína RKIP, inhibidora de la unión de MEK a Raf-1, que permite la actividad de Raf-1 (Corbit *et al.*, 2003). La explicación de la diferencia observada entre nuestros resultados y los de Dreikhaunsen *et al.* con respecto a la activación de ERK podría deberse a la activación de rutas señalizadoras diferentes por los estímulos utilizados: PMA en nuestro caso y la combinación de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en el suyo. De hecho, la señal procedente del TCR activa a la proteína SoS, que junto con Ras-GRP, participa en la activación de Ras. El PMA, además de activar la PKC, es activador de Ras-GRP, por lo que es posible que el efecto de la expresión reducida de PKCβ, si existiera, se viese enmascarado por la actividad de esta proteína. Otra posibilidad es que la activación de la ruta de las ERK no sea específica de una sola isoforma de PKC, por lo que su carencia podría ser suplida por la actividad de otras, o que varias puedan ser necesarias para su activación completa, siendo alguna de ellas más eficiente en su activación, posibilidad que también sugieren otros autores (Werlen *et al.*, 1998).

La JNK precisa para su activación las señales procedentes del TCR y el CD28, o el estímulo proporcionado por el PMA en combinación con un ionóforo de Ca^{2+} (Su *et al.*, 1994) y estas señales se integran para activar la transcripción del gen de la IL-2. La implicación de la PKCβ en la activación de JNK debe ser diferente en respuesta a estos estímulos, a juzgar por el efecto opuesto observado sobre la activación de JNK por Dreikhausen *et al.*, y nosotros en células Jurkat con expresión de PKCβ específicamente reducida. En contraposición a las numerosas referencias que indican la participación de PKC en la activación de las ERK, su efecto sobre la actividad de JNK no ha sido tan

estudiado. Sin embargo, sí se han publicado varios trabajos que demuestran la implicación de PKCθ en su activación (Gaffari-Tabrizi *et al.*, 1999; Werlen *et al.*, 1998).

Las funciones de las JNK 1 y 2 en la célula no están completamente determinadas. Aunque se ha establecido su participación en la activación transcripcional de la IL-2 y la estabilización de su RNA mensajero (Chen *et al.*, 1998), falta por esclarecer si JNK1 y JNK2 ejercen las mismas funciones en células T, como sugieren algunos autores (Sabapathy *et al.*, 2001) o, al contrario, desempeñan papeles diferentes (Conze *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 1998). La misma relación que nosotros observamos entre la activación de JNK (incrementada en los clones con expresión deficiente de PKCβ) y la expresión de IL2, reducida en los mismos, y su receptor, que aumenta, fue descrita por Conze *et al.*, en células T $CD8^+$. En su trabajo demostraron que JNK1 regula positivamente la expresión del CD25 (es decir, la reducción en la actividad JNK1 provoca una menor expresión del IL2R); sin embargo, la JNK2 actúa negativamente sobre la expresión de la IL2 (es decir, la disminución en la expresión de JNK2 induce el aumento de la producción de IL2).

La proteína ATF-2, mediante su interacción con c-Jun, afecta a la activación de los genes diana de AP-1, que son estimulados rápidamente por las señales de activación linfocitaria y regulan los promotores de numerosos genes pro-inflamatorios, como citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión (E-selectina, P-selectina y VCAM). En células T de ratón, los genes c-Jun, TNF-α, IFN-γ y KC (similar a la IL-8 humana) se han identificado como dianas de ATF-2. Es posible, por tanto, que los efectos observados por la reducción de la expresión de PKCβ, que se acompaña de un aumento en la activación de ATF-2, se deban en parte a la actividad de esta proteína (Reimold *et al.*, 2001).

El hecho de que la única alteración de las rutas de MAPK que hemos observado sea la activación de JNK y su diana, la proteína ATF-2, y no hayamos estudiado la inducción de los factores de transcripción implicados en la expresión de las moléculas de activación analizadas hace difícil relacionar estos procesos. Sin embargo, los estudios llevados a cabo por nuestro grupo con las células deficientes en PKCα mostraron alteraciones en la activación de los factores de trasncripción NF-AT y AP-1, pero no en la

de las ERK, JNK y p38, lo que sugiere que debe existir algún mecanismo de activación en estas células independiente de estas MAP quinasas.

Una dificultad añadida a la hora de intentar explicar las variaciones obtenidas por diferentes autores con respecto a la participación de proteínas de la familia MAP quinasa en la activación de las células T es la especificidad de su función en diferentes tipos celulares. Así, la activación de JNK por PMA e ionomicina parece ser específica para las células T (Werlen *et al.*, 1998) y la proteína Raf-1 puede ser activada por PKCβ en respuesta al estímulo de la insulina, pero no en otras rutas de señalización (Formisano *et al.*, 2000) Este hecho dificulta la comparación de nuestros resultados con los publicados a partir de estudios en otros tipos celulares.

Aunque el efecto regulador de la PKC en la activación de los linfocitos T se ha determinado hace tiempo, en los últimos años muchos de los estudios se han centrado en la isoforma PKCθ, ya que su presencia casi exclusiva en linfocitos T y su localización en los SMAC durante la activación linfocitaria sugerían que esta proteína debía de desempeñar un papel importante en el mecanismo de activación. Los resultados obtenidos por distintos grupos de investigación, utilizando diferentes aproximaciones metodológicas y modelos celulares, confirmaron esta hipótesis, al relacionarse la actividad de PKCθ con la expresión del CD69, la regulación de JNK2, la activación de los factores de transcripción AP-1, NF-AT y NF-κB y la producción de IL-2 (revisado en Altman *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2000; Altman y Villalba, 2002; Isakov y Altman, 2002; Sedwick y Altman, 2004 y Manicassamy *et al.*, 2006) Además, esta actividad parece ser específica de células T, puesto que en otros tipos celulares esta enzima no desempeña un papel vital.

La principal aportación de este trabajo radica en que determina las funciones específicas de la enzima PKCβ en diferentes aspectos de la activación de células Jurkat, desde los acontecimientos más tempranos (expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25) hasta los más tardíos (expresión de citoquinas), analizando su participación en la transducción de señales de activación a través de las tres rutas principales de MAP quinasas (ERK, JNK y p38). El hecho de que estos estudios se hayan

realizado en el mismo tipo celular y siguiendo la misma estrategia que los previamente realizados por nuestro grupo (utilizando poblaciones de células transfectadas con vectores anti-sentido para PKCα y β, y clones de células Jurkat con inhibición selectiva de PKCα), permite contrastar los resultados obtenidos en cada uno de ellos y concluir sus papeles antagónicos, solapantes o diferenciales, según el caso. Además, haber examinado determinados aspectos de la activación tanto en clones celulares como en las poblaciones de las cuales derivan, permite reforzar los resultados obtenidos, al demostrar que no se deben a una mera selección clonal.

Los resultados de este trabajo, analizados con respecto a los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo, han permitido establecer la participación diferencial de las isoformas PKCα y β en aspectos de la activación celular que no habían sido descritos previamente, como su papel antagónico en la inducción del CD25 o el TNF-β, o su función diferencial en la activación de las proteínas JNK y ATF-2. Las investigaciones realizadas con respecto a la función específica de PKCβ en la actividad de los linfocitos T sugieren su posible participación en la adhesión celular y la transducción de señales de activación. Un aspecto interesante que debería ser analizado para profundizar en el conocimiento de estos procesos es la expresión de las moléculas LFA-1 o CD99 en la superficie de los linfocitos deficientes en PKCβ. Por otro lado, el análisis de la activación de factores de transcripción, como AP-1, NF-κB y NF-AT, sería útil para tratar de reconstruir la ruta de señalización completa que implica a la PKCβ y que, partiendo del estímulo del PMA e ionomicina, conduce a la expresión de citoquinas.

VII. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. La transfección de las células Jurkat con el plásmido as-PKCβ-pREP3 permite reducir los niveles de expresión de la PKCβ de forma selectiva, sin alterar la expresión de las otras isoformas de PKC presentes en estas células.

2. La introducción del plásmido as-PKCβ-pREP3 reduce los niveles de mRNA de PKCβ, además de la cantidad de proteína, por lo que la secuencia antisentido parece actuar promoviendo la degradación de los dúplex mRNA-asRNA, sin que puedan descartarse otros mecanismos de acción.

3. La reducción en la expresión de PKCβ no se relaciona con alteraciones en la viabilidad o proliferación de las células en cultivo en ausencia de estímulo, pero sí con su capacidad de formar agregados. La menor expresión de PKCβ parece potenciar la formación de agregados por las células Jurkat.

4. La inhibición de la expresión de la PKCβ altera la expresión de marcadores de la activación en la superficie de las células Jurkat: aumenta la expresión del receptor de IL-2 y disminuye la expresión del CD69.

5. La reducción de la expresión de PKCβ se relaciona con alteraciones en la producción de citoquinas en células Jurkat tras la activación, disminuyendo los niveles de expresión de IL-2 e IL-8; la citoquina TNF-β muestra un patrón de expresión opuesto al de la IL-2.

6. El efecto de la inhibición de PKCβ sobre la expresión génica en la activación es independiente de la actividad de las MAP quinasas ERK 1/2 y p38.

7. El efecto de la inhibición de PKCβ en la activación de las células T parece estar mediado, al menos, por la actividad JNK (concretamente la JNK1) y su sustrato, el factor de transcripción ATF-2.

CONCLUSIÓN FINAL

La isoforma PKCβ desempeña un papel diferente al de PKCα en algunos procesos de activación de células Jurkat. Sus efectos son antagónicos con respecto a la expresión del receptor de IL-2 y el TNF-β, difieren en la activación de la JNK y el ATF-2 y son similares en el control de la producción de IL-2.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Raheem, I.T.; Hide, I.; Yanase, Y.; Shigemoto-Mogami, Y.; Sakai, N.; Shirai, Y.; Saito, N.; Hamada, F.M.; El-Mahdy, N.A.; Elisy, A.E.E.; Sokar, S.S. y Nakata, Y. 2005. Protein kinase C-α mediates TNF release process in RBL-2H3 mast cells. *British Journal of Pharmacology* 145: 415-423

Abraham, R.T. y Weiss, A. 2004. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nature Reviews of Immunology* 4: 301-308

Aggarwal, S.; Lee, S.; Mathur, A.; Gollapudi, S. y Gupta, S. 1994. 12-Deoxyphorbol-13-*O*-Phenylacetate 20 Acetate [an agonist of protein kinase Cβ1 (PKCβ1)] induces DNA synthesis, interleukin-2 (IL-2) production, IL-2 receptor α-chain (CD25) and β-chain (CD122) expression, and translocation of PKCβ isozyme in human peripheral blood lymphocytes: evidence for a role of PKCβ1 in human T cell activation. *Journal of Clinical Immunology* 14(4): 248-256

Ahnadi, C.E.; Giguère, P.; Gravel, S.; Gagné, D.; Goulet, A.C.; Fülöp Jr. T.; Payet, M.D. y Dupuis, G. 2000. Chronic PMA treatment of Jurkat T lymphocytes results in decreased protein tyrosine phosphorylation and inhibition of CD3- but not Ti-dependent antibody-triggered by Ca^{2+} signaling. *Journal of Leukocyte Biology* 68: 293-300

Akita, Y. 2002. Protein kinase C-ε (PKC-ε): Its unique structure and function. *The Journal of Biochemistry* 132 (6): 847-852

Altman, A.; Isakov, N. y Baier G. 2000. Protein kinase C θ: a new essential superstar on the T-cell stage. *Immunology Today* 21 (11): 567-573

Altman, A.; Mally, M.I. e Isakov N. 1992. Phorbol ester synergizes with Ca^{2+} ionophore in activation of protein kinase C (PKC)α and PKCβ isoenzymes in human T cells and in induction of related cellular functions. *Immunology* 76: 465-471

Altman, A. y Villalba, M. 2002. Protein kinase C-θ (PKCθ): A key enzyme in T cell life and death. *The Journal of Biochemistry* 132 (6): 841-846

Astoul, E.; Edmunds, C.; Cantrell, D.A. y Ward, S.G. 2001. PI3-K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines and signaling models. *Trends in Immunology* 22 (9): 490-496

