

**Implementação do ensaio fenotípico
das leveduras e sua aplicação na pesquisa de
moduladores selectivos para isoformas
individuais da PKC de mamífero**

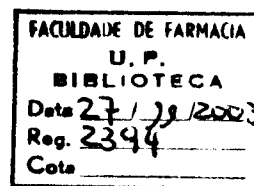
Lucília Helena Ataíde Saraiva

**Universidade do Porto
Faculdade de Farmácia
2003**

Lucília Helena Ataíde Saraiva

Implementação do ensaio fenotípico das leveduras e sua aplicação na pesquisa de moduladores selectivos para isoformas individuais da PKC de mamífero

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor,
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto



FFD
SAR
2394

Porto, 2003

Aos meus pais
À minha irmã Verónica
Ao Hugo Miguel

Agradecimentos

O meu muito obrigada,

Ao Professor Doutor Jorge Gonçalves, orientador desta Tese de Doutoramento, por me ter possibilitado realizar este trabalho, colocando à minha disposição o Serviço de Farmacologia e o seu total apoio, pelas suas críticas e estimulantes sugestões, pelo ânimo e optimismo, pela confiança que sempre depositou no meu trabalho.

À Professora Doutora Paula Fresco, co-orientadora desta Tese de Doutoramento, pelo interesse e apoio prestados ao longo deste trabalho, por partilhar comigo os seus conhecimentos e espírito crítico, pelas suas boas sugestões, pelos momentos de descontração proporcionados.

À Professora Doutora Eugénia Pinto, co-orientadora desta Tese de Doutoramento, pela forma experiente com que me orientou no laboratório, principalmente na parte de Microbiologia deste trabalho, pela atenção e disponibilidade sempre demonstrada, pela sua vivacidade, pelos seus bons conselhos e opiniões, pelas palavras amigas.

À D. Conceição e à D. Céu pela forma acolhedora com que sempre me receberam no Serviço de Farmacologia, pelo apoio e estímulo, pelo carinho e amizade, pelos incontáveis momentos de riso e de boa disposição passados.

À D. Fátima pela atenção e disponibilidade sempre imediata, pelas suas palavras amigas.

À Sílvia Malheiro e à Ana Estela pelo apoio na parte experimental, pelo ânimo e amizade.

À Professora Doutora Glória Queiroz, Dra. Manuela Morato e Dr. Paulo Fragoso pelas palavras de incentivo, pela ajuda espontânea, pelas boas sugestões durante a elaboração desta Tese. Ao Dr. Jorge Oliveira pela colaboração na fase inicial do projecto da PKC. À Professora Doutora Carmen Diniz e D. Fernanda pela atenção e disponibilidade.

À Professora Doutora Madalena Pinto pela colaboração, pelos experientes ensinamentos na área da Química Orgânica, por ter estimulado a união e cooperação entre todos os alunos de doutoramento do CEQOFFUP.

Às minhas colegas e amigas do CEQOFFUP por todo o apoio e ânimo. Em particular à Dra. Emília Sousa pela colaboração sempre entusiástica e à Dra. Madalena Pedro pelas palavras de conforto e incentivo, pela verdadeira amizade demonstrada.

A todos os elementos do Serviço de Microbiologia pelo apoio, pelas palavras de estímulo, pelos bons momentos de convívio. Em particular, à Professora Doutora Isaura, à Professora Doutora Nazaré e à Doutora Helena Vasconcelos pelo apoio sincero que me facultaram sempre, incentivando e revigorando a minha vontade de prosseguir.

Aos meus alunos por darem mais sentido a este trabalho, pelo carinho e reconhecimento demonstrado, pelo apoio e encorajamento.

Ao Fernando pelo afecto e compreensão, pelas pacientes horas de espera, pelo incentivo, por ter estado do meu lado nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Ao Beatle e à Cris, companheiros de longas horas na escrita desta dissertação!

ÍNDICE

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	7
RESUMÉ.....	10
ABREVIATURAS.....	13
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1. As vias de transdução de sinal e as cínases de proteínas.....	18
2. A família da PKC.....	19
3. Distribuição das isoformas da PKC em células e tecidos.....	24
4. Localização intracelular das isoformas da PKC.....	25
5. Funções específicas das isoformas da PKC.....	26
6. Moduladores da PKC.....	28
7. Um método para a pesquisa de potenciais activadores e inibidores da PKC.....	36
8. Objectivos do presente trabalho.....	38
CAPÍTULO II – MÉTODOS GERAIS.....	39
1. Amplificação e análise de restrição dos plasmídeos de expressão das isoformas individuais da PKC de mamífero (α , β I, γ , ϵ , δ , η ou ζ).....	41
1.1. Plasmídeos de expressão, em leveduras, das isoformas individuais da PKC de mamífero.....	41
1.2. Quantificação do DNA plasmídico por determinação espectrofotométrica.....	42
1.3. Preparação das células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	42
1.4. Transformação das células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	43
1.5. Extracção do DNA plasmídico da <i>E. coli</i> DH5 α transformada.....	43
1.6. Análise de restrição do DNA plasmídico extraído da <i>E. coli</i> DH5 α transformada.....	43
2. Transformação da <i>S. cerevisiae</i> pelo método do acetato de lítio.....	44

2.1. Estirpes de <i>S. cerevisiae</i>	44
2.2. Preparação das células competentes de <i>S. cerevisiae</i>	45
2.3. Preparação do DNA transportador.....	46
2.4. Transformação das células competentes de <i>S. cerevisiae</i>	46
3. Condições de incubação da <i>S. cerevisiae</i> transformada.....	47
4. Análise de restrição do DNA plasmídico incorporado pelas leveduras.....	47
5. Confirmação da expressão das isoformas individuais da PKC de mamífero pela <i>S. cerevisiae</i> transformada.....	48
5.1. Extracção das proteínas da <i>S. cerevisiae</i>	48
5.2. Precipitação das proteínas extraídas da <i>S. cerevisiae</i>	49
5.3. Quantificação das proteínas extraídas da <i>S. cerevisiae</i>	50
5.4. Electroforese das proteínas extraídas da <i>S. cerevisiae</i>	50
5.5. <i>Western blot</i>	51
6. Ensaio fenotípico com a <i>S. cerevisiae</i> transformada.....	52
6.1. Estudo funcional das isoformas individuais da PKC de mamífero expressas pela <i>S. cerevisiae</i>	52
6.2. Optimização do ensaio fenotípico da <i>S. cerevisiae</i> transformada para a pesquisa de potenciais activadores e inibidores da PKC.....	53
7. Ensaio <i>in vitro</i> para os compostos que se comportaram como inibidores da PKC, no ensaio fenotípico das leveduras transformadas.....	55
8. Análise estatística dos resultados.....	56
ANEXOS.....	57

CAPÍTULO III – IMPLEMENTAÇÃO DO ENSAIO FENOTÍPICO DAS LEVEDURAS

TRANSFORMADAS.....	64
INTRODUÇÃO.....	65
RESULTADOS.....	69
1. Análise de restrição dos plasmídeos de expressão das isoformas individuais da PKC de mamífero (α , β I, γ , ϵ , δ , η ou ζ).....	69
2. Transformação da <i>S. cerevisiae</i> e análise de restrição do DNA plasmídico incorporado pelas leveduras.....	70
2.1. Transformação das várias estirpes de <i>S. cerevisiae</i> pelo método do acetato de lítio.....	70

2.2. Análise de restrição dos plasmídeos extraídos da <i>S. cerevisiae</i> transformada.....	72
3. Confirmação da expressão das isoformas individuais da PKC de mamífero pelas estirpes de <i>S. cerevisiae</i> transformadas.....	73
4. Estudo funcional das isoformas individuais da PKC de mamífero expressas pela <i>S. cerevisiae</i>	76
5. Optimização do ensaio fenotípico das leveduras transformadas para a pesquisa de potenciais activadores e inibidores da PKC.....	81
DISCUSSÃO.....	90
CAPÍTULO IV – ESTUDO DE ACTIVADORES DA PKC: ÉSTERES DE FORBOL.....	96
CAPÍTULO V – ESTUDO DE INIBIDORES DA PKC.....	120
CAPÍTULO VI – DAFNETOXINA.....	146
ANEXO.....	151
CAPÍTULO VII – EUXANTONA.....	156
CAPÍTULO VIII – DERIVADOS XANTÓNICOS: XANTONAS ACTIVADORAS DA PKC.....	160
CAPÍTULO IX – DERIVADOS XANTÓNICOS: XANTONAS INIBIDORAS DA PKC.....	170
CAPÍTULO X – XANTONOLIGNÓIDES	182
CAPÍTULO XI – DISCUSSÃO GERAL.....	197
BIBLIOGRAFIA.....	206

RESUMO

Dado o papel relevante das isoformas da cínase C de proteínas (PKC) na regulação celular e vias de transdução de sinal, a PKC revelou-se um alvo potencial no tratamento de patologias graves, constituindo o centro de uma investigação exaustiva numa grande variedade de áreas da biomedicina.

Apesar dos numerosos trabalhos realizados à volta desta cínase, continua muito limitado o conhecimento das funções específicas de cada uma das isoformas da PKC nas várias células e tecidos. Tal tarefa tem-se revelado complicada devido à coexistência de várias isoformas da PKC nos modelos celulares e teciduais estudados e ao reduzido número de activadores e inibidores disponíveis selectivos para cada uma das isoformas da PKC. Por outro lado, a pesquisa destes moduladores tem sido dificultada pela falta de um método que permitisse estudar, individualmente, cada isoforma, num ambiente celular.

O presente trabalho surgiu da necessidade de implementar um método que respondesse a essas necessidades e, desta forma, possibilitasse a pesquisa de agentes farmacológicos capazes de modular, de forma selectiva, cada isoforma da PKC.

O ensaio fenotípico das leveduras transformadas foi proposto como um método com potencialidades para colmatar as limitações apresentadas pelos tradicionais ensaios *in vivo* e *in vitro* para a pesquisa de moduladores desta cínase, permitindo o estudo de isoformas da PKC de mamífero, expressas individualmente numa célula eucariota.

Neste trabalho foi implementado o ensaio fenotípico das leveduras transformadas, tendo-se conseguido, pela primeira vez, a expressão de isoformas funcionais das três famílias da PKC: clássicas (α e β I), novel (δ e η) e atípicas (ζ), numa mesma espécie de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e numa mesma estirpe (CG379), o que tornou possível comparar a potência dos diferentes compostos sobre as distintas isoformas da PKC de mamífero, nas mesmas condições experimentais, e, desta forma, caracterizar a selectividade desses compostos para cada uma das isoformas expressas.

O presente estudo aferiu um conjunto de técnicas experimentais que visavam a obtenção de leveduras transformadas capazes de expressar, de forma funcional, cada uma das isoformas da PKC de mamífero e optimizou o ensaio fenotípico.

A capacidade do método para avaliar activadores e inibidores da PKC foi validada, testando-se um conjunto de activadores (nove ésteres de forbol) e inibidores (queleritrina,

NPC 15437, Ro 32-0432, rottlerina, tamoxifeno e D-esfingosina) da PKC conhecidos. No caso dos ésteres de forbol foi confirmada também a capacidade do ensaio para realizar estudos de estrutura-actividade, sugerindo-se pontos específicos da molécula como importantes para a actividade desta família de compostos. Estes trabalhos forneceram, ainda, novos dados a respeito dos compostos testados, constituindo o primeiro esforço no sentido de caracterizar a potência e a selectividade destes activadores e inibidores para as isoformas clássicas, novel e atípicas da PKC, expressas individualmente numa célula eucariota.

Com o ensaio fenotípico foi revelada, pela primeira vez, a capacidade da dafnetoxina, um composto extraído da casca do caule de *Daphne gnidium*, para activar as isoformas α , β I, δ e η da PKC, propondo-se um possível mecanismo molecular para explicar as diferenças de efeitos biológicos apresentados pela dafnetoxina e pelo seu análogo mezereína.

Através deste método confirmou-se que a euxantona, um composto isolado da madeira de *Cratoxylum maingayi*, é um activador da PKC. Os resultados obtidos revelaram que este composto era capaz de activar as isoformas α , β I, δ , η e ζ da PKC, apresentando uma elevada potência na PKC- ζ , o que aponta para o envolvimento preferencial desta isoforma no processo de diferenciação das células de neuroblastoma Neuro 2A (BU-1) induzido pela euxantona.

Foi estudada, também, a actividade moduladora de vinte e duas xantonas simples nas isoformas α , β I, δ , η e ζ da PKC, usando-se o ensaio fenotípico das leveduras transformadas. Os resultados obtidos revelaram compostos com um efeito compatível com uma activação da PKC, apresentando, inclusive alguns deles, selectividade para uma isoforma específica da PKC, nomeadamente para a PKC- δ (3,4-dimetoxixantona), para a PKC- η (xantona e 1,2-dimetoxixantona) e para a PKC- ζ (2-hidroxixantona, 2-metoxixantona, 3-hidroxixantona, 4-metoxixantona e 1,2-di-hidroxixantona). Além disso, duas das xantonas testadas, 3,4-di-hidroxixantona e 1-formil-4-hidroxi-3-metoxixantona, apresentaram um efeito compatível com uma inibição da PKC, revelando a 3,4-di-hidroxixantona uma elevada selectividade para a PKC- η . A capacidade destes dois compostos interagirem com a PKC, inibindo-a, foi confirmada através da realização de um ensaio enzimático *in vitro*.

Com este ensaio foi estudada, ainda, a actividade moduladora de cinco derivados kielcorínicos nas isoformas α , β I, δ , η e ζ da PKC. Este estudo mostrou que os cinco compostos apresentavam um efeito compatível com uma inibição da PKC, o qual foi confirmado através da realização de um ensaio enzimático *in vitro*. Além disso, o ensaio mostrou que estes compostos apresentavam diferenças nas suas potências e selectividades

para as diversas isoformas testadas, sendo de destacar a selectividade da *trans*-(±)-kielcorina C para a PKC- ζ e da *trans*-(±)-kielcorina D para as isoformas novel e atípica da PKC. Este estudo revelou, pela primeira vez, um possível mecanismo molecular capaz de explicar as actividades biológicas destes compostos.

Em conclusão, o presente trabalho implementou o ensaio fenotípico das leveduras transformadas e validou a capacidade do ensaio para pesquisar activadores e inibidores da PKC. Com a utilização deste ensaio foram revelados grupos de compostos bastante promissores para a obtenção de potenciais moduladores selectivos para as isoformas individuais da PKC.

ABSTRACT

Given the relevance of protein kinase C (PKC) isoforms on cellular regulation and signal transduction pathways, PKC has become a potential target for the treatment of pathological states and therefore is currently the center of exhaustive research in several areas of biomedicine.

In spite of all the literature dedicated to the study of this kinase, the knowledge of the specific functions of each PKC isoform in different cells and tissues remains very limited. Such task has been difficult since there is coexistence of several PKC isoforms in the cellular and tissue models studied and because the number of activators and inhibitors selective for each PKC isoform, available for research, is small. On the other hand, the search for these modulators has been hampered by the lack of a method that allowed to study each individual PKC isoform in a cellular environment.

The aim of the present work was to implement a method that would answer these methodological limitations and therefore would allow the search of isoform-selective pharmacological agents.

The yeast phenotypic assay, using transformed yeast, has been proposed as a method with a potential to circumvent the limitations presented by the traditional *in vivo* and *in vitro* assays used for the screening of PKC modulators, allowing the study of mammalian PKC isoforms, which were individually expressed in an eukariotic cell.

In the present work, the yeast phenotypic assay was implemented and expression of functional isoforms of the three PKC families: classical (α and β I), novel (δ and η) and atypical (ζ) was obtained, for the first time, in the same yeast species (*Saccharomyces cerevisiae*) and in the same strain (CG379). This fact has made possible to compare the potency of different compounds on the individual mammalian PKC isoforms, under the same experimental conditions and, therefore, to characterize the selectivity of those compounds for each isoform expressed.

In this study, the experimental procedures necessary to obtain transformed yeast capable of functionally express each individual mammalian PKC isoform were optimised and the yeast phenotypic assay was improved.

The capacity of this method to screen for PKC activators and inhibitors was validated by testing a series of known PKC activators (nine phorbol esters) and inhibitors (chelerythrine, NPC 15437, Ro 32-0432, tamoxifen, rottlerin and D-sphingosine). In the case

of phorbol esters, the capacity of the assay to carry out structure-activity relationship studies was also confirmed, suggesting specific sites of the molecule as being important for the activity of this family of compounds. These works also provide new data about the tested compounds, constituting the first attempt for the characterisation of the potency and selectivity of these activators and inhibitors for the classical, novel and atypical PKC isoforms, which were individually expressed in an eukariotic cell.

The capacity of daphnetoxin, a compound extracted from the steam bark of *Daphne gnidium*, to activate the isoforms α , β I, δ and η of PKC was revealed for the first time. A possible molecular mechanism to explain the different biological effects presented by daphnetoxin and its analogue mezerein was also proposed, using the yeast phenotypic assay.

This method also allowed to confirm that euxanthone, a compound isolated from the wood of *Cratoxylum maingayi*, is a PKC activator. The results obtained revealed that this compound was capable of activating the α , β I, δ , η and ζ isoforms of PKC, presenting a high potency on PKC- ζ , what suggests that this isoform is the one mostly involved in the differentiation of neuroblastoma Neuro 2A (BU-1) cells induced by euxanthone.

The modulatory activity of twenty two simple xanthenes on isoforms α , β I, δ , η and ζ of PKC was also studied, using the yeast phenotypic assay. The results obtained revealed that these compounds had an effect compatible with PKC activation, some of them presenting selectivity for a specific PKC isoform, namely for PKC- δ (3,4-dimethoxyxanthone), for PKC- η (xanthone and 1,2-dimethoxyxanthone) and for PKC- ζ (2-hydroxyxanthone, 2-methoxyxanthone, 3-hydroxyxanthone, 4-methoxyxanthone and 1,2-dihydroxyxanthone). Furthermore, two of the xanthenes tested, 3,4-dihydroxyxanthone and 1-formyl-4-hydroxy-3-methoxyxanthone, had an effect compatible with PKC inhibition, presenting the 3,4-dihydroxyxanthone a high selectivity for PKC- η . The capacity of these two compounds to interact and inhibit PKC was confirmed using an *in vitro* kinase assay.

The modulatory activity of five kielcorin derivatives on isoforms α , β I, δ , η and ζ of PKC was also investigated. This study showed that the five compounds presented an effect compatible with PKC inhibition, which was confirmed by the *in vitro* kinase assay. Furthermore, the assay showed that these compounds presented differences on their potencies and selectivities for the different isoforms tested. Of most relevance is the selectivity presented by *trans*-($\pm$)-kielcorin C for PKC- ζ and by *trans*-($\pm$)-kielcorin D for novel and atypical PKC isoforms. This study revealed, for the first time, a possible molecular mechanism for the biological activities of these compounds.

In conclusion, in the present work the yeast phenotypic assay was developed and its capacity for screening PKC activators and inhibitors was validated. The use of this assay revealed promising groups of compounds in order to obtain potential isoform-selective PKC modulators.

RESUMÉ

En raison de la relevance des isoformes de la kinase C des protéines (PKC) dans la régulation cellulaire et dans les voies de transduction du signal, la PKC c'est révélé un cible potentiel vis-à-vis des traitements des pathologies sévères. Elle est donc devenue le centre d'une recherche intensive dans une grande variété des domaines biomédicaux.

Malgré des nombreux travaux réalisés sur cette kinase, les fonctions spécifiques de chacune de ses isoformes aux niveaux cellulaires et tissulaires sont encore très mal connues. Depuis toujours la mis en œuvre de la caractérisation fonctionnelle s'est révélée compliquée en raison de la co-existence de diverses isoformes de PKC dans les tissus et les cellules utilisés comme modèles d'étude; et aussi à cause d'une disponibilité réduite d'activateurs et d'inhibiteurs suffisamment sélectifs pour les différentes isoformes. D'un autre côté, l'absence d'une méthodologie expérimentale qui permet d'étudier individuellement chacune des isoformes en ambiance cellulaire a empêché l'avancée de la recherche de ces modulateurs.

Cette étude est apparue pour pallier ces problèmes en établissant une méthodologie qui permettrait de mettre en place la recherche d'agents pharmacologiques capables de moduler d'une façon sélective les différentes isoformes de la PKC.

Un test phénotypique de levures transformées a été proposé comme une méthode potentielle pour résoudre les limites des essais traditionnels soit *in vivo* soit *in vitro*, vis-à-vis de la recherche des modulateurs de la PKC. Ainsi l'étude des différentes isoformes de la PKC exprimées individuellement dans la cellule eucaryote de mammifère est devenu possible.

Dans ce travail, la mise en place du test des levures transformées a permis d'obtenir pour la première fois l'expression d'isoformes fonctionnelles des trois familles de la PKC: classique (α et β I), novel (δ et η) et atypiques (ζ), dans la même espèce de levure (*Saccharomyces cerevisiae*), même souche (CG379) et dans les mêmes conditions expérimentales. Ainsi l'étude comparative de la puissance des divers composés sur les isoformes de cette enzyme exprimées chez le mammifère a été possible, de sorte que les différences sélectives de ces agents ont été mises en évidence, parallèlement à la caractérisation pharmacologique de chacune des isoformes de la PKC. Cette étude présente un ensemble de techniques pour obtenir des levures transformées capables d'exprimer, d'une façon fonctionnelle, chacune des isoformes de la PKC de mammifère, mais aussi de permettre l'optimisation du test phénotypique.

L'évaluation de cette méthode pour tester des activateurs et inhibiteurs de la PKC a été validée par l'utilisation d'un groupe d'activateurs (neuf esters de phorbol) et d'un groupe d'inhibiteurs (chelerithrine, NPC 15437, Ro32-0432, rottlerine, tamoxifene et D-sphingosine) connus de la PKC. En outre, les esters de phorbol ont plus particulièrement confirmé la capacité de la méthode pour la réalisation d'études de structure-activité par la détermination des sites spécifiques de la molécule pouvant être importants pour l'activité de cette famille de composés. De surcroît, ces travaux ont fourni de nouvelles informations sur les agents testés. En effet ces résultats constituent les premières tentatives de caractérisation de la puissance et sélectivité de ces activateurs et inhibiteurs sur les isoformes classiques, novel et atypiques de la PKC exprimées individuellement dans une cellule eucaryote.

La réalisation de ce test phénotypique a permis de montrer, pour la première fois, la capacité de la dafnetoxine (un composant extrait de l'écorce de la tige de *Dapne gnidium*) à activer les isoformes α , β I, δ , η de la PKC; ainsi que de proposer un mécanisme moléculaire possible permettant d'expliquer les différences des effets biologiques présentés par la dafnetoxine et son analogue, la mezeleine.

Cette méthode a permis aussi de confirmer que la euxanthone (un composant isolé du bois de *Cratoxylum maingayi*) est un activateur de la PKC. Les résultats obtenus montrent que cette substance est capable d'activer les isoformes α , β I, δ , η et ζ de la PKC, en montrant une puissance plus soutenue pour la PKC- ζ , suggérant un rôle préférentiel de cette isoforme dans la différenciation cellulaire du neuroblastome Neuro 2A (BU-1).

L'utilisation du test des levures transformées a permis aussi, d'étudier l'activité modulatrice de vingt-deux xanthones simples pour les isoformes α , β I, δ , η et ζ de la PKC. Les résultats de cette étude ont montré que ces composés ont un effet comparable avec une activation de la PKC. Certains d'entre eux présentent également une sélectivité élevée pour une isoforme spécifique de cette kinase, particulièrement pour la PKC- δ (cas de la 3,4-diméthoxyxanthone) et pour la PKC- ζ (la 2-hydroxyxanthone, 2-méthoxyxanthone, 3-hydroxyxanthone, 4-méthoxyxanthone et 1,2-dihydroxyxanthone). D'autre part, deux des xanthones testées (3,4-dihydroxyxanthone et 1-formyl-4-hydroxy-3-méthoxyxanthone), ont présenté un effet similaire d'une inhibition de la PKC, et la 3,4-dihydroxyxanthone a montré une sélectivité élevée pour la PKC- η . L'interaction entre ces deux xanthones inhibitrices et la PKC a été confirmée par la réalisation d'un test enzymatique *in vitro*.

Suite à la validation de cette technique, l'activité modulatrice de cinq dérivés kielcoriniques sur les différentes isoformes de la PKC (α , β I, δ , η et ζ) a été étudiée. Cette

étude a montré que ces cinq substances présentent une activité comparable à une inhibition de la PKC, confirmée par l'utilisation d'un test enzymatique *in vitro*. Le test a également montré que ces composés présentent des différences dans leurs sélectivités et puissances pour les diverses isoformes testées; notamment en ce qui concerne leur sélectivité élevée de la *trans*-($\pm$)-Kielcorine C pour l'isoforme ζ , et de la *trans*-($\pm$)-Kielcorine D pour les nPKCs et aPKCs. Cette étude a montré, pour la première fois, un possible mécanisme moléculaire capable d'expliquer les activités biologiques de ces composés.

En conclusion, ce travail a permis de développer un test phénotypique de levures transformées mais également de valider sa capacité pour la recherche d'activateurs et d'inhibiteurs de la PKC. Celui-ci a aussi mis en évidence un ensemble de substances très prometteuses vis-à-vis de l'obtention de potentiels modulateurs sélectifs pour des isoformes spécifiques de la PKC.

ABREVIATURAS

aPKCs	PKCs atípicas
ATP	Trifosfato de adenosina
cDNA	DNA complementar
cPKCs	PKCs clássicas ou convencionais
DG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
dPPA	20-Acetato-13-fenilacetato de 12-desoxiforbol
EC₅₀	Concentração do composto capaz de causar 50 % da resposta máxima
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos da América
NPC 15437	Fluoreto de R-2,6-diamino-N-[[1-(1-oxotridecil)-2-piperidinil]metil]-hexanamida
nPKCs	PKCs novel
PA	13-Monoacetato de forbol
pb	Pares de bases
PDA	12,13-Diacetato de forbol
PDBu	12,13-Dibutirato de forbol
PDD	12,13-Didecanoato de forbol
PKC	Cínase C de proteínas
PKC-α	Isoforma α da PKC
PKC-βI	Isoforma β I da PKC
PKC-δ	Isoforma δ da PKC
PKC-ϵ	Isoforma ϵ da PKC
PKC-γ	Isoforma γ da PKC
PKC-η	Isoforma η da PKC
PKC-μ	Isoforma μ da PKC
PKC-ν	Isoforma ν da PKC

PKC-ζ	Isoforma ζ da PKC
PKD	Cínase D de proteínas
PMA	13-Acetato-12-miristato de forbol
4α-PMA	4 α -13-Acetato-12-miristato de forbol
4-MPMA	4-Metoxi-13-acetato-12-miristato de forbol
PMM	12-Monomiristato de forbol
PRK	Cínases relacionadas com a PKC
PS	Fosfatidilserina
q.b.p.	Que baste para
RFUs	Unidades de fluorescência relativa
RNA	Ácido ribonucleico
Ro 32-0432	Hidrocloreto de 2-(8-[(dimetilamino)metil]-6,7,8,9-tetra- hidropirido[1,2-a]indol-3-il)-3-(1-metilindol-3-il)maleimida
r.p.m.	Rotações por minuto
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

Em 1977 foi identificada, pela primeira vez, uma cínase de proteínas no cérebro de Rato, definida como um novo tipo de cínase citoplasmática que fosforilava resíduos de serina e treonina de inúmeras proteínas alvo. A activação desta proteína mostrou ser dependente do cálcio e fosfolípidos, sendo designada por cínase C de proteínas (PKC) (Inoue *et al.*, 1977; Takai *et al.*, 1977).

Logo de imediato foi verificado que esta enzima também podia ser activada, *in vitro*, pelo diacilglicerol (DG), na presença de fosfolípidos, como a fosfatidilserina (PS) (Takai *et al.*, 1979). Esta observação forneceu um possível mecanismo para explicar a ligação entre a quebra do 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂), desencadeada por um estímulo extracelular, e a fosforilação de proteínas celulares (Kishimoto *et al.*, 1980; Nishizuka, 1984). Estudos posteriores estabeleceram as ligações que faltavam entre o metabolismo dos fosfolípidos de membrana, a mobilização do cálcio, a fosforilação de proteínas e a activação celular, processos que ocorrem quando as células são expostas a uma grande variedade de sinais extracelulares, como por exemplo, aos factores de crescimento (Ohno & Nishizuka, 2002).

Com base nas sequências dos peptídeos extraídos do cérebro de Rato, foram isolados os DNAs complementares (cDNAs) que codificavam a PKC (Parker *et al.*, 1986). Durante este processo observou-se que a PKC não era codificada por um único, mas por vários RNA mensageiros estruturalmente muito relacionados que potencialmente codificariam várias cínases com propriedades similares (Coussens *et al.*, 1986; Knopf *et al.*, 1986; Makowske *et al.*, 1986; Housey *et al.*, 1987; Ohno *et al.*, 1987), sugerindo-se a existência da PKC como uma família de proteínas estreitamente relacionadas, as quais participariam nos processos celulares inicialmente atribuídos a uma única enzima.

Actualmente, a PKC constitui a maior família de cínases de resíduos de serina e treonina conhecida (Parker, 1992).

Desde a sua descoberta, a PKC tem vindo a afirmar-se como a principal cínase envolvida na regulação celular e das vias de transdução de sinal, e tem sido alvo de uma investigação exaustiva numa grande variedade de áreas da biomedicina, como a bioquímica, a farmacologia, a endocrinologia, a oncologia, a neurociência e a biologia celular (Nishizuka, 1984; Bradshaw *et al.*, 1993; Nishizuka, 1995; Goekjian & Jirousek, 1999; Hofmann, 2001). O desenvolvimento embrionário (Otte *et al.*, 1991), memória (Alkon, 1989), transmissão

sináptica, fluxo iónico, controlo do ciclo celular (Goekjian & Jirousek, 2001; Hofmann, 2001), resistência a fármacos antitumorais (Goekjian & Jirousek, 2001; Hofmann, 2001; Swannie & Kaye, 2002), diferenciação celular (Clemens *et al.*, 1992; Cutler *et al.*, 1993; Goekjian & Jirousek, 2001; Hofmann, 2001), proliferação celular (Clemens *et al.*, 1992; Murray *et al.*, 1993; Musashi *et al.*, 2000; Hofmann, 2001; da Rocha *et al.*, 2002), promoção de tumores (Nishizuka, 1984; Hofmann, 2001) e apoptose (Leszczynski, 1996; Musashi *et al.*, 2000; Goekjian & Jirousek, 2001; Hofmann, 2001) são exemplos de processos nos quais a PKC tem sido implicada.

A multiplicidade de isoformas, associada à diferente distribuição intra e intercelular e intertecdular, poderão explicar por que razão tantas são as funções celulares, por vezes antagónicas, atribuídas a esta cínase (Webb *et al.*, 2000).

Dada a importância fisiológica da PKC e o seu provável envolvimento em numerosas patologias, como as de natureza autoimune, cardiovascular, neurológica e oncológica (Bradshaw *et al.*, 1993; Goekjian & Jirousek, 1999; Hofmann, 2001), muitos foram os trabalhos dedicados ao estudo desta cínase, conduzindo a avanços fundamentais na compreensão da sua regulação e na forma como as diferentes isoformas estão envolvidas nas várias vias de transdução de sinal (Ohno & Nishizuka, 2002).

Apesar da grande diversidade de campos de investigação e do elevado número de trabalhos publicados tornar complicado saber o que continua por esclarecer a respeito da PKC (Ohno & Nishizuka, 2002), até hoje, são poucos os trabalhos que se centram no estudo das isoformas individuais (Moscat & Diaz-Meco, 2000; Isakov & Altman, 2002). De facto, o conhecimento das funções fisiológicas de cada uma das isoformas da PKC é, ainda, reduzido, constituindo um dos principais desafios de trabalhos futuros nesta área (Hofmann, 1997; Way *et al.*, 2000; Hofmann, 2001; Ohno & Nishizuka, 2002). Para vencer este desafio, a disponibilidade de compostos activadores e inibidores selectivos para a PKC e, de preferência, para as isoformas individuais, seria uma grande vantagem (Hofmann, 1997).

Apesar de, actualmente, se verificar uma procura exaustiva destes compostos selectivos (Barry & Kazanietz, 2001), são poucos os agentes moduladores desta cínase que apresentam tais características (Way *et al.*, 2000). Assim, novos compostos, com um maior grau de selectividade para cada uma das isoformas da PKC, são urgentemente necessários. Sem esses agentes farmacológicos, o estudo das funções e a regulação de cada uma das isoformas da PKC torna-se difícil (Hofmann, 1997; Way *et al.*, 2000; Hofmann, 2001).

1. As vias de transdução de sinal e as cínases de proteínas

A proliferação, diferenciação, movimento e morte celular programada são fenómenos que parecem ter pouco em comum. Contudo, cada uma destas actividades depende de sinais extracelulares que alteram a fisiologia da célula, frequentemente através da activação e/ou da repressão de genes. As vias celulares utilizadas para enviar ou transportar esses sinais extracelulares para locais específicos dentro da célula são referidas como vias de transdução de sinal. Estas vias envolvem proteínas e alguns mensageiros secundários não proteicos, tais como os iões de cálcio, o monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), o monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), o DG e o 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) (Hughes, 1992).

As cínases de proteínas, assim designadas porque catalisam a fosforilação de outras proteínas alvo (substrato), são proteínas que funcionam nas vias de transdução de sinal, existindo, em geral, em um de dois estados: activo e inactivo. A sua actividade é frequentemente determinada pelo grau de fosforilação ou pelos níveis dos mensageiros secundários (Dunkley & Kemp, 1992).

As cínases de proteínas são classificadas com base nos aminoácidos que fosforilam e no(s) factor(es) necessário(s) à sua activação. Desta forma, a PKC engloba uma vasta família de cínases que fosforilam resíduos de serina e treonina e que são activadas, directamente, pelos mensageiros secundários DG e/ou cálcio (Dunkley & Kemp, 1992).

Um exemplo bem estudado corresponde ao processo de transdução de sinal mediado pelas PKCs clássicas que são activadas pelo DG e cálcio, na presença da PS (Musashi *et al.*, 2000) (Figura 1).

A PKC activada fosforila proteínas das vias de transdução, levando, frequentemente, à sua activação. Por exemplo, as cínases reguladas por sinais extracelulares (ERKs) activadas pela PKC podem activar factores de transcrição, tais como *myc*, *myb*, *max*, *fos* e *jun*, impedindo a expressão de genes que codificam para enzimas requeridas em funções fisiológicas chave, tais como a proliferação e a invasão celular (da Rocha *et al.*, 2002).

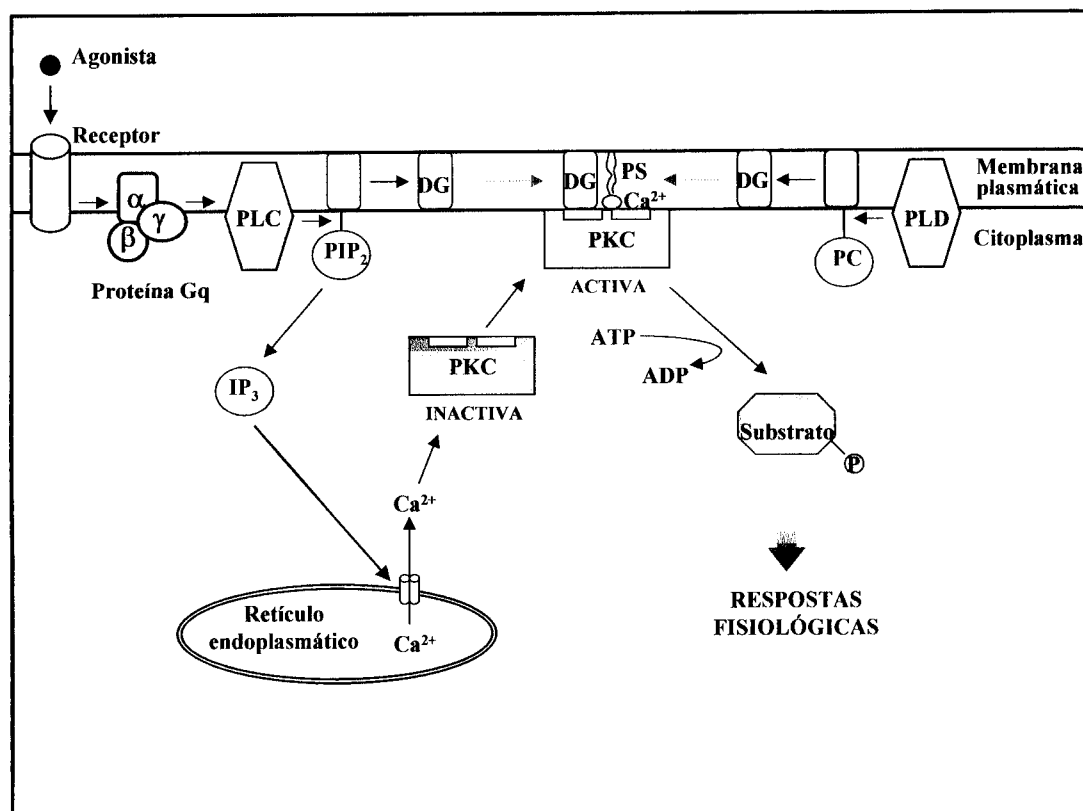


Figura 1. Representação esquemática das vias de transdução de sinal mediadas pelas PKCs clássicas.

Um agonista (como um factor de crescimento) ao ligar-se ao receptor da membrana altera a sua conformação. Isto estimula uma proteína G (Gq) existente na sua vizinhança que, por sua vez, irá estimular uma fosfolipase C (PLC) associada à membrana. A PLC activada catalisa a formação do diacilglicerol (DG) e do 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3), a partir do 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) existente na membrana. O IP_3 formado promove a libertação do cálcio do retículo endoplasmático. O cálcio liga-se à PKC, promovendo a sua translocação até à membrana plasmática, onde será activada pelo DG e pela fosfatidilserina (PS).

A fosfolipase D (PLD) pode produzir DG através da hidrólise da fosfatidilcolina (PC), constituindo, também, uma fonte adicional de DG. A PKC activada irá fosforilar outras proteínas da via de transdução (substrato), resultando em várias respostas celulares.

2. A família da PKC

Classificação e organização

Actualmente, a PKC é conhecida como sendo uma família contendo, no mínimo, 10 isoformas (Barry & Kazanietz, 2001; Newton, 2001; Webb *et al.*, 2000), cada uma codificada

por um gene diferente, com excepção de duas (PKC- β I e PKC- β II), as quais resultam do *splicing* alternativo de um mesmo gene (Ono *et al.*, 1987).

Estes membros estão divididos em 3 grupos (Figura 2), com base nas suas estruturas primárias e cofactores requeridos para activação (Burns & Bell, 1991; Nishizuka, 1992). As PKCs clássicas ou convencionais (cPKCs) foram as primeiras a ser identificadas (Parker *et al.*, 1986). Este grupo é composto pelas isoformas α , β I, β II e γ que se caracterizam por serem activadas pelo DG ou pelos ésteres de forbol (como o 13-acetato-12-miristato de forbol; PMA) e por fosfolípidos, principalmente a PS, de uma forma dependente do cálcio. As PKCs novel (nPKCs) incluem as isoformas δ , ϵ , η e θ que são insensíveis ao cálcio, mas continuam a ser activadas pelo DG ou ésteres de forbol, na presença de fosfolípidos. O terceiro grupo corresponde às PKCs atípicas (aPKCs) que incluem as isoformas ζ e ι/λ (PKC- ι no Homem e PKC- λ no Ratinho). As aPKCs são, tal como as nPKCs, insensíveis ao cálcio, mas, ao contrário das cPKCs e nPKCs, não respondem ao DG ou aos ésteres de forbol, apenas requerendo fosfolípidos para a sua activação (Blobe *et al.*, 1996; Hofmann, 2001).

Além das isoformas da PKC acima referidas, existem outras cínases que compartilham regiões muito semelhantes às das isoformas da PKC. Uma delas é a PKC- μ , uma cínase de serina e treonina que representa a proteína humana (Johannes *et al.*, 1994) equivalente à cínase D de proteínas (PKD) de Ratinho (Valverde *et al.*, 1994). Trata-se de uma cínase independente do cálcio, mas que também é activada pelo DG ou pelos ésteres de forbol (Barry & Kazanietz, 2001). Apesar de existirem alguns autores que consideram a PKC- μ /PKD uma nova isoforma da PKC (Newton, 1997; Barry & Kazanietz, 2001), a sua inclusão nesta família é bastante controversa, uma vez que difere das isoformas da PKC na sua regulação e selectividade para os substratos (Ron & Kazanietz, 1999). Além disso, a diferença de 54 aminoácidos existente entre a PKC- μ e a PKD excede o número observado para as outras isoformas da PKC, quando se fazem comparações interespecies (Webb *et al.*, 2000).

Recentemente, foi identificada uma outra cínase análoga à PKC- μ /PKD, a PKC- ν (Hayashi *et al.*, 1999), no entanto, ainda não existem informações quanto ao facto desta proteína ser ou não um receptor dos ésteres de forbol (Barry & Kazanietz, 2001).

As cínases relacionadas com a PKC (PRKs) 1-3 constituem uma família de cínases que compartilham regiões semelhantes com as isoformas da PKC. Estas cínases são, tal como as aPKCs, insensíveis ao cálcio, ao DG e aos ésteres de forbol requerendo apenas fosfolípidos, como a PS, para a sua activação (Palmer *et al.*, 1994; Kitagawa *et al.*, 1995;

Palmer & Parker, 1995). Esta família de enzimas é considerada, em alguns trabalhos, uma extensão da família da PKC (da Rocha *et al.*, 2002).

Existem cínases menos relacionadas com a família da PKC. Uma delas é a cínase B de proteínas (PKB), rac-PK ou Akt, identificada como sendo uma cínase de serina e treonina com uma região catalítica semelhante à da PKC (Coffer & Woodgett, 1991), mas que difere nos domínios C1 e C2 (Ohno & Nishizuka, 2002).

Da clivagem proteolítica da PKC, pela protease calpaína, resulta uma subunidade catalítica livre, conhecida como cínase M de proteínas (PKM), que apenas requer o magnésio para a sua activação (Newton, 2001). Apesar da relevância fisiológica da PKM ainda não estar totalmente compreendida, uma cínase independente do cálcio e fosfolípidos, semelhante à PKM, tem sido detectada em várias células, tal como em neutrófilos (Melloni *et al.*, 1986; Webb *et al.*, 2000).

As três famílias de isoformas (cPKCs, nPKCs e aPKCs) são conservadas numa grande variedade de espécies de metazoários, incluindo dois organismos como: *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila spp.* (Ohno & Nishizuka, 2002). Na levedura, as três classes de PKC e as PKRs não existem. No entanto, existem cínases semelhantes à PKC: uma na *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*; Pkc1p) e duas na *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*; Pck1p e Pck2p) (Perez & Calonge, 2002). A Pkc1p da *S. cerevisiae* é uma cínase de serina e treonina, com uma estrutura que sugere tratar-se de uma forma ancestral das cPKCs, nPKCs, aPKCs e PKRs dos eucariotas superiores (Mellor & Parker, 1998; Perez & Calonge, 2002).

Estrutura

Análises bioquímicas e genéticas mostraram que a molécula da PKC é formada por uma única cadeia polipeptídica, onde podemos distinguir duas regiões funcionais: uma região reguladora, localizada no terminal amino, e uma região catalítica, localizada no terminal carboxilo (Nishizuka, 1988; Ono *et al.*, 1988; Ono *et al.*, 1989) (Figura 2). A estrutura deste polipéptido compreende 4 domínios conservados (C1-C4) e 5 domínios variáveis (V1-V5) (Nishizuka, 1988; Ono *et al.*, 1988).

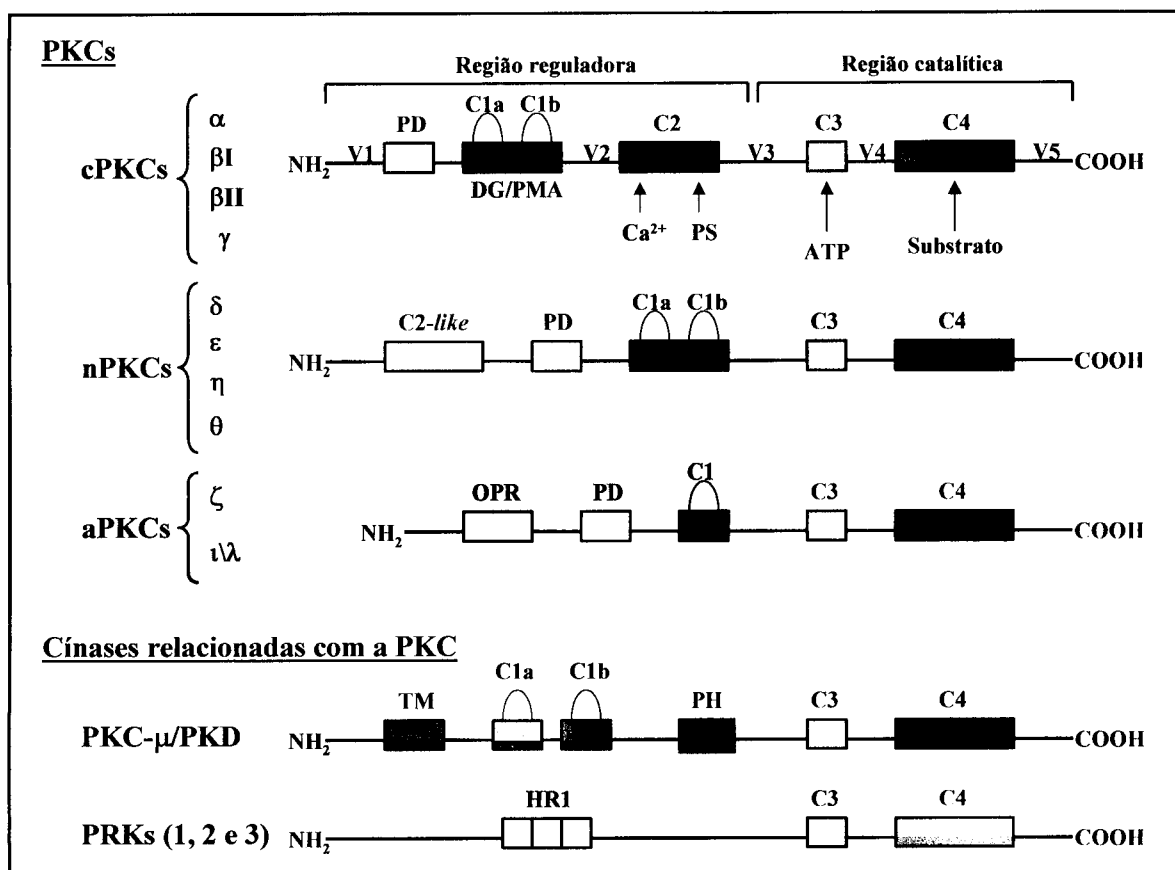


Figura 2. Representação esquemática da estrutura primária das isoformas da PKC, PKC- μ /PKD e PRKs.

As PKCs compreendem 4 domínios conservados (C1-C4) e 5 domínios variáveis (V1-V5) distribuídos por uma região reguladora e uma região catalítica. PD, pseudosubstrato; OPR, domínio *Octicosapeptide Repeat*, local de ligação das proteínas PAR-6 e ZIP/p62 (Ohno & Nishizuka, 2002); TM, domínio transmembranar; PH, domínio *Pleckstrin Homology*, local de ligação dos polifosfoinosítídeos e proteínas (Ron & Kazanietz, 1999); HR1, domínio *Homology Region 1*, com 3 sequências repetidas de aproximadamente 55 aminoácidos, local de ligação das proteínas da família Rho (Ohno & Nishizuka, 2002).

