

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

UNIDAD DE POST-GRADO

**Estudios sobre la exportación de la proteína quinasa
dependiente de cAMP en células humanas en cultivo.**

TESIS

Para optar el grado académico de Magíster en Bioquímica

AUTORA

Heydy Wendy Uriondo Boudri

Lima – Perú

2007

DEDICATORIA

Mi tesis esta dedicada a la persona más importante de mi vida, mi madre, mi gran consejera y mi gran amiga.

A tí papá, darin, oli por ser tan pacientes, y a mi pequeño sebastian por ser mi recreo a todo hora.

A tí mi vida, mi amor, mi Cristian por ser el aire que respiro.

A mi abuelita mi incondicional compañera y a mis tías por brindarme siempre su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Primero agradecerle infinitamente a Dios por darme muchas oportunidades tanto personales como profesionales, y por llevarme siempre por el camino que él ha trazado para mí.

A mi madre, mi padre, por sus consejos, apoyo y cariño. A mis hermanos por siempre tratar que sea mejor, gracias a ti Darin porque aunque tengamos miles de preocupaciones siempre saldremos adelante juntas, a ti Oli por enseñarnos siempre que hay que ser siempre unidos, a mi querido Sebastian por ser el alma de la casa, por ser mi gran alegría y porque siempre serás mi pequeñito.

A usted Dr. Jorge Allende Rivera, por brindarme la oportunidad de conocer la investigación fuera de mi país por permitirme conocer nuevas técnicas para mi crecimiento profesional, por siempre ser tan sincero conmigo en sus decisiones y por brindarme su apoyo y sus consejos. Por permitirme conocer un nuevo mundo de las proteínas quinasas y poder integrarme como una de sus miembros de laboratorio y por brindarme su apoyo y su total confianza en mi trabajo y ser mi asesor. Gracias, muchas gracias por su gran apoyo y por abrirme las puertas de su laboratorio para cumplir con mis objetivos profesionales y a la vez gracias por acogerme en su laboratorio.

Gracias a usted Dra. Catheryne Conelly y al Dr. Allende por abrirme las puertas de su laboratorio, por conocer un nuevo país que me cautiva con sus montañas, cultura y por permitirme conocer a unos nuevos amigos y grandes profesionales. Gracias a ustedes, melina, mauricio, fernando, moni, monique, leticia, germaine, marcelo, celeste, claudia, a todos gracias por su apoyo y cariño.

Al ahora Dr. Fernando Rodriguez del laboratorio de transducción de señales en Biología Molecular de la Universidad de Chile por ser mi guía, mi profesor y consejero en la realización experimental de la presente Tesis. Gracias por tu paciencia siempre lo diré.

A la Dra. Germaine Jacob Ahumada, por ser más que mi asesora una buena profesional y por siempre darme ánimos para seguir adelante. Gracias por su dedicación para conmigo y mi tesis, agradecerle por su apoyo brindado

a las correcciones y en la escritura gracias siempre serán muy importantes para mi en mi formación profesional.

Gracias a la Mc. Sc. Martha Valdivia Cuya, por cultivar siempre en mi, la investigación. Gracias por ser más que nuestra profesora, nuestra amiga y consejera tanto profesional como personal.

A la Mg. Raquel Oré por apoyarme y brindarme su ayuda en todo este procedimiento arduo de la tesis. A la Dr. Mercedes Soberón, a la Mg. Doris Huertas, al Mg. Fernando Retuerto por acceder a ser mi jurado evaluador. A la Mg. Silvia Suárez, por apoyarme, por sus consejos y por hacerme sentir sólo con su presencia, confianza.

Al Blgo. Cristian Roberto Alvarez Sedó, por su apoyo profesional y por siempre recibir tu ayuda y consejo desde hace más de siete años, así como en la redacción de la presente tesis. Por brindarme las fuerzas necesarias para que yo pueda alcanzar todas las metas que me proponga. Gracias por tu apoyo en los momentos más difíciles. A tí mi vida muchas GRACIAS.

A todos ustedes amigos de ayer, hoy y siempre, Lourdes, Tabata, Pamela, Jesús y Darwin.

A todos los chicos del laboratorio 303, laboratorio de fisiología de la reproducción animal, a ustedes por sus consejos y enseñanzas: Iris, Sergio, Flor, Ronald, Susan, Fanny, Luis, Nadia, Pedro, Ricardo y Claudia.

A los chicos de la residencia universitaria en Santiago de Chile, por compartir conmigo nuestras alegrías y tristezas, por que sin conocernos fuimos como una familia. A ustedes: Alicia, Horacio, Rodrigo, Marcelo, Cristian, Maca, Paul, Boris y a ti Claudia gracias ser una gran amiga, por siempre estar presente cuando necesitaba un consejo, unos brazos para consolarme y seguir con mas fuerzas, por siempre querer que me sintiera como en casa, gracias. Muchas gracias por tu tiempo en la realización estadística de mi Tesis, gracias por siempre tratar de que me sienta bien y a gusto, Gracias amiga.

Gracias a mi alma mater, mi querida universidad por darme la educación y las oportunidades, ya que gracias a las Becas Macrouiversidades

de las Américas y el Caribe fue el que me dió el primer paso para empezar a ver el mundo científico internacional, y así ampliar horizontes profesionales e ir creciendo para ser mejor. Así mismo, agradecer la ayuda económica para la finalización de la tesis al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación tecnológica (CONCYTEC) y el apoyo de la Srta. Erika Saavedra.

Gracias a ustedes, Janet y Jorge los dos pronto Doctores en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile, muchísimas gracias por abrimé las puertas de su casa, por su total confianza, y por sus motivaciones para concluir las correcciones de mi tesis, gracias por siempre hacerme sentir como en casa, muchas gracias amigos. GRACIAS.

Yo creo que se me es imposible dar las gracias porque son miles de situaciones, recuerdos y vivencias las que he pasado desde que inicie mi tesis tanto profesional como personal, desde conocer un nuevo País para mí fue mas que eso fue conocer una nueva vida llena de oportunidades, llena de muchas cosas que te hacen sentir y decir que las cosas no son imposibles si uno las busca, si uno se empeña tanto en tratar de conseguirlas y si unos simplemente las sueña también se hacen realidad.

Gracias, muchas gracias a todos aquellos que en estos momentos están leyendo estas líneas, les diré que conocerán un poco sobre el gran mundo de las proteínas quinasas y todo lo que hay por hacer e investigar es enorme y es muy largo el camino, pero les digo que no imposible, solo debemos comenzar ahora.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Descubrimiento de la proteína quinasa dependiente del AMPc o PKA	15
1.2. Geneología	15
1.3. Características bioquímicas y estructurales de la PKA	16
1.3.1. Subunidad catalítica	20
1.3.2. Subunidad reguladora	27
1.3.3. Holoenzima	29
1.4. Localización subcelular de la PKA	31
1.5. PKA ectoquinasa	33
1.6. Justificación e impacto en la salud	36
1.7. Hipótesis	36
1.8. Objetivo general	36
1.9. Objetivo específico	37
CAPITULO II.MATERIALES Y MÉTODOS	38
2.1 Tipo y Nivel de Investigación	38
2.2. Cobertura del Estudio	38
2.3. Técnicas	38
2.3.1. REACTIVOS	38
2.3.2. MATERIALES	41
2.3.3. EQUIPOS	42
2.3.4. LINEAS CELULARES	42
2.3.5. HERRAMIENTAS INFORMATICAS	43
2.4. Técnicas Experimentales	43
2.4.1. Descongelamiento celular	43
2.4.2. Condiciones del cultivo celular	43
2.4.3. Condiciones para el subcultivo	44
2.4.4. Congelamiento de las líneas celulares	44
2.4.5. Proceso de Transfección	44
2.4.6. Obtención del líquido extracelular	47
2.4.7. Obtención del medio condicionado o medio que contiene la ecto-PKA	47

2.4.8. Obtención del lisado celular	47
2.4.9. Inmunoprecipitación	47
2.4.10. Cuantificación de proteínas	48
2.4.11. Determinación de la actividad enzimática	48
a. Ensayo de actividad de la PKA liberada al medio condicionado (ecto-PKA)	48
b. Ensayo de actividad de la PKA en el lisado celular (endo-PKA) y del líquido extracelular (exo-PKA)	51
2.4.12. Ensayo de viabilidad celular	53
2.4.13. Inhibición de la actividad enzimática por PKI	53
2.4.14. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida y Autoradiografía	54
2.4.15. Western Blots	55
2.4.16. Inmunofluorescencia Indirecta	56
2.4.17. Análisis Estadístico	57
CAPITULO III. RESULTADOS	
3.1. PKA unida a la membrana o PKA ectópica	58
3.2. PKA libre en el líquido extracelular o PKA exógena	65
3.3. PKA del lisado celular o PKA endógena	68
3.4. Inhibición por PKI	72
3.5. Detección de las subunidades por Western Blots	78
3.6. Detección de las subunidades por Inmunofluorescencia	86
CAPITULO IV. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	93
4.1. PKA unida a la membrana o ecto-PKA	93
4.2. PKA libre en el líquido extracelular o exo-PKA	96
4.3. PKA del lisado celular o PKA endógena	97
CAPITULO V. CONCLUSIONES	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXOS	108

INDICE DE FIGURAS

❖ Dendrograma del quinota humano	14
❖ Síntesis del AMPc y actividad de la proteína quinasa dependiente de AMPc	17
❖ Mecanismo de actividad de la PKA	19
❖ Subunidad catalítica de la PKA	21
❖ Estructura de la subunidad catalítica de la PKA y la unión del ATP al sitio activo	22
❖ Las conformaciones abiertas y cerradas de la subunidad catalítica	25
❖ Subunidad de la PKA	28
❖ Estructura del complejo de la PKA	30
❖ Localización de la PKA	32
❖ Esquema del protocolo esquemático de cultivo celular y transfección con lipofectamina	46
❖ Metodología del ensayo de actividad enzimática para la proteína quinasa dependiente del AMPc, para detectar la presencia de PKA exógena, PKA ectópica y PKA endógena.	52
❖ Efecto del análogo de AMPc (8-bromoadenosina 3'-5'-monofosfato) sobre la actividad de PKA ectópica del medio condicionado de células HEK293T	59
❖ Detección del daño en la membrana plasmática de células HEK293T	60
❖ Actividad enzimática de la PKA ectópica en células HEK293T	62
❖ Actividad enzimática de la PKA ectópica en células HELA	64
❖ Actividad enzimática de la PKA exógena en células HEK293T	66
❖ Actividad enzimática de la PKA exógena en células HELA	67
❖ Actividad enzimática de la PKA endógena en células HEK293T	69
❖ Actividad enzimática de la PKA endógena en células HELA	71
❖ Inhibición de la subunidad catalítica de la PKA por PKI	73
❖ Inhibición por PKI de la actividad enzimática de la PKA en el libre en el líquido extracelular de células HEK293T	74
❖ Inhibición por PKI de la actividad enzimática de la PKA en el libre en el líquido extracelular de células HELA	76
❖ Inhibición por PKI de la actividad enzimática de la PKA en el lisado celular de células HEK293T	77

❖ Inhibición por PKI de la actividad enzimática de la PKA en el lisado celular de células HELA	79
❖ Detección de la subunidad catalítica en lisados celulares y libre en el líquido extracelular de células HEK293T	81
❖ Detección de la subunidad catalítica en lisados celulares y unida a la membrana plasmática de células HEK293T	82
❖ Detección de la subunidad reguladora RI en lisados celulares, libre en el medio extracelular y unida a la membrana plasmática de células HEK293T	84
❖ Detección de la subunidad reguladora RI en lisados celulares, libre en el medio extracelular y unida a la membrana plasmática de células HELA	85
❖ Detección control de la subunidad catalítica de PKA en células HEK293T	87
❖ Detección control de la subunidad reguladora RI en células HEK293T	87
❖ Detección de la subunidad catalítica en la membrana plasmática de células HEK293T	88
❖ Detección de la subunidad catalítica en el interior de células HEK293T	89
❖ Detección de la subunidad reguladora RI en células HEK293T	91
❖ Detección de la subunidad catalítica y reguladora RI en células HEK293T	92

INDICE DE ANEXOS

A. ECTO –PKA DE LAS CÉLULAS HEK293T	109
B. ECTO –PKA DE LAS CÉLULAS HELA	110
C. EXO-PKA EN CÉLULAS HEK293T	111
D. EXO-PKA EN CÉLULAS HELA	112
E. ENDO-PKA EN CÉLULAS HEK293T	113
F. ENDO-PKA EN CÉLULAS HELA	114
G. INHIBICIÓN DE LA PKA POR PKI EN EL LIQUIDO EXTRACELULAR DE CÈLULAS HEK293T	115
H. INHIBICIÓN DE LA PKA POR PKI EN EL LIQUIDO EXTRACELULAR DE CELULAS HELA	118
I. INHIBICIÓN DE LA PKA POR PKI EN EL LISADO CELULAR EN CÉLULAS HEK293T	121
J. INHIBICIÓN DE LA PKA POR PKI EN EL LISADO CELULAR EN CÉLULAS HELA	124

ABREVIATURAS

PKA o PKAc	Proteína quinasa dependiente de cAMP.
AMPc	Adenosin 3', 5'-monofosfatocíclico.
PKA I, PKA II	Isoformas I y II de la Proteína quinasa dependiente de AMPc.
C α , C β y C γ	Isoformas de la subunidad catalítica.
CKII	Caseína quinasa II.
AKAP	Proteínas de anclaje a PKA.
PKA-C o "C"	Subunidad catalítica de la PKA
RII α y RII β	Subunidad reguladora de la PKA.
HEK293T	Células humanas embrionarias de riñón 293.
HELA	Células humanas de carcinoma cervical.
PKI	Inhibidor de pseudosustrato sintético específico de PKA.
Anti-HA	Anticuerpo contra el epítoto HA (epítoto de hemaglutinina).
Kemptide	Substrato específico contra las subunidades catalíticas de la PKA.
A	Ampere.
[γ ³² P] ATP	Fósforo 32 con ATP radioactivo.
ATP	Adenosin trifosfato.
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario.
Ci	Curie.
cpm	Cuentas por minuto.
DNA	Ácido desoxiribonucleico.
DTT	Ditrioteitol.
EDTA	Etil diamino tetraacético.
min	Minutos.
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro.
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida Conteniendo dodecil sulfato de sodio
g	Gramo.
AP	Fosfatasa alcalina.
AKAPs	Proteína quinasa A anclada a membrana.
DMEM	Dulbeco's modified Eagle's medium.
PPO	2,5-difeniloxazol
POPOP	1,4-bis [2-(5-feniloxazolyl)]-benceno.

RESUMEN

La holoenzima proteína quinasa A (PKA) es un tetrámero que consiste en dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras, se encuentra en forma ubicua fosforilando un gran número de proteínas celulares y participa en la regulación de vías metabólicas y otros procesos (transporte de membrana, motilidad celular, expresión génica, apoptosis, aprendizaje y memoria).

Las proteínas quinasas no solamente se encuentran en el interior de las células, sino además se observa la "exportación" hacia la superficie de la cara externa de la membrana plasmática de las células (Redegeld, F.A et al., 1999). Este fenómeno de exportación de las proteína quinasas hacia la superficie de la cara externa de las células en cultivo se denomina "ectoquinasas."

El objetivo del presente trabajo es estudiar la exportación de la proteína quinasa dependiente del AMPc sobrepresada en células humanas en cultivo a nivel intracelular o endógeno, a nivel ectópico o en la membrana plasmática, y libre en el líquido extracelular o proteína exógeno.

En la presente Tesis se utilizó dos líneas celulares llamadas HEK293T y HELA, realizándose la técnica de transfección por lipofectamina para introducir en estas células la proteína PKA, específicamente el vector (pcDNA3-HA) con el inserto que contiene el gen de la subunidad catalítica con el epítipo anti-HA.

La exportación de la subunidad catalítica fue detectado utilizando anticuerpos específicos (anti-HA IgG mouse F7, anti-HA IgG mouse FITC y anti-RI mouse IgG). El gen de la subunidad catalítica de la PKA lleva un epítipo específico (hemaglutinina o HA) en su estructura primaria que facilita la identificación exclusiva de la proteína quinasa transfectada cuando esta se dirige al medio extracelular o fuera de la célula. Se estudió los efectos del sustrato Kemptide en la fosforilación de la quinasa y la exportación de la subunidad catalítica de la PKA. La actividad de la quinasa se midió como pmoles de P^{32} incorporados /minuto (pmoles ^{32}P /min) utilizando $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ radioactivo.

En la línea celular HEK293T cuando se le agrega el sustrato y el análogo de AMPc, se observó que en células transfectadas con el vector pcDNA3-HA o vector que contiene al gen de la subunidad catalítica tiene una actividad de PKA exógeno o libre en el líquido extracelular fue de 0.7 pmoles ^{32}P /minuto, la actividad de PKA ectópica fue

de 5.2 pmoles ^{32}P /minuto y la actividad de PKA endógena fue de 29.4 pmoles ^{32}P /minuto.

En el caso de la línea celular HELA, se observó que en células transfectadas con el vector pcDNA3-HA o vector que contiene al gen de la subunidad catalítica tiene una actividad de PKA exógeno o libre una actividad de 0.85 pmoles ^{32}P /minuto, actividad de PKA ectópica fue de 5.2 pmoles ^{32}P /minuto y la actividad de PKA endógena fue de 26.7 pmoles ^{32}P /minuto.

Para resumir los resultados de actividad producto de la transfección, podemos decir que se observó una mayor actividad enzimática de PKA cuando es obtenida de la fracción endógena, seguida de la fracción ectópica y la que presentó una menor actividad es la fracción exógena.

La conclusión del trabajo demuestra que las células transfectadas con el gen de la subunidad catalítica de la PKA, son capaces de dirigir la PKA a la cara externa de la membrana plasmática, y evidenciarla libre fuera de la célula, encontrándola como holoenzima o subunidad catalítica libre, lo cual se confirmó por ensayos de actividad enzimática, western blot y localización por microscopia de inmunofluorescencia.

Palabras Claves: Proteína quinasa dependiente de AMPc, subunidad catalítica, AMPc, Kemptide

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

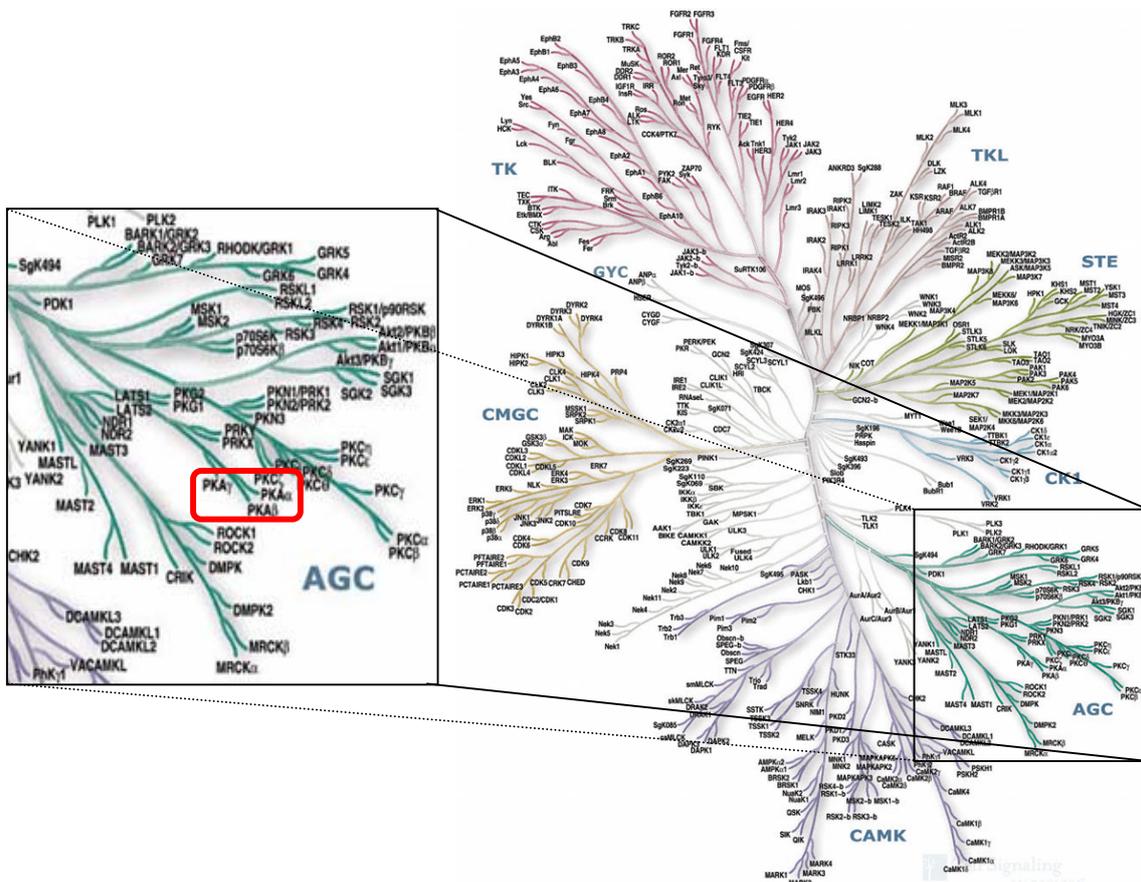
Las proteína quinasas son las enzimas responsables de la fosforilación de proteínas utilizando ATP como dador de grupos fosforilos, aún cuando algunas también pueden usar GTP. Al fosforilar proteínas sustratos, las proteína quinasas transforman señales moleculares en eventos bioquímicos que desencadenan cambios en la actividad, localización celular y diversas funciones de dichos sustratos.

Las proteína quinasas participan en numerosos procesos celulares, siendo el más relevante la transducción de señales (Walsh y col., 1994). Además controlan otros procesos como división o ciclo celular (Matten, I. y Van de Woude, 1994), motilidad celular (Tash y col., 1983) metabolismo (Hubbard, 1993), transporte a través de membrana (Greengard P. y Browning MD., 1988), transcripción (Huggenvik, 1991), expresión génica (Boesler W.; Vanderbark G. y Hanson R., 1988), apoptosis (Gjersten, B.T. y Deskeland, A. 1995), aprendizaje y memoria (Johnson y col., 1998).

Las proteína quinasas representan una de las superfamilias de enzimas más numerosas en las células eucarióticas. La mayoría de las proteína quinasas contienen un dominio catalítico conservado y se agrupan en la superfamilia de las proteína quinasas eucarióticas (ePKs), clasificadas en siete grupos principales (AGC, CAMK, CMGC, CK1, STE, TKL y TK). El resto de las proteína quinasas que no poseen este dominio catalítico conservado se clasifican como proteína quinasas atípicas (aPKs) (Manning y col., 2002).

En el genoma humano se han identificado 518 genes correspondientes a proteína quinasas, constituyendo el denominado quinoma humano (**Figura 1.1**), siendo 478 de ellas ePKs y 40 aPKs, dando cuenta del 1,7% del total de genes humanos (Manning y col., 2002). Dentro del grupo de las ePKs se encuentran 80 genes que son potenciales candidatos para causar una determinada enfermedad (Hunter, 2000).

En la figura 1.1 se observa un árbol filogenético que representa las relaciones entre los miembros de las superfamilias de las proteína quinasas humanas. Entre ellos mostramos a la familia AGC que contiene a las subfamilias de PKA, PKG y PKC. A su vez, la PKA se subdivide en isoformas PKA α , PKA β y PKA γ , mostrado en el recuadro rojo. Una de las familias que se ubica adyacente a la familia AGC es la familia CK1 (conocida como caseína quinasa 1), y al otro lado tenemos a la familia de proteína quinasas dependientes de calcio/ calmodulina (CAMK).



Manning y col. (Science, 298, 1912-1934. 2002)

Figura 1.1 Dendrograma del quinoma humano (mostrado a la derecha) donde encontramos a los siete grandes grupos de ePKs (AGC, CAMK, CMGC, CK1, STE, TKL y TK) diferenciados por colores. A la izquierda se muestra una ampliación del grupo AGC en el cual se encuentra la rama correspondiente a la proteína quinasa PKA (isoformas PKA α , PKA β y PKA γ), observado en el recuadro rojo.

1.1. Descubrimiento de la proteína quinasa dependiente del AMPc o PKA:

La fosforilación y desfosforilación de proteínas es llevada a cabo por proteína quinasas y por proteína fosfatasa, respectivamente. La primera proteína quinasa fue descubierta en 1955 y corresponde a la glicógeno fosforilasa quinasa (Sutherland y col., 1955; Fisher y col., 1955).

En 1968 se encontró la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), enzima que fosforila sustratos proteicos, en residuos de serina y treonina, regulando así su actividad biológica (Krebs, 1986 y Walsh, 1968).

Recibió el nombre de proteína quinasa dependiente de AMPc, debido a que el AMPc se une a la estructura de la enzima provocando su activación, como se analizará en el subtítulo 1.3.

1.2. Genealogía:

Hasta el momento la PKA ha sido detectada en todas las células eucarióticas analizadas. Adelantándonos a la estructura de la PKA, señalemos que está constituida por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras. Las isoformas de la subunidad catalítica, C α y C β , han sido detectadas en bovino, murino, porcino y humano (Uhler y col., 1986; Hadaban y col., 1987); recientemente ha sido identificado en humano la isoforma C γ (Beebe y col., 1990). También las isoformas de la subunidad catalítica fueron detectadas en nemátodos (*Caenorhabditis elegans*), insectos (*Drosophila melanogaster*) y en nudibranchio *Aplysia* (Gross y col., 1990). A su vez, la subunidad reguladora ha sido identificada en mamíferos, así como también en eucariontes menores como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Dictyostelium discoideum*, las cuales contienen dominios conservados cuando son comparados con mamíferos. A diferencia de los demás sistemas estudiados, *Dictyostelium discoideum* presenta una única subunidad reguladora R de 37 KDa que se asocia con una única subunidad catalítica C para formar una holoenzima RC inactiva (Foster y col., 1988; Anjard y col., 1993). En *Aplysia* se han identificado hasta cinco subunidades reguladoras en el tejido nervioso (Eppler y col., 1986).

1.3. Características bioquímicas y estructurales de la PKA:

La transducción de señales extracelulares que culminan con la activación de la PKA comprende una triada formada por un receptor transmembrana, una proteína transductora Gs trimérica ($\alpha \beta \gamma$) y una enzima efectora, la adenilato ciclasa. Cuando el ligando se une al receptor en su dominio extracelular, el complejo hormona-receptor interactúa con la proteína Gs, la cual intercambia el GDP (que tiene unido a la subunidad α s) por GTP y se disocia en la subunidad α s (unida al GTP) y el dímero $\beta\gamma$. La subunidad α s unida al GTP estimula a la adenilato ciclasa, generándose AMPc a partir de ATP (Krupinski y col., 1989). A su vez, el AMPc se une a la PKA activándola y regulando así diversos procesos celulares (**Figura 1.2**).

Existen tres clases de proteína quinasas, que varían según el aminoácido que fosforilan: las serina/treonina proteína quinasas que transfieren el grupo fosforilo del ATP a residuos de serina o treonina de la proteína sustrato, las tirosina proteína quinasas que fosforilan residuos de tirosina y las proteína quinasas de especificidad dual, que pueden fosforilar tanto residuos de serina y treonina como de tirosina.

Dentro del grupo de proteína quinasas que fosforilan residuos de serina o treonina está la proteína quinasa dependiente de AMPc o PKA, la cual, como ya se mencionó, está constituida por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras. La holoenzima difiere en la estructura y tamaño de las subunidades, en la localización subcelular, en los mecanismos de activación y en la especificidad de sustrato.

La PKA reconoce a sustratos que contienen una secuencia consenso que se caracteriza por la presencia de arginina (usualmente dos) hacia el extremo N-terminal del aceptor de fosforilo (serina o treonina) separados por uno o dos residuos (x); también se suele encontrar un residuo hidrofóbico hacia el extremo C-terminal de la serina o treonina. Así, las secuencias consenso de la PKA se pueden representar por R-x-S/T y RR-x-S/T. Para la medición de la actividad fosfotransferasa de las proteína quinasas se utilizan también péptidos que contienen secuencias de consenso; en el caso de la PKA se utiliza el péptido sustrato denominado Kemptide, el cual es un heptapéptido sintético que contiene el sitio de fosforilación por PKA correspondiente a la piruvato quinasa de hígado de porcino, cuya secuencia es LRRASLG (Kemp y col., 1977).

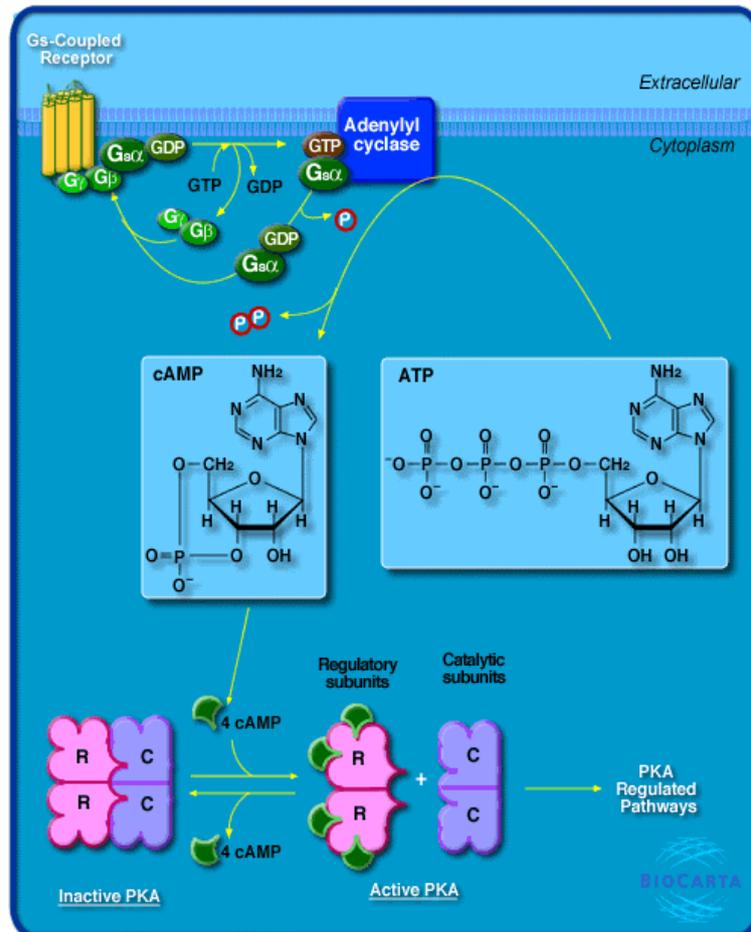


Figura 1.2. Síntesis de AMPc y activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc: Se muestra la triada receptor: proteína transductora Gs: adenilato ciclasa, la formación de AMPc a partir de ATP y la activación de la PKA.

Cuando se reemplaza un aminoácido fosforilable por otro aminoácido no fosforilable, como alanina, resulta un pseudosustrato que se une a la enzima pero no puede ser fosforilado, actuando como un inhibidor competitivo.

La actividad de la PKA requiere del cofactor Mg^{2+} , pero también puede utilizar otros cationes divalentes tales como Mn^{2+} , siendo más efectivo el ATP como dador de grupos fosforilo cuando actúa con Mg^{+2} .

La holoenzima PKA es un tetrámero formado por dos subunidades catalíticas (C) y dos subunidades reguladoras (R), siendo esta holoenzima tetramérica inactiva. La subunidad catalítica (C) posee tres isoformas $C\alpha$, $C\beta$ y $C\gamma$, mientras que en el patrón de elución en columnas de DEAE celulosa se han identificado dos subunidades reguladoras RI ($RI\alpha$ y $RI\beta$) y dos subunidades RII ($RII\alpha$ y $RII\beta$) que difieren en estructura y localización subcelular (Corbin y col., 1978).

Para la mayoría de las PKAs identificadas, la masa molecular de las subunidades catalíticas es de aproximadamente 40 KDa, la de RI 49 KDa y la de RII 55 KDa; la masa molecular estimada para las holoenzimas PKA-I y II es de aproximadamente 180-200 KDa que corresponden a los tetrámeros: RI_2C_2 y RII_2C_2 , respectivamente.

En la **figura 1.3** se muestra que cada subunidad reguladora posee dos sitios de unión para el AMPc, siendo esta unión cooperativa, alterando la afinidad por subunidad catalítica y provocando la disociación de la holoenzima en un dímero de subunidades reguladoras con cuatro moléculas de AMPc unidas, y dos subunidades catalíticas monoméricas activas que fosforilan sustratos proteicos específicos en residuos de serina o treonina (Hanks y col., 1988, Taylor y col., 1990 y Beebe y col., 1986).

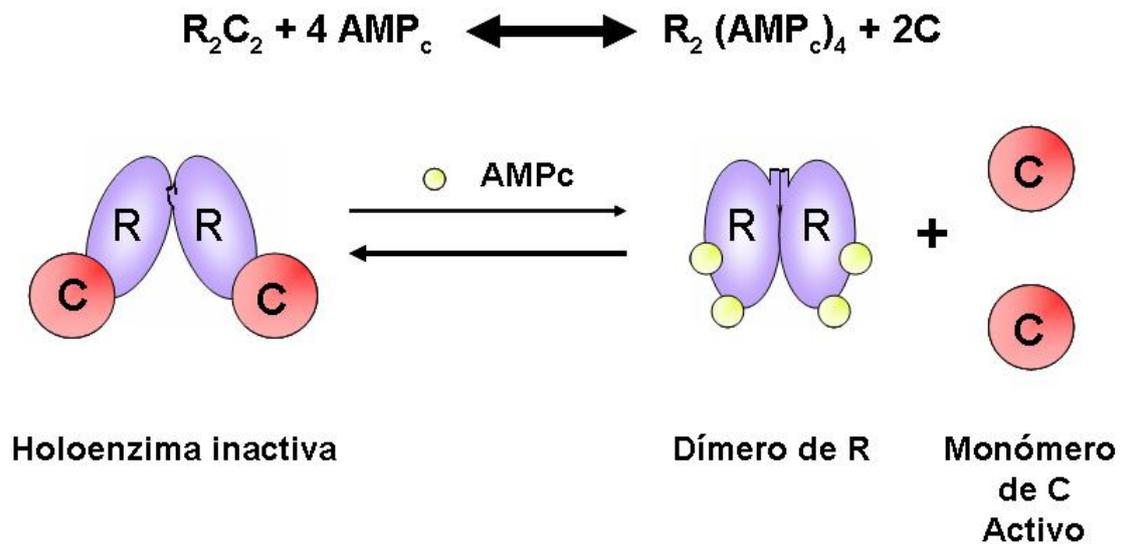


Figura 1.3. Mecanismo de activación de la PKA. Tetrámero inactivo compuesto de dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras, y su disociación por efecto del AMPc.

1.3.1. Subunidad Catalítica:

La estructura cristalográfica de la subunidad catalítica C α de ratón fue una de las primeras estructuras conocidas de una proteína quinasa, a una resolución de 2.0 Å (Knighton y col., 1991 y 1993; Taylor y col., 1992), y sirvió como modelo para otras proteína quinasas, permitiendo profundizar sobre los mecanismos de acción, los roles de los residuos conservados y los aspectos reguladores de los mismos.

La estructura terciaria de la subunidad catalítica consiste en dos estructuras lobulares separadas por una región bisagra que es ocupada por el sustrato. El lóbulo N-terminal es más pequeño y participa en la unión de Mg⁺²-ATP, mientras que el lóbulo C-terminal es más grande y está asociado con el reconocimiento del sustrato peptídico y la actividad catalítica.

La subunidad catalítica contiene una región de aproximadamente 250 aminoácidos, común a todas las proteína quinasas, zona que es conocida como núcleo catalítico (Hanks y col., 1988; Peters y col., 1977; Shoji y col., 1981). Esta región está comprendida entre los residuos 40 a 285 y contiene varias secuencias conservadas; dentro de este núcleo catalítico se pueden identificar residuos y regiones que son esenciales para la actividad catalítica, para la unión de Mg²⁺-ATP y para la unión del sustrato proteico (**Figura 1.4**).