Baier, G. 2003. The PKC gene module: molecular biosystematics to resolve its T cell functions. *Immunological Reviews* 192: 64-79

Baier G. 2004. The protein kinase C gene module: cellular functions in T lymphocytes. *En* Dekker, L. V. (ed.) *Protein kinase C*: 147-164. Ed. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York

Bantounas, I.; Phylactou, L.A. y Uney, J.B. 2004. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *Journal of Molecular Endocrinology* 33: 545-557

Barja, P.; Alavi-Nassab, A.; Turck, C.W. y Freire-Moar, J. 1994. Inhibition of T cell activation by protein kinase C pseudosubstrates. *Cellular Immunology* 153: 28-38

Bauer, B.; Krumböck, N.; Ghaffari-Tabrizi, N.; Kampfer, S.; Villunger, A.; Wilda, M.; Hameister, H.; Utermann, G.; Leitges, M.; Überall, F. y Baier, G. 2000. T cell expressed PKCθ demonstrates cell-type selective function. *European Journal of Immunology* 30: 3645-3654

Behrens, M.M.; Martínez, J.L.; Moratilla, C. y Renart, J. 1995. Apoptosis induced by protein kinase C inhibition in a neuroblastoma cell line. *Cell Growth & Differentiation* 6: 1375-1380

Bennet, C.F. y Cowsert, L.M. 1999. Antisense oligonucleotides as a tool for gene functionalization and target validation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1489: 19-30

Black, J.D. 2000. Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Frontiers in Bioscience* 5: 406-423

Blobe, G.C.; Khan, W.A.; Halpern, A.E.; Obeid, L.M. y Hannun, Y.A. 1993. Selective regulation of expression of protein kinase C β isoenzymes occurs via alternative splicing. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (14): 10627-10635

Blobe, G.C.; Stribling, D.S.; Fabbro, D.; Stabel, S. y Hannun, Y.A. 1996. Protein kinase C βII specifically binds to and is activated by F-actin. *The Journal of Biological Chemistry* 271(26): 15823-15830

Bogoyevitch, M.A. 2006. The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting. *BioEssays* 28: 923-934

Bonilla-Henao, V.; Martínez, R.; Sobrino, F. y Pintado, E. 2005. Different signaling pathways inhibit DNA methylation activity and up-regulate IFN-γ in human lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 78: 1339-1346

Borner, C.; Ueffing, M.; Jaken, S.; Parker, P.J. y Weinstein, I.B. 1995. Two closely related isoforms of PKC produce reciprocal effects on the growth of rat fibroblasts. Possible molecular mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (6): 78-86

Borovsky, Z.; Mishan-Eisenberg, G.; Yaniv, E. y Rachmilewitz, J. 2002. Serial triggering of T cell receptors results in incremental accumulation of signaling intermediates. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (24): 21529-21536

Borrego, F.; Pena, J. y Solana, R. 1993. Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases. *European Journal of Immunology* 23 (5): 1039-43

Brantl, S. 2002. Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochimica et Biophysica Acta* 1575: 15-25

Cai, H.; Smola, U.; Wixler, V.; Eisenmann-Tappe, I.; Díaz-Meco, M.T.; Moscat, J.; Rapp, U. y Cooper, G.M. 1997. Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology* 17 (2): 732-741

Cantrell, D.A. 2001. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *Journal of Cell Science* 114 (8): 1439-1445

Cantrell, D.A. 2002. T-cell antigen receptor signal transduction. *Immunology* 105: 369-374

Castgna, M.; Takai, Y.; Kaibuchi, K.; Sano, K.; Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of Biological Chemistry* 257 (13): 7847-7851

Cebrián, M.; Redondo, J.M.; López-Rivas, A.; Rodríguez-Tarduchy, G.; De Landazuri, M.O. y Sánchez-Madrid, F. 1989. Expression and function of AIM, an activation inducer molecule of human lymphocytes, is dependent on the activation of protein kinase C. *European Journal of Immunology* 19 (5): 809-15

Chambers, C.A. y Allison, J.P. 1999. Costimulatory regulation of T cell function. *Current Opinion in Cell Biology* 11: 203-210

Chaplin, D.D. 2006. Overview of the human immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117 (2): S430-S435

Chen, C.Y.; Del Gatto-Konczak, F.; Wu, Z. y Karin, M. 1998. Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH_2-terminal kinase pathway. *Science* 280: 1945-1949

Cole, D.K. y Gao, G.F. 2004. CD8: Adhesión molecule, co-receptor and immuno-modulator. *Cellular & Molecular Immunology* 1 (2): 81-88

Conze, D.; Krahl, T.; Kennedy, N.; Weiss, L.; Lumsden, J.; Hess, P.; Flavell, R.A.; Le Gros, G.; Davis, R.J. y Rincón, M. 2002. c-Jun NH_2-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have distinct roles in $CD8^+$ T cell activation. *The Journal of Experimental Medicine* 195 (7): 811-823

Corbalán-García, S. y Gómez-Fernández, J.C. 2006. Protein kinase C regulatory domains: The art of decoding many different signals in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1761: 633-654

Corbit, K.C.; Trakul, N.; Eves, E.M.; Diaz, B.; Marshall, M. y Rosner, M.R. 2003. Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (15): 13061-13068

Crabtree, G.R. y Clipstone, N.A. 1994. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annual Review of Biochemistry* 63: 1045-1083

Cross, T.G.; Scheel-Toellner, D.; Henriquez, N.; Deacon, E.; Salmon, M. y Lord, J.M. 2000. Serine/treonine protein kinases and apoptosis. *Experimental Cell Research* 256: 34-41

Cummings, R.; Zhao, Y.; Jacoby, D.; Spannhake, E.W.; Ohba, M.; Garcia, J.G.N.; Watkins, T.; He, D.; Saatian, B. y Natarajan, V. 2004. Protein kinase Cδ mediates lysophosphatidic acid-induced NF-κB activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (39): 41085-41094

Davis, R.J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239-252

Dekker, L.V.; Palmer, R.H. y Parker, P.J. 1995. The protein kinase C related gene families. *Current Opinion in Structural Biology* 5: 396-402

Dong, C.; Davis, R.J. y Flavell, R.A. 2002. MAP kinases in the immune response. *Annual Review of Immunology* 20: 55-72

Dong, C.; Yang, D.D.; Wysk, M.; Whitmarsh, A.J.; Davis, R.J. y Flavell, R.A. 1998. Defective T cell differentiation in the absence of *Jnk1*. *Science* 282: 2092-2095

Dreikhausen, U.E.; Gorf, K.; Resch, K. y Szamel, M. 2003. Protein kinase Cβ1, a major regulator of TCR-CD28-activated signal transduction leading to IL-2 gene transcription and secretion. *International Immunology* 15 (9): 1089-1098

Dumont, F.J.; Staruch, M.J.; Fischer, P.; DaSilva, C. y Camacho, R. 1998. Inhibition of T cell activation by pharmcologic disruption of the MEK1/ERK MAP kinase or calcineurin signaling pathways results in differential modulation of cytokine production. *The Journal of Immunology* 160: 2579-2589

Favero, J. y Lafont, V. 1998. Effector pathways regulating T cell activation. *Biochemical Pharmacology* 56: 1539-1547

Foey, A.D. y Brennan, F.M. 2004. Convencional protein kinase C and atypical protein kinase Cζ differentially regulate macrophage production of tumour necrosis factor-α and interleukin-10. *Immunology* 112: 44-53

Formisano, P.; Oriente, F.; Fiory, F.; Caruso, M.; Miele, C.; Maitan, M.A.; Andreozzi, F.; Vigliotta, G.; Condorelli, G. y Beguinot, F. 2000. Insulin-activated protein kinase Cβ bypasses Ras and stimulates mitogen-activated protein kinase activity and cell proliferation in muscle cells. *Molecular and Cellular Biology*. 20 (17): 6323-6333

Freire-Moar, J.; Cherwinski, H.; Hwang, F.; Ransom, J. y Webb. 1991. Expression of protein kinase C isoenzymes in thymocyte subpopulations and their differential regulation. *The Journal of Immunology* 147 (2): 405-409

Freire-Moar, J.; Tsutsumi, A. y Barja, P. 1992. Use of an antisense RNA expression system to explore functions of PKC isoenzymes in T-cell activation. *Annals of the New York Academy of Science* 660: 288–290.

Genot, E.M.; Parker, P.J. y Cantrell, D.A. 1995. Analysis of the role of protein kinase C-α, -ε, and -ζ in T cell activation. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (17): 9833-9839

Germain, R.N. 2001. The T cell receptor for antigen: signaling and ligand discrimination. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (38): 35223-35226

Ghaffari-Tabrizi, N.; Bauer, B.; Villunger, A.; Baier-Bitterlich, G.; Altman, A.; Utermann, G.; Überall, F. y Baier, G. 1999. Protein kinase Cθ, a selective upstream regulator of JNK/SAPK and IL-2 promoter activation in Jurkat T cells. *European Journal of Immunology* 29: 132-142

Goode, N.T. y Smart, N. 2004. Down-regulation of protein kinase C. *En* Dekker, L. V. (ed.) *Protein kinase C*: 76-86. Ed. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York

Groger, R.K.; Morrow, D.M. y Tykocinski, M.L. 1989. Directional antisense and sense cDNA cloning using Epstein-Barr virus episomal expression vectors. *Gene* 81: 285-294

Gruber, T.; Thuille, N.; Hermann-Kleiter, N.; Leitges, M. y Baier, G. 2005. Protein kinase Cε is dispensable for TCR/CD3-signaling. *Molecular Immunology* 42: 305-310

Gutcher, I.; Webb, P.R. y Anderson, N.G. 2003. The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 1061-1070

Hassan, J.; Rainsford, E. y Reen, D.J. 1997. Linkage of protein kinase C-β activation and intracellular interleukin-2 accumulation in human nive CD4 T cells. *Immunology* 92: 465-471

Herblot, S.; Chastagner, P.; Samady, L.; Moreau, J.L.; Demaison, C.; Froussard, P.; Liu, X.; Bonnet, J. y Thèze, J. 1999. IL-2-dependent expression of genes involved in cytoskeleton organization, oncogene regulation, and transcriptional control. *The Journal of Immunology* 162: 3280-3288

Hess, J.; Angel, P. y Schorpp-Kistner, M. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science* 117: 5965-5973

Hildebrant, M. 1997. Antisense applications in Dictyostelium: a lower eukaryotic model system. *En* Lichtenstein, C. y Nellen, W. (ed.) *Antisense Technology. A practical approach*: 173-190. Ed. Oxford University Press, New York

Hirai, T. y Chida, K. 2003. Protein kinase Cζ (PKCζ): Activation mechanisms and cellular functions. *The Journal of Biochemistry* 133 (1): 1-7

Hoffmeyer, A.; Grosse-Wilde, A.; Flory, E.; Neufeld, B.; Kunz, M.; Rapp, U.R. y Ludwig, S. 1999. Different mitogen-activated protein kinase signaling pathways cooperate to regulate tumor necrosis factor α gene expression in T lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (7): 4319-4327

Hu, H. 1996. Recent discovery and development of selective protein kinase C inhibitors. Drug Discovery Today 1 (10): 438-447

Huang, Y. y Wange, R.L. 2004. T cell receptor signaling: beyond complex complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (28): 28827-28830

Hug, H. y Sarre, T.F. 1993. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *The Biochemical Journal* 291: 329-343

Hughes-Fulford, M.; Sugano, E.; Schopper, T.; Li, C.F.; Boonyaratanakornkit, J.B. y Cogoli, A. 2005. Early immune response and regulation of IL-2 receptor subunits. *Cellular Signalling* 17: 1111-1124

Ioannides, C.G.; Freedman, R.S.; Liskamp, R.M.; Ward, N.E. y O'Brian C.A. 1990. Inhibition of IL-2 receptor induction and IL-2 production in the human leukemic cell line Jurkat by a novel peptide inhibitor of protein kinase C. *Cellular Immunology* 131: 242-252

Isakov, N. y Altman, A. 2002. Protein kinase Cθ in T cell activation. *Annual Review of Immunology* 20: 761-794