Estudos de sequenciação molecular mostraram que os domínios C1 e C2 estão localizados na região reguladora e os domínios C3 e C4 na região catalítica da enzima (Nishizuka, 1988; Ono *et al.*, 1988). As diferenças na estrutura primária das várias isoformas da PKC estão associadas, principalmente, com os domínios conservados (Way *et al.*, 2000). As cPKCs contêm os quatro domínios conservados (Barry & Kazanietz, 2001). Um domínio semelhante ao C2 das clássicas está presente no terminal amino das nPKCs (*C2-like*), enquanto que as aPKCs não possuem o domínio C2 (Barry & Kazanietz, 2001).

Os domínios C1 e C2 constituem as zonas da região reguladora que interagem com a membrana (Newton, 2001). Esta interacção é necessária para a ligação da proteína ao DG ou aos ésteres de forbol, PS e cálcio (Way *et al.*, 2000). Nas cPKCs e nas nPKCs, o domínio C1, com 50-51 aminoácidos, constitui o local de ligação ao DG e aos ésteres de forbol (Ono *et al.*, 1989; Quest *et al.*, 1994). Nestas isoformas, este domínio é constituído por dois sub-domínios ricos em cisteína, referidos como C1a e C1b, cada um dos quais com um átomo de zinco, essencial para a formação da prega em forma de dedo (*cysteine-rich zinc finger*; Hurley *et al.*, 1997). A equivalência entre C1a e C1b, na regulação da actividade da PKC, continua a ser uma questão controversa (Barry & Kazanietz, 2001). No entanto, estudos recentes demonstraram que a regulação da PKC pelos ésteres de forbol pode ocorrer através de cada um dos sub-domínios (ou de ambos em simultâneo) em algumas isoformas, como a PKC- α e - γ , ou apenas através do C1b noutras isoformas, como a PKC- δ (Newton, 2001).

As aPKCs possuem um domínio C1 apenas com uma região rica em cisteína, não sendo activadas pelo DG, nem pelos ésteres de forbol (Hayashi *et al.*, 1999; Ron & Kazanietz, 1999). A incapacidade de ligação das aPKCs ao DG e aos ésteres de forbol pode dever-se à inexistência, no seu domínio C1, de resíduos críticos necessários para a interacção com estes activadores (Ohno & Nishizuka, 2002). Desta forma, a função deste domínio nas aPKCs é, ainda, desconhecida (da Rocha *et al.*, 2002).

Um domínio C1, semelhante ao das cPKCs e nPKCs, é encontrado na PKC- μ /PKD e PKC- ν (Barry & Kazanietz, 2001) e, de forma interessante, noutras proteínas de mamífero, como é o caso das proteínas quimerinas, RasGRP e Unc-13/Munc13, capazes de se ligarem ao DG e ésteres de forbol (Kazanietz *et al.*, 1995; Ron & Kazanietz, 1999).

O domínio C1 está ausente nas PRKs, o que explica o facto destas cínases não responderem ao DG e aos ésteres de forbol (Barry & Kazanietz, 2001).

O domínio C2 constitui o local de ligação do cálcio e fosfolípidos, como a PS, contendo zonas para interagir com os receptores para as cínases C activadas (RACKs; Mochly-Rosen *et al.*, 1991a,b). O domínio *C2-like* das nPKCs que não se liga ao cálcio, parece estar envolvido na translocação da PKC ou nas interacções com outras proteínas (Way *et al.*, 2000).

Na região reguladora, próximo do domínio C1, localiza-se o designado pseudosubstrato, zona responsável pela autossupressão da actividade catalítica da PKC (House & Kemp, 1987). Esta região “autoinibidora” contém uma sequência consenso de fosforilação, mas não contém resíduos fosforiláveis, controlando, desta forma, a actividade da

cínase ao bloquear o acesso do substrato ao local catalítico (Soderling, 1990). A conversão na forma activa ocorre quando a afinidade do pseudosubstrato para a região catalítica diminui, em resposta à ligação à região reguladora da PKC dos seus cofactores, como o DG (Newton, 2001).

A região catalítica contém os domínios C3 e C4. O domínio C3, encontrado em todas as isoformas da PKC, é essencial para a actividade enzimática e representa o local de ligação do trifosfato de adenosina (ATP; Ono *et al.*, 1988). O domínio C4 constitui o local responsável pelo reconhecimento dos substratos a serem fosforilados pela PKC (Way *et al.*, 2000).

Os domínios variáveis da PKC representam sequências pouco conservadas entre as diversas isoformas. O domínio V3 (ou região charneira) constitui a zona de ligação entre a região reguladora e a região catalítica, sendo, também, o local de clivagem pela protease calpaína (Kishimoto *et al.*, 1983). O domínio variável V4 encontra-se a separar os domínios altamente conservados C3 e C4 (Webb *et al.*, 2000). O domínio V5 está envolvido na localização e fosforilação da PKC (Edwards & Newton, 1997).

3. Distribuição das isoformas da PKC em células e tecidos

A distribuição das isoformas da PKC varia de forma acentuada entre diferentes células e tecidos (Nishizuka, 1988; Wetsel *et al.*, 1992; Webb *et al.*, 2000).

Nem todas as isoformas são expressas por um único tipo de célula, variando também, de forma marcada, a quantidade de cada isoforma produzida numa mesma célula (Wetsel *et al.*, 1992; Leszczynski, 1996). Por exemplo, a PKC- α e - β são isoformas abundantes nos linfócitos T e B, mas inexistentes nas células mielóides (Musashi *et al.*, 2000); no pâncreas de Rato, as células β contêm apenas a PKC- α , enquanto que as células δ contêm a PKC- ϵ (Fletcher & Ways, 1991); na retina humana, a PKC- ζ aparece, exclusivamente, nos fotoreceptores, enquanto que a PKC- ϵ encontra-se, principalmente, nas células bipolares (da Rocha *et al.*, 2002).

Relativamente à distribuição das isoformas da PKC pelos tecidos, a PKC- α , - β I, - β II, - δ , - ϵ e - ζ são isoformas ubiquitárias enquanto que a PKC- γ está limitada ao cérebro (Musashi *et al.*, 2000). As PKC- η e - θ são encontradas em certos tecidos apenas: a isoforma η é

expressa em elevada quantidade na pele e pulmão e, em pequena quantidade, no cérebro e baço; a isoforma θ é expressa principalmente no músculo esquelético e, em menor extensão, no pulmão, baço, pele e cérebro (Musashi *et al.*, 2000).

As implicações funcionais destas observações não são ainda claras. Porém, alguns estudos demonstram que a expressão mais ou menos abundante poderá estar relacionada com funções específicas que cada isoforma da PKC desempenha (da Rocha *et al.*, 2002).

4. Localização intracelular das isoformas da PKC

As isoformas da PKC, quando activadas, deslocam-se de um compartimento celular para outro (translocação; Mochly-Rosen & Gordon, 1998). A translocação constitui o principal mecanismo responsável pela distribuição intracelular das isoformas da PKC. Os padrões de translocação diferem, significativamente, com a isoforma e o tipo de célula (Mochly-Rosen & Gordon, 1998).

A translocação da PKC da fracção solúvel para uma fracção celular específica, em resposta ao PMA, foi referida, pela primeira vez, por Kraft e colaboradores (1982). Estudos bioquímicos e imunoquímicos subsequentes, usando anticorpos específicos para uma dada isoforma da PKC, revelaram que a translocação da PKC poderia também ser induzida por uma estimulação fisiológica (Kiley *et al.*, 1991).

Um sistema desenvolvido recentemente que utiliza uma proteína com emissão de fluorescência (*Green Fused Protein*, GFP) ligada à PKC, permite a visualização da translocação da PKC nas células (Oancea *et al.*, 1998). Com base numa GFP ligada à PKC- δ , foi demonstrado que diferentes ligandos da PKC podem translocar a mesma isoforma para diferentes compartimentos intracelulares (Wang *et al.*, 1999a). A tecnologia da GFP tem permitido a visualização, em células vivas, do movimento dinâmico da PKC, tendo confirmado a espantosa diversidade de locais de ligação celulares desta cínase e a importância da translocação na regulação de funções fisiológicas específicas por cada uma das suas isoformas (Shirai & Saito, 2002).

A translocação da PKC para uma dada fracção celular era interpretada, inicialmente, como apenas um reflexo da ligação da enzima a lípidos da membrana plasmática (Mochly-Rosen *et al.*, 1991a). No entanto, tal parece ser mais específico e dever-se à interacção com

diferentes proteínas receptoras localizadas em zonas distintas da célula (proteínas de ancoragem: Mochly-Rosen *et al.*, 1991a,b; Mochly-Rosen & Gordon, 1998; Newton, 2001). Existe um elevado número de proteínas de ancoragem, algumas das quais comuns para várias isoformas da PKC, outras porém são específicas para uma dada isoforma (Newton, 2001).

As proteínas de ancoragem podem ser agrupadas com base na conformação da PKC exigida para a ligação, cofactores requeridos e se as proteínas são ou não substratos da PKC (Ron & Kazanietz, 1999). As PKCs numa conformação activa ligam-se a receptores para as cínases C activadas (RACKs) ou substratos que interactuam com as cínases C (STICKs), enquanto que as PKCs inactivas ligam-se a receptores para as cínases C inactivas (RICKs) ou a proteínas de ancoragem da cínase A de proteínas (AKAPs) (Ron & Kazanietz, 1999). Assim, estas proteínas fixam as formas activas ou inactivas das isoformas da PKC em compartimentos intracelulares específicos, podendo funcionar como substrato ou como veículo à proteína (Mochly-Rosen *et al.*, 1991a,b; Chapline *et al.*, 1998; Mochly-Rosen & Gordon, 1998; Ron & Kazanietz, 1999; Newton, 2001).

O facto das isoformas da PKC poderem ter substratos similares *in vitro*, mas regularem diferentes funções celulares, apoia fortemente a hipótese de que, para cada isoforma são os compartimentos intracelulares que determinam o substrato celular fosforilado e, conseqüentemente, as suas funções *in vivo* (Mochly-Rosen & Gordon, 1998; Barry & Kazanietz, 2001).

5. Funções específicas das isoformas da PKC

Apesar da diversidade de isoformas existentes numa mesma célula e da reduzida especificidade para os substratos que revelam *in vitro*, cada uma das isoformas da PKC parece estar envolvida em funções celulares próprias (Shirai & Saito, 2002), por vezes mesmo opostas (Musashi *et al.*, 2000). Além disso, nos últimos anos, tem-se tornado evidente que as funções desempenhadas por cada isoforma da PKC poderão variar com o tipo de célula (Leszczynski, 1996; Barry & Kazanietz, 2001; Hofmann, 2001). Coloca-se, assim, a questão de saber como é controlada, em cada célula, a especificidade de funções das isoformas da PKC. Para além da capacidade de diferentes estímulos fisiológicos translocarem, selectivamente, um dado tipo de isoforma da PKC para distintos compartimentos

intracelulares (Ohno, 1997), estudos mostraram que os mediadores lipídicos, como os ácidos gordos e os lisofosfolípidos, afectam de forma diferente a actividade catalítica de cada isoforma (Nishizuka, 1995), podendo representar um mecanismo adicional de selectividade.

Apesar de ainda não serem conhecidas as funções específicas para cada uma das isoformas da PKC, diferentes funções já têm sido atribuídas como preferenciais de algumas isoformas (Blobe *et al.*, 1996; Carter, 2000). Por exemplo, vários estudos têm atribuído à PKC- α um papel importante na regulação da apoptose (Romanova *et al.*, 1996; Keenan *et al.*, 1999; Musashi *et al.*, 2000) e da proliferação celular em vários tipos de cancros (Hofmann, 2001). A PKC- β I poderá estar associada à regulação do crescimento de células cancerígenas e à supressão (Choi *et al.*, 1990) ou formação (Borner *et al.*, 1995) de tumores. A PKC- β II parece estar envolvida em disfunções vasculares que ocorrem na diabetes (Inoguchi *et al.*, 1992). A PKC- γ poderá regular a formação de tumores (Persons *et al.*, 1988) e o crescimento celular (Mishima *et al.*, 1994). A PKC- ϵ reduz a apoptose (Basu & Cline, 1995; Musashi *et al.*, 2000), podendo funcionar como um oncogene (Cacace *et al.*, 1993) e conduzir a um aumento da proliferação celular e à formação de tumores (Mischak *et al.*, 1993). A PKC- δ apresenta efeitos opostos aos da PKC- ϵ (Watanabe *et al.*, 1992; Mischak *et al.*, 1993), interferindo no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (La Porta & Comolli, 1995), regulando os processos de apoptose (Gschwendt, 1999; Musashi *et al.*, 2000; Brodie & Blumberg, 2003), diferenciação celular (Gschwendt, 1999), proliferação celular (Mishima *et al.*, 1994; Gschwendt, 1999; Fujii *et al.*, 2000; Musashi *et al.*, 2000) e supressão de tumores (Gschwendt, 1999). A PKC- η parece estar envolvida no crescimento, diferenciação e carcinogénese em tecidos epiteliais (Greif *et al.*, 1992; Hashimoto *et al.*, 1992). A PKC- θ é quase exclusivamente expressa nas células T e pode ter uma função especializada nas vias de sinalização destas células (Baier *et al.*, 1994). As PKC- ζ e - λ têm uma função relevante na proliferação celular e apoptose (Lozano *et al.*, 1994; Diaz-Meco *et al.*, 1996; Musashi *et al.*, 2000; Hofmann, 2001).

Pela importância dos processos celulares regulados pelas diferentes isoformas da PKC, estas são consideradas um potencial alvo na intervenção terapêutica de numerosas patologias graves (Goekjian & Jirousek, 1999; Carter, 2000; Barry & Kazanietz, 2001; Hofmann, 2001; da Rocha *et al.*, 2002).

6. Moduladores da PKC

A maioria dos estudos efectuados sobre as funções da PKC baseiam-se na utilização de activadores e inibidores desta cínase (Ohno & Nishizuka, 2002). No entanto, a falta de selectividade de muitos destes compostos exige que os resultados sejam examinados de forma cautelosa (Hofmann, 2001; Ohno & Nishizuka, 2002).

Apesar de, inicialmente, se pensar ser impraticável conseguir-se uma modulação selectiva das isoformas individuais da PKC, dadas as semelhanças existentes entre os seus domínios, a descoberta de alguns compostos com potências diferentes para as distintas isoformas da PKC mostrou ser possível a obtenção de compostos isoforma-selectivos.

Activadores da PKC

A actividade fisiológica da PKC é regulada pelos moduladores alostéricos, cálcio, DG e fosfolípidos, principalmente a PS (Kishimoto *et al.*, 1980; Nishizuka, 1984). Dois tipos de DG parecem ser importantes para a activação fisiológica da PKC: um é rapidamente produzido a partir do PIP₂ pela fosfolípase C; o outro parece resultar da hidrólise da fosfatidilcolina pela fosfolípase D. Esta última produção de DG ocorre lentamente e é mais sustentada. Além da diferença na cinética de formação de DG, a composição do ácido gordo do DG derivado da fosfatidilcolina difere do formado a partir do PIP₂. De forma interessante, as isoformas da PKC apresentam uma sensibilidade diferente a estes dois tipos de DG. Assim, a composição dos ácidos gordos do DG e a cinética de sua formação podem ser determinantes das isoformas da PKC que serão activadas (Madani *et al.*, 2001).

Além dos fosfolípidos, outros lípidos, como os ácidos gordos saturados e insaturados (nomeadamente o ácido araquidónico, oleico, linoleico e esteárico) são considerados activadores fisiológicos de várias isoformas da PKC (Khan *et al.*, 1995). O ácido araquidónico, produzido em resposta a um estímulo extracelular, representa o principal ácido gordo intracelular livre, sendo um activador fisiológico da PKC que tem recebido uma atenção particular nos últimos anos (Barry & Kazanietz, 2001). Os ácidos gordos são conhecidos por causarem uma activação selectiva das isoformas da PKC (Nishizuka, 1995).

Por exemplo, os ácidos gordos saturados com uma cadeia carbonada com 13 a 18 carbonos activam preferencialmente a PKC- α , - β , - γ e - ϵ , *in vitro* (Kasahara & Kikkawa, 1995).

A ceramida, produzida a partir da esfingomielina pela esfingomielinase, também é considerada um activador da PKC, apesar da forma como o faz ser ainda alvo de controversa. Alguns autores sustentam que a ceramida activa directamente a PKC- ζ (Bourbon *et al.*, 2000), enquanto outros não conseguiram evidenciar a sua ligação directa a esta isoforma da PKC (Huwiler *et al.*, 1998). Adicionalmente, este composto, em baixas concentrações, activa a PKC- α , mas para altas concentrações perde esse efeito, podendo mesmo inibir a actividade desta isoforma (Huwiler *et al.*, 1998).

Além destes, outras substâncias endógenas têm sido propostas como potenciais activadores da PKC. O sulfato de colesterol, um metabolito do colesterol existente no epitélio, é descrito como sendo um composto capaz de activar selectivamente a PKC- η (Ikuta *et al.*, 1994). O ácido fosfatídico e os lisofosfolípidos (como a lisofosfatidilcolina) aumentam a actividade da PKC (Nishizuka, 1995), especialmente das cPKCs (Sasaki *et al.*, 1993) enquanto que os polifosfoinositídeos (3,4-bifosfato de fosfatidilinositol e 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol) são mensageiros secundários lipídicos que têm sido referidos como capazes de activar as isoformas da PKC independentes do cálcio. Apesar de ter sido questionada a selectividade destes compostos para a PKC, estes fosfoinositídeos activam a PKC- ϵ , - η e - ζ , mas não as cPKCs (Nakanishi *et al.*, 1993; Toker *et al.*, 1994).

Os ésteres de forbol foram os primeiros activadores exógenos referidos como capazes de activar a PKC (Castagna *et al.*, 1982; Niedel *et al.*, 1983), mimetizando a acção dos activadores endógenos, principalmente do DG (Nishizuka, 1986). Porém, ao contrário do DG, não são rapidamente metabolizados e, desta forma, causam uma activação prolongada (May *et al.*, 1986; Nishizuka, 1989).

Os ésteres de forbol foram usados, durante muitos anos, como agentes farmacológicos preferidos para a activação da PKC nos mais diversos modelos celulares (Barry & Kazanietz, 2001). No entanto, a descoberta de novos receptores para os ésteres de forbol colocou em causa a utilização destes compostos como activadores selectivos para a PKC (Ron & Kazanietz, 1999; Kazanietz, 2000; Kazanietz *et al.*, 2000). Assim, algumas das respostas biológicas causadas pelos ésteres de forbol e atribuídas a esta cínase poderão envolver a activação desses outros receptores (Ron & Kazanietz, 1999; Kazanietz, 2000; Kazanietz *et al.*, 2000; Ohno & Nishizuka, 2002). Adicionalmente, estudos *in vitro* mostraram que estes agentes não apresentavam selectividade para nenhuma isoforma em particular (Ryves *et al.*,

1991). O 20-acetato-13-fenilacetato de 12-desoxiforbol (dPPA) foi o único éster de forbol referido como sendo selectivo para uma isoforma, a PKC- β I, em estudos *in vitro* (Evans *et al.*, 1991; Ryves *et al.*, 1991). No entanto, esta selectividade tem sido questionada em estudos *in vivo* (Das *et al.*, 1998). Desta forma, as respostas fisiológicas obtidas com estes compostos poderão resultar da activação do conjunto de cínases sensíveis presentes na célula ou tecido em estudo. Por outro lado, os ésteres de forbol não permitem a avaliação da função das aPKCs nos processos biológicos, uma vez que estas isoformas não respondem a estes compostos (Ways *et al.*, 1992). Deste modo, os ésteres de forbol revelam-se compostos com limitações importantes para o estudo das funções mediadas pelas isoformas individuais da PKC (Way *et al.*, 2000).

Outros diterpenos como a mezereína, a octaidromezereína e a timeleatoxina, assim como vários compostos estruturalmente não relacionados, tais como as briostatinas, as indolactamas, as teleocidinas, os ingenóis, as aplisiatoxinas, a dibromoaplisiatoxina, a sapintoxina e a resiniferatoxina, são conhecidos activadores da PKC (Kazanietz *et al.*, 1993; Geiges *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999b; Kazanietz *et al.*, 2000; Barry & Kazanietz, 2001). Além destes, uma grande variedade de compostos, principalmente de origem natural, tem sido estudada, ao longo da última década, e reclamada uma propriedade activadora da PKC.

A timeleatoxina, um composto relacionado com a mezereína, foi descrita como apresentando alguma selectividade para as cPKCs (Ryves *et al.*, 1991; Kazanietz *et al.*, 1993). No entanto, um outro estudo alega que este composto é capaz de activar isoformas da PKC além das cPKCs (Roivainen & Messing, 1993).

A sapintoxina D, a mezereína, a indolactama V e a resiniferatoxina foram referidos como sendo capazes de activar selectivamente a PKC- α , para concentrações entre 1 - 100 nM, activando, para uma concentração de 1 μ M, outras isoformas da PKC, como a PKC- γ , - δ , - ϵ e - η (Geiges *et al.*, 1997). A sapintoxina A é um composto descrito como capaz de activar todas as isoformas da PKC, com excepção da PKC- δ (Way *et al.*, 2000).

Recentemente, o bistrateno A, uma toxina poliéter, foi descrito como sendo um activador selectivo da PKC- δ (Watters & Parsons, 1999). O mecanismo de acção deste composto continua por esclarecer, uma vez que não parece competir com os ésteres de forbol para o local de ligação à PKC (Way *et al.*, 2000). No entanto, revela-se com particular interesse na clínica, principalmente na terapia do cancro (Way *et al.*, 2000), dado o conhecido envolvimento da PKC- δ em processos de proliferação celular e apoptose.

Alguns activadores da PKC estão já a ser avaliados pelo seu interesse terapêutico. A briostatina 1 e o PMA são exemplos de activadores da PKC que se encontram, actualmente, em ensaios clínicos. A briostatina 1 é um composto que, *in vitro*, activa as isoformas individuais da PKC numa extensão semelhante à dos ésteres de forbol e, paradoxalmente, *in vivo*, funciona como um antagonista de uma série de respostas biológicas levadas a cabo pelos ésteres de forbol (Barry & Kazanietz, 2001). Em diversos estudos este composto apresentou numerosos efeitos celulares antitumorais, encontrando-se em avaliação clínica como fármaco anticancerígeno (ensaios clínicos de Fase I: Hofmann, 2001; Swannie & Kaye, 2002 e ensaios clínicos de Fase II: Gonzalez *et al.*, 1999; Pagliaro *et al.*, 2000; Swannie & Kaye, 2002). Relativamente ao PMA, a sua administração a doentes com doença mielóide maligna mostrou que o tratamento com este composto é exequível, apresentando uma boa relação benefício/risco (Han *et al.*, 1998).

Inibidores da PKC

A participação da PKC, quando activada de forma inapropriada, no desenvolvimento de vários tipos de doenças crónicas inflamatórias e proliferativas sugere que os inibidores selectivos desta enzima poderão constituir agentes farmacológicos com uma vasta aplicação terapêutica (da Rocha *et al.*, 2002). Deste modo, uma grande variedade de compostos têm sido identificados ou desenvolvidos como inibidores da PKC.

Apesar de existirem muitos compostos capazes de inibir a actividade da PKC, a maioria não são selectivos, inibindo também a actividade de outras cínases, como a cínase A de proteínas (PKA), a cínase G de proteínas (PKG) e as cínases de tirosina (Caravatti *et al.*, 1994; Hu, 1996). Esta falta de selectividade para a PKC constitui um problema importante, uma vez que vários foram os trabalhos realizados que utilizaram estes inibidores (como a estaurosporina e o H-7) para investigar as funções desta cínase, sem ter em conta esta limitação (Barry & Kazanietz, 2001).

São poucos os inibidores disponíveis com selectividade para isoformas individuais da PKC, constituindo a procura destes inibidores um dos principais objectivos da pesquisa de compostos nesta área (Hofmann, 1997; Parker, 1999).

De acordo com os seus locais de interacção com a enzima, os inibidores da PKC podem ser classificados em dois grupos (Hofmann, 1997; Way *et al.*, 2000): os inibidores que

actuam na região reguladora (Tabela 1) e os inibidores que actuam na região catalítica (Tabela 2). Aqueles que exercem a sua acção na região reguladora podem interagir com o local de ligação dos ésteres de forbol (domínio C1) ou dos fosfolípidos (domínio C2), enquanto que os inibidores que exercem a sua acção na região catalítica podem interagir com o local de ligação do ATP (domínio C3) ou do substrato (domínio C4) (Way *et al.*, 2000; Barry & Kazanietz, 2001).

Tabela 1. Inibidores que actuam na região reguladora da PKC.

Inibidores	Referências
Adriamicina, Trifluoroperazina	Wise & Kuo, 1983
Aminoacridinas*	Hannun & Bell, 1988
Briostatina 1	Berkow & Kraft, 1989; Blumberg, 1991; Szallazi <i>et al.</i> , 1994; Swannie & Kaye, 2002
Calfostina C (UCN-1028C)	Kobayashi <i>et al.</i> , 1989; Bruns <i>et al.</i> , 1991; Gopalakrishna <i>et al.</i> , 1992; Swannie & Kaye, 2002
Cardiotoxina, Polimixina B	Raynor <i>et al.</i> , 1991
Cloropromazina, Dibucaina	Mori <i>et al.</i> , 1980
Cremofofor EL	Zhao <i>et al.</i> , 1989
Dequalinio	Rotenberg <i>et al.</i> , 1990; Rotenberg & Sun, 1998
Esfingosina e derivados	Hannun <i>et al.</i> , 1986; Hannun & Bell, 1989; Endo <i>et al.</i> , 1991; Swannie & Kaye, 2002
Miltefosina	Geilen <i>et al.</i> , 1991; Shoji <i>et al.</i> , 1991; Überall <i>et al.</i> , 1991; Swannie & Kaye, 2002
NPC 15437	Petros <i>et al.</i> , 1991; Sullivan <i>et al.</i> , 1991; 1992
Tamoxifeno	O'Brien <i>et al.</i> , 1985; Horgan <i>et al.</i> , 1986; O'Brien <i>et al.</i> , 1986; Rowlands <i>et al.</i> , 1995; Gundimeda <i>et al.</i> , 1996; Swannie & Kaye, 2002
Toremifeno	Swannie & Kaye, 2002

* O mecanismo de inibição deste composto é bastante complexo, pois ambas as regiões, catalítica e reguladora, da PKC são afectadas. No entanto, parece envolver, predominantemente, a região reguladora (Hannun & Bell, 1988).

Tabela 2. Inibidores que actuam na região catalítica da PKC.

Inibidores	Referências
Balanol (SPC 100840)	Hu, 1996; Gustafsson & Brunton, 1999; Barry & Kazanietz, 2001
Ceramida	Hannun <i>et al.</i> , 1993; Lucas & Sanchez-Margalet, 1995
CGP 41251	Meyer <i>et al.</i> , 1989; Marte <i>et al.</i> , 1994; Fabbro <i>et al.</i> , 1999; Swannie & Kaye, 2002
CGP 53506 e CGP 54345	Zimmermann <i>et al.</i> , 1996; Hofmann, 1997
Estaurosporina	Tamaoki <i>et al.</i> , 1986; Rüegg & Burgess, 1989; Tamaoki & Nakano, 1990; Swannie & Kaye, 2002
GF 109203X (Gö 6850)	Toullec <i>et al.</i> , 1991; Martiny-Baron <i>et al.</i> , 1993; Swannie & Kaye, 2002
Gö 6976	Martiny-Baron <i>et al.</i> , 1993; Swannie & Kaye, 2002
Gö 6983	Gschwendt <i>et al.</i> , 1996
Gö 7612 e Gö 7874	Goekjian & Jirousek, 1999; Swannie & Kaye, 2002
H-7	Hidaka <i>et al.</i> , 1984; Kawamoto & Hidaka, 1984
K-252	Kase <i>et al.</i> , 1986; Yamada <i>et al.</i> , 1987; Rüegg & Burgess, 1989
LY333531	Ishii <i>et al.</i> , 1996; Jirousek <i>et al.</i> , 1996; Swannie & Kaye, 2002
Quelertirina	Herbert <i>et al.</i> , 1990
Quercetina	Gschwendt <i>et al.</i> , 1983; Ferriola <i>et al.</i> , 1989; Swannie & Kaye, 2002
Ro 31-7549, Ro 31-8220	Dieter & Fitzke, 1991; Davis <i>et al.</i> , 1992; Wilkinson <i>et al.</i> , 1993
Ro 31-7208, Ro 31-8425	Wilkinson <i>et al.</i> , 1993
Ro 32-0432	Wilkinson <i>et al.</i> , 1993; Birchall <i>et al.</i> , 1994; Swannie & Kaye, 2002
Rotlerina	Gschwendt <i>et al.</i> , 1994
Sangivamicina	Loomis & Bell, 1988
UCN-01	Takahashi <i>et al.</i> , 1987; Rüegg & Burgess, 1989; Takahashi <i>et al.</i> , 1990; Tamaoki & Nakano, 1990; Seynaeve <i>et al.</i> , 1994; Swannie & Kaye, 2002

Uma vez que a maioria das cínases de serina, treonina e tirosina apresentam uma região catalítica estruturalmente similar (Rüegg & Burgess, 1989; Eckly-Michel *et al.*, 1997; Sodeoka *et al.*, 1998), os inibidores que actuam nesta região deveriam apresentar uma menor selectividade para a PKC (Rüegg & Burgess, 1989; Tamaoki & Nakano, 1990; Eckly-Michel *et al.*, 1997; Sodeoka *et al.*, 1998). No entanto, a verdade é que, até hoje, a maioria dos inibidores selectivos para a PKC disponíveis actuam neste local (Way *et al.*, 2000; Barry & Kazanietz, 2001).

Os inibidores da PKC melhor caracterizados são a seguir referidos.

A estaurosporina é, quimicamente, um indolocarbazol. Trata-se de um inibidor da PKC que compete com o ATP para o seu local de ligação (Way *et al.*, 2000; Hofmann, 2001; Swannie & Kaye, 2002), sendo, segundo resultados obtidos em modelos *in vitro*, um dos inibidores da PKC mais potentes (Baltuch *et al.*, 1993). No entanto, trata-se de um composto não selectivo para a PKC, inibindo uma grande variedade de cínases, como as de serina, treonina e tirosina (Tamaoki *et al.*, 1986; Way *et al.*, 2000; Hofmann, 2001; Swannie & Kaye, 2002). Apesar da sua reduzida selectividade para a PKC condicionar a sua utilização, a estaurosporina tem servido como um composto base para o desenvolvimento de novos inibidores da PKC (Hofmann, 2001; Swannie & Kaye, 2002). Entre eles é de destacar a 7-hidroxiestaurosporina ou UCN-01 (Takahashi *et al.*, 1987; Rüegg & Burgess, 1989; Takahashi *et al.*, 1990; Seynaeve *et al.*, 1994; Swannie & Kaye, 2002) e a N-benzoilestaurosporina, CGP 41251 ou PKC 412 (Meyer *et al.*, 1989; Marte *et al.*, 1994; Fabbro *et al.*, 1999; Swannie & Kaye, 2002), os quais apresentam, relativamente à estaurosporina, uma menor potência inibidora, mas uma maior selectividade para a PKC (Hofmann, 2001; Swannie & Kaye, 2002). Apesar de não revelarem selectividade para nenhuma isoforma em particular, estes compostos inibem preferencialmente as cPKCs (UCN-01: Swannie & Kaye, 2002 e CGP 41251: Marte *et al.*, 1994; Fabbro *et al.*, 1999). UCN-01 e CGP 41251 encontram-se, actualmente, em ensaios clínicos de Fase I (Swannie & Kaye, 2002).

O Gö 6976, o Gö 7612 e o Gö 7874 foram obtidos também a partir da estaurosporina, sendo considerados inibidores da PKC potentes e selectivos (Barry & Kazanietz, 2001). O Gö 6976 está descrito como sendo um inibidor selectivo para as cPKCs (Kitazawa *et al.*, 1999).

Os indolocarbazóis têm sido ainda usados para a obtenção de uma outra série de inibidores da PKC, as bisindolilmaleimidias (Gö 6983, GF109203X, Ro 31-7549, Ro 31-8220, Ro 31-8425, Ro 32-0432, LY333531). Estes compostos são menos potentes do que a

estaurosporina, mas apresentam elevada selectividade para algumas isoformas da PKC (Way *et al.*, 2000), sendo muito utilizados experimentalmente para o estudo das funções da PKC nas várias vias de transdução de sinal (da Rocha *et al.*, 2002). O GF109203X (Gö 6850) é capaz de inibir a PKC- α , - β , - δ e - ϵ , mas apresenta alguma selectividade para a PKC- α (Martiny-Baron *et al.*, 1993). O Ro 31-8220 está descrito como sendo selectivo para as cPKCs (Hofmann, 2001). O LY333531 constitui um dos mais promissores inibidores da PKC desenvolvido até hoje. Estudos efectuados demonstraram que este composto, um inibidor competitivo para o local de ligação do ATP, apresenta uma elevada selectividade para a PKC (Way *et al.*, 2000). Adicionalmente, este composto parece exibir uma elevada selectividade para a PKC- β (β I e β II) (Jirousek *et al.*, 1996; Parker, 1999). O LY333531 tem constituído um agente farmacológico de valor inestimável na clarificação de muitas funções da PKC- β e, actualmente, representa um potencial composto para uso terapêutico em estados patológicos vários (Way *et al.*, 2000) e, particularmente, na *diabetes mellitus* (Parker, 1999).

As calfoquinas, perilenoquinonas fúngicas, são menos potentes do que a estaurosporina, mas revelaram-se muito mais selectivas para a PKC (da Rocha *et al.*, 2002). Estes compostos actuam na região reguladora (da Rocha *et al.*, 2002; Swannie & Kaye, 2002). A calfoquina C (UCN-1028C), um conhecido representante desta classe de inibidores, é considerado um dos mais potentes inibidores selectivos da PKC até hoje disponíveis (da Rocha *et al.*, 2002). As calfoquinas apresentam uma actividade antitumoral proporcional à sua actividade inibidora da PKC (da Rocha *et al.*, 2002).

A queleritrina, uma benzofenantridina, foi descrita como sendo um inibidor da PKC potente e selectivo que compete com o ATP para o seu local de acção (Herbert *et al.*, 1990). No entanto, vários estudos têm contestado a utilização deste composto como um inibidor selectivo da PKC, dada a possibilidade da queleritrina poder interagir com outros alvos moleculares, para além desta cínase (Guillemain & Rossignol, 1995; Eckly-Michel *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000).

O tamoxifeno, um trifeniletileno, é um composto com propriedades anti-estrogénicas, muito usado no tratamento paliativo de carcinomas da mama positivos aos receptores de estrogénio (da Rocha *et al.*, 2002). No entanto, é também conhecida a sua eficácia no tratamento de cancros negativos aos receptores de estrogénio (da Rocha *et al.*, 2002). Este facto é justificado, pelo menos em parte, pela conhecida capacidade deste composto inibir a PKC (O'Brian *et al.*, 1985; Horgan *et al.*, 1986; O'Brian *et al.*, 1986; Rowlands *et al.*, 1995; Gundimeda *et al.*, 1996; da Rocha *et al.*, 2002; Swannie & Kaye, 2002).

O safingol (*L-treo*-diidroesfingosina) é um inibidor selectivo da PKC (Hannun *et al.*, 1986; Hu, 1996) que tem revelado efeitos promissores em ensaios clínicos de Fase I, potenciando a acção de quimioterápicos usados no tratamento de tumores (da Rocha *et al.*, 2002; Swannie & Kaye, 2002).

A rotlerina (ou malotoxina) é um inibidor da PKC descrito como sendo capaz de inibir selectivamente a PKC- δ (Gschwendt *et al.*, 1994). No entanto, é também conhecida a sua capacidade para actuar noutras cínases, além da PKC (Davies *et al.*, 2000; Way *et al.*, 2000; Soltoff, 2001).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um inibidor da PKC que compete com a PS para o mesmo local de ligação à PKC (Shoji *et al.*, 1991; Überall *et al.*, 1991). Apesar de não ser um composto selectivo para esta cínase, a actividade antitumoral revelada (ensaios clínicos de Fase II) parece dever-se, principalmente, à inibição da PKC (Swannie & Kaye, 2002).

7. Um método para a pesquisa de potenciais activadores e inibidores da PKC

Uma dificuldade no estudo dos moduladores da PKC encontra-se na extrapolação dos resultados obtidos *in vitro* para os modelos celulares, pois alguns estudos *in vitro* indicavam uma selectividade para muitos compostos, a qual não foi confirmada nos estudos realizados *in vivo* (Way *et al.*, 2000). De facto, os ensaios *in vitro*, apesar de permitirem o estudo dos compostos numa única isoforma da PKC, não permitem estudar a proteína integrada no seu ambiente celular. Desta forma, numerosos factores que influenciam a actividade de um composto, como a permeabilidade celular, a estabilidade metabólica e as interacções com outros alvos celulares para além da proteína em estudo, não podem ser avaliados neste tipo de ensaios.

A pesquisa de potenciais activadores e inibidores selectivos para as isoformas individuais da PKC tem sido muito dificultada pela falta de um método que permita estudar o efeito dos compostos numa única isoforma da PKC, integrada num ambiente celular. Nos métodos *in vivo* existentes, o estudo das isoformas individuais é complicado devido,

sobretudo, à coexistência de várias isoformas na mesma célula (Nishizuka, 1988; Stabel & Parker, 1991; Nishizuka, 1992; Parissenti *et al.*, 1999).

Com o objectivo de tentar contornar estas limitações metodológicas foi proposto um ensaio que utiliza leveduras transformadas que expressam isoformas individuais da PKC de mamífero (*yeast phenotypic assay*; Riedel *et al.*, 1993a,b,c). Este ensaio permite o estudo de uma única isoforma da PKC, a qual é expressa numa célula eucariota, cuja PKC endógena é diferente da PKC dos mamíferos (Levin *et al.*, 1990; Ogita *et al.*, 1990; Iwai *et al.*, 1992; Antonsson *et al.*, 1994; Perez & Calonge, 2002). Neste modelo existe uma correlação directa entre a activação da isoforma expressa e uma resposta fenotípica específica observada, tendo sido proposto como método para a pesquisa de potenciais activadores da PKC (Riedel *et al.*, 1993a,b,c; Su *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Shieh *et al.*, 1995; Parissenti *et al.*, 1996; Shieh *et al.*, 1996; Parissenti *et al.*, 1999). Adicionalmente, foi demonstrado que, neste ensaio, os inibidores da PKC eram capazes de reduzir o efeito causado pelos activadores, revelando tratar-se de um método também adequado para a pesquisa de inibidores (Keenan *et al.*, 1997a,b). Com este ensaio fenotípico das leveduras transformadas torna-se possível pesquisar moduladores selectivos para as isoformas individuais da PKC, num ambiente celular.

8. Objectivos do presente trabalho

A importância do papel das isoformas da PKC na compreensão e no tratamento de uma grande variedade de patologias tão graves como o cancro, justificou a pesquisa e implementação de um método que permitisse procurar fármacos capazes de modular, de forma selectiva, cada uma das isoformas da PKC. Dado o elevado número de compostos obtidos por síntese ou de origem natural que têm sido propostos como potenciais moduladores da PKC, tornava-se urgente dispor de um ensaio económico, simples e rápido que permitisse estudar, *in vivo*, esses compostos e em isoformas isoladas da PKC.

A implementação do ensaio fenotípico das leveduras transformadas teve por objectivos:

- i) expressar o maior número possível de isoformas funcionais das diferentes famílias da PKC, isoladamente e na mesma estirpe de leveduras;
- ii) otimizar o ensaio de forma a permitir o estudo de activadores e inibidores da PKC de uma forma simples e rápida, com a possibilidade de avaliação de um número elevado de compostos por ensaio;
- iii) validar o método pesquisando potenciais activadores e inibidores da PKC, num conjunto de compostos naturais e sintéticos de interesse biológico.

CAPÍTULO II

MÉTODOS GERAIS

IMPLEMENTAÇÃO DO ENSAIO FENOTÍPICO DAS LEVEDURAS TRANSFORMADAS

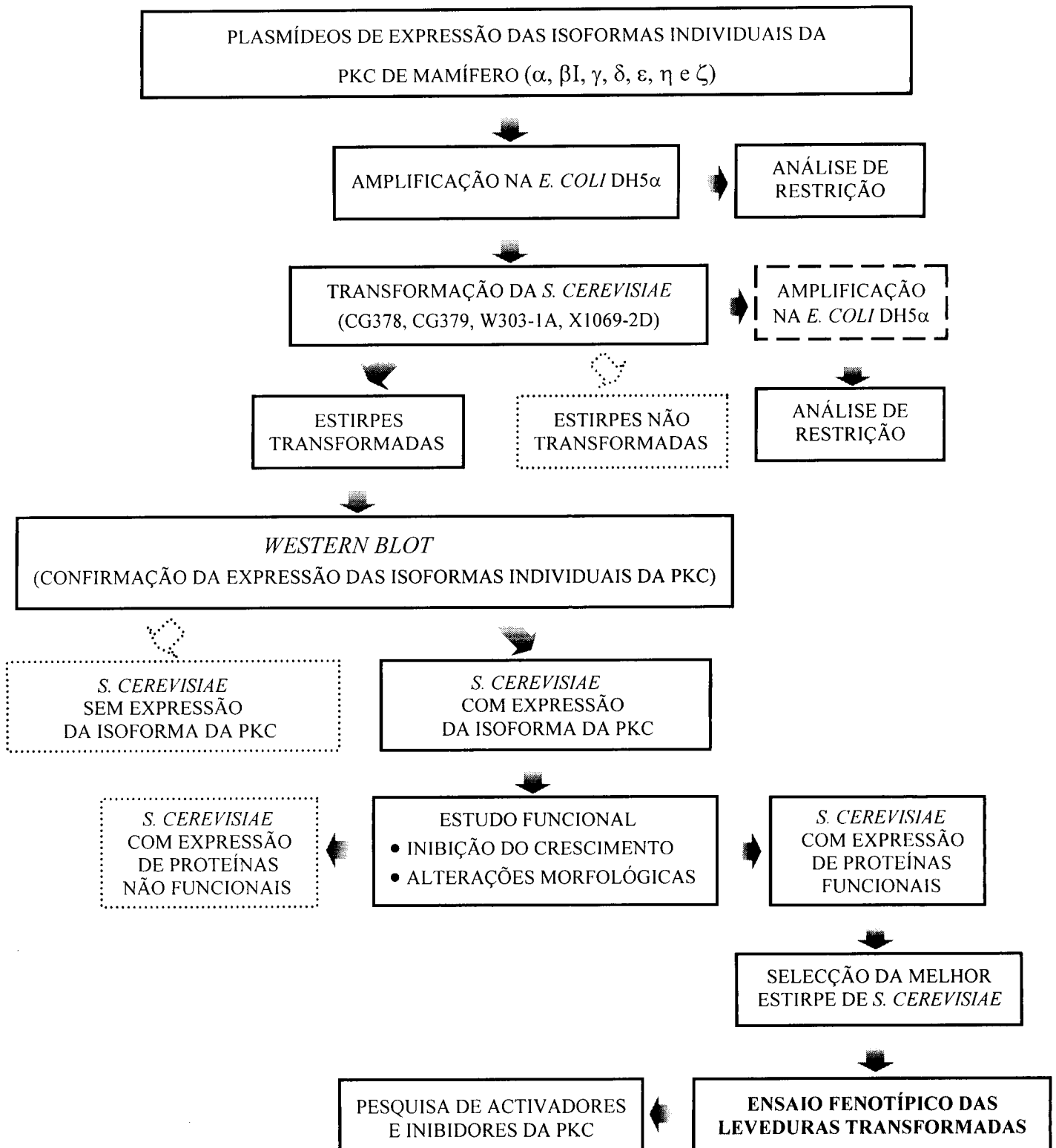


Figura 3 - Passos da implementação do ensaio fenotípico das leveduras transformadas.

1. Amplificação e análise de restrição dos plasmídeos de expressão das isoformas individuais da PKC de mamífero (α , β I, γ , ϵ , δ , η ou ζ)

1.1. Plasmídeos de expressão, em leveduras, das isoformas individuais da PKC de mamífero

Os plasmídeos construídos para a expressão, em leveduras, da PKC- α de Boi ou da PKC- β I de Rato, YEp52-PKC- α (Riedel *et al.*, 1993b,c) e YEp51-PKC- β I (Riedel *et al.*, 1993a), foram gentilmente oferecidos pelo Dr. Heimo Ridel da Universidade de Wayne, Detroit, nos EUA. Os plasmídeos construídos para a expressão, em leveduras, da quimera Homem/Boi da PKC- γ , da PKC- δ de Rato e da PKC- ϵ , PKC- η ou PKC- ζ de Ratinho, YEplac181-PKC- γ , - δ , - ϵ , - η e - ζ (o gene que codifica cada uma das isoformas da PKC foi inserido entre os locais de restrição *Hind*III e *Bam*HI, ficando adjacente ao promotor *Gall*), foram gentilmente oferecidos pelo Dr. Nigel Goode do Royal Veterinary College de Londres, no Reino Unido.

O YEp52 e YEp51 (Broach *et al.*, 1983) e o YEplac181 (Gietz & Sugino, 1988) são plasmídeos episomais de expressão em leveduras (YEp, *yeast episomal plasmids*). Estes vectores são capazes de replicar na *Escherichia coli* (*E. coli*) e na levedura, sendo designados por vectores do tipo ponte (*shuttle vectors*), os quais contêm, entre outros elementos, origens de replicação para as bactérias e para as leveduras, bem como genes marcadores de selecção para as bactérias (*Amp^R*, gene que confere resistência à ampicilina) e para as leveduras (*LEU2*; gene que codifica uma das enzimas da via de síntese da leucina, a β -isopropilmalato desidrogenase). A manipulação destes vectores é realizada nas bactérias sendo, depois, transferidos para as leveduras, organismo onde ocorre a expressão da proteína de interesse.

A transcrição do gene que codifica cada uma das isoformas individuais da PKC está sob o controlo do promotor indutível *GAL* (*Gall*-10; *Gall*10 no YEp52-PKC- α e no YEp51-PKC- β I, *Gall* nos YEplac181-PKC- γ , - δ , - ϵ , - η e - ζ), adjacente ao gene, o qual tem a galactose como molécula indutora e a glucose como molécula repressora (Hovland *et al.*, 1989).

1.2. Quantificação do DNA plasmídico por determinação espectrofotométrica

A pureza e a quantidade do DNA plasmídico foi determinada por medição das densidades ópticas de uma alíquota da solução de DNA a 260 nm e 280 nm, num espectrofotómetro (*Cary 1E Varian spectrophotometer*, Palo Alto, Califórnia, EUA). A razão entre estas duas densidades ópticas (DO_{260}/DO_{280}) constituiu um indicador da pureza da solução e foi usada para a determinação da concentração do DNA na solução. Os valores compreendidos entre 1,8 e 2,0 correspondem a preparações de DNA suficientemente puras, enquanto que valores significativamente inferiores traduzem uma contaminação com proteínas ou fenol e valores superiores indicam uma contaminação com RNA (Sambrook *et al.*, 1989).