Taylor y col. (1999) describieron la estructura tridimensional de la subunidad catalítica: el lóbulo N-terminal está formado por cinco hojas β antiparalelas (β 1- β 5) y una hélice α , α C. El lóbulo C-terminal comprende a cuatro hélices α (α hélices D, E, F y H), flanqueadas por 2 hélices α adicionales (G y I), dos hojas β antiparalelas cortas (β 7 con β 8 y β 6 con β 9) que se ubican entre las hélices α E y α F. Los dos lóbulos están conectados por una región bisagra donde se encuentra el sitio de unión de ATP y del péptido sustrato. Los residuos conservados convergen en el sitio activo entre los dos lóbulos o en la región bisagra, y contribuyen directa o indirectamente a la unión del ATP (residuos 120-127) y a la catálisis (Taylor y col., 1993). En el lóbulo N-terminal entre las hojas β 1 y β 2 se ubica el loop de glicina (residuos 47-58) que es importante para la unión con el ATP (Bossemeyer, 1994; Grant and Adams, 1996; Hemmer., 1997). El sitio catalítico (Asp166–Asn171) se une a la hoja β 6 y β 7 y Mg²⁺ en la posición loop (Asp184-Phe187) que se une a la hoja β 8 y β 9. La Asp166 sirve como base catalítica (Zhou y Adams, 1997). En la **figura 1.5** se muestra la estructura tridimensional de la subunidad catalítica:

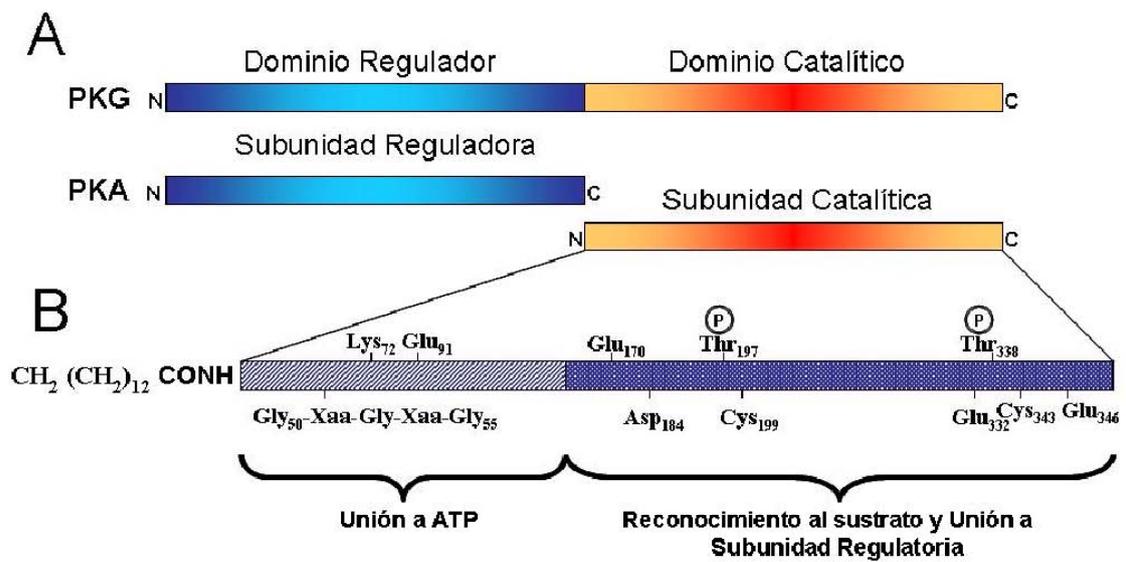


Figura 1.4. Subunidad catalítica de la PKA. Dominios correspondientes a la subunidad catalítica C α de bovino.

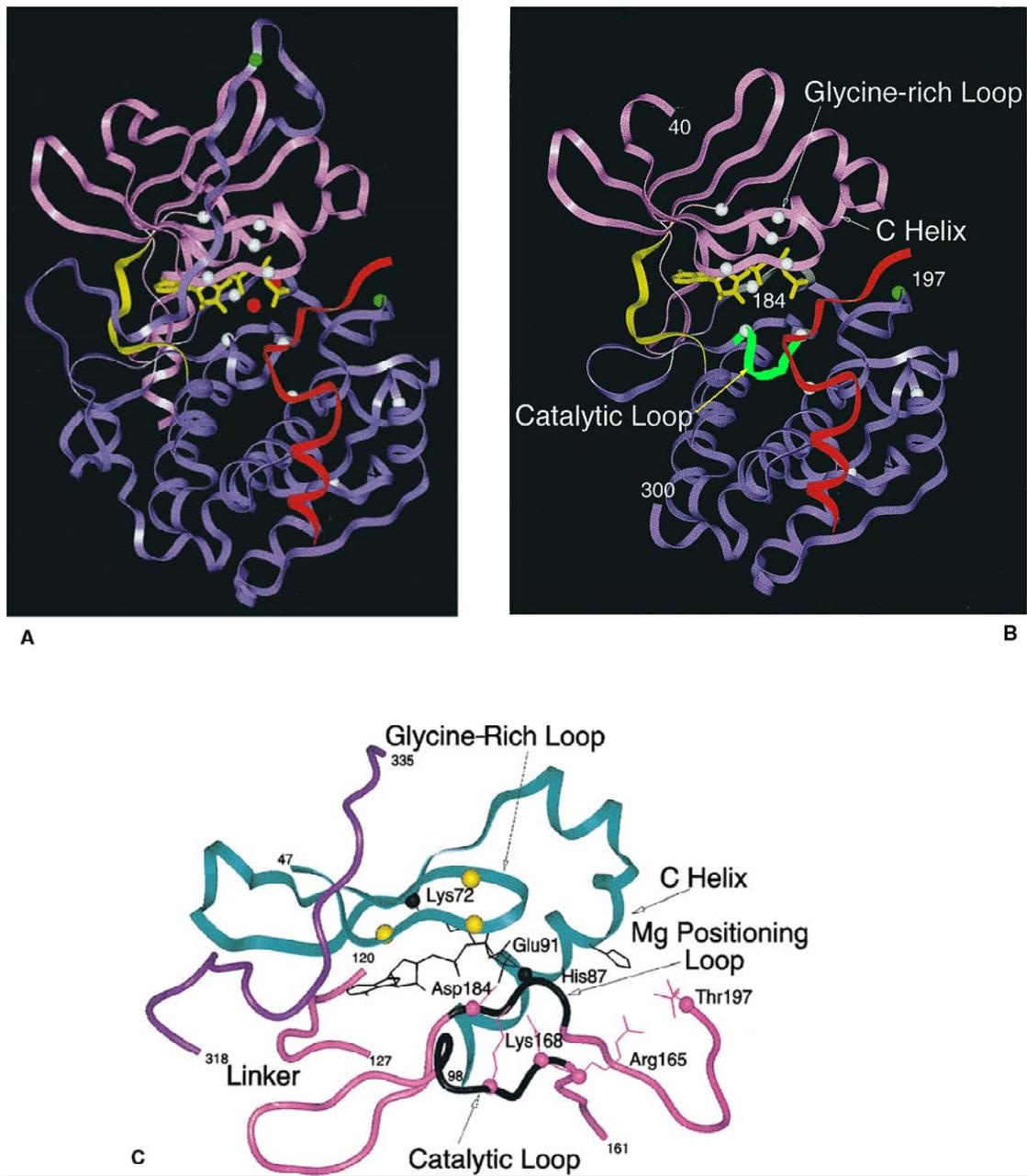


Figura 1.5. Estructura de la subunidad catalítica de la PKA y la unión del ATP al sitio activo. *A y B*, representan un diagrama de la subunidad catalítica unida con el Mg^{+2} -ATP y el inhibidor PKI, se muestra la estructura de 2 lóbulos el lóbulo amino-terminal rico en estructura β y el lóbulo C- terminal caracterizado por la presencia mayoritaria de α -hélices, ambos lóbulos se unen por una región bisagra. La estructura ha sido obtenida para el complejo terciario [Enzima-ATP- Mg^{+2} -PKI], descrito por Zheng y col. (1993). Los residuos del 15-119 están en color rosado; residuos del 128-350 están en color púrpura. El loop de activación esta en color verde fluorescente; el segmento de unión

del ATP entre los residuos del 120-127 está en color amarillo, ubicado en la región bisagra. El ATP está en color amarillo. Los iones Mg^{+2} y el PKI están en color rojo; residuos conservados en la familia de las proteína quinasas como Gly50, Gly52, Gly55, Lys72, Glu91, Asp166, Asn171, Asp184, Glu208, Asp220 y Arg280 son mostrados como pequeñas esferas blancas e involucrados en el núcleo catalítico. Los residuos fosforilables, Ser 338 y Thr197, son mostrados como esferas verdes. El modelo abarca el centro conservado (residuos 40-300). *C*, el sitio activo (residuos 47-98) se muestra en color turquesa, la región de la hojas β antiparalelas hacia el carboxi-terminal (residuo 161-197) son mostrados en color rosado y el loop catalítico (residuos 166-171) y del Mg^{+2} (residuo 184-187) en color negro. En la porción carboxi-terminal se ubica el loop rico en glicina (residuos 318-335), mostrado en color púrpura (Taylor y col., 1999).

Antes que la catálisis proceda, la subunidad catalítica debe unirse al sustrato peptídico y al segundo sustrato, el ATP, uniéndose ambos con alta afinidad en sitios separados dentro del sitio catalítico de la quinasa. El ATP se une al sitio ubicado en la región amino-terminal de la subunidad catalítica y mediante mutagénesis sitio dirigida y modificaciones químicas de residuos de la proteína se ha identificado en este dominio a la Lys72 como funcionalmente importante (Zoller y Taylor, 1979). El núcleo catalítico en todas las proteína quinasas contiene un residuo de Lys o Arg invariante correspondiente al sitio Lys72 de la subunidad catalítica C α y que interactúa con el fosfato β del ATP.

El residuo Glu170 y un grupo de varios residuos básicos que se encuentran hacia el extremo carboxi-terminal, participan en el reconocimiento del sustrato (Buechler y Taylor, 1990). La Cys199, Glu346 y la Thr197 formarían también parte del sitio activo, uniéndose al Mg⁺² formando un complejo con el Mg⁺²-ATP. La Thr197 tiene un interés particular ya que su fosforilación es una condición para la actividad catalítica (Granot y col., 1980; Puri y col., 1985; Mobashery y Kaiser, 1988).

Actualmente se le asigna un rol importante a la His87 no sólo por la interacción con los sustratos sino también por la interacción con la subunidad reguladora (Levin y col., 1988; Shoji y col., 1981).

El análisis cristalográfico del complejo binario formado por la subunidad catalítica y el péptido inhibidor PKI muestra que la Thr197 es el principal sitio de contacto entre los dos lóbulos de la proteína. Cuando es fosforilada, esta fosfotreonina no sólo es necesaria para el reconocimiento del sustrato, sino también para la liberación de la subunidad reguladora (Levin y col., 1988).

Esta fosforilación es el resultado de una autofosforilación, siendo un paso muy importante para la actividad de la subunidad catalítica. Cuando se realizan sustituciones de este aminoácido por Asp o Glu se demuestra que lo importante es que en la posición de la treonina haya un grupo cargado negativamente para que ocurra la separación con la subunidad reguladora (Levin y Zoller, 1990). Se evidencia que esta autofosforilación provocaría cambios importantes generando un estado conformacionalmente activo (Zheng y col., 1993).

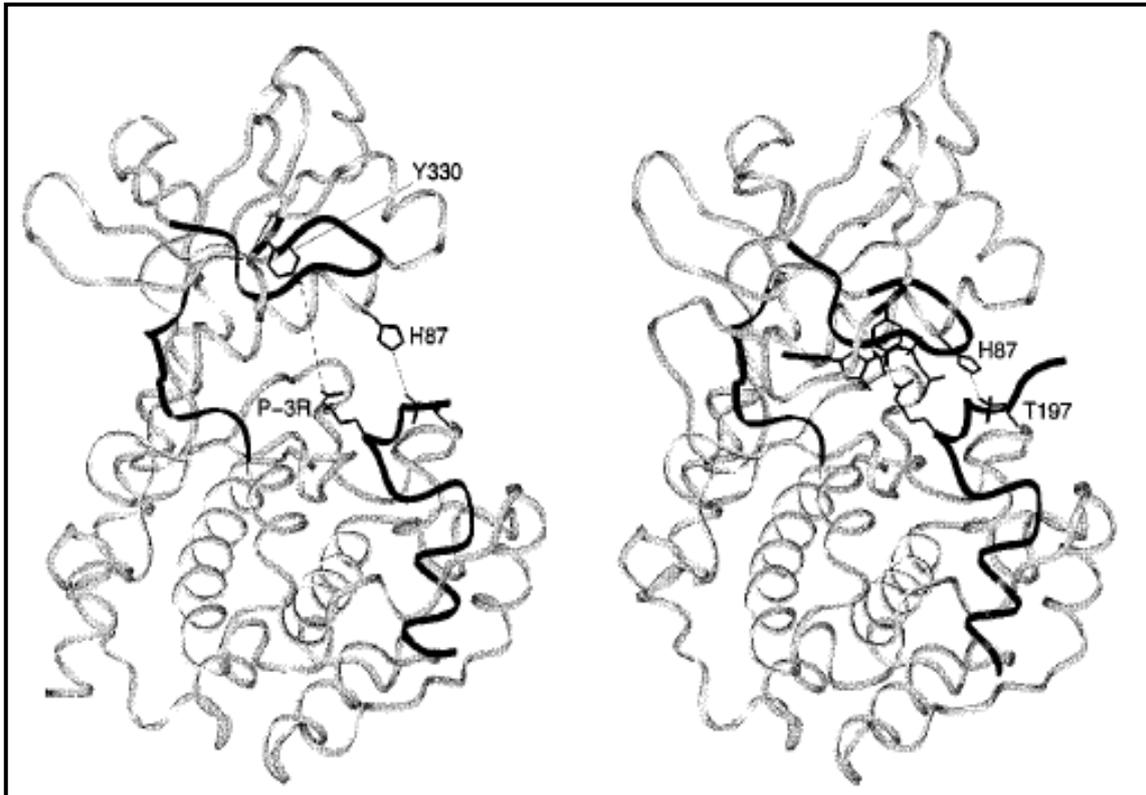


Figura 1.6. Las conformaciones abierta y cerrada de la subunidad catalítica C. *A la izquierda*, el complejo binario conformado por la subunidad catalítica y el péptido inhibidor PKI adopta una conformación abierta. *A la derecha*, el complejo ternario conformado por la subunidad catalítica, el Mg⁺²-ATP y el péptido inhibidor PKI presenta una conformación cerrada. El loop rico en glicina (residuos 47-58), el segmento de unión al ATP (120-127) y PKI (5-24), están representados en negro.

En la **figura 1.6**, se muestra la conformación de la subunidad catalítica, evidenciando que las distancias entre His87 y el fosfato de la Thr197 y entre la Tyr330 y una arginina del péptido inhibidor PKI, sirven como indicadores cuantitativos del grado de conformación “abierta”, presentando mayores distancias entre los dos lóbulos pertenecientes a la subunidad catalítica. Estos cambios conformacionales están mejor caracterizados por tres parámetros moleculares cuantitativos: el primero es una regresión del loop rico en glicina el cual en una conformación abierta se aleja del lóbulo más grande, una regresión de la His87 en el lóbulo pequeño alejándose de la fosfo-Thr197 y además habrá una regresión en la Tyr330, la cual en una conformación abierta se mueve aproximadamente 7 Å alejándose del péptido inhibidor PKI (Shaltiel y col., 1998).

La unión entre la subunidad catalítica y la subunidad reguladora, a través de la interacción de la primera con el “loop” de unión de la subunidad reguladora, mantiene a la subunidad catalítica en una conformación “cerrada”. Cuando se une el AMPc y se disocian las subunidades, la subunidad catalítica queda en forma libre, ahora activa, mostrando una conformación “abierta” capaz de interactuar con su sustrato peptídico (Zhao y col., 1998).

Yang y col. (1995) utilizaron técnicas de transferencia de energía de resonancia (FRET) y observaron que no es suficiente la presencia de altas concentraciones de AMPc para disociar a la enzima de tipo II. Mientras que Vigil y col. (2004) utilizaron el método SAXS, (small angle X-ray scattering, pequeña dispersión angular del rayo X) y concluyeron que un exceso molar de AMPc en la enzima de tipo I origina una activación parcial de la misma que se completa recién con la adición del sustrato peptídico, siendo menor en la enzima tipo II. Recientemente, Viste y col. (2005) señalaron que los sustratos aumentan la disociación de la PKA tipo I a concentraciones bajas de AMPc, pero no ocurre lo mismo con la enzima tipo II. Lo relevante de estos estudios es que sustentan la hipótesis de que la disponibilidad de sustratos contribuiría a la regulación de la activación que diferenciaría a las enzimas tipo I de las tipo II. En muchos casos, esta activación está asociada con una dinámica de turn-over de un fosfato β en el loop de activación (Johnson y col., 1996)

1.3.2. Subunidad Reguladora:

La subunidad reguladora tiene una estructura dimérica muy asimétrica y esta asimetría parece mantenerse en la holoenzima (Zhao y col., 1998).

La función primaria de la subunidad reguladora (R) es inhibir a la subunidad catalítica.

En la **figura 1.7**, se muestran los dominios de la subunidad reguladora que incluye el dominio de dimerización, una región bisagra (incluye la secuencia de pseudosustrato en RI /sustrato en RII) y el dominio de unión a AMPc. En la dimerización de RI, los monómeros están unidos covalentemente por puentes disulfuro formados por residuos de Cys15 y Cys37 (Zick y Taylor, 1982), mientras que la dimerización de RII no está mediada por cisteínas, sino presenta interacciones entre los residuos del extremo N-terminal. Se determinó que el dominio de dimerización en RII está localizado entre los residuos del 1-30 (Scott y col., 1990) y tiene interacción con la proteína quinasa de anclaje AKAPs (A Kinase Anchoring Proteins) (Bubis y col, 1987). La región que interactúa con la subunidad catalítica es la región conocida como «bisagra», que se encuentra entre los residuos 90 y 100 en la subunidad reguladora (Titani y col., 1984); esta región es sensible a ruptura proteolítica, especialmente por tripsina. Las secuencias de esta región son semejantes a las secuencias de los sustratos fosforilados por la subunidad catalítica (Rangel-Aldo y Rosen, 1977; Takio y col., 1984). La subunidad RI posee, en esta región, una secuencia de pseudosustrato Arg-Arg-Gly-**Ala/Gly**-Ile-Ser en la cual la posición Ser fosforilable está reemplazada por Ala o Gly. La proteólisis del extremo amino-terminal no impide la unión a la subunidad catalítica, mientras se mantengan las Arg, demostrando que por lo menos una de las dos argininas conservadas en la región «bisagra» son necesarias para la unión estable entre la subunidad reguladora y catalítica (Buechler y col., 1993). El dominio de unión al AMPc posee dos sitios de unión con una alta afinidad para este nucleótido, denominados sitios A y B (Corbin y col., 1978; Deskeland y col, 1978); el sitio B está expuesto y al unirse el AMPc a la molécula tetramérica, la subunidad reguladora sufre un cambio conformacional exponiendo el sitio A para la unión de otra molécula de AMPc, resultando una cooperación positiva. Una vez que ambos sitios han sido ocupados formando el complejo $R_2C_2(AMPc)_4$, las subunidades catalíticas se separan de las subunidades reguladoras.

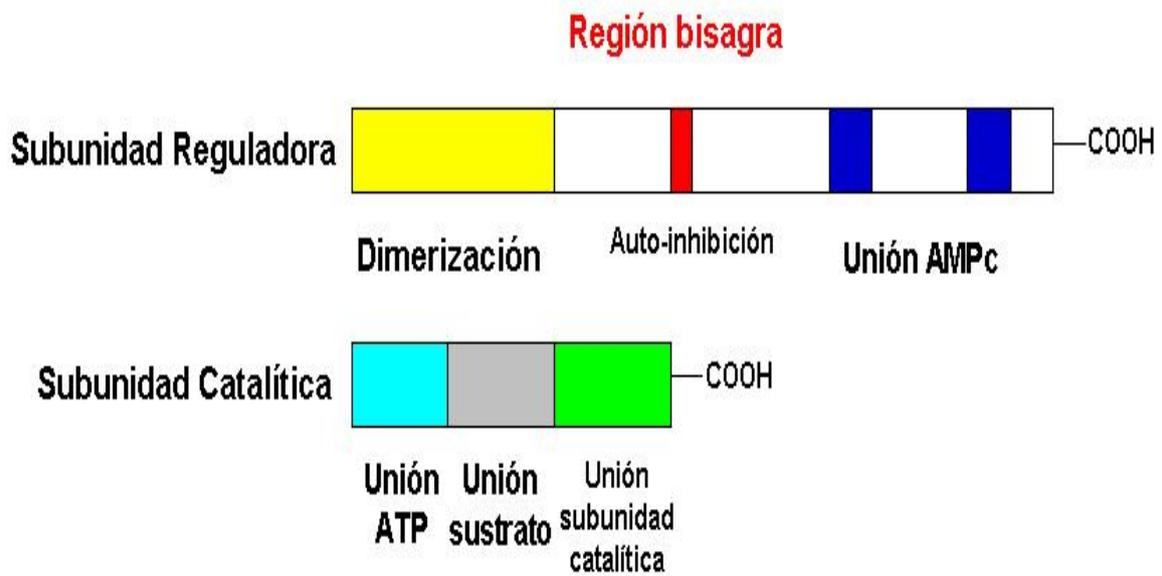


Figura 1.7. Subunidades de la PKA: El esquema muestra los diferentes dominios identificados en la subunidad catalítica y en la reguladora.

1.3.3. Holoenzima:

La holoenzima PKA es un tetrámero que consiste en dos subunidades catalíticas y un dímero bilobulado correspondiente a las subunidades reguladoras. La holoenzima PKA puede unirse hasta con cuatro moléculas de AMPc cuando está saturada, el número exacto requerido para la activación está aún en discusión. La unión de una molécula de AMPc hace que la subunidad reguladora sufra cambios conformacionales generando cargas en la holoenzima y gracias a estas cargas se han podido aislar por columnas de DEAE celulosa complejos ternarios donde el 50% de los sitios de unión a AMPc están saturados (Cobb y col., 1987; y Wolfe y col., 1990). Como anteriormente lo hemos mencionado, la activación de la PKA ocurre en dos fases: primero una molécula de AMPc se une al sitio B de la subunidad reguladora originando cambios conformacionales en la enzima inactiva lo cual crea un complejo ternario con una alta afinidad por AMPc y segundo, la adición del segundo AMPc en los sitios de unión libres (sitio A) originan cambios conformacionales que causan la liberación de las subunidades catalíticas activas.

En la figura 1.8, se observa que entre la subunidad catalítica y la subunidad reguladora interactúa una región bisagra que contiene el sitio de activación, sitio de unión del fosfato β del ATP y el sitio de unión del Mg^{+2} .

En la holoenzima la región de inhibición es representada por el péptido sustrato PKI que bloquea el sitio activo de la subunidad catalítica.

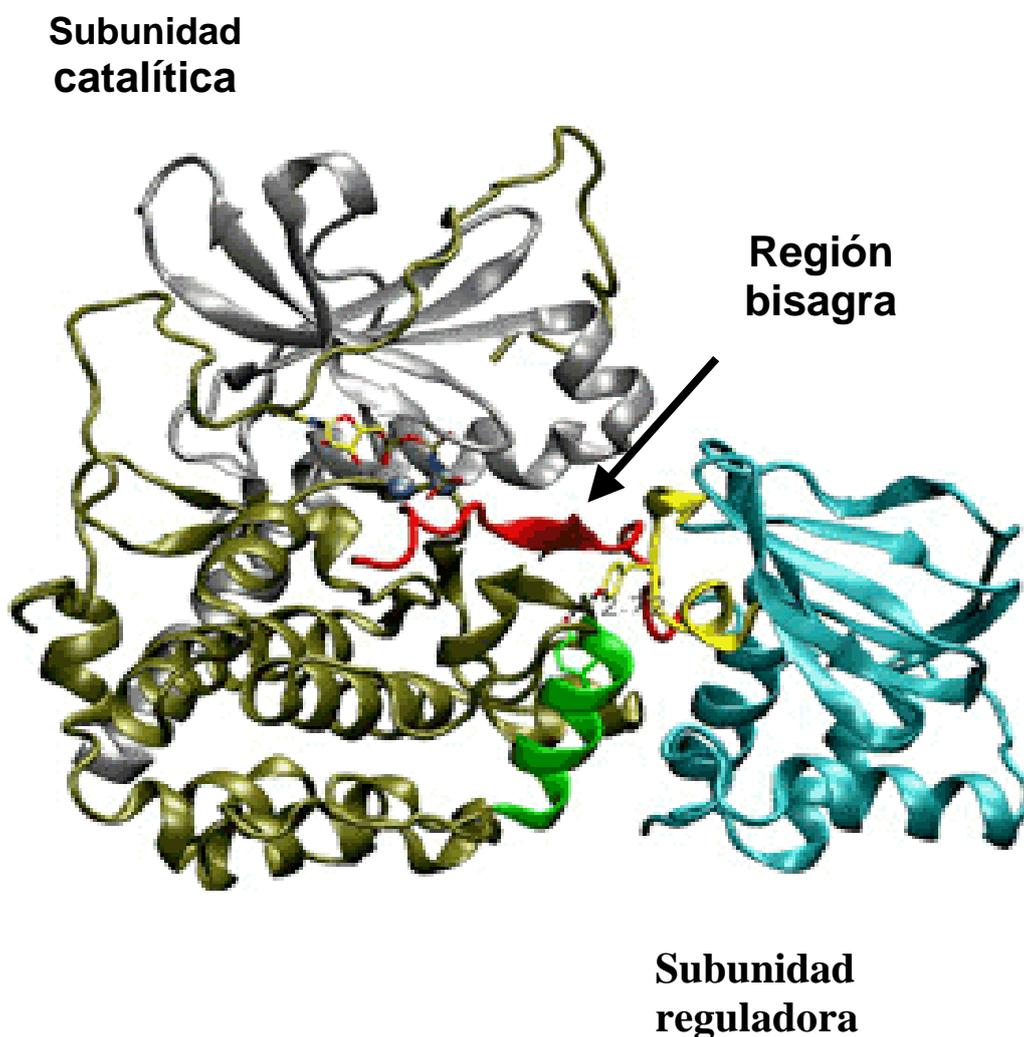


Figura 1.8. Estructura de un complejo de PKA consistente en una subunidad catalítica C (dos lóbulos en color gris y amarillo) y una subunidad reguladora R (en color turquesa). En la región bisagra esta formado por puentes de hidrógeno entre dos residuos conservados de tirosina, la hélice G de la subunidad catalítica (en color verde) y el sitio de unión al AMPc (color amarillo) presente en la subunidad reguladora. En el complejo, la región de unión al inhibidor PKI (color rojo) bloquea el sitio activo de la subunidad catalítica.

1.4. Localización subcelular de la PKA:

En las células de mamíferos se descubrieron dos formas de PKA (Krebs, 1971), a través del análisis de eluidos de columnas de DEAE- celulosa (Reimann y col., 1971; Corbin y col., 1975), que se denominaron PKA-I y PKA-II.

La PKA-I es soluble y se expresa en casi todas las células. A su vez, las isoformas PKA-II (PKA II α y PKAII β) están ubicadas o ancladas en la membrana plasmática y se encuentran en gran cantidad en células neuroendocrinas (Hofman y col., 1975; Weber y col., 1986 y Glantz y col., 1992).

Como ya se mencionó, existen 3 isoformas de la subunidad catalítica en mamíferos, C α , C β y C γ . La C α y C β han sido descritas en casi todos los tejidos, sin embargo, C β es una isoforma predominante en cerebro (Uhler y col., 1986), mientras que la C γ ha sido recientemente encontrada en testículo (Taylor y col., 1993).

En cuanto a la subunidad reguladora, las isoformas más abundantes en varios tejidos son las RI α y las RI β (Lee y col., 1983; Stein y col., 1984) encontradas en el citoplasma y son excluyentes de cualquier compartimiento nuclear (Lee y col., 1983 y Clegg y col., 1988), mientras que la RII α y RII β se presentan asociadas a la membrana plasmática, a los componentes del citoesqueleto, a los gránulos secretores, al aparato de golgi, centrosomas, y posiblemente en el núcleo (Scott y col., 1987; Jahnsen y col., 1986; Joachim y col., 1990; Pariste y col., 1989; De Camilli y col., 1986) y son expresadas selectivamente en tejidos del sistema nervioso y reproductivo (Clegg y col., 1988; Jahnsen y col., 1986; Cadd and McKnight, 1989).

En células eucarióticas, podemos observar una compartimentalización subcelular de la PKA unida a las proteínas de anclaje más conocidas como AKAPs (A Kinase Anchoring Proteins). Estas regulan la localización de la PKA de una manera tiempo-dependiente (Scott y col., 1994). Las AKAPs se unen a los primeros 30 aminoácidos de la subunidad reguladora tipo RII de la PKA con una alta afinidad (Carry col., 1991; Hausken y col., 1996), dirigiéndola a diversos compartimientos celulares, ya sea por interacción proteína-proteína o por interacción lípido-proteína que le permite anclarse a la membrana. De las 25 AKAPs descritas, sólo 3 AKAPs han sido asociadas con las subunidades RI (Huang y col., 1997).

En la **figura 1.9**, se muestran la AKAP 79, que se une a la PKA pero también se une con otras quinasas y/o fosfatasas formando un complejo de transducción de señales (Griffioen y Thevelein, 2002).

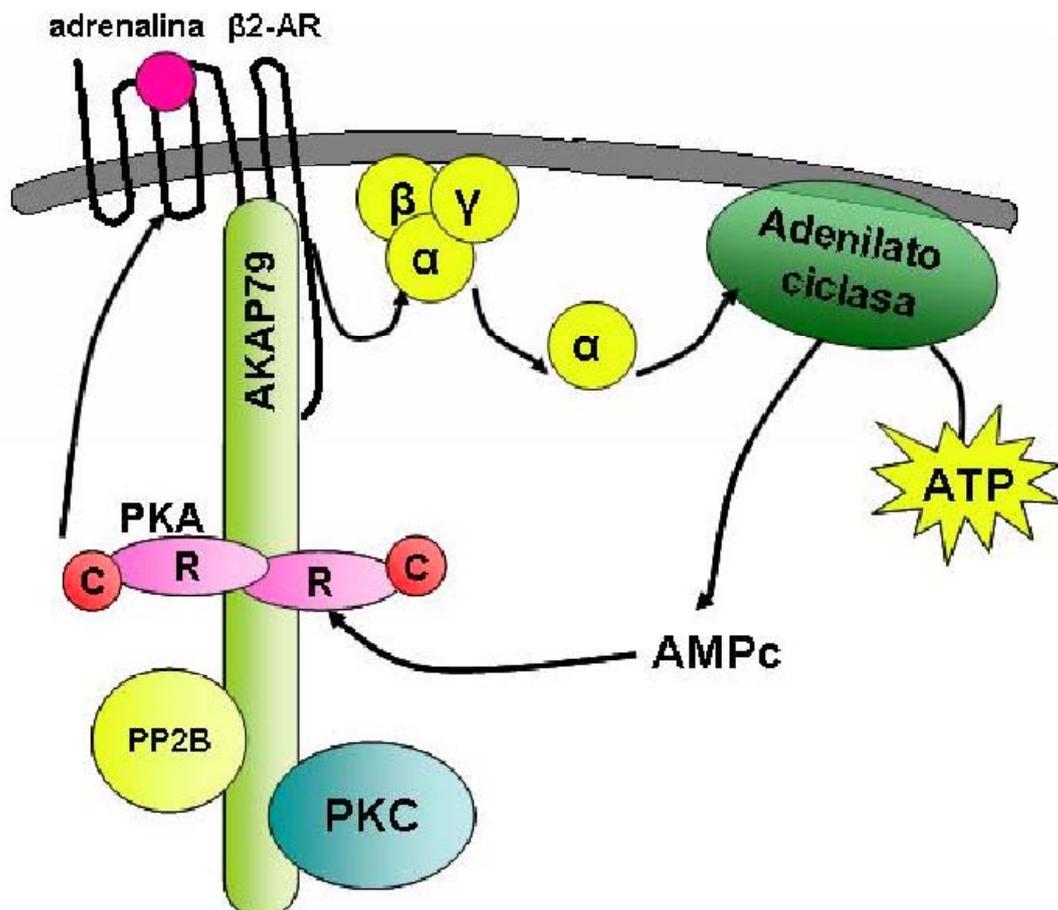


Figura 1.9. Localización de la PKA. Unión de la AKAP79 con dos quinasas (PKA y PKC) y una fosfatasa de proteínas (PP2B).

Las “ectoquinasas” se definen como enzimas unidas a la membrana plasmática donde la actividad quinasa se localiza en la superficie extracelular. La presencia de la actividad de PKA en la superficie extracelular es un fenómeno no muy bien entendido en la actualidad (Ehrlich, 1996).

1.5. PKA ectoquinasa:

Algunas proteína quinasas han sido detectadas en la cara externa de la membrana de las células y se les denomina ectoquinasas, pero aún no se conoce en profundidad el mecanismo mediante el cual estas enzimas son exportadas por la célula, ya que ellas carecen del péptido señal que actúa como etiqueta de exportación en la mayoría de las proteínas que se secretan. Esto ha llevado al laboratorio del Dr. Jorge Allende a estudiar las características intrínsecas de las ectoquinasas que les permiten ser exportadas. En el caso de la caseína quinasa 2 o proteína quinasa CK2, los resultados obtenidos indican que esta enzima sólo puede ser exportada por células HEK293T, cuando dichas células son transfectadas con genes que codifican para ambas subunidades (catalítica y reguladora) de la CK2 (Rodríguez, F. y col., 2005).

Muchos estudios sugieren que la PKA, siendo una enzima predominantemente intracelular, puede también ser una ectoproteína quinasa asociada con la superficie celular. La actividad de PKA se han encontrado en la superficie de células de glioma y en otras superficies celulares como en el espermatozoide y en los adipocitos, ambos en ratón (Kang y col., 1978; y Majumder y col., 1978).

En varias líneas celulares, la incubación con un sustrato permite la liberación al medio extracelular de enzimas que están unidas a la cara externa de la membrana plasmática. Así, por ejemplo, el tratamiento de células con fosvitina permite la liberación de CK2 y se conoce como ecto-CK2 (Kübler, 1983). De la misma manera, se cree que la incubación de células con el péptido sustrato Kemptide, permitiría que la PKA sea liberada al medio extracelular desde la parte externa de la membrana (Kübler, 1989).

Existen varios trabajos realizados in vivo con suero de pacientes con algún tipo de cáncer que presentan evidencia sobre la actividad “ectoquinasa” de la PKA (Kübler, 1992 y 1994; Ehrlich, 1990; Cvijic, 2000; Cho, 2000; Pryzwansky, 2003 y Hui, 2007). Estos estudios indican que la PKA se encuentra unida a la membrana plasmática por su cara externa como “ecto-PKA” (Kübler, 1989) como también libre en el líquido

extracelular como “exo-PKA” (Cho y col., 2000). Sin embargo, ninguno de estos trabajos estudió en detalle las características del proceso de la exportación de la PKA ni los requerimientos estructurales necesarios para ello.

Kübler y col. (1989) incubaron células con Kemptide, sustrato peptídico de la PKA, [γ - 32 P] ATP y observaron que en algunas líneas celulares este sustrato resultaba fosforilado. Los resultados obtenidos de diversos ensayos indicaron que la PKA se encontraba unida a la cara externa de la membrana plasmática y comprobaron además que el uso del sustrato sintético Kemptide no causa daño a las membranas celulares, demostrando que posee propiedades citofílicas, y por lo tanto, la elevada actividad quinasa detectada era debido a la presencia de la PKA en la membrana celular y no a la salida de la PKA intracelular por un daño en la membrana.

A comienzos de los años noventa, Erlich y col.(1990) definen las actividades catalíticas de la PKA unida a la membrana plasmática como ecto-PKA, y señalan que existen también proteínas solubles en el medio extracelular llamadas exo- PKA encontrado en suero de pacientes.

Se ha sugerido que la fosforilación de sustratos extracelulares solubles y dominios extracelulares de proteínas integrales de membrana por ecto- proteína quinasa estaría vinculada a la regulación de la interacción célula-célula, unión de ligandos a sus respectivos receptores, transducción de señales extracelulares, control de respuesta inmune y regulación de la adhesión y migración celular (Redegeld y col., 1999).

Trabajos posteriores de Cvijic y col. (2000), mostraron las primeras evidencias de la presencia de PKA exógena en líneas celulares cancerosas, hallando un incremento de actividad de la subunidad catalítica en pacientes con cáncer prostático. Esto fue de gran importancia, dado que podría servir como un nuevo marcador para enfermedades neoplásicas. Los autores comprobaron por ensayos de actividad y por ensayos no-paramétricos de Wilcoxon que la PKA exógena es una quinasa soluble presente en el medio extracelular, que es secretada o transportada hacia afuera de las células concomitante con la progresión tumoral y la metástasis. Ellos concluyeron que la actividad de la subunidad catalítica de la exo-PKA puede servir como un indicador del status de la enfermedad en pacientes con cáncer, pero aún no se comprende bien los mecanismos fisiológicos y moleculares de la función de la exo-PKA hallado en suero de pacientes con cáncer prostático.