Jaken, S. 1997. Protein kinase C intracellular binding proteins. *En* Parker, P.J. y Dekker, L. V. (eds.) *Protein kinase C*: 179-188. Ed. Springer-Verlag, Heilderberg

Jaken, S. 2004. Protein kinase C regulation by protein interactions. *En* Dekker, L. V. (ed.) *Protein kinase C*: 49-62. Ed. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York

Jiang, X.H.; Tu, S.P.; Cui, J.T.; Lin, M.C.M.; Xia, H.H.X.; Wong, W.M.; Chan, A.O.O.; Yuen, M.F.; Jiang, S.H.; Lam, S.K.; Kung, H.F.; Soh, J.W.; Weinstein, I.B. y Wong, B.C.Y. 2004. Antisense targeting protein kinase C α and β1 inhibits gastric carcinogenesis. *Cancer Research* 64: 5787-5794

Johnson, G.L. y Lapadat, R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinase. *Science* 298: 1911-1912

Kanashiro, C. y Khalil, R. 1998. Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 25: 974-985

Kang, B.S.; French, O.G.; Sando, J.J. y Hahn, C.S. 2000. Activation-dependent degradation of protein kinase Cη. *Oncogene* 31, 19 (37): 4263-4272

Kashiwagi, M.; Ohba, M.; Chida, K. y Kuroki, T. 2002. Protein kinase Cη (PKCη): Its involvement in keratinocyte differentiation. *The Journal of Biochemistry* 132 (6): 853-857

Kasinrerk, W.; Tokrasinwit, N.; Moonsom, S. y Stockinger, H. 2000. CD99 monoclonal antibody induce homotypic adhesion of Jurkat cells through protein tyrosine kinase and protein kinase C-dependent pathway. *Immunology Letters* 71 (1): 33-41

Katagiri,K.; Hattori, M.; Minato, N.; Irie, S.K.; Takatsu, K. y Kinashi, T. 2000. Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associate antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Molecular and Cellular Biology* 20 (6): 1956-1969

Kawakami, T.; Kawakami, Y. y Kitaura, J. 2002. Protein kinase Cβ (PKCβ): normal functions and diseases. *The Journal of Biochemistry* 132 (5): 677-682

Kawakami, Y.; Kitaura, J.; Yao, L.; McHenry, R.W.; Kawakami, Y.; Newton, A.C.; Kang, S.; Kato, R.M.; Leitges, M.; Rawlings, D.J. y Kawakami, T. 2003. A Ras activation pathway dependent on Syk phosphorylation of protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (16): 9470-9475

Kelleher, D. y Long, A. 1992. Development and characterization of a protein kinase C β-isozyme-deficient T-cell line. *FEBS Letters* 301 (3): 310-314

Kikkawa, U.; Matsuzaki, H. y Yamamoto, T. 2002. Protein kinase Cδ (PKCδ): Activation mechanisms and functions. *The Journal of Biochemistry* 132 (6): 831-839

Kiley, S.C.; Jaken, S.; Whelan, R. y Parker, P.J. 1995. Intracellular targeting of protein kinase C isoenzymes: functional implications. *Biochemical Society Transactions* 23: 601-605

Kiley, S.C. y Parker, P.J. 1995. Differential localization of protein kinase C isozymes in U937 cells: evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation. *Journal of Cell Science* 108: 1003-1016

Kiley, S.C.; Olivier, A.R.; Gordge, P.C.; Ryves, W.J.; Evans, F.J.; Ways, D.K. y Parker, P.J. 1994. 12-Deoxyphorbol-13-*O*-phenylacetate-20-acetate is not protein kinase C-β isozyme-selective *in vivo*. *Carcinogenesis* 15 (2): 319-324

Kindt,T.J.; Goldsby, R.A. y Osborne, B.A. 2007. Kuby Immunology. 6ª edición. W.H. Freeman and Company, New York

Koivunen, J.; Aaltonen, V. y Peltonen J. 2006. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Letters* 235 (1): 1-10

Kolch, W. 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical Journal* 351: 289-305

Kolch, W.; Heidecker, G.; Kochs, G.; Hummel, R.; Vahidi, H.; Mischak, H.; Finkenzeller, G.; Marmé, D. y Rapp, U.R. 1993. Protein kinase Cα activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364: 249-252

Koller, E.; Gaarde, W.A. y Monia, B.P. 2000. Elucidating cell signaling mechanisms using antisense technology. *Trends in Pharmacological Sciences* 21: 142-148

König, R. y Zhou, W. 2004. Signal transduction in T helper cells: CD4 coreceptors exert complex regulatory effects on T cell activation and function. *Current Issues in Molecular Biology* 6: 1-16

Kontny, E.; Ziolkowska, M.; Ryzewska, A. y Maslinski, W. 1999. Protein kinase C-dependent pathway is critical for the production of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β, IL-6). *Cytokine* 11 (11): 839-848

Koon, H.W.; Zhao, D.; Zhan, Y.; Simeonidis, S.; Moyer, M.P. y Pothoulakis, C. 2005. Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonia epithelial cells involves protein kinase Cδ activation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 314 (3): 1393-1400

Koretzky, G.A. y Boerth, N.J. 1999. The role of adapter proteins in T cell activation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56: 1048-1060

Koretzky, G.A.; Wahi, M.; Newton, M.E. y Weiss, A. 1989. Heterogeneity of protein kinase C isoenzyme gene expression in human T cell lines. *The Journal of Immunology* 143 (5): 1692-1695

Kunsch, C. y Rosen, C.A.1993. NF-κB subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Molecular and Cellular Biology* 13 (10): 6137-6146

Lauzurica, P.; Sancho, D.; Torres, M.; Albella, B.; Marazuela, M.; Merino, T.; Bueren, J.A.; Martínez-A., C. y Sánchez-Madrid, F. 2000. Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. *Blood* 95 (7): 2312-2320

Lee, M. y Park, J. 2006. Regulation of NFAT activation: a potencial therapeutic target for immunosuppression. *Molecules and Cells* 22 (1): 1-7

Leitges, M.; Schmedt, C.; Guinamard, R.; Davoust, J.; Schaal, S.; Stabel, S. y Tarakhovsky, A. 1996. Immunodeficiency in protein kinase Cβ-deficient mice. *Science* 273: 788-791

Leszczynski, D. 1996. The role of protein kinase C in regulation of apoptosis: a brief overview of the controversy. *The Cancer Journal* 9 (6): 308-313

Li, Y.Q.; Hii, C.S.T.; Costabile, M.; Goh, D.; Der, C.J. y Ferrante, A. 1999a. Regulation of lymphotoxin production by the $p21^{ras}$-raf-MEK-ERK cascade in PHA/PMA-stimulated Jurkat cells. *The Journal of Immunology* 162: 3316-3320

Li, Y.Q.; Hii, C.S.T.; Der, C.J. y Ferrante, A. 1999b. Direct evidence that ERK regulates the production/ secretion of interleukin 2 in PHA/PMA-stimulated T lymphocytes. *Immunology* 96: 524-528

Li, Y.Q.; Kobayashi, M.; Yuan, L.; Wang, J.; Matsushita, K.; Hamada, J.I.; Kimura, K.; Yagita, H.; Okumura, K. y Hosokawa, M. 1998. Protein kinase C mediates the signal for interferon-γ mRNA expression in cytotoxic T cells after their adhesion to laminin. *Immunology* 93: 455-461

Lin, J. y Weiss, A. 2001. T cell receptor signalling. *Journal of Cell Science* 114 (2): 243-244

Lin, X.; O'Mahony, A.; Mu, Y.; Geleziunas, R. y Greene, W.C. 2000. Protein kinase C-θ participates in NF-κB activation induced by CD3-CD28 costimulation through selective activation of IκB kinase β. *Molecular and Cellular Biology* 20 (5): 2933-2940

Liu, J.P. 1996. Protein kinase C and its substrates. *Molecular and Cellular Endocrinology* 116: 1-29

Liu, W.S. y Heckman, C.A. 1998. The sevenfold way of PKC regulation. *Cellular Signalling* 10 (8): 529-542

Livneh, E. y Fishman, D.D. 1997. Linking protein kinase C to cell-cycle control. *European Journal of Biochemistry* 248: 1-9

Long, A.; Kelleher, D.; Lynch, S. y Volkov, Y. 2001. Cutting edge: Protein kinase Cβ expression is critical for export of IL-2 from T cells. *The Journal of Immunology* 167: 636-640

López-Lago, M.A. 1998. Estudio de la función de PKCα y PKCβ en la activación de los linfocitos T. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España

López-Lago, M.A.; Freire-Moar, J. y Barja, P. 1999. Inhibition of protein kinase Cα expression by antisense RNA in transfected Jurkat cells. *European Journal of Immunology* 29: 466-476

Lu, Z.; Liu, D.; Hornia, A.; Devonish, W.; Pagano, M. y Foster, D.A. 1998. Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Molecular and Cellular Biology* 18 (2): 839-845

Lucas, S.; Marais, R.; Graves, J.D.; Alexander, D.; Parker, P. y Cantrell, D.A. 1990. Heterogeneity of protein kinase C expression and regulation in T lymphocytes. *FEBS Letters* 260 (1): 53-56

Macián, F.; López-Rodríguez, C. y Rao, A. 2001. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20: 2476-2489

Manicassamy, S.; Gupta, S. y Sun, Z. 2006. Selective function of PKC-θ in T cells. *Cellular & Molecular Immunology* 3 (4): 263-270

Marinari, B.; Costanzo, A.; Marzano, V.; Piccolella, E. y Tuosto, L. 2004. CD28 deliver a unique signal leading to the selective recruitment of RelA and p52 NF-κB subunits on *IL-8* and *Bcl-xL* gene promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (16): 6098-6103

Martelli, A.M.; Evangelisti, C.; Nyakern, M. y Manzoli, F.A. 2006. Nuclear protein kinase C. *Biochimica et Biophysica Acta* 1761: 542-551

Martelli, A.M.; Sang, N.; Borgatti, P.; Capitani, S. y Neri, L.M. 1999. Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *Journal of Cellular Biochemistry* 74: 499-521

Mellor, H. y Parker, P.J. 1998. The extended protein kinase C superfamily. *The Biochemical Journal* 332: 281-292

Mochly-Rosen, D. y Gordon, A.S. 1998. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *The FASEB Journal* 12: 35-42

Moscat, J. y Díaz-Meco, M.T. 2000. The atypical protein kinase Cs. Functional specifity mediated by specific protein adapters. *EMBO Reports* 1(5): 399-403

Moynagh, P.N. 2005. The NF-κB pathway. *Journal of Cell Science.* 118: 4389-4392

Musashi, M.; Ota, S. y Shiroshita, N. 1999. The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *International Journal of Hematology* 72: 12-19

Mustelin, T. y Taskén, K. 2003. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *The Biochemical Journal* 371: 15-27

Nakashima, S. 2002. Protein Kinase Cα (PKCα): Regulation and biological function. *The Journal of Biochemistry* 132 (5): 669-675

Neelamegham, S.; Munn, L.L. y Zygourakis, K. 1997. A model for the kinetics of homotypic cellular aggregation under static conditions. *Biophysical Journal* 72: 51-64

Nellen, W. y Lichtenstein, C. 1997. Evaluation of antisense effects. *En* Lichtenstein, C. y Nellen, W. (ed.) *Antisense Technology. A practical approach*: 25-38. Ed. Oxford University Press, New York

Newton, A.C. 1997. Regulation of protein kinase C. *Current Opinion in Cell Biology* 9: 161-167

Newton, A.C. 2001. Protein kinase C: Structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chemical Reviews* 101: 2353-2364

Newton, A.C. 2003. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *The Biochemical Journal* 370: 361-371

Newton, A.C. 2004. Regulation of protein kinase C by membrane interactions. *En* Dekker, L. V. (ed.) *Protein kinase C*: 36-48. Ed. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York

Nishikawa, K.; Toker, A.; Johannes, F.J.; Songyang, Z. y Cantley, L.C. 1997. Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (2): 952-960

Nishizuka, Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308: 693-697

Nishizuka, Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *The FASEB Journal* 9: 484-496

Nixon, J.S. 1997. The biology of protein kinase C inhibitors. *En* Parker, P.J. y Dekker, L. V. (eds.) *Protein kinase C*: 205-236. Ed. Springer-Verlag, Heilderberg

Ohno, S. y Nishizuka, Y. 2002. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *The Journal of Biochemistry* 132 (4): 509-511

Papp, H.; Czifra, G.; Bodó, E.; Lázár, J.; Kovács, I.; Aleksza, M.; Juhász, I.; Ács, P.; Sipka, S.; Kovács, L.; Blumberg, P.M. y Bíró, T. 2004. Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 1095-1105

Parekh, D.B.; Ziegler, W. y Parker, P.J. 2000. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *The EMBO Journal* 19 (4): 496-503

Parson, W.; Kirchebner, R.; Mühlmann, R.; Renner, K.; Kofler, A.; Schmidt, S. y Kofler, R. 2005. Cancer cell line identification by short tandem repeat profiling: power and limitations. *The FASEB Journal* 19: 434-436.