1.3. Preparação das células competentes de *E. coli* DH5 α

A preparação das células competentes de *E. coli* DH5 α baseou-se no método proposto por Tang e colaboradores (1994). Inocularam-se 10 ml de meio de Luria-Bertani (LB; Anexo II) com uma colónia de *E. coli* DH5 α , que cresceu no meio de Mueller-Hinton Agar (Anexo I). A cultura foi incubada a 37 °C, durante 12 – 15 h, com agitação (200 r.p.m.). Estes 10 ml de cultura foram usados para inocular 500 ml de meio de LB, previamente aquecidos a 37 °C, que foram mantidos a esta temperatura, com agitação (200 r.p.m.). A DO_{600} foi determinada a cada 20 min para se examinar o crescimento da cultura. Quando se obteve uma densidade celular de, aproximadamente, 1×10^8 células/ml ($DO_{600} = 0,3 - 0,4$; fase de crescimento logarítmico), a cultura foi colocada em gelo, durante 2 h, e centrifugada a 1680 r.p.m./25 min, a 4 °C. As células foram cuidadosamente ressuspensas em 5 ml de solução de *Trituration Buffer* (TB; Anexo II), previamente arrefecida a 4 °C, e diluídas, com o mesmo tampão, até um volume final de, aproximadamente, 50 ml. As células diluídas foram colocadas em gelo, durante 90 min, centrifugadas a 1680 r.p.m./25 min, a 4 °C, e cuidadosamente ressuspensas em 600 μ l de solução de TB a 4 °C. A esta suspensão de células foi adicionado glicerol a 80 % (v/v), de forma a obter uma concentração final de 15 % (v/v). As células competentes foram armazenadas a -80 °C, em alíquotas de 200 μ l.

1.4. Transformação das células competentes de *E. coli* DH5 α

A transformação das células competentes baseou-se no método proposto por Sambrook e colaboradores (1989). A uma alíquota de 200 μ l de células competentes foram adicionados 5 μ l de DNA plasmídico (contendo, aproximadamente, 10 ng de DNA). A suspensão foi agitada suavemente e colocada em gelo, durante 30 min. Posteriormente, foi transferida para um banho de água a 42 °C, durante 2 min. Adicionou-se 1 ml de solução de LB, previamente aquecida a 37 °C, e colocou-se a suspensão num banho de água a 37 °C, sem agitação, durante 90 min. Centrifugou-se a 5000 r.p.m./1 min, rejeitou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células no líquido residual (cerca de 100 μ l). Esta suspensão foi semeada em meio de MacConkey Agar com ampicilina (Anexo II). As placas foram incubadas a 37 °C, durante 16 - 24 h.

1.5. Extração do DNA plasmídico da *E. coli* DH5 α transformada

Inocularam-se 10 ml de meio de LB com ampicilina (Anexo II) com uma colónia de *E. coli* DH5 α , que cresceu no meio de MacConkey Agar com ampicilina. A cultura foi incubada a 37 °C, durante 12 – 15 h, com agitação (200 r.p.m.). A extração do DNA plasmídico das bactérias transformadas foi efectuada de acordo com o protocolo do sistema comercial de purificação de DNA plasmídico (*Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System*, Promega, Lisboa, Portugal), para 5 – 10 ml de cultura de *E. coli*. O DNA plasmídico extraído foi dissolvido em solução tampão de Tris-EDTA (TE; Anexo II) (1X) e armazenado a -20 °C.

1.6. Análise de restrição do DNA plasmídico extraído da *E. coli* DH5 α transformada

A concentração do DNA plasmídico extraído da *E. coli* DH5 α foi determinada espectrofotometricamente, como anteriormente descrito (ponto 1.1.). A mistura de digestão foi preparada de acordo com as instruções do fornecedor das enzimas de restrição *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III e *Xba*I (Promega, Lisboa, Portugal), para um volume final de 15 μ l.

Paralelamente, foi preparada uma mistura com todos os componentes da mistura de digestão excepto a(s) enzima(s) (controlo). As misturas foram incubadas num banho a 37 °C, durante 90 min, e, após este tempo, colocadas em gelo para parar a reacção. Às misturas de digestão foram adicionados 4 µl de corante (Promega, Lisboa, Portugal). O gel de agarose a 0,7 % (Anexo II) foi colocado numa tina de electroforese (*Mini-Sub[®] Cell GT*, Bio-Rad, PACI, Lisboa, Portugal) contendo solução tampão de Tris-acetato-EDTA (TAE; Anexo II) (1X). As misturas de digestão, assim como 5 µl do marcador de peso molecular de DNA (*1 kb DNA Ladder*, Promega, Lisboa, Portugal), foram aplicados nos poços. A tina foi ligada a uma fonte de alimentação (*Power Pac 200*, Bio-Rad, PACI, Lisboa, Portugal), tendo-se aplicado uma corrente eléctrica constante de 70 V/2 h. Terminada a corrida, o gel foi mergulhado numa solução de brometo de etídio a 0,5 µg/ml (Anexo II), durante 10 min, observado num transiluminador com luz ultra-violeta (*UV Transilluminator*, Izasa S.A., Barcelona, Espanha) e fotografado usando um sistema de análise e documentação de imagem (*Kodak Digital Science*, 1D Image Analysis Software Version 3.0, Life Technologies Ltd., EUA).

2. Transformação da *S. cerevisiae* pelo método do acetato de lítio

Várias estirpes de *S. cerevisiae* foram transformadas com os plasmídeos que codificam as isoformas individuais da PKC de mamífero (α , β I, γ , ϵ , δ , η ou ζ).

As transformações foram realizadas com base no método proposto por Ito e colaboradores (1983) e no protocolo apresentado por Ausubel e colaboradores (1995).

2.1. Estirpes de *S. cerevisiae*

Todas as estirpes de *S. cerevisiae* usadas na transformação (Tabela 3) apresentam uma mutação no gene *LEU2*, pelo que não crescem em meios de cultura deficientes no aminoácido leucina. As estirpes CG378 e CG379 têm sido frequentemente utilizadas em processos de transformação, nomeadamente com o cloreto de cálcio (Bruschi *et al.*, 1987).

Tabela 3. Estirpes de *S. cerevisiae* usadas na transformação.

Estirpes <i>S. cerevisiae</i>	Genótipo	Fornecedor
CG378	<i>a ade5 can1 leu2-3 leu2-112 trp1-289α ura3-52 gal2[Kil-O]</i>	Y.G.S.C. ^a
CG379	<i>α ade5 his7-2 leu2-3 leu2-112 trp1-289α ura3-52 [Kil-O]</i>	Y.G.S.C. ^a
W303-1A	<i>a ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3, 112can1-100</i>	Gentilmente oferecida pela Dra. Roxana Moreira
X1069-2D	<i>α leu2 ade1 his4 thr4 met2 ura1 trp5 gal2 MAL</i>	Y.G.S.C. ^a

^aYeast Genetic Stock Center, Universidade da Califórnia, Berkeley, EUA.

2.2. Preparação das células competentes de *S. cerevisiae*

Inocularam-se 10 ml de meio de *Yeast Peptone Dextrose* (YPD; Anexo II) com uma colônia de *S. cerevisiae* (estirpe a transformar), que cresceu no meio de Sabouraud Dextrose Agar (Anexo I). Na noite anterior à transformação, 100 ml de meio de *Yeast Peptone Adenine Dextrose* (YPAD; Anexo II) foram inoculados com 100 μ l da cultura anterior e incubados a 30 °C, com agitação (200 r.p.m.), até se obter uma densidade celular de, aproximadamente, 1×10^7 células/ml ($DO_{600} = 0,3 - 0,5$; fase de crescimento logarítmico). A cultura foi diluída em meio de YPAD (1:5), de forma a obter 100 ml de cultura final com uma densidade celular de, aproximadamente, 2×10^6 células/ml, e incubada a 30 °C/3 h, com agitação (200 r.p.m.). A cultura foi centrifugada a 4000 r.p.m./10 min e as células ressuspensas em 10 ml de água bidestilada estéril. Centrifugou-se a 4000 r.p.m./10 min e o depósito celular foi transferido para um *eppendorf* que foi centrifugado a 7000 r.p.m./7 min. O excesso de água foi rejeitado e as células ressuspensas em 600 μ l de uma solução tampão de acetato de lítio (Anexo II).

2.3. Preparação do DNA transportador

No protocolo da transformação pelo método do acetato de lítio, a utilização do DNA transportador (DNA *carrier*; DNA de cadeia simples e de elevado peso molecular, num estado desnaturado), revelou ser crucial para a obtenção de um elevado rendimento em células transformadas (Ausubel *et al.*, 1995).

Preparou-se uma solução de DNA (*type III sodium salt from salmon testes*; Sigma Aldrich, Sintra, Portugal), em solução tampão de TE (1X), com a concentração final de 10 mg/ml. A solução foi agitada com uma barra magnética, a 4 °C, durante 12 – 15 h, e passada 15 vezes através de uma agulha hipodérmica de 17-Gauge. A solução foi fervida durante 10 min e armazenada a –20 °C, em alíquotas de 100 µl.

2.4. Transformação das células competentes de *S. cerevisiae*

Colocaram-se 20 µl da solução de DNA transportador num banho de água fervente, durante 5 min, seguido de um arrefecimento rápido em gelo. Repetiu-se este ciclo e à solução foram adicionados 5 µl de DNA plasmídico. Paralelamente, foi efectuado um controlo negativo, substituindo-se o DNA plasmídico pelo solvente (solução tampão de TE; 1X). Adicionaram-se 200 µl da suspensão de células competentes, previamente incubadas a 30 °C/1 h com agitação suave (140 r.p.m.), e 1200 µl de solução de polietilenoglicol (Anexo II). A suspensão foi incubada a 30 °C/30 min com agitação (200 r.p.m.), transferida para um banho de água a 42 °C/15 min (choque térmico) e centrifugada durante 5 s, à temperatura ambiente. O depósito celular obtido foi ressuspenso em 500 µl de solução tampão de TE (1X). Semearam-se 200 µl das suspensões (com DNA plasmídico e controlo negativo) em placas de meio glucosado (Anexo II) suplementado com os aminoácidos essenciais para cada estirpe de *S. cerevisiae*, com excepção da leucina. Simultaneamente, foi efectuado um controlo positivo semeando-se as suspensões (com DNA plasmídico e controlo negativo) em placas de meio glucosado com leucina. As placas foram incubadas a 30 °C, durante 2 – 5 dias.

3. Condições de incubação da *S. cerevisiae* transformada

Por rotina, as leveduras transformadas foram incubadas em meio mínimo e selectivo, contendo: glucose (2 %; m/v) como fonte de carbono; *Yeast Nitrogen Base* (0,7 %; m/v) como fonte de nitrogénio, fósforo e iões metálicos e os aminoácidos essenciais para a estirpe de *S. cerevisiae* em estudo (50 µg/ml), com excepção da leucina.

Para a indução da transcrição do gene que codifica as isoformas individuais da PKC de mamífero, as leveduras foram incubadas em meio galactosado e selectivo, contendo: galactose (2 %; m/v) como fonte de carbono e indutor da transcrição; glicerol (3 %; v/v) como fonte alternativa de carbono não fermentável e os aminoácidos essenciais para a estirpe de *S. cerevisiae* em estudo (50 µg/ml), com excepção da leucina.

As culturas foram incubadas a 30 °C, com agitação constante (140 r.p.m.).

4. Análise de restrição do DNA plasmídico incorporado pelas leveduras

Para se proceder à análise de restrição do DNA plasmídico incorporado pelas leveduras, esse DNA foi extraído e amplificado na *E. coli* DH5α. Posteriormente, foi efectuada a análise de restrição do DNA plasmídico extraído da bactéria.

Para a extracção do DNA plasmídico, 10 ml de meio mínimo e selectivo foram inoculados com uma colónia de *S. cerevisiae* transformada. A cultura foi incubada a 30 °C, durante 48 h, e centrifugada a 4000 r.p.m./10 min. As células recolhidas foram lavadas com 1000 µl de água estéril, centrifugadas a 4000 r.p.m./10 min e ressuspensas em 100 µl de solução tampão de lise A (Anexo II). Adicionaram-se 100 µl de uma mistura de fenol/clorofórmio (1:1) e, aproximadamente, 60 µl de esferas de vidro 0,45 – 0,50 mm (Sigma Aldrich, Sintra, Portugal). Esta mistura foi agitada manualmente, durante 3 min, e, posteriormente, em vortex à velocidade máxima, durante 10 min. De seguida, foi aquecida em banho de água a 65 °C, durante 5 min, e centrifugada a 13 000 r.p.m./5 min. A fase aquosa (sobrenadante) foi recolhida. Procedeu-se a uma nova extracção fenol/clorofórmio. Ao sobrenadante total recolhido foram adicionados 500 µl de *Wizard Minipreps DNA*

Purification Resin (Promega, Lisboa, Portugal). A mistura foi homogeneizada e transferida para uma coluna (*Wizard Minicolumns*, Promega, Lisboa, Portugal), usando uma seringa de 2 ml. A coluna foi lavada 3 vezes com solução de *Wash Buffer* (Anexo II) e centrifugada a alta velocidade, durante 1 min, para a remoção da solução de lavagem residual. À coluna foram adicionados 50 µl de solução tampão de TE (1X). A coluna foi centrifugada a alta velocidade, durante 1 min, e o DNA, dissolvido em solução tampão de TE, foi recolhido num *eppendorf*.

O DNA plasmídico extraído da *S. cerevisiae* foi usado para a transformação das células competentes de *E. coli* DH5α. Desta forma, o DNA plasmídico foi amplificado na bactéria, posteriormente extraído e submetido a análise electroforética em gel de agarose, após digestão com enzimas de restrição. Os protocolos usados, para cada uma destas etapas, foram os anteriormente descritos.

5. Confirmação da expressão das isoformas individuais da PKC de mamífero pela *S. cerevisiae* transformada

A confirmação da expressão das isoformas individuais da PKC-α, -βI, -γ, -δ, -ε, -η ou -ζ, pelas várias estirpes de *S. cerevisiae* transformadas (CG378, CG379, W303-1A e X1069-1D), foi efectuada pela técnica de *Western Blot*.

5.1. Extracção das proteínas da *S. cerevisiae*

A extracção das proteínas da *S. cerevisiae* foi realizada com base no protocolo proposto por Shieh e colaboradores (1996).

Inocularam-se 250 ml de meios selectivos, glucosado e galactosado, com as leveduras transformadas em estudo, de forma a obter-se uma cultura com uma DO₆₀₀ inicial de 0,05. Esta cultura foi incubada até se obter uma DO₆₀₀ final de 0,5 (a qual se encontra a meio da fase logarítmica), ou seja, aproximadamente 24 ou 48 h consoante o meio usado fosse o glucosado ou galactosado, respectivamente. A cultura foi centrifugada a 4000 r.p.m./10 min.

As células foram lavadas com solução de *Phosphate Buffer Saline* (PBS; Anexo II), centrifugadas a 4000 r.p.m./10 min e ressuspensas em 6 ml de solução tampão de lise B (Anexo II). Adicionaram-se 6 ml de esferas de vidro 0,45 – 0,50 mm (Sigma Aldrich, Sintra, Portugal), previamente arrefecidas a 4 °C. A mistura foi agitada em vortex à velocidade máxima, durante 1 min, e colocada em gelo, durante 2 min, processo que foi repetido 6 vezes. A mistura foi centrifugada a 4000 r.p.m./10 min, a 4 °C, e o sobrenadante recolhido. As esferas de vidro foram lavadas com 1,5 ml de solução tampão de lise B, centrifugadas a 4000 r.p.m./10 min, a 4 °C, e o sobrenadante obtido adicionado ao anterior. Centrifugou-se o sobrenadante total a 30000 r.p.m. em ultracentrífuga (*L-80 Ultracentrifuge*, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, Califórnia, EUA), durante 30 min, a 4 °C. O sobrenadante (contendo o extracto proteico) foi recolhido e guardado a 4 °C.

5.2. Precipitação das proteínas extraídas da *S. cerevisiae*

Esta etapa teve por objectivo obter um concentrado proteico livre de substâncias interferentes, provenientes quer da extracção (como o Triton X-100), quer da própria célula (como os lípidos).

A precipitação das proteínas existentes no sobrenadante obtido foi efectuada com base no protocolo apresentado por Wessel e Flugge (1984).

A 100 µl do sobrenadante foram adicionados 400 µl de metanol a 4 °C. Homogeneizou-se e centrifugou-se a 6300 r.p.m./10 s, a 4 °C. À mistura centrifugada foram adicionados 100 µl de clorofórmio a 4 °C. Homogeneizou-se e centrifugou-se a 6300 r.p.m./10 s, a 4 °C. A esta mistura final foram adicionados 300 µl de água bidestilada a 4 °C. Homogeneizou-se e centrifugou-se a 6300 r.p.m./1 min, a 4 °C. A fase superior foi rejeitada e à fase inferior e interfase foram adicionados 300 µl de metanol. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 6300 r.p.m./2 min, a 4 °C. Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante e secou-se o precipitado por corrente de ar. Para a quantificação das proteínas obtidas, o precipitado foi dissolvido em 50 µl de solução de dodecilsulfato de sódio (SDS; Anexo II) a 5% (m/v). Para a análise electroforética, o precipitado foi dissolvido em 50 µl de solução tampão da amostra (Anexo II).

5.3. Quantificação das proteínas extraídas da *S. cerevisiae*

Para a quantificação das proteínas precipitadas utilizamos um sistema comercial de quantificação de proteínas (*Coomassie[®] Protein Assay Reagent Kit*, Pierce, Biocontec, Lisboa, Portugal), baseado no método de Bradford (1976). A densidade óptica foi determinada a 595 nm num leitor de placas (*Bio-Rad Benchmark Microplate Reader*, Bio-Rad, PACI, Lisboa, Portugal). Uma vez que a curva de resposta à cor do reagente de Coomassie não era linear com o aumento da concentração das proteínas, foi efectuada uma curva padrão para cada ensaio.

5.4. Electroforese das proteínas extraídas da *S. cerevisiae*

As proteínas extraídas das leveduras transformadas foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida, com base no protocolo proposto no manual de instruções do aparelho de electroforese utilizado (*Mini-PROTEAN[®] II Electrophoresis Cell*, Bio-Rad, PACI, Lisboa, Portugal).

O gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) foi preparado conforme as instruções do fornecedor, tendo-se usado um gel de concentração a 4 % e um gel de separação a 8 %. As amostras foram diluídas na solução tampão da amostra (1:4), aquecidas em banho de água a 95 °C/4 min e aplicadas nos poços do gel (~ 40 µg por poço). Paralelamente, aplicou-se o controlo positivo, que correspondia à proteína recombinante padrão da isoforma da PKC em estudo (4 µg por poço): PKC- α (PK 11), PKC- β I (PK 16), PKC- γ (PK 26), PKC- δ (PK 31), PKC- ϵ (PK 65), PKC- η (PK 46) ou PKC- ζ (PK 41) (Oxford Biomedical Research, LabClinics, Barcelona, Espanha). Para a realização da corrida electroforética foi aplicada uma corrente eléctrica constante de 200 V, durante aproximadamente 50 min. Para a visualização das bandas, o gel foi corado com uma solução de Comassie blue (Anexo II), durante 30 min, e descorado através de várias lavagens em solução descorante (Anexo II).

5.5. Western blot

A transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose de 0,2 μm (espessura) e de 7 x 8,4 cm (altura x largura) (*Trans-Blot[®] Transfer Medium*, Bio-Rad, PACI, Lisboa, Portugal) foi efectuada de acordo com o protocolo proposto no manual de instruções do aparelho utilizado para a realização da transferência (*Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell*, Bio-Rad, PACI, Lisboa, Portugal). As cassetes contendo o gel e a membrana de nitrocelulose foram mergulhadas numa solução tampão de transferência (Anexo II) e mantidas a 4 °C. Aplicou-se uma corrente eléctrica constante de 30 V, durante 12 – 15 h.

A detecção de cada uma das isoformas da PKC foi realizada de acordo com o protocolo apresentado pelo sistema comercial de detecção da fosfatase alcalina, ligada a um anticorpo secundário anti-IgG de Coelho (*Alkaline Phosphatase Kit Rabbit*, AP-10, Oxford Biomedical Research, LabClinics, Barcelona, Espanha). Os anticorpos primários, desenvolvidos no Coelho, para a PKC- α , PKC- β I, PKC- γ , PKC- δ , PKC- ϵ , PKC- η e PKC- ζ (Sigma Aldrich, Sintra, Portugal) foram previamente diluídos de acordo com as indicações do fornecedor. A expressão da proteína em estudo foi considerada quando ocorreu o aparecimento de bandas rosa-avermelhadas (quer para o controlo positivo, quer para a amostra resultante da extracção das leveduras incubadas em meio galactosado) na membrana, mergulhada na solução de revelação, num período de tempo não superior a 20 – 60 s.



6. Ensaio fenotípico com a *S. cerevisiae* transformada

6.1. Estudo funcional das isoformas individuais da PKC de mamífero expressas pela *S. cerevisiae*

O estudo da funcionalidade de cada uma das isoformas individuais da PKC expressas pelas várias estirpes de *S. cerevisiae* (CG378, CG379, W303-1A e X1069-1D), foi efectuado com base nos trabalhos previamente realizados com algumas das isoformas da PKC: α (Riedel *et al.*, 1993b; Zhu *et al.*, 1994; Parissenti *et al.*, 1996) e β I (Riedel *et al.*, 1993a; Parissenti *et al.*, 1996).

Após incubação na presença do activador da PKC, as alterações fenotípicas estudadas foram: inibição do crescimento (consequência de um aumento do tempo de duplicação celular) e alterações morfológicas das células leveduriformes.

As leveduras transformadas foram incubadas em 10 ml de meio mínimo e selectivo até se obter uma DO_{620} de, aproximadamente, 1. A cultura foi centrifugada a 4000 r.p.m./10 min e as células ressuspensas em meio galactosado e selectivo. A cultura foi diluída em novo meio galactosado e selectivo, até uma DO_{620} final de 0,05. Transferiu-se 1 ml de cultura para tubos de ensaio e incubou-se a 30 °C, com agitação constante (140 r.p.m.), durante, aproximadamente, 48 h (DO_{620} final de 0,5). Paralelamente, a experiência foi repetida com as leveduras incubadas em meio mínimo e selectivo (ausência de expressão da isoforma da PKC de mamífero). A incubação das leveduras transformadas decorreu quer na presença do activador da PKC padrão, PMA (ácido araquidónico para as leveduras que expressavam a PKC- ζ), quer na presença apenas do solvente, dimetilsulfóxido (DMSO; concentração final de 0,1 %). Os compostos (ou solvente) foram adicionados no início da experiência e mantidos durante toda a incubação. O efeito do activador da PKC no crescimento das leveduras foi estudado através da determinação da DO_{620} em espectrofotómetro (Cary 1E Varian spectrophotometer, Palo Alto, Califórnia, EUA). O crescimento obtido na presença do activador da PKC foi expresso em percentagem do obtido apenas na presença do solvente (testado em simultâneo com o composto), foi depois transformado em percentagem de inibição do crescimento, subtraindo a 100 aquele valor.

No final da experiência, a morfologia das leveduras incubadas apenas na presença do solvente e na presença do activador da PKC foi estudada em microscópio óptico simples (Nikon Eclipse E400, Lisboa, Portugal) e fotografada (3x Zoom Digital Camera, Nikon CoolPix950, Lisboa, Portugal).

6.2. Optimização do ensaio fenotípico da *S. cerevisiae* transformada para a pesquisa de potenciais activadores e inibidores da PKC

O ensaio fenotípico da *S. cerevisiae* transformada, descrito no estudo funcional, foi optimizado com base no ensaio fenotípico das leveduras proposto para a pesquisa de inibidores da PKC (Keenan *et al.*, 1997a,b).

Transferiram-se 200 µl da cultura diluída em meio galactosado e selectivo (DO₆₂₀ final de 0,05; ver estudo funcional) para os poços de uma microplaca (*Tissue Culture Plate 96-well Flat Bottom with Lid*, Sarstedt, Lisboa, Portugal). A placa foi incubada a 30 °C, com agitação constante (140 r.p.m.), durante 100 h (150 h nas experiências efectuadas para a obtenção das curvas de crescimento). A incubação das leveduras transformadas decorreu quer na presença do composto em estudo, quer na presença apenas do solvente (DMSO; concentração final de 0,1 %). Os compostos (ou solvente) foram adicionados no início da experiência e mantidos durante toda a incubação. O crescimento das leveduras foi monitorizado através da determinação da DO₆₂₀ com um leitor de placas (*Bio-Rad Benchmark Microplate Reader*, Bio-Rad, PACI, Lisboa, Portugal). Para cada ensaio foram obtidos 4 valores para o solvente e para cada concentração do composto em estudo.

A diferença entre a máxima DO₆₂₀ atingida e aquela medida no início da incubação foi usada para a determinação do crescimento das leveduras. O crescimento obtido na presença do composto foi expresso em percentagem do obtido apenas na presença do solvente (testado em simultâneo com o composto), foi depois transformado em percentagem de inibição do crescimento.

Em experiências preliminares foram obtidas as curvas de crescimento para as leveduras que expressavam cada uma das isoformas individuais da PKC, para a determinação da duração das respectivas fases logarítmicas. Para a obtenção destas curvas, as leveduras foram incubadas durante 150 h, em meio galactosado e na presença apenas do solvente (DMSO; concentração final de 0,1 %) ou de 10⁻⁵ M do activador da PKC adequado. Em

simultâneo, foram traçadas as curvas de inibição do crescimento das leveduras incubadas na presença de 10^{-5} M do activador da PKC adequado, para a identificação do período de tempo durante o qual a inibição máxima do crescimento foi alcançada e permaneceu constante ou apresentou alterações pouco significativas. A estimativa do efeito dos compostos baseou-se, então, nas medições da DO_{620} em tempos fixos, situados na fase logarítmica do crescimento das leveduras e na fase estacionária da inibição do crescimento causada pelo activador da PKC.

Compostos activadores da PKC

O efeito dos compostos activadores da PKC foi expresso em percentagem da inibição do crescimento causada por 10^{-5} M PMA (ácido araquidónico no caso da PKC- ζ). Os compostos foram testados num intervalo de concentrações de 10^{-13} a 10^{-5} M e, para cada um deles, foi determinada a concentração capaz de causar 50 % da inibição do crescimento causada por 10^{-5} M PMA (ou ácido araquidónico para a PKC- ζ ; EC_{50}).

Compostos inibidores da PKC

Numa primeira fase foi estudado o efeito dos compostos (10^{-8} – 10^{-5} M), isoladamente, no crescimento das leveduras que expressavam cada uma das isoformas individuais da PKC. Numa segunda fase foram efectuadas experiências de interacção. Nestas experiências, ao activador da PKC, PMA (10^{-8} – 10^{-5} M; ácido araquidónico no caso da PKC- ζ) foi adicionado o inibidor da PKC. Obtiveram-se as curvas de concentração-resposta para o activador da PKC na presença e na ausência do inibidor e determinaram-se os valores de EC_{50} para cada um dos casos. A potência do inibidor da PKC foi calculada com base na razão dos EC_{50} , [EC_{50} (activador da PKC + inibidor da PKC) / EC_{50} (activador da PKC)], em cada uma das isoformas da PKC testadas.

7. Ensaio *in vitro* para os compostos que se comportaram como inibidores da PKC, no ensaio fenotípico das leveduras transformadas

A interacção directa entre os compostos que se comportaram como inibidores da PKC, no ensaio fenotípico das leveduras transformadas, e a PKC foi demonstrada através da realização de um ensaio enzimático *in vitro*. Este ensaio decorreu de acordo com o protocolo proposto pelo sistema comercial utilizado (*IQTM PKC Assay Kit – Pseudosubstrate Peptide Substrate*, Pierce Biotechnology, PACI, Lisboa, Portugal) para microplacas de 96 poços. A enzima usada, nestes ensaios, foi extraída do cérebro de Rato e constituía uma mistura das isoformas α , β e γ da PKC (*Purified PKC Enzyme Standard from Rat Brain*, Pierce Biotechnology, PACI, Lisboa, Portugal). A concentração final da enzima usada foi de 0,01 U. Esta concentração foi obtida através da realização de um estudo preliminar para a optimização da concentração da enzima a usar no nosso ensaio. As misturas de reacção contendo o activador endógeno da PKC, fosfatidil-L-serina, foram incubadas durante 90 min e a intensidade da fluorescência foi determinada usando-se um fluorímetro de microplacas (*SPECTRAmax[®] GEMINI XS*, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, Califórnia, EUA).

Este ensaio baseia-se na utilização de um substrato fluorescente, cuja fosforilação conduz a uma redução da sua fluorescência. Desta forma, a activação da PKC causa a fosforilação do substrato, o que conduz a uma diminuição das unidades de fluorescência relativa (RFUs). Os inibidores da PKC causam uma diminuição da fosforilação do substrato (resultante de uma diminuição da actividade catalítica da PKC), conduzindo a um aumento das RFUs.

Às RFUs obtidas com as misturas de reacção sem a PKC foi atribuído o valor de 100 %. Os efeitos dos compostos foram expressos em % daquele valor.

8. Análise estatística dos resultados

Os resultados são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão da média de um número de (n) ensaios realizados em quadruplicado. Diferenças significativas entre as médias foram determinadas com base no teste estatístico considerado mais apropriado à análise em questão. Os testes utilizados foram: teste t de *Student* emparelhado, o teste t de *Student* e *one way* análise de variância (ANOVA) seguido do teste t de *Tukey*, respectivamente para a comparação de dois tratamentos diferentes na mesma experiência, dois tratamentos diferentes e vários tratamentos em várias experiências. Um valor de P inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

ANEXOS

ANEXO I

MATERIAL	FORNECEDOR	(1)
20-Acetato-13-fenilacetato de 12-desoxiforbol (dPPA)	Biomol (Quimigranel, Madrid, Espanha)	
Acetato de lítio	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)	
Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)	Merck (Lisboa, Portugal)	
Ácido etilenoglicol-2-(2-aminoetil) tetraacético (EGTA)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)	
Ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-2-etanosulfónico (HEPES)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)	
Agar	BioMérieux (Carnaxide, Portugal)	
Agarose	Pharmacia Biotech (Lisboa, Portugal)	
Ampicilina	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)	
Aprotinina	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)	
Azul de bromotimol	Bio-rad (PACI, Lisboa, Portugal)	
Bactopeptona	Difco (Quilaban, Química Laboratorial Analítica Lda., Porto, Portugal)	
Brometo de etídio	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)	
Citrato de tamoxifeno	Tocris (Biogen Científica S.L., Madrid, Espanha)	
Cloreto de queleritrina	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)	
Coomassie blue R-350	Pharmacia Biotech (Lisboa, Portugal)	
12,13-Diacetato de forbol (PDA)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)	
12,13-Dibutirato de forbol (PDBu)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)	
12,13-Didecanoato de forbol (PDD)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)	
Dodecilsulfato de sódio (SDS)	Bio-rad (PACI, Lisboa, Portugal)	

MATERIAL	FORNECEDOR (2)
Extracto de levedura	Difco (Quilaban, Química Laboratorial Analítica Lda., Porto, Portugal)
Fluoreto de R-2,6-diamino-N-[1-(1-oxotridecil)-2-piperidinil]metil]-hexanamida (NPC 15437)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
Fluoreto de fenilmetilsulforeto (PMSF)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
Galactose	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
Glicerol	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
Glicina	Merck (Lisboa, Portugal)
Glucose	Difco (Quilaban, Química Laboratorial Analítica Lda., Porto, Portugal)
Hemissulfato de adenina	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
Hidrocloreto de 2-(8-[(dimetilamino)metil]-6,7,8,9-tetra-hidropirido[1,2-a]indol-3-il)-3-(1-metilindol-3-il)maleimida (Ro 32-0432)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
Leupeptina	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
Meio de MacConkey Agar	BioMérieux (Carnaxide, Portugal)
Meio de Mueller-Hinton Agar	BioMérieux (Carnaxide, Portugal)
Meio de Sabouraud Dextrose Agar	BioMérieux (Carnaxide, Portugal)
β-Mercaptoetanol	Merck (Lisboa, Portugal)
Mezereína	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
13-Acetato -12-miristato de forbol (PMA)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
4α-13-Acetato -12-miristato de forbol (4α-PMA)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
4-Metoxi-13-acetato-12-miristato de forbol (MPMA)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
13-Monoacetato de forbol (PA)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)

MATERIAL	FORNECEDOR (3)
12-Monomiristato de forbol (PMM)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
Pepstatina A	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
Persulfato de amónio (APS)	Bio-rad (PACI, Lisboa, Portugal)
Poliacrilamida	Bio-rad (PACI, Lisboa, Portugal)
Polietilenoglicol 4000	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
Rotlerina (Malotoxina)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
Sal sódico do ácido araquidónico	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina (TEMED)	Bio-rad (PACI, Lisboa, Portugal)
<i>Trans</i> -D-eritro-esfingosina (D-esfingosina)	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
Triptona	Difco (Quilaban, Química Laboratorial Analítica Lda., Porto, Portugal)
Triton X-100	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
Trizma Base	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
Xantona	Sigma Aldrich (Sintra, Portugal)
<i>Yeast Nitrogen Base</i> (YNB)	Difco (Quilaban, Química Laboratorial Analítica Lda., Porto, Portugal)

Todos os outros reagentes utilizados eram de qualidade pró-analítica.

ANEXO II

SOLUÇÕES / MEIOS DE CULTURA	PREPARAÇÃO	(1)
Gel de agarose a 0,7 %	0,7 g de agarose foram dissolvidos em 100 ml de solução tampão de TAE (1X).	
Meio de Luria-Bertani (LB)	Solução com 10 g de triptona; 5 g de extracto de levedura; 10 g de NaCl; 500 µl de uma solução a 4 M de NaOH e água bidestilada q.b.p. 1000 ml. Esterilização por autoclavagem.	
Meio de LB com ampicilina	Ao meio de LB estéril foram adicionados 100 µg de ampicilina estéril (50 mg/ml; filtração esterilizante) por ml de meio.	
Meio de MacConkey Agar com ampicilina	Ao meio de MacConkey Agar, esterilizado por autoclavagem, foram adicionados 100 µg de ampicilina estéril (50 mg/ml; filtração esterilizante) por ml de meio.	
Meio de <i>Yeast Peptone Dextrose</i> (YPD)	1 % de extracto de levedura; 2 % de bactopectona e 2 % de glucose (pH 5,3). Esterilização por autoclavagem.	
Meio de <i>Yeast Peptone Adenine Dextrose</i> (YPAD)	Ao meio de YPD estéril foram adicionados 0,5 % de solução de hemissulfato de adenina estéril (filtração esterilizante), numa concentração final de 30 mg/l.	
Meio galactosado (caldo)	Solução com 0,7 % de YNB e 2 % de galactose. Esterilização por autoclavagem.	
Meio galactosado (placa)	Meio com 0,7 % de YNB; 2 % de galactose e 2 % de agar. Esterilização por autoclavagem.	
Meio glucosado (caldo)	Solução com 0,7 % de YNB e 2 % de glucose. Esterilização por autoclavagem.	
Meio glucosado (placa)	Meio com 0,7 % de YNB; 2 % de glucose e 2 % de agar. Esterilização por autoclavagem.	
Solução de brometo de etídio a 0,5 µg/ml	Preparada a partir de uma solução de brometo de etídio a 10 mg/ml diluída em solução tampão de TE (1X).	
Solução de Comassie blue	Solução com 0,1 % de Comassie blue R-350; 40 % de metanol e 10 % de ácido acético.	

SOLUÇÕES / MEIOS DE CULTURA

PREPARAÇÃO

(2)

Solução de polietilenoglicol

Solução de preparação extemporânea com 8 volumes de solução de polietilenoglicol 4000 a 50 % (m/v); 1 volume de solução tampão de TE (10X; pH 7,5); 1 volume de solução 1 M de acetato de lítio (10X; pH 7,5). Esterilização por autoclavagem de cada constituinte desta solução.

Solução descorante

Solução com 40 % de metanol e 10 % de ácido acético.

Solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 5 % (m/v)

Solução com 5 g de SDS em 100 ml de água bidestilada.

Solução de *Phosphate Buffer Saline* (PBS)

Solução com 137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 4,3 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,4 mM KH_2PO_4 (pH 7,3).

Solução tampão da amostra

Solução com 0,125 mM de Trisma Base (pH 6,8); 5 % de SDS; 20 % de glicerol; 10 % de mercaptoetanol e 1 % de azul de bromofenol.

Solução tampão de acetato de lítio

Solução de preparação extemporânea com 1 volume de solução tampão de TE (10X; pH 7,5); 1 volume de solução 1 M de acetato de lítio (10X; pH 7,5) e 8 volumes de água bidestilada. Esterilização por autoclavagem de cada constituinte desta solução.

Solução tampão de lise A

Solução com 2,5 M de cloreto de lítio; 50 mM de Trisma base (pH 8,0); 20 mM de EDTA (pH 8,0) e 4 % de Triton X-100.

Solução tampão de lise B

Solução com 1 % de Triton X-100; 50 mM de Hepes (pH 7,4); 150 mM de NaCl; 5 mM de EDTA; 5 mM de EGTA; 10 $\mu\text{g/ml}$ de Pepstatina A; 40 $\mu\text{g/ml}$ de Leupeptina; 10 $\mu\text{g/ml}$ de Aprotinina e 200 $\mu\text{g/ml}$ de PMSF.

Solução tampão de Tris-acetato-EDTA (TAE) (50X)

Solução com 2 M de Trisma Base; 2 M de ácido acético glacial e 50 mM de EDTA. Esterilização por autoclavagem.

SOLUÇÕES / MEIOS DE CULTURA	PREPARAÇÃO	(3)
Solução tampão de transferência (Towbin)	Solução com 3,03 g de Trisma Base; 14,40 g de glicina; 200 ml de metanol e água bidestilada q.b.p. 1000 ml (pH final entre 8,1 e 8,5).	
Solução tampão de Tris-EDTA (TE)	Solução com 1 ml de uma solução 1 M de Trisma Base (pH 8,0); 200 µl de solução 0,5 M de EDTA e água bidestilada q.b.p. 100 ml. Esterilização por autoclavagem.	
Solução de Trituration Buffer (TB)	Solução com 100 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 70 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Esterilização por autoclavagem.	
Solução de Wash Buffer	Solução com 55 % de etanol; 200 mM de NaCl; 20 mM Trisma Base (pH 7,5) e 5 mM de EDTA.	

CAPÍTULO III

IMPLEMENTAÇÃO DO ENSAIO FENOTÍPICO DAS LEVEDURAS TRANSFORMADAS

INTRODUÇÃO

O objectivo do presente trabalho foi implementar um método, que permitisse pesquisar, *in vivo*, potenciais activadores e inibidores das isoformas individuais da PKC, num sistema em que apenas uma das isoformas fosse expressa.

Um dos pré-requisitos para a utilização farmacológica dos moduladores da PKC é o conhecimento detalhado da sua selectividade não só para esta cínase, como, também, para as diferentes isoformas que constituem esta família (Hofmann, 1997; Webb *et al.*, 2000), o que tem sido dificultado, sobretudo, por limitações de carácter metodológico.

Os métodos que utilizam células de mamífero permitem o estudo da proteína num ambiente celular. No entanto, o estudo dos efeitos mediados por uma dada isoforma da PKC, revela-se difícil devido, principalmente, à coexistência de outras isoformas da PKC (Nishizuka, 1988; Parker *et al.*, 1989; Stabel & Parker, 1991; Nishizuka, 1992; Parissenti *et al.*, 1999).

Existem diversos ensaios *in vitro* para estudar potenciais activadores e inibidores da PKC, os quais medem a transferência de grupos fosfato pela PKC para substratos proteicos apropriados, com base em marcadores radioactivos ou, mais recentemente, com base em marcadores de fluorescência. Apesar de serem ensaios rápidos e capazes de revelar, com maior precisão, efeitos mediados por isoformas individuais da PKC, não permitem o estudo da proteína num ambiente celular. Desta forma, impossibilitam estudar factores que influenciam a actividade dos compostos, como a permeabilidade celular, nem recriar as interacções que ocorrem, *in vivo*, entre a PKC e os restantes constituintes celulares. Além disso, são ensaios de custo muito elevado, facto que se deve quer ao preço dos marcadores utilizados, quer das isoformas da PKC, inviabilizando o uso destes métodos em rotina. No caso dos ensaios que envolvem marcadores radioactivos temos ainda que acrescentar, a desvantagem de exigirem condições laboratoriais especiais quer para a realização dos ensaios, quer para a armazenagem dos compostos e resíduos, o que nem sempre está ao dispor de qualquer instituição.

Neste contexto, a obtenção de um modelo *in vivo* que permitisse expressar isoformas funcionais da PKC de mamífero e de comparar, em condições semelhantes, o efeito de compostos sobre essas várias isoformas, a um custo aceitável, tornou-se num objectivo perseguido por diversos grupos. É nesta linha que surge a proposta de se utilizarem leveduras

transformadas, como um modelo experimental para o estudo de potenciais moduladores da PKC (Riedel *et al.*, 1993a,b,c; Shieh *et al.*, 1995; 1996; Keenan *et al.*, 1997a,b).

As leveduras possuem muitas características que justificam a sua crescente utilização como modelo experimental para a expressão e estudo de várias proteínas de mamífero (Brown & Tuite, 1998; Melese & Hieter, 2002). Estas células eucariotas inferiores são muito semelhantes às dos eucariotas superiores em várias vias celulares importantes (Botstein, 1991; Perego *et al.*, 2000). Por exemplo, possuem organelos subcelulares ligados à membrana e uma organização do citoesqueleto semelhante, a estrutura do seu DNA cromossómico é comparável à dos eucariotas superiores e os mecanismos de activação e repressão da transcrição são também similares (Smutzer, 2001). As leveduras e as células de mamífero apresentam muitas proteínas envolvidas em importantes processos fisiológicos, com sequências de DNA homólogas e semelhanças funcionais (Perego *et al.*, 2000; Smutzer, 2001), existindo também uma elevada analogia entre as suas vias de transdução e processos celulares (Parissenti *et al.*, 1999; Perego *et al.*, 2000).

Estes microrganismos possuem um genoma pequeno (aproximadamente 200 vezes inferior ao das células humanas) que se encontra já totalmente sequenciado em algumas leveduras, como a *S. cerevisiae* (Perego *et al.*, 2000). Pensa-se que a levedura expressa um número mínimo de genes necessários à sobrevivência do organismo vivo, facto que a torna um modelo mais simples das células de mamífero (Smutzer, 2001).

A grande simplicidade genética destas células permite criar, facilmente, estirpes mutantes (Smutzer, 2001). Por outro lado, a facilidade de manipulação genética das leveduras permite, por exemplo, a utilização de vectores do tipo ponte (*shuttle vectors*), capazes de replicar na bactéria e na levedura. A manipulação destes vectores é realizada nas bactérias sendo, depois, transferidos para a levedura, organismo onde as proteínas de interesse são expressas (Smutzer, 2001).

As características de crescimento das leveduras favorecem também a sua utilização como modelo experimental (Smutzer, 2001). Estes microrganismos têm um tempo de duplicação celular reduzido (aproximadamente de 2 h) e podem crescer em meios de cultura selectivos, que permitem a identificação de leveduras mutantes conhecidas como auxotróficas, as quais se tornaram incapazes de sintetizar um metabolito requerido para o seu crescimento. Esta capacidade de proliferar sob condições de crescimento específicas tem sido muito explorada para a selecção, pesquisa e identificação de fenótipos de leveduras mutantes (Smutzer, 2001).

Das leveduras mais usadas experimentalmente constam a *S. cerevisiae* e a *S. pombe*. Estes microrganismos têm-se tornado importantes modelos no estudo de funções celulares básicas das células eucariotas, tal como o controlo do ciclo celular (Perego *et al.*, 2000). Uma das grandes vantagens da *S. cerevisiae* é a de permitir monitorizar a progressão das células ao longo do seu ciclo celular, através da observação das alterações na morfologia celular e nuclear (Perego *et al.*, 2000).

Assim, apesar de não poderem substituir completamente as células de mamífero para estudos farmacológicos, as leveduras constituem, entre os vários modelos de organismos eucariotas disponíveis, um valioso modelo celular e a sua utilização na farmacologia molecular é já extensa (Perego *et al.*, 2000; Melese & Hieter, 2002).

A *S. cerevisiae* revelou-se um modelo experimental muito atractivo para a expressão e estudo das isoformas individuais da PKC de mamífero porque, para além das vantagens anteriormente referidas, a influência da PKC endógena da levedura não parece perturbar, significativamente, o efeito dos compostos sobre a isoforma de mamífero expressa (Parissenti *et al.*, 1993; Riedel *et al.*, 1993a,b,c; Su *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Shieh *et al.*, 1995; Parissenti *et al.*, 1996; Shieh *et al.*, 1996; Parissenti *et al.*, 1999). De facto, na *S. cerevisiae* existe uma cínase semelhante à PKC que, apesar de ser activada pelo diacilglicerol, não responde aos activadores clássicos da PKC de mamífero (os ésteres de forbol), apresentando diferentes propriedades catalíticas e especificidade para substratos (Levin *et al.*, 1990; Ogita *et al.*, 1990; Iwai *et al.*, 1992; Antonsson *et al.*, 1994). A PKC da *S. cerevisiae* parece estar envolvida no ciclo celular, na estabilidade osmótica e no processo de gemulação das leveduras (Levin *et al.*, 1990; Fields & Thorner, 1991; Levin & Bartlett-Heubusch, 1992). No entanto, foi verificado que, quando a síntese desta proteína era bloqueada, as suas funções não eram complementadas pelas isoformas da PKC de mamífero expressas. Desta forma, a PKC da *S. cerevisiae* não parece ser uma proteína homóloga à PKC dos mamíferos (Levin *et al.*, 1990; Fields & Thorner, 1991; Levin & Bartlett-Heubusch, 1992).

Apesar de ter sido descrita uma PKC nativa da levedura semelhante à do mamífero e capaz de responder aos ésteres de forbol (Simon *et al.*, 1991; 1992), muitos são os trabalhos que contrariam a identidade entre a PKC da levedura e do mamífero e que mostram a incapacidade da PKC da levedura para responder aos ésteres de forbol (Parissenti *et al.*, 1993; Riedel *et al.*, 1993a,b,c; Su *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Shieh *et al.*, 1995; Parissenti *et al.*, 1996; Shieh *et al.*, 1996; Parissenti *et al.*, 1999).

A *S. cerevisiae* foi utilizada, por alguns grupos, para a expressão de isoformas individuais da PKC de mamífero, tendo sido possível expressar algumas isoformas funcionais da PKC: α (Parissenti *et al.*, 1993; Riedel *et al.*, 1993b,c; Su *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Shieh *et al.*, 1995; 1996); β I (Parissenti *et al.*, 1993; Riedel *et al.*, 1993a; Parissenti *et al.*, 1996; Shieh *et al.*, 1996); γ (Shieh *et al.*, 1996) e ϵ (Parissenti *et al.*, 1999). As proteínas expressas, neste modelo, apresentavam uma actividade enzimática dependente do cálcio, dos fosfolípidos e dos ésteres de forbol, conforme o descrito, na literatura, para as diferentes famílias de isoformas da PKC de mamífero. As isoformas expressas eram ainda capazes de fosforilar proteínas das leveduras, resultando várias respostas fenotípicas destas células: aumento do tempo de duplicação celular, alteração da morfologia celular e estimulação da captação do cálcio, as quais mostraram ser dependentes da isoforma expressa (Parissenti *et al.*, 1993; Riedel *et al.*, 1993a,b,c; Su *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Shieh *et al.*, 1995; Parissenti *et al.*, 1996; Shieh *et al.*, 1996; Parissenti *et al.*, 1999).

Na *S. cerevisiae*, a correlação entre o grau de activação da isoforma expressa e as respostas fenotípicas, não observadas nas células controlo (sem expressão da PKC de mamífero), indicam que estas respostas reflectem a actividade catalítica da PKC expressa (Riedel *et al.*, 1993c). Resultados semelhantes foram observados na *S. pombe*, onde algumas isoformas da PKC foram funcionalmente expressas, causando também respostas fenotípicas específicas e dependentes da isoforma da PKC expressa: γ e δ (Goode *et al.*, 1994; Keenan *et al.*, 1997a,b); η (Goode *et al.*, 1994; Keenan *et al.*, 1997a); ϵ e ζ (Goode *et al.*, 1994).