Las funciones fisiológicas de las ectoquinasa pueden evidenciarse en células tipo específicas. Por ejemplo, en linfocitos T, una ectoquinasa fosforila proteínas

relacionadas con citotoxicidad mediada por células. En basófilos, la fosforilación de proteínas de membrana por una ectoquinasa involucra un influjo de calcio. Otras quinasas juegan un rol importante en eventos iniciales de la activación y secreción plaquetaria.

Asimismo, Cho y col. (2000) examinaron la expresión de PKA-ectópica y de PKA-exógena o libre fuera de las células, en suero de pacientes con una variedad de cáncer y en suero de individuos normales. La caracterización bioquímica e inmunológica muestra que la PKA extracelular es del tipo I, demostrando también que las células cancerosas pueden liberar en altas cantidades de la subunidad catalítica de la PKA al espacio extracelular. Esto permite proyectar que la PKA extracelular podría servir como un potencial elemento diagnóstico y marcador pronóstico para el cáncer.

Se realizaron ensayos con muestras de suero de individuos normales y pacientes con cáncer en una población china, según las investigaciones de Hui y col. (2007), observándose un incremento en la expresión de actividad extracelular de la PKA en los suero de pacientes con cáncer, mientras que en los individuos normales se observaron valores bajos o no detectables de la PKA extracelular, concluyendo que la PKA extracelular serviría como un biomarcador en varios cánceres humanos y podría usarse para la detección de la enfermedad y el monitoreo de la terapia contra el cáncer junto con el uso de otras técnicas diagnósticas.

En más de 40 años de investigación en el área de las ectoquinasas y casi 20 años para la PKA como ectoquinasa, no se ha logrado develar aspectos básicos de la presencia de esta serina- treonina quinasa en la superficie celular. Considerando la ausencia de una secuencia señal en ambas subunidades de la PKA, es de gran interés determinar los requerimientos estructurales necesarios para su exportación al espacio extracelular y los factores que influyen este proceso. Así mismo, las vías de secreción usadas, su anclaje a la superficie celular y su posterior liberación en respuesta a un sustrato son aún desconocidos o la información que se tiene actualmente es diversa o contradictoria.

1.6. Justificación e impacto en salud:

Teniendo evidencia de la existencia de una subunidad catalítica de PKA en la cara externa de la membrana plasmática o ectópica reportada en varias investigaciones (Cvijic y col., 2000; Cho y col., 2000 y Wang y col., 2007), es que proponemos a través de la presente tesis adaptar un protocolo *in vitro* para estudiar la exportación de la subunidad catalítica de la PKA que ha sido transfectado en las células humanas en cultivo.

Se determina la actividad enzimática de quinasas para detectar nuestra PKA (en la cara externa de la membrana) y poder observar una posible exportación de la subunidad catalítica de la PKA que ha sido sobreexpresada en células humanas en cultivo por la transfección de su propio gen.

Este es el primer paso para futuros estudios sobre la exportación de la PKA desde el interior y el posible camino que elige para poder ser liberado hacia afuera de la célula, como también indagar con ayuda de qué receptores o secuencias señal se logra evidenciar la PKA en la cara externa de la membrana.

El presente trabajo es un aporte valioso como un primera contribución a caracterizar el proceso de exportación de la subunidad catalítica de la PKA a través de la transfección del gen y por ende una sobreexpresión de la PKA, comparando células “normales” las HEK293T así como células de origen cancerígeno como lo son las HELA.

1.7. Hipótesis:

“La subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMPc que es sobreexpresada en células humanas en cultivo sería exportada hacia el exterior de la célula”.

1.8. Objetivo General:

- Estudiar la posible exportación de la proteína quinasa dependiente del AMPc sobreexpresada en células humanas en cultivo.

1.9. Objetivos específicos:

- a) Determinar la actividad y detectar la PKA unida a membrana celular y libre en el líquido extracelular en células HEK293T y HELA transfectadas con el gen de la PKA.
- b) Determinar el efecto del inhibidor PKI sobre la PKA externa (exo PKA) en células HEK293T y HELA transfectadas con el gen de la PKA.
- c) Inmuno-detectar la subunidad catalítica y la subunidad reguladora RI de la PKA en la cara externa de la membrana plasmática y en el líquido extracelular de las células HEK293T transfectadas con el gen de PKA.

CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo y Nivel de Investigación:

Fue una investigación básica aplicada, correlacional y explicativa, el diseño de la investigación fue experimental y estructurado.

2.2. Cobertura del Estudio:

El presente proyecto se realizó en la Universidad de Chile, Facultad de Medicina-Instituto de Ciencias Biomédicas - Programa de Biología Celular y Molecular-Laboratorio de Biología Molecular de la Transducción de Señales Celulares.

2.3. Técnicas :

2.3.1. REACTIVOS:

A) Reactivos para Biología Molecular:

Las sales, ácidos, bases, detergentes, solventes y otros reactivos utilizados fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., Merck Química Chilena, Fluka y Winkler.

B) Reactivos para la electroforesis PAGE-SDS y para el Western Blot:

- a. La acrilamida y la bis-acrilamida fueron suministrados por Winkler.
- b. El 2-mercaptoetanol fue adquirido a Sigma.
- c. Los estándares de peso molecular de proteínas, “Page Ruler prestained Protein Ladder”, fue suministrado por Fermentas.
- d. El N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) fue adquirido a Sigma.
- e. Los filtros de PVDF de 0,45 μm y 0,25 μm (25 mm) fueron adquiridos Millipore.
- f. Papel filtro N°1 y N°3 fueron obtenidos de Whatman.

C) Reactivos para la Inmunofluorescencia Indirecta:

- a. El medio de montaje para fluorescencia fue suministrado por DAKO.
- b. El colorante supravital Hoescht 33258 usado para la tinción nuclear fue adquirido a Sigma.
- c. El paraformaldehído al 37 % usado como fijador celular fue obtenido de Merck.
- d. La poli-L-lisina usada para la adherencia celular en lámina fue suministrado por Sigma.

D) Anticuerpos:

- a. Anticuerpo anti-HA monoclonal IgG_{2a} de ratón (F-7) fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology.
- b. Anticuerpo anti-HA policlonal IgG de conejo fue suministrado por Upstate Biotechnology.
- c. Anticuerpo anti- α -actina policlonal IgG de conejo fue obtenido de Sigma.
- c. Anticuerpo anti-RI monoclonal IgG_{2b} de ratón fue suministrado por BD Biosciences.
- e. Anticuerpo anti-RI policlonal IgG de conejo fue suministrado por Fermentas.
- f. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina fueron adquiridos de Calbiochem.
- g. El anticuerpo para microscopía de fluorescencia anti-RI IgG de conejo conjugado con rodamina fue adquirido a Santa Cruz Biotechnology.
- h. El anticuerpo para microscopía de fluorescencia anti-HA IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) fue de DAKO.
- i. El anticuerpo para microscopía de fluorescencia anti-HA IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) fue de DAKO
- j. El reactivo para el revelado del inmunoblotting fue incubado con anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (*AP Conjugate Substrate Kit*) obtenido de Bio-Rad.

E) Enzimas y reactivos para la actividad quinasa:

- a. Adenosina 5'-trifosfato (ATP) (Sigma).

- b. [γ -³²P] ATP (Perkin Elmer).
- c. Péptido sintético Kemptide en forma de acetato (Sigma).
- d. Proteína quinasa A, subunidad catalítica de corazón de bovino (Sigma).
- e. Inhibidor de PKA de músculo de conejo PKI (Sigma).
- f. 8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato, un análogo de AMPc (Sigma).
- g. Cocktails de inhibidores de fosfatasa I y II para Ser/Thr fosfatasa y para L-isoenzimas de fosfatasa alcalina (Calbiochem).
- h. Proteína A conjugada a agarosa (Sigma).
- i. Papel de fosfocelulosa P81 (Whatman).

F) Reactivos para el Cultivo Celular:

- a. Medio de cultivo "Dulbecco's modified Eagle's medium" (DMEM) rico en glucosa y L-glutamina fue obtenido de Sigma.
- b. Suero Bovino Fetal (SBF) fue suministrado por Gibco.
- c. Antibióticos como gentamicina y penicilina fueron obtenidos de Invitrogen.
- d. Tripsina- EDTA 10X fue obtenida de Gibco.
- e. El dimetilsulfoxido (DMSO) fue adquirido en Sigma.
- f. Reactivo de lipofectamina de 2mg/mL fue de Invitrogen.

G) Vectores de expresión:

Para la expresión de proteínas recombinantes en células eucariotas (HEK293T y las HELA) se emplearon los vectores de expresión pCEFL-HA, facilitado por el Dr. Juan Marcelo Antonelli perteneciente a la Universidad de Chile, y el vector de expresión pcDNA3-HA que contiene la subunidad catalítica de la PKA, el cual fue donado por la Dra. Susan Taylor perteneciente a la Universidad de California, San Diego. Los vectores pCEFL-HA y pcDNA3-HA proporcionan epítopes de hemaglutinina (HA) en el extremo amino-terminal de la proteína expresada. Todos los vectores empleados confieren resistencia a ampicilina (Amp^r).

H) Otros reactivos y soluciones:

- a. Solución de acrilamida y bisacrilamida (29:1% p/v): por cada 100 mL de solución se requiere 29g. de acrilamida (grado biología molecular); 1 g de bisacrilamida (grado biología molecular) y agua destilada c.s.p.100ml.
- b. PPO (2, 5-difeniloxazol) (Sigma).
- c. POPOP (1,4-bis [2-(5-feniloxazolyl)]-benzeno (Sigma).
- d. Nonidet P-40 (Sigma).
- e. Proteína A agarosa (Sigma).
- f. Ribonucleasa A (Sigma).
- g. Yoduro de propidio (Sigma).
- h. Ditiotreititol (Sigma)

I) Tampones utilizados:

- a. Tampón de carga de proteínas para SDS-PAGE 5X: 100mM Tris-Cl a pH 6.8, 4% p/v SDS grado electroforético, 0.2% p/v azul de bromofenol, 20% p/v de glicerol y 200 mM de β -mercaptoetanol.
- b. Tampón de corrida para PAGE-SDS: Tris -HCl 25 mM, pH 8.3, SDS 0.1 % p/v y Glicina 250 mM.
- c. TBS: Tampón Tris- HCl 50 mM pH 7.5y NaCl 150 mM.
- d. TBS-T: Tampón Tris- HCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 150 mM y Tween al 0.05 % p/v.
- e. Buffer de Transferencia 10X: Tris 250 mM, pH 8.3 y glicina 1.92 M.
- f. Buffer de Transferencia 1X (para 1L): 100 mL de buffer de transferencia 10X 200 mL de metanol y agua destilada fría (4°C) para completar 1 litro.
- g. PBS: NaH_2PO_4 16 mM, Na_2HPO_4 4 mM y NaCl 150 mM, pH 7.4.
- h. Buffer P: Tris 30 mM, acetato de magnesio 5 mM, fosfato de potasio 5 mM, cloruro de sodio 70 mM, etilenodiaminotetracetato (EDTA) 0.5 mM, glucosa 75 mM, pH 7.2 y osmolaridad 290+- 10mosm.
- i. Buffer lisis: detergentes no iónicos Nonidet P-40 y Triton X-100 (Sigma).

2.3.2. MATERIALES

- a. Placas petri (35, 60 y 100 mm de diámetro) y multiwells de 12 pocillos fueron obtenidas de Falcon.

- b. Pipetas pasteur fueron obtenidas de Hirschman Laborigorate.
- c. Tubos Eppendorf, jeringas finas, contómetro, cámara Neubauer, pipetas desechables de 10mL de Hirschman Laborigorate.
- d. Las unidades de filtración descartables de 0,2 μm de Millipore
- e. Membranas de celulosa de 0.2 μm fueron suministrados por Advantec MFS y se usan en equipos autoclavables Nalgene para la filtración de medios y soluciones.
- f. Los viales criogénicos utilizados fueron obtenidos de Nalgene.
- g. El nitrógeno líquido empleado para la preservación de las líneas celulares fue suministrado por la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.
- h. El CO_2 utilizado para el cultivo de células fue suministrado por la empresa AGA.

2.3.3. EQUIPOS:

- a. Autoclave eléctrico VWR modelo AS12.
- b. Incubadora a 37 °C con 5% de CO_2 - 95 % de aire marca Shellab, modelo IR2424.
- c. Microscopio óptico de BioJSP.
- d. Crio sistema de almacenaje biológico
- e. Contador de centelleo para líquidos (para medición de radiactividad β), Searle Analytic Inc. Delta 300.
- f. Espectrofotómetro de doble haz UV 150-02 marca Shimadzu.
- g. Secador de geles marca Savant SGD 4050.
- h. Microscopio Confocal de láser Zeiss Axiovert 100.
- i. Campana de flujo laminar marca Factomet, modelo VR24301.
- j. Equipo Molecular Imager FX marca Bio-Rad, para la detección de radiactividad en geles o membrana de PVDF.

2.3.4. LINEAS CELULARES:

Se emplearon las líneas celulares HEK293T (*Human Embryonic Kidney*, ATCC number CRL-11268) y las células HELA (células de adenocarcinoma cervical, ATCC number CCL-2). Se trata de células adherentes y de morfología epitelial. Las células HEK293T son transformadas con el adenovirus 5 DNA, y se

destaca por tener una alta eficiencia de transfección.

2.3.5. HERRAMIENTAS INFORMATICAS:

Se utilizaron varias páginas de la Web. Entre ellas:

- a. Pubmed, de la “National Library of Medicine”
<http://www.Ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi>.
- b. Protein Data Bank, para encontrar las estructuras de proteínas cristalizadas.
<http://www.pdb.org>.
- c. ATCC- Cell Biology Collection.
<http://www.atcc.org>.

2.4. Técnicas Experimentales:

2.4.1. Descongelamiento celular:

Las líneas celulares HEK293T y las células HELA están almacenadas en un tanque de nitrógeno a -196°C . Se procedió a descongelar los viales criogénicos en un baño térmico a una temperatura de 37°C por un tiempo de 45 segundos con agitación constante; este procedimiento es conocido como método de descongelamiento rápido. Las células se colocaron en placas de 100 mm de diámetro en medio DMEM sin suero bovino fetal y sin gentamicina, y se incubaron a una temperatura de 37°C con 5% CO_2 . Después de 10 horas se observó la adherencia de las células a la placa y se procedió a cambiar el medio por nuevo medio completo DMEM, como se indica en el siguiente subtítulo.

2.4.2. Condiciones del cultivo celular:

Las células HEK293T y HELA fueron cultivadas en medio DMEM rico en glucosa suplementado con 3.7 g /L de bicarbonato de sodio, 10% suero bovino fetal (SBF) inactivado (10 minutos / 65°C) y con 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina y 0.3 mg/mL de glutamina (medio completo). Los cultivos fueron mantenidos en el incubador a 37°C , en una atmósfera con 5% de CO_2 y 80% de humedad relativa. El manejo de los cultivos se realizó en una campana de flujo laminar

equipada con luz UV.

2.4.3. Condiciones para el subcultivo:

Cuando las células presentaron un 80% a 90% de confluencia, se inició el subcultivo. Primero se absorbió el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (PBS). Luego se incubaron durante 2 a 3 minutos en una solución de tripsina al 0.05% y 0.5 mM EDTA en PBS, proceso conocido como tripsinización. Enseguida, las células se liberaron de la superficie de la placa mediante resuspensión con la ayuda del medio completo. Finalmente, las células que fueron tripsinizadas fueron contadas en una cámara de Neubauer y una cantidad adecuada de células fueron colocadas en placa con el medio de cultivo.

Para definir la cantidad de células a usar, se revisaron los trabajos de Kübler y col. (1989), quienes empleaban una concentración de 2×10^6 células/mL en placas petri de 5 cm de diámetro para células HELA, mientras que en estudios previos en células HEK293T efectuados en este laboratorio se empleó una concentración de 1×10^6 células/mL. Dado el uso en este trabajo de placas multiwells de 12 pocillos de 1.5 cm de diámetro, se decidió trabajar a una concentración de 3×10^5 células/mL.

2.4.4. Congelamiento de las líneas celulares:

Las líneas celulares HEK293T y HELA se mantienen en nitrógeno líquido (-196 °C). Regularmente, una placa de 100 mm con una confluencia próxima al 90% era tripsinizada. Las células obtenidas eran centrifugadas y el pellet celular era resuspendido en 0.5 mL de medio suplementado con 20% de SBF y 5% de dimetilsulfóxido (DMSO). Así las células eran colocadas en viales criogénicos enfriados progresivamente hasta alcanzar -70°C y al día siguiente eran transpasados al nitrógeno líquido.

2.4.5. Proceso de Transfección:

Después de 24 horas de cultivo (con 80 a 90 % de confluencia), se procedió a realizar la transfección de las células HEK293T y de las células HELA. En el momento de la transfección las células fueron lavadas dos veces con PBS y colocadas en DMEM sin suero ni antibióticos. El método de transfección usado fue la lipofección, basado en la formación de complejos lipídicos que ayudan al ingreso del DNA a las células por un proceso de endocitosis en el cultivo de células adherentes. La transfección es realizada

en los siguientes pasos (Figura 2.1):

Paso 1: Se agregó en un microtubo 2 μg del vector pcDNA3-HA que contiene el gen con el inserto de cDNA de la subunidad catalítica de la PKA unido a hemaglutinina o HA y en otro microtubo, 2 μg del vector pCEFL-HA que no contiene el cDNA, unido a hemaglutinina o HA. Luego en cada microtubo se añadió el medio DMEM (sin SBF y sin antibiótico) enrasando el volumen a 73 μL , y por último a cada microtubo se le adicionó 2 μL del reactivo Plus (Invitrogen), obteniendo 75 μL como volumen total en cada microtubo y se dejó incubando por 15 minutos a temperatura ambiente.

Paso 2: En otro microtubo se colocó 3.6 μL de lipofectamina y 71.4 μL del medio DMEM (sin SBF y sin gentamicina), teniendo un volumen total de 75 μL por pocillo del multiwell.

Paso 3: Se agregó los 75 μL de la preparación del paso 2 en cada microtubo que contiene el DNA en la preparación del paso 1, dejando incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.

Paso 4: Se lavó los pocillos del multiwell con PBS (dos veces), estos pocillos contenían a las células, y luego se agregó 850 μL del medio DMEM (sin SBF y sin antibiótico).

Paso 5: A cada pocillo se le agregó el total de la preparación del paso 3 a una altura adecuada del multiwell y en pequeñas gotas dispersas de 10 o 20 μL , dejando incubar por 4 horas a 37°C con 5% CO₂.

Paso 6: Después de 4 horas se cambió el medio DMEM (sin SBF y sin antibiótico) a medio DMEM completo.

Luego, las células fueron procesadas a las horas de postransfección según las condiciones para cada experimento. En trabajos de Rodríguez y Allende (2005), se analizó la aparición de la proteína quinasa CKII ectópica, en lisados celulares y en el líquido extracelular de células HEK293T, a las 0, 5, 10, 15 y 20 horas postransfección, y se pudo apreciar que entre las 15 y las 20 horas postransfección existía una mayor actividad de esta proteína quinasa. En el caso de la PKA, se determinó que a las 15 horas aún no se alcanzaba el punto máximo de actividad, realizando entonces experimentos a las 20 horas postransfección.

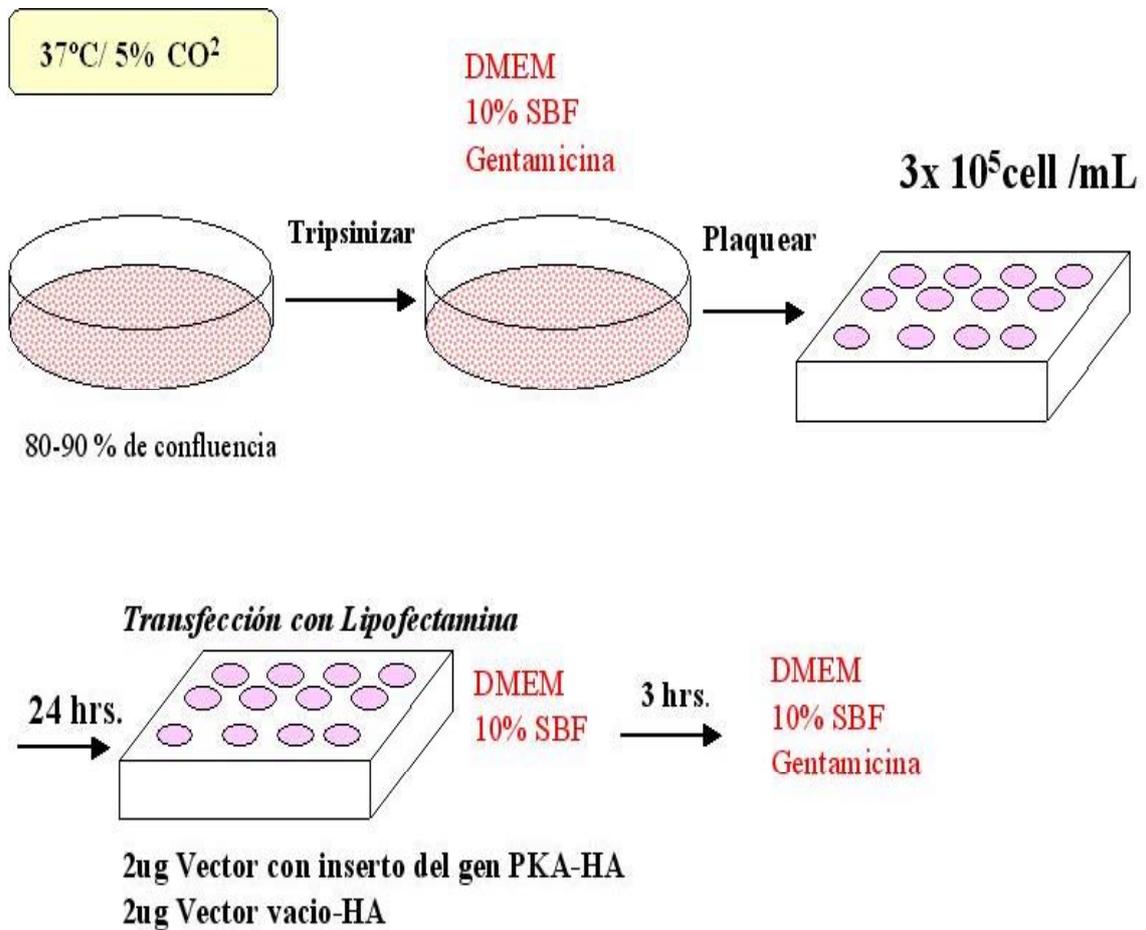


Figura 2.1. Esquema del protocolo esquemático de cultivo celular y transfección con lipofectamina. Se muestra las células cultivadas en medio completo (DMEM, SBF y antibiótico), luego se tripsiniza para plaquear 3×10^5 células/mL y luego de transcurridas las 24 horas se inicia el proceso de transfección con lipofectamina.

2.4.6. Obtención del líquido extracelular:

Una vez transcurridas las 20 hr post-transfección de las líneas celulares humanas en cultivo (HEK293T y las HELA), el líquido extracelular fue colectado y centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C y el sobrenadante fue conservado en hielo.

2.4.7. Obtención del medio condicionado o medio que contiene la ecto-PKA:

El procedimiento de liberación de la enzima ubicada en la cara externa de la membrana mediante la utilización del sustrato se denomina *shedding* (Kübler, 1989). Después de 20 horas posttransfección, se absorbe el líquido extracelular, se lava las células 2 veces con buffer P y se agrega el sustrato Kemptide para una concentración de 300 μ M e inhibidores de fosfatasas y se completa un volumen de 360 μ L con buffer P. Cuando se realiza el shedding en presencia de Kemptide y 8-Bromoadenosina 3',5' monofosfato, este se agrega para una concentración de 0.5 μ M. Este medio fue recolectado y conservado en hielo y corresponde al medio condicionado.

2.4.8. Obtención del lisado celular:

Después que se colectó el líquido extracelular, las células fueron lavadas una vez con PBS y luego fueron tratadas en frío con una solución de lisis que contenía 0.1% de Nonidet P-40 en PBS y 10 μ L/mL del mix de inhibidores de proteasas y mantenidas por 30 minutos en hielo. El lisado resultante fue centrifugado a 15 000 x g por 15 minutos en una centrífuga refrigerada a 4°C, y el sobrenadante resultante o lisado celular fue conservado en hielo.

2.4.9. Inmunoprecipitación:

Tanto las muestras de lisado celular como de líquido extracelular fueron incubadas toda la noche con agitación constante a 4°C en presencia del anticuerpo monoclonal anti-HA (3 μ g de anticuerpo/ mL). Al día siguiente, el inmunocomplejo fue incubado con 20 μ L de proteína A agarosa por 4–5 horas a 4°C con agitación constante. Después de la última incubación la muestra fue lavada cuatro veces con 400 μ L de buffer P pH 7.2 y finalmente fue resuspendida en 20 μ L de buffer lisis para el inmunoprecipitado de lisado celular y 20 μ L de buffer P para el caso del líquido extracelular.

2.4.10. Cuantificación de proteínas:

Se cuantificaron las proteínas del líquido extracelular, del medio condicionado o de los lisados celulares mediante el método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

2.4.11. Determinación de la actividad enzimática:

a) Ensayo de actividad de la PKA liberada al medio condicionado (ecto-PKA):

* *Ensayos preliminares:* Se realizaron para determinar la concentración a usar del análogo de AMPc (8-bromoadenosina 3', 5'-monofosfato) variando desde 0.025 μM hasta 1.5 μM en el ensayo, realizado con 360 μL de medio condicionado al cual se agrega [γ - ^{32}P] ATP 200 μM (700-3000 cpm/pmol) en un volumen final de 400 μL . Se obtuvo una mayor actividad enzimática con 0.5 μM por lo que se empleó esta concentración en todos los ensayos de actividad en que se agrega este compuesto. También se determinó que 37° C resulta ser la temperatura óptima para el ensayo de actividad. En cuanto al tiempo de reacción, se realizó un estudio cinético determinando la actividad enzimática a los 5, 10, 15, 25, 35 y 40 minutos, comprobando que el tiempo adecuado para determinar la actividad es de 30 minutos (datos no mostrados).

**Ensayo para la actividad de ecto-PKA:* Se realizaron tres diferentes ensayos para determinar en el medio condicionado la actividad de ecto-PKA en células HEK293T y en células HELA transfectadas con los vectores pCEFL-HA y pcDNA3-HA, en cada caso.

Como se describió en 2.4.7, después de 20 horas postransfección se absorbe el líquido extracelular, se lava las células 2 veces con buffer P y se incuban durante 3 minutos a 37°C con agitación constante, en presencia de inhibidores de fosfatasas y

- En ausencia de Kemptide,
 - En presencia de Kemptide 300 μM ,
 - En presencia de Kemptide y 8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato 0.5 μM ,
- completando en los tres casos a 360 μL de buffer P, pH 7.2.

A continuación, se agrega el [γ - ^{32}P] ATP, de modo tal que éste quede a una concentración de 200 μM (700-3000 cpm/pmol de actividad específica) y el volumen

final es de 400 μL . Se incuba a 37°C por 30 minutos, con agitación constante. Luego se transpasan 100 μL del medio condicionado a microtubos y se detiene la reacción colocando éstos en hielo. Luego, todo el volumen es adsorbido en papel de fosfocelulosa P81 de 1,5 cm x 1,5 cm. Estos papeles se lavan 3 veces con H_3PO_4 75 mM, durante 15, 20 y 30-45 minutos, respectivamente. Posteriormente, se secan y se colocan en 5 mL de solución de centelleo (PPO y POPOP en tolueno, ver más abajo) y se determina la radiactividad en un contador de centelleo para líquidos.

La actividad enzimática es expresada como pmoles de P^{32} incorporados /minuto (pmoles $^{32}\text{P}/\text{min}$).

El contador de centelleo para líquidos consiste en un tubo foto-multiplicador en contacto óptico con un frasco de vidrio o plástico. El frasco contiene el líquido centelleador orgánico que consiste en una mezcla de PPO (2, 5-difeniloxazol) y POPOP (1,4-bis -[2-(5-difeniloxazol)]benzeno disueltos en tolueno. Las partículas β emitidas por la muestra radiactiva chocan y excitan a las moléculas de PPO y POPOP, las cuales emiten fotones detectados por el tubo fotomultiplicador. El contador de centelleo para líquidos es importante en la determinación de emisores β , pero también nos permite seguir todos los procesos de emisión directa o indirecta de fotones, debido a un íntimo contacto entre la muestra y el centelleador en forma de una solución homogénea.

Por otro lado, se conoce como período de desintegración ($t_{1/2}$) o vida media de un radioisótopo al tiempo que una cantidad dada del elemento radiactivo demora en decaer a la mitad. El $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ usado para el ensayo de la quinasa está definido en la fecha de su calibración (día 0) y posee una actividad específica de 6000 Ci/mmol y una concentración radioquímica de 150 mCi/mL.

La actividad específica en cualquier día después de la fecha de calibración puede ser calculada usando la siguiente tabla:

FÓSFORO 32 – TABLA DE DECAIMIENTO

Días	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1.000	0.953	0.906	0.865	0.0824	0.785	0.748	0.712	0.678	0.646
10	0.616	0.587	0.559	0.532	0.507	0.483	0.460	0.436	0.418	0.396
20	0.379	0.361	0.344	0.328	0.312	0.297	0.283	0.270	0.257	0.245
30	0.233	0.222	0.212	0.202	0.192	0.183	0.174	0.166	0.158	0.151
40	0.144	0.137	0.13	0.124	0.118	0.113	0.107	0.102	0.096	0.093
50	0.088	0.084	0.080	0.077	0.073	0.069	0.066	0.063	0.060	0.057
60	0.054	0.052	0.049	0.047	0.045	0.043	0.041	0.039	0.037	0.035

Vida media = 14.3 días

Estos valores se obtienen considerando que el decaimiento radiactivo sigue una cinética de 1° orden:

$$N = N_0 \times e^{-\lambda t}$$

Donde:

N = n° de átomos radiactivos después de un tiempo t

N₀ = n° de átomos radiactivos iniciales

λ = constante de decaimiento (propia de cada radioisótopo)

t = tiempo

A su vez, el período de semidesintegración o t^{1/2} (vida media) se relaciona con la constante λ según la ecuación:

$$t^{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$$

b) **Ensayo de actividad de la PKA en el lisado celular (endo-PKA) y del líquido extracelular (exo-PKA):**

Tanto las células HEK293T como las HELA fueron transfectadas con 2 µg de los vectores pCEFL-HA y pcDNA3-HA, en cada caso. Luego de 20 horas postransfección se colecta el líquido extracelular y las células se lisan. Tanto el líquido extracelular como el lisado celular se inmunoprecipitan con anticuerpos anti-HA (ver 2.4.6, 2.4.8 y 2.4.9).

Con los inmunoprecipitados se realizaron ensayos de actividad PKA:

- En ausencia de Kemptide,
- En presencia de Kemptide 200 µM,
- En presencia de Kemptide 200 µM y 8-Br-adenosina-3', 5'-monofosfato 0,5 µM.

En un volumen total de 40 µL, el medio de ensayo contenía 5 µL de inmunoprecipitado resuspendido (de lisado celular o de líquido extracelular), se incubaron en buffer P a pH 7.2 en presencia o ausencia de Kemptide 200 µM y [γ - 32 P] ATP 200 µM (700-3000 cpm/ pmol), durante 20 minutos a 37°C.

En los ensayos en presencia de 8-Br-adenosina-3', 5'- monofosfato, éste se agregó a una concentración final de 0,5 µM.

Para detener la reacción, los microtubos se colocaron en hielo, y luego todo el contenido se adsorbió en papel de fosfocelulosa P81 (1,5 cm x 1,5 cm) continuando como se describió en 2.4.11. A continuación, los papeles se lavaron 3 veces con H₃PO₄ 75 mM, durante 15, 20 y 30-45 minutos, se secaron y se colocaron en 5 mL de líquido de centelleo y se determinó la radiactividad en un contador de centelleo para líquidos.

La actividad enzimática es expresada como pmoles de P³² incorporados /minuto (pmoles ³²P/min).

Los protocolos de los ensayos de actividad enzimática correspondientes a la PKA exógena, la PKA ectópica y la PKA endógena, para las células HEK293T y las células HELA, se puede resumir en la figura 2.2.

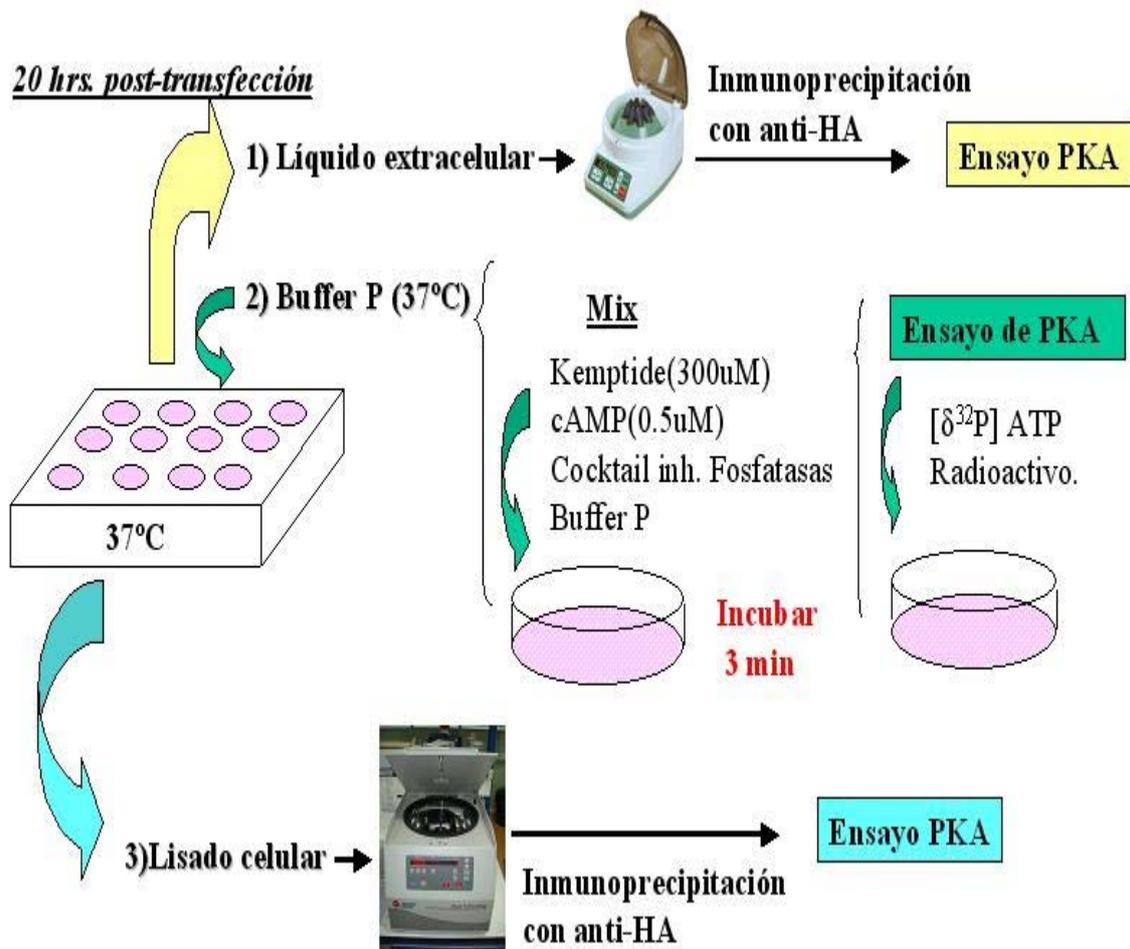


Figura 2.2. Metodología del ensayo de actividad enzimática para la proteína quinasa dependiente del AMPc, para detectar la presencia de PKA exógena, PKA ectópica y PKA endógena.

2.4.12. Ensayo de viabilidad celular:

Para detectar la posible salida de microtúbulos de actina lo cual indicaría un daño en la membrana celular, se utilizó el anticuerpo anti- α actina IgG en una proporción 1:2500. Según trabajos de Kübler, en 1989, el sustrato Kemptide tiene la propiedad de ser citofílico, es decir, se trata de un compuesto que mantiene intactas la membrana de las células cuando es agregado a los cultivos celulares. En nuestro estudio se realizó un inmunoblotting del líquido extracelular con la finalidad de detectar la presencia de α y β actina, y se pudo comprobar que no aparece una banda que corresponda a la α o β actina en la muestra, lo que permitió estar seguros de que nuestro tratamiento con Kemptide no daña la membrana celular.

2.4.13. Inhibición de la actividad enzimática por PKI:

En estudios anteriores de este laboratorio se ensayó “in vitro” el inhibidor de PKA denominado PKI (Walsh y col., 1971), utilizando subunidad catalítica de PKA purificada.