Penix, L.; Weaver, W.M.; Pang, Y.; Young, H.A. y Wilson, C.B. 1993. Two essential regulatory elements in the human interferon γ promoter confer activation specific expression in T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 178: 1483-1496

Reimold, A.M.; Kim, J.; Finberg, R. y Glimcher, L.H. 2001. Decreased immediate inflammatory gene induction in activating transcription factor-2 mutant mice. *International Immunology* 13 (2): 241-248

Renier, G.; Olivier, M.; Skamene, E. y Radzioch, D. 1994. Induction of tumor necrosis factor α gene expression by lipoprotein lipase requires protein kinase C activation. *Journal of Lipid Research* 35: 1413-1421

Rincón, M.; Enslen, H.; Raingeaud, J.; Recht, M.; Zapton, T.; Su, M.S.S.; Penix, L.A.; Davis, R.J. y Flavell, R.A. 1998. Interferon-γ expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *The EMBO Journal* 17 (10): 2817-2829

Rincón, M.; Flavell, R.A. y Davis, R.J. 2001. Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes. *Oncogene* 20: 2490-2497

Ron, D. y Kazanietz, M.G. 1999. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *The FASEB Journal* 13: 1658-1676

Roose, J.P.; Mollenauer, M.; Gupta, V.A.; Stone, J. y Weiss, A. 2005. A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Molecular and Cellular Biology* 25 (11): 4426-4441

Rothenberg, E.V. y Ward, S.B. 1996. A dynamic assembly of diverse transcription factors integrates activation and cell-type information for interleukin 2 gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 9358-9365

Rozen, S. y Skaletsky, H.J. 2000. Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. *En* Krawetz, S. (eds). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology:* 365-386. Humana Press, Totowa, NJ

Rykx, A.; De Kimpe, L.; Mikhalap, S.; Vantus, T.; Seufferlein, T.; Vandenheede, J.R. y Van Lint, J. 2003. Protein kinase D: a family affair. *FEBS Letters* 546: 81-86

Sabapathy, B.K.; Kallunki, T.; David, J.P.; Graef, I.; Karin, M. y Wagner, E.F. 2001. c-Jun NH_2-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have similar and stage-dependent roles in regulating T cell apoptosis and proliferation. *The Journal of Experimental Medicine* 193 (3): 317-328

Saijo, K.; Mecklenbräuker, I.; Santana, A.; Leitges, M.; Schmedt, C. y Tarakhovsky, A. 2002. Protein kinase C β controls nuclear factor κB activation in B cells through selective regulation of the IκB kinase α. *The Journal of Experimental Medicine* 195 (12): 1647-1652

Saito, N. y Shirai, Y. 2002. Protein kinase Cγ (PKCγ): function of neuron specific isotype. *The Journal of Biochemistry* 132 (5): 683-687

Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.

Samelson, L.E. 2002. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annual Review in Immunology* 20: 371-394

Sancho, D.; Gómez, M. y Sánchez-Madrid, F. 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *TRENDS in Immunology* 26 (3): 136-140

Sawamura, S.; Ase, K.; Berry, N.; Kikkawa, U.; McCaffrey, P.G.; Minowada, J. y Nishizuka, Y. 1989. Expression of protein kinase C subspecies in human leukemia-lymphoma cell lines. *FEBS Letters* 247 (2): 353-357

Schaeffer, H.J. y Weber, M.J. 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and Cellular Biology* 19(4): 2435-2444

Schönwasser, D.C.; Marais, R.M.; Marshall, C.J. y Parker, P.J. 1998. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Molecular and Cellular Biology* 18 (2): 790-798

Sedwick, C.E. y Altman, A. 2004. Perspectives on PKCθ in T cell activation. *Molecular Immunology* 41: 675-686

Serfling, E.; Avots, A. y Neumann, M. 1995. The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1263: 181-200

Shearman, M.S.; Berry, N.; Oda, T.; Ase, K.; Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. 1988. Isolation of protein kinase C subspecies from a preparation of human T lymphocytes. *The FEBS Letters* 234 (2): 387-391

Shirai, Y. y Saito, N. 2002. Activation mechanisms of protein kinase C: maduration, catalytic activation, and targeting. *The Journal of Biochemistry* 132 (5): 663-668

Sim, A.T.R. y Scott, J.D. 1999. Targeting of PKA, PKC and protein phosphatases to cellular microdomains. *Cell Calcium* 26 (5): 209-217

Soderling, T.R. 1990. Protein kinases. Regulation by autoinhibitory domains. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (4): 1823-1826

Spitaler, M. y Cantrell, D.A. 2004. Protein kinase C and beyond. *Nature Immunology* 5 (8): 785-790

Steinberg, S.F. 2004. Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cδ. *The Biochemical Journal* 384: 449-459

Steube, K.G. y Drexler, H.G. 1995. The protein kinase C activator bryostatin-1 induces the rapid release of TNF-α from Mono-Mac-6 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 214 (3): 1197-1203

Strauss, M. 1997. Antisense molecules and ribozymes: medical applications. *En* Lichtenstein, C. y Nellen, W. (ed.) *Antisense Technology. A practical approach*: 221-239. Ed. Oxford University Press, New York

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

Su, T.T.; Guo, B.; Kawakami, Y.; Sommer, K.; Chae, K.; Humphries, L.A.; Kato, R.M.; Kang, S.; Patrone, L.; Wall, R.; Teitell, M.; Leitges, M.; Kawakami, T. y Rawlings, D.J. 2002. PKC-β controls IκB kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling. *Nature Immunology* 3 (8): 780-786

Suzuki, A.; Akimoto, K. y Ohno, S. 2003. Protein kinase C λ/ι (PKCλ/ι): a PKC isotype essential for the development of multicellular organisms. *The Journal of Biochemistry* 133 (1): 9-16

Szamel, M.; Appel, A.; Schwinzer, R. y Resch, K. 1998. Different protein kinase C isoenzymes regulate IL-2 receptor expression or IL-2 synthesis in human lymphocytes stimulated via the TCR. *The Journal of Immunology* 160: 2207-2214

Szamel, M.; Bartels, F. y Resch, K. 1993. Cyclosporin A inhibits T cell receptor-induced interleukin-2 synthesis of human T lymphocytes by selectively preventing a transmembrane signal transduction pathway leading to sustained activation of a protein kinase C isoenzyme, protein kinase C-β. *European Journal of Immunology* 23: 3072-3081

Szamel, M.; Ebel, U.; Uciechowski, P.; Kaever, V. y Resch, K. 1997. T cell antigen receptor dependent signalling in human lymphocytes: cholera toxin inhibits interleukin-2 receptor expression but not interleukin-2 synthesis by preventing activation of a protein kinase C isotype, PKC-α. *Biochimica et Biophysica Acta* 1356: 237-248

Szamel, M.; Kracht, M.; Krebs, B.; Hübner, U. y Resch, K. 1990. Activation signals in human lymphocytes: Interleukin 2 synthesis and expression of high affinity interleukin 2 receptors require differential signalling for the activation of protein kinase C. *Cellular Immunology* 126: 117-128

Szamel, M.; Leufgen, H.; Kurrle, R. y Resch, K. 1995. Differential signal transduction pathways regulating interleukin-2 synthesis and interleukin-2 receptor expression in stimulated human lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1235: 33-42

Szweykowska-Kulińska Z, Jarmolowski A y Figlerowicz M. 2003. RNA interference and its role in the regulation of eukaryotic gene expression. *Acta Biochimica Polonica* 50 (1): 217-229

Tan, S.L. y Parker, P.J. 2003. Emerging and diverse roles of PKC in immune cell signaling. *The Biochemical Journal* 376 (3): 545-552

Tarantino, N.; Debré, P. y Körner, M. 1994. Differential expression of PKCα and PKCβ isozymes in $CD4^+$, $CD8^+$ and $CD4^+/CD8^+$ double positive human T cells. *FEBS Letters* 338: 339-342

Terajima, J.; Tsutsumi, A.; Freire-Moar, J.; Cherwinski, H. M. y Ransom, J. T. 1992. Evidence for clonal heterogeneity of the expression of six protein kinase C isoforms in murine B and T lymphocytes. *Cellular Immunology* 142: 197-206

Thuille, N.; Gruber, T.; Böck, G.; Leitges, M. y Baier, G. 2004. Protein kinase C beta is dispensable for TCR-signaling. *Molecular Immunology* 41: 385-390

Toker, A. 1998. Signaling through protein kinase C. *Frontiers in Bioscience* 3: 1134-1147

Toker, A. 2004. Regulation of protein kinase C by phosphorylation. *En* Dekker, L. V. (ed.) *Protein kinase C*: 63-75. Ed. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York

Trushin, S.A.; Pennington, K.N.; Carmona, E.M.; Asin, S.; Savoy, D.N.; Billadeau, D.D. y Paya, C.V. 2003. Protein kinase Cα (PKCα) acts upstream of PKCθ to activate IκB kinase and NF-κB in T lymphocytes. *Molecular and Cellular Biology* 23 (19): 7068-7081

Tseng, S.Y. y Dustin, M.L. 2002. T-cell activation: a multidimensional signaling network. *Current Opinion in Cell Biology* 14: 575-580

Tsutsumi, A.; Kubo, M.; Fujii, H.; Freire-Moar, J.; Turck, C.W. y Ransom, J.T. 1993. Regulation of protein kinase C isoform proteins in phorbol ester-stimulated Jurkat T lymphoma cells. *The Journal of Immunology* 150: 1746-1754

Ullman, K.S.; Northrop, J.P.; Verweij, C.L. y Crabtree, G.R. 1990. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: The missing link. *Annual Review in Immunology* 8: 421-452

Veillette, A.; Latour, S. y Davidson, D. 2002. Negative regulation of immunoreceptor signaling. *Annual Review in Immunology* 20: 669-707

Volkov, Y.; Long, A. y Kelleher, D. 1998. Inside the crawling T cell: leukocyte function-associated antigen-1 cross-linking is associated with microtubule-directed translocation of protein kinase C isoenzymes β(I) and δ. *The Journal of Immunology* 161: 6487-6495

Volkov, Y.; Long, A.; McGrath, S.; Ni Eidhin, D. y Kelleher, D. 2001. Crucial importance of PKC-β(I) in LFA-1-mediated locomotion of activated T cells. *Nature Immunology* 2 (6): 508-514

Wang, Q.J.; Lu, G.; Schlapkohi, W.A.; Goerke, A.; Larsson, C.; Mischak, H.; Blumberg, P.M. y Mushinski, J.F. 2004. The V5 domain of protein kinase C plays a critical role in determining the isoform-specific localization, translocation, and biological function of protein kinase C-δ and -ε. *Molecular Cancer Research* 2: 129-140

Way, K.J.; Chou, E. y King, G.L. 2000. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends in Pharmacological Sciences* 21: 181-187

Wechsler, A.S.; Gordon, M.C.; Dendorfer, U. y LeClair, K.P. 1994. Induction of IL-8 expression in T cells uses the CD28 costimulatory pathway. *The Journal of Immunology* 153: 2515-2523

Weil, R. e Israël, A. 2006. Deciphering the pathway from the TCR to NFκB. *Cell Death and Differentiation* 13: 826-833