A activação da isoforma individual da PKC de mamífero expressa pela levedura causou, como resposta mais aparente, uma inibição do crescimento (que reflecte um aumento no tempo de duplicação celular), a qual mostrou ser proporcional ao grau de actividade enzimática da isoforma expressa (Riedel *et al.*, 1993a,b,c; Shieh *et al.*, 1995). Esta inibição do crescimento foi originada por vários activadores da PKC testados, como o PMA, a mezereína e o indolactamo V, tendo permitido revelar diferenças na potência destes compostos em activar as isoformas expressas (Shieh *et al.*, 1995).

Estudos realizados com a *S. pombe* mostraram que este ensaio das leveduras transformadas poderia também ser utilizado para a pesquisa e estudo de inibidores da PKC (Keenan *et al.*, 1997a,b). Segundo estes trabalhos, os inibidores da PKC eram capazes de reduzir a inibição do crescimento causada por um activador. Além disso, quando testados isoladamente, poderiam causar uma estimulação do crescimento das leveduras que expressavam a isoforma individual da PKC (Keenan *et al.*, 1997b). A capacidade do ensaio

para estudar a selectividade dos inibidores para as várias isoformas da PKC foi demonstrada testando-se inibidores conhecidos da PKC (Keenan *et al.*, 1997a,b).

Uma vez que a inibição do crescimento é uma resposta fenotípica facilmente quantificável, medindo-se espectrofotometricamente a densidade celular de culturas líquidas, este ensaio, quando automatizado, pode permitir a pesquisa sistemática, rápida e em paralelo de um número elevado de compostos (Shieh *et al.*, 1995). Estas vantagens, combinadas com a simplicidade e o baixo custo, tornam o método muito atractivo para a pesquisa de moduladores da PKC.

Contudo, não existem disponíveis leveduras transformadas que permitam uma simples utilização deste método. Tornava-se, por isso necessário, realizar todo um trabalho preliminar que permitisse expressar isoformas funcionais das três famílias da PKC, numa mesma espécie e estirpe de leveduras. Pretendia-se, assim, ter um grupo representativo de isoformas que nos possibilitasse comparar a actividade de moduladores da PKC sobre isoformas individuais de diferentes famílias e, por outro lado, diminuir a variabilidade resultante da expressão dessas isoformas em diferentes espécies ou estirpes de leveduras.

Foi objectivo destas experiências preliminares implementar este ensaio fenotípico das leveduras. Com este propósito foi necessário obter plasmídeos que expressassem, nas leveduras, as isoformas individuais da PKC; seleccionar uma estirpe de *S. cerevisiae* capaz de expressar o maior número possível de isoformas de forma funcional; encontrar respostas fenotípicas (entre as descritas como sendo proporcionais ao grau de actividade enzimática da isoforma da PKC expressa) quantificáveis; encontrar uma forma de calcular a potência dos activadores e dos inibidores da PKC, neste modelo.

RESULTADOS

1. Análise de restrição dos plasmídeos de expressão das isoformas individuais da PKC de mamífero (α , β I, γ , ϵ , δ , η ou ζ)

Os plasmídeos usados na transformação (previamente amplificados na *E. coli* DH5 α) foram analisados electroforeticamente em gel de agarose, após digestão com enzimas de

restrição. O tamanho dos fragmentos obtidos foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular (*1 kb DNA Ladder*).

Os perfis de restrição de cada um dos plasmídeos em estudo foram fornecidos, juntamente com os plasmídeos, pelo Dr. Heimo Ridel (YEp52-PKC- α e YEp51-PKC- β I) e pelo Dr. Nigel Goode (YEplac181-PKC- γ , - ϵ , - δ , - η e - ζ) e são apresentados na Tabela 4.

Os fragmentos obtidos na análise de restrição de cada um dos plasmídeos (YEp52-PKC- α , YEp51-PKC- β I, YEplac181-PKC- γ , - ϵ , - δ , - η ou - ζ) estavam de acordo com os indicados na Tabela 4.

Tabela 4. Fragmentos resultantes da digestão dos plasmídeos de expressão da PKC- α , - β I, - γ , - ϵ , - δ , - η ou - ζ de mamífero com enzimas de restrição.

Plasmídeos	Enzimas de restrição	Fragmentos resultantes (pb)
YEp52-PKC- α	<i>EcoRI</i>	5038 + 3342
YEp51-PKC- β I	<i>EcoRI</i>	4446 + 3302 + 1637
YEplac181-PKC- γ	<i>EcoRI</i> + <i>XbaI</i>	5090 + 2863
YEplac181-PKC- ϵ	<i>HindIII</i>	7670 + 1068
YEplac181-PKC- δ	<i>HindIII</i>	6650 + 1515
YEplac181-PKC- η	<i>BamHI</i>	6320 + 1265 + 534
YEplac181-PKC- ζ	<i>BamHI</i>	6020 + 1509

2. Transformação da *S. cerevisiae* e análise de restrição do DNA plasmídico incorporado pelas leveduras

2.1. Transformação das várias estirpes de *S. cerevisiae* pelo método do acetato de lítio

As estirpes de *S. cerevisiae* (CG378, CG379, W303-1A e X1069-2D) foram transformadas com o plasmídeo que codifica cada uma das isoformas individuais da PKC de mamífero (YEp52-PKC- α , YEp51-PKC- β I, YEplac181-PKC- γ , - δ , - ϵ , - η ou - ζ).

Foram consideradas como leveduras transformadas aquelas que cresceram no meio glucosado sem leucina semeado com a suspensão contendo o DNA plasmídico, quando, simultaneamente, não ocorreu crescimento no mesmo meio semeado com a suspensão sem o DNA plasmídico (controle negativo) e quando no meio glucosado com leucina (controle positivo) ocorreu crescimento para as suspensões com e sem DNA plasmídico.

Os resultados das transformações das várias estirpes de *S. cerevisiae* são apresentados na Tabela 5. De todas as estirpes testadas, apenas foi possível transformar a CG379 com todos os plasmídeos usados, sendo a única capaz de incorporar os plasmídeos YEp52-PKC- α e YEp51-PKC- β I.

Tabela 5. Transformação das várias estirpes de *S. cerevisiae* com o plasmídeo que codifica a PKC- α , - β I, - γ , - δ , - ε , - η ou - ζ de mamífero.

Plasmídeos	Estirpes <i>S. cerevisiae</i>			
	CG378	CG379	W303-1A	X1069-2D
YEp52-PKC- α	-	+	-	-
YEp51-PKC- β I	-	+	-	-
YEplac181-PKC- γ	+	+	+	+
YEplac181-PKC- δ	+	+	+	+
YEplac181-PKC- ε	+	+	+	+
YEplac181-PKC- η	+	+	+	+
YEplac181-PKC- ζ	+	+	+	+

Os resultados das transformações são apresentados na forma de sinais + ou -. O sinal + indica ocorrência de transformação da estirpe em estudo (crescimento no meio glucosado sem leucina semeado com a suspensão contendo o DNA plasmídico, ausência de crescimento no controle negativo e crescimento no controle positivo semeado com a suspensão com e sem o DNA plasmídico). O sinal - indica que não foi conseguida a transformação da estirpe indicada.

2.2. Análise de restrição dos plasmídeos extraídos da *S. cerevisiae* transformada

O DNA plasmídico incorporado pela levedura foi analisado electroforéticamente em gel de agarose, após digestão com enzimas de restrição.

Dado que a quantidade de DNA plasmídico extraído das leveduras era insuficiente para se proceder a uma análise de restrição, foi necessário efectuar, previamente, a sua amplificação na *E. coli* DH5 α .

A Figura 4 apresenta os resultados da análise de restrição dos plasmídeos YEp52-PKC- α e YEp51-PKC- β I, a Figura 5 do plasmídeo YEplac181-PKC- γ e a Figura 6 dos plasmídeos YEplac181-PKC- ϵ , - δ , - η e - ζ , extraídos da *S. cerevisiae* CG379. Os fragmentos obtidos, na análise de restrição de cada um destes plasmídeos, foram os esperados (Tabela 4).

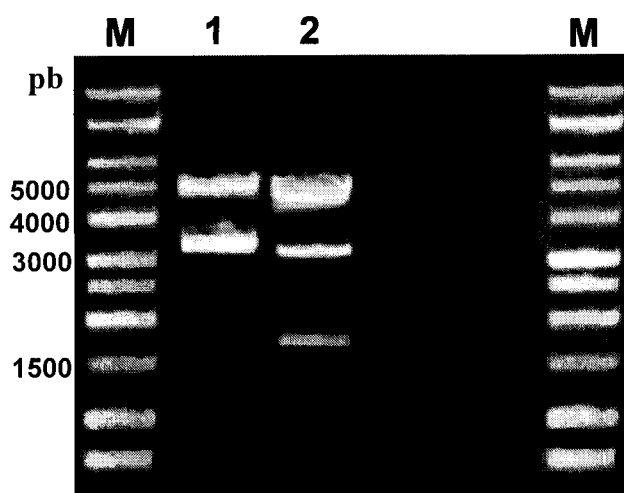


Figura 4. Análise electroforética, em gel de agarose, dos fragmentos resultantes da digestão dos plasmídeos YEp52-PKC- α e YEp51-PKC- β I, extraídos da *S. cerevisiae* CG379, com a enzima de restrição *Eco*RI. Linhas: M- marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder); 1- YEp52-PKC- α e 2- YEp51-PKC- β I.

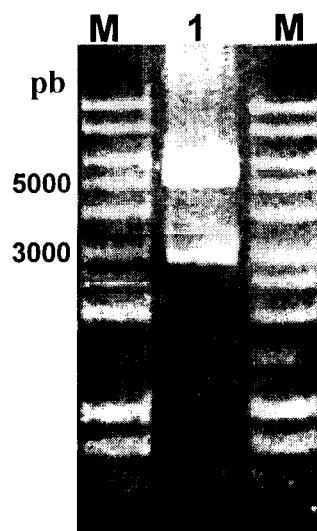


Figura 5. Análise electroforética, em gel de agarose, dos fragmentos resultantes da digestão do plasmídeo YEplac181-PKC- γ , extraído da *S. cerevisiae* CG379, com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Xba*I. Linhas: M- marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder) e 1- YEplac181-PKC- γ .

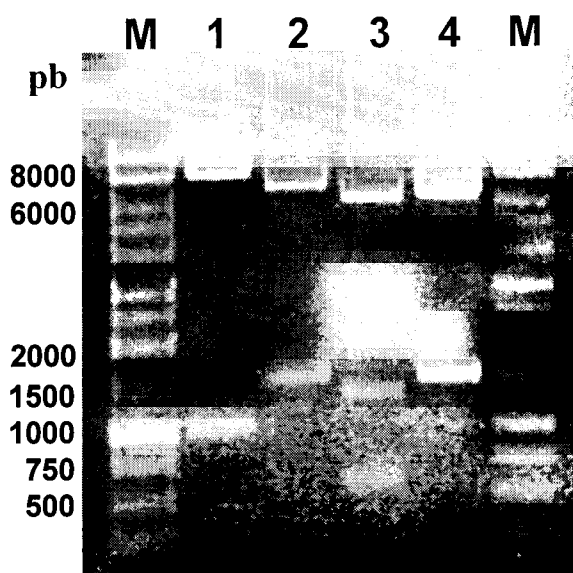


Figura 6. Análise electroforética, em gel de agarose, dos fragmentos resultantes da digestão dos plasmídeos YEplac181-PKC- ϵ , - δ , - η e - ζ , extraídos da *S. cerevisiae* CG379, com as enzimas de restrição *Hind*III (YEplac181-PKC- ϵ e - δ) ou *Bam*HI (YEplac181-PKC- η e - ζ). Linhas: M- marcador de peso molecular (*1 kb DNA Ladder*), 1- YEplac181-PKC- ϵ ; 2- YEplac181-PKC- δ ; 3- YEplac181-PKC- η e 4- YEplac181-PKC- ζ .

3. Confirmação da expressão das isoformas individuais da PKC de mamífero pelas estirpes de *S. cerevisiae* transformadas

A expressão das isoformas individuais da PKC- α , - β I, - γ , - δ , - ϵ , - η ou - ζ , pelas várias estirpes de *S. cerevisiae* transformadas (CG378, CG379, W303-1A e X1069-1D), foi confirmada pela técnica de *Western Blot*. Em cada *Western Blot* realizado foram analisados, em simultâneo, os extractos proteicos obtidos a partir das leveduras transformadas incubadas em meio galactosado (indução da transcrição do gene que codifica a isoforma da PKC de mamífero) e a partir das leveduras transformadas incubadas em meio glucosado (ausência de transcrição do gene que codifica a isoforma da PKC). A expressão de cada uma das isoformas da PKC foi apenas considerada quando do extracto proteico obtido a partir das leveduras incubadas em meio galactosado resultou uma banda antigénica que migrou a mesma distância

que a respectiva proteína recombinante (controlo positivo) e, simultaneamente, do extracto proteico obtido a partir das leveduras incubadas em meio glucosado não resultaram bandas antigénicas.

Os resultados da expressão das isoformas individuais da PKC de mamífero, pelas várias estirpes de *S. cerevisiae* transformadas, são apresentados na Tabela 6.

Apesar de todas as estirpes terem incorporado o plasmídeo que codifica a isoforma γ , apenas a CG379 foi capaz de expressar esta isoforma. No entanto, a intensidade das bandas obtidas com esta isoforma foi visivelmente inferior à das bandas obtidas com as outras isoformas expressas (ver Figura 7). Todas as estirpes testadas foram capazes de expressar as isoformas ϵ , δ , η e ζ . De todas as estirpes de *S. cerevisiae* testadas, apenas a CG379 foi capaz de expressar todas as isoformas da PKC (Figura 7).

Tabela 6. Expressão das isoformas individuais da PKC- α , - β I, - γ , - δ , - ϵ , - η ou - ζ de mamífero pelas várias estirpes de *S. cerevisiae* transformadas.

Isoformas da PKC	Estirpes <i>S. cerevisiae</i>			
	CG378	CG379	W303-1A	X1069-2D
PKC- α	ND	+	ND	ND
PKC- β I	ND	+	ND	ND
PKC- γ	-	$\pm$	-	-
PKC- δ	+	+	+	+
PKC- ϵ	+	+	+	+
PKC- η	+	+	+	+
PKC- ζ	+	+	+	+

O sinal + indica a ocorrência de expressão da isoforma da PKC (do extracto proteico obtido a partir das leveduras incubadas em meio galactosado resultou uma banda antigénica que migrou a mesma distância que o respectivo controlo positivo e, simultaneamente, do extracto proteico obtido a partir das leveduras incubadas em meio glucosado não resultaram bandas antigénicas). O sinal - indica a ausência de expressão da isoforma da PKC. O sinal $\pm$ indica que ocorreu expressão da isoforma da PKC, mas a intensidade das bandas obtidas foi reduzida. ND: Não foi determinada a expressão da isoforma da PKC.

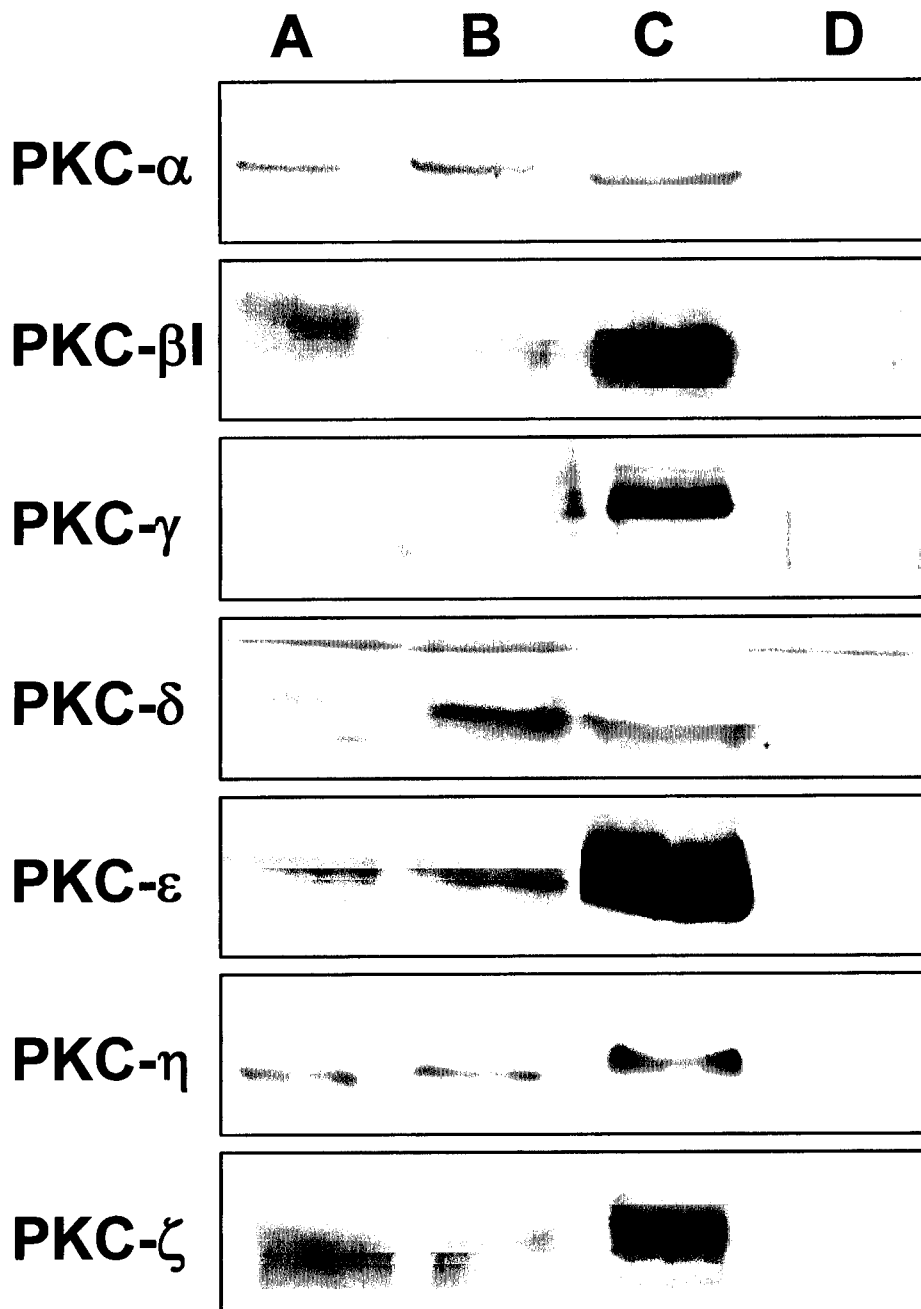


Figura 7. Western Blot efectuado para a *S. cerevisiae* CG379 transformada com o plasmídeo que codifica a PKC- α , - β I, - γ , - δ , - ϵ , - η ou - ζ de mamífero. As bandas antigénicas são apresentadas num arranjo horizontal e foram obtidas a partir de extractos proteicos ($\sim 40 \mu\text{g}$ de proteína por banda) resultantes de culturas incubadas na presença de 2 % de galactose (colunas A e B; amostras em duplicado) ou na presença de 2 % de glucose (coluna D). O controlo positivo (coluna C; $4 \mu\text{g}$ por banda) foi obtido usando-se a proteína recombinante da respectiva isoforma da PKC em estudo.

4. Estudo funcional das isoformas individuais da PKC de mamífero expressas pela *S. cerevisiae*

O estudo da funcionalidade das isoformas individuais da PKC de mamífero, expressas pelas várias estirpes de *S. cerevisiae* (CG378, CG379, W303-1A e X1069-1D), foi efectuado com base nos trabalhos previamente realizados com as isoformas da PKC: α (Riedel *et al.*, 1993b; Zhu *et al.*, 1994; Parissenti *et al.*, 1996) e β I (Riedel *et al.*, 1993a; Parissenti *et al.*, 1996). De acordo com estes trabalhos, o PMA, activador da PKC, provocava alterações no fenótipo das leveduras sempre que a expressão da isoforma da PKC (α ou β I) era induzida (incubação na presença da galactose). Entre as alterações fenotípicas detectadas pelos autores foram referidas: a inibição do crescimento das leveduras (em resultado de um aumento do tempo de duplicação celular) e as alterações morfológicas. Uma vez que estas alterações não foram observadas nem nas leveduras incubadas apenas na presença do solvente, nem no controlo negativo (ausência de expressão da isoforma da PKC), foram consideradas uma consequência da activação, pelo PMA, da isoforma da PKC expressa.

No presente estudo funcional, o PMA, considerado o activador padrão das cPKCs e das nPKCs (Gschwendt, 1999), foi testado nas leveduras que expressavam a PKC- α , - β I, - γ , - δ , - ϵ ou - η , numa concentração de 10^{-5} M. Uma vez que a aPKC (PKC- ζ) não é activada pelos ésteres de forbol (Ways *et al.*, 1992; Gschwendt, 1999), o ácido araquidónico, capaz de activar a PKC- ζ (Nakanishi & Exton, 1992), foi usado como activador padrão desta isoforma, numa concentração de 10^{-5} M.

Na ausência da galactose, nenhum dos activadores da PKC (PMA ou ácido araquidónico para a PKC- ζ) causou alterações no fenótipo das leveduras transformadas. O solvente usado (DMSO; concentração final de 0,1 %) não influenciou o fenótipo das leveduras quer na ausência, quer na presença da galactose.

A Tabela 7 apresenta a inibição do crescimento causada por 10^{-5} M PMA, nas várias estirpes de *S. cerevisiae* (CG378, CG379, W303-1A e X1069-1D) incubadas em meio galactosado (com indução da expressão da isoforma da PKC). Para a determinação da percentagem de inibição do crescimento causada pelo activador, o crescimento obtido na presença do composto foi expresso em percentagem do obtido apenas na presença do solvente (testado em simultâneo com o composto), sendo depois transformado em percentagem de

inibição, subtraindo a 100 aquele valor. Desta forma, 100 % de inibição do crescimento corresponde à ausência de crescimento das leveduras durante a incubação.

Tabela 7. Inibição do crescimento causada por 10^{-5} M PMA, nas várias estirpes de *S. cerevisiae* que expressavam a PKC- α , - β I, - γ , - δ , - ϵ , - η ou - ζ de mamífero.

Isoformas da PKC	Estirpes <i>S. cerevisiae</i>			
	CG378	CG379	W303-1A	X1069-2D
PKC- α	ND	$43,8 \pm 1,3$	ND	ND
PKC- β I	ND	$33,6 \pm 1,8$	ND	ND
PKC- γ	ND	-	ND	ND
PKC- δ	$21,1 \pm 1,4$	$27,1 \pm 1,8$	$22,0 \pm 1,7$	$17,3 \pm 1,0$
PKC- ϵ	-	-	-	-
PKC- η	$20,2 \pm 2,0$	$22,3 \pm 1,2$	$18,2 \pm 1,6$	$14,5 \pm 0,9$
PKC- ζ^a	-	-	-	-

O crescimento obtido apenas na presença do solvente foi considerado 0 % de inibição (100 % de crescimento). Os valores de inibição do crescimento (% do controlo) apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão da média de 5 ensaios realizados em quadruplicado. O sinal - indica que o crescimento obtido na presença de 10^{-5} M PMA não foi significativamente diferente do obtido apenas na presença do solvente (teste *t* de Student emparelhado). ND: Não foi determinada a inibição do crescimento. ^aOs valores de inibição do crescimento (% do controlo) obtidos com 10^{-5} M ácido araquidónico foram de: $20,9 \pm 0,5$ (CG378); $26,3 \pm 1,8$ (CG379); $19,1 \pm 1,4$ (W303-1A) e de $15,5 \pm 1,6$ (X1069-2D), ($n = 5$ ensaios).

A estirpe CG379, que foi capaz de expressar as isoformas α e β I, apresentou, para estas isoformas, uma inibição acentuada do crescimento na presença do PMA. Por outro lado, a reduzida expressão da isoforma γ , nesta estirpe, foi acompanhada por uma ausência de inibição do crescimento na presença do PMA. Em nenhuma das estirpes que expressavam a PKC- ϵ foi observada uma inibição significativa do crescimento em presença do PMA. Todas as estirpes capazes de expressar as isoformas δ , η ou ζ apresentaram uma inibição significativa do crescimento na presença do activador da PKC (PMA; ácido araquidónico para a PKC- ζ). No entanto, a estirpe CG379 que expressava as isoformas δ , η ou ζ , foi aquela que

apresentou uma inibição do crescimento mais acentuada. Em oposição, a estirpe X1069-2D, que expressava uma dessas isoformas (δ , η ou ζ), foi aquela que apresentou uma menor inibição do crescimento na presença do activador da PKC.

Além da PKC- ζ , o ácido araquidónico foi testado nas outras isoformas da PKC expressas, causando, numa concentração de 10^{-5} M, uma inibição significativa do crescimento das leveduras que expressavam as isoformas α ou β I (CG379), δ ou η (CG378, CG379, W303-1A e X1069-2A). Também com este activador da PKC, o efeito mais marcado foi obtido na estirpe CG379, onde causou uma inibição do crescimento (% do controlo) de: $19,8 \pm 1,6$ (PKC- α); $23,1 \pm 1,5$, (PKC- β I); $28,8 \pm 1,3$ (PKC- δ); $19,1 \pm 1,1$ (PKC- η) ($n = 5$).

Os resultados do estudo morfológico efectuado para cada uma das estirpes de *S. cerevisiae* (CG378, CG379, W303-1A e X1069-1D), incubadas em meio galactosado (indução da expressão da isoforma da PKC) e na presença de 10^{-5} M PMA (ácido araquidónico para a PKC- ζ), são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Alterações morfológicas causadas por 10^{-5} M PMA, nas várias estirpes de *S. cerevisiae* que expressavam a PKC- α , - β I, - γ , - δ , - ϵ , - η ou - ζ de mamífero.

Isoformas da PKC	Estirpes <i>S. cerevisiae</i>			
	CG378	CG379	W303-1A	X1069-2D
PKC- α	ND	+	ND	ND
PKC- β I	ND	+	ND	ND
PKC- γ	ND	-	ND	ND
PKC- δ	+	+	+	$\pm$
PKC- ϵ	-	-	-	-
PKC- η	+	+	+	-
PKC- ζ ^a	-	-	-	-

O sinal + indica a ocorrência de alterações morfológicas e o sinal - indica a ausência de alterações morfológicas. O sinal $\pm$ indica que foram observadas alterações morfológicas em número muito reduzido. ND: Não determinadas. ^aNa presença de 10^{-5} M de ácido araquidónico não foram detectadas alterações morfológicas em nenhuma das estirpes de *S. cerevisiae* que expressavam a PKC- ζ .

Em algumas estirpes e para algumas das isoformas expressas, o PMA causou marcadas alterações na morfologia das leveduras (Figura 8).

Apenas foram observadas alterações morfológicas, causadas por 10^{-5} M PMA, nas leveduras que expressavam as isoformas α e β I (CG379), δ (CG378, CG379, W303-1A e X1069-1D) e η (CG378, CG379 e W303-1A).

Segundo Parissenti e colaboradores (1996), a activação da PKC- α , apesar de inibir de forma acentuada o crescimento das leveduras, não originaria marcadas alterações morfológicas. Contudo, no presente trabalho foram observadas evidentes alterações na morfologia das leveduras que expressavam a PKC- α , à semelhança do observado nas leveduras que expressavam a PKC- β I, - δ ou - η .

Na estirpe CG379 que expressava a PKC- γ não foram observadas alterações morfológicas na presença do PMA. De forma semelhante, também não foram observadas alterações morfológicas em nenhuma das estirpes de *S. cerevisiae* que expressavam a PKC- ϵ .

Ao contrário do PMA, o ácido araquidónico (10^{-5} M) não causou alterações na morfologia das leveduras que expressavam as isoformas individuais da PKC em estudo.

As acentuadas alterações na morfologia das leveduras apareceram, em geral, em aproximadamente 10 a 15 % do campo microscópico. Aparentemente, não foram detectadas diferenças evidentes na frequência do aparecimento das alterações morfológicas apresentadas pela mesma estirpe de leveduras que expressavam as isoformas α , β I, δ ou η . No entanto, entre estirpes diferentes de *S. cerevisiae* que expressavam a mesma isoforma da PKC (δ ou η) pareciam existir diferenças no número de alterações morfológicas apresentadas. As estirpes CG378 e CG379 pareciam apresentar sempre alterações morfológicas em número superior à estirpe W303-1A. Por outro lado, na estirpe X1069-1D, as alterações morfológicas apareceram em número muito reduzido (PKC- δ) ou nunca foram observadas (PKC- η). Desta forma, a estirpe X1069-1D que expressava a PKC- η foi a única em que o PMA causou uma inibição do crescimento, sem originar alterações morfológicas.

Das isoformas da PKC de mamífero expressas pela *S. cerevisiae*, apenas a α , β I, δ , η e ζ originaram alterações fenotípicas nas leveduras, em presença do activador da PKC e, por isso, apenas estas poderiam ser usadas em estudos farmacológicos posteriores.

Das estirpes de *S. cerevisiae* estudadas, a CG379 foi aquela que, após transformação, conseguiu expressar um maior número de isoformas da PKC. Além disso, das isoformas expressas por várias estirpes de *S. cerevisiae*, foi também aquela que apresentou respostas

fenotípicas mais marcadas aos activadores da PKC (PMA ou ácido araquidónico). Deste modo, a estirpe de *S. cerevisiae* CG379 que expressava a PKC- α , - β I, - δ , - η ou - ζ foi a seleccionada para a realização do ensaio fenotípico das leveduras transformadas.

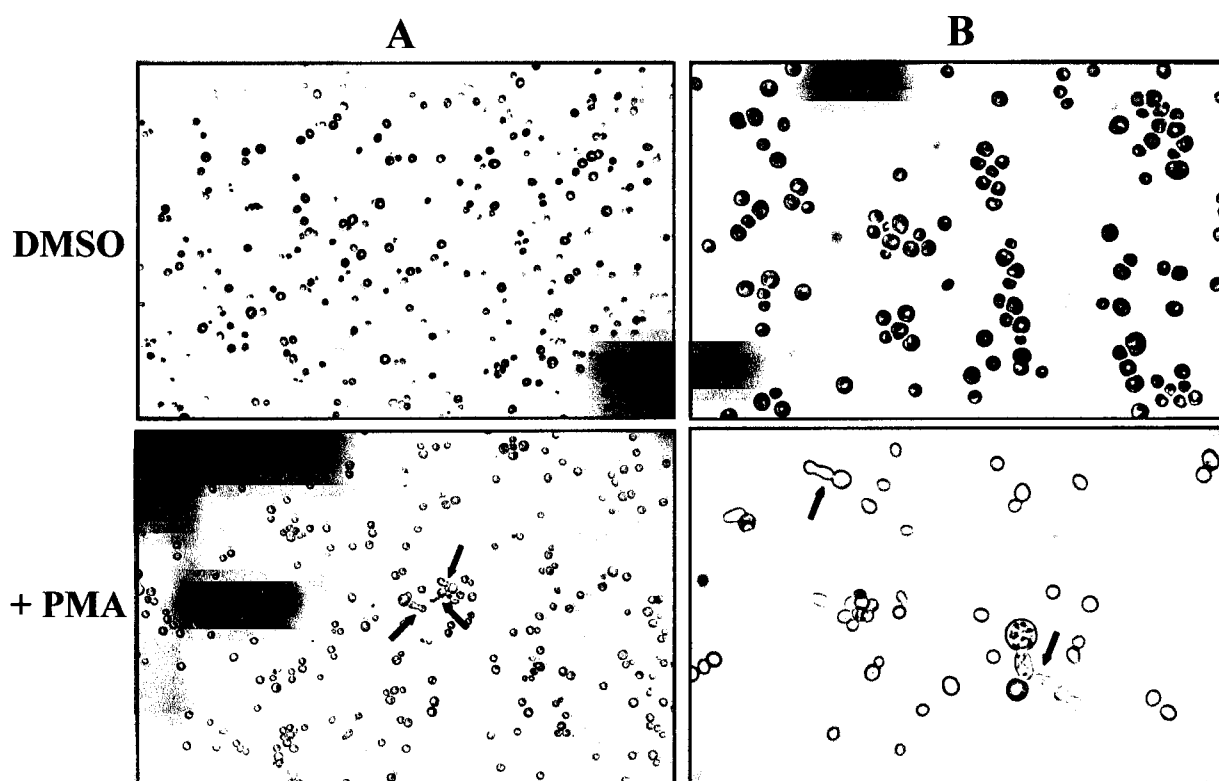


Figura 8. Morfologia característica da *S. cerevisiae* CG379 que expressava a PKC- α , - β I, - δ ou - η , observada numa ampliação de 200x (A) e numa ampliação de 400x (B): morfologia normal das leveduras observada quando incubadas apenas na presença do solvente (DMSO); alterações morfológicas (assinaladas com setas) observadas quando as leveduras foram incubadas na presença de 10^{-5} M PMA (+ PMA).

5. Optimização do ensaio fenotípico das leveduras transformadas para a pesquisa de potenciais activadores e inibidores da PKC

Activadores da PKC

Numa primeira série de experiências caracterizou-se o efeito do activador da PKC adequado (PMA; ácido araquidónico no caso da PKC- ζ) no crescimento da *S. cerevisiae* CG379 que expressava a PKC- α , - β I, - δ , - η ou - ζ de mamífero, numa gama ampla de concentrações.

Com o objectivo de identificar a fase logarítmica do crescimento das leveduras que expressavam cada uma das isoformas da PKC, foram traçadas as respectivas curvas de crescimento. Para a obtenção destas curvas, as leveduras foram incubadas durante 150 h, em meio galactosado e na presença apenas do solvente (DMSO; concentração final de 0,1 %) ou de 10^{-5} M do activador da PKC adequado (Figura 9, coluna da esquerda). Paralelamente, foram traçadas as curvas de inibição do crescimento para essas leveduras incubadas na presença do activador da PKC adequado (Figura 9, coluna da direita), com o objectivo de identificar o período de tempo durante o qual a inibição máxima do crescimento foi alcançada e permaneceu constante ou apresentou alterações pouco significativas. A determinação do efeito dos compostos baseou-se nas medições da DO_{620} em tempos fixos, para os quais o crescimento das leveduras se encontrava na fase logarítmica e a inibição do crescimento na fase estacionária.

Nas leveduras que expressavam as cPKCs (α ou β I), o patamar de inibição do crescimento causado pelo PMA ocorreu entre as 60 e as 75 h de incubação, pelo que a determinação do efeito dos compostos, nestas isoformas, foi baseado em medições da DO_{620} às 65 h. Nas leveduras que expressavam as nPKCs (δ ou η), o patamar de inibição do crescimento causado pelo PMA ocorreu entre as 45 e as 55 h de incubação, pelo que a determinação do efeito dos compostos sobre o crescimento destas leveduras foi baseado em medições da DO_{620} às 45 h. Nas leveduras que expressavam a PKC- ζ , o patamar de inibição do crescimento causado pelo ácido araquidónico ocorreu entre as 42 e as 60 h, pelo que a

determinação do efeito dos compostos sobre o crescimento destas leveduras foi baseado em medições da DO_{620} às 45 h.

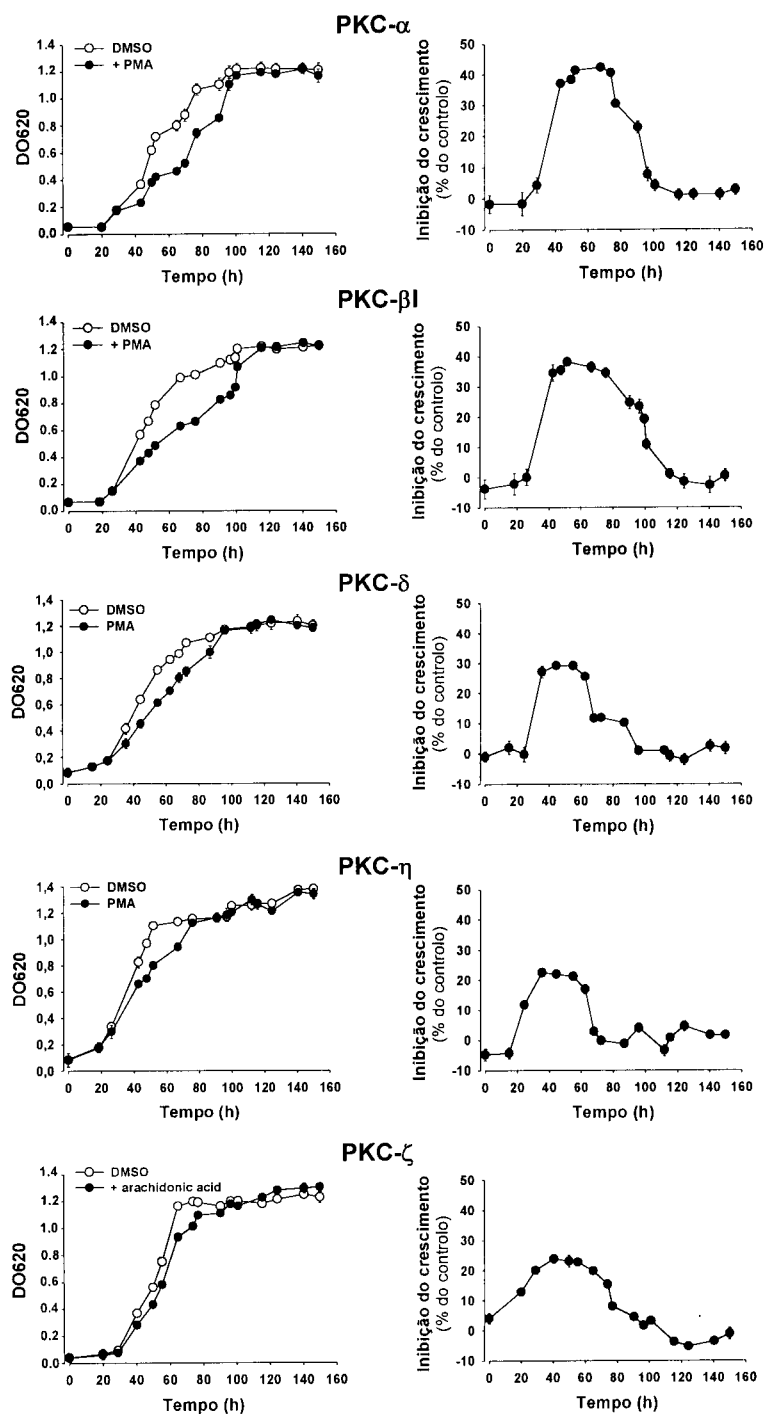


Figura 9. Coluna da esquerda: curvas representativas do crescimento da *S. cerevisiae* CG379 que expressava a PKC- α , - β I, - δ , - η ou - ζ , incubada na ausência (círculos abertos) ou na presença (círculos fechados) de 10^{-5} M do activador da PKC indicado (PMA ou ácido araquidónico para a PKC- ζ). **Coluna da direita:** curvas representativas da % de inibição do crescimento causada por 10^{-5} M do activador da PKC indicado (PMA ou ácido araquidónico para a PKC- ζ). Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão da média de 1 ensaio realizado em quadruplicado.

Os valores de inibição do crescimento obtidos com 10^{-5} M PMA, nas leveduras que expressavam as isoformas individuais da PKC em estudo, são apresentados na Tabela 9. Esta foi a máxima concentração que foi possível testar nestas condições experimentais, uma vez que, para concentrações superiores, não se conseguiu uma completa dissolução do PMA no meio. Por esta razão, assumiu-se que o efeito causado por 10^{-5} M PMA (ou ácido araquidónico no caso da PKC- ζ) representava a máxima inibição do crescimento que era possível obter por activação da PKC.

Tabela 9. Inibição do crescimento causada por 10^{-5} M PMA, nas leveduras que expressavam a PKC- α , - β I, - δ , - η ou - ζ de mamífero.

Isoformas da PKC	Inibição do crescimento causada por 10^{-5} M PMA (% do controlo)
PKC- α	$40,6 \pm 1,9$ ($n = 9$)
PKC- β I	$36,1 \pm 1,1$ ($n = 14$)
PKC- δ	$26,6 \pm 0,6$ ($n = 13$)
PKC- η	$21,3 \pm 0,7$ ($n = 13$)
PKC- ζ^a	$0,2 \pm 1,4$ ($n = 9$)

O crescimento obtido apenas na presença do solvente foi considerado de 0 % de inibição (100 % de crescimento). Os valores de % de inibição do crescimento apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão da média de um número de (n) ensaios realizados em quadruplicado.

^aA inibição do crescimento causada por 10^{-5} M ácido araquidónico foi de $23,9 \pm 0,7$ ($n = 14$).

Uma vez que a máxima inibição do crescimento variou entre as isoformas, assumiu-se como 100 % de inibição do crescimento, a inibição causada por 10^{-5} M PMA (ácido araquidónico para a PKC- ζ) em cada isoforma. Desta forma, tentou-se uniformizar a máxima inibição do crescimento alcançável pela activação das isoformas expressas, diminuindo assim a influência de diferentes valores absolutos, obtidos em diferentes isoformas, na interpretação dos resultados. Os efeitos dos activadores da PKC foram expressos em percentagem dessa

máxima inibição do crescimento. Um valor de 0 % de inibição ocorreu quando o crescimento na presença do composto foi semelhante ao obtido apenas na presença do solvente; valores negativos de inibição ocorreram quando o crescimento na presença do composto foi superior ao obtido apenas na presença do solvente e foi assumido como uma indicação de estimulação do crescimento pelo composto.

Para a determinação das curvas de concentração-resposta, os activadores da PKC (PMA; ácido araquidónico para a PKC- ζ) foram testados num intervalo de concentrações de 10^{-13} a 10^{-5} M. A partir destas curvas foi calculada a concentração do activador capaz de causar 50 % da resposta máxima (EC_{50}).

O PMA causou uma inibição do crescimento dependente da concentração, nas leveduras que expressavam as cPKCs ou nPKCs (Figura 10).

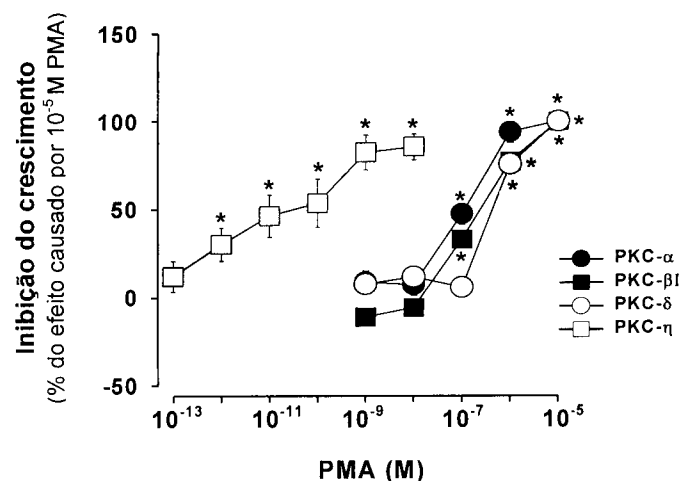


Figura 10. Curvas de concentração-resposta para os efeitos do PMA no crescimento das leveduras que expressavam a PKC- α , - β I, - δ ou - η . Os valores de inibição do crescimento são expressos em percentagem do efeito causado por 10^{-5} M PMA e correspondem à média $\pm$ erro padrão da média de 5 – 14 ensaios realizados em quadruplicado. Crescimento das leveduras em presença do PMA significativamente diferente do obtido apenas na presença do solvente: * $P < 0,05$ (teste *t* de Student emparelhado).

Nas leveduras que expressavam a PKC- ζ , o ácido araquidónico causou também uma inibição do crescimento dependente da concentração (Figura 11).

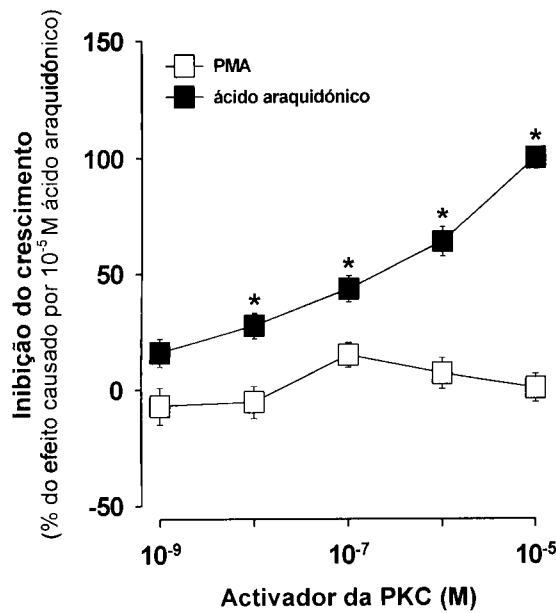


Figura 11. Curvas de concentração-resposta para os efeitos do PMA (quadrados abertos) e do ácido araquidónico (quadrados fechados) no crescimento das leveduras que expressavam a PKC-ζ. Os valores de inibição do crescimento são expressos em percentagem do efeito causado por 10⁻⁵ M ácido araquidónico e correspondem à média ± erro padrão da média de 9 ensaios realizados em quadruplicado. Crescimento das leveduras em presença do ácido araquidónico significativamente diferente do obtido apenas na presença do solvente: **P* < 0,05 (teste *t* de Student emparelhado).

Os valores de EC₅₀ determinados a partir das curvas de concentração-resposta obtidas em experiências individuais para estes activadores da PKC, nas várias isoformas testadas, são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de EC₅₀ obtidos para o PMA, nas leveduras que expressavam as isoformas individuais da PKC em estudo.

Composto	EC ₅₀ (nM)				
	PKC-α	PKC-βI	PKC-δ	PKC-η	PKC-ζ ^a
PMA	111,6 ± 18,4*	243,2 ± 69,1*	573,8 ± 36,7*	0,1 ± 0,01	—

Os valores de EC₅₀ correspondem à concentração do activador da PKC capaz de causar 50 % da inibição do crescimento causada por 10⁻⁵ M PMA (ácido araquidónico para a PKC-ζ). Os resultados apresentados correspondem à média ± erro padrão da média de 5 ensaios realizados em quadruplicado. Valores de EC₅₀ significativamente diferentes do obtido para a PKC-η: **P* < 0,05, *one way* análise de variância (ANOVA) seguido do teste *t* de Tukey. ^a O valor do EC₅₀ obtido para a PKC-ζ, com o ácido araquidónico, foi de 205,4 ± 32,6 nM (*n* = 5).

O PMA apresentou diferenças na sua potência para as distintas isoformas da PKC testadas, como revelado pelos respectivos valores de EC_{50} . A seguinte ordem de potência foi estabelecida para este activador da PKC: $PKC-\eta > -\alpha > -\beta I > -\delta$ (o sinal $>$ foi usado sempre que o valor do EC_{50} da isoforma colocada à esquerda foi significativamente superior ao valor do EC_{50} da isoforma colocada à direita do sinal, caso contrário foi usado o sinal $=$; $P < 0,05$, teste t de *Student*). Assim, a PKC- η foi a isoforma em que o PMA se revelou mais potente e a PKC- δ a isoforma em que se revelou menos potente.

Inibidores da PKC

Segundo estudos anteriores, recorrendo ao ensaio fenotípico das leveduras transformadas, um inibidor da PKC é capaz de reduzir a inibição do crescimento causada por um activador (Keenan *et al.*, 1997a,b). Por outro lado, quando testados isoladamente, os inibidores da PKC poderão causar, por si só, uma estimulação do crescimento das leveduras que expressam as isoformas individuais desta cínase (Keenan *et al.*, 1997b).

A queleritrina, um conhecido inibidor da PKC (Herbert *et al.*, 1990), foi estudada neste ensaio fenotípico das leveduras transformadas.

Em meio glucosado (ausência de expressão da PKC), a queleritrina, na concentração máxima de 10^{-5} M, não modificou, de forma significativa, o crescimento das leveduras.