El medio de incubación consistió en buffer P, pH 7,2, DTT 0.26 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (proveniente de la solución de la enzima), Kemptide 133 μM , [γ - ^{32}P] ATP 55 μM (2000-5000 cpm/pmol), 3,5 unidades de subunidad catalítica de PKA y entre 1 y 25 μg del inhibidor PKI, en un volumen total de 30 μL . Se incubó por 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo colocando los tubos en hielo. Luego todo el volumen se adsorbió en papel de fosfo celulosa P81 y se continuó como se describió en 2.4.11.

1 unidad de enzima de PKA corresponde a la cantidad de enzima que transfiere 1pmol de fosfato del ATP a un sustrato sintético por minuto, a pH 7,4 y 30°C. A su vez, 8,3 μg de PKI inhiben a 5 unidades de enzima.

Para los experimentos de la tesis se utilizó 16 μg de PKI en los ensayos.

Para las células HEK293T y HELA, tranfectadas con pCEFL-HA o pcDNA3-HA, se estudió el efecto del inhibidor sobre la PKA intracelular y la exo-PKA, utilizando para ello 5 μL de lisado celular o de líquido extracelular, respectivamente, e incubando durante 10 minutos a 37°C en buffer P, pH 7,2, [γ - ^{32}P] ATP 55 μM (1300-6000 cpm/pmol) y

- Kemptide 133 μM ,
- Kemptide 133 μM y del análogo de AMPc (8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato de sodio) 100 μM ,
- Kemptide 133 μM y 16 μg PKI,

- 16 μg de PKI,
- Kemptide 133 μM , del análogo de AMPc (8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato de sodio) 100 μM y 16 μg de PKI.

En un volumen total de 30 μL .

Para detener la reacción, los tubos se colocaron en hielo y luego todo el volumen se adsorbió en papel de fosfo celulosa P81 y se continuó como se indicó en 2.4.11.

La actividad enzimática es expresada como pmoles de P^{32} incorporados /minuto (pmoles $^{32}\text{P}/\text{min}$).

2.4.14. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida y Autoradiografía:

Para identificar proteínas por medio de este método, primero se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) siguiendo básicamente el protocolo Laemmli (1970).

A 15 μL de muestra (lisado, líquido extracelular o medio condicionado) se agregaron 3 μL de buffer de carga 5X y se calentó a 100° C por 10 minutos.

*Gel separador: Para hacer un gel al 10%, se mezclan 1.9 mL de agua; 1.7 mL de una solución de acrilamida: bisacrilamida (29:1% p/v); 1.5mL de tampón Tris-HCl 1.5 M y pH 8.8; 50 μL de SDS al 10%; 50 μL de persulfato de amonio al 10% p/v y 13 μL de TEMED.

*Gel concentrador: Para preparar el gel concentrador se mezclan 1.05 mL de agua; 250 μL de una solución de acrilamida: bisacrilamida (29:1% p/v); 190 μL de tampón Tris-HCl 1.0M y pH 6.8; 15 μL de SDS al 10%; 15 μL de persulfato de amonio y 10 μL de TEMED.

Las muestras se cargaron en un gel de 1.0 mm de espesor y la electroforesis se desarrolló en buffer de corrida a 100 V, para luego aumentar el voltaje a 200 v una vez que las muestras cruzaron el gel concentrador.

Una vez terminada la electroforesis se procedió a teñir el gel con azul de coomasie por 45 minutos, luego se lava con una solución de desteñido (450 mL de metanol, 450 mL de agua destilada y enrasado a 1000 mL con ácido acético) por 45 minutos, para luego lavar el gel dos veces con agua de caño, y dos veces con agua destilada por 20 minutos cada vez. Es recomendable lavar el gel con 100 mL de una solución acuosa que contiene etanol al 20% y glicerol al 3%, repitiendo el procedimiento una vez más, con el fin de disminuir la radiactividad residual que no está

asociada a bandas de proteínas fosforiladas (^{32}P).

Luego se procedió a secar el gel, para lo cual se colocó en el secador de geles un papel filtro grande whatman #3, encima se colocó otro papel filtro del tamaño del gel; luego se agregó agua y encima delicadamente se colocó el gel, nuevamente se mojó y con mucho cuidado se cubrió con un film plástico. El secado se realizó al vacío, calentando los primeros 30 minutos a 50°C, luego se aumentó la temperatura a 70°C y luego los últimos 10 a 15 minutos se aumentó a 80 °C.

Después se destapa el sistema cuidadosamente para evitar romper el gel que se encuentra ahora seco y adherido al papel whatman. Posteriormente se colocó el papel filtro que tiene adherido el gel sobre una placa radiográfica y ambos fueron colocados dentro de un sistema hermético para su exposición. Dependiendo de la radioactividad que contenga, el gel puede ser expuesto hasta por dos días. Después de pasado el tiempo de exposición, se sacó la placa radiográfica y se colocó en una solución de revelado con agitación constante hasta que aparecieron las bandas de proteínas fosforiladas (^{32}P).

Inmediatamente se lavó con agua de caño, y por último se colocó en una solución de fijador, también con agitación constante. Por último, se dejó secar la placa radiográfica expuesta. En caso de ser necesario, para la detección de las bandas de proteínas radiactivas se utilizó un equipo Molecular Imager FX que posee mayor sensibilidad a la radiación.

2.4.15. Western Blots:

Una vez que las muestras fueron inmunoprecipitadas y centrifugadas, al pellet se le agregó 15 μL de urea 6 M y buffer de carga 5X en un volumen total de 20 μL , y se calentaron a 100°C por 10 minutos. Finalmente se cargaron en un gel cuyo espesor era de 1.0 mm. Por su parte, a las muestras sin inmunoprecipitar no se les agregó urea, sólo buffer de carga y se denaturaron a 100 °C por 3 minutos.

El gel SDS-PAGE fue corrido a 100 V, hasta que el frente de corrida alcanzó el gel separador y a partir de ahí el voltaje aumentó a 200 V. El gel fue corrido en buffer de corrida y una vez terminada la electroforesis se colocó en tampón de transferencia y se procedió a transferir las proteínas a una membrana de PVDF o Immobilon (previamente activada 15 segundos en metanol, 2 minutos en agua y 15 minutos en buffer de transferencia). La transferencia se realizó a una intensidad constante de 100 V, 350 mA por 120 minutos, dentro de una cámara refrigerada y con agitación magnética.

Luego de la transferencia, a la membrana de PVDF o de Immobilon, se le agregó

directamente el anticuerpo primario. Para la presente tesis se usó 2 anticuerpos: el anticuerpo primario policlonal anti-HA de conejo (a 1:1000) y un anticuerpo policlonal anti-RI IgG de conejo (a 1:500), los cuales fueron preparados en una solución denominada Blotto que consiste en buffer TBS-T al cual se adiciona leche descremada en polvo de 5%p/v. Se agregó 20 μ L anticuerpo primario y se incubó durante 1 hora o toda la noche con agitación constante a 4°C en una cámara fría.

Posteriormente se recuperó el anticuerpo primario y se lavó la membrana 3 veces con tampón TBS-T por 5 min cada vez, con agitación fuerte. Luego se incubó con el anticuerpo secundario, que posee el sistema de detección con la fosfatasa alcalina, durante 3 a 4 horas. Los segundos anticuerpos utilizados fueron: un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (1:1000) y un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:5000). Luego se lavó 3 veces por 5 minutos con TBS-T, con agitación fuerte.

El revelado se realizó utilizando el Kit *AP Conjugate Substrate Kit*, con 100 μ L de solución A y 100 μ L de solución B, en 10 mL de tampón de revelado. Cuando la señal del anticuerpo era visible, se lavó la membrana con agua y se dejó secar a temperatura ambiente.

2.4.16. Inmunofluorescencia Indirecta:

Las células HEK293T fueron cultivadas sobre laminillas (7 X 7 mm) y tratadas con poli-L-lisina. Veinte horas después de la transfección, las células fueron lavadas con PBS frío y fijadas por 5 minutos con paraformaldehído al 0.37% en PBS a 4°C. En todas las condiciones se tenía 500 μ L de volumen total. A continuación, se lavó una vez con PBS a 4°C y las células fueron incubadas con PBS conteniendo 1.5 μ g /mL de yoduro de propidio y 0.5 mg/mL de ribonucleasa A, por 5 minutos a temperatura ambiente (cámara oscura), en los casos de la detección de una sola subunidad (sea la subunidad catalítica o la subunidad reguladora). Por su parte, en casos de detección para las dos subunidades (catalítica y reguladora) coexpresadas en una misma fijación se empleó la tinción Hoescht (1 μ g/mL) con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente en una cámara oscura. Luego las células se lavaron nuevamente con PBS y fueron bloqueadas con PBS adicionado de 4% de SBF por 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara oscura.

Para la técnica de inmunofluorescencia, las células se incubaron durante 2-3 horas a temperatura ambiente, con el anticuerpo primario: anticuerpo IgG monoclonal

anti-HA de ratón (F-7) (1:100 en PBS) para la subunidad catalítica y un anticuerpo anti-RI monoclonal IgG de ratón disueltos en solución de bloqueo.

Luego las laminillas fueron lavadas tres veces con la solución de bloqueo durante 2 minutos cada vez con agitación constante, y colocadas con los anticuerpos secundarios: anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con rodamina y el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:200 en PBS) disueltos en la solución de bloqueo, para la detección de las subunidades catalíticas y reguladoras. Se incubó durante 2-3 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda (oscuridad) y luego las laminillas fueron nuevamente lavadas cuatro veces con solución de bloqueo durante 2 minutos cada vez.

Luego las laminillas fueron montadas con 5-10 μ L de moviol y fueron selladas con un esmalte, colocado por los bordes para mantener hidratada la muestra, y se dejó secar para su posterior observación. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal de láser marca Zeiss Axiovert 100.

2.4.17. Análisis Estadístico:

El análisis estadístico se realizó con el programa de SPSS versión 12.0. Se calculará un promedio o rango para expresar los resultados. Se fijó un nivel de significación del 95 % como aceptable. Para la comparación de medias en dos grupos independientes se usó la prueba de t de Student, para la comparación de medias en un mismo grupo se usó la prueba t de Student pareada y para comparación de medias en 3 grupos o más se usó el Análisis de Varianza “ANOVA”.

CAPITULO III. RESULTADOS

En este capítulo se da a conocer los resultados obtenidos al estudiar la exportación de la proteína quinasa dependiente del AMPc en células humanas en cultivo (HEK293T y HELA) en las cuales se sobreexpresa la subunidad catalítica.

En estos estudios se analizó la PKA exógena, la PKA unida a la cara externa de la membrana plasmática o PKA ectópica. Por otra parte, también se determinó la PKA intracelular o PKA endógena.

En primer lugar, se realizaron ensayos preliminares para determinar la concentración del análogo de AMPc (8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato) con la cual se obtenga la mayor actividad enzimática. Para esto se usó el medio condicionado de células HEK293T transfectadas con el vector pcDNA3-HA, el cual contiene el cDNA para la subunidad catalítica de la PKA y el sustrato sintético Kemptide. Como se observa en la **figura 3.1.A**, la mayor actividad se obtiene con 0.5 μ M del análogo de AMPc. Cuando se realiza una electroforesis de los medios condicionados, la autoradiografía correspondiente revela que la mayor autofosforilación de la subunidad catalítica se obtiene a la misma concentración de 8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato (**figura 3.1.B**). Cabe señalar que la subunidad catalítica se autofosforila en el residuo Thr187.

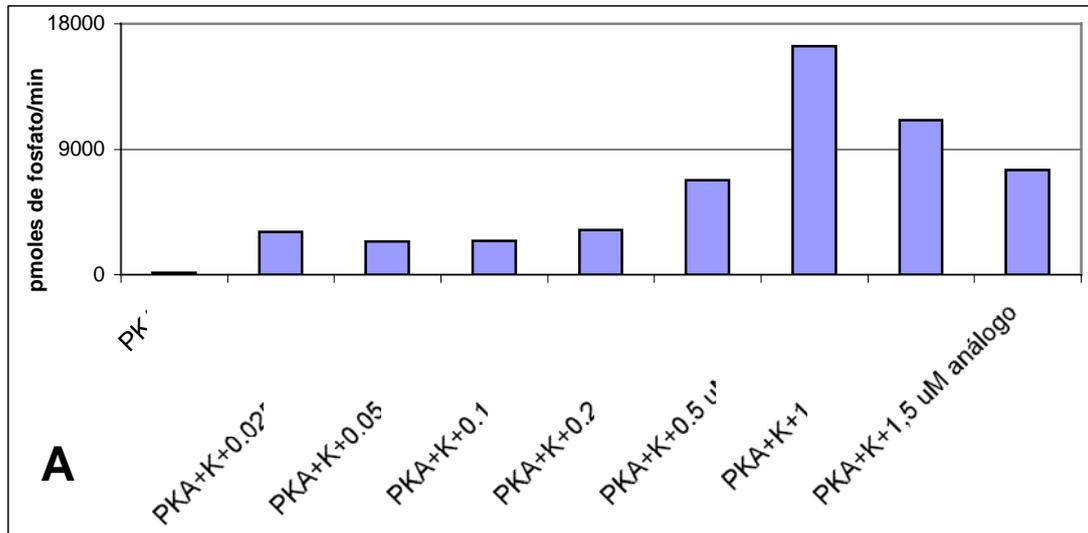
El hecho que el análogo de AMPc active a la ecto-PKA nos indica que por lo menos una fracción se encuentra en forma de holoenzima en el medio condicionado.

Luego se comprobó que el sustrato Kemptide tiene la propiedad de ser citofílico, es decir, se trata de un compuesto que mantiene intactas las membranas de las células cuando es agregado a los cultivos celulares. En este estudio se pudo comprobar que no aparece una banda de α -actina en la muestra de medio condicionado cuando se realiza un western blot revelando con anti α -actina. Aparece también una segunda banda que, por su peso molecular, podría corresponder a β -actina, lo que permitió estar seguros de que nuestro tratamiento con el péptido sustrato no dañó a la membrana celular (**Figura 3.2**).

3.1. PKA unida a la membrana o PKA ectópica:

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Se determinó las proteínas totales del medio condicionado de las dos líneas celulares

EFECTO DEL ANÁLOGO DE AMPc (8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato) SOBRE LA ACTIVIDAD DE PKA ECTÓPICA DEL MEDIO CONDICIONADO DE CÉLULAS HEK293T



Medio condicionado Células pcDNA3HA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Medio condiciona células pCEFLHA
Kemptide	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Análogo AMPc	-	1.5 μM	1.0 μM	0.5 μM	0.2 μM	0.1 μM	0.05 μM	0.025 μM	-	-

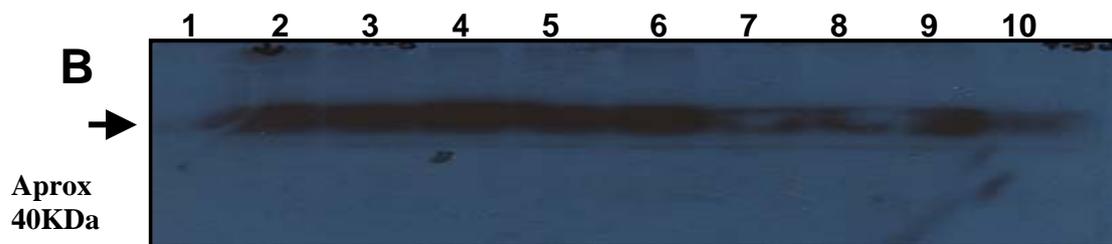


Figura 3.1. Efecto del análogo de AMPc (8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato) sobre la actividad de PKA en el medio condicionado (ecto-PKA) de células HEK293T transfectadas con vector pcDNA3-HA que tiene el cDNA para la subunidad catalítica de PKA. **A.** Actividad de PKA en el medio condicionado al tratar las células en ausencia y presencia del sustrato sintético Kemptide (K) 300 μM, [γ - 32 P] ATP 200 μM (700-3000 cpm/pmol) y con diferentes concentraciones del análogo de AMPc. **B.** Autoradiografía de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de los mismos medios condicionados utilizados en A (carril 1 al 9). Las bandas corresponden a la subunidad catalítica autofosforilada. En el carril 10 se cargó medio condicionado de células HEK293T transfectadas con el vector vacío e incubadas con Kemptide 300 μM.

DETECCIÓN DEL DAÑO EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS HEK293T

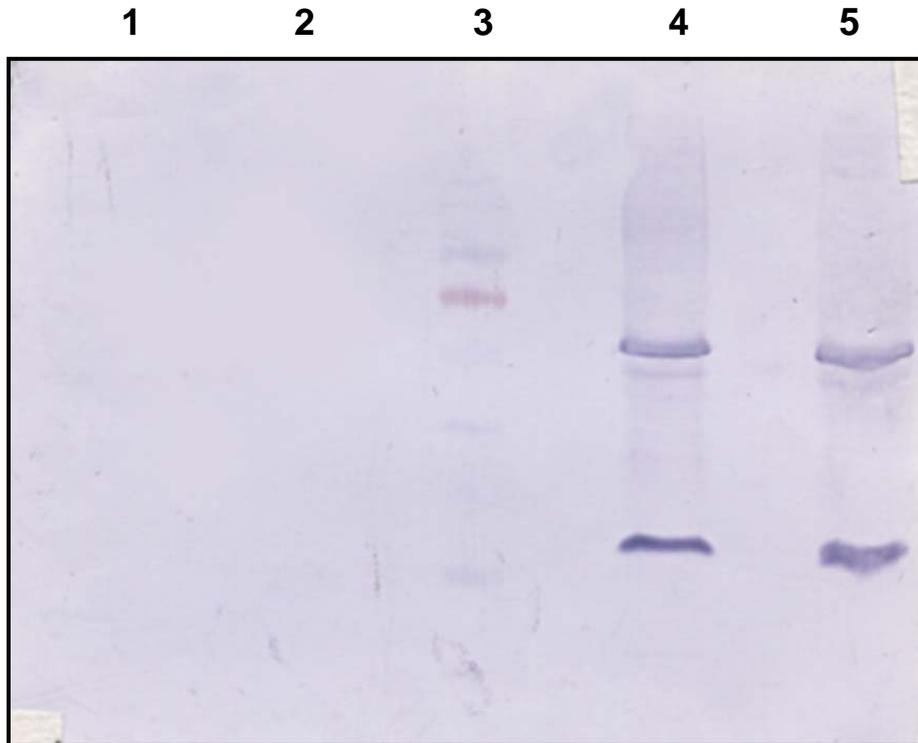


Figura 3.2. Detección de α actina en las células HEK293T por Western blot. Las muestras de los lisados celulares y la muestra del medio condicionado (obtenidos después de 22 horas post-transfección) se corren en un gel SDS -PAGE al 10%. Para el western blot, se transfirió las proteínas a una membrana de PVDF y se reveló con el anticuerpo anti- α actina IgG. (1) Medio condicionado de células transfectadas con el vector pCEFL- HA y tratadas con Kemptide 300 μ M por 3 minutos, (2) Medio condicionado de células transfectadas con el vector pcDNA3-HA y tratadas con Kemptide 300 μ M por 3 minutos, (3) Estándares de peso molecular, (4) Lisado de células transfectadas con el vector pCEFL-HA y (5) Lisado de células transfectadas con el vector pcDNA3-HA.

(HEK293T y HELA) cuando son transfectados con los dos vectores (pCEFL-HA y pcDNA3-HA), con la finalidad de tener iguales concentraciones de proteínas para los ensayos de actividad. En el caso de células HEK293T transfectadas con el vector pCEFL-HA (vector sin cDNA) fue 0.14 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y con el vector pcDNA3-HA que contiene el cDNA de la subunidad catalítica de la PKA 0.16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; para las células HELA, transfectadas con el vector pCEFL-HA fue 0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y con el vector pcDNA3-HA 0.16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

La **figura 3.3**, representa la actividad enzimática de la PKA unida a membrana plasmática (ecto-PKA) en la línea celular HEK293T. Se observó que en el caso de las células transfectadas con el vector pCEFL-HA o vector vacío, e incubadas por tres minutos en ausencia de sustrato, la actividad en el medio fue 0.4 pmoles ^{32}P /minuto. En el caso de las células incubadas durante el mismo tiempo con el péptido sustrato Kemptide 300 μM , la actividad fue 0.3 pmoles ^{32}P /minuto. A su vez, al incubar las células con sustrato 300 μM y el análogo de AMPc (8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato) 0.5 μM , se observó un incremento en la actividad a 1.7 pmoles ^{32}P /minuto. Las diferencias estadísticas entre las tres condiciones son significativas ($p < 0.05$).

En cuanto a las células transfectadas con el vector pcDNA3-HA o vector que contiene el cDNA de la subunidad catalítica de la PKA, cuando se incubaba por tres minutos en ausencia del sustrato, la actividad de PKA en el medio fue 0.13 pmoles ^{32}P /minuto. En el caso de las células incubadas durante el mismo tiempo con el péptido sustrato Kemptide 300 μM , la actividad aumentó a 3.6 pmoles ^{32}P /minuto. Así mismo, al incubar las células con sustrato 300 μM y el análogo de AMPc 0.5 μM , la actividad fue de 5.2 pmoles ^{32}P /minuto. Las diferencias estadísticas entre estas tres condiciones son significativa ($p < 0.05$).

Si comparamos entre los dos vectores, En ausencia del sustrato, la actividad en el caso de las células transfectadas con el vector vacío fue 0.4 pmoles ^{32}P /minuto y las células transfectadas con el otro vector fue 0.13 pmoles ^{32}P /minuto, ($p > 0.05$). En presencia del sustrato 300 μM , la actividad en el caso del vector vacío fue 0.31 pmoles ^{32}P /minuto y del vector pcDNA3-HA fue 3.63 pmoles ^{32}P /minuto, resultando éste último ser 5 veces mayor ($p < 0.05$), y finalmente ante la presencia del sustrato 300 μM y el análogo de AMPc 0.5 μM la actividad en el caso del vector vacío fue 1.69 pmoles

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PKA ECTÓPICA EN CÉLULAS HEK293T

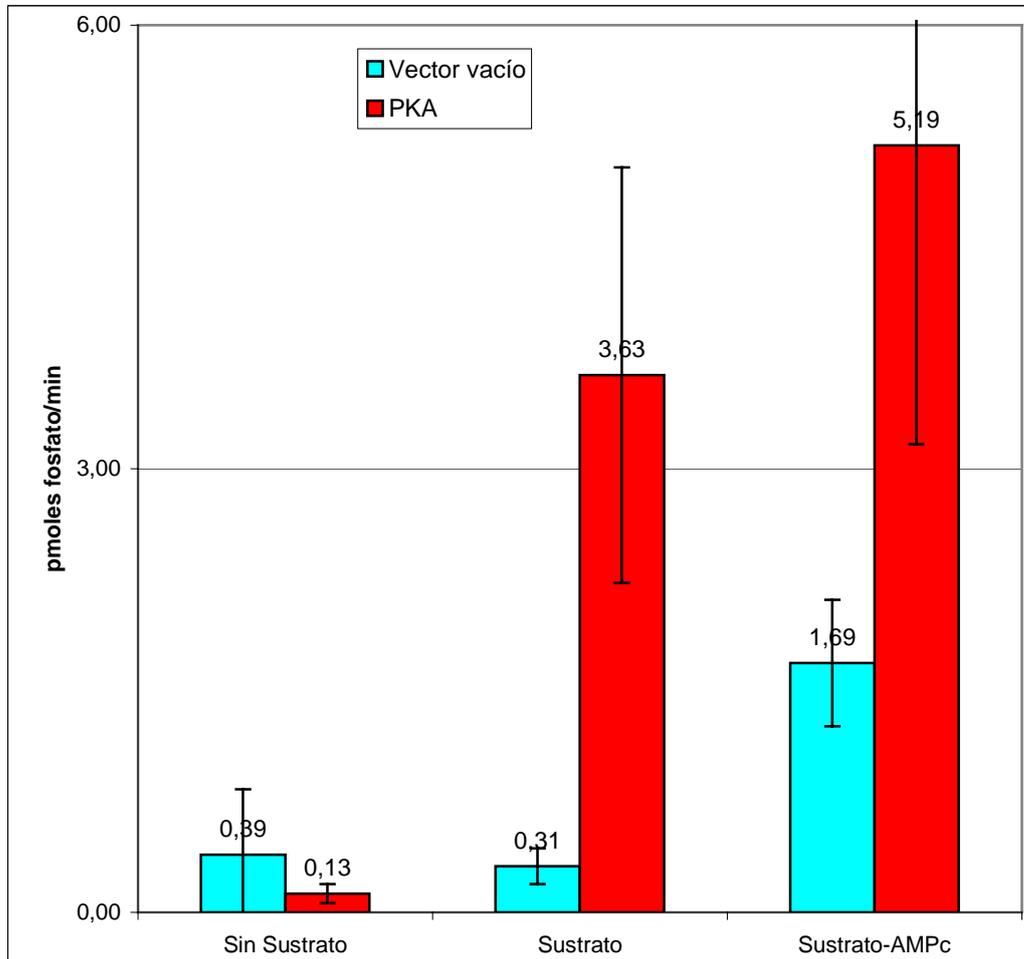


Figura 3.3.- Presencia de la PKA ectópica unida a la membrana extracelular en células HEK293T. Las células HEK293T fueron transfectadas con el vector pCEFL-HA o vector vacío (■) o con el vector pcDNA3-HA que contiene el cDNA para la subunidad catalítica de la PKA (■). Luego de 20 horas postransfección, las células fueron incubadas durante 3 minutos en un medio sin sustrato, en presencia de Kemptide 300 μ M y en presencia de Kemptide y del análogo de AMPc (8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato) 0.5 μ M, y luego se determinó en cada caso la actividad de la PKA como se indica en Materiales y Métodos.

^{32}P /minuto y del vector que contiene el cDNA de PKA fue 5.19 pmoles ^{32}P /minuto resultando un aumento de 3 veces en la actividad ($p < 0.05$).

La actividad en presencia del sustrato pone en evidencia la presencia de la subunidad catalítica en la membrana y el aumento de actividad al agregar además el análogo de AMPc, nos indica la presencia de la holoenzima.

En el caso de la actividad enzimática de la PKA unida a membrana plasmática (ecto-PKA) en la línea celular HELA (**figura 3.4**), se observó al incubar las células transfectadas con el vector pCEFL-HA o vector vacío, por tres minutos en ausencia de sustrato, la actividad en el medio fue 0.4 pmoles ^{32}P /minuto. En el caso de las células incubadas durante el mismo tiempo con el péptido sustrato Kemptide 300 μM , la actividad fue 0.2 pmoles ^{32}P /minuto. A su vez, al incubar las células con sustrato 300 μM y el análogo de AMPc (8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato) 0.5 μM , se observó un incremento en la actividad a 1.0 pmoles ^{32}P /minuto ($p > 0.05$).

En cuanto a las células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, e incubadas por tres minutos en ausencia del sustrato, la actividad de PKA en el medio fue 0.04 pmoles ^{32}P /minuto. En el caso de las células incubadas durante el mismo tiempo con el péptido sustrato Kemptide 300 μM , la actividad aumentó a 0.75 pmoles ^{32}P /minuto. Así mismo, al incubar las células con sustrato 300 μM y el análogo de AMPc (8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato) 0.5 μM , la actividad fue 5.2 pmoles ^{32}P /minuto. La diferencia entre las tres condiciones es significativa ($p < 0.05$).

Al comparar entre las células transfectadas con uno y otro vector, aprecia que en ausencia del sustrato, la actividad en el caso de las células que contienen el vector vacío fue 0.36 pmoles ^{32}P /minuto, dos veces más que en el caso del vector pcDNA3-HA que fue 0.04 pmoles ^{32}P /minuto. Esta diferencia es significativa. En presencia del sustrato 300 μM fue 0.2 pmoles ^{32}P /minuto (vector vacío) 0.75 pmoles ^{32}P /minuto (vector PKA) y la diferencia no es significativa, y finalmente, ante la presencia del sustrato 300 μM y el análogo de AMPc 0.5 μM la actividad fue 0.97 pmoles ^{32}P /minuto (vector vacío) y 5.19 pmoles ^{32}P /minuto (vector PKA), aumentando cinco veces de actividad y presentando una diferencia significativa.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PKA ECTÓPICA EN CÉLULAS HELA

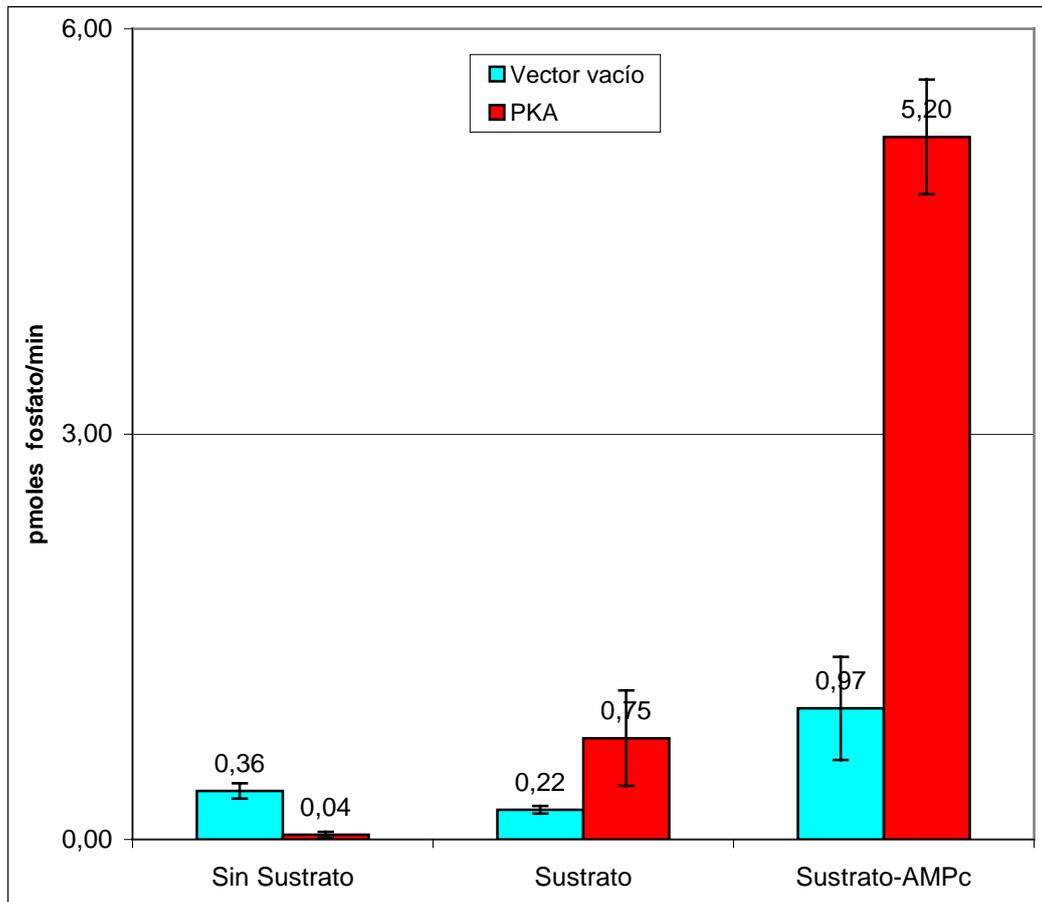


Figura 3.4.- Presencia de la PKA ectópica unida a la membrana extracelular en células HELA. Las células HELA fueron transfectadas con el vector pcDNA3-HA o vector que contiene el cDNA de la subunidad catalítica de PKA (■) o con el vector pCEFL-HA sin cDNA (■). A las 20 horas postransfección, se determinó la actividad de PKA en el medio condicionado luego de incubar las células durante 3 minutos en ausencia del sustrato, en presencia de Kemptide 300 μ M, y con Kemptide 300 μ M y el análogo de AMPc 0.5 μ M, como se indica en Materiales y Métodos.

3.2. PKA libre en el líquido extracelular o PKA exógena:

Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976). Se determinó las proteínas totales del líquido extracelular de las dos líneas celulares (HEK293T y HELA) cuando son transfectados con los dos vectores (pCEFL-HA y pcDNA3-HA) con la finalidad de usar las mismas concentraciones para los ensayos de actividad. Para las células HEK293T, fue 0.31 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el caso del vector pCEFL-HA y 0.34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el vector pcDNA3-HA, mientras que en células HELA se obtuvo 0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el vector pCEFL-HA y 0.34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el vector pcDNA3-HA.

Cuando se determinó la actividad enzimática de la PKA libre en el líquido extracelular (exo-PKA) en la línea celular HEK293T (**figura 3.5**), se observó que en el caso de las células transfectadas con el vector pCEFL-HA (vector vacío), en ausencia de sustrato, la actividad fue de 0.02 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$. En presencia del péptido sustrato, la actividad fue de 0.01 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$, y al añadir el sustrato y el análogo de AMPc aumentó a 0.07 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$ ($p>0.05$).

Por su parte, el líquido extracelular correspondiente a las células transfectadas con el vector pcDNA3-HA (vector que contiene la subunidad catalítica de la PKA), en ausencia del sustrato presenta una actividad de 0.04 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$, en presencia del sustrato aumentó a 0.4 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$, y al agregar el sustrato y el análogo de AMPc se obtuvo una actividad aún mayor, de 0.7 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$ ($p>0.05$).

Cuando se compara los casos de las células transfectadas con el vector vacío y con el vector pcDNA3-HA se observa que en ausencia del sustrato, la actividad en el caso del vector vacío fue 0.02 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$ aumentando dos veces cuando se trata del vector conteniendo el cDNA; ($p>0.05$). En presencia del sustrato, la actividad fue 0.01 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$ (vector vacío) y 0.4 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$ (vector PKA); ($p>0.05$). Así mismo, ante la presencia del sustrato y el análogo del AMPc en el caso del vector vacío fue 0.07 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$ y del vector PKA fue 0.65 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$, esto representa seis veces más de actividad, ($p>0.05$).