Werlen, G.; Jacinto, E.; Xia, Y. y Karin, M. 1998. Calcineurin preferentially synergizes with PKC-θ to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *The EMBO Journal* 17 (11): 3101-3111

Whitesell, L.; Rosolen, A. y Neckers, L.M. 1991. Episome-generated N-myc antisense RNA restricts the differentiation potential of primitive neuroectodermal cell lines. *Molecular and Cellular Biology* 11 (3): 1360-1371

Wilkinson, S. y Nixon, J.S. 1998. T-cell signal transduction and the role of protein kinase C. *Cellular and Molecular Life Sciences* 54: 1122-1144

Yamamoto, M.; Acevedo-Duncan, M.; Chalfant, C.E.; Patel, N.A.; Watson, J.E. y Cooper, D.R. 1998. The roles of protein kinase C βI and βII in vascular smooth muscle cell proliferation. *Experimental Cell Research* 240: 349-358

Yang D.D.; Conze, D.; Whitmarsh, A.J.; Barrett, T.; Davis, R.J.; Rincón, M. y Flavell, A. 1998. Differentiation of $CD4^+$ T cells to Th1 requires MAP kinase JNK2. *Immunity* 9: 575-585

Young, S.W.; Dickens, M. y Tavaré, J.M. 1996. Activation of mitogen-activated protein kinase by protein kinase C isotypes α, βI and γ, but not ε. *FEBS Letters* 384: 181-184

Zarubin, T. y Han, J. 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research* 15 (1): 11-18

Zhang, H.C.; Derian, C.K.; McComsey, D.F.; White, K.B.; Ye, H; Hecker, L.R.; Li, J.; Addo, M.F.; Croll, D.; Eckardt, A.J.; Smith C.E.; Li, Q.; Cheung, W.M.; Conway, B.R.; Emanuel, S.; Demarest, K.T.; Andrade-Gordon, P.; Damiano, B.P. y Maryanoff B.E. 2005. Novel indolylindazolylmaleimides as inhibitors of protein kinase C-*β*: synthesis, biological activity, and cardiovascular safety. *Journal of Medicinal Chemistry* 48: 1725-1728

Zhang, Y. y Dong, C. 2005. MAP Kinases in immune responses. *Cellular & Molecular Immunology* 2 (1): 20-27

Zheng, Y.; Liu, H.; Coughling, J.; Li, L. y Stone, J.C. 2005. Phosphorylation of RasGRP3 on threonine 133 provides a mechanistic link between PKC and Ras signaling systems in B cells. *Blood* 105 (9): 3648-3654

Zhu, W.; Downey, J.S.; Gu, J.; Di Padova, F.; Gram, H. y Han, J. 2000. Regulation of TNF expression by multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *The Journal of Immunology* 164: 6349-6358

Ziegler, S.F.; Levin, S.D.; Johnson, L.; Copeland, N.G.; Gilbert, D.J.; Jenkins, N.A.; Baker, E.; Sutherland, G.R.; Feldhaus, A.L. y Ramsdell, F. 1994. The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to the NK complex. *The Journal of Immunology* 152: 1228-1236

IX. APÉNDICE

La PKCα es la isoforma de la proteína quinasa C más similar a PKCβ y, como se ha indicado en apartados anteriores, su participación en la activación linfocitaria ha sido estudiada por nuestro grupo en un trabajo previo, en el que se utilizaron clones de células Jurkat con inhibición específica de PKCα, obtenidos mediante la utilización del RNA antisentido (López-Lago *et al.*, 1999). Para completar el análisis comparativo de las dos isoformas en el proceso de activación de células T, paralelamente al análisis de la activación de las MAP quinasas en clones de células Jurkat deficientes en PKCβ, se realizó el mismo en los clones deficientes en PKCα antes citados. Teniendo en cuenta el interés de estos resultados en relación a los obtenidos en los clones as-PKCβ-pREP3, se incluyen como apéndice de este trabajo (apartado 1), al tratarse de datos inéditos.

En el apartado 2 se incluye, como información adicional, la comparación de las secuencias de mRNA y proteína de las isoformas PKCβ1 y PKCβ2.

1. Efecto de la inhibición de la expresión de PKCα mediante RNA antisentido en la activación de MAP quinasas (ERK, JNK y p38) y el factor de transcripción ATF-2

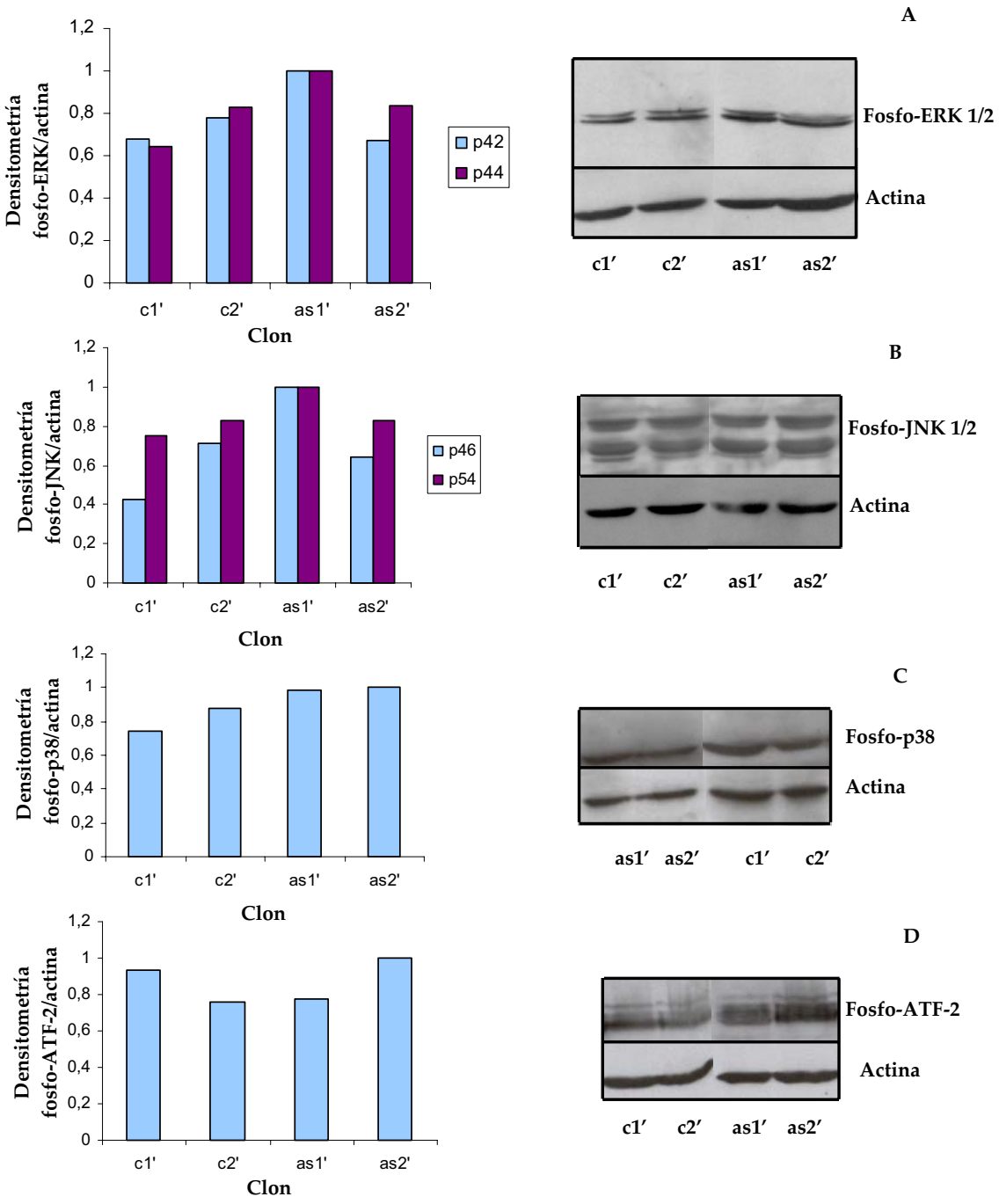
La activación de las proteínas ERK 1 (p44), ERK2 (p42), JNK1 (p46), JNK2 (p54) y p38 se analizó en clones transfectados con el vector as-PKCα-pREP, que mostraban una expresión de PKC-α de alrededor del 15% (as1') y 25% (as2'), en comparación con los clones transfectados con el vector pREP3 vacío (López-Lago et al., 1999), c1' y c2'.

Para analizar en estos clones la activación de las ERK, las células se incubaron en ausencia de suero durante 48 horas a una densidad de 10^6 células/ml. Posteriormente, se diluyeron a 5 x 10^5 células/ml en medio de cultivo con PMA 100 nM, y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C . El estímulo para activar la JNK y la p38 se realizó, en las mismas condiciones con respecto a la densidad celular y la concentración de suero, con PMA 50 nM e ionomicina a 0,5 μg/ml durante 15 minutos a 37 °C.

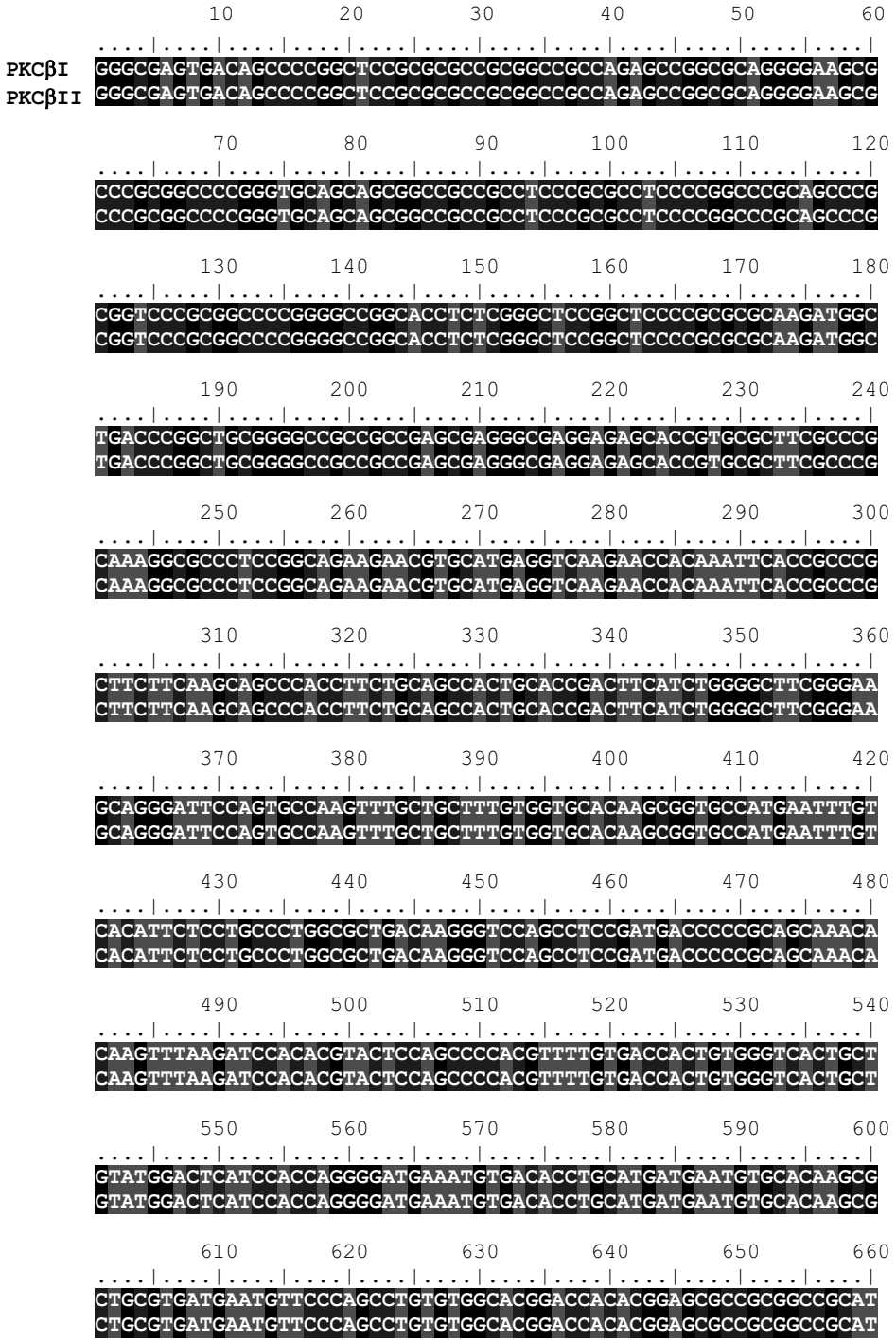
Tras el estímulo, las células se recogieron y se lisaron en tampón de muestra, utilizándose posteriormente en experimentos de *western blot*, realizados según lo descrito en el apartado "Material y Métodos" para los clones deficientes en PKCβ, utilizando los mismos anticuerpos dirigidos contra las formas activas de estas MAP quinasas. En este caso, se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo-HRP (Cell Signaling) a dilución 1:2000.