Em meio galactosado (com expressão da isoforma da PKC), o inibidor da PKC foi testado isoladamente e em associação com o activador (PMA; ácido araquidónico para a PKC- ζ). Numa primeira abordagem foi estudado o efeito da queleritrina (10^{-8} - 10^{-5} M), isoladamente, no crescimento das leveduras que expressavam a PKC- α , $-\beta I$, $-\delta$, $-\eta$ ou $-\zeta$. Para a máxima concentração testada (10^{-5} M), a queleritrina causou uma ligeira estimulação do crescimento das leveduras (Figura 12). Para concentrações inferiores, este composto, em geral, não modificou, de forma significativa, o crescimento das leveduras transformadas (Figura 12).

Em experiências subsequentes foi estudada a capacidade da queleritrina reduzir a inibição do crescimento causada pelo activador da PKC, PMA (ácido araquidónico para a PKC- ζ). A queleritrina foi testada na concentração máxima, 10^{-5} M (concentração para a qual foi detectada uma estimulação significativa do crescimento das leveduras) e na concentração

mínima, 10^{-8} M (concentração para a qual não ocorreu uma modificação significativa do crescimento das leveduras). Os efeitos da queleritrina na inibição do crescimento das leveduras que expressavam as isoformas α , β I, δ , η ou ζ , causada pelo activador da PKC adequado, são apresentados na Figura 13.

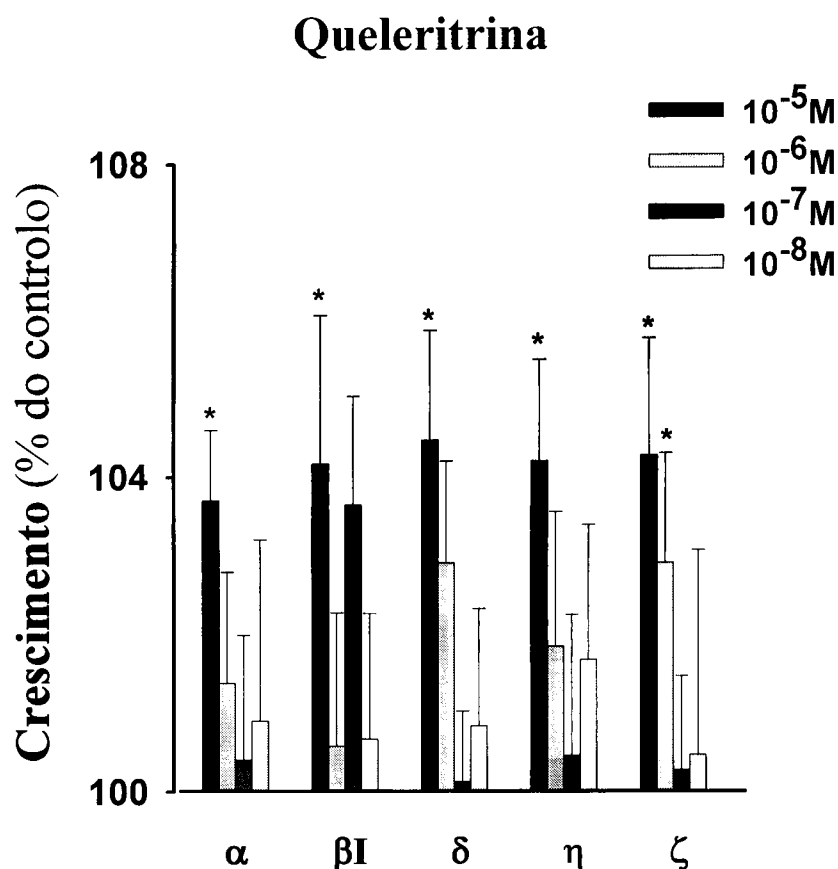


Figura 12. Efeito do inibidor da PKC, queleritrina, no crescimento das leveduras que expressavam a PKC- α , - β I, - δ , - η ou - ζ . As leveduras que expressavam as isoformas individuais da PKC foram incubadas na presença apenas do solvente (DMSO; concentração final de 0,1 %) ou da concentração indicada de queleritrina. Os resultados são expressos em % de crescimento e correspondem à média $\pm$ erro padrão da média de 4 – 6 ensaios realizados em quadruplicado. Crescimento das leveduras em presença da queleritrina significativamente diferente do obtido apenas na presença do solvente: * $P < 0,05$ (teste *t* de Student emparelhado).

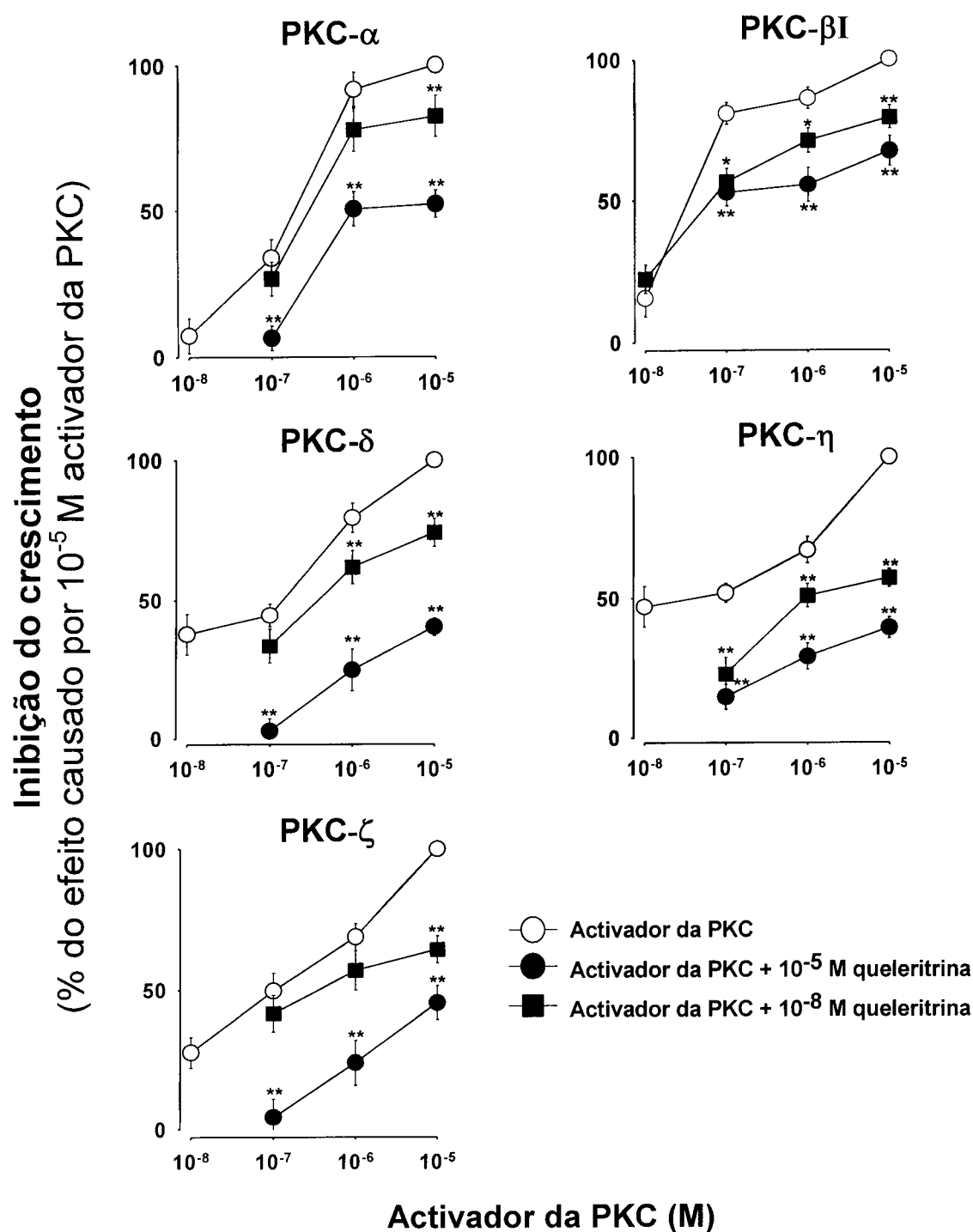


Figura 13. Experiências de interacção entre a queleritrina e o activador da PKC: curvas de concentração-resposta para o activador da PKC, PMA (ácido araquidónico para a PKC- ζ) na ausência (círculos abertos) e na presença da queleritrina na concentração de 10^{-5} M (círculos fechados) ou de 10^{-8} M (quadrados fechados). Os resultados são apresentados em % do efeito causado por 10^{-5} M do activador da PKC e correspondem à média $\pm$ erro padrão da média de 4 – 5 ensaios realizados em quadruplicado. Crescimento das leveduras em presença da queleritrina significativamente diferente do obtido apenas na presença do activador da PKC: * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ (teste *t* de Student).

Em todas as isoformas testadas, a queleritrina foi capaz de reduzir a inibição do crescimento causada pelo activador (PMA ou ácido araquidónico para a PKC- ζ), provocando um deslocamento, para a direita, da curva de concentração-resposta ao activador da PKC (comparar os círculos abertos com os símbolos fechados da Figura 13).

Este deslocamento mostrou ser dependente da concentração, sendo o deslocamento causado por 10^{-5} M queleritrina mais pronunciado do que aquele causado por 10^{-8} M.

O deslocamento da curva de concentração-resposta ao activador da PKC, causado pelo inibidor, foi quantificado através da razão entre os valores de EC_{50} obtidos a partir das curvas traçadas para o activador da PKC na presença e na ausência do inibidor da PKC. Para o cálculo destas razões dos EC_{50} usou-se a concentração de inibidor que, isoladamente, não causou uma estimulação significativa do crescimento (10^{-8} M).

As razões assim obtidas, causadas pela mesma concentração de inibidor, foram usadas para comparar a sua potência nas isoformas da PKC em estudo. A Tabela 11 apresenta os valores das razões dos EC_{50} obtidos para 10^{-8} M queleritrina, nas isoformas da PKC testadas.

Tabela 11. Razões dos EC_{50} obtidas para a queleritrina na PKC- α , - β I, - δ , - η e - ζ .

Composto	Razões dos EC_{50} ^a				
	PKC- α	PKC- β I	PKC- δ	PKC- η	PKC- ζ
Queleritrina	$1,9 \pm 0,3^*$	$2,9 \pm 0,3^*$	$1,3 \pm 0,1^*$	$63,2 \pm 1,7$	$1,4 \pm 0,2^*$

^aRazões dos EC_{50} = EC_{50} (activador da PKC + 10^{-8} M queleritrina) / EC_{50} (activador da PKC)

Os valores dos EC_{50} correspondem à concentração do activador da PKC que causou 50 % da inibição do crescimento causada por 10^{-5} M PMA (ácido araquidónico para a PKC- ζ). Os resultados apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão da média de 4 – 5 ensaios realizados em quadruplicado. Razões dos EC_{50} significativamente diferentes da razão obtida na PKC- η : $^*P < 0,05$, *one way* análise de variância (ANOVA) seguido do teste *t* de Tukey.

A queleritrina apresentou diferenças na sua potência para as distintas isoformas da PKC testadas, como pode ser observado pela comparação das razões dos EC_{50} obtidas. Para este inibidor da PKC foi estabelecida a seguinte ordem de potência: PKC- $\eta > -\beta$ I $> -\alpha > -\zeta = -\delta$ (o sinal $>$ foi usado sempre que o valor da razão dos EC_{50} para a isoforma colocada à

esquerda do sinal foi significativamente superior ao valor da razão dos EC_{50} para a isoforma colocada à direita, caso contrário foi usado o sinal $=$; $P < 0,05$; teste t de *Student*). Assim, segundo esta análise, a queleritrina parece ser mais potente na isoforma η do que nas outras isoformas da PKC estudadas.

DISCUSSÃO

A implementação de um modelo experimental simples e rápido que permitisse efectuar, *in vivo*, o estudo farmacológico das isoformas individuais da PKC e que pudesse ser utilizado na pesquisa de activadores e inibidores para as várias isoformas desta cínase, constituiu o principal objectivo do presente trabalho.

O ensaio fenotípico das leveduras transformadas, que utiliza um sistema eucariota de complexidade mínima para expressar as isoformas individuais da PKC de mamífero, foi proposto como um ensaio alternativo aos tradicionais ensaios *in vivo* para a pesquisa de potenciais moduladores da PKC. Com este trabalho pretendeu-se expressar, na mesma estirpe de leveduras, um conjunto de isoformas suficientemente representativo das diversas famílias da PKC.

Ao contrário dos trabalhos anteriormente efectuados (Riedel *et al.*, 1993a,b,c; Su *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Shieh *et al.*, 1995; Parissenti *et al.*, 1996; Shieh *et al.*, 1996), foi conseguida a expressão de várias isoformas funcionais da PKC (α , βI , δ , η e ζ) numa mesma estirpe de *S. cerevisiae* (CG379). A expressão de cada uma destas isoformas, numa mesma estirpe de leveduras, constitui um requisito essencial neste tipo de ensaio, uma vez que permite comparar a potência dos compostos em várias isoformas desta cínase, nas mesmas condições experimentais.

A expressão das isoformas γ e ϵ pelas leveduras não foi bem sucedida em nenhuma das estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas. No caso da isoforma γ , este insucesso pode ser devido à produção de uma quantidade reduzida da proteína. No caso da isoforma ϵ , essa explicação não pode ser usada, uma vez que a intensidade das bandas obtidas para esta isoforma indicavam a produção de uma quantidade de proteína similar à das isoformas que apresentaram alterações fenotípicas em presença do activador da PKC, o que sugere a produção de uma proteína não funcional.

Como demonstrado neste estudo preliminar, foram detectadas diferenças entre as várias estirpes de *S. cerevisiae* testadas, as quais começaram por ser observadas nos processos de transformação (apenas a estirpe CG379 foi capaz de incorporar os plasmídeos YEp51 e YEp52) e na capacidade de expressão de uma dada proteína (apenas a estirpe CG379 foi capaz, embora de forma reduzida, de expressar a PKC- γ). Variações relevantes na intensidade das respostas fenotípicas (inibição do crescimento e/ou alterações morfológicas) foram também detectadas entre as várias estirpes que expressavam a mesma isoforma da PKC (a estirpe CG379 foi a que apresentou respostas fenotípicas mais marcadas, enquanto que a estirpe X1069-2D foi a que apresentou respostas fenotípicas mais fracas).

Tal como noutros estudos realizados (Riedel *et al.*, 1993a,b,c; Su *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Shieh *et al.*, 1995; Parissenti *et al.*, 1996; Shieh *et al.*, 1996), as respostas fenotípicas causadas nas leveduras pelos activadores da PKC (inibição do crescimento e alterações morfológicas) eram dependentes da expressão da isoforma da PKC de mamífero. Apesar de parecer existir, nas leveduras, uma PKC homóloga à dos mamíferos, os activadores da PKC apenas originaram respostas fenotípicas nas leveduras que expressavam uma das isoformas da PKC de mamífero, o que exclui o envolvimento de proteínas da levedura a mediar os efeitos dos compostos testados. Assim, e apesar do ácido araquidónico ser um composto capaz de activar a PKC de mamífero e da levedura, a concentração óptima capaz de activar ambas as cínases é bastante diferente (Ogita *et al.*, 1990) e, no intervalo de concentrações usado neste trabalho, apenas foi observada uma inibição do crescimento nas leveduras que expressavam a PKC de mamífero. Este facto permitiu utilizar este composto, capaz de activar a PKC- ζ (Nakanishi & Exton, 1992), como activador padrão desta isoforma, a qual não é activada pelos ésteres de forbol (Ways *et al.*, 1992; Gschwendt, 1999).

A PKC tem um papel importante na estimulação e na inibição da progressão do ciclo celular (Parissenti *et al.*, 1999). Uma activação da PKC pode conduzir a um aumento ou a uma diminuição do crescimento das células de mamífero (Gescher, 1985; Housey *et al.*, 1988; Persons *et al.*, 1988; Gescher, 1992). Nas leveduras, a activação da PKC de mamífero causou uma inibição do crescimento (que reflecte um aumento no tempo de duplicação celular) o que, se atendermos aos efeitos que estas isoformas medeiam nas células de mamífero, não pode ser considerada uma resposta inesperada, constituindo mais uma indicação da existência de vias de transdução relacionadas entre os eucariotas inferiores e superiores (Riedel *et al.*, 1993b; Shieh *et al.*, 1995).

A observação de que a activação da isoforma expressa conduz a respostas biológicas na levedura sugere que esta possa partilhar, com uma cínase nativa, funções na regulação do crescimento da levedura. A existência de tal cínase já foi proposta (Simon *et al.*, 1991; 1992), pelo que a isoforma expressa da PKC de mamífero, provavelmente, activa as vias de transdução na qual ela participa (Riedel *et al.*, 1993b).

Embora existam várias provas que apoiam o envolvimento da PKC da levedura na regulação do seu ciclo celular (Parissenti *et al.*, 1999), a forma como esta modula o crescimento celular ainda não é bem conhecida. De forma semelhante ao observado quando a PKC- β I (Riedel *et al.*, 1993a) e a PKC- ϵ (Parissenti *et al.*, 1999) foram expressas nas leveduras, as alterações na morfologia das leveduras pareciam dever-se a um impedimento na formação do septo entre a célula mãe e a célula filha. Desta forma, a isoforma da PKC expressa, quando activada, poderá inibir o crescimento das leveduras afectando directamente vários passos da progressão do ciclo celular, predominantemente a gemulação mas também outros processos que ocorrem após a síntese do DNA, tal como a separação dos cromossomas e a formação do septo (Parissenti *et al.*, 1999).

Neste trabalho foram observadas alterações morfológicas nas leveduras que expressavam as isoformas individuais da PKC, causadas pelo activador, PMA. No entanto, este efeito não nos pareceu o mais adequado para quantificar a actividade dos activadores da PKC. As razões que justificaram tal opção basearam-se na observação de que o ácido araquidónico, ao contrário do PMA, não causou alterações na morfologia das leveduras que expressavam as isoformas individuais da PKC, o que sugere que nem todos os activadores da PKC são capazes de originar esta alteração fenotípica. Por outro lado, na presença do PMA, o número de alterações morfológicas observadas nas leveduras que expressavam as isoformas da PKC- α , - β I, - δ ou - η foi reduzido, tal como referido por outros autores para a PKC- β I (Riedel *et al.*, 1993a) e para a PKC- ϵ (Parissenti *et al.*, 1999). Acrescenta-se, por último, a dificuldade em estabelecer critérios para a quantificação das alterações morfológicas, de forma a estabelecer uma relação entre a concentração do activador e a resposta fenotípica.

No presente trabalho, as leveduras que expressavam uma das isoformas da PKC apresentaram uma inibição significativa do crescimento em presença dos activadores da PKC (quer do PMA, quer do ácido araquidónico), tendo sido possível estabelecer uma correlação entre a quantificação do fenótipo e a concentração do activador. Esta correlação observada confirmou resultados de estudos anteriores que demonstraram existir uma proporcionalidade entre o grau de inibição do crescimento e o grau de activação enzimática da isoforma da PKC

de mamífero expressa (Riedel *et al.*, 1993a,b; Shieh *et al.*, 1995), reflectindo, esse grau de inibição do crescimento, a potência dos activadores da PKC sobre a isoforma em estudo (Shieh *et al.*, 1995).

As razões anteriores, juntamente com a fácil quantificação desta resposta fenotípica (medição da densidade celular de culturas líquidas), justificaram a utilização da inibição do crescimento como parâmetro para quantificar a resposta das leveduras, que expressam as isoformas da PKC de mamífero, aos activadores da PKC.

Os valores absolutos de inibição do crescimento causado pela máxima concentração do activador da PKC usado (PMA; ácido araquidónico para a PKC- ζ), diferiram entre as isoformas da PKC expressas. Esta variação poderá dever-se a diferenças no grau de expressão conseguido para as várias isoformas da PKC. Pode dever-se, ainda, a diferenças no potencial catalítico das diferentes isoformas. Esta última possibilidade é apoiada por resultados obtidos *in vitro*, os quais mostraram que idênticas quantidades de diferentes isoformas da PKC, na presença da mesma concentração do activador, conduziam a diferentes graus de fosforilação do mesmo substrato (Ryves *et al.*, 1991; Kazanietz *et al.*, 1993).

De forma a evitar a influência dos diferentes valores absolutos na interpretação dos resultados, a inibição do crescimento causada pelo activador da PKC foi padronizada e, para cada isoforma, a inibição do crescimento causada pela máxima concentração testada do activador da PKC (PMA; ácido araquidónico para a PKC- ζ) foi considerada de 100 %. O efeito dos activadores da PKC foi, então, expresso em % desse efeito considerado como máximo para cada isoforma e os valores de EC_{50} , calculados a partir das respectivas curvas de concentração-resposta obtidas em experiências individuais, foram usados como um indicador da potência dos activadores na isoforma da PKC expressa.

O inibidor da PKC, queleritrina, quando testado isoladamente e na máxima concentração usada no ensaio, causou uma estimulação do crescimento das leveduras que expressavam as isoformas individuais da PKC de mamífero. Esta estimulação do crescimento não foi observada na ausência de expressão da PKC, o que indica não se tratar de um efeito mediado por proteínas nativas da levedura. Um efeito semelhante foi já referido para a briostatina 1 (descrito como um composto capaz de se comportar como um activador ou inibidor conforme a isoforma da PKC) em leveduras que expressavam a PKC- γ (Keenan *et al.*, 1997b). Este efeito foi explicado como resultante de um bloqueio da activação endógena da PKC expressa. No entanto, esta característica fenotípica revelou-se inadequada para ser usada como um indicador da potência de um inibidor da PKC, uma vez que sendo a

quelitrina um potente inibidor da PKC (Herbert *et al.*, 1990), apenas causou uma estimulação ligeira do crescimento. Por outro lado, se tal efeito resultar do bloqueio da activação endógena, este será sempre influenciado pela quantidade de mediadores endógenos existentes, o que poderá ser um factor difícil de controlar. Keenan e colaboradores (1997a,b) mostraram que os inibidores da PKC, em condições experimentais semelhantes às usadas no presente trabalho, eram capazes de reduzir a inibição do crescimento causada por um activador da PKC. Esta capacidade do ensaio para estudar inibidores da PKC foi demonstrada analisando o efeito de inibidores da PKC conhecidos (como o Gö 6976 e a rotlerina) na inibição do crescimento, causada pelo PMA, das leveduras que expressavam as isoformas individuais da PKC- γ ou - δ (Keenan *et al.*, 1997b). Este estudo confirmou um padrão de selectividade para estes compostos compatível com o proposto com base em ensaios *in vitro*.

No presente trabalho procurou-se obter um parâmetro que pudesse ser usado como indicador da potência do inibidor da PKC em antagonizar o efeito do activador da PKC. À semelhança do procedimento utilizado para quantificar a potência de antagonistas de receptores de membrana, procurou-se relacionar a potência do inibidor da PKC com a sua capacidade para deslocar a curva de concentração-resposta a um activador. O deslocamento da curva de concentração-resposta ao activador da PKC, causado pelo inibidor, foi calculado através das razões entre os EC_{50} obtidos a partir das curvas traçadas para o activador da PKC na presença e na ausência do inibidor. Uma vez que o inibidor da PKC, quando testado isoladamente, podia causar estimulação do crescimento das leveduras que expressavam as isoformas da PKC de mamífero, utilizou-se a concentração de inibidor que não causou uma estimulação significativa do crescimento. Procedendo-se desta forma, pretendeu-se evitar a influência da estimulação do crescimento no deslocamento da curva de concentração-resposta ao activador da PKC. Este critério foi seguido em todos os ensaios posteriores, em que se procurou caracterizar o efeito de inibidores conhecidos e de compostos potenciais inibidores da PKC. Procurou-se testar, sempre que possível, a mesma concentração de inibidor, para, desta forma, poder relacionar a potência com o grau de deslocamento causado.

Apesar das limitações resultantes de nem sempre ser possível obter curvas completas de concentração-resposta ao activador da PKC e de nem sempre o deslocamento da curva causado pelo inibidor da PKC ser paralelo, facto que poderá influenciar a quantificação do grau de deslocamento, esta abordagem parece ser adequada para avaliar a capacidade de um composto se comportar como inibidor da PKC, para estimar a sua potência e, desta forma,

para o comparar com outros inibidores e assim definir, para cada isoforma da PKC em estudo, qual ou quais os inibidores mais potentes ou selectivos.

Alguns dos inibidores da PKC testados estimularam o crescimento e reduziram o efeito dos activadores. No entanto, estes dois efeitos parecem ser independentes, não se tendo encontrado um paralelismo entre a potência de um composto para estimular o crescimento e para reduzir o efeito do activador da PKC. Por exemplo, a queleritrina foi capaz de bloquear o efeito dos activadores, mesmo numa concentração para a qual não causou uma estimulação significativa do crescimento.

Uma crítica que poderá ser levantada quanto à utilização das leveduras em estudos farmacológicos preditivos do efeito dos compostos em células de mamífero, diz respeito às condições de penetração de alguns compostos através da sua parede celular. No entanto, a diferença de respostas fenotípicas apresentadas pelas leveduras, na ausência e na presença da expressão da isoforma da PKC, constitui uma evidência de que os compostos foram capazes de alcançar a isoforma da PKC expressa pelas leveduras. Além disso, o facto do mesmo composto ter causado efeitos diferentes em leveduras semelhantes, que apenas diferiam na isoforma da PKC de mamífero que expressavam, é um argumento que retira valor a tais criticismos. Por outro lado, também nas células de mamífero, as diferenças na potência dos compostos poderão ser influenciadas pela capacidade destes atingirem os seus alvos intracelulares. Uma vez que este ensaio utiliza células eucariotas, os factores que influenciam o acesso dos compostos aos receptores intracelulares (PKC) serão mais próximos daqueles presentes nas células eucariotas mais complexas, do que os existentes nos ensaios *in vitro*. Desta forma, parece-nos que a potência dos compostos revelada neste modelo se aproximará daquela que será apresentada nas células de mamífero.

Em síntese, o presente trabalho permitiu obter um conjunto de células preparadas para expressar algumas das isoformas individuais da PKC representativas de três famílias distintas (cPKCs: α e β I; nPKCs: δ e η e aPKCs: ζ). Estas células permitirão pesquisar, de uma forma rápida, simples e económica, potenciais activadores e inibidores da PKC, podendo dar indicações quantitativas quanto à potência e selectividade desses compostos para as diversas isoformas da PKC em células de mamífero. Os métodos usados, desde a obtenção das estirpes transformadas até ao ensaio fenotípico das leveduras, foram optimizados, revelando-se adequados para posteriores trabalhos alargados a novas isoformas da PKC ou a outras proteínas de mamífero.

CAPÍTULO IV

ESTUDO DE ACTIVADORES DA PKC: ÉSTERES DE FORBOL

SARAIVA L., FRESCO P., PINTO E., GONÇALVES J. Comparison of the Potency of Phorbol Esters on Mammalian PKC- α , - β I, - δ , - η and - ζ . (Submetido para publicação na revista *Eur. J. Pharmacol.*, em Abril de 2003).

ABSTRACT

An alternative *in vivo* assay, based on growth inhibition of yeast expressing an individual mammalian protein kinase C (PKC) isoform, was used to compare the potency of phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and its analogues on classical (α and β I), novel (δ and η) and atypical (ζ) PKC isoforms. Effects of PMA, 4 α -PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate-4-O-methyl-ether (MPMA), phorbol-12-monomyristate (PMM), phorbol-12,13-diacetate (PDA), phorbol-13-monoacetate (PA), phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu), phorbol-12,13-didecanoate (PDD) and 12-deoxyphorbol-13-phenylacetate-20-acetate (dPPA), on growth of yeast expressing individual PKC isoforms was determined. PMA induced growth inhibition on all isoforms tested (except on PKC- ζ). PDD and PDBu presented an efficacy similar to PMA; the other PMA-analogues presented lower efficacies. On classical PKCs, MPMA and 4 α -PMA even stimulated yeast growth. On interaction experiments, MPMA and 4 α -PMA reduced the PMA-induced growth inhibition, an effect similar to that exhibited by the PKC inhibitors chelerythrine and NPC 15437. This study reveals that phorbol esters differ on their potency to activate a given PKC isoform and each phorbol ester may present some isoform-selectivity. Furthermore, some phorbol esters caused effects compatible with those expected from PKC inhibitors.

Keywords: Protein Kinase C, Isoforms, Phorbol Esters, Yeast Phenotypic assay.

INTRODUCTION

The ubiquitous enzyme, protein kinase C (PKC) is a serine-threonine kinase, grouped into three families according to their primary structure and cofactor requirements: the classical PKCs (cPKCs), which include the isoforms α , β I, β II and γ , require phospholipid, diacylglycerol (DAG) and calcium for activation; the novel PKCs (nPKCs), which include the isoforms δ , ϵ , η and θ , require phospholipid, DAG but not calcium; the atypical PKCs (aPKCs), which include the isoforms ζ and λ / ι , depend on phospholipid only but not on DAG or calcium (Musashi et al., 2000). More recently, a fourth group of structurally distinct PKCs has been identified, the so-called PKC-related kinases (PRKs; Webb et al., 2000).

A variety of cellular functions including growth, differentiation, tumor promotion and apoptosis are believed to be mediated by PKC isoforms (Musashi et al., 2000; Webb et al., 2000). However, the precise role of each isoform has been hampered by the lack of isoform-selective PKC ligands (Hofmann, 1997; Way et al., 2000).

Phorbol esters have been, for many years, the preferred pharmacological activators to study PKC (Kazanietz et al., 2000; Barry and Kazanietz, 2001). Phorbol esters bind to PKC at the C1 domain of the PKC regulatory region, that consists of a tandem repeat of cystein-rich motifs, which is not found in aPKCs (Burns and Bell, 1991). Phorbol esters may differ on their potency to activate cPKC and nPKC isoforms, as revealed by *in vitro* assays (Evans et al., 1991; Ryves et al., 1991). However, to date, characterization of their isoform-selectivity has been hampered by methodological limitations, such as the use of a limited range of concentrations (see Jeffrey and Liskamp, 1986) or of mammalian systems where several PKC isoforms are present (see, for instance, Shoyab and Todaro, 1980; Darbon et al., 1986; Huwiler et al., 1994; Iannazzo et al., 1999). Furthermore, phorbol esters can induce several biological activities that are mediated by cellular receptors other than PKC isoforms (Kazanietz et al., 2000; Ohno and Nishizuka, 2002). The *in vitro* assays tried to overcome these limitations (Ryves et al., 1991; Geiges et al., 1997), but their cost, the impossibility to study the isoform in a cellular environment, and to reproduce the interactions between PKC and other cellular constituents has been considered a limitation for the use of such assays (Webb et al., 2000).

Some difficulties to characterize PKC isoform-mediated selectivity of phorbol esters can be circumvented by using the *in vivo* yeast phenotypic assay. On this assay, PKC activators cause an inhibition of growth of yeast that express a mammalian PKC isoform (reflecting an increase in the cell doubling time), which is proportional to the degree of PKC

activation (Riedel et al., 1993a,b; Shieh et al., 1995; 1996); PKC inhibitors reduce the PKC activator induced growth inhibition and may cause, *per se*, stimulation of yeast growth (Keenan et al., 1997).

In the present study, the effects of nine phorbol esters (Fig. 1) on isoforms α and β I of the cPKC family, δ and η of the nPKC family and ζ the of aPKC family were compared using the yeast phenotypic assay. The phorbol esters tested differ on the substituents at C-4, C-12, C-13 or at C-20 of the phorbol skeleton, positions previously considered important for the activity of these compounds as PKC activators. Our results indicate that phorbol esters differ on their efficacy and potency towards the PKC isoforms assayed, and further confirm that some phorbol esters may cause effects compatible with those elicited by PKC inhibitors.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Yeast nitrogen base was from DIFCO (Merck Portugal, Lisboa, Portugal). Arachidonic acid sodium salt, chelerythrine chloride, NPC 15437 dihydrochloride (R-2,6-diamino-N-[[1-(1-oxotridecyl)-2-piperidinyl]methyl]-hexanamide dihydrochloride), phorbol-12,13-diacetate (PDA), phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu), phorbol-12,13-didecanoate (PDD), phorbol-12-monomyristate (PMM), phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), phorbol-12-myristate-13-acetate-4-O-methyl-ether (MPMA), phorbol-13-monoacetate (PA), 4 α -phorbol-12-myristate-13-acetate (4 α -PMA) were from SIGMA (Sigma Aldrich Química, Sintra, Portugal). 12-Deoxyphorbol-13-phenylacetate-20-acetate (dPPA) was from Biomol (Quimigranel, Madrid, Spain). All other chemicals used were of analytical grade.

Yeast Transformation and Cell Cultures

Constructed yeast expression plasmids YEp52 and YEp51, encoding cDNA for bovine PKC- α and for rat PKC- β I, respectively (kindly offered by Dr. Heimo Riedel, Wayne University, Detroit, USA) and YEplac181, encoding the cDNA for the rat PKC- δ , mouse PKC- η or PKC- ζ (kindly offered by Dr. Nigel Goode, Royal Veterinary College, London, UK) were amplified in *Escherichia coli* DH5 α and confirmed by restriction analysis. The plasmids used contain galactose-inducible transcriptional elements and the *leu2* gene for

selection. *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*; strain CG379; α *ade5 his7-2 leu2-112 trp1-289 α ura3-52 [Kil-O]*; Yeast Genetic Stock Center, University of California, Berkeley, USA) was transformed using the lithium acetate method (Ito et al., 1983). To ensure selection of transformed yeast, cells were grown in leucine-free medium, in 1.5% agar plates, at 30°C.

For the yeast phenotypic assay, transformed cells were incubated at 30°C in leucine free-medium, with slow shaking. The leucine free-medium contained 0.7% yeast nitrogen base, 2% glucose (w/v) or the indicated carbon source, amino acids, purines and pyrimidines, according to the transformed yeast requirements. Galactose (2%; w/v), instead of glucose, was included to induce transcription of the mammalian PKC gene.

Cell Lysis and Immunoblotting

Cell lysis was performed as previously described (Saraiva et al., 2002).

Yeast Phenotypic Assay

Transformed yeast cultures were routinely incubated in leucine free glucose medium. Optical density values, measured at 620 nm (OD₆₂₀; Cary 1E Varian spectrophotometer, Palo Alto, CA, USA), were used as indicator of growth. Transformed yeast were grown to an OD₆₂₀ of approximately 1, collected by centrifugation and diluted to an OD₆₂₀ of 0.05, in medium containing 2% (w/v) galactose (gene transcription-inducer) and 3% (v/v) glycerol (alternative carbon source). Diluted cultures (200 μ l) were transferred to 96-wells microtitre plates and incubated for up to 100 h (150 h in experiments carried out to obtain growth curves), with slow shaking at 30°C, either in the presence of drugs or solvent (0.1% DMSO; final concentration). Growth was monitored by determining the OD₆₂₀ using a plate reader (BioRad Benchmark Microplate Reader; Hercules, CA, USA). The difference between maximal OD₆₂₀ reached and that measured at the beginning of incubation was used as an index of yeast growth. Drugs or solvent were added at the beginning and kept throughout the incubation. Yeast growth in the presence of drugs was expressed as percentage of growth observed in parallel experiments in the presence of solvent; it was further transformed into growth inhibition by subtracting that value from 100. Therefore, 100% growth inhibition would occur when there was no growth during incubation; 0% growth inhibition would occur when growth in the presence of drugs was identical to that in the presence of solvent; a

negative growth inhibition occurred when growth in the presence of drugs was higher than in the presence of solvent and was taken as an indicator of drug-induced growth stimulation.

In experiments where drug potencies were compared, and because growth inhibition caused by a maximal concentration of phorbol esters varied between isoforms, 100% growth inhibition was standardized and assumed to be that caused by 10^{-5} M PMA on cPKCs and nPKCs. Since atypical PKC isoforms are not activated by phorbol esters (Ways et al., 1992; see also Fig. 2), the activator used was arachidonic acid (up to 10^{-5} M), an unsaturated fatty acid known to activate PKC- ζ (Nakanishi and Exton, 1992; see also Fig. 2). Effects of phorbol esters were expressed as percentage of that growth inhibition.

Chemical structures of the phorbol esters used are depicted in Fig. 1. They differ from PMA on the substituents at C-12 and C-13, except 4α -PMA, which is a stereoisomer of PMA having an α -oriented hydroxyl group at C-4, and MPMA, which differs from PMA by having a methoxyl group at C-4. dPPA has also an acetyl group at C-20, and was included because it has been described as a PKC- β I selective activator (Evans et al., 1991; Ryves et al., 1991).

To obtain concentration-response curves, each phorbol ester was tested in concentrations ranging from 10^{-13} to 10^{-5} M and the concentration that caused 50% of the maximal growth inhibition caused by 10^{-5} M PMA (arachidonic acid for PKC- ζ ; EC_{50}) was calculated. For those isoforms on which phorbol esters caused less than 50% growth inhibition, determination of EC_{50} was not feasible and EC_{50} values are referred as non determinable (ND).

For interaction experiments, MPMA, 4α -PMA, chelerythrine and NPC 15437 were tested alone and combined with 10^{-5} M PMA at the same concentration (10^{-5} M; 10^{-6} M for NPC 15437), on yeast expressing PKC- α , - β I, - δ or - η . Results are expressed as % of growth inhibition.

Statistical Analysis

Results are presented as arithmetic means $\pm$ S.E.M. and n represents the number of determinations. Differences between means were tested for significance using either paired Student's t test, unpaired Student's t test or one way ANOVA, followed by Tukey's *post-hoc* test. A P value lower than 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

Expression of mammalian PKC isoforms in S. cerevisiae

Plasmids containing the cDNA of PKC- α , - β I, - δ , - η or - ζ were amplified in *Escherichia coli* DH5 α and confirmed by restriction analysis. Plasmids were stably propagated in transformed *S. cerevisiae* (CG379) and selected in leucine-free medium. Transcription was routinely induced by 2% galactose.

To test whether PKC isoforms were faithfully expressed, protein extracts of transformed cells, grown in the presence or in the absence of the transcription inducer, were separated on SDS-polyacrylamide gels and analysed with specific antibodies in immunoblots. Expression of mammalian PKC isoforms was observed only in the presence of 2% galactose and resulted in a single antigenic band, which co-migrated with the respective recombinant protein (see Saraiva et al., 2002).

Effects of phorbol esters in yeast growth

Two hundred microlitre cultures were incubated with or without expression of PKC isoforms (2% galactose present or absent, respectively). The solvent used (0.1% DMSO; final concentration) did not change growth either in the presence or in the absence of 2% galactose.

Phorbol esters (as well as arachidonic acid) were tested in concentrations up to 10^{-5} M. Higher concentrations of phorbol esters were not possible to test due to their low solubility in the culture medium. In the absence of galactose, phorbol esters and arachidonic acid did not change yeast growth (not shown).

In preliminary experiments, growth curves for yeast expressing PKC- α , - β I, - δ , or - η (2% galactose present) were obtained in the presence of solvent, of 10^{-5} M phorbol esters (considered a standard activator for the classical and novel PKC isoforms) or of 10^{-5} M arachidonic acid (for yeast expressing PKC- ζ). In the obtained curves, logarithmic and stationary phases were identified for each isoform. Effects of drugs on yeast growth were monitored along the experiment to determine the period of time during which maximal growth inhibition was reached and remained fairly constant ("steady-state growth inhibition"). Estimation of drug effects was based on OD₆₂₀ measured at fixed time points, that occurred during the respective logarithmic phase and where a "steady-state growth inhibition" was reached. For yeast expressing the cPKC isoforms (α or β I) estimation of drug

effects was based on OD₆₂₀ measurements at 65 h. For yeast expressing the nPKC isoforms (δ or η) estimation of drug effects was based on OD₆₂₀ measurements at 45 h. For yeast expressing PKC- ζ estimation of drug effects was based on OD₆₂₀ measurements at 45 h.

Values of growth inhibition caused by 10^{-5} M PMA (arachidonic acid for PKC- ζ), on yeast expressing an individual PKC isoform are presented in Table 1 and were assumed to correspond to 100% growth inhibition. Effects of drugs were expressed as percentage of that growth inhibition value.

According to the maximal growth inhibition caused, phorbol esters tested can be grouped into 3 groups. A first group, composed by PMA, PDD and PDBu, caused a significant growth inhibition on all PKC isoforms tested. In general, the maximal growth inhibition caused by PMA was higher on yeast expressing cPKCs than on yeast expressing the nPKC isoforms. PDD and PDBu caused maximal effects similar to those caused by PMA on all the responsive isoforms (Fig. 3). A second group, composed by PA, PDA, PMM and dPPA, showed to be inactive or much less active than PMA on PKC isoforms tested, causing a maximal growth inhibition smaller than that of PMA. However, on some isoforms growth inhibition elicited by these compounds was higher than 50%, allowing estimation of EC₅₀ values (Fig. 3). The third group, comprises MPMA and 4 α -PMA, which even at the maximal concentration tested (10^{-5} M), were unable to reach 50% growth inhibition on any of the isoforms tested (Fig. 4). On yeast expressing the cPKCs, these compounds even caused a marked growth stimulation (Fig. 4). Since stimulation of yeast growth was not observed in the absence of PKC expression, it was assumed to be an effect mediated by the PKC isoform expressed.

Table 2 shows EC₅₀ values for phorbol esters on each of the PKC isoforms tested. According to the respective EC₅₀ values, the rank order of potency obtained for the indicated phorbol ester was: for PMA, $\eta > \alpha > \beta I > \delta$; for PDD, $\eta = \alpha = \delta = \beta I$; for PDBu, $\eta > \beta I > \alpha = \delta$; PDA and PMM showed to be active only on the nPKC isoforms ($\delta > \eta$); dPPA activated βI and the η isoforms ($\eta > \beta I$), whereas PA was active only on the η isoform. For the indicated PKC isoform, phorbol esters can be ranked as following: for the α isoform, PDD > PMA > PDBu; for the βI isoform, PDD > PMA > PDBu > dPPA; for the δ isoform, PDD > PMA > PDA = PMM > PDBu; for the η isoform, PMA > PA = PDBu > PDD > dPPA > PMM = PDA (for definition of the rank order of potency, the signal > was applied only when the EC₅₀ value of the compound placed at the left was significantly higher than the EC₅₀ placed at the right of

the signal; otherwise = was applied; $P < 0.05$; unpaired Student's t test). On PKC- ζ all the phorbol esters were inactive (see Fig. 2).

Interaction experiments

The possibility that the inactive phorbol esters, MPMA and 4 α -PMA, could interfere with the effects of PMA was examined in this series of experiments. Results are expressed as percentage of growth inhibition (not standardized to the maximal effect caused by PMA). As before, 10^{-5} M PMA caused a more marked growth inhibition on yeast expressing cPKCs than on yeast expressing nPKCs (compare black columns of Fig. 4 with values in Table 1). MPMA and 4 α -PMA were tested at the single concentration of 10^{-5} M, in the absence or in the presence of 10^{-5} M PMA. Results of such interactions on yeast expressing PKC- α , - β I, - δ or - η are shown in Fig. 4.

In the absence of PMA, MPMA and 4 α -PMA stimulated growth of yeast expressing PKC- α or - β I (an effect more pronounced for MPMA). In the presence of 10^{-5} M PMA, these compounds reduced the PMA-induced growth inhibition on all the isoforms tested (Fig. 4). Since this effect also occurred on yeast expressing PKC- δ or - η , where MPMA and 4 α -PMA when tested alone practically did not influence yeast growth, the reduction of the PMA effect cannot be explained simply by a balance between the PMA-induced growth inhibition and the growth stimulation induced by the analogue.

On the yeast phenotypic assay, PKC inhibitors reduce the PKC activator-induced growth inhibition and may cause also, *per se*, a stimulation of yeast growth (Keenan et al., 1997; Saraiva et al., 2003). Therefore, effects of MPMA and 4 α -PMA were compared to those exhibited by two known PKC inhibitors, chelerythrine (Herbert et al., 1990) and NPC 15437 (Petros et al., 1991; Sullivan et al., 1991; 1992). Effects of chelerythrine (10^{-5} M) and NPC 15437 (10^{-6} M; an higher concentration interfered with yeast growth in the absence of PKC expression) on the yeast growth, in the absence and in the presence of 10^{-5} M PMA, are presented in Fig. 5. Like MPMA and 4 α -PMA, NPC 15437, when tested alone, also caused a marked stimulation of yeast growth and, like MPMA and 4 α -PMA, both chelerythrine and NPC 15437 reduced the PMA-induced growth inhibition.

DISCUSSION

In the present study the mammalian PKC- α , - β I, - δ , - η , or - ζ were expressed in the same strain of *S. cerevisiae* and the transformed yeast used to characterize, in detail and *in vivo*, the effects of a group of structurally close phorbol esters on each of these PKC isoforms. In *S. cerevisiae*, a PKC-related protein is also present but did not respond to phorbol esters, as predicted (Ogita et al., 1990; Iwai et al., 1992). Growth inhibition induced by phorbol esters, that occurred only when the mammalian PKC isoform was expressed, was assumed to reflect its activation as previously described (Riedel et al., 1993a,b; Shieh et al., 1995; 1996). Under these conditions, the main methodological limitation of the *in vivo* assays (co-existence of several PKC isoforms) was circumvented and the comparison of the potency of phorbol esters on each of the PKC isoforms expressed was possible.

PMA was used as a standard PKC activator. In the present study, PMA activated cPKCs and nPKCs but not aPKCs, as observed previously in yeast expressing mammalian PKC isoforms (α : Shieh et al., 1995; β I: Riedel et al., 1993; γ , δ , η and ζ : Goode et al., 1994; ϵ : Parissenti et al., 1999). According to the EC₅₀ values PMA seems to be much more potent on PKC- η than on PKC- α , - β I and - δ .

PDD and PDBu are two other phorbol esters frequently used as PKC activators. Like PMA, they activated the cPKCs and nPKCs tested and presented an efficacy similar to that of PMA, *i.e.*, the maximal response they caused was similar to that caused by 10⁻⁵ M PMA. When compared to PMA, PDD showed a similar potency on all isoforms tested, suggesting that PDD may be a prototype of a potent and non isoform-selective PKC activator. PDBu was less potent than PMA on all the responsive isoforms and, like PMA, presented its highest potency on PKC- η . By similitude with the concepts of full and partial agonists applicable to ligands for membrane-receptors (Kenakin, 1993), these PKC activators could be called "full activators".

The position of PMA and PDBu in the rank order of potency differs from their position in the rank order of affinity for PKC- α , - β I and - δ reported in binding studies (Dimitrijevic et al., 1995). Although binding data indicated a lower affinity for PKC- β I than for PKC- δ (Dimitrijevic et al., 1995), we found that PMA was more potent on PKC- β I than on PKC- δ . Furthermore, PDBu was more potent on PKC- β I than on PKC- α or - δ , whereas binding data showed that PDBu has a lower affinity for PKC- β I than for PKC- α or - δ (Dimitrijevic et al., 1995). The observed differences on the rank order of potency and affinity

may have a molecular basis. Studies carried out in yeast expressing deletion mutants of mammalian PKC- α showed that the lack of certain aminoacids led to loss of activity without changing the affinity of ligands, leading to the conclusion that "...the binding of an activator to a specific PKC sequence may not necessarily reflect its role in the regulation of the PKC enzymatic activity." (Shieh et al., 1995). Therefore, a pharmacologic property like intrinsic activity (see Kenakin, 1993) may also be determinant for the activity of PKC ligands.

Affinity of PA, PDA, PMM and dPPA to PKC has been previously reported: [^3H]-PDBu binding was decreased by PA (mouse skin: Delclos et al., 1980; mouse brain: Dunphy et al., 1980), by PDA (mouse skin: Delclos et al., 1980; mouse brain: Dunphy et al., 1980), by PMM (rat brain: Nidel et al., 1983) and by dPPA (Dimitrijevic et al., 1995). In the present study PA, PDA, PMM and dPPA caused, on the responsive isoforms, a response lower than the maximal response caused by the "full activators", probably because they have a lower "intrinsic activity" and therefore, they may be called as "partial activators". Among them, PA presented an high potency on PKC- η , whereas PDA and PMM showed to be selective for nPKCs, particularly for PKC- δ .