La actividad enzimática de la PKA libre en el líquido extracelular (exo-PKA) en la línea celular HELA se muestra en la **figura 3.6**. En el caso de las células transfectadas con el vector pCEFL-HA o vector vacío, en ausencia de sustrato se obtuvo una actividad de 0.05 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$, en presencia del sustrato una actividad de

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PKA EXÓGENA EN CÉLULAS HEK293T

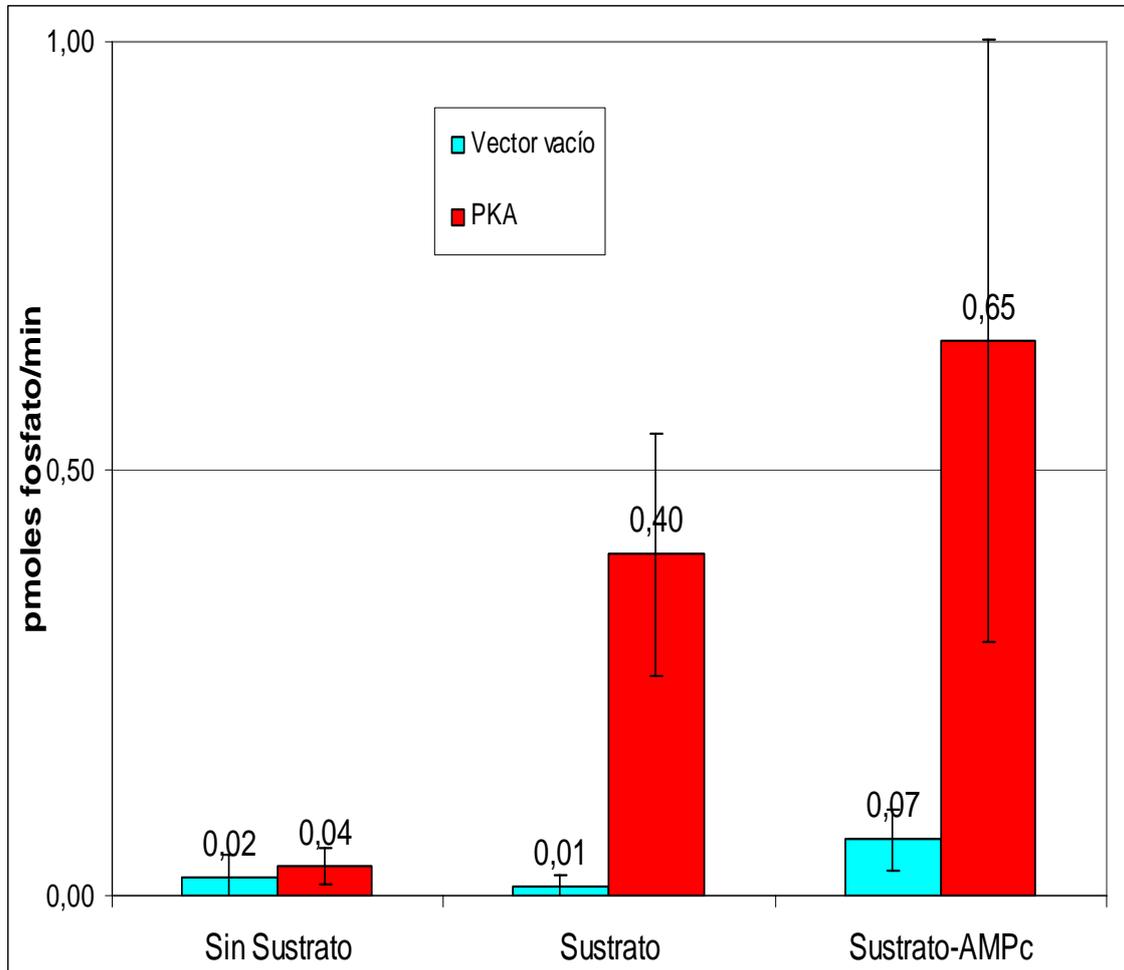


Figura 3.5.- Presencia de PKA libre en el medio extracelular. Las células HEK293T fueron transfectadas con el vector pCEFL-HA () y con el vector pcDNA3-HA que contiene al cDNA de la subunidad catalítica de PKA (). A las 20 horas postransfección, se inmunoprecipitó con anticuerpos anti-HA y se determinó la actividad de PKA en los inmunoprecipitados en ausencia del sustrato, en presencia del sustrato Kemptide 300 μ M, y con sustrato Kemptide 300 μ M y el análogo de AMPc (8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato) 0.5 μ M, como se indica en Materiales y Métodos.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PKA EXÓGENA EN CÉLULAS HELA

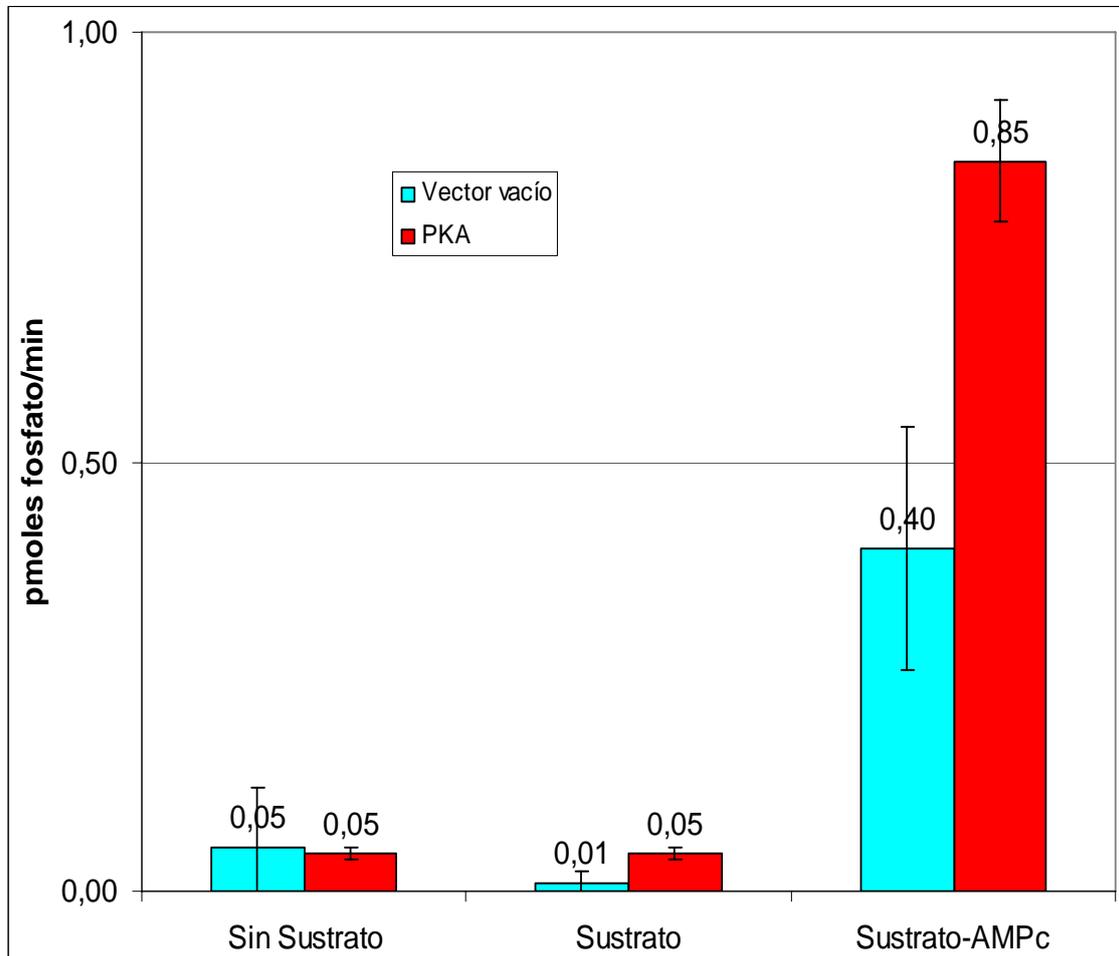


Figura 3.6.- Presencia de PKA libre en el medio extracelular. Las células HELA fueron transfectadas con el vector pCEFL-HA (■) y con el vector pcDNA3-HA que contiene el cDNA de la subunidad catalítica de PKA (■). A las 20 horas postransfección, se determinó la actividad de PKA en el líquido extracelular inmunoprecipitado en ausencia del sustrato, en presencia del sustrato Kemptide 300 μM , y con sustrato Kemptide 300 μM y el análogo de AMPc (8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato) 0.5 μM , como se indica en Materiales y Métodos.

0.01 pmoles ^{32}P /minuto, y al añadir el sustrato y el análogo de AMPc aumentó a 0.4 pmoles ^{32}P /minuto. Las diferencias entre las tres condiciones son significativas ($p < 0.05$).

En el caso de las células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, en ausencia del sustrato se determinó una actividad de 0.05 pmoles ^{32}P /minuto en el líquido extracelular, en presencia del sustrato fue de 0.05 pmoles ^{32}P /minuto, y al agregar el sustrato y el análogo de AMPc, la actividad aumentó a 0.9 pmoles ^{32}P /minuto. Las diferencias entre las tres condiciones son significativas ($p < 0.05$).

Analizando las diferencias entre el líquido extracelular de células transfectadas con uno u otro vector, se puede apreciar que en ausencia del sustrato, la actividad en el caso del vector vacío fue 0.05 pmoles ^{32}P /minuto y del vector pcDNA3-HA fue 0.05 pmoles ^{32}P /minuto, ($p > 0.05$). En presencia del sustrato fue 0.01 pmoles ^{32}P /minuto y 0.05 pmoles ^{32}P /minuto, respectivamente ($p > 0.05$). Finalmente, ante la presencia del sustrato y el análogo del AMPc fue 0.4 pmoles ^{32}P /minuto y 0.85 pmoles ^{32}P /minuto, respectivamente. Este aumento al doble ($p > 0.05$).

3.3. PKA del lisado celular o PKA endógena:

La cuantificación de proteínas fue realizada por el método de Bradford (1976). Se determinó las proteínas totales del lisado de las dos líneas celulares (HEK293T y HELA) cuando son transfectadas con los dos vectores (pCEFL-HA y pcDNA3-HA) con la finalidad de usar las mismas concentraciones para los ensayos de actividad. En las células HEK293T transfectadas con el vector pCEFL-HA, el valor fue de 0.43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y en el caso del vector pcDNA3-HA, 0.48 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. En las células HELA, se obtuvo 0.28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el caso del vector pCEFL-HA y 0.29 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el vector pcDNA3-HA.

La **figura 3.7** representa la actividad de PKA endógena en células HEK293T: en el caso de las transfectadas con el vector pCEFL-HA o vector vacío, en ausencia de sustrato se tiene una actividad de 0.68 pmoles ^{32}P /minuto; en presencia del sustrato, 1.4 pmoles ^{32}P /minuto, y al añadir el sustrato y el análogo de AMPc se observó un aumento a 4.5 pmoles ^{32}P /minuto. Las diferencias entre las tres condiciones son significativas ($p < 0.05$).

En el caso de las células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, en ausencia del sustrato se determinó una actividad de 0.65 pmoles ^{32}P /minuto, en presencia del

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PKA ENDÓGENA EN CÉLULAS HEK293T

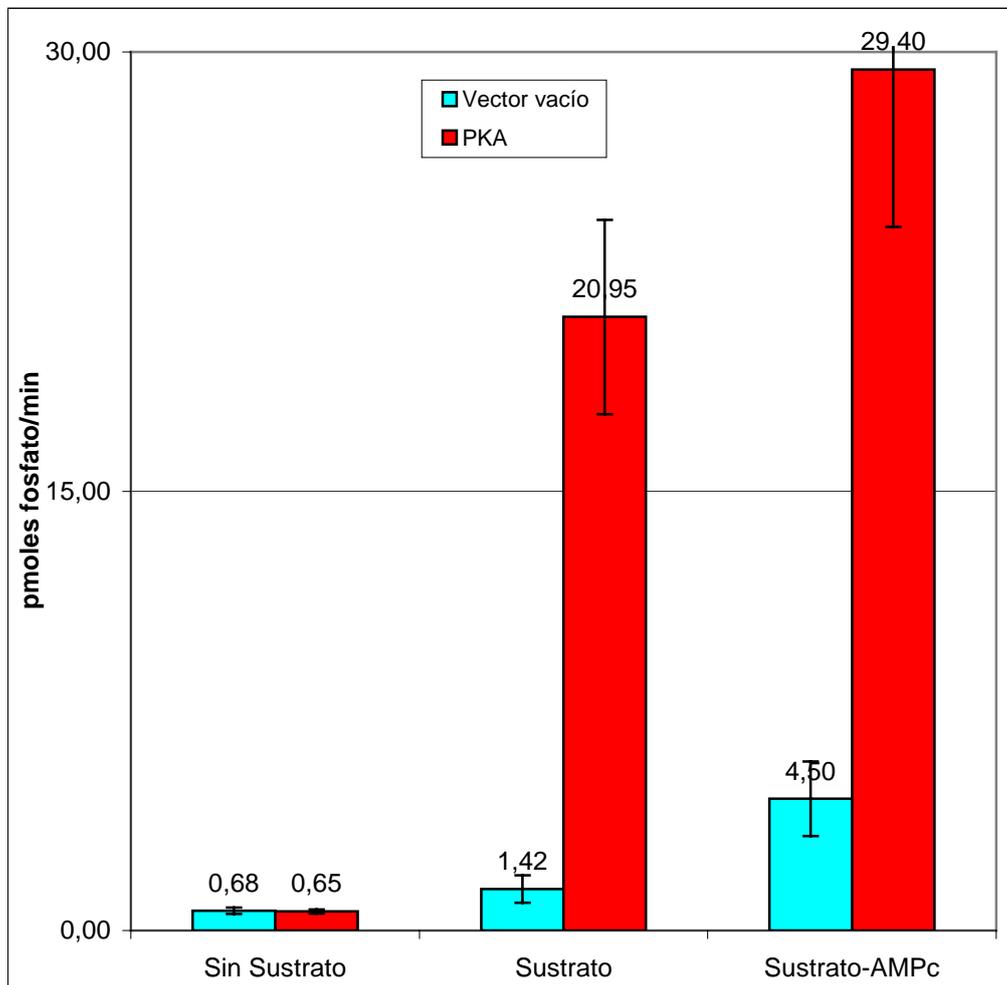


Figura 3.7.- Presencia de la PKA en lisados celulares. Las células HEK293T fueron transfectadas con el vector pCEFL-HA (■) y con el vector pcDNA3-HA conteniendo la subunidad catalítica de PKA (■). Luego se lisan y se inmunoprecipitan con el anticuerpo anti-HA. La actividad de PKA se determina en ausencia de sustrato, en presencia de Kemptide 300 μ M, y en presencia del Kemptide 300 μ M y del análogo del AMPc (8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato) 0.5 μ M, como se indica en Materiales y Métodos.

sustrato aumentó a 20.9 pmoles ^{32}P /minuto, y al agregar el sustrato y el análogo de AMPc se obtuvo una actividad aún mayor de 29.4 pmoles ^{32}P /minuto. Las diferencias entre las tres condiciones son significativas ($p < 0.05$).

Si se compara las células transfectadas con uno u otro vector, se ve que en ausencia del sustrato, la actividad en el caso del vector vacío fue 0.68 pmoles ^{32}P /minuto y en el caso de pcDNA3-HA fue 0.65 pmoles ^{32}P /minuto, resultando tener una diferencia no significativa. En presencia del sustrato, la actividad fue 1.4 pmoles ^{32}P /minuto (vector vacío) y 20.9 pmoles ^{32}P /minuto (vector PKA) siendo este incremento significativo. Finalmente ante la presencia del sustrato y el análogo del AMPc fue 4.5 pmoles ^{32}P /minuto (vector vacío) y 29.4 pmoles ^{32}P /minuto (vector PKA) aumentando más de seis veces la actividad, y con un diferencia significativa.

En la **figura 3.8** se observa los resultados obtenidos para la actividad de PKA endógena en células HELA: cuando las células fueron transfectadas con el vector pCEFL-HA (vector vacío), en ausencia de sustrato la actividad fue 0.03 pmoles ^{32}P /minuto; en presencia del sustrato aumentó a 0.2 pmoles ^{32}P /minuto, y al añadir el sustrato y el análogo de AMPc se observó un incremento a 0.8 pmoles ^{32}P /minuto. Las diferencias entre las tres condiciones son significativas.

A su vez, para las células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, en ausencia del sustrato se determinó una actividad de 0.7 pmoles ^{32}P /minuto, en presencia del sustrato aumentó a 23.3 pmoles ^{32}P /minuto, y al adicionar el sustrato y el análogo de AMPc incrementa aún más a 26.7 pmoles ^{32}P /minuto. Las diferencias entre estas condiciones son significativas.

Al comparar los revelados de las células transfectadas con pCEFL-HA o pcDNA3-HA, se observa que en ausencia del sustrato, la actividad en el caso del vector vacío fue 0.03 pmoles ^{32}P /minuto y en el caso del pcDNA3-HA fue 0.7 pmoles ^{32}P /minuto, observándose un aumento en la actividad que fue significativo. En presencia del sustrato, fue 23.3 pmoles ^{32}P /minuto (vector PKA) con un incremento significativo de cien veces más que el vector vacío con 0.2 pmoles ^{32}P /minuto. Así mismo, ante la presencia del sustrato y el análogo del AMPc, en el caso del vector pcDNA-HA fue 26.7 pmoles ^{32}P /minuto, observándose un incremento de alrededor de treinta y tres veces con respecto a la actividad del vector vacío (0.8 pmoles ^{32}P /minuto) y esta diferencia es significativa.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PKA ENDÓGENA EN CÉLULAS HELA

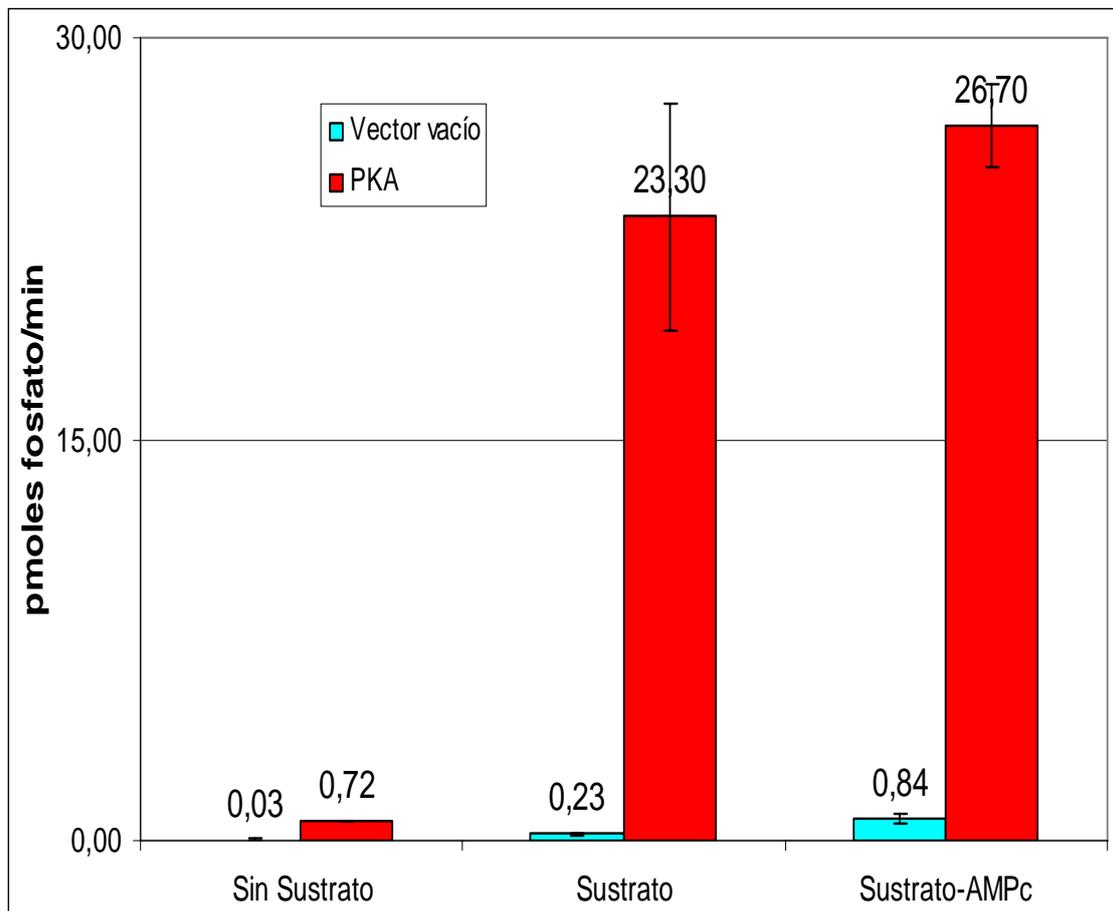


Figura 3.8.- Presencia de la PKA en lisados celulares. Las células HELA fueron transfectadas con el vector pCEFL-HA (■) y con el vector pcDNA3-HA conteniendo el cDNA para la subunidad catalítica de PKA. Las células transfectadas con el gen de la subunidad catalítica PKA (■). Luego se lisan y se inmunoprecipitan con el anticuerpo anti-HA. La actividad de PKA se determina en ausencia de sustrato, en presencia de Kemptide 300 μ M, y en presencia del Kemptide 300 μ M y del 8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato (análogo del AMPc) 0.5 μ M, como se indica en Materiales y Métodos.

3.4. Inhibición por PKI:

Se determinó el efecto del inhibidor PKI sobre la actividad de la PKA purificada, utilizando desde 1 μg a 24 μg y se pudo observar que el máximo de inhibición se obtuvo con 16 μg , como se ve en la **figura 3.9**. Esta cantidad de PKI, por lo tanto, se usó en los experimentos posteriores.

En primer lugar se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976). A continuación, se estudió el efecto de PKI sobre la PKA presente en los lisados celulares y en el líquido extracelular. Se midió las proteínas totales de las dos líneas celulares (HEK293T y HELA) cuando se han transfectado con los vectores pCEFL-HA y pcDNA3-HA y la finalidad es tener la misma concentración de proteínas para realizar los ensayos de actividad. En el caso de las células HEK293T, la concentración de proteínas en el lisado celular fue de 0.32 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para las células transfectadas con el vector pCEFL-HA y de 0.35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para aquellas transfectadas con el vector pcDNA3-HA. Para los ensayos del líquido extracelular la concentración fue 0.30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el caso del vector pCEFL-HA y para el vector pcDNA3-HA fue de 0.32 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Por su parte, la concentración de proteínas en el lisado de las células HELA fue de 0.28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para aquellas transfectadas con el vector pCEFL-HA y 0.30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para las transfectadas con el vector pcDNA3-HA y el líquido extracelular presentó 0.34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el vector pCEFL-HA y para el vector pcDNA3-HA resultó ser 0.35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

En la **figura 3.10**, se muestra el efecto del inhibidor de PKA (PKI) sobre la actividad de la enzima presente en el líquido extracelular de células HEK293T: en el caso de las células transfectadas con el vector pCEFL-HA, la adición del inhibidor en presencia del sustrato disminuyó la actividad enzimática de 0.07 a 0.05 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$, siendo esta diferencia no significativa. A su vez, en presencia del sustrato más el análogo de AMPc la actividad enzimática cayó de 0.2 a 0.05 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$, siendo esta diferencia significativa.

Por su parte, en células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, en presencia del sustrato la adición del inhibidor disminuyó la actividad de 0.13 a 0.06 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$, y esta caída no es significativa. Al añadir el inhibidor en presencia del sustrato más el análogo de AMPc, se evidencia una disminución de 0.38 a 0.07 pmoles $^{32}\text{P}/\text{minuto}$, siendo esta diferencia significativa.

INHIBICIÓN DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA DE LA PKA POR PKI

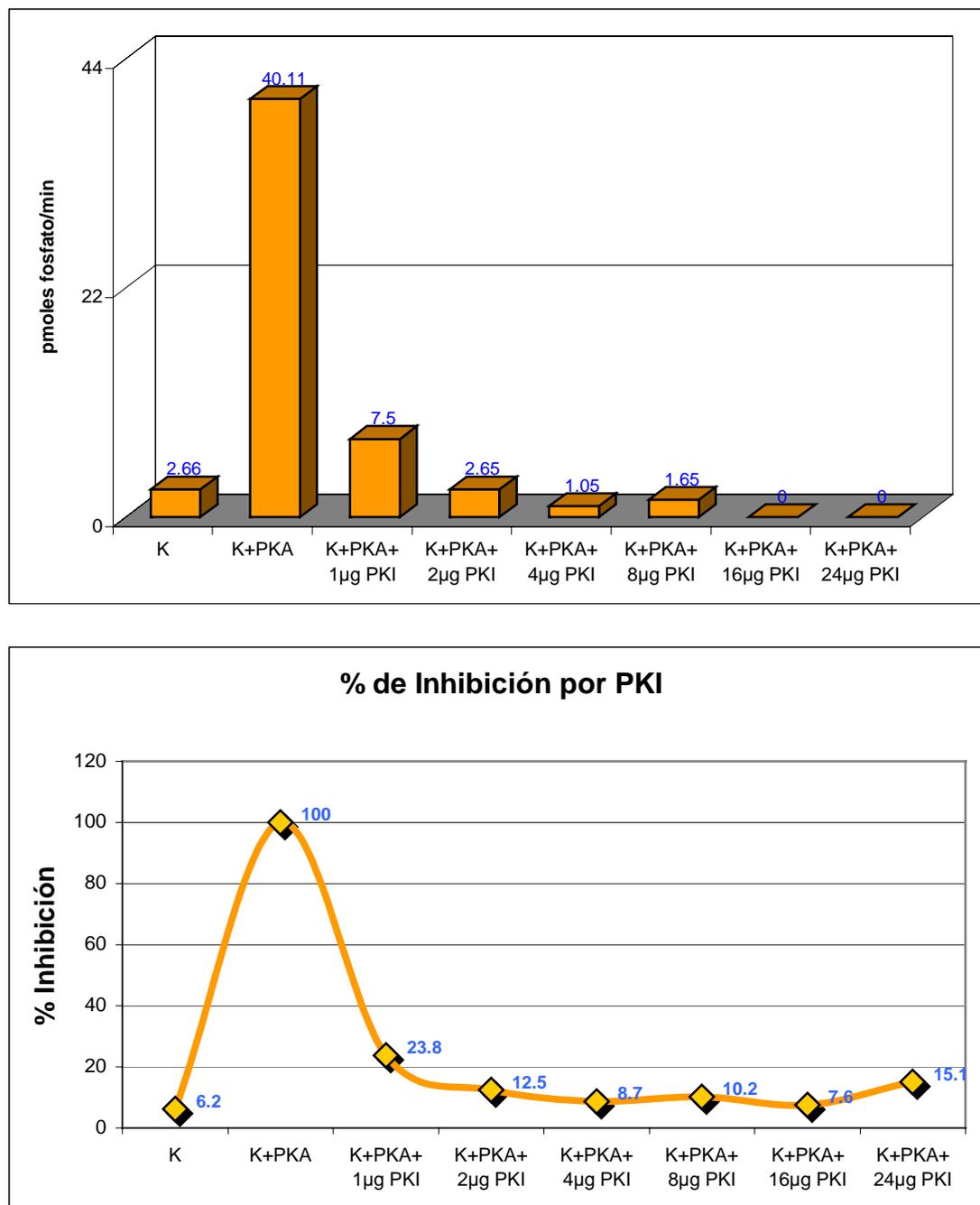


Figura 3.9. Efecto del inhibidor PKI sobre la actividad de la PKA purificada. A. Actividad de PKA en presencia de concentraciones crecientes de PKI. 10-20 unidades de PKA se ensayan en un medio que contiene Kemptide 300 µM, sin o con la adición de PKI en las concentraciones que se indican, como se señala en Materiales y Métodos. **B.** Porcentajes de inhibición calculados a partir de A.

INHIBICIÓN POR PKI DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PKA LIBRE EN EL LÍQUIDO EXTRACELULAR DE CÉLULAS HEK293T

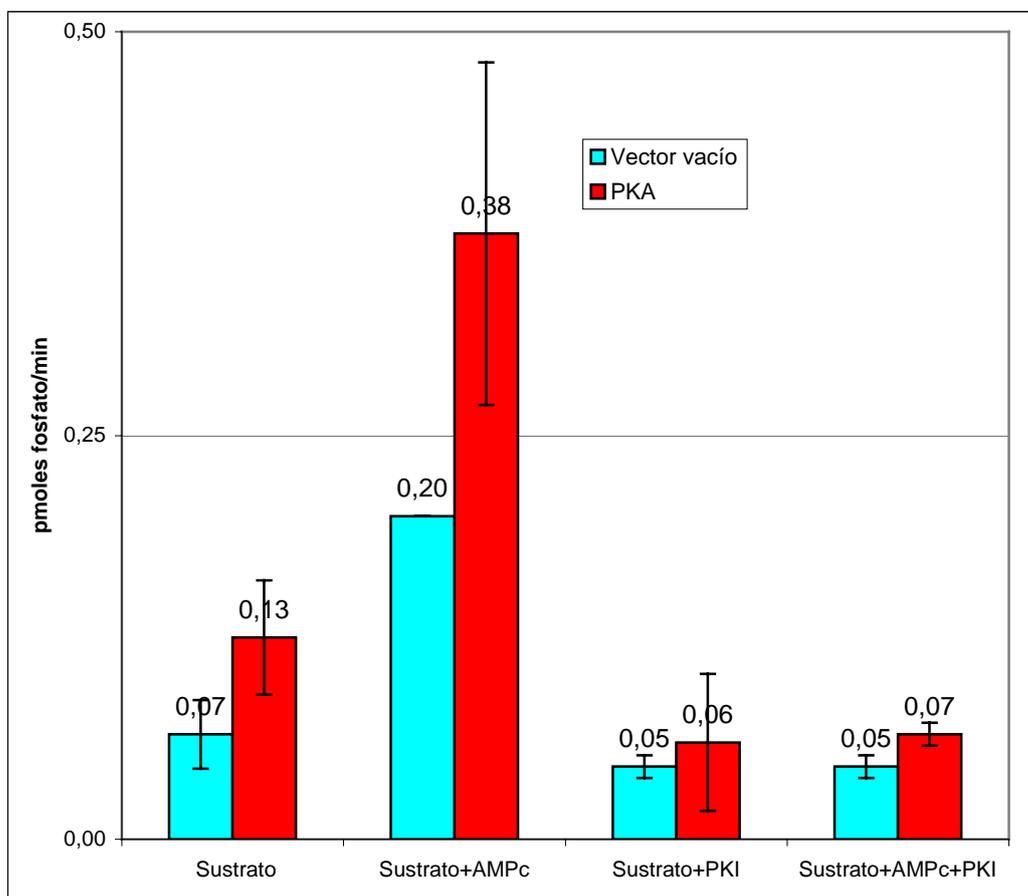


Figura 3.10. Efecto de PKI, inhibidor de la PKA, sobre la actividad de la enzima libre en el líquido extracelular correspondiente a células HEK293T. Se compara la actividad de PKA en el líquido extracelular de células transfectadas con el vector vacío (■) con la del líquido extracelular de células transfectadas con el vector que contiene el inserto para la subunidad catalítica de PKA (■). La actividad enzimática se determina utilizando Kemptide 300 μM como sustrato, en presencia o ausencia 16 μg de PKI o bien, usando Kemptide 300 μM y 8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato (análogo de AMPC) 0.5 μM , con o sin la adición de 16 μg PKI, según se señala en Materiales y Métodos

Cuando se compara los dos grupos, grupo vector vacío con el grupo vector pcDNA3-HA, se tiene diferencias significativas en cuanto a la actividad de PKA en presencia de sustrato y de sustrato y del análogo de AMPc. En cuanto al efecto de PKI también las diferencias son significativas cuando se adiciona al sustrato o al sustrato en presencia del análogo de AMPc.

En el caso de las células HELA, se evidencia una inhibición de la actividad en el líquido extracelular (**figura 3.11**) de células transfectadas con el vector pCEFL-HA ensayada en la presencia de sustrato y en ausencia y presencia del PKI, se obtiene una disminución de la actividad de 0.39 a 0.25 pmoles ³²P/minuto por efecto del inhibidor, no siendo significativa esta diferencia. De igual manera, al adicionar el inhibidor en presencia del sustrato y el análogo de AMPc, la actividad disminuye de 0.33 a 0.25 pmoles ³²P/minuto, resultando una diferencia no significativa.

Para las células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, en presencia del sustrato, el líquido extracelular presentó una actividad de 0.6 que disminuyó a 0.35 pmoles ³²P/minuto al agregar PKI al medio de ensayo y esta diferencia no es significativa. Por su parte, al ensayar la actividad enzimática en presencia del sustrato más el análogo de AMPc, la adición del inhibidor provocó una disminución de 2.25 a 0.08 pmoles ³²P/minuto, siendo esta diferencia no significativa.

Al transfectar las células HELA con el vector pcDNA3-HA que contiene a la subunidad catalítica, ante la presencia del sustrato y la ausencia y presencia del inhibidor son estadísticamente significativas, y del mismo modo al adicionar el sustrato y el análogo de AMPc, en presencia y ausencia del inhibidor estas diferencias son significativas.

En la **figura 3.12**, se muestra los resultados al analizar la inhibición por PKI de la PKA presente en el lisado celular de células HEK293T. Se observó que en presencia del sustrato, el lisado obtenido de las células transfectadas con el vector pCEFL-HA presenta una actividad de 0.7 pmoles ³²P/minuto la cual disminuyó a 0.6 pmoles ³²P/minuto al adicionar PKI, pero esta disminución no es estadísticamente significativa. Así mismo, hay una disminución en la actividad al añadir el inhibidor ante la presencia del análogo de AMPc y del sustrato, en este caso la actividad disminuyó de 2.2 a 0.6 pmoles ³²P/minuto y esta disminución no es significativa.

INHIBICIÓN POR PKI DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PKA LIBRE EN EL LÍQUIDO EXTRACELULAR DE CÉLULAS HELA

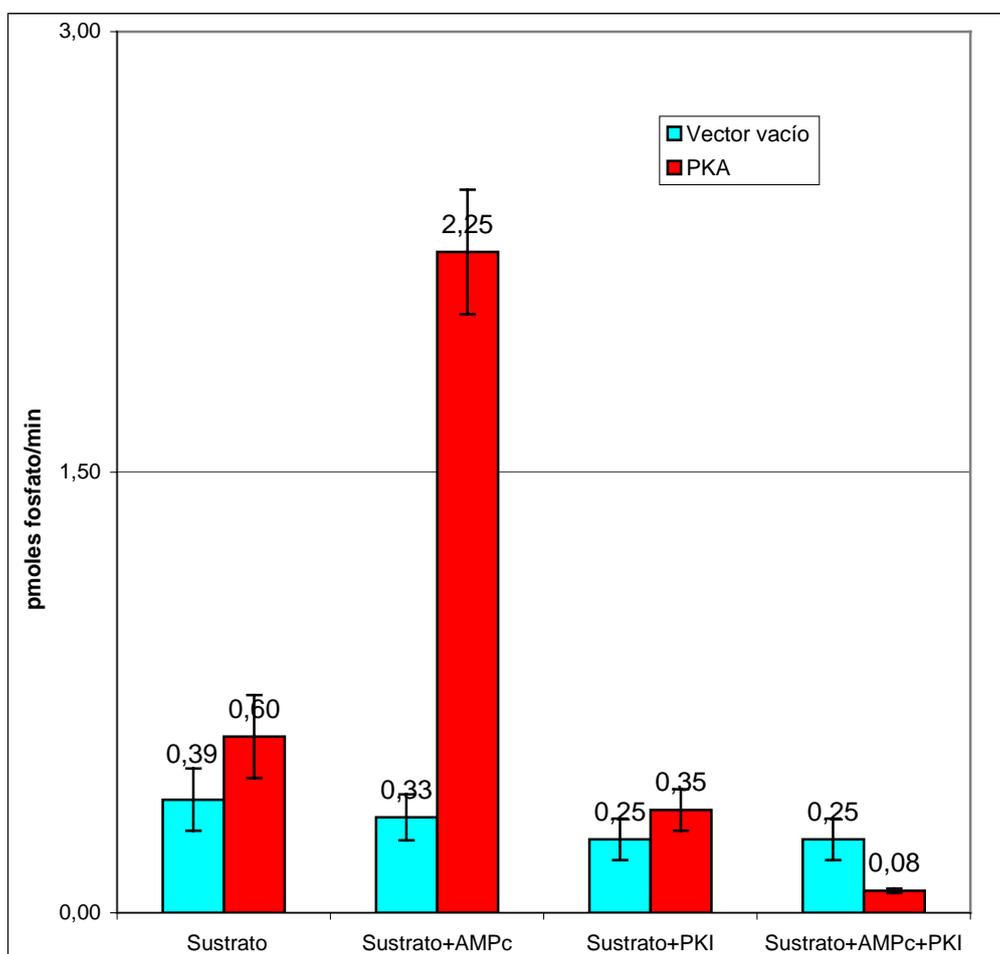


Figura 3.11. Efecto de PKI, inhibidor de PKA, sobre la actividad de la enzima libre en el líquido extracelular correspondiente a las células HELA. Se compara la actividad de PKA en el líquido extracelular de células transfectadas con el vector vacío () con la del líquido extracelular de células transfectadas con el vector que contiene el inserto para la subunidad catalítica de PKA (). La actividad enzimática se determina utilizando Kemptide 300 μ M como sustrato, en presencia o ausencia de 16 μ g PKI o bien, usando Kemptide 300 μ M y 8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato (análogo de AMPc) 0.5 μ M, con o sin la adición de 16 μ g PKI, según se señala en Materiales y Métodos.

INHIBICIÓN POR PKI DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PKA EN EL LISADO CELULAR DE CÉLULAS HEK293T

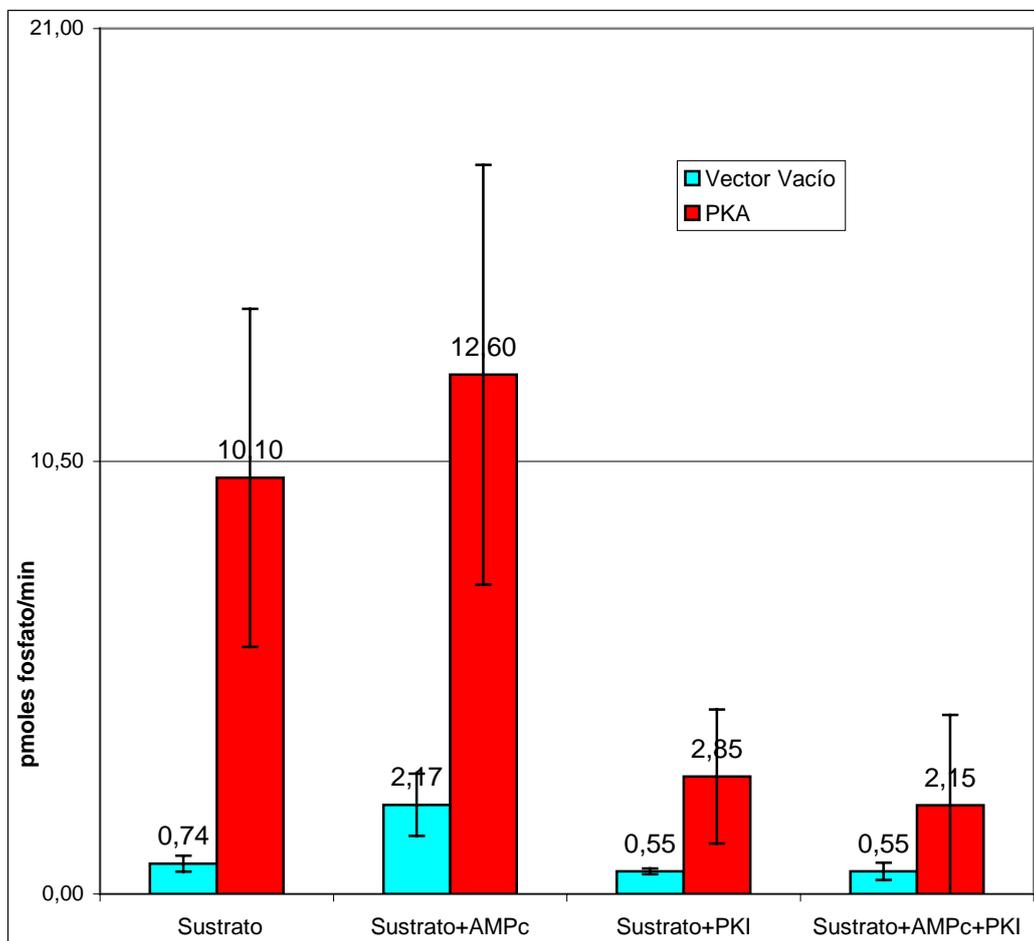


Figura 3.12. Efecto de PKI, inhibidor de PKA, sobre la actividad de la enzima en el lisado celular de células HEK293T. Se compara la actividad de PKA en el lisado de células transfectadas con el vector vacío (■) con la del lisado de células transfectadas con el vector que contiene el inserto para la subunidad catalítica de PKA (■). La actividad enzimática se determina utilizando Kemptide 300 μM como sustrato, en presencia o ausencia de 16 μg PKI o bien, usando Kemptide 300 μM y 8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato (análogo de AMPc) 0.5 μM , con o sin la adición de 16 μg PKI, según se señala en Materiales y Métodos.