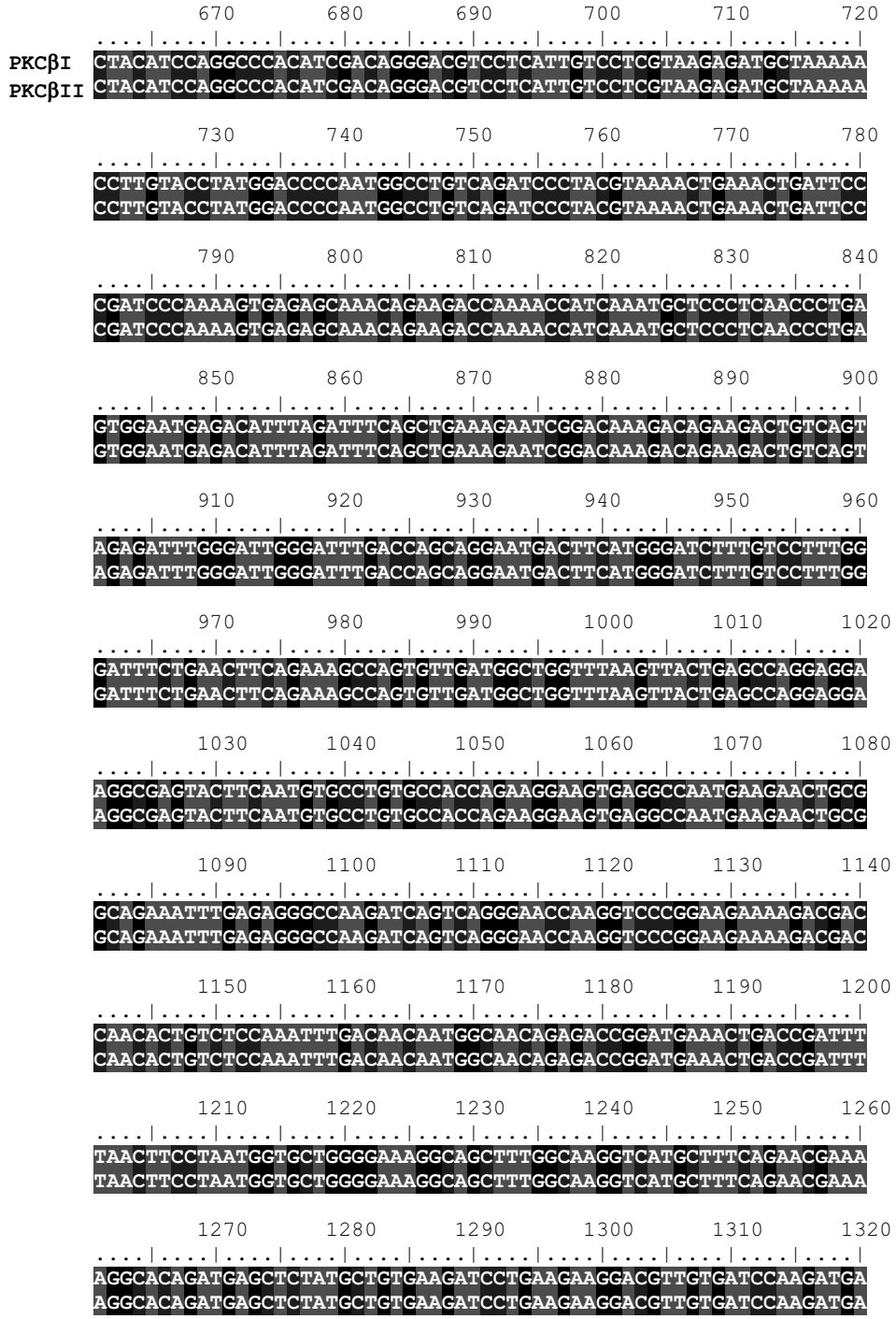
Los resultados obtenidos (imágenes representativas de los experimentos realizados se muestran en la figura IX.1), no mostraron ningún efecto de la inhibición de la expresión de PKC-α sobre el grado de activación de las proteínas ERK 1/2, JNK, p38 o ATF-2.

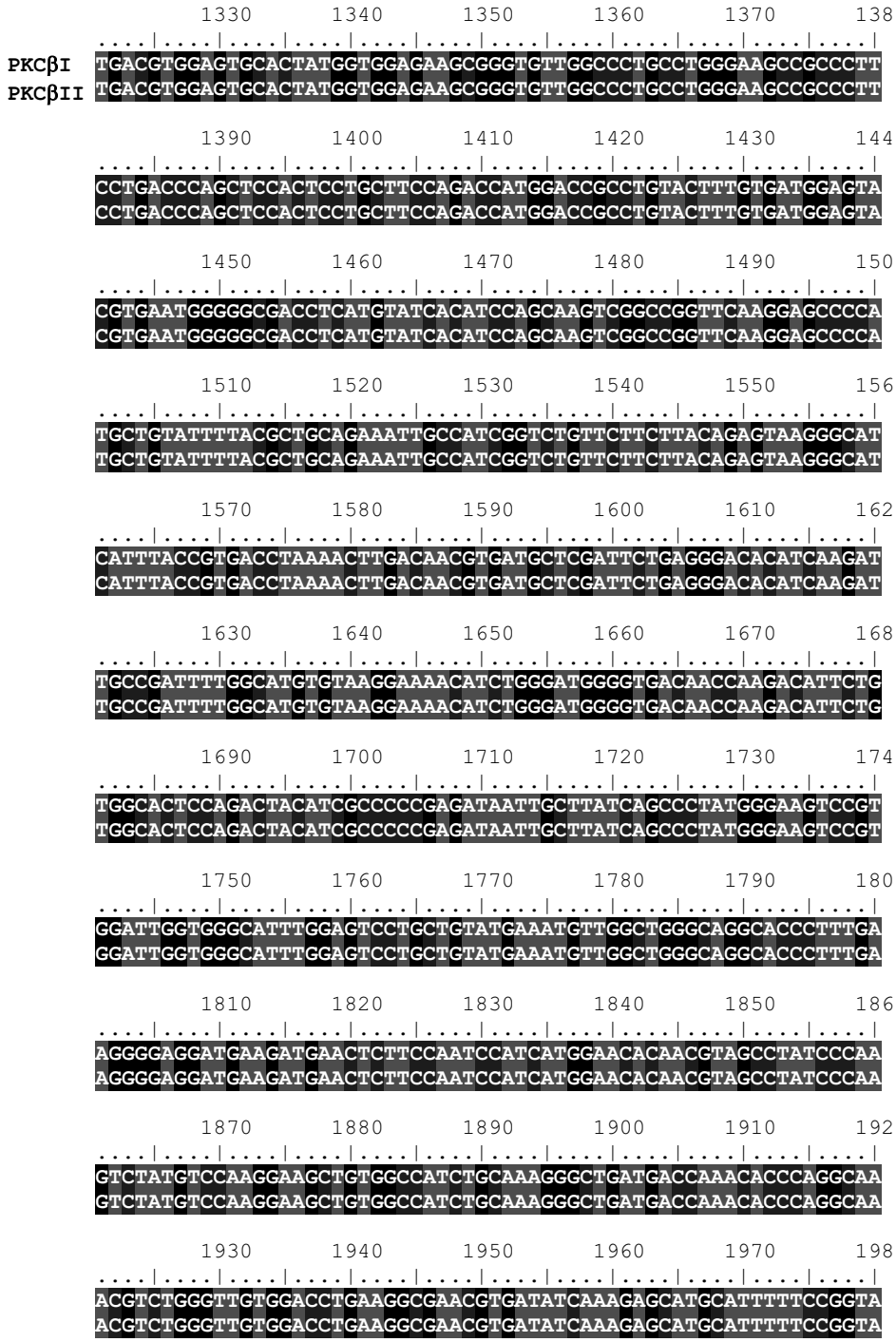
Figura IX-1. Expresión de las formas activas de las MAPK ERK (A), JNK (B), p38 (C) y ATF-2 (D) en células Jurkat con inhibición selectiva de PKCα. El mismo número de células de cada clon se utilizó en experimentos de *western blot* para detectar la forma activa de las diferentes proteínas de la ruta de MAP quinasas, siguiendo el mismo protocolo y empleando los mismos anticuerpos que se indicaron en "Material y métodos" para los clones deficientes en PKCβ. Como control de carga proteica, se detectó la presencia de la actina en las mismas membranas, y se muestra bajo la banda de MAPK correspondiente. El valor densitométrico de las bandas de las MAPK, mostrado al lado del *Western blot*, se expresa en relación a la intensidad de la banda de actina y se normalizó asignando el valor 1 al máximo.

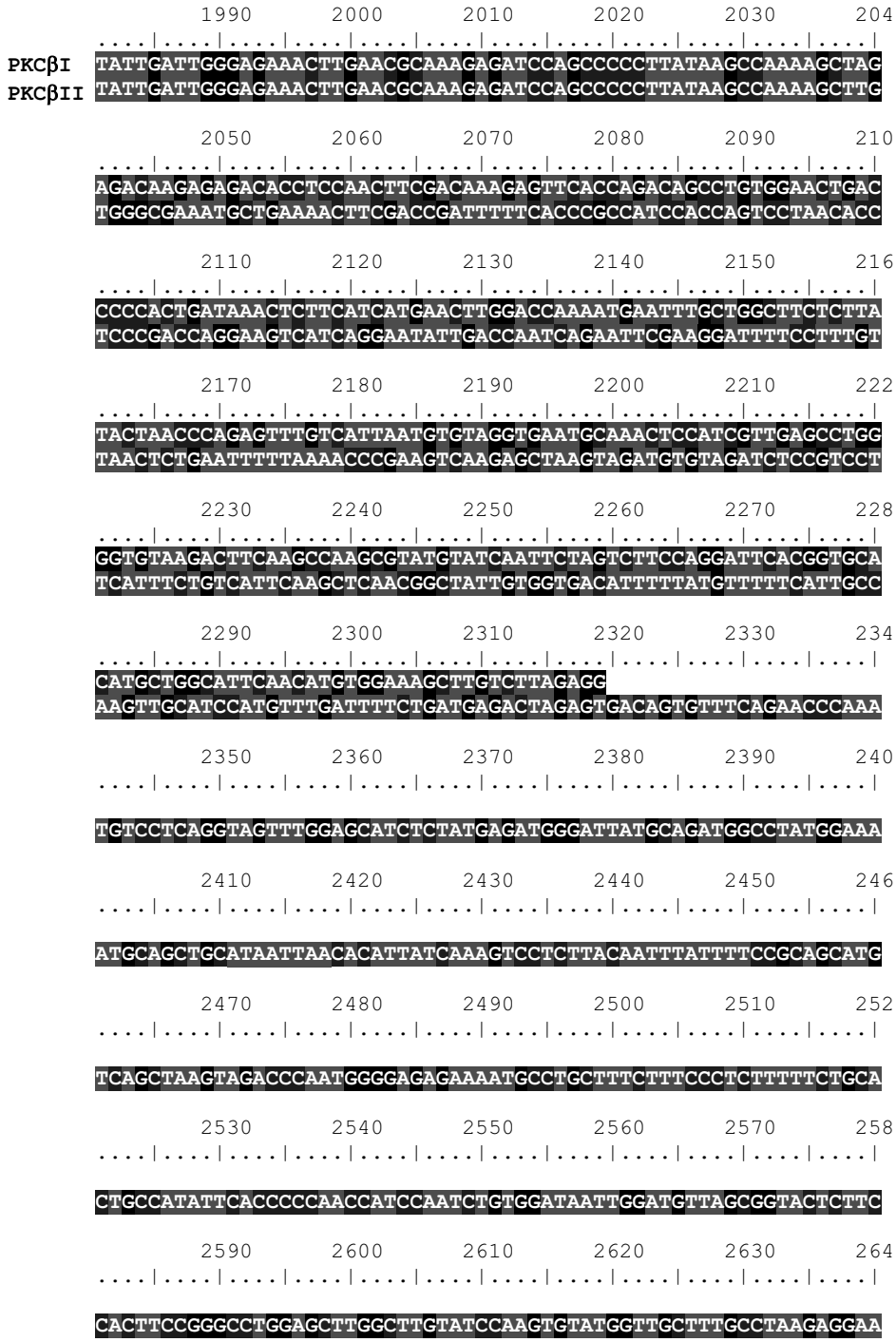

A
Densitometría fosfo-ERK/actina
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
c1'
c2'
as1'
as2'
Clon
p42
p44
Fosfo-ERK 1/2
Actina
c1′
c2′
as1′
as2′
B
Densitometría fosfo-JNK/actina
p46
p54
Fosfo-JNK 1/2
Actina
C
Densitometría fosfo-p38/actina
Fosfo-p38
Actina
D
Densitometría fosfo-ATF-2/actina
Fosfo-ATF-2
Actina