Previous *in vitro* studies suggested that dPPA is a selective PKC- βI activator (Evans et al., 1991; Ryves et al., 1991). This putative selectivity has been questioned by an *in vivo* study, which reported that dPPA also activates PKC- α and - δ (Das et al., 1998). The present study also argues against the selectivity of dPPA for PKC- βI , because it activated PKC- η with an higher potency than PKC- βI . However, in contrast to Das and coworkers (1998), we found no evidence that dPPA activates PKC- α and - δ . Our observation is in agreement with the low affinity presented by dPPA for these isoforms (Dimitrijevic et al., 1995).

According to molecular modeling studies, the presence of a lipophilic domain at C-12 and/or at C-13 positions of the phorbol skeleton is considered a requirement for PKC activation (Jeffrey and Liskamp, 1986; Wender et al., 1988). This prediction was largely confirmed in binding studies (Delclos et al., 1980; Dunphy et al., 1980; Dimitrijevic et al., 1995). The present study provides functional data supporting these predictions: the "full activators" have the largest substituents at C-12 and at C-13 of the phorbol esters tested whereas the lower efficacy of the "partial activators" may be related to their smaller substituents. Our results also suggest that the reduction of the size of the lipophilic substituent decreases the potency of phorbol esters, more markedly on cPKC isoforms than on nPKC isoforms. The importance of an acetyl group at C-20 (like in dPPA) to obtain a selective activation of PKC- βI (Dimitrijevic et al., 1995) is not supported by the present results.

Molecular modeling studies also indicated that the presence of a methoxyl group at C-4 (like in MPMA) or of an α -oriented group (like in 4 α -PMA) causes loss of activity of the compounds as PKC activators (Jeffrey and Liskamp, 1986; Wender et al., 1988). We further observed that MPMA and 4 α -PMA failed to inhibit growth of yeast expressing individual cPKCs and nPKCs and reduced the effect of the PKC activator, PMA.

These effects of MPMA and 4 α -PMA were similar to those caused by the two well known PKC inhibitors, chelerythrine (Herbert et al., 1990) and NPC 15437 (Petros et al., 1991; Sullivan et al., 1991; 1992), what suggest that MPMA and 4 α -PMA are acting like PKC inhibitors. A putative action of MPMA as PKC inhibitor may explain previous works that showed that, although MPMA was an inactive tumor promoter, it was able to inhibit the PMA-induced tumor promotion (Slaga et al., 1980). Therefore, MPMA should not be considered an inactive phorbol ester, because by preventing effects of PKC activators it may influence a biological system. Considering the possibility that MPMA may also exert biological effects, the present study gives further support to the doubts concerning the use of MPMA as a negative control (Fürstenberger et al., 1982). The same may also holds true for 4 α -PMA.

In conclusion, the present work shows *in vivo* and in a system where a single mammalian PKC isoform is expressed, that structurally close phorbol esters may differ on their efficacy and potency to activate individual PKC isoforms. It also presents functional data that can help to clarify the structure-activity relationships and to develop a pharmacophore for PKC activators. Furthermore, it shows that some phorbol esters may cause PKC-mediated effects similar to those exhibited by a PKC inhibitor.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT; I&D n° 226/94), POCTI (QCA III) and FEDER. L. Saraiva was a recipient of a PhD grant from FCT (PRAXIS XXI/BD/18048/98).

REFERENCES

- Barry, O.P., Kazanietz, M.G., 2001. Protein kinase C isozymes, novel phorbol ester receptors and cancer chemotherapy. *Curr. Pharm. Des.* 7, 1725-1744.
- Burns, D.J., Bell, R.M., 1991. Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *J. Biol. Chem.* 266,18330-18338.
- Darbon, J.-M., Valette, A., Bayard, F., 1986. Phorbol esters inhibit the proliferation of MCF-7 cells. *Biochem. Pharmacol.* 35, 2683-2686.
- Das, K.C., Guo, X.-L., White, C.W., 1998. Protein kinase C δ -dependent induction of manganese superoxide dismutase gene expression by microtubule-active anticancer drugs. *J. Biol. Chem.* 273, 34639-34645.
- Delclos, K.B., Nagle, D.S., Blumberg, P.M., 1980. Specific binding of phorbol ester tumor promoters to mouse skin. *Cell* 19, 1025-1032.
- Dimitrijevic, S.M., Ryves, W.J., Parker, P.J., Evans, F.J., 1995. Characterization of phorbol ester binding to protein kinase C isotypes. *Mol. Pharmacol.* 48, 259-267.
- Dunphy, W.G., Delclos, K.B., Blumberg, P.M., 1980. Characterization of specific binding of [^{3} H]phorbol 12,13-dibutyrate and [^{3} H]phorbol 12-myristate 13-acetate to mouse brain. *Cancer Res.* 40, 3635-3641.
- Evans, F.J., Parker, P.J., Olivier, A.R., Thomas, S., Ryves, W.J., Evans, A.T., Gordge, P., Sharma, P., 1991. Phorbol ester activation of the isotypes of protein kinase C from bovine and rat brain. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 397-402.
- Fürstenberger, G., Richter, H., Argyris, T.S., Marks, F., 1982. Effects of the phorbol ester 4-O-methyl-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse skin in vivo: evidence for its uselessness as a negative control compound in studies on the biological effects on phorbol ester tumor promoters. *Cancer Res.* 42, 342-348.
- Geiges, D., Meyer, T., Marte, B., Vanek, M., Weissgerber, G., Stabel, S., Pfeilschifter, J., Fabbro, D., Huwiler, A., 1997. Activation of protein kinase C subtypes α , γ , δ , ζ , ϵ and

η by tumor-promoting and nontumor-promoting agents. *Biochem. Pharmacol.* 53, 865-875.

Goode, N.T., Hajibagheri, M.A.N., Warren, G., Parker, P.J., 1994. Expression of mammalian protein kinase C in *Schizosaccharomyces pombe*: isotype-specific induction of growth arrest, vesicle formation, and endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 5, 907-920.

Herbert, J.M., Augereau, J.M., Gleye, J., Maffrand, J.P., 1990. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 993-999.

Hofmann, J., 1997. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J.* 11, 649-669.

Huwiler, A., Fabbro, D., Pfeilschifter, J., 1994. Comparison of different tumor promoters and bryostatin 1 on protein kinase C activation and down-regulation in rat renal mesangial cells. *Biochem. Pharmacol.* 48, 689-700.

Iannazzo, L., Kotsonis, P., Majewski, H., 1999. The structural requirements for phorbol esters to enhance serotonin and acetylcholine release from rat brain cortex. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1177-1189.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A., 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.

Iwai, T., Fujisawa, N., Ogita, K., Kikkawa, U., 1992. Catalytic properties of yeast protein kinase C: difference between the yeast and mammalian enzymes. *J. Biochem.* 112, 7-10.

Jeffrey, A.M., Liskamp, R.M.J., 1986. Computer-assisted molecular modeling of tumor promoters: Rationale for the activity of phorbol esters, teleocidin B, and aplysiatoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 241-245.

Kazanietz, M.G., Caloca, M.J., Eroles, P., Fujii, T., Garcia-Bermejo, M.L., Reilly, M., Wang, H., 2000. Pharmacology of the receptors for the phorbol ester tumor promoters: multiple receptors with different biochemical properties. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1417-1424.

Keenan, C., Goode, N., Pears, C., 1997. Isoform specificity of activators and inhibitors of protein kinase C γ and δ . *FEBS Lett.* 415, 101-108.

- Kenakin, T., 1993. Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction, second ed. Raven Press, New York, NY.
- Musashi, M., Ota, S., Shiroshita, N., 2000. The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int. J. Hematol.* 72, 12-19.
- Nakanishi, H., Exton, J.H., 1992. Purification and characterization of the ζ isoform of protein kinase C from bovine kidney. *J. Biol. Chem.* 267, 16347-16354.
- Niedel, J.E., Kuhn, L.J., Vandenbark, G.R., 1983. Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 36-40.
- Ogita, K., Miyamoto, S.-I., Koide, H., Iwai, T., Oka, M., Ando, K., Kishimoto, A., Ikeda, K., Fukami, Y., Nishizuka, Y., 1990. Protein kinase C in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison with the mammalian enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5011-5015.
- Ohno, S., Nishizuka, Y., 2002. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J. Biochem.* 132, 509-511.
- Parissenti, A.M., Villeneuve, D., Kirwan-Rhude, A., Busch, D., 1999. Carbon source-dependent regulation of cell growth by murine protein kinase C ϵ expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Physiol.* 178, 216-226.
- Petros, A.M., Gampe, R.T. Jr., Gemmecker, G., Neri, P., Holzman, T.F., Edalji, R., Hochlowski, J., Jackson, M., McAlpine, J., Luly, J.R., Pratt, P.-M.S., Fesik, S.W., 1991. Substituted 2-(aminomethyl)piperidines: a novel class of selective protein kinase C inhibitors. *J. Med. Chem.* 34, 2928-2931.
- Riedel, H., Hansen, H., Parissenti, A.M., Su, L., Shieh, H.-L., Zhu, J., 1993a. Phorbol ester activation of functional rat protein kinase C β -1 causes phenotype in yeast. *J. Cell. Biochem.* 52, 320-329.
- Riedel, H., Parissenti, A.M., Hansen, H., Su, L., Shieh, H.-L., 1993b. Stimulation of calcium uptake in *Saccharomyces cerevisiae* by bovine protein kinase C α . *J. Biol. Chem.* 268, 3456-3462.

- Ryves, W.J., Evans, A.T., Olivier, A.R., Parker, P.J., Evans, F.J., 1991. Activation of the PKC-isotypes α , β_1 , γ , δ , and ϵ by phorbol esters of different biological activities. *FEBS Lett.* 288, 5-9.
- Saraiva, L., Fresco, P., Pinto, E., Sousa, E., Pinto, M., Gonçalves, J., 2002. Synthesis and *in vivo* modulatory activity of protein kinase C of xanthone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 10, 3219-3227.
- Saraiva, L., Fresco, P., Pinto, E., Sousa, E., Pinto, M., Gonçalves, J., 2003. Inhibition of α , β_1 , δ , η and ζ Protein Kinase C Isoforms by Xanthonolignoids. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* (*In press*).
- Shieh, H.-L., Hansen, H., Zhu, J., Riedel, H., 1995. Differential protein kinase C ligand regulation detected *in vivo* by a phenotypic yeast assay. *Mol. Carcinog.* 12, 166-176.
- Shieh, H.-L., Hansen, H., Zhu, J., Riedel, H., 1996. Activation of conventional mammalian protein kinase C isoforms expressed in budding yeast modulates the cell doubling time - a potential *in vivo* screen for protein kinase C activators. *Cancer Detect. Prev.* 20, 576-589.
- Shoyab, M., Todaro, G.J., 1980. Specific high affinity cell membrane receptors for biologically active phorbol and ingenol esters. *Nature (Lond)* 288, 451-455.
- Slaga, T.J., Fischer, S.M., Nelson, K., Gleason, G.L., 1980. Studies on the mechanism of skin tumor promotion: evidence for several stages in promotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3659-3663.
- Sullivan, J.P., Connor, J.R., Shearer, B.G., Burch, R.M., 1991. 2,6-Diamino-N-([1-oxotridecyl]-2-piperidinyl)methyl)hexanamide (NPC 15437): a selective inhibitor of protein kinase C. *Agents Actions* 34, 142-144.
- Sullivan, J.P., Connor, J.R., Shearer, B.G., Burch, R.M., 1992. 2,6-Diamino-N-([1-(1-oxotridecyl)-2-piperidinyl] methyl)hexanamide (NPC 15437): a novel inhibitor of protein kinase C interacting at the regulatory domain. *Mol. Pharmacol.* 41, 38-44.
- Way, K.J., Chou, E., King, G.L., 2000. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *TiPS* 21, 181-187.

Ways, D.K., Cook, P.P., Webster, C., Parker, P.J., 1992. Effect of phorbol esters on protein kinase C- ζ . *J. Biol. Chem.* 267, 4799-4805.

Webb, B.L.J., Hirst, S.J., Giembycz, M.A., 2000. Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1433-1452.

Wender, P.A., Cribbs, C.M., Koehler, K.F., Sharkey, N.A., Herald, C.L., Kamano, Y., Pettit, G.R., Blumberg, P.M., 1988. Modeling of the bryostatins to the phorbol ester pharmacophore on protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7197-7201.

Table 1. Yeast growth inhibition caused by PMA on the PKC isoforms studied.

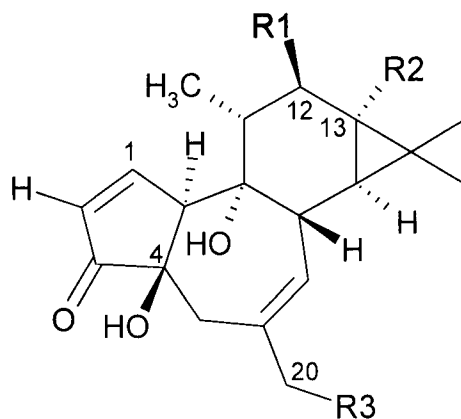
PKC isoforms	Growth inhibition caused by 10 ⁻⁵ M PMA (% of control)
α	40.6 $\pm$ 1.9 (<i>n</i> = 36)
β I	36.1 $\pm$ 1.1 (<i>n</i> = 56)
δ	26.6 $\pm$ 0.6 (<i>n</i> = 52)
η	21.3 $\pm$ 0.7 (<i>n</i> = 52)
ζ	0.2 $\pm$ 1.4 (<i>n</i> = 36) ^a

^a Growth inhibition caused by 10⁻⁵ M arachidonic acid was 23.9 $\pm$ 0.7 (*n* = 56). Growth in the presence of solvent was considered to be 0 % growth inhibition (100 % growth; see Experimental for details). Each value represents the mean $\pm$ SEM of the indicated *n* determinations.

Table 2. EC₅₀ values of phorbol esters on individual PKC isoforms studied.

Phorbol ester	EC ₅₀ (nM)				
	PKC-α	PKC-βI	PKC-δ	PKC-η	PKC-ζ ^a
PMA	112 ± 18 [#]	243 ± 69 [#]	574 ± 37 [#]	0.1 ± 0.01	ND
PDD	42 ± 4	67 ± 16	51 ± 10 [*]	32 ± 2 [*]	ND
PDBu	2740 ± 372 ^{*#}	1040 ± 107 ^{*#}	3530 ± 178 ^{*#}	8 ± 3	ND
PA	ND	ND	ND	6 ± 1	ND
PDA	ND	ND	1190 ± 97 ^{*#}	7400 ± 768 [*]	ND
PMM	ND	ND	1290 ± 212 ^{*#}	5230 ± 1101 [*]	ND
dPPA	ND	3440 ± 929 ^{*#}	ND	438 ± 59 [*]	ND

The EC₅₀ values were considered the concentration of PKC activator that caused 50% of the growth inhibition caused by 10⁻⁵ M PMA (arachidonic acid for PKC-ζ). Phorbol esters were tested in a concentration range of 10⁻¹³ - 10⁻⁵ M. Shown are means ± S.E.M. of 20 determinations. ND: non determinable (when the maximal response reached was lower than 50% growth inhibition). Significant differences: from PMA, ^{*}*P* < 0.05; from PKC-η, [#]*P* < 0.05 (one way ANOVA, followed by Tukey's *post-hoc* test). ^aOn yeast expressing PKC-ζ, arachidonic acid caused a concentration-dependent growth inhibition with an EC₅₀ of 205 ± 33 nM (*n* = 20).



	R1	R2	R3
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	$-\text{OCO}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$	$-\text{OCOCH}_3$	$-\text{OH}$
4 α -Phorbol 12-myristate 13-acetate (4 α -PMA) ^a	$-\text{OCO}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$	$-\text{OCOCH}_3$	$-\text{OH}$
Phorbol 12-myristate 13-acetate 4-O-methyl ether (MPMA) ^b	$-\text{OCO}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$	$-\text{OCOCH}_3$	$-\text{OH}$
Phorbol 12,13-didecanoate (PDD)	$-\text{OCO}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$	$-\text{OCO}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$	$-\text{OH}$
Phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu)	$-\text{OCO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	$-\text{OCO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	$-\text{OH}$
Phorbol 13-monoacetate (PA)	$-\text{OH}$	$-\text{OCOCH}_3$	$-\text{OH}$
Phorbol 12,13-diacetate (PDA)	$-\text{OCOCH}_3$	$-\text{OCOCH}_3$	$-\text{OH}$
Phorbol 12-monomyristate (PMM)	$-\text{OCO}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$	$-\text{OH}$	$-\text{OH}$
12-Deoxyphorbol 13-phenylacetate 20-acetate (dPPA)	$-\text{H}$	$-\text{OCOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	$-\text{OCOCH}_3$

Figure 1. Chemical structures of the phorbol esters tested; ^a 4 α -PMA is a stereoisomer of PMA having an α -oriented hydroxyl group at C-4; ^b MPMA differs from PMA by having a methoxyl group at C-4.

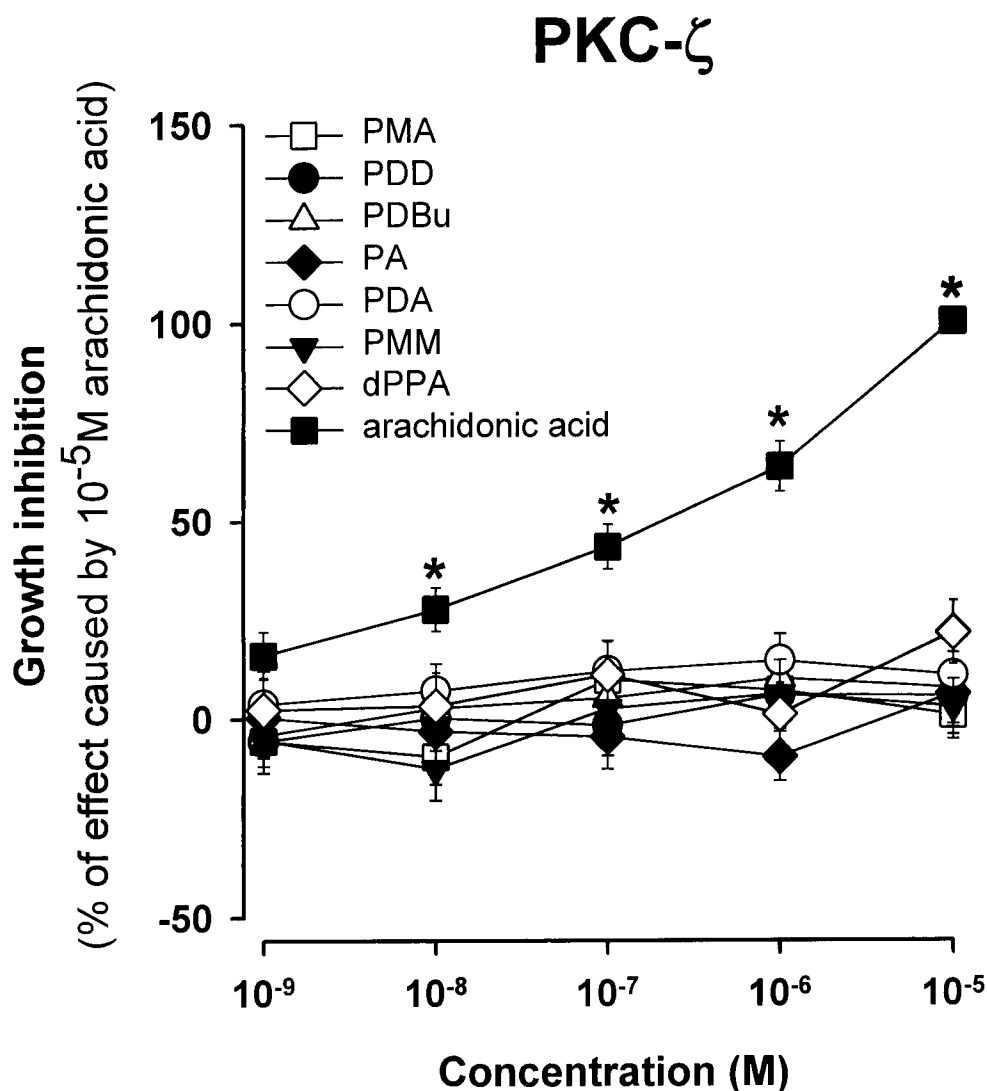


Figure 2. Concentration-response curves for the effects of phorbol esters and arachidonic acid on the growth of yeast expressing the atypical mammalian PKC- ζ . Transformed yeast were incubated with drugs or solvent (0.1% DMSO) and the effects measured at 45 h incubation. Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10⁻⁵ M arachidonic acid; 100% growth inhibition was considered that caused by 10⁻⁵ M arachidonic acid; 0% growth inhibition was considered to occur when growth in the presence of drugs was identical to that in the presence of solvent; negative growth inhibition was considered to occur when growth in the presence of drugs was higher than that in the presence of solvent and was taken to indicate growth stimulation. Shown are means $\pm$ S.E.M. of 16 - 36 determinations. Significant differences from control: * P < 0.05 (paired Student's t test).

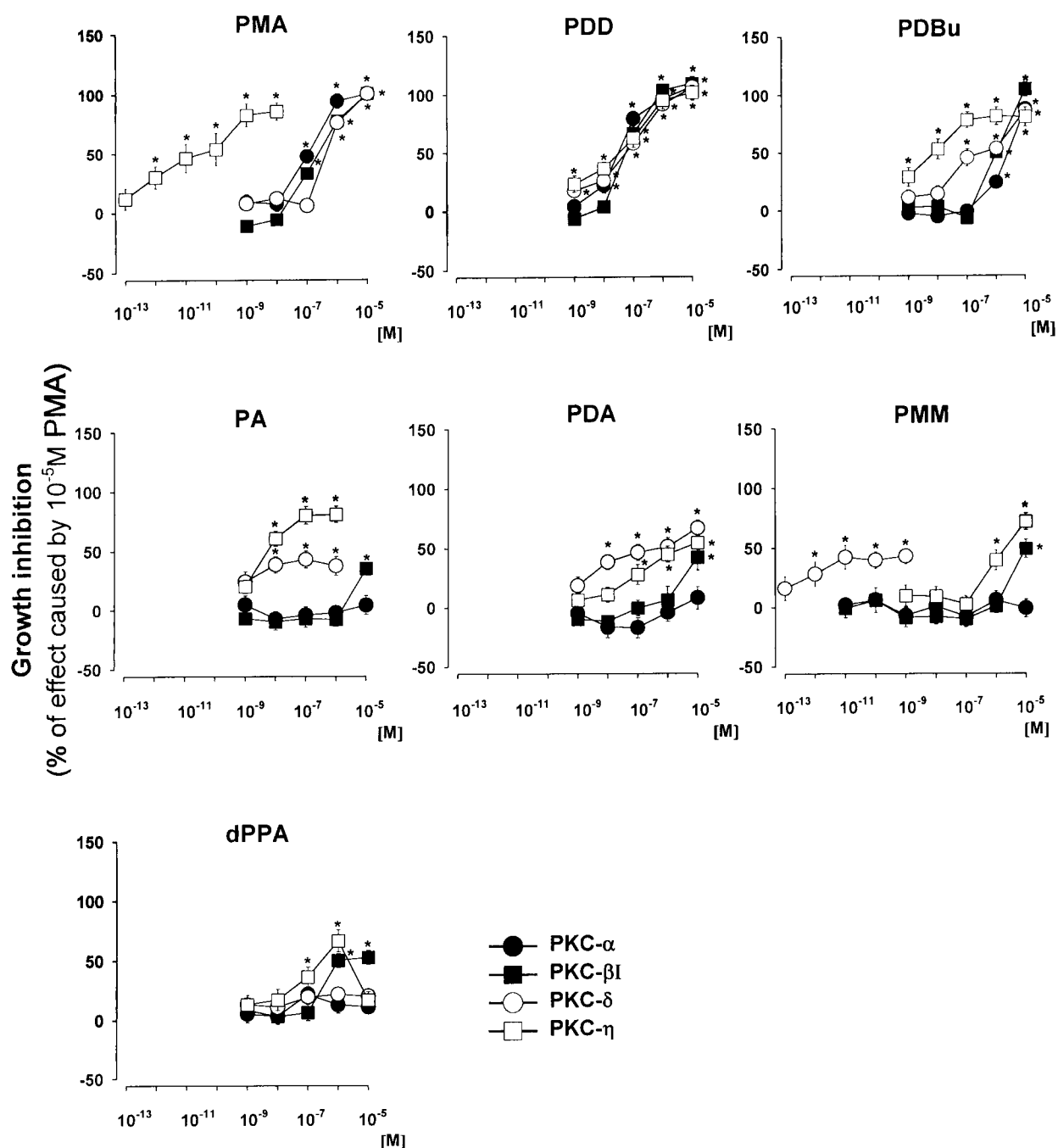


Figure 3. Concentration-response curves for the effects of phorbol esters on the growth of yeast expressing the indicated mammalian PKC isoforms (α , β I, δ or η). Transformed yeast cells were incubated with phorbol esters or solvent (0.1% DMSO) and effects measured at 65 h (for cPKCs; α and β I) or at 45 h (for nPKCs; δ and η) incubation. Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10⁻⁵ M PMA; 100% growth inhibition was considered that caused by 10⁻⁵ M PMA; 0% growth inhibition was considered to occur when growth in the presence of drugs was identical to that in the presence of solvent; negative growth inhibition was considered to occur when growth in the presence of drugs was higher than that in the presence of solvent and was taken to indicate growth stimulation. Shown are means $\pm$ S.E.M. of 20 - 56 determinations. Yeast growth significant different from solvent: * P < 0.05 (paired Student's t test).

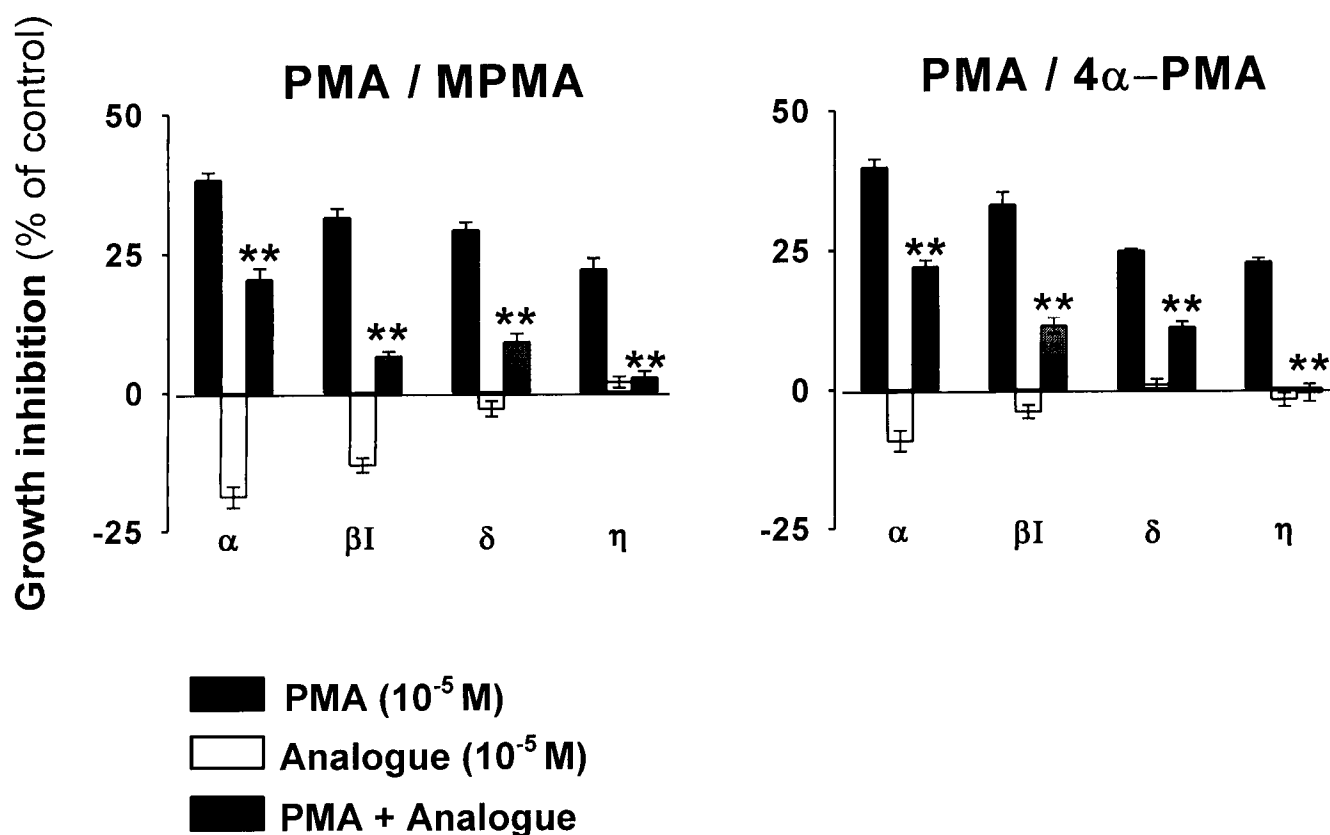


Figure 4. Interaction experiments: effects of PMA-analogues, MPMA and 4α-PMA, on the PMA-induced growth inhibition of yeast expressing mammalian PKC-α, -βI, -δ or -η. Yeast cells expressing the indicated PKC isoform were incubated with phorbol esters or solvent (0.1% DMSO) and growth was measured at 65 h (for cPKCs; α and βI) or at 45 h (for nPKCs; δ and η) incubation. PMA-analogues were tested alone and combined with PMA at the same concentration (10⁻⁵ M). Results are expressed as % of growth inhibition; 100% growth inhibition occurred when there was no increase on yeast growth during incubation; 0% growth inhibition was considered to occur when growth in the presence of drugs was identical to that in the presence of solvent; negative growth inhibition was considered to occur when growth in the presence of drugs was higher than that in the presence of solvent and was taken to indicate growth stimulation. Shown are means ± S.E.M. of 16 - 48 determinations. Significant differences from 10⁻⁵ M PMA alone: ***P* < 0.01 (unpaired Student's *t* test).

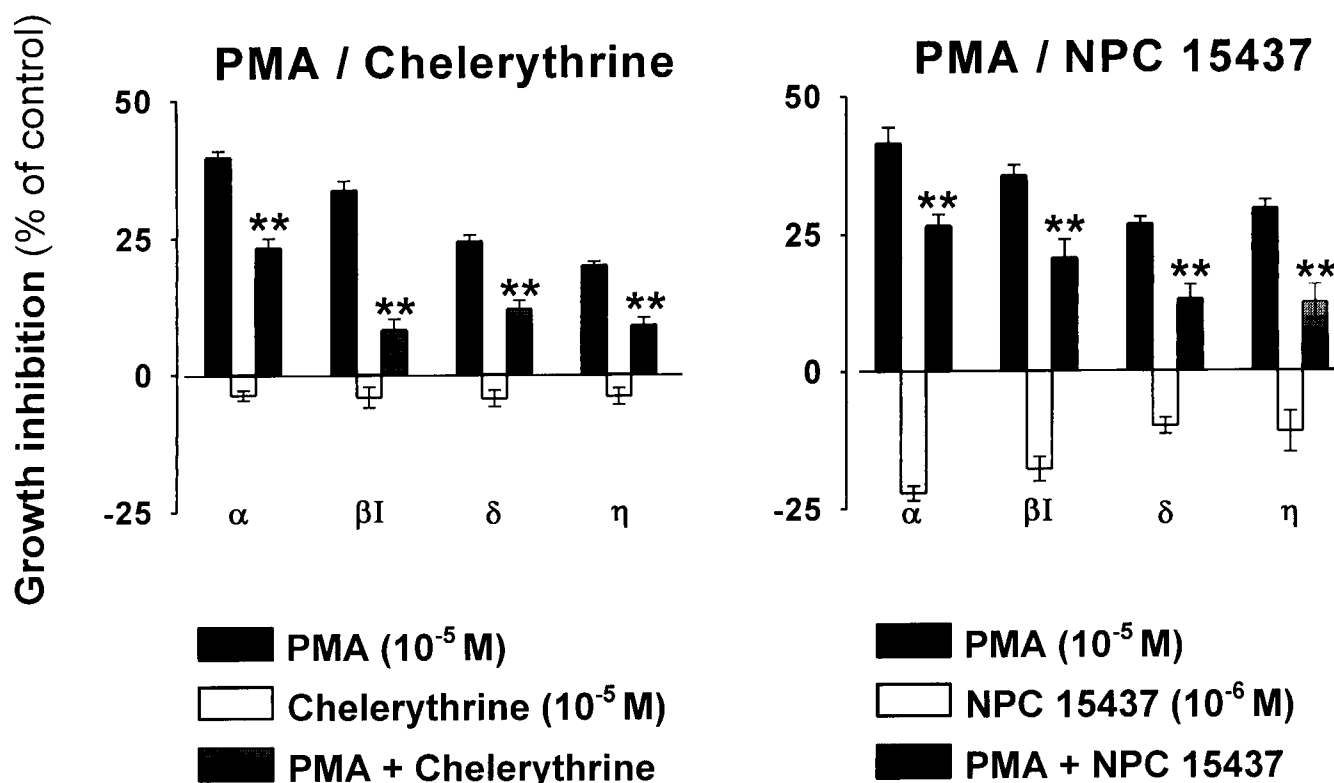


Figure 5. Interaction experiments: effects of PKC inhibitors, chelerythrine and NPC 15437, on the PMA-induced growth inhibition of yeast expressing mammalian PKC- α , - β I, - δ or - η . Yeast cells expressing the indicated PKC isoform were incubated with compounds or solvent (0.1% DMSO) and growth was measured at 65 h (for cPKCs; α and β I) or at 45 h (for nPKCs; δ and η) incubation. Chelerythrine (10⁻⁵ M) or NPC 15437 (10⁻⁶ M) were tested alone and combined with PMA (10⁻⁵ M). Results are expressed as % of growth inhibition; 100% growth inhibition occurred when there was no increase on yeast growth during incubation; 0% growth inhibition was considered to occur when growth in the presence of drugs was identical to that in the presence of solvent; negative growth inhibition was considered to occur when growth in the presence of drugs was higher than that in the presence of solvent and was taken to indicate growth stimulation. Shown are means $\pm$ S.E.M. of 16 - 20 determinations. Significant differences from 10⁻⁵ M PMA alone: ** $P < 0.01$ (unpaired Student's t test).

CAPÍTULO V

ESTUDO DE INIBIDORES DA PKC

SARAIVA L., FRESCO P., PINTO E., GONÇALVES J. Isoform-Selectivity of PKC Inhibitors Acting at the Regulatory and Catalytic Domain of Mammalian PKC- α , - β I, - δ , - η and - ζ . (Submetido para publicação na revista *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, em Março de 2003).

ABSTRACT

The aim of the present study was to compare the potency of a series of widely used PKC inhibitors acting either at the regulatory (NPC 15437, tamoxifen and D-sphingosine) or at the catalytic domain (Ro 32-0432, chelerythrine and rottlerin) on individual mammalian PKC isoforms of the classical (α and β I), novel (δ and η) and atypical (ζ) PKC families, using the yeast phenotypic assay, in order to contribute for the elucidation of their isoform-selectivity.

The PKC inhibitors studied presented differences on their potency to reduce the effect of the appropriate PKC activator (estimated as EC_{50} ratios) what was interpreted as an index of PKC inhibitory potency. In general, the more marked inhibition was observed on novel PKC isoforms, particularly on PKC- η .

This study indicates promising isoform-selectivity of some PKC inhibitors, namely NPC 15437 for PKC- η or rottlerin for both nPKC isoforms. It is also suggested that the PKC domain involved on the inhibition does not seem to be relevant for the potency and isoform-selectivity of PKC inhibitors.

Keywords: Protein kinase C, PKC isoforms, PKC inhibitors, Yeast phenotypic assay

INTRODUCTION

Protein kinase C (PKC) is a family of serine-threonine kinases that comprises at least 13 isoforms, classified into three groups: the classical PKCs (cPKCs), which include isoforms α , β I, β II and γ ; the novel PKCs (nPKCs), which include isoforms δ , ϵ , η and θ and the atypical PKCs (aPKCs), which include isoforms ζ and ι/λ .^{1,2} Recently, a new member of the PKC family, PKC μ /PKD, has been reported, but its inclusion in this family remains controversial.¹

The general structure of a PKC molecule consists of a regulatory and a catalytic domain, found at the -NH₂ and -COOH terminus, respectively, containing conserved (C1-C4) regions of extended sequence homology as well as variable (V1-V5) regions.^{2,3}

PKC isoforms are involved on transmembrane signal transduction pathways,^{3,4} regulating a wide variety of cellular functions such as growth, differentiation, tumor promotion and apoptosis.^{1,2,4} Individual PKC isoforms differ on their expression patterns and substrate specificities, strongly suggesting that each isoform may be involved on distinct regulatory processes within the cell.⁵ Activation of PKC isoforms occurs in a number of pathological states, such as chronic inflammation and proliferative diseases, what emphasises the therapeutic potential of isoform-selective PKC inhibitors.^{2,4,6-8} Furthermore, availability of isoform-selective PKC inhibitors may also provide important pharmacological agents to better define the physiological and pathophysiological functions of each PKC isoform.^{4,8,9}

A large variety of structurally distinct PKC inhibitors have been identified or developed so far,⁷ namely chelerythrine,¹⁰ NPC 15437,¹¹⁻¹³ Ro 32-0432,^{2,9,14,15} tamoxifen,¹⁶⁻²⁰ rottlerin^{9,21} and D-sphingosine.^{2,22,23} They differ on their site of interaction with PKC: chelerythrine,^{8,10} Ro 32-0432^{2,8,14,15} and rottlerin^{8,9,21} interact with PKC at the catalytic domain whereas NPC 15437,¹¹⁻¹³ tamoxifen^{8,16,17} and D-sphingosine^{2,8,22,23} interact at the regulatory domain.

Although these compounds have been widely used as PKC inhibitors, little information is available about their isoform-selectivity. Study of isoform-selectivity has been hampered by methodological limitations,²⁴ such as coexistence of several PKC isoforms in the cells used for *in vivo* assays and the difficulties to reproduce, *in vitro*, the interactions occurring *in vivo* between PKC and other cellular constituents. These limitations can be circumvented using the yeast phenotypic assay, which uses transformed yeast expressing a single functional mammalian PKC isoform. This assay is based on the inhibition of yeast growth (reflecting an

increase in the cell doubling time) caused by PKC activators that is proportional to the degree of PKC activation.^{25,26} In this assay, PKC inhibitors reduce growth inhibition caused by an activator^{24,27} and comparison of that reduction may be taken as an index of potency of a given PKC inhibitor on the expressed isoform.

Because only a single mammalian PKC isoform is expressed, this method makes possible the comparison of potency of a compound on different isoforms, under similar experimental conditions. Since expression of the mammalian PKC is dependent on the presence of a transcription inducer (galactose), effects in the absence of galactose (no expression) allows detection of effects non-mediated by the expressed PKC isoform.

In the present study, effects of the PKC inhibitors, chelerythrine, NPC 15437, Ro 32-0432, tamoxifen, rottlerin and D-sphingosine, on PKC isoforms α and β I (cPKCs), δ and η (nPKCs) and ζ (aPKCs) were compared using the yeast phenotypic assay. Our results indicate that these PKC inhibitors may present some isoform-selectivity and that the yeast phenotypic assay may be an appropriate method to investigate the isoform-selectivity of putative PKC inhibitors.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Yeast nitrogen base was from DIFCO (Merck Portugal, Lisboa, Portugal). The kit for protein quantification was from Pierce (Biocontec, Lisboa, Portugal). The secondary alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG detection kit (AP-10), recombinant proteins PKC- α (PK11), PKC- β I (PK16), PKC- δ (PK31), PKC- η (PK46) and PKC- ζ (PK41) were from Oxford Biomedical Research (LabClinics, Barcelona, Spain). Nitrocellulose membranes and all the reagents for sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblots were from BioRad (PACI, Lisboa, Portugal). Acid-washed glass beads, antibodies to PKC- α , PKC- β I, PKC- δ , PKC- η and PKC- ζ , aprotinin, arachidonic acid sodium salt, chelerythrine chloride, leupeptin, NPC 15437 dihydrochloride (R-2,6-diamino-N-[[1-(1-oxotridecyl)-2-piperidinyl]methyl]-hexanamide dihydrochloride), pepstatin A, phenylmethylsulfonyl fluoride, PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), Ro 32-0432 (2-(8-[[dimethylamino)methyl]-6,7,8,9-tetrahydropyrido[1,2-a]indol-3-yl)-3-(1-methylindol-3-

yl)maleimide, hydrochloride), rottlerin (mallotoxin), D-sphingosine (*trans*-D-erythro-sphingosine) were from Sigma Aldrich (Sintra, Portugal). Tamoxifen citrate was from Tocris (Bristol, UK). All other chemicals used were of analytical grade.

Yeast transformation and cell cultures

Constructed yeast expression plasmids YEp52 and YEp51, encoding the cDNA for bovine PKC- α and for rat PKC- β I, respectively (kindly offered by Dr. Heimo Riedel, Wayne University, Detroit, USA) and YEplac181, encoding the cDNA for the rat PKC- δ , mouse PKC- η or PKC- ζ (kindly offered by Dr. Nigel Goode, Royal Veterinary College, London, UK) were amplified in *Escherichia coli* DH5 α and confirmed by restriction analysis. The plasmids used contain galactose-inducible transcriptional elements and the *leu2* gene for selection. *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*; strain CG379; α *ade5 his7-2 leu2-112 trp1-289 α ura3-52 [Kil-O]*; Yeast Genetic Stock Center, University of California, Berkeley, USA) was transformed using the lithium acetate method.²⁸ To ensure the selection of transformed yeast, cells were grown in leucine-free medium, in 1.5% agar plates, at 30°C.

For the yeast phenotypic assay, transformed cells were incubated in leucine free-medium, with slow shaking, at 30°C. The leucine free-medium contained 0.7% yeast nitrogen base, 2% glucose (w/v) or the indicated carbon source, amino acids, purines and pyrimidines, according to the transformed yeast requirements. Galactose (2%; w/v), instead of glucose, was included in the medium to induce transcription of the mammalian PKC gene.

Cell lysis and immunoblotting

Cell lysis was performed basically as described.²⁵ The protein concentration was determined using a kit for protein quantification (*Coomassie*[®] *Protein Assay Reagent Kit*, Pierce, Biocontec, Lisboa, Portugal). Similar amounts of protein (~40 μ g) from protein extracts were then separated on 10% SDS-polyacrylamide gels (Mini-Protean II, BioRad, Hercules, CA, USA). Positive controls (4 μ g) were obtained using recombinant proteins PKC- α (MW 76,799 Da), PKC- β I (MW 76,790 Da), PKC- δ (MW 77,517 Da), PKC- η (MW 77,600 Da) and PKC- ζ (MW 67,740 Da). Proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes and probed on immunoblots with specific rabbit antibodies to the individual mammalian PKC isoforms and revealed with a secondary alkaline phosphatase-

conjugated anti-rabbit IgG (AP-10, Oxford Biomedical Research, LabClinics, Barcelona, Spain).

Yeast Phenotypic Assay

Transformed yeast cultures were incubated in leucine-free medium. Optical density values, measured at 620 nm (OD_{620} ; Cary 1E Varian spectrophotometer, Palo Alto, CA, USA), were used as an indicator of growth. Transformed yeast were grown to an OD_{620} of approximately 1, collected by centrifugation and diluted to an OD_{620} of 0.05, in medium containing 2% (w/v) galactose (gene transcription-inducer) and 3% (v/v) glycerol (alternative carbon source). Diluted cultures (200 μ l) were transferred to 96-wells microtitre plates and incubated for up to 100 hours, with slow shaking at 30°C, either in the presence of drugs or solvent (DMSO 0.1%; final concentration). Growth was monitored by determining the OD_{620} using a plate reader (BioRad Benchmark Microplate Reader; Hercules, CA, USA). In preliminary experiments, growth curves for individual isoforms were determined and duration of logarithmic and stationary phases identified. Estimation of drug effects was based on OD_{620} measurements at fixed time points (at 65 h for cPKC isoforms or at 48 h incubation for nPKC and aPKC), times occurring during the respective logarithmic phase and where a “steady-state growth inhibition” was reached (period of time during which maximal inhibition of growth was reached and remained constant or changed only slightly). In individual experiments, OD_{620} was routinely monitored for up to 100 hours to confirm whether the “fixed time points” chosen were appropriate for the activators used (PMA or arachidonic acid). The difference between the maximal OD_{620} reached and that measured at the beginning of incubation was used as an index of yeast growth. Drugs or solvent were added at the beginning and kept throughout the incubation. Yeast growth in the presence of drugs was expressed as percentage of growth observed in parallel experiments in the presence of solvent; it was further transformed into growth inhibition by subtracting that value from 100. Because growth inhibition caused by a maximal concentration of the standard PKC activator varied between isoforms, 100% growth inhibition was assumed to be that caused by 10^{-5} M PMA (or arachidonic acid for PKC- ζ), in order to standardise the maximal inhibition reachable on different isoforms; 0% growth inhibition would occur when yeast growth in the presence of drugs was identical to that in the presence of solvent.

For interaction experiments, a single concentration of PKC inhibitor was added in the presence of the PKC activator PMA (10^{-8} - 10^{-5} M; arachidonic acid for PKC- ζ).

Concentration-response curves for the PKC activator in the absence or in the presence of PKC inhibitor, were obtained and, on each experiment, the concentration of PKC activator that caused 50% growth inhibition (EC_{50}) calculated. For each PKC inhibitor and on each PKC isoform, EC_{50} ratios of the EC_{50} in the presence and in the absence of PKC inhibitor [EC_{50} (PKC activator + PKC inhibitor) / EC_{50} (PKC activator)] were calculated.

Statistical analysis.

Results are given as arithmetic means $\pm$ SEM of n determinations. Differences between means were tested for significance using either paired Student's t test, unpaired Student's t test or one way ANOVA, followed by Tukey's *post-hoc* test. A P value less than 0.05 was considered to denote a statistically significant difference.

RESULTS

Expression of mammalian PKC- α , - β I, - δ , - η or - ζ was confirmed by immunoblotting, using protein extracts of yeast cells, transformed with a plasmid containing the gene for one of the mammalian PKC isoforms, grown in the presence of the transcription inducer (2% galactose). Expression of the PKC isoform resulted in a single antigenic band, which co-migrated with the respective recombinant protein. Protein extracts of transformed yeast cells grown in the absence of galactose did not present antigenic bands (see Figure 1).

PMA (considered as the standard activator for the classical and novel PKC isoforms) was tested on yeast expressing PKC- α , - β I, - δ or - η , in concentrations up to 10^{-5} M (higher concentrations were not possible to test due to its low solubility in the culture medium). Since atypical PKC isoforms are not activated by phorbol esters,²⁹ arachidonic acid (up to 10^{-5} M) was used as the activator for PKC- ζ .³⁰

In the absence of galactose, neither PMA nor arachidonic acid altered yeast growth. The solvent used (DMSO; final concentration 0.1%) also did not change yeast growth both in the presence and in the absence of galactose (not shown).

Maximal values of growth inhibition caused by 10^{-5} M of the appropriate PKC activator (PMA for PKC- α , - β I, - δ and - η or arachidonic acid for PKC- ζ), on the PKC isoforms tested, are presented in Table 1 and were assumed to correspond to the maximal growth inhibition

reachable by PKC activation for the isoform expressed. Effects of lower concentrations of PKC activator were expressed as percentage of that maximal growth inhibition.