Así mismo, las células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, al adicionar el PKI en presencia del sustrato disminuyó la actividad de 10.0 pmoles ^{32}P /minuto, medida en ausencia de PKI, a 2.9 pmoles ^{32}P /minuto y esta diferencia no significativa. Ante la presencia de sustrato y del análogo de AMPc, la adición de PKI ejerce su efecto inhibitorio al disminuir la actividad de 12.6 a 2.2 pmoles ^{32}P /minuto y esta disminución es estadísticamente significativa.

Cuando se compara las células transfectadas con uno u otro vector, se puede apreciar las diferencias significativas en la actividad enzimática de los lisados celulares cuando se ensaya en presencia de sustrato y de sustrato y análogo de AMPc. También las diferencias son significativas cuando se realizan los ensayos en presencia del inhibidor, con sustrato y en presencia o ausencia del análogo de AMPc.

En células HELA, la inhibición de la PKA del lisado celular por se muestra en la **figura 3.13**. En presencia del sustrato, la actividad de la enzima presente en los lisados de células que han sido transfectadas con el vector pCEFL-HA disminuye de 0.8 a 0.35 pmoles ^{32}P /minuto en presencia del PKI y esta diferencia no es significativa; en presencia del sustrato y del análogo del AMPc se observó una disminución de 2.4 a 0.05 pmoles ^{32}P /minuto y esta diferencia es significativa. En el caso de las células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, se aprecia una disminución de actividad al adicionar el PKI: en presencia del sustrato fue de 1.25 a 0.3 pmoles ^{32}P /minuto, siendo esta diferencia significativa, y se hace más evidente la inhibición al agregar el sustrato y el análogo de AMPc, en que la disminución fue de 5.7 a 0.08 pmoles ^{32}P /minuto, resultando una diferencia significativa.

3.5. Detección de las subunidades por Western Blots:

A continuación, se analizó la presencia de las subunidades de la PKA en los lisados celulares, en el líquido extracelular y en el medio condicionado tanto de células HEK293T como HELA transfectadas con los vectores pCEFL-HA o pcDNA3-HA.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Se determinó las proteínas totales para las dos líneas celulares (HEK293T y HELA) al ser transfectadas con los vectores pCEFL-HA o pcDNA3-HA, para utilizar la misma concentración de proteínas para los Western blot. Para la detección de la subunidad catalítica en células HEK293T, el lisado celular tenía 0.43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína en el caso

INHIBICIÓN POR PKI DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PKA EN EL LISADO CELULAR DE CÉLULAS HELA

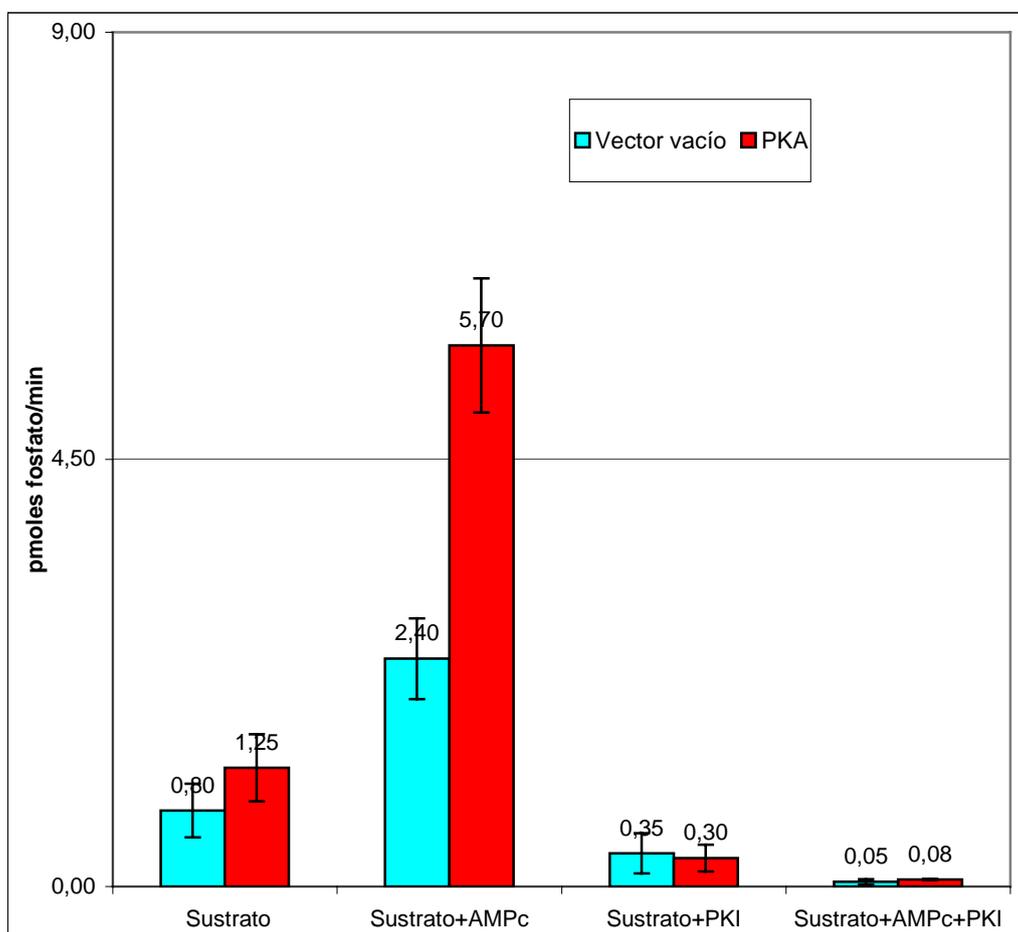


Figura 3.13. Efecto de PKI, inhibidor de PKA, sobre la actividad de la enzima en el lisado celular de células HELA. Se compara la actividad de PKA en el lisado de células transfectadas con el vector vacío (■) con la del lisado de células transfectadas con el vector que contiene el inserto para la subunidad cataítica de PKA (■). La actividad enzimática se determina utilizando Kemptide 300 μ M como sustrato, en presencia o ausencia de 16 μ g PKI o bien, usando Kemptide 300 μ M y 8-Bromoadenosina 3', 5'-monofosfato (análogo de AMPC) 0.5 μ M, con o sin la adición de 16 μ g PKI, según se señala en Materiales y Métodos.

de las células transfectadas con el vector pCEFL-HA y 0.48 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para aquellas transfectadas con el vector pcDNA3-HA. Para la detección de la PKA ectópica, el medio condicionado tenía 0.14 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el caso del vector pCEFL-HA y 0.16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para las células transfectadas con el vector pcDNA3-HA. Las muestras del líquido extracelular para detectar la PKA exógena tenía 0.31 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (vector pCEFL-HA) y 0.34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (vector pcDNA3-HA).

En la **figura 3.14** se muestra un western blot que corresponde a las muestras del lisado celular y del líquido extracelular de células HEK293T, transfectadas con los vectores pCEFL-HA o pcDNA3-HA. En el carril 1 (lisado celular) se observa una banda muy marcada de peso molecular aproximado de 40 KDa y en el carril 5 (líquido extracelular) una banda muy tenue con el mismo peso molecular, que corresponde al PM de la subunidad catalítica. Estas muestras corresponden a células transfectadas con el vector que contiene el cDNA de la subunidad catalítica de la PKA. Por el contrario, en los carriles 2 y 4 (lisado y medio extracelular, respectivamente) no se evidenció la presencia de la subunidad catalítica, lo cual está de acuerdo con el hecho de que se trata de células que han sido transfectadas con el vector vacío.

En resumen, se detectó la subunidad catalítica en el lisado celular (PKA endógena) y en el líquido extracelular (exo-PKA) de las células HEK293T que han sido transfectadas con el cDNA de la subunidad catalítica de la PKA o vector pcDNA3-HA.

En la **figura 3.15** se presenta un western blot de los inmunoprecipitados de las muestras del lisado celular y del medio condicionado, que corresponden al medio celular una vez que las células han sido tratadas con el sustrato Kemptide y el análogo de AMPc para liberar la PKA (ecto-PKA) de células transfectadas con los vectores pCEFL-HA y pcDNA3-HA. En el carril 1 se observa la presencia de una banda muy notoria con un peso molecular aproximado de 40 KDa y en el carril 5 una banda más tenue con el mismo peso molecular. Estas muestras corresponden al lisado celular y medio condicionado de células que sobreexpresan la subunidad catalítica. A su vez, en los carriles 2 y 4 no se evidenció ninguna banda correspondiente a la subunidad catalítica en concordancia con el hecho de que se trata del lisado celular y medio condicionado de células transfectadas con el vector vacío.

DETECCIÓN DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA EN LISADOS CELULARES Y LIBRE EN EL LÍQUIDO EXTRACELULAR DE CÉLULAS HEK293T

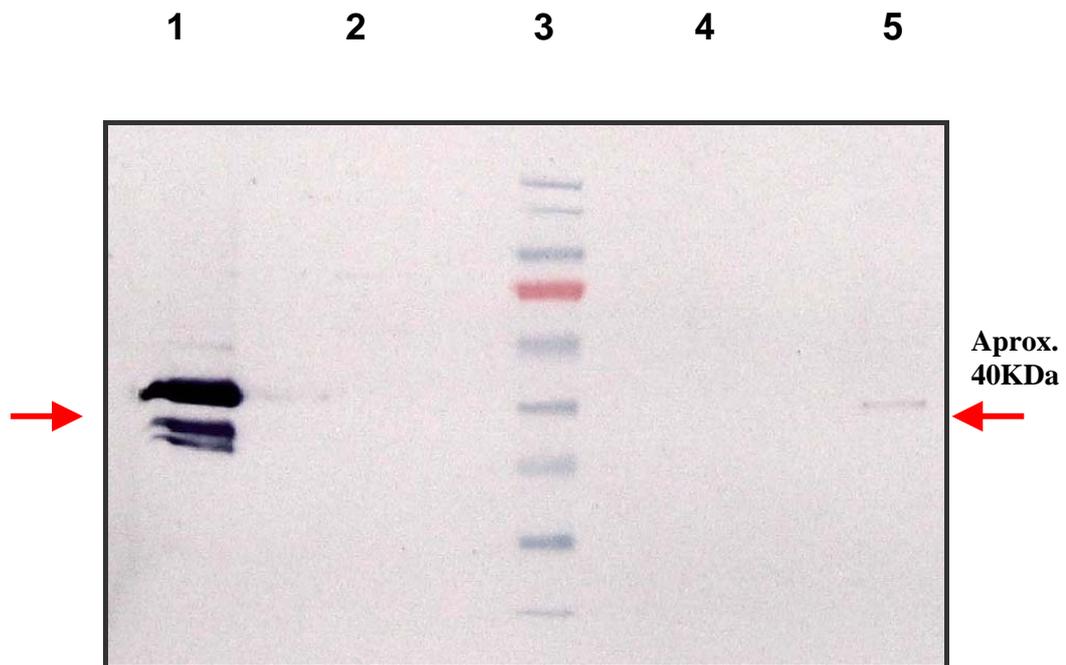


Figura 3.14. Detección por Western Blot de la subunidad catalítica en células HEK293T. Las muestras corresponden al líquido extracelular (exo-PKA) y a lisados celulares (endo-PKA) que fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-HA. Las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE al 10%, se transfirieron a una membrana de PVDF y se revelaron con el anticuerpo anti-HA: (1) Lisado de células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, (2) Lisado de células transfectadas con el vector pCEFL-HA; (3) Estándares de PM; (4) Líquido extracelular de células transfectadas con el vector pCEFL-HA y (5) Líquido extracelular de células transfectadas con el vector pcDNA3-HA.

DETECCIÓN DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA EN LISADOS CELULARES Y UNIDA A LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS HEK293T

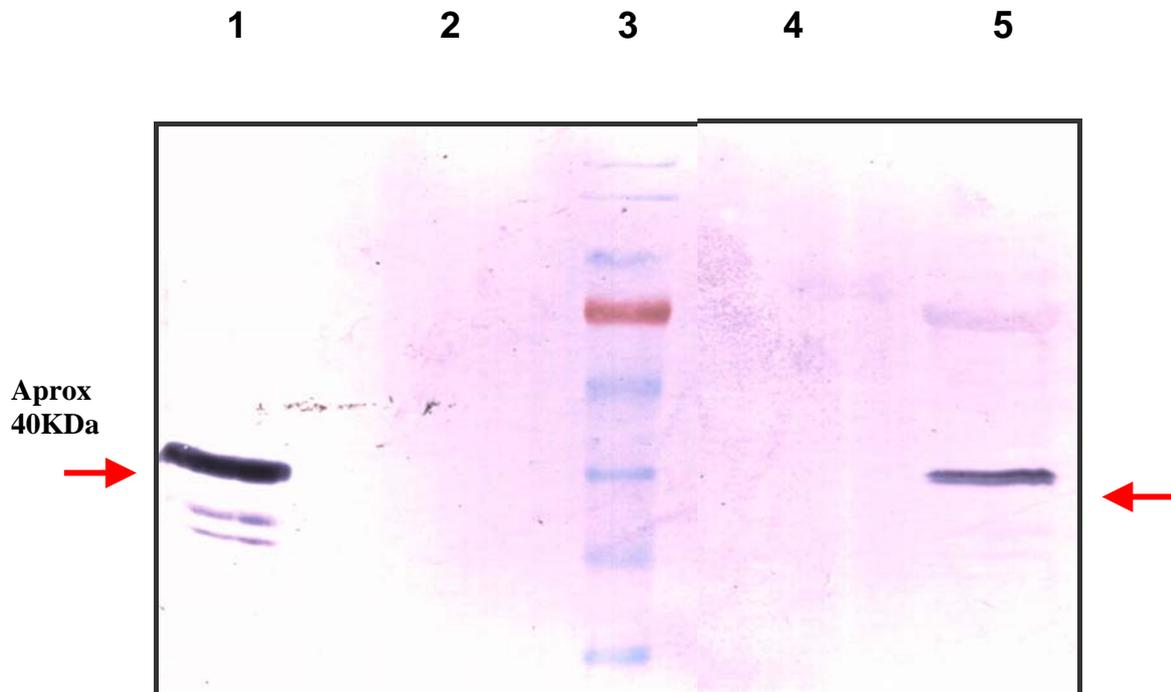


Figura 3.15. Detección por Western Blot de la subunidad catalítica en células HEK293T. Las muestras corresponden a lisados celulares (endo-PKA) que fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-HA y al medio condicionado (ecto-PKA). Las muestras se corrieron en un gel SDS -PAGE al 10%, se transfirieron a una membrana de PVDF y se revelaron con el anticuerpo anti-HA. (1) Lisado de células transfectadas con el vector pcDNA3-HA; (2) Lisado de células transfectadas con el vector pCEFL-HA; (3) Estándares de PM; (4) Medio condicionado de las células transfectadas con el vector pCEFL-HA y (5) Medio condicionado de células transfectadas con el vector pcDNA3-HA. Los medio condicionados corresponden a los medios de cultivo una vez que las células han sido sometidas al proceso de “shedding” con sustrato y el análogo de AMPc para liberar la ecto-PKA.

En la **figura 3.16** se muestra un western blot para detectar la presencia de la subunidad reguladora RI en células HEK293T en muestras no inmunoprecipitadas de lisados celulares, líquido extracelular y medio condicionado. En los carriles 1 y 2 se observa una banda que corresponde a la subunidad reguladora RI, con un peso molecular aproximado de 49 KDa, detectado en los lisados celulares de células transfectadas con cada vector. En los carriles 4 y 5 se ve una banda con un peso molecular aproximado de 89 KDa que corresponde a la holoenzima, presente en los líquidos extracelulares de células transfectadas con cada vector. En el carril 6 (medio condicionado, vector vacío) no se observó banda alguna que corresponda a la subunidad reguladora RI, y finalmente en el carril 7 (medio condicionado, vector pcDNA3-HA) se observó una banda que corresponde a la subunidad reguladora RI con un peso molecular aproximado de 49 KDa.

En resumen, se detectó la subunidad reguladora RI de la PKA en el lisado celular de células transfectadas con los dos vectores y en la cara externa de la membrana plasmática de las células HEK293T que han sido transfectadas con el cDNA de la subunidad catalítica de la PKA o vector pcDNA3-HA. Así mismo, en el líquido extracelular también se detecta la subunidad reguladora RI con un ligero aumento en su PM de 49 KDa a 54 KDa, que podría corresponder a una forma glicosilada.

En la **figura 3.17** se muestra un western blot para detectar la presencia de la subunidad reguladora RI en muestras no inmunoprecipitadas de células HELA. Los resultados fueron los siguientes: en los carriles 1 y 2 (lisado celular, vector pcDNA3-HA y vector vacío) se observó una banda que corresponde a la subunidad reguladora RI con un peso molecular aproximado de 49 KDa; en los carriles 4 y 5 (líquido extracelular, vector vacío y pcDNA3-HA) se ve la subunidad reguladora RI con un peso molecular aproximado de 54 KDa; en el carril 6 (medio condicionado, vector vacío) no se observó ninguna banda correspondiente a la subunidad reguladora RI y finalmente en el carril 7 se observó una única banda correspondiente a la subunidad RI con un peso molecular aproximado de 49 KDa (medio condicionado, vector pcDNA3-HA). Así, en el caso de las células HELA se detectó la subunidad reguladora RI de la PKA tanto en el lisado celular y como en la cara externa de la membrana plasmática de las células que han sido transfectadas con el cDNA de la subunidad catalítica de la PKA o vector pcDNA3-HA. En el líquido extracelular también se detectó la subunidad reguladora RI, pero se observa un ligero aumento en su PM de 49 KDa a 54 KDa, lo que puede corresponder a

**DETECCIÓN DE LA SUBUNIDAD REGULADORA RI EN
LISADOS CELULARES, LIBRE EN EL MEDIO EXTRACELULAR
Y UNIDA A LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS
HEK293T**

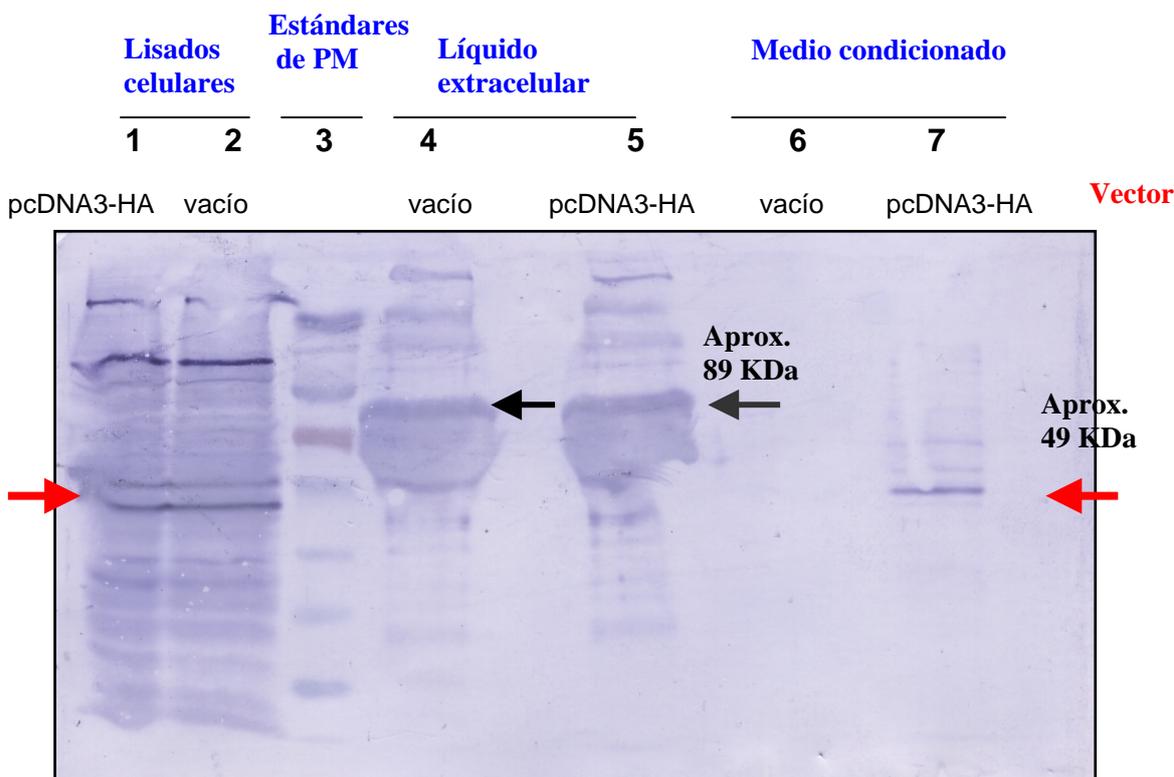


Figura 3.16. Detección por Western Blot de la subunidad reguladora RI en células HEK293T. Las muestras corresponden a lisados celulares (endo-PKA), líquido extracelular (exo-PKA) y medio condicionado (ecto-PKA) sin inmunoprecipitar. Las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE al 10%, se transfirieron a una membrana de PVDF y se revelaron con el anticuerpo anti-RI: (1) Lisado celular de células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, (2) Lisado celular de células transfectadas con el vector pCEFL-HA, (3) Estándares de PM, (4) Líquido extracelular de células transfectadas con el vector pCEFL-HA, (5) Líquido extracelular de células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, (6) Medio condicionado de células transfectadas con el vector pCEFL-HA y (7) Medio condicionado de células transfectadas con el vector pcDNA3-HA. Los medios condicionados corresponden a los medios de cultivo post-tratamiento de las células con sustrato y el análogo de AMPc para liberar la ecto-PKA.

DETECCIÓN DE LA SUBUNIDAD REGULADORA RI EN LISADOS CELULARES, LIBRE EN EL MEDIO EXTRACELULAR Y UNIDA A LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS HELA

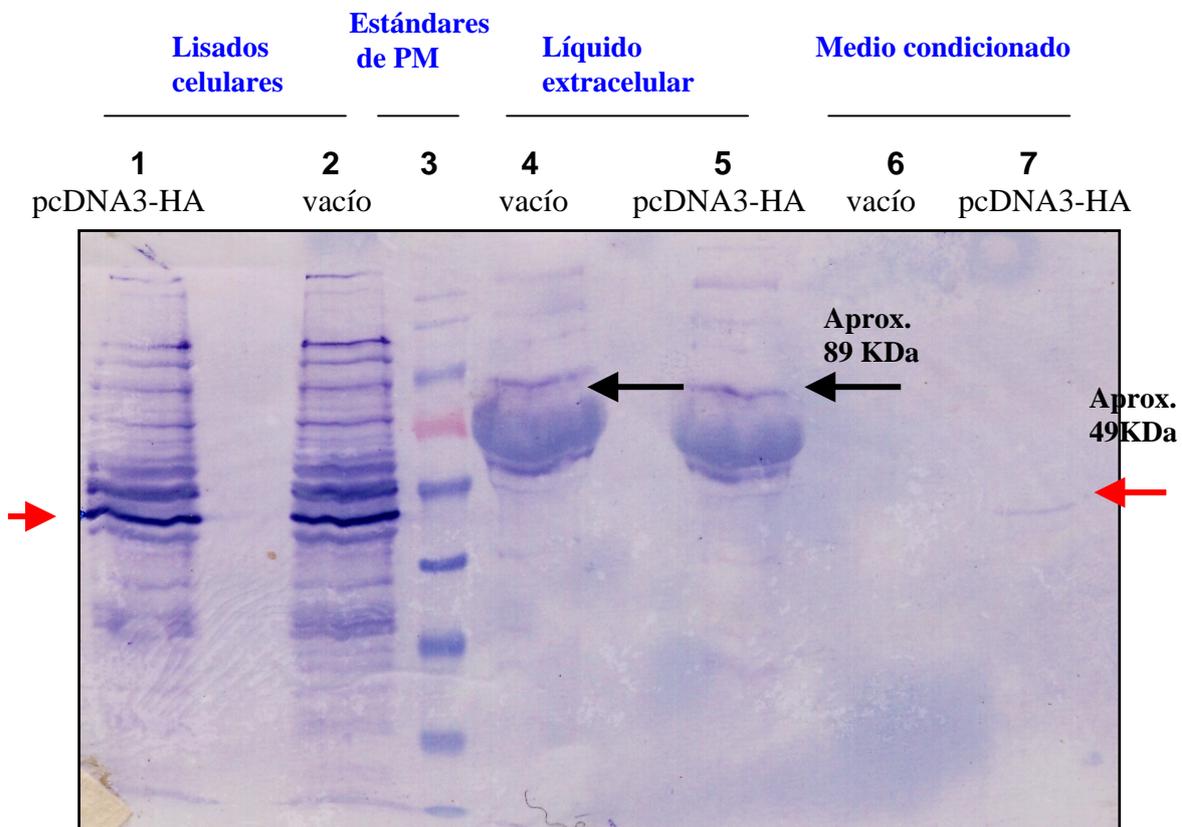


Figura 3.17. Detección por Western Blot de la subunidad reguladora RI en células HELA. Las muestras corresponden a lisados celulares (endo-PKA), líquido extracelular (exo-PKA) y medio condicionado (ecto-PKA) sin inmunoprecipitar. Las muestras se corrieron en un gel SDS -PAGE al 10%, se transfirieron a una membrana de PVDF y se revelaron con el anticuerpo anti-RI: (1) Lisado celular de células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, (2) Lisado celular de células transfectadas con el vector pCEFL-HA; (3) Estándares de PM, (4) Líquido extracelular de células transfectadas con el vector pCEFL-HA, (5) Líquido extracelular de células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, (6) Medio condicionado de células transfectadas con el vector pCEFL-HA y (7) Medio condicionado de células transfectadas con el vector pcDNA3-HA. Los medios condicionados corresponden a los medios de cultivo post-tratamiento de las células con sustrato y el análogo de AMPc para liberar la ecto-PKA.

una forma glicosilada.

3.6. Detección de las subunidades por Inmunofluorescencia:

La presencia de la subunidad catalítica en la cara externa de la membrana plasmática de células HEK293T se evidenció también por el método de Inmunofluorescencia indirecta. Primero se realizó un control de células transfectadas con el vector vacío (pCEFL-HA) e incubando las células con el anticuerpo primario anti-HA IgG de ratón (F7) y el anticuerpo secundario anti-HA IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), no observándose la subunidad catalítica (**figura 3.18**).

A su vez, en células HEK293T transfectadas con el vector pcDNA3-HA e incubadas con el anticuerpo primario anti-HA IgG de ratón (F7) y con el anticuerpo secundario anti-HA IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), se parecía la localización de la subunidad catalítica en la cara externa de la membrana plasmática (**figura 3.20**).

En la **figura 3.21**, se observa algunas células HEK293T que fueron transfectadas con el vector de la pcDNA3-HA y que se lisaron durante los procedimientos de incubación permitiendo evidenciar las subunidades catalíticas en el interior de las células, observando un elevado porcentaje de subunidad catalítica en el interior de ellas comparado con la subunidades catalíticas presentes en la cara externa de la membrana plasmática. Algunos ensayos fueron realizados con tinción Hoescht para visualizar el núcleo.

Para analizar la presencia de la subunidad reguladora RI en la membrana plasmática de las células HEK293T transfectadas con el vector vacío o pCEFL-HA como control, se realizó incubaciones con el anticuerpo primario anti-RI IgG de ratón y con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), y se pudo observar la ausencia de la subunidad reguladora RI en la cara externa de la membrana (**figura 3.19**).

Para analizar la presencia de la subunidad reguladora RI en la cara externa de la

DETECCIÓN CONTROL DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA DE PKA EN CÉLULAS HEK293T

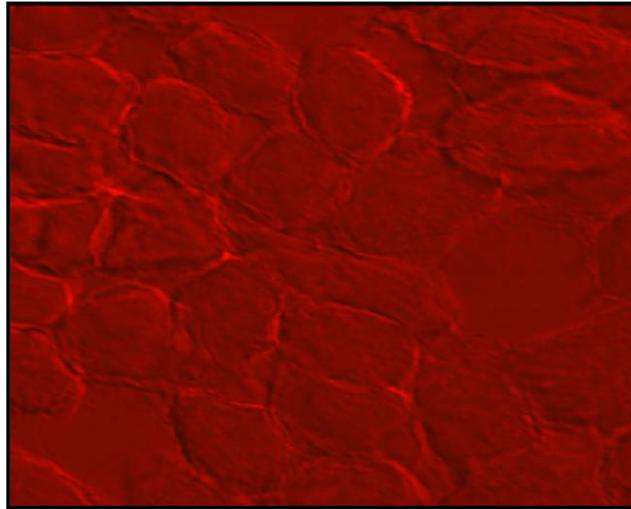


Figura 3.18. Células HEK293T transfectadas por el vector pCEFL-HA o vector vacío (control). Incubación con el anticuerpo primario Anti-HA IgG de ratón (F7) y con el anticuerpo secundario Anti- IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

DETECCIÓN CONTROL DE LA SUBUNIDAD REGULADORA RI EN CÉLULAS HEK293T

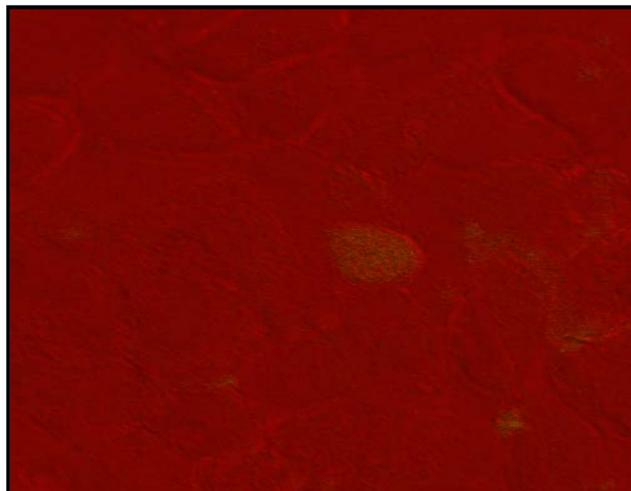


Figura 3.19. Células HEK293T transfectadas con el vector pCEFL-HA o vector vacío (control). Incubación con el anticuerpo primario Anti -RI de ratón IgG y con el anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

DETECCIÓN DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS HEK293T

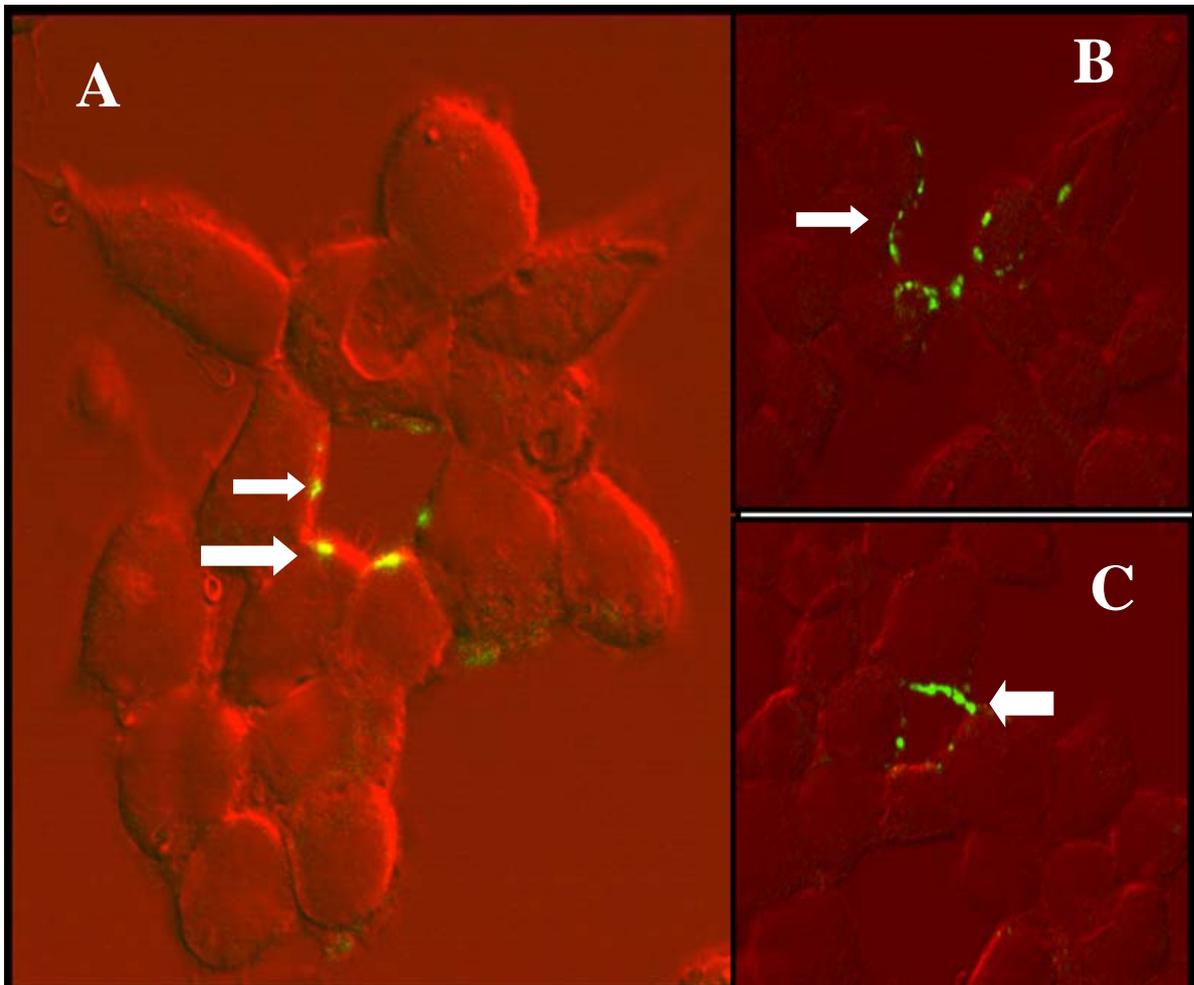


Figura 3.20. Células transfectadas con el vector pcDNA3-HA fueron incubadas con el anticuerpo primario Anti-HA IgG de ratón (F7) y con el anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). En los cuadros **A**, **B** y **C**, se observa la subunidad catalítica en la cara externa de la membrana de células HEK293T, indicada con flechas en color blanco.

