Nuevas dianas terapéuticas en la transducción de señales por proteincinasas C

Jorge Moscat y María T. Díaz Meco

Laboratorio GlaxoWellcome-CSIC de Biología Molecular y Celular. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM. Universidad Autónoma. Madrid.

Introducción

Los mecanismos de señalización celular acoplan los receptores de factores de crecimiento o citocinas inflamatorias con respuestas celulares como proliferación, quimiotaxis, diferenciación o apoptosis. Estos procesos de señalización constituyen un intrincado sistema de redes bioquímicas que permiten el flujo de la información desde el entorno extracelular hasta el núcleo de la célula. En la actualidad, la identificación de los distintos componentes que participan en estas rutas y de sus alteraciones en situaciones fisiopatológicas son objeto de un intenso estudio en búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. En estas rutas desempeña un papel destacado la génesis de segundos mensajeros lipídicos que conducen a la activación de cascadas de cinasas activables por lípidos. Entre éstas, la familia de las proteincinasas C (PKC) es una de las mejor caracterizadas[1]. Son ya más de 12 los isotipos de PKC que han sido identificados y que se agrupan en tres subfamilias, según sus características estructurales y sus propiedades bioquímicas[1]. La subfamilia de las PKC clásicas (cPKC), cuyo prototipo es αPKC, es sensible a Ca^{2+} y a diacilglicerol (DAG), mensajeros producidos por la activación de fosfolipasa C de fosfoinosítidos[1], mientras que las nuevas (nPKC) son activables por DAG y no responden a Ca^{2+}, pudiendo ser dianas de fosfolipasa C de fosfatidilcolina[2]. La clonación del isotipo ζ[3], que constituye junto a λ y ι la subfamilia atípica[3-5], abrió nuevas perspectivas en el estudio de la señalización celular por estas cinasas.

Características de las PKC atípicas

ζPKC a diferencia de las clásicas, y al igual que las nuevas, no es regulable[3] por Ca^{2+}. Otra característica que distingue a esta nueva isoforma de las otras de su familia es su único *zinc finger* (lugar hipotético de unión a fosfolípidos) que es doble en las clásicas y nuevas, y que en otras PKC parece ser responsable de la activación por diacilglicerol y ésteres de forbol[1]. Es interesante destacar que las PKC atípicas (aPKC) son insensibles a ésteres de forbol y DAG[3-5]. Sin embargo, son activables por importantes segundos mensajeros lipídicos tales como fosfatidilinositol 3,4,5-P_3 (PI 3,4,5-P_3) y ceramida[6-9] que se generan tras la activación celular por citocinas inflamatorias y factores de crecimiento[10-12]. De acuerdo con esto, se ha descrito la implicación de esta subfamilia atípica de PKC en importantes funciones celulares. Así, la microinyección de un péptido inhibidor con la secuencia del seudosustrato de las aPKC, pero no de α o εPKC inhibe completamente la maduración y la activación de NF-κB en oocitos de *Xenopus laevis,* así como la reiniciación de la síntesis de ADN en fibroblastos quiescentes de ratón[13,14]. Además, la depleción de λ/ιPKC con oligonucleótidos antisentido o su inhibición por transfección de mutantes que carecen de actividad cinasa y son dominante negativos inhibe la capacidad proliferativa celular, así como la activación de MAPK[15,16], la actividad de promotores dependientes de elementos κB[14,17-20], la liberación de PGE_2 en respuesta a IL-1β[21], la expresión del gen de α_2 integrina inducida por PDGF[22] y la diferenciación de células PC12 en respuesta a NGF[23]. Así mismo, se ha demostrado recientemente in vivo que λPKC, y muy probablemente también ζPKC, es una etapa clave en la transmisión de la cascada mitogénica activada por PI-3 cinasa[24,25].