In the presence of galactose, the appropriate PKC activator caused a concentration-dependent inhibition of the growth of yeast expressing the mammalian PKC isoform. For PMA, the EC_{50} values (nM) were (for the isoform indicated) 99.4 ± 10.1 (PKC- α), 214.7 ± 48.0 (PKC- β I), 453.1 ± 32.8 (PKC- δ) and 7.6 ± 0.6 (PKC- η) ($n = 64$). In yeast expressing PKC- ζ , arachidonic acid, but not PMA, caused a concentration-dependent growth inhibition of yeast expressing this isoform, with an EC_{50} of 208.2 ± 30.3 nM ($n = 64$).

In the absence of galactose, chelerythrine, Ro 32-0432, tamoxifen and D-sphingosine, all tested at the concentration of 10^{-5} M, did not influence yeast growth. However, NPC 15437 (10^{-5} M) inhibited yeast growth to 73.0 ± 4.6 % ($n = 32$), and rottlerin (10^{-5} M) increased yeast growth to 114.1 ± 10.1 % ($n = 36$). At the concentration of 10^{-6} M neither NPC 15437 nor rottlerin influenced yeast growth. Therefore, 10^{-6} M was the maximal concentration of NPC 15437 and rottlerin used when expression of the mammalian PKC isoform was induced (galactose present in the medium). These maximal concentrations of PKC inhibitors that did not alter yeast growth, in the absence of mammalian PKC isoform expression, was defined as the maximal concentration feasible.

In the yeast phenotypic assay, a PKC inhibitor reduces growth inhibition caused by a PKC activator.^{24,27} However, a direct stimulation of yeast growth caused by the PKC inhibitor alone was also reported.²⁴ Therefore, on a first approach, PKC inhibitors were tested alone and at the maximal concentration feasible: 10^{-5} M for chelerythrine, Ro 32-0432, tamoxifen and D-sphingosine; 10^{-6} M for NPC 15437 and rottlerin. As shown in Figure 2, PKC inhibitors stimulated growth of yeast expressing individual mammalian PKC isoforms; the only exception was D-sphingosine, which only slightly stimulated yeast growth. A reduction on the concentration reduced the growth stimulation. At 10^{-8} M, none of the PKC inhibitors stimulated yeast growth (Figure 2).

On a subsequent series of experiments, the ability of PKC inhibitors to reduce growth inhibition caused by PKC activators (PMA; arachidonic acid for PKC- ζ) was tested. PKC inhibitors were tested both at the maximal concentration feasible (at which they generally caused some growth stimulation) and at 10^{-8} M (concentration at which none caused a significant stimulation of yeast growth). Effects of chelerythrine, NPC 15437, Ro 32-0432, tamoxifen, rottlerin and D-sphingosine on the growth inhibition caused by the appropriate PKC activator are shown in Figures 3, 4, 5, 6, 7 and 8, respectively. At the maximal

concentration feasible, chelerythrine, NPC 15437, Ro 32-0432, tamoxifen and rottlerin markedly reduced effects of the PKC activator, causing a rightward shift of the concentration-response curve to the PKC activator (compare open and filled circles of Figures 3, 4, 5, 6 and 7). Surprisingly, D-sphingosine caused a biphasic response on cPKCs and nPKCs: at 10^{-5} M increased the PMA induced growth inhibition whereas at 10^{-6} M already reduced the effect of PMA (compare open circles and filled triangles of Figure 8).

Chelerythrine, NPC 15437, Ro 32-0432, tamoxifen and rottlerin caused a rightward shift of the concentration-response curve for the PKC activator that, in general, was concentration-dependent (the displacement caused by 10^{-8} M was less pronounced than that caused by 10^{-5} M or 10^{-6} M; compare filled circles and squares of Figures 3, 4, 5, 6 and 7). However, in some cases (NPC 15437 on PKC- β I and - δ , Ro 32-0432 on PKC- η , tamoxifen on PKC- η and rottlerin on PKC- δ and - η), no concentration-dependence was found, being the rightward shift similar for the highest and the lowest concentration tested ($P > 0.05$; unpaired Student's *t* test).

To compare the potency of PKC inhibitors, ratios of EC_{50} values obtained in the presence and in the absence of each PKC inhibitor were calculated (EC_{50} is the concentration of the PKC activator that caused 50% of the growth inhibition caused by 10^{-5} M of the appropriate PKC activator). Only EC_{50} ratios obtained in the presence of 10^{-8} M of PKC inhibitor were used to estimate the PKC inhibitor potency on the various isoforms tested (Table 2). In general, PKC inhibitors presented the highest EC_{50} ratios on nPKC isoforms. The highest EC_{50} ratio was caused by NPC 15437 on PKC- η , which was about 109 times higher than that obtained on the second highest ratio (observed on PKC- α). Chelerythrine, tamoxifen and Ro 32-0432 also caused their highest EC_{50} ratios on yeast expressing PKC- η but the differences between EC_{50} ratios obtained on PKC- η and on the isoform where the second highest EC_{50} ratio was observed (PKC- β I for chelerythrine; PKC- δ for tamoxifen and Ro 32-0432) were smaller than that observed for NPC 15437 (Table 2). Although rottlerin also caused significant EC_{50} ratios on PKC- η , it shared this high potency with PKC- δ upon which EC_{50} ratio even tended to be higher (about 1.4 times) than that obtained on PKC- η (Table 2). D-sphingosine was, in general, the PKC inhibitor with the lowest EC_{50} ratio value on all isoforms tested.

According to the obtained EC_{50} ratios, the rank order of potency was, for chelerythrine, PKC- $\eta > -\beta$ I $> -\alpha = -\zeta = -\delta$; for NPC 15437, PKC- $\eta > -\alpha = -\zeta > \beta$ I $> -\delta$; for Ro 32-0432, PKC- $\eta > -\delta > -\zeta = -\beta$ I $> -\alpha$; for tamoxifen, PKC- $\eta > -\delta > -\zeta = -\beta$ I; for rottlerin,

PKC- δ = - η > - ζ > - β I and for D-sphingosine, PKC- δ > - η = - ζ = - α = - β I (for definition of the rank order of potency, the signal > was applied only when the EC₅₀ ratio of the isoform placed at the left was significantly higher than that of the EC₅₀ ratio placed at the right of the signal; otherwise = was applied; $P < 0.05$; unpaired Student's t test).

DISCUSSION

Despite the use of PKC inhibitors as pharmacological or therapeutic agents, little information is available concerning their isoform-selectivity, particularly on an eukaryotic environment^{4,24} and on a system where a single mammalian PKC isoform is expressed. The present work is an attempt to characterise the isoform-selectivity of a group of widely used PKC inhibitors on a set of mammalian isoforms of the three main PKC families, expressed under identical experimental conditions and using the yeast phenotypic assay.

On the present study, mammalian PKC- α , - β I, - δ , - η or - ζ was functionally expressed in yeast cells of the same strain of *S. cerevisiae*. On the yeast phenotypic assay, PKC activation induces a concentration-dependent growth inhibition,^{25,26} which was also observed on the present study and which occurred only when the mammalian PKC isoform was expressed. PKC inhibitors reduced that growth inhibition,^{24,27} which was also observed on the present study and for all isoforms expressed.

The attempt to compare the potency of each PKC inhibitor was based on the reduction of the effect of a PKC activator caused by a given concentration of PKC inhibitor. For each PKC isoform, estimation of PKC inhibitor potency was based on the rightward shift they caused of the concentration-response curve to the appropriate PKC activator (PMA for PKC- α , - β I, - δ and - η ; arachidonic acid for PKC- ζ). The rightward shift was estimated at the EC₅₀ level, and expressed as EC₅₀ ratios (see Methods). The same concentration (10^{-8} M) was used for all PKC inhibitors. This concentration was chosen because, at this concentration, none of the PKC inhibitors altered, *per se*, growth of yeast expressing PKC- α , - β I, - δ , - η or - ζ . By using the same concentration of PKC inhibitor on all isoforms, it was possible not only to compare the potency of a given PKC inhibitor on the isoforms expressed, but also to compare the potency of the inhibitors tested on a given PKC isoform.

Among the PKC inhibitors studied, NPC 15437 was the compound that caused the highest EC₅₀ ratio (observed on yeast expressing PKC- η). Therefore, this set of results may

indicate that NPC 15437 is a selective PKC- η inhibitor. NPC 15437 has been described as a weak PKC inhibitor.⁴ However, in our model showed an extraordinary potency on PKC- η . A possible explanation for this discrepancy is the fact that PKC- η is present mainly in epithelial tissues,^{1,31} which are not frequently used. Furthermore, mixtures of PKC isoforms, used for *in vitro* assays, are usually obtained from rat brain extracts, which contain small amounts of this isoform,¹ justifying the reported weak inhibition for NPC 15437.

Ro 32-0432 was the second compound that caused the highest EC₅₀ ratios, again on yeast expressing PKC- η , but closer than those obtained on PKC- δ , - ζ and - β I. On PKC- α , Ro 32-0432 caused lower EC₅₀ ratios, what differs with the results obtained in *in vitro* studies that suggested that Ro 32-0432 was more potent on PKC- α than on PKC- β .¹⁴

The third highest EC₅₀ ratio was caused by rottlerin (observed on yeast expressing PKC- δ). This highest ratio observed on PKC- δ is in agreement with previous studies that showed that rottlerin was a potent inhibitor of PKC- δ .²¹ However, the claimed selectivity for this isoform is challenged on the present study since the EC₅₀ ratio obtained on yeast expressing PKC- η was similar to that obtained on yeast expressing PKC- δ .

Tamoxifen is an antitumor compound which main mechanism of action is ascribed to blockade of estrogen receptors.^{32,33} It was also claimed that tamoxifen inhibits PKC.¹⁶⁻²⁰ The results obtained on the present study confirm that tamoxifen is a PKC inhibitor, since it reduced effects of PKC activators on all PKC isoforms (see Figure 6). Although an estrogen-binding protein is also present in yeast, it is unlikely that reduction of the effect of PKC activator is due to an interference with this yeast protein, because tamoxifen did not cause any effect on non-transformed yeast, and because it is known that tamoxifen has a negligible affinity for the estrogen-binding protein present in *S. cerevisiae*.³⁴ As observed with Ro 32-0432, tamoxifen caused the highest EC₅₀ ratios on yeast expressing nPKC isoforms, and presented more marked differences than Ro 32-0432 between PKC- η and PKC- ζ or PKC- β I (EC₅₀ ratios about 56 and 70 times lower than that of PKC- η , respectively).

As observed with rottlerin, tamoxifen did not caused significant EC₅₀ ratios on yeast expressing PKC- α . These results must be interpreted with caution and should not be regarded as an definitive proof that rottlerin and tamoxifen are inactive on PKC- α . The present comparison was based on results obtained with a single (and low) concentration of these compounds. However, inhibition of PKC- α occurred with higher concentrations.

Although chelerythrine has been the most widely used PKC inhibitor, the isoform-selectivity of this compound was studied, for the first time, in the present work and the much

higher EC₅₀ ratios caused on yeast expressing PKC- η may indicate some selectivity for this isoform.

D-sphingosine was the compound that caused more similar EC₅₀ ratios on all PKC isoforms tested, what may be taken as an indication that it is the less isoform-selective PKC inhibitor among the compounds tested. D-sphingosine has been considered a potent PKC inhibitor.²³ However, the EC₅₀ ratios obtained with this compound were among the lowest obtained, what questions the claimed high potency of this D-sphingosine as PKC inhibitor.

Inhibition of PKC activity by interfering with the regulatory domain was claimed to be an approach to obtain more selective PKC inhibitors.¹² Therefore, the question arises whether the site of action (regulatory or catalytic domain) is important for isoform-selectivity. The obtained results hardly support that PKC inhibitors acting at the regulatory domain may be more isoform-selective. In fact, chelerythrine, which acts at the catalytic domain, seems to have a more marked selectivity than D-sphingosine, which acts at the regulatory domain.

Considering the co-existence of several PKC isoforms in the same cell, an important aim would be to obtain and identify isoform-selective PKC inhibitors. The present results suggest that inhibition of PKC- η would be possible without a significant inhibition of other PKC isoforms (by using NPC 15437, for instance). It is further suggested that it would be possible to inhibit nPKC isoforms, without a significant inhibition of cPKC and aPKC isoforms (by using rottlerin, for instance). However, it is clear that more isoform-selective PKC inhibitors are required in order to selectively inhibit PKC isoforms other than PKC- η and to better clarify the physiological and pathophysiological roles of each PKC isoform. An analysis of the structural differences between different groups of PKC inhibitors acting at the regulatory domain and at the catalytic domain may provide important information on the molecular changes needed to obtain isoform-selective PKC inhibitors.

In conclusion, the present study is an attempt to describe the isoform-selectivity of six widely used PKC inhibitors by using an assay in which a single mammalian PKC isoform was expressed. It is revealed that PKC- η was the isoform that may be more selectively inhibited (namely by using NPC 15437) and that the PKC domain involved on the inhibition does not seem to be relevant to obtain more isoform-selective PKC-inhibitors.

Acknowledgements

The authors thank Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT; I&D nº 226/94), POCTI (QCA III) and FEDER for financial support.

REFERENCES

1. Musashi, M.; Ota, S. and Shiroshita, N. (2000) *Int. J. Hematol.*, **72**, 12.
2. Barry, O.P. and Kazanietz, M.G. (2001) *Curr. Pharm. Des.*, **7**, 1725.
3. Webb, B.L.; Hirst, S.J. and Giembycz, M.A. (2000) *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 1433.
4. Hofmann, J. (2001) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **142**, 1.
5. Watters, D.J. and Parsons, P.G. (1999) *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 383.
6. Bradshaw, D.; Hill, C.H.; Nixon, J.S. and Wilkinson, S.E. (1993) *Agents Actions*, **38**, 135.
7. Da Rocha, A.B.; Mans, D.R.A.; Regner, A. and Schwartzmann, G. (2002) *Oncologist*, **7**, 17.
8. Hofmann, J. (1997) *FASEB J.*, **11**, 649.
9. Way, K.J.; Chou, E. and King, G.L. (2000) *TiPS*, **21**, 181.
10. Herbert, J.M.; Augereau, J.M.; Gleye, J. and Maffrand, J.P. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 993.
11. Sullivan, J.P.; Connor, J.R.; Tiffany, C.; Shearer, B.G. and Burch, R.M. (1991) *FEBS Lett.*, **285**, 120.
12. Sullivan, J.P.; Connor, J.R.; Shearer, B.G. and Burch, R.M. (1991) *Agents Actions*, **34**, 142.
13. Sullivan, J.P.; Connor, J.R.; Shearer, B.G. and Burch, R.M. (1992) *Mol. Pharmacol.*, **41**, 38.
14. Birchall, A.M.; Bishop, J.; Bradshaw, D.; Cline, A.; Coffey, J.; Elliott, L.H.; Gibson, V.M.; Greenham, A.; Hallam, T.J.; Harris, W.; Hill, C.H.; Hutchings, A.; Lamont, A.G.; Lawton, G.; Lewis, E.J.; Maw, A.; Nixon, J.S.; Pole, D.; Wadsworth, J. and Wilkinson, S.E. (1994) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 922.
15. Wilkinson, S.E.; Parker, P.J. and Nixon, J.S. (1993) *Biochem. J.*, **294**, 335.

16. O'Brian, C.A.; Liskamp, R.M.; Solomon, D.H. and Weinstein, I.B. (1985) *Cancer Res.*, **45**, 2462.
17. O'Brian, C.A.; Liskamp, R.M.; Solomon, D.H. and Weinstein, I.B. (1986) *J. Natl. Cancer Inst.* **76**, 1243.
18. Horgan, K.; Cooke, E.; Hallett, M.B. and Mansel, R.E. (1986) *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 4463.
19. Rowlands, M.G.; Budworth, J.; Jarman, M.; Hardcastle, I.R.; McCague, R. and Gescher, A. (1995) *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 723.
20. Gundimeda, U.; Chen, Z.-H. and Gopalakrishna, R. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 13504.
21. Gschwendt, M.; Muller, H.J.; Kielbassa, K.; Zang, R.; Kittstein, W.; Rincke, G. and Marks, F. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 93.
22. Hannun, Y.A.; Loomis, C.R.; Merrill, Jr.A.H. and Bell, R.M. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 12604.
23. Hannun, Y.A. and Bell, R.M. (1989) *Clin. Chim. Acta*, **185**, 333.
24. Keenan, C.; Goode, N. and Pears, C. (1997) *FEBS Lett.*, **415**, 101.
25. Riedel, H.; Hansen, H.; Parissenti, A.M.; Su, L.; Shieh, H.-L. and Zhu, J. (1993) *J. Cell. Biochem.*, **52**, 320.
26. Shieh, H.-L.; Hansen, H.; Zhu, J. and Riedel, H. (1995) *Mol. Carcinog.*, **12**, 166.
27. Keenan, C.; Goode, N. and Pears, C. (1997) *Biochem. Soc. Trans.*, **25**, S591.
28. Ito, H.; Fukuda, Y.; Murata, K. and Kimura, A. (1983) *J. Bacteriol.*, **153**, 163.
29. Ways, D.K.; Cook, P.P.; Webster, C. and Parker, P.J. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 4799.
30. Nakanishi, H. and Exton J.H. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 16347.
31. Hashimoto, Y.; Osada, S.; Ohno, S. and Kuroki, T. (1992) *Tohoku J. Exp. Med.*, **168**, 275.

32. Lippman, M.; Bolan, G. and Huff, K. (1976) *Cancer Res.*, **36**, 4610.
33. Coezy, E.; Borgna, J.L. and Rochefort, H. (1982) *Cancer Res.*, **42**, 317.
34. Burshell, A.; Stathis, P.A.; Do, Y.; Miller, S.C. and Feldman, D. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 3450.

Table 1. Yeast growth inhibition caused by PMA on the PKC isoforms studied.

PKC isoforms	Growth inhibition caused by 10 ⁻⁵ M PMA (% of control)
α	40.6 $\pm$ 1.9 (<i>n</i> = 36)
β I	36.1 $\pm$ 1.1 (<i>n</i> = 56)
δ	26.6 $\pm$ 0.6 (<i>n</i> = 52)
η	21.3 $\pm$ 0.7 (<i>n</i> = 52)
ζ	0.2 $\pm$ 1.4 (<i>n</i> = 36) ^a

^a Growth inhibition caused by 10⁻⁵ M arachidonic acid was 23.9 $\pm$ 0.7 (*n* = 56). Growth in the presence of solvent was considered to be 0 % growth inhibition (100 % growth; see Experimental for details). Each value represents the mean $\pm$ SEM of the indicated *n* determinations.

Table 2. EC₅₀ ratios for PKC inhibitors on the individual PKC isoforms tested.

Compound	EC ₅₀ Ratio ^a				
	PKC-α	PKC-βI	PKC-δ	PKC-η	PKC-ζ
Chelerythrine	1.9 ± 0.3 [#]	2.9 ± 0.3 [#]	1.3 ± 0.1 [#]	63.2 ± 1.7	1.4 ± 0.2 [#]
NPC 15437	5.1 ± 0.5 [#]	3.7 ± 0.3 [#]	2.4 ± 0.1 [#]	556.0 ± 44.7	4.5 ± 0.1 [#]
Ro 32-0432	1.3 ± 0.2 [#]	20.0 ± 3.1 [#]	70.9 ± 7.4 [#]	125.9 ± 11.1	25.2 ± 2.8 [#]
Tamoxifen	ND	1.6 ± 0.2 [#]	20.0 ± 2.7 [#]	112.1 ± 9.7	2.0 ± 0.2 [#]
Rottlerin	ND	1.4 ± 0.2 [#]	70.9 ± 9.6	50.3 ± 6.8	8.9 ± 1.5 [#]
D-Sphingosine	1.6 ± 0.2	1.3 ± 0.2	6.3 ± 1.2 [#]	2.0 ± 0.3	1.6 ± 0.3

^aEC₅₀ ratio = EC₅₀ (PKC activator + 10⁻⁸ M PKC inhibitor) / EC₅₀ (PKC activator).

The EC₅₀ values were considered the concentration of PKC activator that caused half of the growth inhibition caused by 10⁻⁵ M of PMA (arachidonic acid for PKC-ζ). Shown are mean ± SEM of 16 - 20 determinations. ND: Not determined (identical EC₅₀ values in the absence or in the presence of the compound). Significant differences: from PKC-η, [#]*P* < 0.05 (one way ANOVA, followed by Tukey's *post-hoc* test).

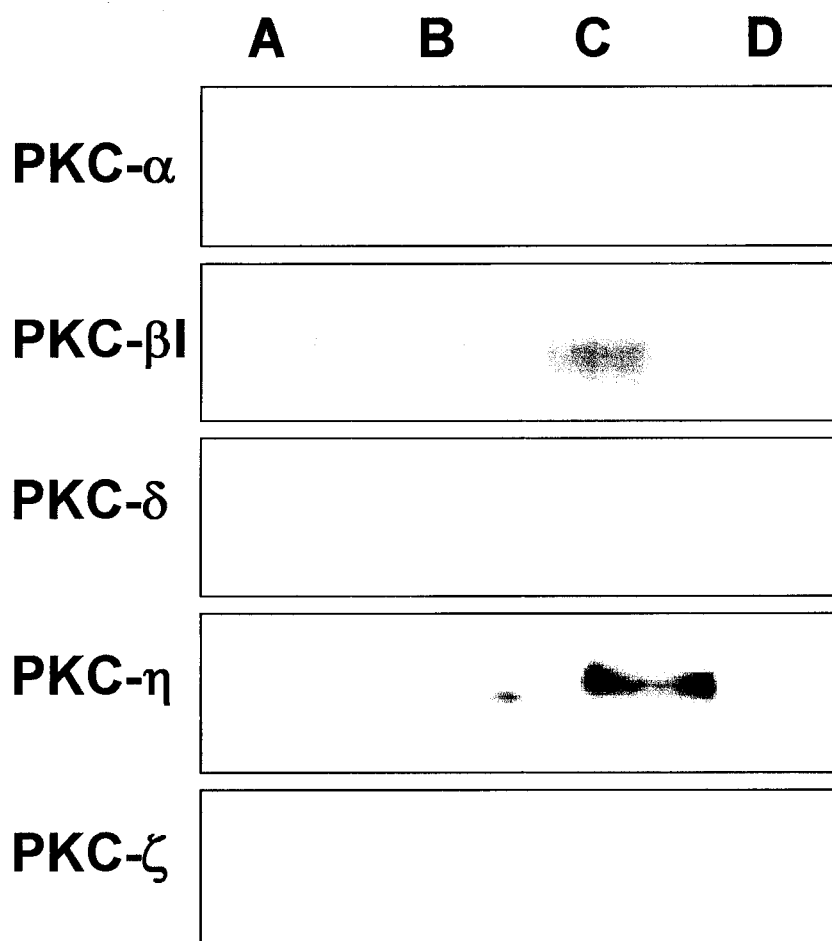


Figure 1. Immunodetection of PKC- α , - β I, - δ , - η and - ζ isoforms expressed in transformed *Saccharomyces cerevisiae* (CG379). Individual immunoblots are presented in a horizontal arrangement and were obtained from proteins extracts ($\sim 40 \mu\text{g}$ protein/lane) from cultures grown in selective medium with 2% galactose (lanes **A** and **B**; duplicate samples) or without 2% galactose (lane **D**). Positive controls (lane **C**; $4 \mu\text{g}$) were obtained using recombinant proteins PKC- α (MW 76,799 Da), PKC- β I (MW 76,790 Da), PKC- δ (MW 77,517 Da), PKC- η (MW 77,600 Da) and PKC- ζ (MW 67,740 Da).

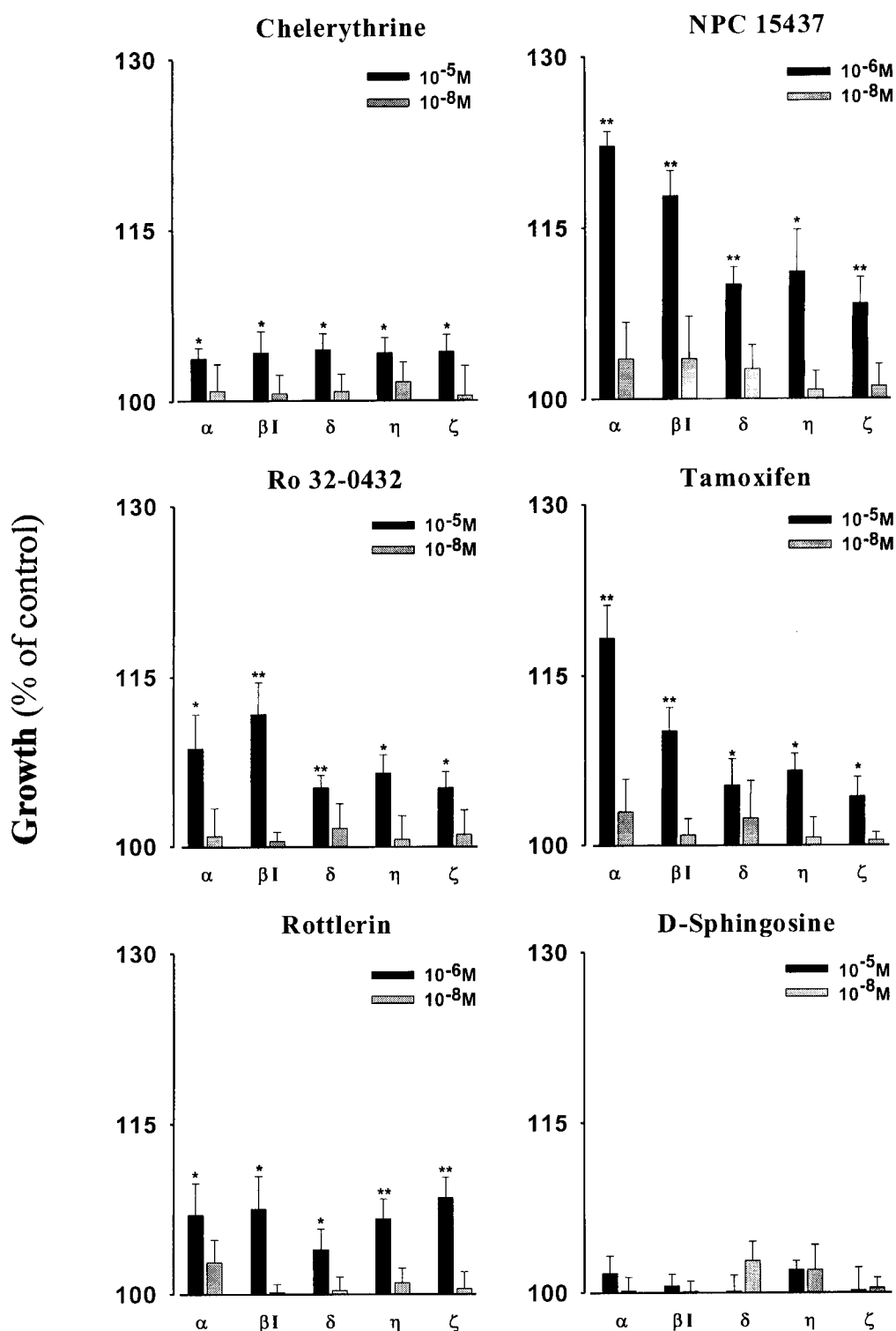


Figure 2. Effects of the indicated PKC inhibitor on the growth of yeast expressing individual PKC isoforms (α , β I, δ , η or ζ). Yeast cells expressing the indicated mammalian PKC isoform were incubated with the PKC inhibitor or solvent (DMSO; 0.1% final concentration). Results are expressed as % of growth. Shown are means $\pm$ SEM of 16 - 24 determinations. Significantly different from growth in the presence of solvent: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ (paired Student's t test).

Chelerythrine

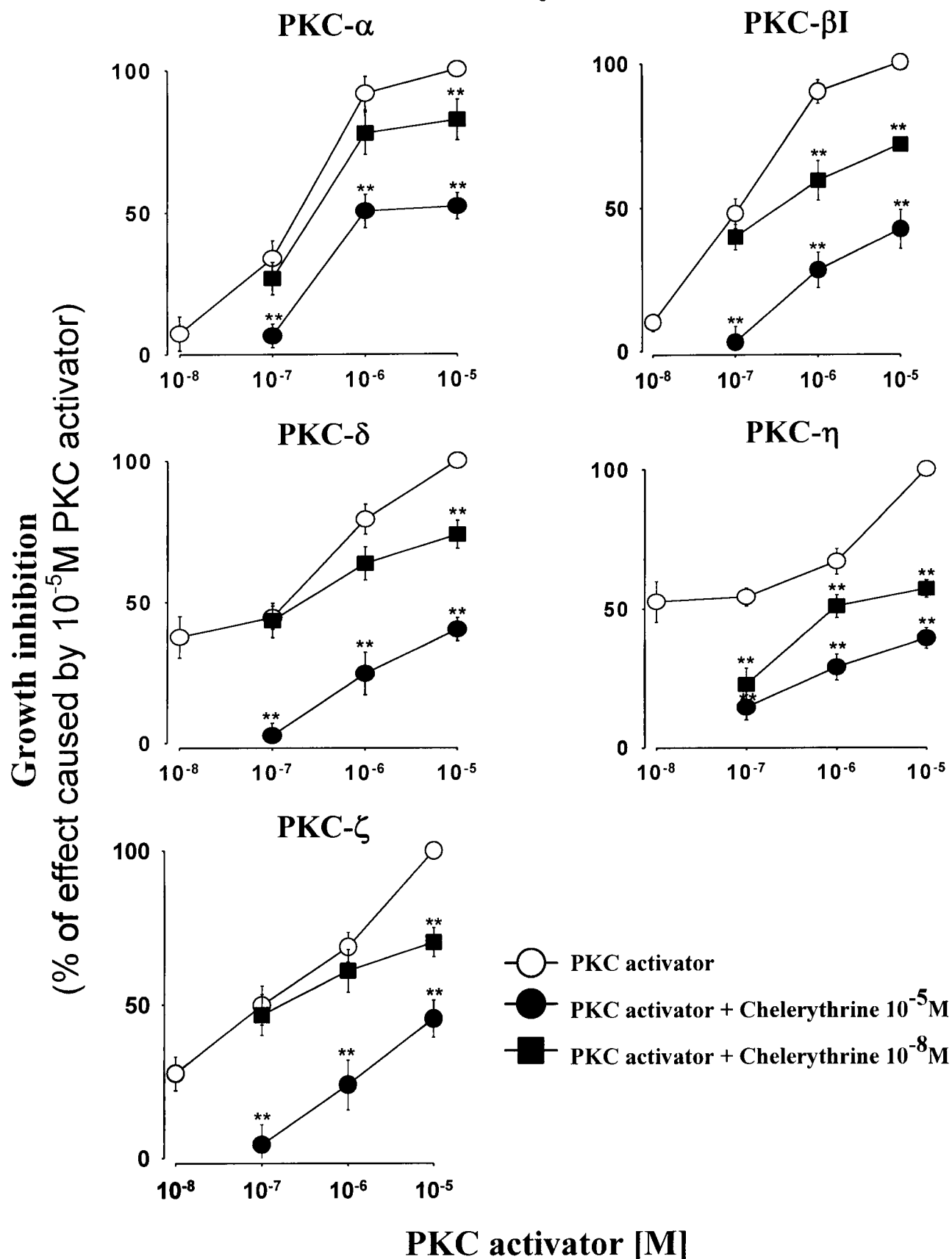


Figure 3. Interaction experiments for chelerythrine: concentration-response curves for PKC activator alone (open circles) and in the presence of 10^{-5} M (filled circles) or 10^{-8} M (filled squares) chelerythrine. Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10^{-5} M PKC activator (PMA for PKC- α , - β I, - δ and - η ; arachidonic acid for PKC- ζ). Shown are means $\pm$ SEM of 16 – 20 determinations. Significantly different from growth inhibition caused by PKC activator alone: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ (unpaired Student's t test).

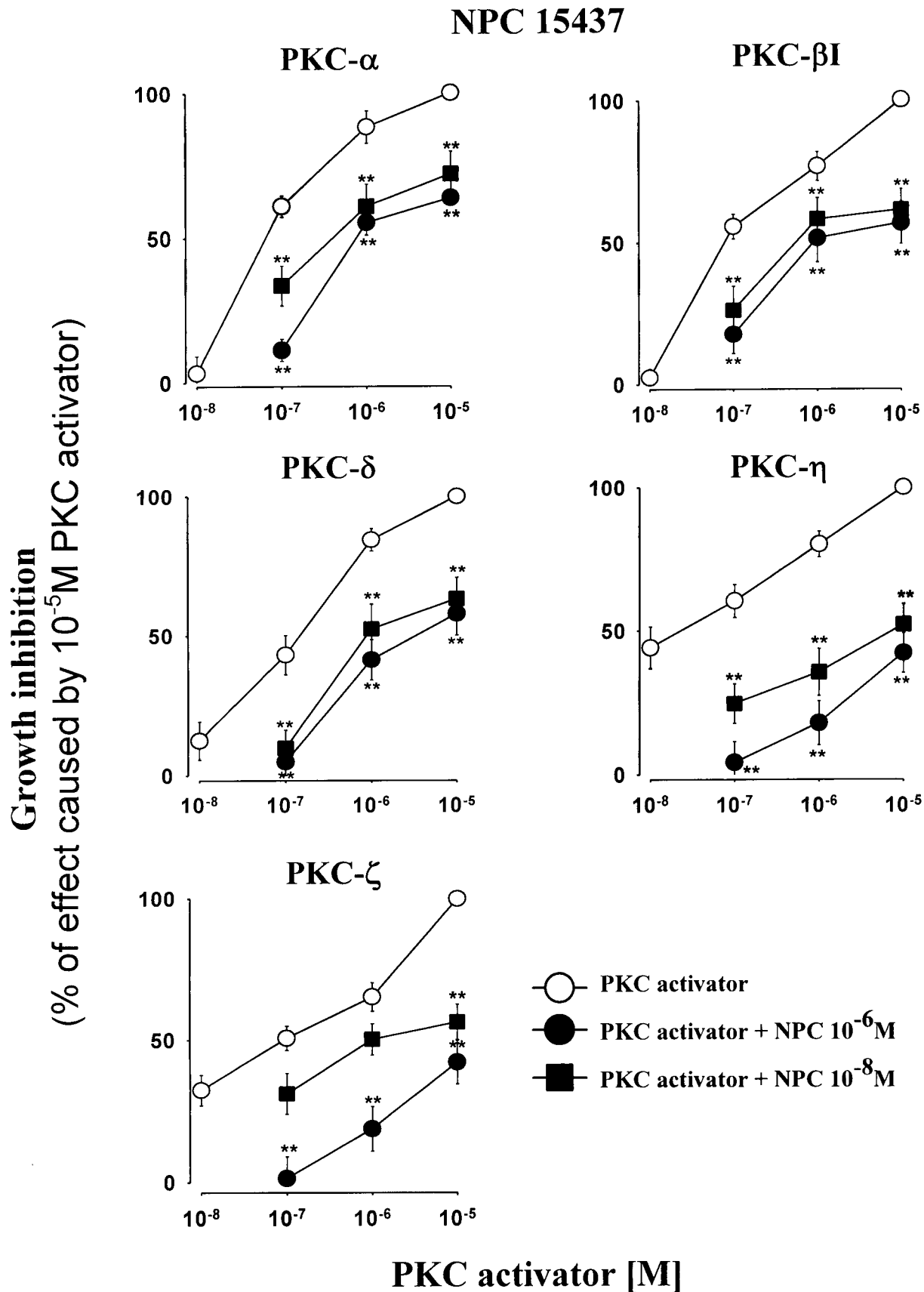


Figure 4. Interaction experiments for NPC 15437: concentration-response curves for PKC activator alone (open circles) and in the presence of 10^{-6} M (filled circles) or 10^{-8} M (filled squares) NPC 15437. Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10^{-5} M PKC activator (PMA for PKC- α , - β I, - δ and - η ; arachidonic acid for PKC- ζ). Shown are means $\pm$ SEM of 16 – 20 determinations. Significantly different from growth inhibition caused by PKC activator alone: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ (unpaired Student's t test).

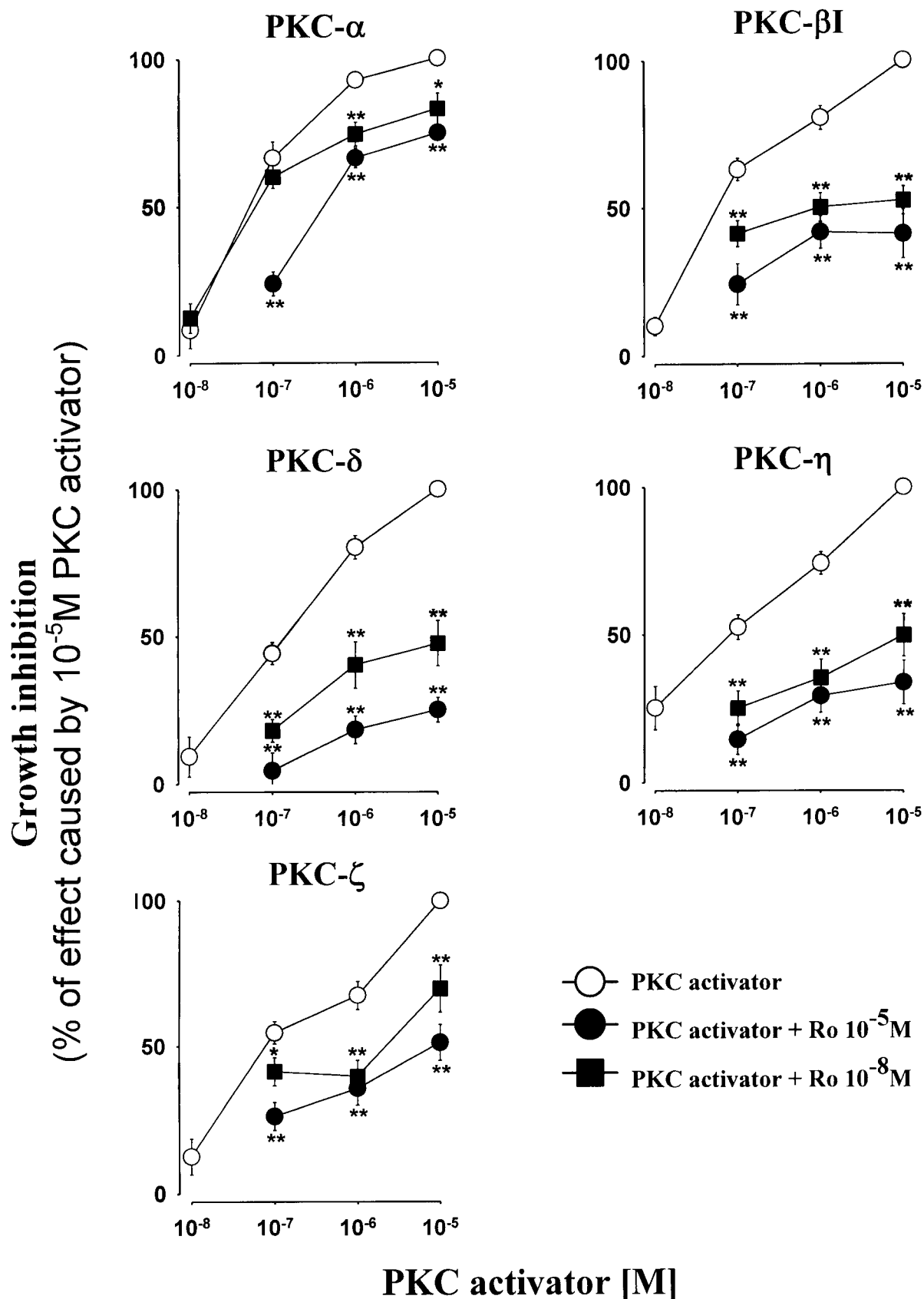


Figure 5. Interaction experiments for Ro 32-0432: concentration-response curves for PKC activator alone (open circles) and in the presence of 10^{-5} M (filled circles) or 10^{-8} M (filled squares) Ro 32-0432. Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10^{-5} M PKC activator (PMA for PKC- α , - β I, - δ and - η ; arachidonic acid for PKC- ζ). Shown are means $\pm$ SEM of 16 – 20 determinations. Significantly different from growth inhibition caused by PKC activator alone: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ (unpaired Student's t test).

Tamoxifen

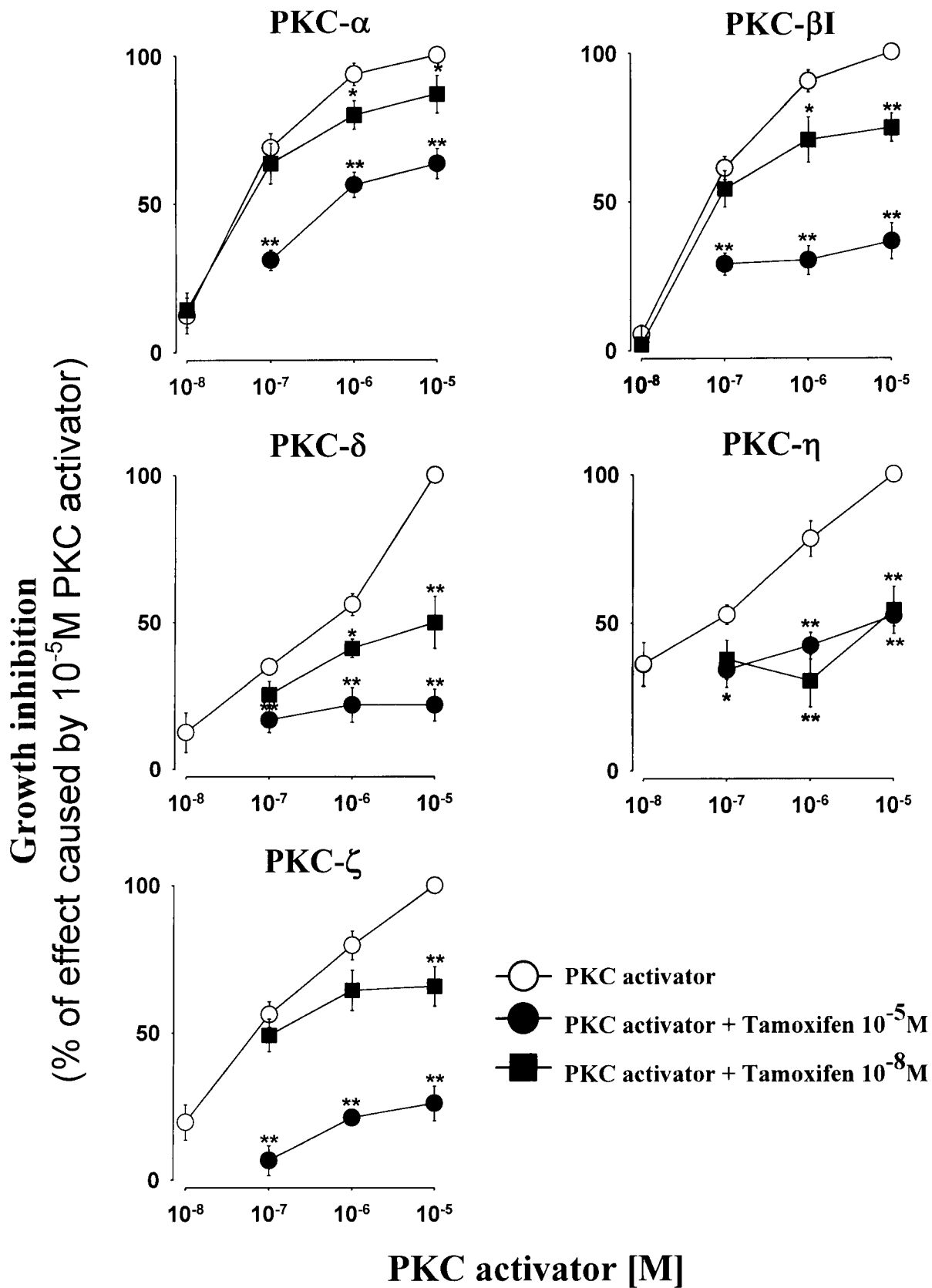


Figure 6. Interaction experiments for tamoxifen: concentration-response curves for PKC activator alone (open circles) and in the presence of 10^{-5} M (filled circles) or 10^{-8} M (filled squares) tamoxifen. Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10^{-5} M PKC activator (PMA for PKC- α , - β I, - δ and - η ; arachidonic acid for PKC- ζ). Shown are means $\pm$ SEM of 16 – 20 determinations. Significantly different from growth inhibition caused by PKC activator alone: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ (unpaired Student's t test).

Rottlerin

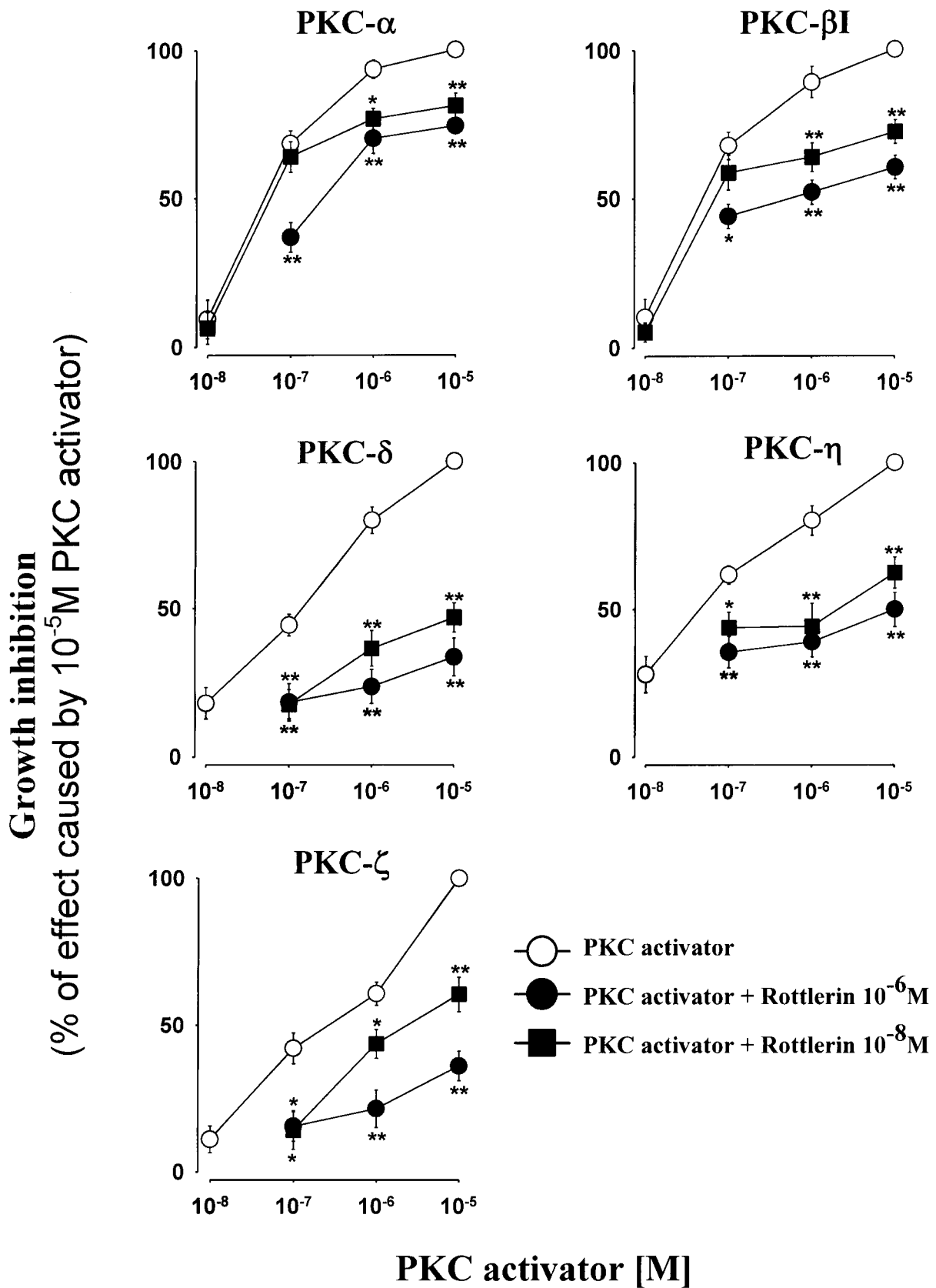


Figure 7. Interaction experiments for rottlerin: concentration-response curves for PKC activator alone (open circles) and in the presence of 10^{-6} M (filled circles) or 10^{-8} M (filled squares) rottlerin. Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10^{-5} M PKC activator (PMA for PKC- α , - β I, - δ and - η ; arachidonic acid for PKC- ζ). Shown are means $\pm$ SEM of 16 – 20 determinations. Significantly different from growth inhibition caused by PKC activator alone: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ (unpaired Student's t test).