DETECCIÓN DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA EN EL INTERIOR DE CÉLULAS HEK293T

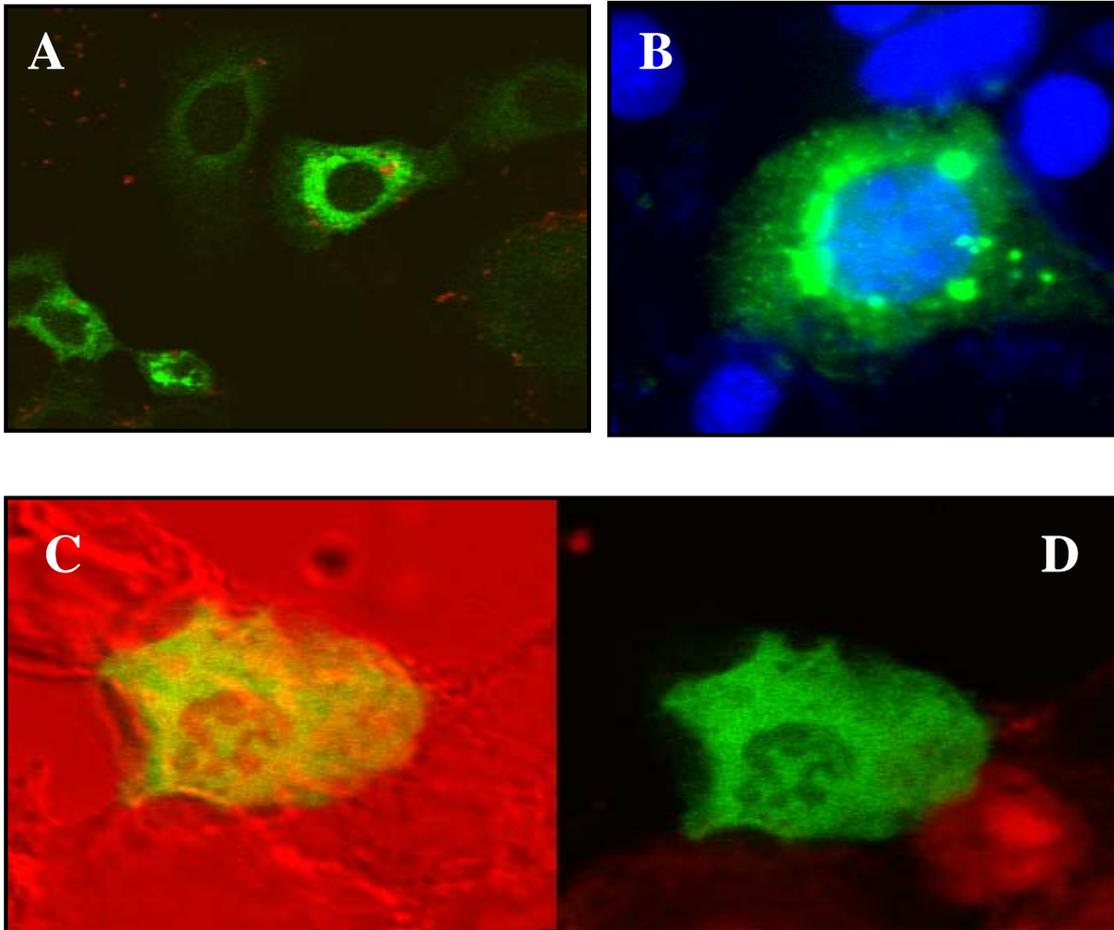


Figura 3.21. Células HEK293T transfectadas con el vector pcDNA3-HA fueron incubadas con el anticuerpo primario Anti-HA IgG de ratón (F7) y con el anticuerpo secundario Anti- IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). En el cuadro **A**, se observa las subunidades catalíticas (color verde). En el cuadro **B**, se observa las subunidades catalíticas alrededor del núcleo teñido con Hoescht (color azul). En **C** y **D**, se observa las subunidades catalíticas en dos campos.

membrana plasmática de las células HEK293T transfectadas con el vector pcDNA3-HA, las células fueron incubadas con anticuerpo primario anti-RI IgG de ratón y con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). En la **figura 3.22**, se puede observar la presencia de la subunidad reguladora RI en la cara externa de la membrana celular y en el interior de las células, diferenciando con yoduro de propidio el núcleo.

También se observó la colocalización de la subunidad reguladora RI y de la subunidad catalítica en el exterior de la membrana plasmática de las células HEK293T transfectadas con el vector pcDNA3-HA (**figura 3.23**) indicada por la cofijación de los anticuerpos primarios (anti-RI IgG de ratón y el anti-HA de conejo) y anticuerpos secundarios (el anticuerpo anti-RI de ratón conjugado con rodamina y el anticuerpo anti-HA IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína- FITC). Cuando se utilizan dos fluoróforos de dos longitudes de onda diferentes como el FITC evidenciado en color verde detectando a la subunidad catalítica y la rodamina de color rojo evidenciando a la subunidad reguladora. Al colocarse estas dos subunidades, se aprecian de color rojo y verde las subunidades reguladora y catalítica, respectivamente; pero también de color amarillo cuando ambos fluoróforos tienen una distancia menor de 200 micrones, pero no se debe a que las subunidades estén superpuestas o unidas.

DETECCIÓN DE LA SUBUNIDAD REGULADORA RI EN CÉLULAS HEK293T

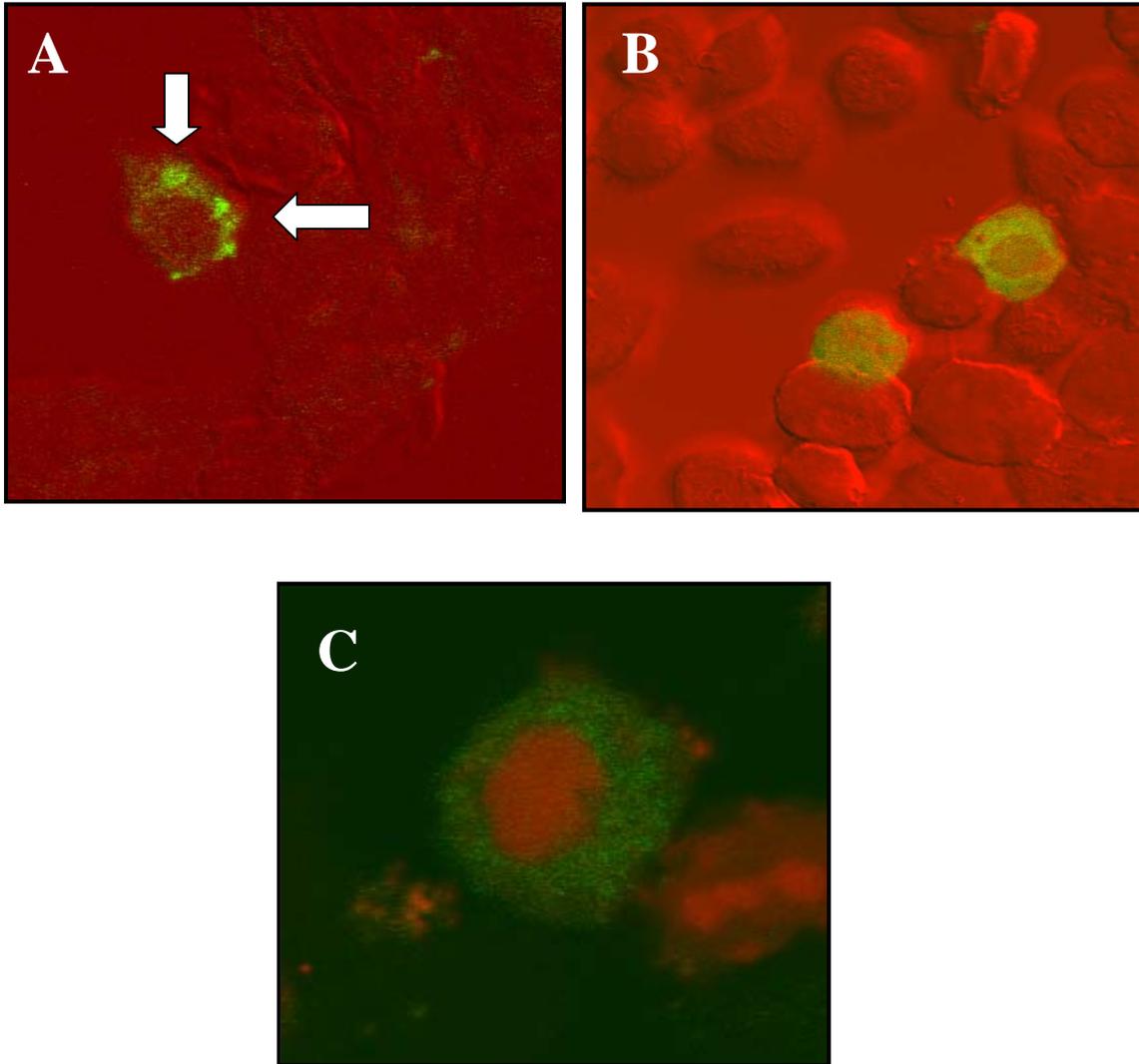


Figura 3.22. Se observa la subunidad reguladora RI presente en el exterior de la membrana plasmática de las células HEK293T transfectadas con el vector pcDNA3-HA, e incubadas con el anticuerpo primario Anti-RI IgG de ratón (F7) y con el anticuerpo secundario Anti- IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC); **A.** Las flechas blancas indican la subunidad reguladora RI en la cara externa de la membrana plasmática, **B** y **C.** El núcleo teñido con yoduro de propidio.

DETECCIÓN DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA Y REGULADORA RI EN CÉLULAS HEK293T

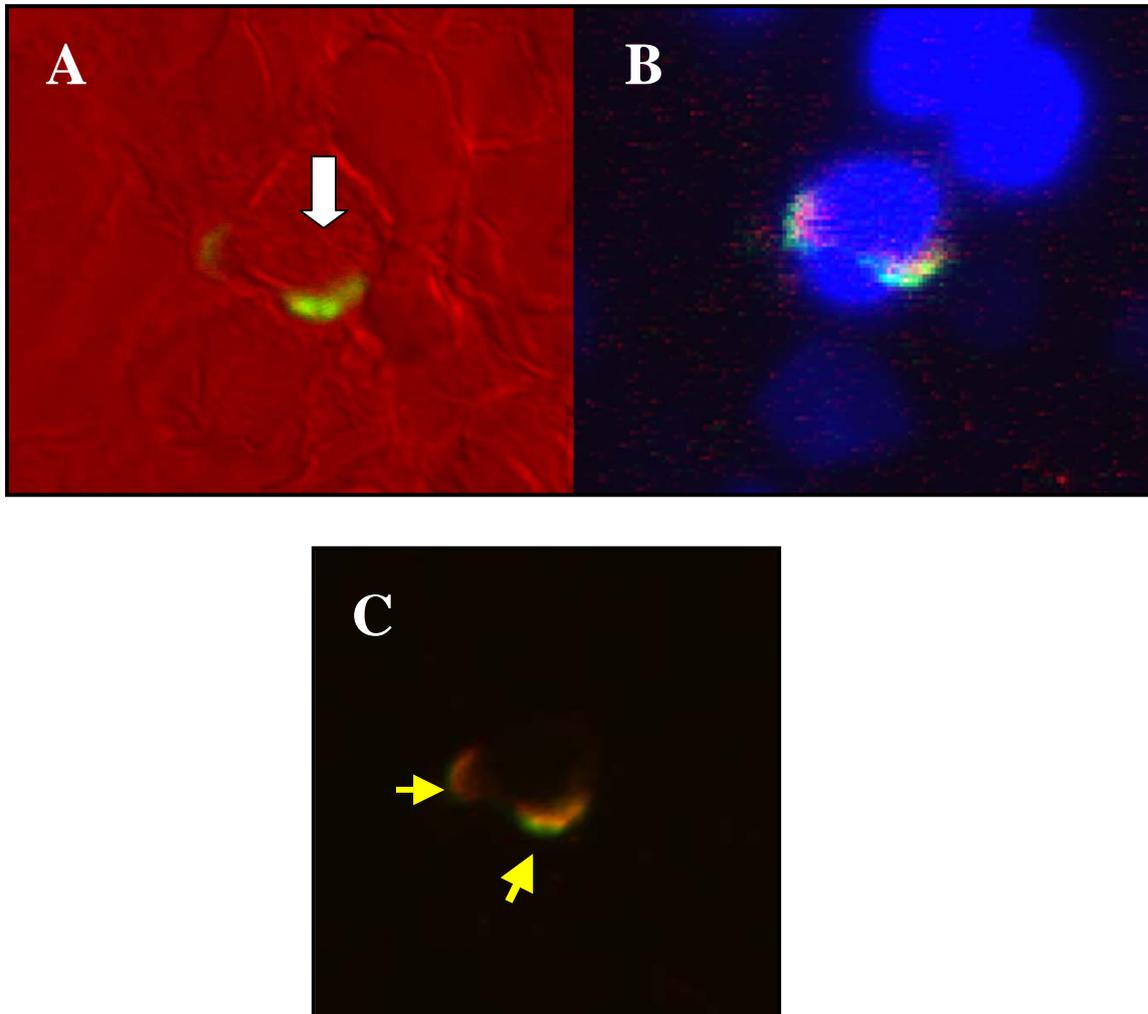


Figura 3.23. Colocalización en las células HEK293T de las subunidades catalítica y reguladora RI en células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, **A.** Presencia de la subunidad catalítica en el exterior de la membrana plasmática indicada con una flecha blanca, **B.** Célula permeabilizada donde se ve el núcleo azul por la tinción Hoescht, la subunidad catalítica en color verde y la subunidad reguladora en color rojo en forma muy tenue, **C.** Las flechas amarillas muestran la colocalización de subunidad catalítica (color verde por la incubación con el FITC), y de la subunidad reguladora (color rojo por la incubación con la rodamina) dando un color amarillo.

CAPITULO IV. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS:

Existe numerosa evidencia experimental que demuestra la presencia de actividad ectoquinasa en el lado externo de la membrana celular. Hay también numerosos indicios de que esta actividad enzimática juega un papel fisiológico importante en las interacciones célula-célula, movimiento celular y unión de células a la matriz extracelular (Taylor y col., 1989; Walsh y col., 1994). Por otra parte, también se han encontrado exoquinasas, libres en el medio extracelular (Erlich y col., 1984; Pryerin y col., 1986). Una de estas actividades proteína quinasa corresponde a la proteína quinasa dependiente del AMPc.

Este trabajo se enfocó en el estudio de la exportación de la subunidad catalítica de la PKA, con el fin de conocer más acerca del mecanismo de este proceso, a través del análisis de la localización de esta enzima luego de su sobreexpresión en células humanas que han sido transfectadas con el cDNA que codifica para dicha subunidad catalítica. Para ello se utilizaron células embrionarias de riñón HEK293T y células de carcinoma cervical HELA, las cuales destacan por su alta eficiencia de transfección, y se logró transfectar con éxito el vector pcDNA3-HA, obteniéndose una elevada síntesis de la subunidad catalítica de la PKA.

4.1. PKA unida a la membrana o ecto-PKA:

Cuando se realiza un western blot de muestras de lisado celular, medio condicionado o líquido extracelular correspondientes a células HEK293T transfectadas con el pCEFL-HA (vector vacío), no se detecta la subunidad catalítica recombinante en ningún caso al revelar con anticuerpos anti-HA, como era de esperar. La etiqueta de hemoaglutinina (HA) nos permite diferenciar la subunidad catalítica sobreexpresada de la sintetizada normalmente por la célula.

Así las actividades obtenidas con células transfectadas con el vector vacío constituyen los controles para los ensayos realizados con células transfectadas con el vector pcDNA3-HA, que contiene el cDNA para la subunidad catalítica de PKA.

Cuando las células HEK293T, a las 20 horas postranfección, se incuban con el sustrato durante 3 minutos, se libera al medio la PKA unida a la cara externa de la membrana plasmática o ecto-PKA. En el caso del medio condicionado correspondiente a las células transfectadas con el vector pCEFL-HA o vector vacío, y tratadas con el

péptido sustrato durante 3 minutos, la actividad enzimática encontrada (0.3 pmoles $^{32}\text{P}/\text{min}$) representa la actividad enzimática propia de las células.

La actividad de ecto-PKA en el medio condicionado correspondiente a células HEK293T transfectadas con el vector pcDNA3-HA y tratadas durante 3 minutos con Kemptide (3.6 pmoles $^{32}\text{P}/\text{min}$) fue notoriamente mayor que en el caso del experimento control, lo cual era esperable dado la sobreexpresión en las células de la subunidad catalítica de PKA. Cabe mencionar que para este ensayo de actividad, el medio condicionado no fue inmunoprecipitado con anticuerpos anti-HA, de modo tal que no podemos distinguir actividad ecto-PKA correspondiente a subunidad catalítica sobreexpresada de aquella debida a enzima endógena.

Sin embargo, gracias al epítipo de hemaglutinina (HA), se pudo demostrar la presencia de la subunidad catalítica recombinante en la cara externa de la membrana de células HEK293T transfectadas con el vector pcDNA3-HA, mediante inmunoblotting con anticuerpos anti-HA, en el cual se pudo apreciar la aparición de una banda de peso molecular de 40 KDa en muestras de medio condicionado. Así mismo, mediante el uso de microscopía de inmunofluorescencia confocal se pudo también detectar en la cara externa de la membrana de las células HEK293T las subunidades catalíticas sobreexpresadas tras la transfección.

De estos experimentos podemos concluir que la subunidad catalítica sobreexpresada en células HEK293T es exportada hacia el exterior de la célula, detectándose unida a la cara externa de la membrana plasmática.

Estos experimentos requieren de un cuidadoso control para estar seguros que la fracción de enzima que se detecta externamente no es debido a lisis celular. En este sentido, bajo las mismas condiciones que se usaron para detectar la subunidad catalítica de la PKA, tanto en el medio condicionado y como en el líquido extracelular no se detectó α -actina, una proteína muy abundante en la célula, al utilizar anticuerpos específicos. Este resultado nos indica que no hay lisis de las células durante los experimentos. Además, se sabe que el péptido Kemptide, utilizado en este trabajo para el “shedding”, es un compuesto citofílico que no causa daño a la membrana celular (Kübler y col., 1986).

Un resultado importante es el que se obtuvo al estudiar el efecto de un análogo de AMPc sobre la actividad de la ecto-PKA. Llama la atención que la actividad determinada en el medio condicionado aumenta en forma significativa al agregar el análogo de AMPc además del sustrato. Esto está indicando la presencia de la

holoenzima en la cara externa de la membrana plasmática, de forma tal que una fracción la subunidad catalítica que aparece como ecto-PKA debe estar conformando el tetrámero con subunidades reguladoras endógenas. Esto porque el AMPc sólo ejerce su efecto sobre la holoenzima, dado que su acción consiste en unirse a las subunidades reguladoras que conforman el tetrámero, generando un cambio conformacional en la molécula que provoca la disociación de ella y la liberación de las subunidades catalíticas activas.

Si existe PKA sobreexpresada que se encuentra en el exterior de la membrana plasmática conformando el tetrámero con subunidades reguladoras endógenas, entonces deberíamos encontrar subunidad reguladora en el medio condicionado, después del “shedding”, tal como ocurre con la subunidad catalítica. Al realizar un Western blot de muestras de medio condicionado de células HEK293T que sobreexpresan la subunidad catalítica, se detectó la presencia de subunidad reguladora RI al revelar con anticuerpos específicos anti-RI, demostrando su localización a nivel de la parte externa de la membrana plasmática. A su vez, también por microscopía de inmunofluorescencia indirecta se pudo detectar la subunidad reguladora RI en el exterior de la membrana plasmática y se pudo además comprobar que colocaliza con la subunidad catalítica.

En el caso de los estudios realizados con las células HELA, éstas también fueron transfectadas con el vector pCEFL-HA o vector vacío y sirvieron como controles de los experimentos con las células HELA transfectadas con el vector pcDNA3-HA.

Cuando las células HELA se transfectaron con pcDNA3-HA y se preincubaron con el sustrato por 3 minutos, se observó en el medio condicionado no inmunoprecipitado una actividad enzimática significativamente mayor que en el caso de las células transfectadas con el vector vacío, reflejando la sobreexpresión de la subunidad catalítica. Esta actividad se incrementó considerablemente en presencia del análogo de AMPc, lo cual, al igual que en el caso de las células HEK293T, estaría indicando la presencia de PKA en forma de holoenzima en el lado extracelular de la membrana plasmática. Al realizar un Western blot del medio condicionado, se detecta la presencia de la subunidad reguladora RI.

Por lo tanto en ambos tipos de células, HEK293T y HELA, se pudo comprobar la presencia de la subunidad catalítica en la cara externa de la membrana celular y resultan relevantes los hallazgos que indican la presencia de PKA en forma de holoenzima.

No se conoce el mecanismo por el cual la PKA es exportada hacia el exterior de la célula. Existe información que señala que la holoenzima llegaría a la membrana

plasmática por un proceso de exocitosis y se tienen evidencias de que la subunidad reguladora RII estaría asociada a la membrana de gránulos secretorios producidos por el aparato de Golgi, lo que podría indicar que la PKA sale del retículo endoplasmático para dirigirse al Golgi y salir como gránulos secretorios hacia la cara externa de la membrana (Hausken y col., 1996; Ehrlich y col., 1990). Es importante determinar a futuro si la enzima es exportada como holoenzima o como subunidades libres.

Existen antecedentes en la literatura sobre otra proteína quinasa multimérica, la proteína quinasa CK2, que sólo es exportada si está en forma de holoenzima. En el caso de esta enzima, se pudo establecer que la holoenzima expresada ectópicamente, compuesta por subunidades catalíticas y reguladoras, puede ser exportada de las células HEK293T, mientras que la subunidad catalítica y la subunidad reguladora libres no se exportan en forma detectable (Rodríguez y col., 2005).

Otro aspecto interesante con respecto a las ecto-proteína quinasa y su liberación de la membrana mediante el proceso de “shedding” es saber cómo estas enzimas se encuentran unidas a la cara externa de la membrana celular. El hecho de que sean liberadas mediante el tratamiento con el sustrato sugiere que la unión puede involucrar el dominio de reconocimiento de sustrato de la enzima y así, la competencia por este sitio por la presencia de un sustrato externo podría provocar la liberación de la enzima (Kübler y col., 1989). También es posible que la unión del sustrato a la enzima provoque un cambio conformacional en ella que gatille su liberación (Taylor y col., 1990; Kempt y col., 1977).

Ahora bien, con respecto a la presencia de ATP y AMPc en el medio extracelular para que se pueda manifestar la actividad enzimática existen evidencias de que existiría translocación del ATP intracelular hacia el exterior de la célula (Ehrlich, 1996; Kübler, 1992). Tampoco se puede descartar que tanto el ATP como el AMPc provengan de células muertas que liberen su contenido intracelular (Dorskland y col., 1981; Beebe y col., 1986).

4.2. PKA libre en el líquido extracelular o exo-PKA:

La presencia de la PKA exógena o libre en el líquido extracelular donde se cultivaron las células HEK293T que han sido transfectadas con el vector vacío o con el vector pcDNA3-HA fue analizada mediante ensayos de western blot y de actividad enzimática con el péptido sustrato específico.

En cuanto a la actividad enzimática, en el caso de las células HEK293T se encontró un aumento importante al comparar el líquido extracelular de las células que sobreexpresan PKA con el de aquellas transfectadas con el vector vacío (0.4 contra 0.01 pmoles $^{32}\text{P}/\text{min}$), ensayadas en presencia de sustrato. En este caso, los ensayos se realizaron con el líquido extracelular inmunoprecipitado con anticuerpos anti-HA, por lo tanto, estamos detectando sólo la enzima recombinante.

En presencia del sustrato, la adición de AMPc produce un aumento de la actividad enzimática en el líquido extracelular de las células que sobreexpresan la subunidad catalítica (0.7 contra 0.4 pmoles $^{32}\text{P}/\text{min}$), indicándonos la presencia de la PKA en forma de holoenzima a nivel extracelular. Cabe señalar que las diferencias en ambos casos resultaron ser no significativas, aun cuando en el caso de las actividades medidas en presencia de sustrato el aumento es de 40 veces.

Al observar los western blot realizados con el líquido extracelular inmunoprecipitado con anticuerpos anti-HA podemos ver la presencia de subunidad catalítica recombinante que se detecta libre en el medio extracelular con un peso molecular de 40 Kda y el segundo aspecto es que cuando se detectó la subunidad reguladora RI en el extracelular se pudo observar que estaba unida a la catalítica en su mayoría.

Los resultados obtenidos con células HELA son similares, con la diferencia de que estas células aparentemente presentan una mayor presencia de subunidad catalítica propia.

Una forma de comprobar si es la subunidad catalítica la que se está detectando, es utilizar en los ensayos de actividad el inhibidor de PKA, PKI. Se procedió a realizar las mediciones de actividad en el líquido extracelular de las dos líneas celulares, demostrándose una clara inhibición tanto al incubarse con el sustrato como al incubarse con el sustrato y el AMPc, confirmando de esta forma que estamos frente a la actividad de la subunidad catalítica exógena.

4.3. PKA del lisado celular o PKA endógena:

La actividad enzimática de la PKA endógena que presenta en el lisado celular de las células HEK293T transfectadas con el vector pcDNA3-HA, medida en presencia de Kemptide, es mucho mayor que comparada con la determinada en el lisado celular de

células transfectadas con el vector pCEFL-HA (20.9 contra 1.4 pmoles $^{32}\text{P}/\text{min}$) y esta diferencia es significativa. Esto indica que nuestro protocolo de transfección funciona eficientemente y así mismo demuestra que existe una población de subunidad catalítica recombinante mucho mayor a la propia de la célula. Para comprobar si una fracción de estas subunidades catalíticas estaban unidas a subunidades reguladoras en el medio intracelular, se agregó el análogo de AMPc, observándose un aumento significativo de la actividad.

También las células controles presentan una cantidad de subunidad catalítica conformando la holoenzima y los valores de actividad con el sustrato y con éste y el análogo de AMPc son mucho mayores en comparación a la exógena y la ectópica, como era de esperar.

La actividad enzimática de la PKA endógena en el lisado celular de las células HELA que fueron transfectadas con el vector pcDNA3-HA, medida en la presencia del sustrato, presenta una diferencia que es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al ser comparada con la de las células transfectadas del vector pCEFL-HA, lo que demuestra nuevamente una eficiente transfección. Al agregar el análogo de AMPc para observar si existe subunidad catalítica unida a subunidad reguladora, podemos ver un aumento significativo de la actividad. A diferencia de las HEK293T, en las células HELA se observa que existe una fracción pequeña de subunidades catalíticas endógenas libres y unidas que podría estar indicando que estas células promueven la direccionalidad de la enzima tanto a la membrana como al exterior.

Si queremos resumir los resultados de actividad producto de la transfección, podemos decir que se observó una mayor actividad enzimática de PKA en la fracción endógena, seguida de la fracción ectópica y la que presentó la menor actividad es la fracción exógena.

La PKA no posee péptido señal que le sirva para su ubicación y localización a nivel celular, es un problema de tráfico proteico intra y extracelular, fenómeno que tiene muchos aspectos desconocidos hasta la fecha. Hoy sabemos que muchas patologías se originan por errores cometidos en algunos pasos durante el tráfico (Blobel, 1999). Las proteínas recién sintetizadas contarían con una especie de señal intrínseca, o señal topogénica, que sería esencial para que la proteína pueda llegar al organelo correcto, determinando así su destino. El conocimiento de señales topogénicas podría ayudar al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Más experimentos serán necesarios para evaluar los posibles efectos de la PKA exógena sobre características del crecimiento celular, en la progresión de tumores y de metástasis (Cvijic, 2000). y confirmar lo señalado por Taylor en 2005, en el sentido que una PKA mal regulada puede causar muchas enfermedades, entre ellas el cáncer. Este trabajo entrega evidencias de que la PKA regulada por AMPc puede ser detectada en el medio extracelular de células humanas en cultivo y este tipo de estudios puede proporcionar la base para un innovador acercamiento al diagnóstico del cáncer y al seguimiento del curso de la enfermedad, así como para constituirse en un marcador pronóstico para el cáncer.

Como se señaló en la Introducción, la PKA ectópica esta siendo investigada en la actualidad por su relevancia en estudios ligados al cáncer, ya que está presente en el suero de pacientes y en cultivos de células cancerosas por lo que se decidió en esta tesis estudiar la localización y posible exportación de la subunidad catalítica de la PKA sobreexpresada en células humanas en cultivo normales (HEK293T) y cancerosas (HELA) transfectadas con el vector pcDNA3-HA.

Sabemos que muchas de las proteínas de adhesión celular que participan en la uniones estrechas, entre ellas caderinas, α y β cateninas, etc., se destabilizan ante las fosforilación por proteína quinasas, haciendo que se pierda la adhesión celular, lo cual sería muy beneficioso en la migración e invasión celular.

Dentro de las dificultades de esta tesis estuvo el manejo de las desviaciones estándares de las muestras, las cuales fueron grandes y por eso en algunos casos se observa una gran diferencia entre dos condiciones diferentes, pero dicha diferencia resulta no ser estadísticamente significativa. Esto se resuelve realizando un mayor número de ensayos en estudios futuros.

CAPITULO V. CONCLUSIONES

- 1 En las células HEK293T y en las células HELA transfectadas con el vector pcDNA3-HA que contiene el gen de la subunidad catalítica de la PKA, se evidenció la presencia de la PKA exógena o libre fuera de la célula y la PKA ectópica o en la cara externa de la membrana plasmática.
- 2 En las células HEK293T y las HELA transfectadas con el gen de la PKA, se evidenció la posible salida de la holoenzima por el aumento en forma significativa al agregar el análogo de AMPc además del sustrato.
- 3 Se demostró que en células HEK293T y HELA transfectadas con el gen de la PKA y en presencia del sustrato Kemptide, la subunidad catalítica se encuentra unida a la subunidad reguladora RI y por efecto de un proceso conocido como “shedding”, el cual consiste en la liberación de la enzima al saturar el medio con sustrato, existirá una competencia de acceso al sitio de reconocimiento de la enzima y esta es liberada.
- 4 En las células HEK293T y las HELA transfectadas con el gen de la subunidad catalítica de la PKA, se confirmó que la actividad enzimática era específica de la subunidad catalítica mediante la utilización del inhibidor PKI.
- 5 Mediante inmunoblotting se identificó a la subunidad catalítica y reguladora RI de la PKA en el extracelular, en la membrana celular y en el intracelular en células HEK293T y en HELA y por microscopía de inmunofluorescencia indirecta se identificó a la subunidad catalítica y reguladora RI en la membrana y en el intracelular en células HEK293T.
- 6 La actividad enzimática de la PKA se correlaciona a la concentración de la PKA inmuno-detectada. Presentándose la PKA endógena como aquella con mayor actividad, seguida de la ectópica y finalmente la exógena.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Adams S R, Harootunian AT, Buechler YJ, Taylor SS and Tsien RY. 1991. *Fluorescence ratio imaging cyclic AMP in single cells*. Nature; 349: 649- 647.
2. Anjard C, Etchebehere L, Stéphane P, Véron M and Reymond C. 1993. *An unusual catalytic subunit for the cAMP-Dependent protein kinase of Dictyostelium discoideum*. Biochemistry; 32, 9532-9538.
3. Beebe SJ, and Corbin JD. 1986. *Cyclic nucleotide-dependent protein kinases*. Enzymes; 17: 43-111.
4. Beebe SJ, Oyen O, Sandberg M, Froyso A, Hansson V and Jahnsen T. 1990. *Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C γ) from human testis-representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP –dependent protein kinase*. Molec. Endocr; 4: 465-475.
5. Bossemeyer D, Richard A. Engh, Andreas Girod, Volker Kinzel, Robert Huber. y col., 1994. *PROTEIN CHEMISTRY AND STRUCTURE: Crystal Structures of Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase in Complex with Isoquinolinesulfonyl Protein Kinase Inhibitors H7, H8, and H89. STRUCTURAL IMPLICATIONS FOR SELECTIVITY*. J. Biol. Chem., Oct 1996; 271: 26157 - 26164.
6. Boynton AL, Whitfield JF. 1983. *The role of AMPc in cell proliferation: A critical assessment of the evidence*. Adv. Cyclic. Nucleotide Res. 15, 193-294.
7. Bubis J, Vedvick TS, and Taylor SS. 1987. *Antiparallel alignment of the protomers of the regulatory subunit dimer of cAMP- dependent protein kinase I*. J.Biol.Chem; 262: 14961-14966.
8. Buechler J, Vedvick T, and Taylor S. 1990. *Differential labeling of the catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase with acetic anhydride: Substrate induced conformational changes*. Biochemistry; 28: 3018- 3024.
9. Builder S, Beavo J, and Krebs E. 1980. *The mechanism of activation of bovine skeletal muscle protein kinase by adenosine 3', 5' monophosphate*. J.Biol. Chem; 255:3514-3519.
10. Burnett G, Kennedy E. 1954. *The enzymatic phosphorylation of proteins*. J. Biol. Chem; 211: 969-980.
11. Bustos, V. 2005. *Bases estructurales del reconocimietno de sustratos por la proteína quinasa CK1 de vertebrados*. Tesis Doctoral en Ciencias Biomédicas. Universidad de Chile.
12. Cheng H, Kemp B, Pearson R, Misconi L, Van Patten S, Smith A, and Walsh D. 1986. *A potent synthetic peptide inhibitor of the cAMP dependent protein kinase*. J. Biol. Chem. 261: 989-992.

13. Cho Y, Park Y, Lee Y, Kon Kin M, Bates S, Langzhu T, Chung Y. 2000. *Extracellular protein kinase A as a cancer biomarker: Its expression by tumor cells and reversal by a myristate- lacking C α and RII β subunit overexpression.* Medical Sciences Vol97, n $^{\circ}$ 2: 835-840.
14. Cobb C E, Beth AH, and Corbin JD. 1987. *Purification and characterization of an inactive form of cyclic cAMP-dependent protein kinase containing bound cyclic AMP.* J. Biol.Chem; 262:16566-16574.
15. Corbin JD, Keely SL, Park CR. 1975. *The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3': 5 monophosphate dependent protein kinase in adipose, cardiac, and other tissues.* J. Biol. Chem; 250, 218-225.
16. Corbin JD, Sugden PH, West L, Flockhart DA, Lincoln T and McCarthy D. 1978. *Studies on the properties and mode of action of the purified regulatory subunit of bovine heart adenosine 3': 5'-monophosphate- dependent protein kinase.* J. biol. Chem; 253: 3997- 4003.
17. Cvijic M, Kita T, Shih W, DiPaola R, Chin K. 2000. *Extracellular catalytic subunit activity of the cAMP-dependent protein kinase in Prostate Cancer.* Clinical Cancer Research; Vol. 6, 2309- 2317.
18. Doskeland and Ueland P M. 1978. *An adenosine 3':5'-monophosphate-adenosine binding protein from mouse liver. A study on its interaction with adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine.* J. Biol. Chem. 253: 1667-1676.
19. Eppler C, Bayley H, Greenberg S and Schwartz J. 1986. *Structural studies on a family of cAMP binding protein in the nervous system of Aplysia.* J. Biol. Chem; 102: 320-331.
20. Erlich Y, Davis T, Bock E, Korecki E, Lenox R. 1986. *Ecto-protein kinase activity on the external surface of neural cells.* Nature; 320: 67-70.
21. Erlich Y, Rosnfeld R, and Rosen O M. 1974. *Phosphorylation of a cyclic adenosine 3', 5' monophosphate dependent protein kinase from bovine cardiac muscle.* J. Biol. Chem; 249: 5000- 5003.
22. Erlich YH. 1996. *Extracellular protein kinase.* Science (Washington D.C.), 271: 278-279.
23. Ferraz C, Demaille JG and Fischer EH. 1979. *The protein inhibitor of adenosine 3', 5'-monophosphate dependent protein kinases.* Biochem; 61: 645- 651.
24. Fisher E and Krebs E. 1955. *Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts.* J. Biol. Chem, 216: 121- 132.
25. Geahlen R and Krebs E. 1980a. *Regulatory subunit of the Type I AMPc dependent protein kinase as an inhibitor and substrate of the GMPc dependent protein kinase.* J. Biol. Chem; 255: 1164- 1169.