Mecanismos de regulación y PKC atípicas

Las PKC atípicas no son sólo regulables por lípidos, sino que también lo son por reguladores proteicos. Así, ζPKC interacciona con Ras in vitro e in vivo[26-28], lo que podría explicar el requerimiento de este oncogén en la activación de las aPKC por PDGF[26] y el hecho de que

ζPKC medie, al menos en parte, las señales mitogénicas de Ras[13,29,30]. Sin embargo, tanto Ras como los mediadores lipídicos descritos como cofactores para las PKC atípicas no son selectivos para éstas. Así, el PIP_3 no sólo activa a ζPKC o λPKC sino que, además, es importante en la activación de otras cinasas como εPKC, δPKC, c-AKT o PRK1[24]. Las ceramidas, no sólo activan a ζPKC sino que también regulan a la CAP cinasa o a la CAP fosfatasa[11].

Por tanto, la identificación y caracterización de moduladores proteicos específicos para cada isotipo de PKC es importante en el establecimiento de estrategias específicas para el bloqueo selectivo de cada isoforma. Es de destacar, en este sentido, la identificación utilizando el sistema de doble híbrido en levadura, de dos nuevos moduladores proteicos que controlan la actividad de las aPKC: LIP y el producto del gen par-4[18,31]. LIP es un activador selectivo de λ/ιPKC a través de su interacción con el dominio "dedo de cinc" de la cinasa[18]. Por otro lado, el producto del gen par-4, que se induce durante la parada del crecimiento celular y la apoptosis[32], también interacciona específicamente con el "dedo de cinc" de ζPKC y λ/ιPKC, lo que conduce a la inhibición de su actividad enzimática. La interacción de las aPKC con Par-4 ha permitido desvelar el papel fundamental de estas cinasas en la supervivencia celular[31].

Uno de los posibles efectores directos de estas PKC en el control de la supervivencia y la proliferación celular es la cascada de MAPK[31,33,34]. Al contrario que Raf-1[35], MAPK parece estar implicada de modo decisivo en los mecanismos de acción de las aPKC en supervivencia. El hecho de que estas PKC regulen la activación de promotores dependientes de AP1 en respuesta a estímulos mitogénicos[24,36] y Ras[29], junto con la evidencia de que ζPKC es un efector clave de Ras[26,28], ya sugería que estas isoformas podrían estar implicadas en la activación de MAPK. En este sentido, se ha demostrado recientemente que la sobreexpresión de un mutante permanentemente activo de ζPKC o λ/ιPKC es suficiente para activar MAPK sin efecto alguno sobre SAPK o p70s6K[16]. Además, mutantes dominantes negativos de PKC atípicas inhiben significativamente la activación de la cascada de MAPK[16]. Es interesante destacar que la activación de MAPK por los isotipos clásicos y nuevos de PKC implica la activación de Raf, mientras que las acciones de aPKC son independientes de Raf pero mediadas por MEK[16,37]. Todas estas evidencias en su conjunto indican que las aPKC constituyen una ruta paralela a Raf para activar MAPK sin afectar la cascada de SAPK[16,27,30,37,38]. Esto puede ser de especial relevancia ya que el balance de la actividad de MAPK frente a SAPK y p38 puede ser crítico en la inducción de apoptosis[39,40]. De hecho, el bloqueo de las aPKC por Par-4 o la irradiación ultravioleta conlleva la inhibición de MAPK y una activación concomitante de p38[33]. Resultados recientes demuestran, además, que la simple inhibición de la actividad basal de MAPK es suficiente para desencadenar la activación de p38 de manera dependiente de caspasas[34]. Este efecto se bloquea en presencia de suero a través de la cascada de PI-3 cinasa-Akt[34]. El hecho de que las aPKC sean activadas por productos de PI-3 cinasa[6,7,25] indica que estas PKC están sujetas a un doble mecanismo de control en respuesta a señales de estrés: la interacción con Par-4 y la inactivación de PI-3 cinasa.

Sin embargo, la regulación de las cascadas de MAPK no es la única vía por la que las PKC controlan la supervivencia celular. Existen sólidas evidencias que implican a las aPKC en la regulación de NF-κB[8,9,13,16,17,19,20,29]. Este importante factor de transcripción es esencial para la inducción de la supervivencia celular y el bloqueo de la apoptosis, por lo que un campo de investigación importante en la actualidad lo constituye el estudio del mecanismo por el que estas PKC controlan NF-κB. Resultados recientes sugieren que la acción de las PKC en esta ruta está mediada por las cinasas responsables de la fosforilación de IκB, las IKK[41].