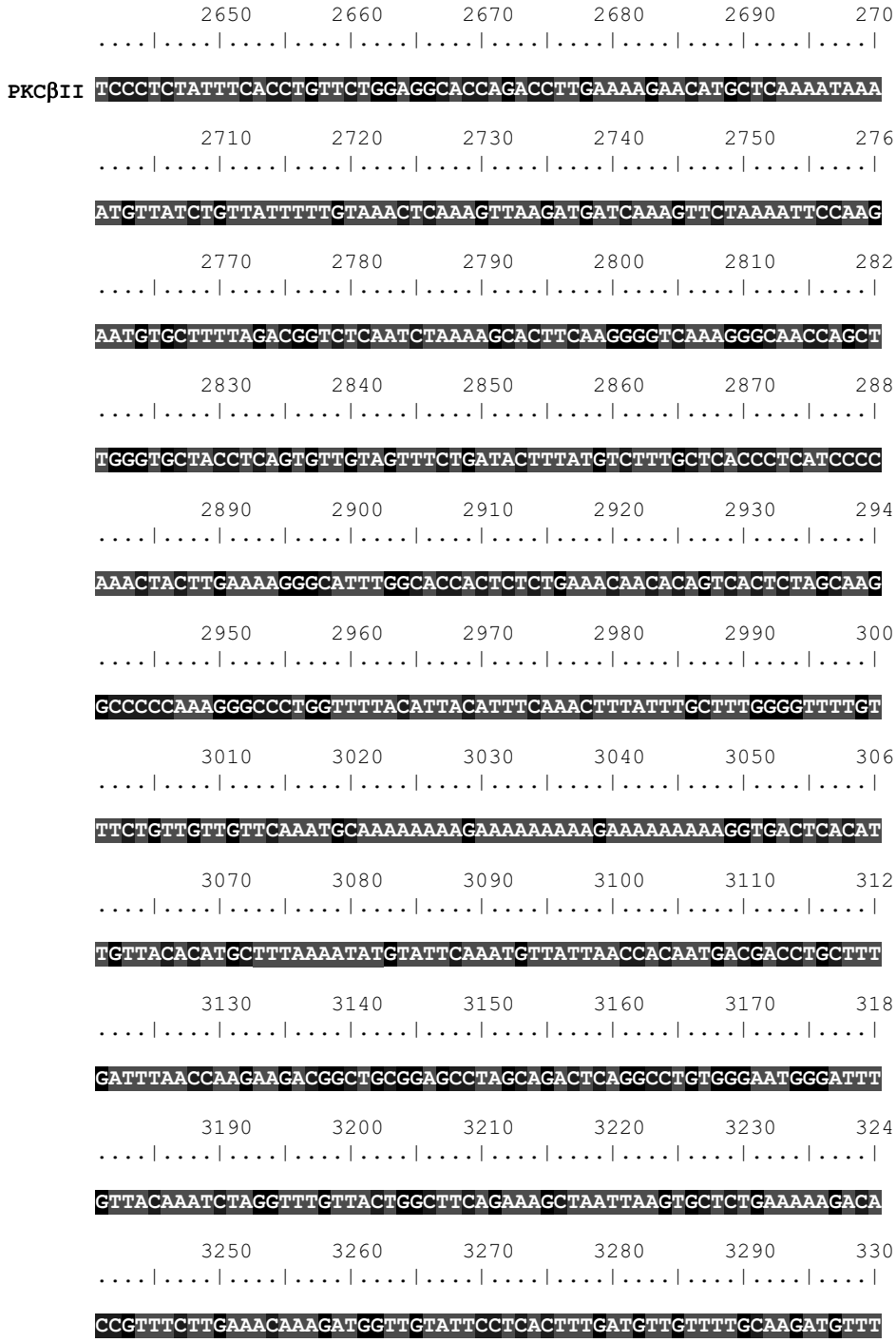
2. Secuencias del cDNA de PKCβI y PKCβII

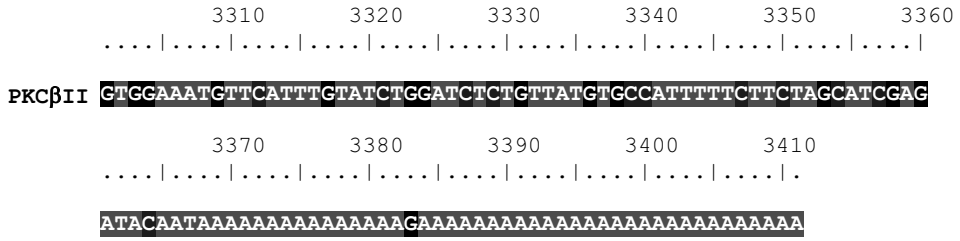



670 680 690 700 710 720
PKCβI CTACATCCAGGCCCACATCGACAGGGACGTCCTCATTGTCCTCGTAAGAGATGCTAAAAA
PKCβII CTACATCCAGGCCCACATCGACAGGGACGTCCTCATTGTCCTCGTAAGAGATGCTAAAAA
730 740 750 760 770 780
CCTTGTACCTATGGACCCCAATGGCCTGTCAGATCCCTACGTAAAACTGAAACTGATTCC
CCTTGTACCTATGGACCCCAATGGCCTGTCAGATCCCTACGTAAAACTGAAACTGATTCC
790 800 810 820 830 840
CGATCCCAAAAGTGAGAGCAAACAGAAGACCAAAACCATCAAATGCTCCCTCAACCCTGA
CGATCCCAAAAGTGAGAGCAAACAGAAGACCAAAACCATCAAATGCTCCCTCAACCCTGA
850 860 870 880 890 900
GTGGAATGAGACATTTAGATTTCAGCTGAAAGAATCGGACAAAGACAGAAGACTGTCAGT
GTGGAATGAGACATTTAGATTTCAGCTGAAAGAATCGGACAAAGACAGAAGACTGTCAGT
910 920 930 940 950 960
AGAGATTTGGGATTGGGATTTGACCAGCAGGAATGACTTCATGGGATCTTTGTCCTTTGG
AGAGATTTGGGATTGGGATTTGACCAGCAGGAATGACTTCATGGGATCTTTGTCCTTTGG
970 980 990 1000 1010 1020
GATTTCTGAACTTCAGAAAGCCAGTGTTGATGGCTGGTTTAAGTTACTGAGCCAGGAGGA
GATTTCTGAACTTCAGAAAGCCAGTGTTGATGGCTGGTTTAAGTTACTGAGCCAGGAGGA
1030 1040 1050 1060 1070 1080
AGGCGAGTACTTCAATGTGCCTGTGCCACCAGAAGGAAGTGAGGCCAATGAAGAACTGCG
AGGCGAGTACTTCAATGTGCCTGTGCCACCAGAAGGAAGTGAGGCCAATGAAGAACTGCG
1090 1100 1110 1120 1130 1140
GCAGAAATTTGAGAGGGCCAAGATCAGTCAGGGAACCAAGGTCCCGGAAGAAAAGACGAC
GCAGAAATTTGAGAGGGCCAAGATCAGTCAGGGAACCAAGGTCCCGGAAGAAAAGACGAC
1150 1160 1170 1180 1190 1200
CAACACTGTCTCCAAATTTGACAACAATGGCAACAGAGACCGGATGAAACTGACCGATTT
CAACACTGTCTCCAAATTTGACAACAATGGCAACAGAGACCGGATGAAACTGACCGATTT
1210 1220 1230 1240 1250 1260
TAACTTCCTAATGGTGCTGGGGAAAGGCAGCTTTGGCAAGGTCATGCTTTCAGAACGAAA
TAACTTCCTAATGGTGCTGGGGAAAGGCAGCTTTGGCAAGGTCATGCTTTCAGAACGAAA
1270 1280 1290 1300 1310 1320
AGGCACAGATGAGCTCTATGCTGTGAAGATCCTGAAGAAGGACGTTGTGATCCAAGATGA
AGGCACAGATGAGCTCTATGCTGTGAAGATCCTGAAGAAGGACGTTGTGATCCAAGATGA