26. Geahlen R and Krebs E. 1980b. *Studies on the phosphorylation of the Type I AMPc dependent protein kinase*. J. Biol. Chem; 255: 9475- 9379
27. Gjersten BT and Doskeland A. 1995. Biochim. Biophys. Acta 1269, 187.
28. Glantz SB, Amat JA and Rubin CS. 1992. Mol. Biol. Cell 3, 1215–1228.
29. Grant and Adams, 1996. *Pre-Steady-State Kinetic Analysis of cAMP-Dependent Protein Kinase Using Rapid Quench Flow Techniques*. Biochemistry, 35 (6), 2022-2029.
30. Greengard P y Browning MD, 1988. *Studies of the physiological role of specific neuronal phosphoproteins*. Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res;21:133-46.
31. Griffioen y Thevelein y col., 2002. Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A. Volumen 41, Numero 4.
32. Gross R A, Uhler M D and Macdonald R L. 1990. *The cyclic AMP-dependent protein kinase catalytic subunit selectively enhances calcium currents in rat nodose neurones*. J Physiol; Vol 429 pp 483-496.
33. Hanks SK, Hunter T. 1995. *Protein kinases . The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification*. FASEB J. Vol 9: 576-96.
34. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. 1988. *The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains*. Science. 241, 42-52.
35. Hausken Zachary, Dell'Acqua Mark L., Coghlan Vincent M. and Scott John D. 1996. Mutational Analysis of the A-Kinase Anchoring Protein (AKAP)-binding Site on RII. CLASSIFICATION OF SIDE CHAIN DETERMINANTS FOR ANCHORING AND ISOFORM SELECTIVE ASSOCIATION WITH AKAPs. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Volume 271, Number 46, Issue of November 15, 1996 pp. 29016-29022.
36. Hemmer Wolfram, McGlone Maria, Tsigelny Igor and Taylor Susan S. 1997. *Role of the Glycine Triad in the ATP-binding Site of cAMP-dependent Protein Kinase*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Volume 272, Number 27, Issue of July 4, pp. 16946-16954.
37. Hofman F, Beavo J A, Bechtel P J, and Krebs E G. 1975. J. Biol. Chem. 250, 7795–7801.
38. Huang L, Durick K, Weiner J. 1997. *Identification of a Novel Protein Kinase A anchoring Protein that binds both type I and type II regulatory subunits*. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 272, N°12: 8057-8064.
39. Hubbard M.J. and Cohen P. 1993. *On target with a new mechanism for the*

- regulation of protein phosphorylation. Trends Biochem. Sci.* 18, 172.
40. Huggenvik, J.I, Collard MW, Stofko RE, Seasholtz AF and Uhler MD. 1991. *Regulation of the human enkephalin promoter by two isoforms of the catalytic subunit of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase.* Molecular Endocrinology, Vol 5, 921-930,
 41. Hunter, T. 1995. *Protein kinases and phosphatases: the ying and yang of protein phosphorylation and signaling.* Cell. Vol. 80: 225-36.
 42. Hunter, T. 2000. Signaling and beyond. Cell. Jan 7: 100(1):113-27.
 43. Johnson N., Lowe E., Noble M., Owen D. 1998. *The structural basic for substrate recognition and control by protein kinase.* FEBS Lettes 430: 1-11.
 44. Johnson N.L., Noble M.E. and Owen D.J. 1996. Cell 85, 149- 158.
 45. Kempt B.E., Benajmini E., Krebs E.G. 1976. *Synthetic hexapeptide substrates and inhibitors of 3': 5'- cyclic AMP-dependent protein kinase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73 (4): 1038-42.
 46. Kennedy E. and Burnett G. 1954. *The enzymatic phosphorylation of proteins.* Journal of Biological Chemistry.211: 969-980.
 47. Knighton D.R., Zheng J.H., Ten Eyck L.F., Ashford V.A., Xuong N.H., Taylor S.S., Sowadski J.M. 1991. *Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate dependent protein kinase.* Science. 253, 407-414.
 48. Krebs E.G., Beavo J.A. 1979. *Phosphorylation –dephosphorylation of enzymes.* Annu. Rev. Biochem. 48, 923-959.
 49. Krebs E.G., Bechtel P.J. and Beavo J.A. 1977. *Purification and characterization of catalytic subunit of skeletal muscle adenosine 3': 5'- monophosphate-dependent protein kinase.* J.Biol.Chem.252: 2b691-2697.
 50. Krebs E.G., Edelman A.M., Takio K., Blumenthal D.K., Hansen R. S., Walsh K.A. and Titani. K. 1986. *J. Biol. Chem.* 260, 11275-11285.
 51. Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR and Gilman AG. 1989. *Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure.* Science 30 June: Vol. 244. no. 4912, pp. 1558 – 1564.
 52. Kübler D., Pryerin W., Bill O., Hotz A., Sonka J., Kinzel V. 1989. *Evidence for ecto-protein kinase activity that phosphorylates Kemptide in a cyclic AMP- dependent mode.* J. Biol. Chem. 264: 14549- 14555.
 53. Kurten RC, Levy LO, Shey J, Durica JM, Richards JS. 1992. *Identification and characterization of the GC-rich and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP)-inducible promoter of the type II cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit*

- gene*. Mol Endocrinol 6, 536-550.
54. Lee D., Carmichael D.F., Krebs E. and McKnight G. 1983. *Isolation of a cDNA clone for the type I regulatory subunit of bovine cAMP-dependent protein kinase*. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 80: 3608-3612.
 55. Sambrook J., Russell, D. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Third edition. Volume 3. New York. United States.
 56. Manning G, Whyte D. B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. 2002. *The Protein Kinase Complement of the Human Genome*. Science 6 December 2002: Vol. 298. No. 5600, pp. 1912 – 1934.
 57. Matten, W., Daar, I. and Vande Woude, G.F. 1994. Mol. Cell Biol. 14, 4419.
 58. Peters, K.A., Demaille, J.G and Fischer, E.H. 1977. *Adenosine 3': 5'- monophosphate dependent protein kinase from bovine heart. Characterization of the catalytic subunit*. Biochemistry 16: 5691-5697.
 59. Redegeld, FA., Caldwell Charles C. and Sitkovsky Michail V. 1999. *Ecto-protein kinases: ecto-domain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation?*. Trends Pharmacol. Sci. 20, 453-450.
 60. Reimann E.M., Walsh D.A., Krebs E.G. 1971. *Purification and properties of rabbit skeletal muscle adenosine 3': 5'- monophosphate dependent protein kinase*. J. Biol.Chem. 246:198-1995.
 61. Rodríguez F., Allende C., y Allende J. 2005. *Protein kinase casein 2 holoenzyme produced ectopically in human cells can be exported to the external side of the cellular membrane*. PNAS, 29, vol 102, nº13: 4718- 4723.
 62. Rubin C.S, Rangel-Aldao R., Sarkar, D., Erlichman J., Fleischer N. 1979. *Characterization and comparison of membrane-associated and cytosolic cAMP-dependent protein kinases*. J. Biol. Chem. 254:3797-3805.
 63. Scott JD, McCartney S. 1994. *Localization of A-kinase through anchoring proteins*. Mol Endocrinol 8, 5-11.
 64. Scott J.D., Glaccum M.B., Zoller M.J., Uhler M.D., Helfma D.M., McKnight G.S, Krebs E.G. 1987. *The molecular cloni of a type II regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase from rat skeletal muscle and mouse brain*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:5192-5196.
 65. Scott J., Vitalis E. and Cupp J. 1990. *Dimerization of the type II regulatory subunit of the cAMP dependent protein kinase is maintained through extreme amino terminal residues*. Protein Soc. Proc. 3er Symp (Abstr. T141).
 66. Shaltiel Shmuel, Cheng Xiaodong and Taylor Susan S. 1998. *Mapping Substrate-Induced Conformational Changes in cAMP-Dependent Protein Kinase by Protein*

- Footprinting*. Biochemistry, 37 (40), 14005–14013.
67. Shoji S., Parmelee D.C., Wade R. D., Kumar S., Ericsson L.H., Walsh K.A., Neurath H., Long G.L., Demaille J.G., Fischer E.H. and Titani K. 1981. *Complete amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine cardiac muscle cyclic AMP –dependent protein kinase*. Proc. Natn. Acad. Sci.USA.78: 848-851.
 68. Sutherland E.W. and Wosilait W.D. 1955. *Inactivation and activation of liver phosphorylase*. Nature. 175, 169-170.
 69. Takio Koji, Wade Roger D., Smith Stephen B., Krebs Edwin G., Walsh Kenneth A., and Titani Koiti. 1984. *Guanosine Cyclic 3',5'-Phosphate Dependent Protein Kinase, a Chimeric Protein Homologous with Two Separate Protein Families*. Biochemistry; 23, 4207-4218
 70. Taylor S., and Buechler J., 1990. *Differential labelling of the catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase with a water- soluble carbodiimide: Identification of carboxyl groups protected by MgATP and inhibitor peptides*. Biochemistry 29: 1937- 1943.
 71. Taylor Susan S., Smitha Christopher M., Radzio-Andzelmb Elzbieta, Madhusudanb, Akamineb Pearl. 1999. *The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: prototype for an extended network of communication*. Progress in Biophysics & Molecular Biology 71 (1999) 313-341.
 72. Taylor S.S., Buechler J.A. and Yonemoto W. 1990. *cAMP - dependent protein kinase: Framework for a diverse family of regulatory enzymes*. A. Rev. Biochem. 59: 971-1005.
 73. Taylor S.S., Knighton D.R., Zheng J., Ten Eyck L.F., Sowadski J.M. 1992. *Structural framework for the protein kinase family*. Annu. Rev. Cell. Biol.8, 429-462.
 74. Uhler M.D., Carmichael D.F., Lee D.C., Chrivia J. C., Krebs E.G. and Mcknight G.S. 1986a. *Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase*. Proc. Natn. Acad.Sci. U.S.A. 83: 1300-1304.
 75. Uhler M.D., Chrivia J. C. and Mcknight G.S. 1986b. *Evidence for a second isoform of the catalytic subunit of cAMP –dependent protein kinase*. J.biol.Chem. 261: 15360-15363.
 76. Walsh D.A and Van Patten S.M. 1994. *Multiple pathway signal trasduction by the cAMP-dependent protein kinase*. The FASEB Journal, Vol 8, 1227-1236.
 77. Walsh D.A., Perkins J. P., and Krebs E. G. 1968. *J. Biol. Chem.* 243, 3763–3765.
 78. Weber W. and Hilz R. 1986. *cAMP-Dependent Protein Kinases I and II: Divergent Turnover of Subunits*. Biochemistry 25, 5661–5667.
 79. Zheng J., Knighton D.R., Xoung N., Taylor S.S., Sowadski J., Ten Eyck L.F. 1993. *Cristal structure myristylation catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase reveal open and closed confirmation*. Protein. Science. 2, 1559-1573.
 80. Zhou Jie and Adams Joseph A. 1997. *Is There a Catalytic Base in the Active Site*

- of cAMP-Dependent Protein Kinase? . Biochemistry, 36 (10), 2977 –2984.*
81. Zick SK and Taylor SS. 1982. *Interchain disulfide bonding in the regulatory subunit of cAMP- dependent protein kinase I.* J. Biol. Chem., Vol. 257, Issue 5, 2287-2293.
82. Zoller Mark J., Kerlavage Anthony R. and Taylor Susan S. 1979. *Structural Comparisons of CAMP-dependent Protein Kinases I and II from Porcine Skeletal Muscle.* The Journal of Biological Chemistry. Vol. 254, No. 7, Issue of April 10, pp. 2408-2412.

ANEXOS

A. ECTO –PKA DE LAS CÉLULAS HEK293T:

Tabla 1 Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas	Prueba T para la igualdad de medias								
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
SIn_Sustrat	Se han asumido varianzas iguales	10.843	.030	1.019	4	.366	.26333	.25848	-.45432	.98098
	No se han asumido varianzas iguales			1.019	2.084	.412	.26333	.25848	-.80685	1.33352
Sustrato	Se han asumido varianzas iguales	4.408	.104	-4.079	4	.015	-3.32000	.81402	5.58007	1.05993
	No se han asumido varianzas iguales			-4.079	2.029	.054	-3.32000	.81402	6.77416	.13416
Sustrao_AM	Se han asumido varianzas iguales	8.186	.046	-2.934	4	.043	-3.50000	1.19290	6.81204	-.18796
	No se han asumido varianzas iguales			-2.934	2.178	.090	-3.50000	1.19290	8.25033	1.25033

Tabla 2 ANOVA-Grupo Vector

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3.573	2	1.787	13.626	.006
Intra-grupos	.787	6	.131		
Total	4.360	8			

ANOVA-Grupo PKA

Tabla 3

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	40.313	2	20.157	9.972	.012
Intra-grupos	12.128	6	2.021		
Total	52.441	8			

Tabla 4 Estadísticos de grupo

grupo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	
SIn_Sustrato	Vetor	3	.3900	.44306	.25580
	PKA	3	.1267	.06429	.03712
Sustrato	Vetor	3	.3133	.12055	.06960
	PKA	3	3.6333	1.40475	.81104
Sustrao_AMPc	Vetor	3	1.6867	.42724	.24667
	PKA	3	5.1867	2.02152	1.16712

B. ECTO –PKA DE LAS CÉLULAS HELA:

Tabla 1 Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas	Prueba T para la igualdad de medias								
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Sln_Sustra	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	6E+015	.000	7.608	2	.017	.32500	.04272	.14119	.50881
				7.608	1.276	.051	.32500	.04272	-.00589	.65589
Sustrato	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	.	.	-2.113	2	.169	-.53000	.25080	.60910	.54910
				-2.113	1.013	.279	-.53000	.25080	3.62309	2.56309
Sustrao_AM	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	1E+014	.000	-10.480	2	.009	-4.23000	.40361	5.96659	2.49341
				-10.480	1.978	.009	-4.23000	.40361	5.98506	2.47494

Tabla 2 ANOVA- Grupo Vector

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.636	2	.318	6.370	.083
Intra-grupos	.150	3	.050		
Total	.786	5			

Tabla 3 ANOVA-Grupo PKA

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	31.327	2	15.664	153.842	.001
Intra-grupos	.305	3	.102		
Total	31.633	5			

Tabla 4 Estadísticos de grupo

grupo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Sln_Sustrato	Vetor	2	.3600	.05657
	PKA	2	.0350	.02121
Sustrato	Vetor	2	.2200	.02828
	PKA	2	.7500	.35355
Sustrao_AMPc	Vetor	2	.9700	.38184
	PKA	2	5.2000	.42426

C. EXO-PKA EN CÉLULAS HEK293T

Tabla 1 Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas	Prueba T para la igualdad de medias								
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
SIn_Sustra	Se han asumido varianzas iguales	2E+015	.000	-6.00	2	.609	-.01500	.02500	-.12257	.09257
	No se han asumido varianzas iguales			-6.00	1.855	.614	-.01500	.02500	-.13107	.10107
Sustrato	Se han asumido varianzas iguales	2E+016	.000	-3.881	2	.060	-.39000	.10050	-.82241	.04241
	No se han asumido varianzas iguales			-3.881	1.020	.157	-.39000	.10050	.60929	.82929
Sustra_AMPc	Se han asumido varianzas iguales	2E+018	.000	-2.328	2	.145	-.58500	.25125	-.66603	.49603
	No se han asumido varianzas iguales			-2.328	1.020	.254	-.58500	.25125	-.63322	.46322

Tabla 2 ANOVA- Grupo Vector

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.003	2	.002	2.289	.249
Intra-grupos	.002	3	.001		
Total	.006	5			

Tabla 3 ANOVA- Grupo PKA

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.383	2	.191	3.946	.145
Intra-grupos	.145	3	.048		
Total	.528	5			

Tabla 4 Estadísticos de grupo

grupo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
SIn_Sustrato	Vetor	2	.0200	.02828
	PKA	2	.0350	.02121
Sustrato	Vetor	2	.0100	.01414
	PKA	2	.4000	.14142
Sustra_AMPc	Vetor	2	.0650	.03536
	PKA	2	.6500	.35355

D. EXO-PKA EN CÉLULAS HELA

Tabla 1

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
SIn_Sustrato	1E+016	.000	.100	2	.930	.00500	.05025	-.21121	.22121
			No se han asumido varianzas iguales	.100	1.020	.937	.00500	.05025	-.60464
Sustrato	1E+016	.000	-3.130	2	.089	-.03500	.01118	-.08311	.01311
			No se han asumido varianzas iguales	-3.130	1.471	.129	-.03500	.01118	-.10419
Sustrao_AV	3E+015	.000	-4.025	2	.057	-.45000	.11180	-.93105	.03105
			No se han asumido varianzas iguales	-4.025	1.471	.092	-.45000	.11180	1.14185

Tabla 2

ANOVA- Grupo Vector

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.184	2	.092	10.960	.042
Intra-grupos	.025	3	.008		
Total	.209	5			

Tabla 3

ANOVA- Grupo PKA

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.864	2	.432	254.127	.000
Intra-grupos	.005	3	.002		
Total	.869	5			

Tabla 4

Estadísticos de grupo

grupo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
SIn_Sustrato	Vetor	2	.0500	.07071
	PKA	2	.0450	.00707
Sustrato	Vetor	2	.0100	.01414
	PKA	2	.0450	.00707
Sustrao_AMPc	Vetor	2	.4000	.14142
	PKA	2	.8500	.07071

E. ENDO-PKA EN CÉLULAS HEK293T:

Tabla 1

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas	Prueba T para la igualdad de medias								
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
SIn_Sustrato	Se han asumido varianzas iguales	.	.	.277	2	.808	.02500	.09014	-.36284	.41284
	No se han asumido varianzas iguales			.277	1.742	.811	.02500	.09014	-.42335	.47335
Sustrato	Se han asumido varianzas iguales	.	.	-8.230	2	.014	19.53000	2.37306	9.74044	9.31956
	No se han asumido varianzas iguales			-8.230	1.039	.071	19.53000	2.37306	7.10987	8.04987
Sustrato_AM	Se han asumido varianzas iguales	2E+017	.000	-6.376	2	.024	24.90000	3.90512	1.70240	8.09760
	No se han asumido varianzas iguales			-6.376	1.112	.082	24.90000	3.90512	4.14852	4.34852

Tabla 2

ANOVA- Grupo Vector

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	16.448	2	8.224	13.343	.032
Intra-grupos	1.849	3	.616		
Total	18.297	5			

Tabla 3

ANOVA- Grupo PKA

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	873.370	2	436.685	32.809	.009
Intra-grupos	39.930	3	13.310		
Total	913.300	5			

Tabla 4

Estadísticos de grupo

grupo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
SIn_Sustrato	Vetor	2	.6750	.10607
	PKA	2	.6500	.07071
Sustrato	Vetor	2	1.4200	.46669
	PKA	2	20.9500	3.32340
Sustrato_AM	Vetor	2	4.5000	1.27279
	PKA	2	29.4000	5.37401

F. ENDO-PKA EN CÉLULAS HELA:

Tabla 1 Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas	Prueba T para la igualdad de medias								
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Sin_Sustrato	Se han asumido varianzas iguales	2E+015	.000	-23.667	2	.002	-.69000	.02915	-.81544	-.56456
	No se han asumido varianzas iguales			-23.667	1.637	.005	-.69000	.02915	-.84621	-.53379
Sustrato	Se han asumido varianzas iguales	8E+019	.000	-7.689	2	.016	23.07000	3.00027	5.97911	0.16089
	No se han asumido varianzas iguales			-7.689	1.000	.082	23.07000	3.00027	1.16000	5.02000
Sustrato_AM	Se han asumido varianzas iguales	1E+016	.000	-23.370	2	.002	25.86000	1.10653	0.62100	1.09900
	No se han asumido varianzas iguales			-23.370	1.024	.025	25.86000	1.10653	9.17047	2.54953

Tabla 2 ANOVA- Grupo Vector
PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.719	2	.359	32.432	.009
Intra-grupos	.033	3	.011		
Total	.752	5			

Tabla 3 ANOVA- Grupo PKA
PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	607.144	2	303.572	22.724	.015
Intra-grupos	40.076	3	13.359		
Total	647.221	5			

Tabla 4 Estadísticos de grupo

grupo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Sin_Sustrato	Vetor	2	.0250	.03536
	PKA	2	.7150	.02121
Sustrato	Vetor	2	.2300	.05657
	PKA	2	23.3000	4.24264
Sustrato_AM	Vetor	2	.8400	.16971
	PKA	2	26.7000	1.55563

G. INHIBICIÓN DE LA PKA POR PKI EN EL LÍQUIDO EXTRACELULAR DE CÉLULAS HEK293T

Tabla 1

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Sustrato	Se han asumido varianzas iguales	1E+016	.000	-2.058	2	.176	-.06000	.02915	-.18544	.06544
	No se han asumido varianzas iguales			-2.058	1.637	.203	-.06000	.02915	-.21621	.09621
Sustrato_AMPc	Se han asumido varianzas iguales			-2.333	2	.145	-.17500	.07500	-.49770	.14770
	No se han asumido varianzas iguales			-2.333	1.000	.258	-.17500	.07500	-.12797	.77797
Sustrato_PKI	Se han asumido varianzas iguales	1E+016	.000	-4.93	2	.671	-.01500	.03041	-.14586	.11586
	No se han asumido varianzas iguales			-4.93	1.056	.705	-.01500	.03041	-.35657	.32657
Sustrato_AMPc_PKI	Se han asumido varianzas iguales	.000	1.000	-2.828	2	.106	-.02000	.00707	-.05042	.01042
	No se han asumido varianzas iguales			-2.828	2.000	.106	-.02000	.00707	-.05042	.01042

Tabla 2

ANOVA-Grupo Vector

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.034	3	.011	81.303	.000
Intra-grupos	.001	4	.000		
Total	.034	7			

Tabla 3

ANOVA-Grupo PKA

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.133	3	.044	12.343	.017
Intra-grupos	.014	4	.004		
Total	.147	7			

Tabla 4

Estadísticos de grupo

grupo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Sustrato	Vetor	2	.0650	.02121
	PKA	2	.1250	.03536
Sustrato_AMPc	Vetor	2	.2000	.00000
	PKA	2	.3750	.10607
Sustrato_PKI	Vetor	2	.0450	.00707
	PKA	2	.0600	.04243
Sustrato_AMPc_PKI	Vetor	2	.0450	.00707
	PKA	2	.0650	.00707

. *Comparación de sustrato vs sustrato+PKI en el grupo VECTOR **Tabla 5**

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sustrato	2	.065	.015	.0212132	-.1255931	.2555931
sust_pki	2	.045	.005	.0070711	-.018531	.108531
combined	4	.055	.0086603	.0173205	.0274392	.0825608
diff		.02	.0158114		-.0480309	.0880309
diff = mean(sustrato) - mean(sust_pki)					t =	1.2649
Ho: diff = 0					degrees of freedom =	2
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.8333		Pr(T > t) = 0.3333		Pr(T > t) = 0.1667		

. *Comparación de sustrato+AMPC vs sustrato+AMPC+ PKI en el grupo VECTOR **Tabla 6**

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sust_a~c	2	.2	0	0	.2	.2
s_ampc~i	2	.045	.005	.0070711	-.018531	.108531
combined	4	.1225	.0447912	.0895824	-.0200455	.2650455
diff		.155	.005		.1334867	.1765133
diff = mean(sust_ampc) - mean(s_ampc_pki)					t =	31.0000
Ho: diff = 0					degrees of freedom =	2
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.9995		Pr(T > t) = 0.0010		Pr(T > t) = 0.0005		

. *Comparación de sustrato vs sustrato+PKI en el grupo PKA **Tabla 7**

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sustrato	2	.125	.025	.0353553	-.1926551	.4426552
sust_pki	2	.06	.03	.0424264	-.3211862	.4411862
combined	4	.0925	.0246221	.0492443	.0141413	.1708587
diff		.065	.0390513		-.103024	.233024
diff = mean(sustrato) - mean(sust_pki)					t =	1.6645
Ho: diff = 0					degrees of freedom =	2
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.8810		Pr(T > t) = 0.2379		Pr(T > t) = 0.1190		

. *Comparación de sustrato+AMPC vs sustrato+AMPC+ PKI en el grupo PKA

Tabla 8

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sust_a~c	2	.375	.075	.106066	-.5779652	1.327965
s_ampc~i	2	.065	.005	.0070711	.001469	.128531
combined	4	.22	.0946044	.1892089	-.0810735	.5210735
diff		.31	.0751665		-.0134152	.6334152

```
-----  
diff = mean(sust_ampc) - mean(s_ampc_pki)          t = 4.1242  
Ho: diff = 0                                       degrees of freedom = 2  
  
Ha: diff < 0                                       Ha: diff != 0          Ha: diff > 0  
Pr(T < t) = 0.9730      Pr(|T| > |t|) = 0.0541      Pr(T > t) = 0.0270
```

H. INHIBICIÓN DE LA PKA POR PKI EN EL LÍQUIDO EXTRACELULAR DE CÉLULAS HELA

Tabla 1

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Sustrato	Se han asumido varianzas iguales	.000	1.000	-1.720	2	.228	-.21500	.12500	-.75283	.32283
	No se han asumido varianzas iguales			-1.720	1.855	.237	-.21500	.12500	-.79533	.36533
Sustrato_AMPc	Se han asumido varianzas iguales	5E+015	.000	-12.049	2	.007	-1.92500	.15977	2.61242	1.23758
	No se han asumido varianzas iguales			-12.049	1.264	.029	-1.92500	.15977	3.18243	-.66757
Sustrato_PKI	Se han asumido varianzas iguales	.000	1.000	-1.414	2	.293	-.10000	.07071	-.40424	.20424
	No se han asumido varianzas iguales			-1.414	2.000	.293	-.10000	.07071	-.40424	.20424
Sustrato_AMPc_PKI	Se han asumido varianzas iguales			3.483	2	.073	.17500	.05025	-.04121	.39121
	No se han asumido varianzas iguales			3.483	1.020	.174	.17500	.05025	-.43464	.78464

Tabla 2

ANOVA-Grupo Vector

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.026	3	.009	1.253	.402
Intra-grupos	.027	4	.007		
Total	.053	7			

Tabla 3

ANOVA-Grupo PKA

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	5.738	3	1.913	109.226	.000
Intra-grupos	.070	4	.018		
Total	5.808	7			

Tabla 4

Estadísticos de grupo

	grupo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Sustrato	Vetor	2	.3850	.10607	.07500
	PKA	2	.6000	.14142	.10000
Sustrato_AMPc	Vetor	2	.3250	.07778	.05500
	PKA	2	2.2500	.21213	.15000
Sustrato_PKI	Vetor	2	.2500	.07071	.05000
	PKA	2	.3500	.07071	.05000
Sustrato_AMPc_PKI	Vetor	2	.2500	.07071	.05000
	PKA	2	.0750	.00707	.00500

. *Comparación de sustrato vs sustrato+PKI en el grupo VECTOR

Tabla 5

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sustrato	2	.735	.135	.1909188	-.9803375	2.450338
sust_pki	2	.55	.05	.0707107	-.0853104	1.18531
combined	4	.6425	.0794119	.1588238	.3897759	.8952241
diff		.185	.1439618		-.4344176	.8044176
diff = mean(sustrato) - mean(sust_pki)					t =	1.2851
Ho: diff = 0					degrees of freedom =	2
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.8363		Pr(T > t) = 0.3275		Pr(T > t) = 0.1637		

. *Comparación de sustrato+AMPC vs sustrato+AMPC+ PKI en el grupo VECTOR

Tabla 6

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sust_a~c	2	2.165	.535	.7566043	-4.63282	8.96282
s_ampc~i	2	.55	.15	.212132	-1.355931	2.455931
combined	4	1.3575	.5184653	1.036931	-.2924879	3.007488
diff		1.615	.5556303		-.7756842	4.005684
diff = mean(sust_ampc) - mean(s_ampc_pki)					t =	2.9066
Ho: diff = 0					degrees of freedom =	2
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.9496		Pr(T > t) = 0.1008		Pr(T > t) = 0.0504		

. *Comparación de sustrato vs sustrato+PKI en el grupo PKA

Tabla 7

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sustrato	2	10.1	2.9	4.101219	-26.748	46.94799
sust_pki	2	2.85	1.15	1.626346	-11.76214	17.46214
combined	4	6.475	2.449957	4.899915	-1.321858	14.27186
diff		7.25	3.119696		-6.172967	20.67297
diff = mean(sustrato) - mean(sust_pki)					t =	2.3239
Ho: diff = 0					degrees of freedom =	2
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.9271		Pr(T > t) = 0.1457		Pr(T > t) = 0.0729		

. *Comparación de sustrato+AMPC vs sustrato+AMPC+ PKI en el grupo PKA

Tabla 8

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sust_a~c	2	12.6	3.6	5.091169	-33.14234	58.34234
s_ampc~i	2	2.15	1.55	2.192031	-17.54462	21.84462
combined	4	7.375	3.414766	6.829532	-3.492309	18.24231

diff	10.45	3.919503	-6.414259	27.31426

diff = mean(sust_ampc) - mean(s_ampc_pki)			t =	2.6662
Ho: diff = 0			degrees of freedom =	2
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0
Pr(T < t) = 0.9417		Pr(T > t) = 0.1166		Pr(T > t) = 0.0583

I. INHIBICIÓN DE LA PKA POR PKI EN EL LISADO CELULAR EN CÉLULAS HEK293T

Tabla 1

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Sustrato	Se han asumido varianzas iguales	1E+016	.000	-3.226	2	.084	-9.36500	2.90314	21.85621	3.12621
	No se han asumido varianzas iguales			-3.226	1.004	.191	-9.36500	2.90314	45.87884	27.14884
Sustrato_AMPc	Se han asumido varianzas iguales	4E+017	.000	-2.867	2	.103	-10.43500	3.63954	26.09466	5.22466
	No se han asumido varianzas iguales			-2.867	1.044	.205	-10.43500	3.63954	52.30558	31.43558
Sustrato_PKI	Se han asumido varianzas iguales	6E+015	.000	-1.998	2	.184	-2.30000	1.15109	-7.25273	2.65273
	No se han asumido varianzas iguales			-1.998	1.004	.295	-2.30000	1.15109	16.79640	12.19640
Sustrato_AMPc_PI	Se han asumido varianzas iguales	1E+016	.000	-1.027	2	.412	-1.60000	1.55724	-8.30027	5.10027
	No se han asumido varianzas iguales			-1.027	1.019	.489	-1.60000	1.55724	20.54737	17.34737

Tabla 2

ANOVA-Grupo Vector

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3.665	3	1.222	7.416	.041
Intra-grupos	.659	4	.165		
Total	4.324	7			

Tabla 3

ANOVA-Grupo PKA

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	163.385	3	54.462	4.340	.095
Intra-grupos	50.190	4	12.548		
Total	213.575	7			

Tabla 4

Estadísticos de grupo

grupo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Sustrato	Vetor	2	.7350	.19092
	PKA	2	10.1000	4.10122
Sustrato_AMPc	Vetor	2	2.1650	.75660
	PKA	2	12.6000	5.09117
Sustrato_PKI	Vetor	2	.5500	.07071
	PKA	2	2.8500	1.62635
Sustrato_AMPc_PKI	Vetor	2	.5500	.21213
	PKA	2	2.1500	2.19203

. *Comparación de sustrato vs sustrato+PKI en el grupo VECTOR

Tabla 5

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sustrato	2	.385	.075	.106066	-.5679654	1.337965
sust_pki	2	.25	.05	.0707107	-.3853103	.8853103
combined	4	.3175	.0535996	.1071992	.1469222	.4880778
diff		.135	.0901388		-.2528359	.5228359
diff = mean(sustrato) - mean(sust_pki)				t =	1.4977	
Ho: diff = 0				degrees of freedom =	2	
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.8635		Pr(T > t) = 0.2729		Pr(T > t) = 0.1365		

. *Comparación de sustrato+AMPC vs sustrato+AMPC+ PKI en el grupo VECTOR

Tabla 6

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sust_a~c	2	.325	.055	.0777817	-.3738412	1.023841
s_ampc~i	2	.25	.05	.0707107	-.3853103	.8853103
combined	4	.2875	.0372771	.0745542	.1688676	.4061324
diff		.075	.0743303		-.2448176	.3948176
diff = mean(sust_ampc) - mean(s_ampc_pki)				t =	1.0090	
Ho: diff = 0				degrees of freedom =	2	
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.7904		Pr(T > t) = 0.4192		Pr(T > t) = 0.2096		

. *Comparación de sustrato vs sustrato+PKI en el grupo PKA

Tabla 7

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sustrato	2	.6	.1	.1414213	-.6706204	1.87062
sust_pki	2	.35	.05	.0707107	-.2853102	.9853102
combined	4	.475	.0853913	.1707825	.2032469	.7467531
diff		.25	.1118034		-.2310512	.7310512
diff = mean(sustrato) - mean(sust_pki)				t =	2.2361	
Ho: diff = 0				degrees of freedom =	2	
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.9226		Pr(T > t) = 0.1548		Pr(T > t) = 0.0774		

. *Comparación de sustrato+AMPC vs sustrato+AMPC+ PKI en el grupo PKA

Tabla 8

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sust_a~c	2	2.25	.1500001	.2121322	.3440681	4.155932
s_ampc~i	2	.075	.005	.0070711	.011469	.138531
combined	4	1.1625	.630851	1.261702	-.8451493	3.170149
diff		2.175	.1500834		1.529243	2.820757

```
-----  
diff = mean(sust_ampc) - mean(s_ampc_pki)          t = 14.4919  
Ho: diff = 0                                       degrees of freedom = 2  
  
Ha: diff < 0                                     Ha: diff != 0          Ha: diff > 0  
Pr(T < t) = 0.9976                             Pr(|T| > |t|) = 0.0047 Pr(T > t) = 0.0024
```

J. INHIBICIÓN DE LA PKA POR PKI EN EL LISADO CELULAR EN CELULAS HELA

Tabla 1 Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Sustrato	Se han asumido varianzas iguales	8E+014	.000	-1.406	2	.295	-.45000	.32016	-1.82752	.92752
	No se han asumido varianzas iguales			-1.406	1.908	.301	-.45000	.32016	-1.89313	.99313
Sustrato_AMPc	Se han asumido varianzas iguales			-5.659	2	.030	-3.30000	.58310	-5.80886	-.79114
	No se han asumido varianzas iguales			-5.659	1.637	.046	-3.30000	.58310	-6.42428	-.17572
Sustrato_PKI	Se han asumido varianzas iguales	2E+015	.000	.277	2	.808	.05000	.18028	-.72567	.82567
	No se han asumido varianzas iguales			.277	1.742	.811	.05000	.18028	-.84671	.94671
Sustrato_AMPc_PKI	Se han asumido varianzas iguales	9E+015	.000	-1.213	2	.349	-.02500	.02062	-1.1370	.06370
	No se han asumido varianzas iguales			-1.213	1.125	.421	-.02500	.02062	-.22743	.17743

Tabla 2 ANOVA-Grupo Vector

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6.570	3	2.190	28.646	.004
Intra-grupos	.306	4	.076		
Total	6.876	7			

Tabla 3 ANOVA-Grupo PKA

PO3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	41.468	3	13.823	85.716	.000
Intra-grupos	.645	4	.161		
Total	42.113	7			

Tabla 4 Estadísticos de grupo

grupo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Sustrato	Vetor	2	.8000	.28284
	PKA	2	1.2500	.35355
Sustrato_AMPc	Vetor	2	2.4000	.42426
	PKA	2	5.7000	.70711
Sustrato_PKI	Vetor	2	.3500	.21213
	PKA	2	.3000	.14142
Sustrato_AMPc_PKI	Vetor	2	.0500	.02828
	PKA	2	.0750	.00707

. *Comparación de sustrato vs sustrato+PKI en el grupo VECTOR

Tabla 5

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sustrato	2	.8	.2	.2828427	-1.741241	3.341241
sust_pki	2	.35	.15	.212132	-1.555931	2.255931
combined	4	.575	.1652019	.3304038	.0492538	1.100746
diff		.45	.25		-.6256631	1.525663
diff = mean(sustrato) - mean(sust_pki)					t =	1.8000
Ho: diff = 0					degrees of freedom =	2
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.8932		Pr(T > t) = 0.2137		Pr(T > t) = 0.1068		

. *Comparación de sustrato+AMPC vs sustrato+AMPC+ PKI en el grupo VECTOR

Tabla 6

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sust_a~c	2	2.4	.3000001	.4242642	-1.411862	6.211862
s_ampc~i	2	.05	.02	.0282843	-.2041241	.3041241
combined	4	1.225	.6894019	1.378804	-.9689846	3.418985
diff		2.35	.300666		1.056339	3.643661
diff = mean(sust_ampc) - mean(s_ampc_pki)					t =	7.8160
Ho: diff = 0					degrees of freedom =	2
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.9920		Pr(T > t) = 0.0160		Pr(T > t) = 0.0080		

. *Comparación de sustrato vs sustrato+PKI en el grupo PKA

Tabla 7

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sustrato	2	1.25	.25	.3535534	-1.926551	4.426551
sust_pki	2	.3	.1	.1414214	-.9706205	1.57062
combined	4	.775	.2954516	.5909033	-.1652589	1.715259
diff		.95	.2692582		-.2085247	2.108525
diff = mean(sustrato) - mean(sust_pki)					t =	3.5282
Ho: diff = 0					degrees of freedom =	2
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.9641		Pr(T > t) = 0.0718		Pr(T > t) = 0.0359		

. *Comparación de sustrato+AMPC vs sustrato+AMPC+ PKI en el grupo PKA

Tabla 8

Two-sample t test with equal variances

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
sust_a~c	2	5.7	.5	.7071068	-.6531026	12.0531
s_ampc~i	2	.075	.005	.0070711	.011469	.138531
combined	4	2.8875	1.636579	3.273157	-2.320824	8.095823
diff		5.625	.500025		3.473566	7.776434
diff = mean(sust_ampc) - mean(s_ampc_pki)					t =	11.2494
Ho: diff = 0					degrees of freedom =	2
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.9961		Pr(T > t) = 0.0078		Pr(T > t) = 0.0039		

EQUIPOS

SHEL LAB CO2 Incubator



Cryo Biological Storage System



Liquid Scintillation System (Contador de Radioactividad- beta).