Un mejor conocimiento y caracterización de los mecanismos que regulan estas cinasas puede suponer un avance significativo para el diseño de posibles nuevas dianas terapéuticas más eficaces y selectivas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nishizuka Y. Intracellular signalling by hidrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 1992; 258: 607-614.
2. Exton JH. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. Biochim Biophys Acta 1994; 1.212: 26-42.
3. Ohno Y, Fuji T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. Protein kinase C ζ subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 3.099-3.103.
4. Selbie LA, Schmitz-Peiffer C, Sheng Y, Biden TJ. Molecular cloning and charcterization of PKCι,

and atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. J Biol Chem 1993; 268: 24.296-24.302.
5. Akimoto K, Mizuno K, Osada S, Hirai S, Tanuma S, Suzuki K et al. A new member of the third class in the protein kinase C family, PKCλ, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. J Biol Chem 1994; 269: 12.677-12.683.
6. Nakanishi H, Exton JH. Purification and characterization of the zeta isoform of protein kinase C from bovine kidney. J Biol Chem 1992; 267: 16.347-16.354.
7. Nakanishi H, Brewer KA, Exton JH. Activation of the ζ isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J Biol Chem 1993; 268: 13-16.
8. Lozano J, Berra E, Municio MM, Díaz-Meco MT, Domínguez I, Sanz L et al. Protein kinase C ζ isoform is critical for κB-dependent promoter activation by sphingomyelinase. J Biol Chem 1994; 269: 19.200-19.202.
9. Müller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K. PKC ζ is a molecular switch in signal transduction of TNFα, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. EMBO J 1995; 14: 1.961-1.969.
10. Hannun YA. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. J Biol Chem 1994; 269: 3.125-3.128.
11. Kolesnick R, Golde DW. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. Cell 1994; 77: 325-328.
12. Liscovitch M, Cantley LC. Lipid second messengers. Cell 1994; 77: 329-334.
13. Domínguez I, Díaz-Meco MT, Municio MM, Berra E, García de Herreros A, Cornet ME et al. Evidence for a role of protein kinase C ζ subspecies in maturation of *Xenopus laevis* oocytes. Mol Cell Biol 1992; 12: 3.776-3.783.
14. Domínguez I, Sanz L, Arenzana-Seisdedos F, Díaz-Meco MT, Virelizier JL, Moscat J. Inhibition of protein kinase ζ subspecies blocks the activation of a NF-κB-like activity in *Xenopus laevis* oocytes. Mol Cell Biol 1993; 13: 1.290-1.295.
15. Berra E, Díaz-Meco MT, Domínguez I, Municio MM, Sanz L, Lozano J et al. Protein kinase C ζ isoform is critical for mitogenic signal transduction. Cell 1993; 74: 555-563.
16. Berra E, Díaz-Meco MT, Lozano J, Frutos S, Municio MM, Sánchez P et al. Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C ζ. EMBO J 1995; 14: 6.157-6.163.
17. Díaz-Meco MT, Berra E, Municio MM, Sanz L, Lozano J, Domínguez I et al. A dominant negative protein kinase C ζ subspecies blocks NF-κB activation. Mol Cell Biol 1993; 13: 4.770-4.775.
18. Díaz-Meco MT, Municio MM, Sánchez P, Lozano J, Moscat J. Lambda-interacting protein, a novel protein that specifically interacts with the zinc finger domain of the atypical protein kinase C isotype λ/ι and stimulates its kinase activity in vitro and in vivo. Mol Cell Biol 1996; 16: 105-114.
19. Folgueira L, McElhinny JA, Bren GD, MacMorran WS, Díaz-Meco MT, Moscat J et al. Protein kinase C-ζ mediates NF-κB activation in human immunodeficiency virus-infected monocytes. J Virol 1996; 70: 223-231.
20. Sontag E, Sontag JM, Garcia A. Protein phosphatase 2A is a critical regulator of protein kinase C ζ signaling targeted by SV40 small t to promote cell growth and NF-κB activation. EMBO J 1997; 16: 5.662-5.671.
21. Rzymkiewicz DM, Tetsuka T, Daphna-Iken D, Srivastava S, Morrison AR. Interleukin-1β activates protein kinase C ζ in renal mesangial cells. J Biol Chem 1996; 271: 17.241-17.246.
22. Xu J, Zutter MM, Santoro SA, Clark R. PDGF-induction of α2 integrin gene expression is mediated by protein kinase C ζ. J Cell Biol 1996; 134: 1.301-1.311.
23. Wooten MW, Zhou G, Seibenhener ML, Coleman ES. A role for ζ protein kinase C in nerve growth factor induced differentiation of PC12 cells. Cell Growth and Diff 1994; 5: 395-403.
24. Akimoto K, Takahashi R, Moriya S, Nishioka N, Takayanagi J, Kimura K et al. EGF or PDGF receptors activate atypical PKCζ through phosphatidylinositol 3-kinase. EMBO J 1996; 15: 788-798.
25. Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. Protein Kinase C-ζ as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. J Biol Chem 1997; 272: 30.075-30.082.
26. Díaz-Meco MT, Lozano J, Municio MM, Berra E, Frutos S, Sanz L et al. Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C ζ. J Biol Chem 1994; 269: 31.706-31.710.
27. Liao D-F, Monia B, Dean N, Berk BC. Protein kinase C-ζ mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 1997; 272: 6.146-6.150.
28. Wooten MW, Seibenhener ML, Matthews LH, Zhou G, Coleman ES. Modulation of ζ-protein kinase C by cyclic AMP in PC12 cells occurs through phosphorylation by protein kinase A. J Neurochem 1996; 67: 1.023-1.031.
29. Bjorkoy G, Overvatn A, Díaz-Meco MT, Moscat J, Johansen T. Evidence for a bifurcation of the mitogenic signaling pathway activated by ras and phosphatidylcholine-hydrolyzing. J Biol Chem 1995; 270: 21.299-21.306.
30. Bjorkoy G, Perander M, Overvatn A, Johansen T. Reversion of Ras- and phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C-mediated transformation of NIH 3T3 cells by a dominant interfering mutant of protein kinase C λ is accompanied by the loss of constitutive nuclear mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. J Biol Chem 1997; 272: 11.557-11.565.

31. Díaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sánchez P, Lozano J, Sanz L et al. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. Cell 1996; 86: 777-786.
32. Sells SF, Wood DP, Joshi-Barve SS, Muthukumar S, Jacob RJ, Crist SA et al. Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cell. Cell Growth & Diff 1994; 5: 457-466.
33. Berra E, Municio MM, Sanz L, Frutos S, Díaz-Meco MT, Moscat J. Positioning the atypical protein kinase C isoforms in the UV-induced apoptotic signaling cascade. Mol Cell Biol 1997; 17: 4.346-4.354.
34. Berra E, Díaz-Meco MT, Moscat J. The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. J Biol Chem 1998; 273: 10.792-10.797.
35. Wang H-G, Rapp UR, Reed JC. BCl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. Cell 1996; 87: 629-638.
36. Huang C, Ma W, Bowden T, Dong Z. Ultraviolet B-induced activated protein-1 activation does not require epidermal growth factor receptor but is blocked by a dominant negative PKCλ/ι. J Biol Chem 1996; 271: 31.262-31.268.
37. Schönwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. Mol Cell Biol 1998; 18: 790-798.
38. Van Dijk MCM, Muriana FJG, Van der Hoeven PCJ, Widt J, Schaap D, Moolenar WH et al. Diacylglycerol generated by exogenous phospholipase C activates the mitogen-activated protein kinase pathway independent of Ras and phorbol ester-sensitive protein kinase C: dependence on protein kinase C-ζ. Biochem J 1997; 323: 693-699.
39. Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. Nature 1996; 380: 75-79.
40. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science 1995; 270: 1.326-1.332.
41. Lallena MJ, Díaz-Meco MT, Moscat J. Critical role of the atypical PKC isoforms in the regulation of IκB kinase β by TNFα. 1999. En prensa.

DISCUSIÓN

A. Zorzano: En relación con el papel propuesto de la ζPKC en proliferación y supervivencia, ¿cómo lo cuadras con los resultados de tu colaboración con Bob Farese de los cuales se evidencia que ζPKC participa en los efectos típicos de una célula diferenciada, como es la respuesta a la insulina estimulando el transporte de glucosa?