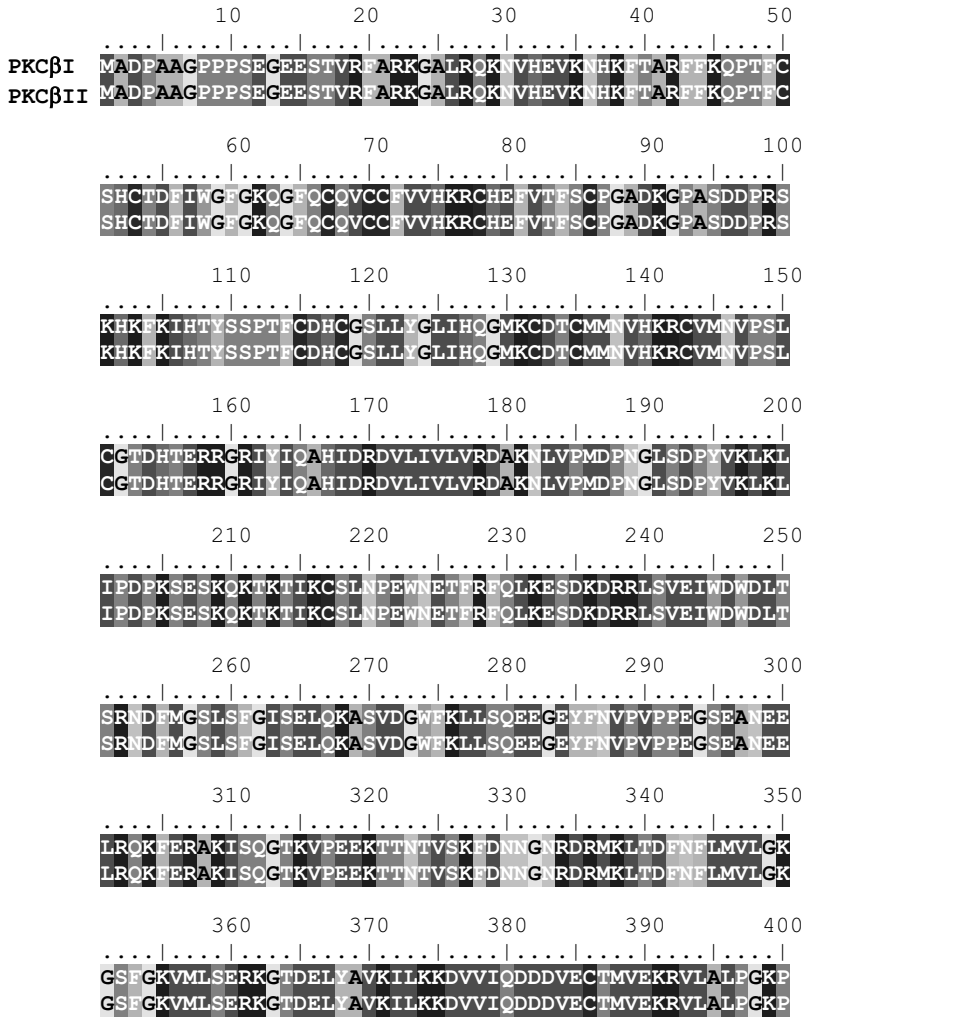

1330 1340 1350 1360 1370 1380
PKCβI TGACGTGGAGTGCACTATGGTGGAGAAGCGGGTGTTGGCCCTGCCTGGGAAGCCGCCCTT
PKCβII TGACGTGGAGTGCACTATGGTGGAGAAGCGGGTGTTGGCCCTGCCTGGGAAGCCGCCCTT
1390 1400 1410 1420 1430 1440
CCTGACCCAGCTCCACTCCTGCTTCCAGACCATGGACCGCCTGTACTTTGTGATGGAGTA
CCTGACCCAGCTCCACTCCTGCTTCCAGACCATGGACCGCCTGTACTTTGTGATGGAGTA
1450 1460 1470 1480 1490 1500
CGTGAATGGGGGCGACCTCATGTATCACATCCAGCAAGTCGGCCGGTTCAAGGAGCCCCA
CGTGAATGGGGGCGACCTCATGTATCACATCCAGCAAGTCGGCCGGTTCAAGGAGCCCCA
1510 1520 1530 1540 1550 1560
TGCTGTATTTTACGCTGCAGAAATTGCCATCGGTCTGTTCTTCTTACAGAGTAAGGGCAT
TGCTGTATTTTACGCTGCAGAAATTGCCATCGGTCTGTTCTTCTTACAGAGTAAGGGCAT
1570 1580 1590 1600 1610 1620
CATTTACCGTGACCTAAAACTTGACAACGTGATGCTCGATTCTGAGGGACACATCAAGAT
CATTTACCGTGACCTAAAACTTGACAACGTGATGCTCGATTCTGAGGGACACATCAAGAT
1630 1640 1650 1660 1670 1680
TGCCGATTTTGGCATGTGTAAGGAAAACATCTGGGATGGGGTGACAACCAAGACATTCTG
TGCCGATTTTGGCATGTGTAAGGAAAACATCTGGGATGGGGTGACAACCAAGACATTCTG
1690 1700 1710 1720 1730 1740
TGGCACTCCAGACTACATCGCCCCCGAGATAATTGCTTATCAGCCCTATGGGAAGTCCGT
TGGCACTCCAGACTACATCGCCCCCGAGATAATTGCTTATCAGCCCTATGGGAAGTCCGT
1750 1760 1770 1780 1790 1800
GGATTGGTGGGCATTTGGAGTCCTGCTGTATGAAATGTTGGCTGGGCAGGCACCCTTTGA
GGATTGGTGGGCATTTGGAGTCCTGCTGTATGAAATGTTGGCTGGGCAGGCACCCTTTGA
1810 1820 1830 1840 1850 1860
AGGGGAGGATGAAGATGAACTCTTCCAATCCATCATGGAACACAACGTAGCCTATCCCAA
AGGGGAGGATGAAGATGAACTCTTCCAATCCATCATGGAACACAACGTAGCCTATCCCAA
1870 1880 1890 1900 1910 1920
GTCTATGTCCAAGGAAGCTGTGGCCATCTGCAAAGGGCTGATGACCAAACACCCAGGCAA
GTCTATGTCCAAGGAAGCTGTGGCCATCTGCAAAGGGCTGATGACCAAACACCCAGGCAA
1930 1940 1950 1960 1970 1980
ACGTCTGGGTTGTGGACCTGAAGGCGAACGTGATATCAAAGAGCATGCATTTTTCCGGTA
ACGTCTGGGTTGTGGACCTGAAGGCGAACGTGATATCAAAGAGCATGCATTTTTCCGGTA

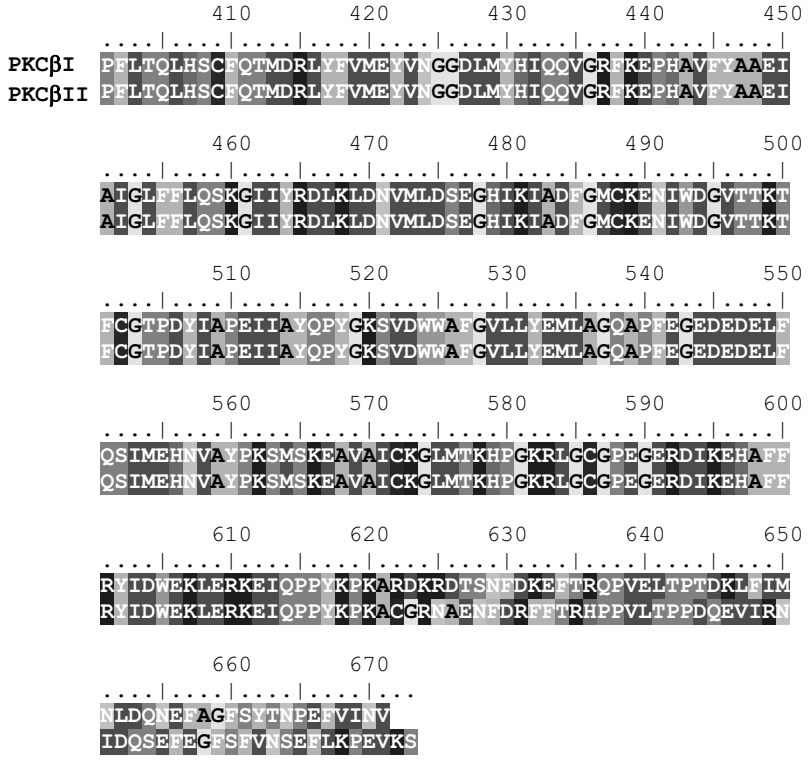

1990 2000 2010 2020 2030 2040
PKCβI TATTGATTGGGAGAAACTTGAACGCAAAGAGATCCAGCCCCCTTATAAGCCAAAAGCTAG
PKCβII TATTGATTGGGAGAAACTTGAACGCAAAGAGATCCAGCCCCCTTATAAGCCAAAAGCTTG
2050 2060 2070 2080 2090 2100
AGACAAGAGAGACACCTCCAACTTCGACAAAGAGTTCACCAGACAGCCTGTGGAACTGAC
TGGGCGAAATGCTGAAAACTTCGACCGATTTTTCACCCGCCATCCACCAGTCCTAACACC
2110 2120 2130 2140 2150 2160
CCCCACTGATAAACTCTTCATCATGAACTTGGACCAAAATGAATTTGCTGGCTTCTCTTA
TCCCGACCAGGAAGTCATCAGGAATATTGACCAATCAGAATTCGAAGGATTTTCCTTTGT
2170 2180 2190 2200 2210 2220
TACTAACCCAGAGTTTGTCATTAATGTGTAGGTGAATGCAAACTCCATCGTTGAGCCTGG
TAACTCTGAATTTTTAAAACCCGAAGTCAAGAGCTAAGTAGATGTGTAGATCTCCGTCCT
2230 2240 2250 2260 2270 2280
GGTGTAAGACTTCAAGCCAAGCGTATGTATCAATTCTAGTCTTCCAGGATTCACGGTGCA
TCATTTCTGTCATTCAAGCTCAACGGCTATTGTGGTGACATTTTTATGTTTTTCATTGCC
2290 2300 2310 2320 2330 2340
CATGCTGGCATTCAACATGTGGAAAGCTTGTCTTAGAGG
AAGTTGCATCCATGTTTGATTTTCTGATGAGACTAGAGTGACAGTGTTTCAGAACCCAAA
2350 2360 2370 2380 2390 2400
TGTCCTCAGGTAGTTTGGAGCATCTCTATGAGATGGGATTATGCAGATGGCCTATGGAAA
2410 2420 2430 2440 2450 2460
ATGCAGCTGCATAATTAACACATTATCAAAGTCCTCTTACAATTTATTTTCCGCAGCATG
2470 2480 2490 2500 2510 2520
TCAGCTAAGTAGACCCAATGGGGAGAGAAAATGCCTGCTTTCTTTCCCTCTTTTTCTGCA
2530 2540 2550 2560 2570 2580
CTGCCATATTCACCCCCAACCATCCAATCTGTGGATAATTGGATGTTAGCGGTACTCTTC
2590 2600 2610 2620 2630 2640
CACTTCCGGGCCTGGAGCTTGGCTTGTATCCAAGTGTATGGTTGCTTTGCCTAAGAGGAA


2650 2660 2670 2680 2690 2700
PKCβII TCCCTCTATTTCACCTGTTCTGGAGGCACCAGACCTTGAAAAGAACATGCTCAAAATAAA
2710 2720 2730 2740 2750 2760
ATGTTATCTGTTATTTTTGTAAACTCAAAGTTAAGATGATCAAAGTTCTAAAATTCCAAG
2770 2780 2790 2800 2810 2820
AATGTGCTTTTAGACGGTCTCAATCTAAAAGCACTTCAAGGGGTCAAAGGGCAACCAGCT
2830 2840 2850 2860 2870 2880
TGGGTGCTACCTCAGTGTTGTAGTTTCTGATACTTTATGTCTTTGCTCACCCTCATCCCC
2890 2900 2910 2920 2930 2940
AAACTACTTGAAAAGGGCATTTGGCACCACTCTCTGAAACAACACAGTCACTCTAGCAAG
2950 2960 2970 2980 2990 3000
GCCCCCAAAGGGCCCTGGTTTTACATTACATTTCAAACTTTATTTGCTTTGGGGTTTTGT
3010 3020 3030 3040 3050 3060
TTCTGTTGTTGTTCAAATGCAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAGGTGACTCACAT
3070 3080 3090 3100 3110 3120
TGTTACACATGCTTTAAAATATGTATTCAAATGTTATTAACCACAATGACGACCTGCTTT
3130 3140 3150 3160 3170 3180
GATTTAACCAAGAAGACGGCTGCGGAGCCTAGCAGACTCAGGCCTGTGGGAATGGGATTT
3190 3200 3210 3220 3230 3240
GTTACAAATCTAGGTTTGTTACTGGCTTCAGAAAGCTAATTAAGTGCTCTGAAAAAGACA
3250 3260 3270 3280 3290 3300
CCGTTTCTTGAAACAAAGATGGTTGTATTCCTCACTTTGATGTTGTTTTGCAAGATGTTT



3. SECUENCIA AMINOACÍDICA DE PKCβI y PKCβII




410 420 430 440 450
PKCβI PFLIQLHSCFQTMDRLYFVMEYVNGGDLMYHIQQVGRFKEPHAVFYAAEI
PKCβII PFLIQLHSCFQTMDRLYFVMEYVNGGDLMYHIQQVGRFKEPHAVFYAAEI
460 470 480 490 500
AIGLFFLQSKGIIYRDLKLDNVMLDSEGHIKIADFGMCKENIWDGVTTKT
AIGLFFLQSKGIIYRDLKLDNVMLDSEGHIKIADFGMCKENIWDGVTTKT
510 520 530 540 550
FCGTPDYIAPEIIAYQPYGKSVDWWAFGVLLYEMLAGQAPFEGEDEDELF
FCGTPDYIAPEIIAYQPYGKSVDWWAFGVLLYEMLAGQAPFEGEDEDELF
560 570 580 590 600
QSIMEHNVAYPKSMSKEAVAICKGLMTKHPGKRLGCGPEGERDIKEHAFF
QSIMEHNVAYPKSMSKEAVAICKGLMTKHPGKRLGCGPEGERDIKEHAFF
610 620 630 640 650
RYIDWEKLERKEIQPPYKPKARDKRDTSNFDKEFTRQPVELTPTDKLFIM
RYIDWEKLERKEIQPPYKPKACGRNAENFDRFFTRHPPVLTPPDQEVIRN
660 670
NLDQNEFAGFSYTNPEFVINV
IDQSEFEGFSFVNSEFLKPEVKS