J. Moscat: Aunque no participé directamente en estos trabajos de Farese, no es tan sorprendente lo que comentas porque, por ejemplo, está ampliamente aceptado que PI-3 cinasa está implicada en supervivencia celular y, sin embargo, parece ser que también lo está en el control de GLUT-4. Esto es muy interesante, porque se relaciona con la localización geográfica de las cinasas. EGF y PDGF inducen PI-3 cinasa y, sin embargo, no inducen GLUT-4. Pero la diferencia es que al estimular PI-3 cinasa por insulina, se localiza cerca del IRS-1 y cuando se estimula por el factor de crecimiento está en otro lugar. Por esta razón, la proteinasa que hemos clonado en p62 puede ser muy interesante porque está ubicando ζPKC en una región en la que pueda haber un complejo de señalización distinto según cada tipo celular.

A.M. Planas: Vosotros habéis estudiado este control de la supervivencia en diversos tipos celulares. Sin embargo, in vivo existen muchos más tipos celulares diferentes, sobre todo pensando en el cerebro que es el órgano con el cual trabajo. ¿Hasta qué punto pensáis que vuestros hallazgos podrían ser dependientes del tipo celular con el que se está trabajando? Me refiero a que, tal vez, una serie de cinasas podrían estar activadas en un sistema y no en otros.

J. Moscat: Desde mi perspectiva de biólogo molecular y celular sólo puedo decirte que, en nuestro grupo, trabajamos en sistemas modelo que intentamos que reproduzcan al máximo lo que realmente ocurre en situaciones fisiológicas. Por ejemplo, el modelo de PI-3 cinasa en supervivencia se definió en células PC-12, que son realmente unas células de muy mala calidad, pero que los hallazgos derivados de su estudio han sido posteriormente confirmados con experimentos realizados con células reales de hipocampo y de otras regiones cerebrales. Los resultados que he presentado indican que existen muchísimos balances relacionados con las proteínas cinasas C y deben interpretarse de forma que en algunas células el balance puede estar favore-

cido algunas de estas rutas, pero que en otras células tal vez participan rutas que todavía desconocemos. La ventaja de utilizar sistemas modelo es que son sistemas bastante limpios, en los que uno puede diseccionar estas rutas, aunque la significación que esto luego pueda tener en la fisiología o la clínica dependerá de que podamos disponer de inhibidores farmacológicos para administrar al animal y estudiar sus efectos. La otra alternativa es utilizar animales *knock-out*, aunque en este caso se incurre en el riesgo de que se desarrollen mecanismos compensatorios que pueden complicar la interpretación de los resultados.

P. Kaliman: En vuestro sistema ¿la activación de IKK por ζPKC depende de PI-3 cinasa? Y, en segundo lugar, cuando precipita el complejo de IKK, ¿precipita también algún otro tipo de PKC?

J. Moscat: La influencia de PI-3 cinasa la estamos explorando en la actualidad. Creo que en determinados tipos de factores de supervivencia la PI-3 cinasa va a ser necesaria, aunque posiblemente no sea suficiente. Si sobreexpresamos PI-3 cinasa no se aprecia ζPKC más activa, sin embargo, si bloqueamos PI-3 cinasa sí que se inhibe ζPKC. Si realmente es tan importante ζPKC como pensamos para la estimulación de NFκ-B y de NFκ-B cinasa, deberíamos tener una respuesta similar.

P. Kaliman: Esto estaría relacionado con mi comentario anterior sobre la limitación endógena del sistema. Por ejemplo, cuando nosotros sobreexpresamos la p85 salvaje y estimulamos las células para diferenciarlas, no vemos que se diferencien más que las células controles.

J. Moscat: En vuestro experimento añadisteis p85 δ que es dominante negativo, mientras que p85 de tipo salvaje no hace nada, por lo que sugerí añadir p110 permanentemente activo. Nosotros disponemos del mutante p110 permanentemente activo que es perfectamente activo, puesto que estimula RAC y JNK. Fisiológicamente tampoco estamos seguros de lo que significa, pero por lo menos sabemos que está funcionando. En estas condiciones no es suficiente para estimular ζPKC, lo cual no quiere decir que sea una limitación del sistema, sino que ζPKC puede utilizar una actividad basal de PI-3 cinasa aunque no sea estimulable. De esto hay ejemplos, como AKT que se fosforila por PDK-1 y PDK-1 únicamente es capaz de estimular a AKT porque está unido a un PIP 3-4 basal. No hace falta más PIP-3 para estimular PDK-1, aunque sí para estimular AKT. Es decir, hay un papel de la PI-3 cinasa basal que puede ser necesario, aunque su estimulación puede no ser suficiente.

P. Kaliman: Esto también se recoge en un artículo que publicamos hace unos años, donde el tráfico de GLUT-1 basal en mioblastos depende de una actividad basal de PI-3 cinasa. Por más insulina que se añada no vemos más efectos.

J. Moscat: Sobre tu pregunta de si podíamos precipitar otras PKC, estudiamos αPKC y εPKC, esta última no está presente pero la sobreexpresamos. Cuando se sobreexpresa de forma ectópica αPKC con IKK podemos ver una asociación. Sin embargo, cuando se analiza la interacción de las proteínas endógenas no se observa interacción, lo que quiere decir que si forzamos el sistema podemos llegar a ver una interacción que es inespecífica. Precisamente esto es todo lo contrario de lo que pasa con la ζPKC, puesto que tras la expresión ectópica de IKK observábamos que TNFα inducía a la asociación de la endógena, lo que no ocurre si se hace lo mismo para αPKC, ni incluso estimulando con PMA, por lo que pensamos que las otras PKC no están implicadas en la regulación fisiológica de IKK. Además, esto concuerda con que inhibidores más o menos selectivos para αPKC o la βPKC y sin efecto sobre las ζ son incapaces de bloquear el efecto TNFα.

F. Ventura: En tu presentación has comentado que la ζPKC activaba tanto p38 como IKK. ¿Habéis estudiado la implicacion de Met cinasa en estos efectos?

J. Moscat: En realidad es la inhibición de ζPKC la que estimula p38. Cuando se induce PAR-4 se inhibe ζPKC y es esta inhibición la que promueve la estimulación de p38 a través de su sistema de caspasas. Respecto a tu pregunta, hemos realizado varios experimentos y no hemos podido constatar ningún tipo de interacción entre ζPKC y Met cinasa.

A. García de Herreros: ¿Podrías comentar algo más sobre la p62 y su papel de localización de la ζPKC en la membrana? Me refiero, por ejemplo, a si está involucrada en la activación de ζPKC.

J. Moscat: p62 no es capaz de estimular ζPKC porque interacciona por un dominio que nada tiene que ver con el dominio de interacción. En resultados preliminares de laboratorio, hemos observado que p62 permite que SARK fosforile a la ζPKC en una re-

gión que la activa. De confirmarse, esto sería bastante novedoso porque constituiría una evidencia de que las ζPKC son activables por fosforilación en tiroxina. El hecho de que nadie haya objetivado que ζPKC in vitro se fosforile por SARK o por miembros de esta familia, se debe simplemente a la falta de p62. Si no hay p62 que las una e induzca un cambio conformacional, no puede haber fosforilación. Pensamos, por tanto, que realmente va a ser importante la estimulación por tirosincinasas.

R. Trullás: ¿El tratamiento con suero altera de alguna manera la reducción de ERK? Mi segunda pregunta sería si el efecto del suero se revierte completamente con wortmanina.

J. Moscat: He presentado los resultados basales de ERK. El valor de ERK no varía tengan o no tengan suero, porque su valor basal no varía ni en células en quiescencia, detenidas en G_0-G_1, ni en células que estén proliferando activamente. La única diferencia es que en células que están en quiescencia, al añadir suero, se produce un pico que es más o menos sostenido por las respuestas del valor basal. Nosotros hemos observado que en células que proliferan activamente y sin la presencia de suero, a pesar de que el suero no modifique en absoluto ERK, si se bloquea ζPKC por inducción de par-4 se induce apoptosis. Sobre tu segunda pregunta, la wortmanina revierte totalmente el efecto del suero.