D-Sphingosine

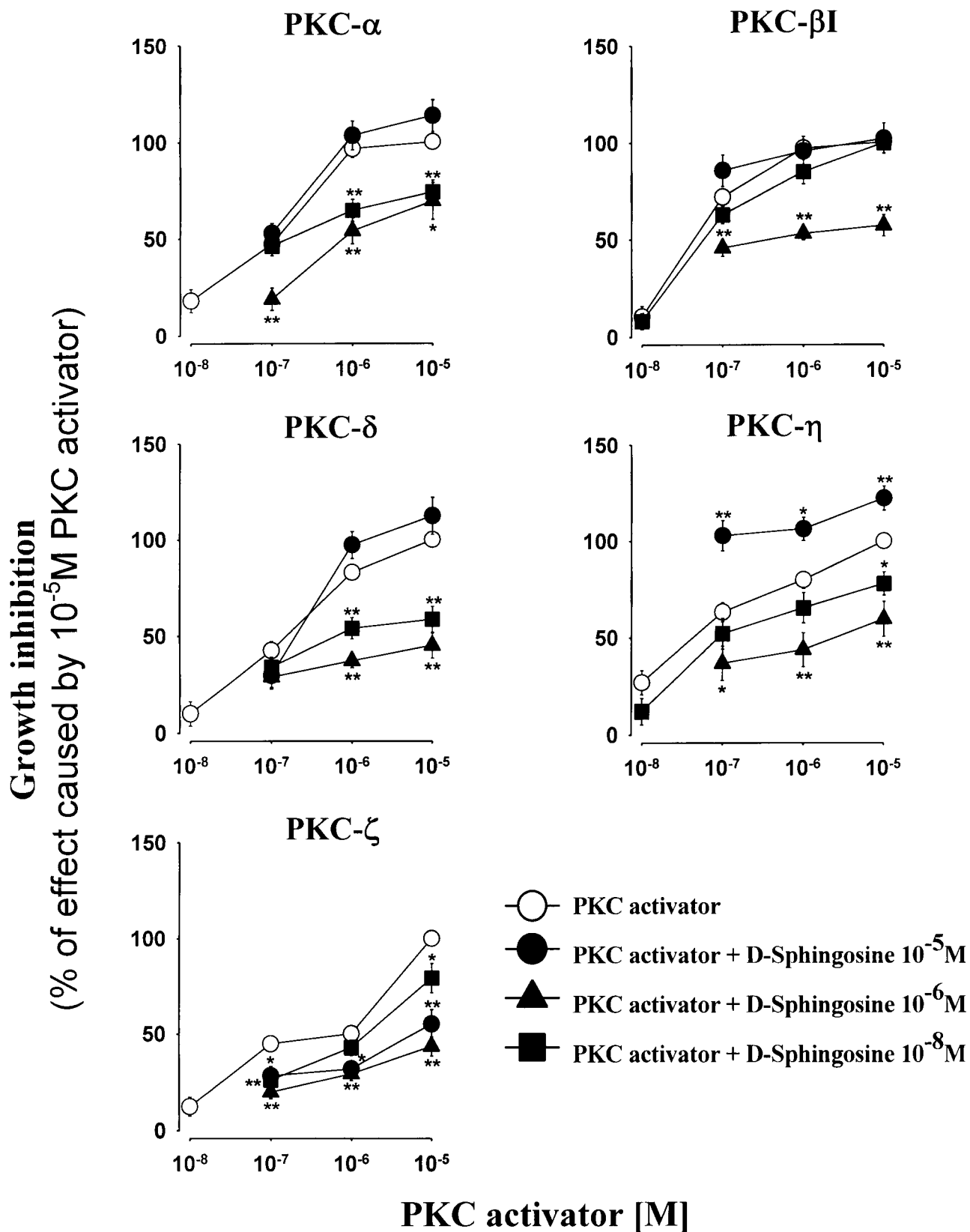


Figure 8. Interaction experiments for D-sphingosine: concentration-response curves for PKC activator alone (open circles) and in the presence of 10^{-5} M (filled circles), 10^{-6} M (filled triangles) or 10^{-8} M (filled squares) D-sphingosine. Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10^{-5} M PKC activator (PMA for PKC- α , - β I, - δ and - η ; arachidonic acid for PKC- ζ). Shown are means $\pm$ SEM of 16 – 20 determinations. Significantly different from growth inhibition caused by PKC activator alone: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ (unpaired Student's t test).

CAPÍTULO VI

DAFNETOXINA

SARAIVA L., FRESCO P., PINTO E., PORTUGAL H., GONÇALVES J. (2001)
Differential activation by daphnetoxin and mezerein of PKC-isotypes α , β I, δ and ζ . *Planta Med.*, 67, 787-790.

Differential Activation by Daphnetoxin and Mezerein of PKC-Isotypes α , β I, δ and ζ

Lucília Saraiva¹, Paula Fresco¹, Eugénia Pinto², Helena Portugal³, Jorge Gonçalves^{1,*}

¹ Department of Pharmacology, CEQOFFUP, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Porto, Portugal

² Department of Microbiology, CEQOFFUP, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Porto, Portugal

³ Chemistry Section, University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

Received: December 19, 2000; Accepted: March 4, 2001

Abstract: Daphnetoxin, a mezerein derivative, was isolated from the stem bark of *Daphne gnidium*. Mezerein is a PKC activator that exhibits antileukemic properties. However, daphnetoxin and its analogue 12-hydroxydaphnetoxin were described as being devoid of this effect. In the present study daphnetoxin and mezerein were compared as PKC activators on classical (α and β I), novel (δ) and atypical (ζ) isoforms, using an alternative *in vivo* yeast phenotypic assay. The aim was to clarify if daphnetoxin is a PKC activator and if the differences between the antiproliferative effect of mezerein and of its analogue daphnetoxin may be ascribed to differences on their potency or selectivity as PKC activators. Yeast samples expressing each of the mammalian PKC isoforms tested were incubated with daphnetoxin or mezerein. Growth inhibition caused by these drugs was assumed to be due to PKC activation since it did not occur when expression was not induced. Mezerein inhibited the growth of yeast expressing PKC α ($IC_{50} = 1190 \pm 237$ nM; $n = 20$), PKC β I ($IC_{50} = 908 \pm 46$ nM; $n = 20$), and PKC δ ($IC_{50} = 141 \pm 25$ nM; $n = 20$) but not of yeast expressing PKC ζ . Daphnetoxin also inhibited the growth of yeast expressing isoforms α , β I and δ , being more potent than mezerein on PKC α ($IC_{50} = 536 \pm 183$ nM; $n = 20$; $P < 0.05$), as potent as mezerein on PKC β I ($IC_{50} = 902 \pm 129$ nM; $n = 20$) and less potent than mezerein upon PKC δ ($IC_{50} = 3370 \pm 492$ nM; $n = 20$; $P < 0.05$). These results show that daphnetoxin is a potent PKC activator but with a selectivity different from that of mezerein. It is suggested that the lack of antileukemic and antiproliferative effects of daphnetoxin may be due to its lower potency to activate PKC δ .

Key words: *Daphne gnidium* L., Thymelaeaceae, daphnetoxin, mezerein, PKC isoforms, yeast phenotypic assay.

Introduction

Daphne species are known to cause a wide range of biological effects namely toxic, irritative, carcinogenic, cocarcinogenic, and antineoplastic (1).

The systematic fractionation of extracts from *Daphne mezereum* led to the isolation of mezerein that showed antileuke-

mic activities (2). Chemical and crystallographic analysis and molecular modelling studies have revealed structural similarities between mezerein and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (3). Biological studies also showed similarities between mezerein and PMA: mezerein was capable of bringing about most of the biological responses seen with PMA (4), ascribed to their ability to activate protein kinase C (PKC) (5).

PKC is a family of serine/threonine kinases involved in cellular signalling pathways (6), playing a central role in the control of cell growth and differentiation, and is a target to several oncogenes (7).

Daphnetoxin is a mezerein analogue without substituents at C-12 (Fig. 1). Although mezerein and daphnetoxin share similarities on their toxicity (8), the antileukemic properties of mezerein are not shared by daphnetoxin (9). The molecular

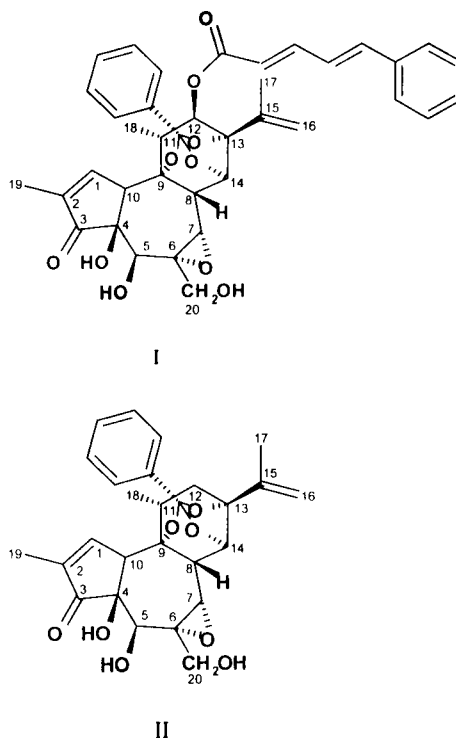


Fig. 1 Chemical structure of mezerein (I) and daphnetoxin (II).

mechanisms for these differences on the biological activities remain to be determined. In the present work, an attempt was made to compare the activity of daphnetoxin and mezerein on PKC in order to investigate if the differences in their biological activities can be ascribed to differences in their selectivity as PKC activator. Therefore, the effects of daphnetoxin, extracted from the stem bark of *Daphne gnidium*, were compared with those caused by mezerein, on classical (α and β), novel (δ), and atypical (ζ) PKC isoforms, using an *in vivo* yeast phenotypic assay. This assay is based on the growth inhibition of transformed yeast that is dependent on the degree of activation of the mammalian PKC isoform expressed (10).

Materials and Methods

Plant material

The stem bark of *Daphne gnidium* L. was collected in February 1993 at the region of Folhadela, Vila Real, Portugal. A voucher specimen (No. 3497) is deposited at the Herbarium of the University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal.

Isolation and identification of daphnetoxin

The air-dried stem bark of *D. gnidium* was reduced to pieces of approximately 2 cm and submitted to two extractions (one with *n*-hexane and another with chloroform) for two weeks at room temperature. The chloroform extract was concentrated under vacuum and the resultant solid (32.54 g, 0.74%) was subjected to column chromatography (CC) using silica gel 60 (230–400 mesh; 300 g) with EtOAc/*n*-hexane (1:9, 2:8, 3:7, and 4:6) providing 90 fractions (120 ml each). Analysis by TLC (silica gel HF254, 0.2 mm thick) using daphnetoxin as standard was performed. Fractions containing daphnetoxin (75–86) were combined and re-subjected to silica gel CC (100 g, EtOAc/*n*-hexane, 4:6, 1000 ml) to give 300 mg of daphnetoxin (whitish crystals). Daphnetoxin was identified by IR, UV, NMR (^1H and ^{13}C) and mass spectra, melting point and specific optical rotation ($[\alpha]_D^{25}$: +36°; c 0.08; CHCl_3). All data were in accord with those described in the literature (8), (11).

Reagents

Yeast nitrogen base was from DIFCO (Merck, Lisboa, Portugal). The secondary alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit IgG detection kit (AP-10), recombinant PKC α (PK11), PKC β (PK16), PKC δ (PK31) and PKC ζ (PK41) proteins were from Oxford Biomedical Research (LabClinics, Barcelona, Spain). Reagents for SDS-PAGE and immunoblotting were from BioRad (PACI, Lisboa, Portugal). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), mezerein, arachidonic acid and rabbit antibodies specific to PKC α , PKC β , PKC δ , and PKC ζ were from SIGMA (Sintra, Portugal). Daphnetoxin used as standard was a kind gift from Dra. Maria João Carvalho (University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal). All other chemicals used were of analytical grade.

Yeast transformation

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) strain CG379 was transformed with the yeast expression plasmids encoding the cDNA for bovine PKC α , for rat PKC β and PKC δ , or mouse PKC ζ . All the plasmids used contain galactose-inducible transcrip-

tional elements and the *leu2* gene for selection. Yeast expression plasmids were amplified in *Escherichia coli* DH5 α and confirmed by restriction analysis. *S. cerevisiae* was transformed using the lithium acetate method (12). Transformed yeast were selected in leucine-free selective-medium containing 2% glucose in 1.5% agar plates. Transcription was routinely induced with 2% galactose.

Cell lysis and immunoblotting

Cell lysis was performed as described (10). Proteins were separated on sodium dodecyl sulphate (SDS) 10% polyacrylamide gels (Mini-Protean II, BioRad, Hercules, CA, USA), electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes and detected with specific rabbit antibodies to PKC α , PKC β , PKC δ , or PKC ζ and with a secondary alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG. Recombinants PKC α , PKC β , PKC δ and PKC ζ were used as positive controls for immunoblotting.

Yeast phenotypic assay

Transformed yeast cells were grown to an OD₆₂₀ of approximately 1, collected by centrifugation and diluted to an OD₆₂₀ of 0.05 (Cary 1E Varian; Palo Alto, CA, USA) in selective-medium containing 2% galactose (gene transcription-inducer) and 3% glycerol (alternative carbon source). Diluted cultures (200 μ l) were transferred to microtitre plates and incubated for up to 100 hours with slow shaking, at 30 °C either in the presence of drugs or solvent (DMSO 0.1%; final concentration). In general, drug effects reached a plateau after 60 hours incubation and effects were based on the OD₆₂₀ measurements at 65 hours (BioRad Benchmark Microplate Reader; Hercules, CA, USA). The OD₆₂₀ determined in cultures incubated with solvent was considered as 0% growth inhibition. Growth inhibition values were estimated assuming that 100% inhibition (maximal effect) was that caused by PMA for the α , β and δ isoforms and arachidonic acid for the ζ isoform. IC₅₀ values were determined in each experiment as the concentration of drug that caused half of that maximal effect.

Statistical analysis

Results are given as arithmetic mean $\pm$ SEM and *n* represents the number of samples. Differences between means were tested for significance using one way ANOVA, followed by *post-hoc* Tukey's multiple comparison test. A *P* value lower than 0.05 was taken to be statistically significant.

Results

Expression of mammalian PKC α , PKC β , PKC δ , and PKC ζ was confirmed by immunoblotting using protein extracts of transformed yeast cells grown in the presence of the transcription inducer (2% galactose). The expression of these proteins resulted in a single antigenic band, which co-migrated with a recombinant protein of individual PKC isoforms. Protein extracts of transformed yeast cells grown in the absence of galactose did not present antigenic bands (Fig. 2).

A wide range of concentrations of PMA (considered as a standard activator for the classical and novel PKC isoforms) was tested in yeast expressing PKC α , PKC β and PKC δ . Concentrations higher than 10 μ M were not possible to test because

of its solubility in the medium. Since atypical PKC isoforms are not activated by phorbol esters (6), arachidonic acid was used as the standard activator for PKC ζ (13).

The solvent used (DMSO; final concentration 0.1%) did not change yeast growth either in the presence or in the absence of galactose. In the absence of galactose, neither PMA nor arachidonic acid altered yeast growth (not shown).

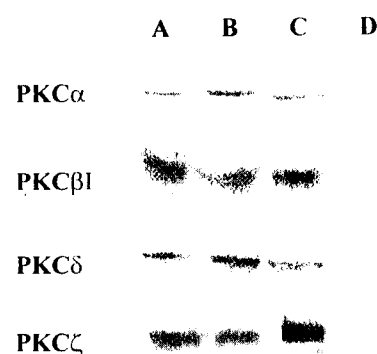


Fig. 2 Immunodetection of PKC α , PKC β , PKC δ and PKC ζ expressed in transformed *S. cerevisiae* (CG379). Shown are immunoblots obtained from proteins extracted from cultures grown in selective medium in the presence (A, B; duplicate samples) or in the absence (D) of 2% galactose (transcription inducer). Immunoblots

for recombinant PKC α (MW 76,799 Da), PKC β (MW 76,790 Da), PKC δ (MW 77,517 Da) or PKC ζ (MW 67,740 Da) proteins (positive controls) are also shown (C).

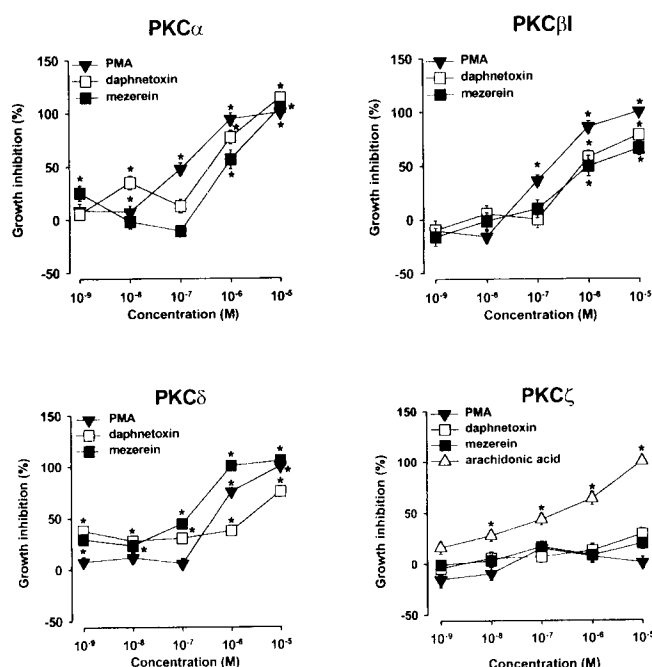


Fig. 3 Concentration-response curves for the effect of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), mezerein and daphnetoxin on the growth of yeast expressing mammalian PKC α , PKC β , PKC δ and PKC ζ (where arachidonic acid was also assayed). Transformed yeast cells were incubated with drugs or solvent (0.1% DMSO) and the effects measured at 65 hours incubation. 0% growth inhibition was considered that in the presence of solvent (control); 100% growth inhibition was assumed to be that caused by the standard PKC activator (10 μ M PMA for PKC α , PKC β and PKC δ ; 10 μ M arachidonic acid for PKC ζ). Shown are means $\pm$ SEM of 16 to 36 samples. Significant differences from control: * P < 0.05 (one way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test).

In the presence of galactose, PMA caused a concentration-dependent inhibition on the growth of yeast expressing PKC α , PKC β , or PKC δ . The maximal inhibition (100% growth inhibition) was considered that induced by 10 μ M PMA, resulting in a decrease of OD₆₂₀ values of $40.5 \pm 1.9\%$ ($n = 48$), $30.6 \pm 1.5\%$ ($n = 48$) and $23.6 \pm 0.9\%$ ($n = 48$) respectively. In yeast expressing PKC ζ , PMA failed to inhibit growth but arachidonic acid caused a concentration-dependent inhibition of growth. The maximal inhibition was considered that induced by 10 μ M arachidonic acid, resulting in a decrease of OD₆₂₀ values of $23.9 \pm 0.7\%$ ($n = 48$). Concentration-response curves for the effects of PMA in yeast expressing PKC α , PKC β , or PKC δ and for the effects of arachidonic acid in yeast expressing PKC ζ , are shown in Fig. 3.

To investigate whether daphnetoxin could activate PKC, yeast cells expressing PKC α , PKC β , PKC δ , or PKC ζ were incubated in the presence of daphnetoxin (1 nM – 10 μ M). To compare the selectivity of daphnetoxin and mezerein as PKC activators, the effects of mezerein (1 nM – 10 μ M) were also investigated on the same isoforms. In the absence of galactose, neither daphnetoxin nor mezerein altered yeast growth. In the presence of galactose, both compounds inhibited the growth of yeast expressing PKC α , PKC β or PKC δ , but failed to inhibit growth in yeast expressing PKC ζ (Fig. 3).

IC₅₀ values of daphnetoxin and mezerein obtained for each of the responsive PKC isoforms are presented in Table 1. These values show that mezerein has an IC₅₀ significantly lower on PKC δ than on PKC α (P < 0.05), whereas daphnetoxin has an IC₅₀ significantly lower on PKC α than on PKC δ (P < 0.05). Furthermore, differences in the potencies of mezerein and daphnetoxin to activate PKC α , PKC β or PKC δ are also shown: they are equipotent in inhibiting growth of yeast expressing PKC β , but daphnetoxin is more potent in yeast expressing PKC α and less potent in yeast expressing PKC δ .

Discussion

Compounds extracted from *Daphne* species are known to exhibit toxic effects evaluated by toxicity tests using goldfish (2), (11), (16) and by irritant effects in rat skin (8), (14). However, some of them may also exhibit antileukemic activity as shown by tests performed according to the standard protocols

Table 1 Potencies of mezerein and daphnetoxin in inhibiting growth of yeast expressing PKC α , PKC β , PKC δ or PKC ζ

	IC ₅₀ (nM)			
Compound	PKC α	PKC β	PKC δ	PKC ζ
PMA	295 $\pm$ 48	243 $\pm$ 69*	574 $\pm$ 37*	ND
mezerein	1190 $\pm$ 237*	908 $\pm$ 46	141 $\pm$ 25* ¹	ND
daphnetoxin	536 $\pm$ 183	902 $\pm$ 129	3370 $\pm$ 492 ¹	ND

IC₅₀ values are the concentration that caused 50% growth inhibition (100% growth inhibition was assumed that caused by 10 μ M PMA for PKC α , PKC β and PKC δ or 10 μ M arachidonic acid for PKC ζ). Transformed *S. cerevisiae* cells expressing PKC α , PKC β , PKC δ or PKC ζ were incubated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), mezerein, daphnetoxin or solvent (0.1% DMSO). Drugs were tested in a concentration range of 1 nM – 10 μ M and the effects determined at 65 hours incubation. Shown are means $\pm$ SEM. IC₅₀ is based on 20 samples in which compounds were tested in a concentration range of 1 nM – 10 μ M. ND: not determinable (when the maximal response reached was lower than 50% growth inhibition). Significant differences: from the IC₅₀ of daphnetoxin on the same PKC isoform, * P < 0.05; from the IC₅₀ of the same compound on PKC α , ¹ P < 0.05 (one way ANOVA followed by Tukey's test).

of the US National Cancer Institute (1), (2), (16). Mezerein is an example of a natural compound that exhibits this dual effect, exerting toxic (8) and antileukemic effects (2). However, daphnetoxin exerts toxic effects (11) without showing antileukemic activity (9). Mezerein is a PKC activator (5) and the question arises whether differences in the activity or in the selectivity to PKC isoforms are the explanation for the distinct patterns of effects exhibited by mezerein and daphnetoxin. This question is justified: the presence of a lipophilic group at C-12 in phorbol esters is considered critical for PKC activation (4). Mezerein and phorbol esters have a very close structural homology (3) and daphnetoxin differs from mezerein by not having a lipophilic substituent at C-12. Furthermore, the presence of a substituent at C-12 (as occurs with mezerein) has been considered a requirement for the antileukemic activity (15), (16).

The present study confirms that mezerein is an activator of the classical (α and β) and novel (δ) PKC isoforms (17). Furthermore it shows, for the first time, that daphnetoxin is a potent PKC activator, being capable of exerting a maximal effect comparable to that caused by PMA and mezerein in PKC isoforms of the classical and novel families. Its binding site is, probably, the same as for phorbol esters since, like PMA, daphnetoxin did not activate PKC ζ , an isoform of the atypical PKC family that lacks the phorbol ester binding site on their structure (6).

It is well accepted that different PKC isoforms fulfill different functions in the cell (7). Therefore, differences in the selectivity of PKC activators may cause differences in the pattern of PKC-mediated effects. Our results show that daphnetoxin and mezerein present different PKC selectivity: daphnetoxin is more potent than mezerein as a PKC α activator but much less potent as a PKC δ activator. PKC δ has been clearly involved in inhibition of cell growth (18). It is tempting to suggest that daphnetoxin does not exert the antiproliferative effects exhibited by mezerein, because of its lower potency to activate PKC δ .

In conclusion, the present study shows that daphnetoxin is an activator of the classical and novel PKC isoforms, differing from mezerein in its selectivity. A preferential activation of different PKC isoforms may well be the molecular basis for the distinct pattern of effects (toxic/antiproliferative) exerted by daphnanes.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Heimo Riedel (Wayne University, Detroit, USA) and Dr. Nigel Goode (Royal Veterinary College, London, UK) for the kind gift of the constructed yeast expression plasmids. We are grateful to Dr. Madalena Pinto for her invaluable comments. L. Saraiva is a recipient of a PhD grant from FCT (PRAXIS XXI/BD/18048/98). Supported by FCT (PRAXIS/PSAU/C/SAU/71/96 and Unidade de I&D n° 226/94, PRAXIS and FEDER).

References

- Felhauer M, Hecker E. Screening of Thymelaeaceae species for irritant, cocarcinogenic and antineoplastic activity. *Planta Medica* 1986; 52: 553–4
- Kupchan SM, Baxter RL. Mezerein: antileukemic principle isolated from *Daphne mezereum* L. *Science* 1975; 187: 652–3
- Jeffrey AM, Liskamp RMJ. Computer-assisted molecular modeling of tumor promoters: rationale for the activity of phorbol esters, teleocidin B, and aplysiatoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1986; 83: 241–5
- Slaga TJ, Fischer SM, Nelson K, Gleason GL. Studies on the mechanism of skin tumor promotion: evidence for several stages in promotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1980; 77: 3659–63
- Miyake R, Tanaka Y, Tsuda T, Kaibushi K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Activation of protein kinase C by non-phorbol tumor promoter, mezerein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984; 121: 649–56
- Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992; 258: 607–14
- Blumberg PM. Complexities of the protein kinase C pathway. *Molecular Carcinogenesis* 1991; 4: 339–44
- Ronlán A, Wickberg B. The structure of mezerein, a major toxic principle of *Daphne mezereum* L. *Tetrahedron Letters* 1970; 49: 4261–4
- Ulubelen A, Terem B, Tuzlaci E. Coumarins and flavonoids from *Daphne gnidioides*. *Journal of Natural Products* 1986; 49: 692–4
- Shieh HL, Hansen H, Zhu J, Riedel H. Differential protein kinase C ligand regulation detected *in vivo* by a phenotypic yeast assay. *Molecular Carcinogenesis* 1995; 12: 166–76
- Stout GH, Balkenhol WG, Poling M, Hickernell GL. The isolation and structure of daphnetoxin, the poisonous principle of *Daphne* species. *Journal of the American Chemical Society* 1970; 92: 1070–1
- Ito H, Yasuki F, Murata K, Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology* 1983; 153: 163–8
- Gailly P, Gong MC, Somlyo AV, Somlyo AP. Possible role of atypical protein kinase C activated by arachidonic acid in Ca²⁺ sensitization of rabbit smooth muscle. *Journal of Physiology* 1997; 500: 95–109
- Adolf W, Dossajit SF, Seip EH, Hecker E. Skin irritant diterpene orthoesters of daphnane type from *Peddiea africana* and *P. volkensii*. *Phytochemistry* 1985; 24: 2047–9
- Nyborg J, La Cour T. X-ray diffraction study of molecular structure and conformation of mezerein. *Nature* 1975; 257: 824–5
- Kupchan SM, Sweeny JG, Baxter RL, Murae T, Zimmerly VA, Sickles BR. Gnididin, gniditrin, and gnidicin, novel potent antileukemic diterpenoid esters from *Gnidia lamprantha*. *Journal of the American Chemical Society* 1975; 97: 672–3
- Geiges D, Meyer T, Marte B, Vanek M, Weissgerber G, Stabel S et al. Activation of protein kinase C subtypes α , γ , δ , ϵ , ζ and η by tumor-promoting and nontumor-promoting agents. *Biochemical Pharmacology* 1997; 53: 865–75
- Fujii T, García-Bermejo ML, Bernabó JL, Caamaño J, Ohba M, Kuraki T et al. Involvement of protein kinase C δ (PKC δ) in phorbol ester-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 7574–82

Prof. Dr. J. Gonçalves

Department of Pharmacology
Faculty of Pharmacy, University of Porto
Rua Aníbal Cunha, 164
4050-047 Porto
Portugal
E-mail: jorgemmg@mail.ff.up.pt
Fax: +351 222078969

ANEXO

Neste anexo são apresentados os trabalhos adicionais realizados com a dafnetoxina e a mezereína. Estes dois compostos foram, também, estudados numa outra isoforma das nPKCs (PKC- η), entretanto expressa de forma funcional na *S. cerevisiae* CG379, complementando o estudo já publicado (*Planta Med.*, 2001, **67**, 787-790). Além disso, foi efectuado o estudo morfológico das leveduras que expressavam a PKC- α , - β I, - δ , - η ou - ζ de mamífero, quando incubadas na presença da dafnetoxina ou mezereína.

I. Efeitos da dafnetoxina e mezereína nas leveduras que expressavam a PKC- η

Após a obtenção de leveduras transformadas capazes de expressar, de forma funcional, a PKC- η , procedeu-se ao estudo do efeito da dafnetoxina e do activador da PKC, mezereína, nesta isoforma, usando o ensaio fenotípico das leveduras transformadas.

RESULTADOS

Na presença da galactose, a dafnetoxina e a mezereína, na concentração de 10^{-5} M, inibiram, de forma marcada, o crescimento das leveduras que expressavam a PKC- η .

Para a comparação da potência da dafnetoxina e da mezereína, na PKC- η , estes compostos foram testados num intervalo de concentrações de 10^{-11} – 10^{-5} M, em leveduras que expressavam essa isoforma. Foram obtidas as curvas de concentração-resposta (Figura 1) e determinados os valores de EC_{50} para ambos os compostos.

PKC- η

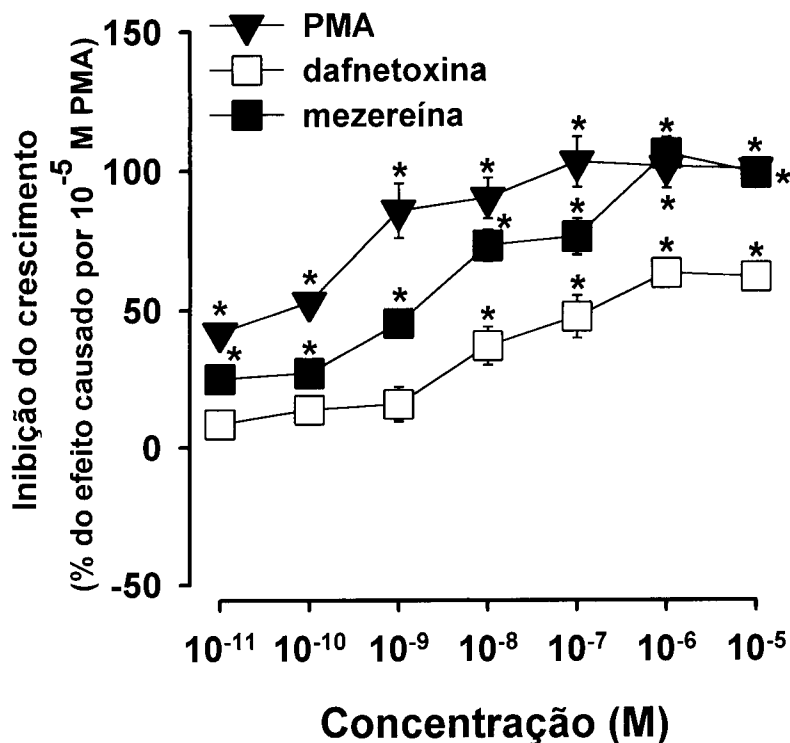


Figura 1. Curvas de concentração-resposta para os efeitos do PMA, dafnetoxina e mezereína no crescimento das leveduras que expressavam a PKC- η de mamífero. Os valores de inibição do crescimento são expressos em percentagem do efeito causado por 10^{-5} M PMA e correspondem à média $\pm$ erro padrão da média de 4 a 9 ensaios realizados em quadruplicado. Crescimento das leveduras em presença do composto significativamente diferente do obtido apenas na presença do solvente: * $P < 0,05$; *one way* análise de variância (ANOVA) seguido do teste *t* de Tukey.

Na Tabela 1 são apresentados os valores de EC_{50} obtidos para a dafnetoxina, mezereína e para o activador padrão da PKC, PMA, em leveduras que expressavam as isoformas clássicas (α ou β I) ou novel (δ ou η) da PKC de mamífero.

Na PKC- η , a dafnetoxina apresentou um valor de EC₅₀ muito superior (184 vezes superior) ao da mezereína. No caso da dafnetoxina, o valor de EC₅₀ obtido na PKC- η foi idêntico ao obtido na PKC- δ . Contudo, foi significativamente superior aos valores de EC₅₀ obtidos nas cPKCs (α e β I). O oposto foi observado com a mezereína, cujo valor de EC₅₀ na PKC- η foi significativamente inferior aos valores obtidos nas cPKCs (α e β I), sendo, ainda, significativamente inferior ao valor de EC₅₀ obtido na PKC- δ .

Tabela 1. Valores de EC₅₀ obtidos para o PMA, mezereína e dafnetoxina, nas leveduras que expressavam a PKC- α , - β I, - δ ou - η de mamífero.

Compostos	EC ₅₀ (nM)			
	PKC- α	PKC- β I	PKC- δ	PKC- η
PMA	295 $\pm$ 48 [#]	243 $\pm$ 69 ^{*#}	574 $\pm$ 37 ^{*#}	0,1 $\pm$ 0,01 [*]
Mezereína	1190 $\pm$ 237 ^{*#}	908 $\pm$ 46 [#]	141 $\pm$ 25 ^{*#}	19 $\pm$ 6 [*]
Dafnetoxina	536 $\pm$ 183 [#]	902 $\pm$ 129 [#]	3370 $\pm$ 492	3500 $\pm$ 703

Os valores de EC₅₀ correspondem à concentração do composto que causou 50 % da inibição do crescimento causada por 10⁻⁵ M PMA. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ erro padrão da média de 5 ensaios realizados em quadruplicado. Valores de EC₅₀ significativamente diferentes: do obtido na PKC- η , [#]*P* < 0,05; do obtido com a dafnetoxina na mesma isoforma da PKC, ^{*}*P* < 0,05 (*one way* análise de variância, ANOVA, seguido do teste *t* de Tukey).

DISCUSSÃO

O presente estudo veio complementar o publicado (*Planta Med.*, 2001, **67**, 787-790), permitindo comparar os efeitos da dafnetoxina e mezereína numa outra isoforma da família novel da PKC (PKC- η), família onde a dafnetoxina parecia ser menos potente e a mezereína mais potente.

Este trabalho revelou, pela primeira vez, que a dafnetoxina é capaz de activar a PKC- η e confirmou a capacidade da mezereína activar esta isoforma (Geiges *et al.*, 1997). Além disso, veio comprovar a referida diferença de potências apresentada por estes dois compostos para as isoformas da PKC, sustentando a selectividade da dafnetoxina para as cPKCs e da mezereína para as nPKCs.

Em conclusão, este estudo adicional veio apoiar a hipótese de que, as diferenças na selectividade destes compostos para as isoformas da PKC poderão constituir a base molecular capaz de explicar os diferentes efeitos biológicos apresentados por estes dois compostos análogos.

II. Estudo morfológico das leveduras que expressavam a PKC- α , - β I, - δ , - η ou - ζ de mamífero, incubadas na presença da dafnetoxina ou mezereína

A observação microscópica das leveduras transformadas, incubadas em meio galactosado e na presença de 10^{-5} M dafnetoxina ou mezereína, revelou que ambos os compostos causavam alterações morfológicas idênticas às originadas pelo PMA (*Capítulo III*, Figura 8), nas leveduras que expressavam a PKC- α , - β I, - δ ou - η de mamífero. No entanto, tal como o PMA, estes compostos não originaram alterações morfológicas nas leveduras que expressavam a PKC- ζ .

Não foram observadas alterações morfológicas nas leveduras transformadas incubadas em meio glucosado e na presença de 10^{-5} M de dafnetoxina ou mezereína.

CAPÍTULO VII

EUXANTONA

SARAIVA L., FRESCO P., PINTO E., KIJJOA A., GONZALEZ M., GONÇALVES J. (2002)
Differential activation of protein kinase C isoforms by euxanthone, revealed by
an *in vivo* yeast phenotypic assay. *Planta Med.*, 68, 1039-1041.

- ⁶ Huang RL, Chen CC, Huang HL, Chang CG, Chen CF, Chang C, Hsieh MT. Anti-hepatitis B virus effects of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. *Planta Medica* 2000; 66: 694–8
- ⁷ Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1472: 643–50
- ⁸ Ohtsuka M, Fukuda K, Yano H, Kojiro M. Effects of nine active ingredients in Chinese herbal medicine sho-saiko-to on 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide mutagenicity. *Jap J Cancer Res* 1995; 86: 1131–5
- ⁹ Chi YS, Jong HG, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 185–91
- ¹⁰ Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 59–65
- ¹¹ Wakabayashi I. Inhibitory effects of baicalein and wogonin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages. *Pharmacol Toxicol* 1999; 84: 88–91
- ¹² Kim H, Kim YS, Kim SY, Suk K. The plant flavonoid wogonin suppresses death of activated C6 rat glial cells by inhibiting nitric oxide production. *Neurosci Lett* 2001; 309: 67–71
- ¹³ Kim HM, Moon EJ, Li E, Kim KM, Nam SY, Chung CK. The nitric oxide-producing activities of *Scutellaria baicalensis*. *Toxicology* 1999; 135: 109–15
- ¹⁴ Wu KK. Aspirin and salicylate: An old remedy with a new twist. *Circulation* 2000; 102: 2022–3
- ¹⁵ Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Met* 1983; 65: 55–63
- ¹⁶ Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–9
- ¹⁷ Wasser S, Ho JM, Ang HK, Tan CE. *Salvia miltiorrhiza* reduces experimentally-induced hepatic fibrosis in rats. *J Hepatol* 1998; 29: 760–71

Differential Activation of Protein Kinase C Isoforms by Euxanthone, Revealed by an *In Vivo* Yeast Phenotypic Assay

Lucília Saraiva^{1,2}, Paula Fresco¹, Eugénia Pinto², Anake Kijjoa³, Maria José Gonzalez⁴, Jorge Gonçalves¹

Abstract

The protein kinase C (PKC) modulatory effects of euxanthone, isolated from the wood of *Cratoxylum maingayi*, on isoforms α , β I, δ , η and ζ were characterised using an alternative *in vivo* yeast phenotypic assay. The present study shows that euxanthone can activate isoforms α , β I, δ , η and ζ , being more effective on PKC- β I, - δ , - η and - ζ than the established PKC activators used (the phorbol ester PMA and arachidonic acid for PKC- ζ). Furthermore, euxanthone presents differences on its potency towards individual PKC isoforms, showing a remarkable selectivity for PKC- ζ . These results can help to clarify the molecular basis of the euxanthone-mediated effects.

Euxanthone (1,7-dihydroxyxanthone) (Fig. 1) obtained from several medicinal plants such as *Polygala caudate*, has been reported to induce differentiation of neuroblastoma Neuro 2A (BU-1) cells [1], an effect recently ascribed to a differential expression of protein kinase C (PKC) isoforms [2]. This conclusion is supported by the observation that, like the well known PKC activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), euxanthone caused differentiation of neuroblastoma cells, an effect blocked by Go6976, a selective PKC inhibitor [2].

PKC is a multifamily of serine-threonine kinases. According to their primary structure and cofactor requirements, PKC isoforms are grouped into at least three families: the classical PKCs (cPKCs; α , β I, β II and γ), the novel PKCs (nPKCs; δ , ϵ , θ and η) and the atypical PKCs (aPKCs; λ and ζ) [3].

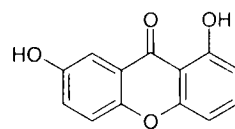


Fig. 1 Chemical structure of euxanthone (1,7-dihydroxyxanthone).

Affiliation: ¹ Serviço de Farmacologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal · ² Serviço de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal · ³ Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, Portugal · ⁴ Serviço de Química Orgânica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal

Correspondence: Dr. Jorge Gonçalves · Laboratório de Farmacologia · Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto · Rua Aníbal Cunha 164 · P 4050-047 Porto, Portugal · Phone: +351 222078932 · Fax: +35122078969 · E-mail: jorge.goncalves@ff.up.pt

Received: April 8, 2002 · **Accepted:** June 1, 2002

Bibliography: *Planta Med* 2002; 68: 1039–1041 · © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0032-0943

The differentiation of neuroblastoma cells induced by euxanthone was accompanied by up-regulation of the PKC-isoforms α , β , δ , λ and ζ [2]. PKC- ζ has been reported to be involved in the differentiation of neuroblastoma cells [4], [5]. However, this isoform was only slightly up-regulated what may indicate a low potency of euxanthone to activate this isoform.

The yeast phenotypic assay is an alternative *in vivo* assay based on the growth inhibition (reflecting an increase in the cell doubling time) of transformed yeast cells, which is proportional to the degree of activation of the mammalian PKC isoform expressed [6]. Because only a mammalian PKC isoform is functionally expressed separately and effects not mediated by this protein can easily be detected by measuring growth in the absence of isoform expression, it is a convenient method to elucidate the selectivity of potential PKC activators. Therefore, the aim of the present work was to confirm, in a system where a single PKC isoform is expressed, if euxanthone is a PKC activator and, if so, to characterise its potency and selectivity towards individual isoforms.

Euxanthone was isolated by our group from the wood of *Cratogeomys maynardi* [7] and was tested on yeast expressing individual mammalian PKC- α , - β , - δ , - η or - ζ . Expression of mammalian PKC isoforms was confirmed by immunoblotting, using protein extracts of yeast cells transformed with plasmids encoding the genes for single mammalian PKC isoforms, grown in the presence of the transcription inducer (2% galactose). Expression of each of these proteins resulted in a single antigenic band, which co-migrated with the respective PKC isoform recombinant protein. Protein extracts of transformed yeast cells grown in the absence of galactose did not present antigenic bands (not shown).

PMA (considered as a standard activator for cPKC and nPKC isoforms) was tested in yeast expressing PKC- α , - β , - δ or - η . Since atypical PKC isoforms are not activated by phorbol esters, arachidonic acid was used as the standard activator for PKC- ζ [8]. In the absence of PKC expression (galactose absent), neither PMA nor arachidonic acid altered yeast growth (not shown). The solvent used (DMSO; final concentration 0.1%) did not change yeast growth either in the presence or in the absence of galactose. In the presence of PKC expression (galactose present), PMA caused a concentration-dependent inhibition on the growth of yeast expressing PKC- α , - β , - δ or - η , with IC_{50} values of (nM) 112 ± 18 , 243 ± 69 , 574 ± 37 and 0.1 ± 0.01 , respectively ($n = 20$). In yeast expressing PKC- ζ , arachidonic acid, but not PMA, caused a concentration-dependent inhibition on the growth of yeast expressing this isoform, with an IC_{50} of 205 ± 33 nM ($n = 20$).

To investigate whether euxanthone activates mammalian PKC isoforms, yeast cells expressing PKC- α , - β , - δ , - η or - ζ were incubated in the presence of this compound in concentrations from 10^{-11} up to 10^{-5} M. Concentrations higher than 10^{-5} M were not tested because effects non mediated by PKC were detected (inhibition of yeast growth in the absence of galactose). In the presence of galactose, euxanthone caused a concentration-dependent inhibition of the growth of transformed yeast (Fig. 2; results are expressed as % of the effect caused by 10^{-5} M of the respective standard PKC activator). Euxanthone, at the maximal concentration tested, showed a remarkable efficacy on yeast expressing PKC- β , - δ , - η and - ζ , causing a growth inhibition that exceeded that caused by the PKC activators used (PMA; arachidonic acid for PKC- ζ). Euxanthone further showed marked differences on its potency to activate the PKC isoforms tested (see Table 1). According to the IC_{50} values, the rank order of potency obtained was PKC- $\zeta > -\eta > -\delta > -\beta > -\alpha$ (for definition of the rank order of potency, $>$ was applied only when the IC_{50} for the PKC isoform placed at the left was significantly lower than that of the isoform placed at the right of the signal; otherwise $=$ was applied; $P < 0.05$; unpaired Student's *t* test). Furthermore, euxanthone was more potent than the respective PKC activator on isoforms δ and ζ (see Table 1).

The influence of the specific PKC-inhibitor chelerythrine [9] on the euxanthone-induced growth inhibition was also studied. In the

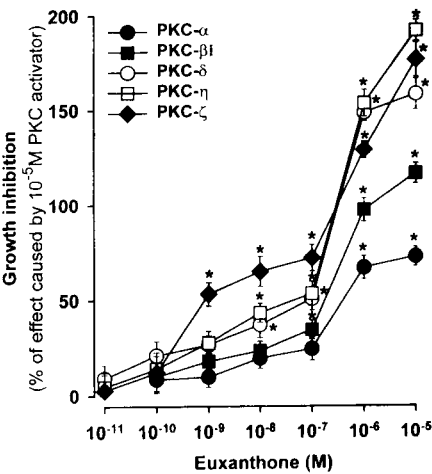


Fig. 2 Concentration-response curves for the effects of euxanthone on the growth of yeast expressing the indicated mammalian PKC isoforms (α , β , δ , η or ζ). Results are expressed as % of the effect caused by 10^{-5} M of the respective standard PKC activator. Shown are means $\pm$ SEM of 20 – 32 determinations. Yeast growth significantly different from solvent: * $P < 0.05$ (paired Student's *t* test).

Table 1 IC_{50} values of euxanthone and of the respective PKC activator on PKC- α , - β , - δ , - η or - ζ

Compound	IC_{50} (nM)				
	PKC- α	PKC- β	PKC- δ	PKC- η	PKC- ζ
PKC activator	$112 \pm 18^{**}$	243 ± 69	$574 \pm 37^{**}$	$0.1 \pm 0.01^{**}$	$205 \pm 33^{**}$
Euxanthone	$449 \pm 15^{**}$	$121 \pm 7^{**}$	$81 \pm 5^{**}$	$39 \pm 3^{**}$	$1 \pm 0.1^{**}$

IC_{50} values were considered the concentration that caused 50% of the maximal growth inhibition; 100% growth inhibition was assumed to be that caused by 10^{-5} M of the respective PKC activator (PMA for PKC- α , - β , - δ and - η /PK; arachidonic acid for PKC- ζ). Shown are means $\pm$ SEM of 20 determinations. ** $P < 0.001$, different from PKC- ζ ; *** $P < 0.001$, different from euxanthone (unpaired Student's *t* test).

absence of expression of the mammalian PKC isoform (galactose absent), chelerythrine (10^{-5} M) did not influence yeast growth. In the presence of expression (galactose present), euxanthone (10^{-6} M) was tested alone and combined with chelerythrine (10^{-5} M). As shown in Fig. 3, 10^{-5} M chelerythrine markedly reduced the euxanthone-induced growth inhibition on isoforms tested.

The results of the present study, obtained in a model that allows a more direct evaluation of effects mediated by a single mammalian PKC isoform, indicate that euxanthone is a PKC activator. It further shows that euxanthone has a very high potency to activate PKC- ζ whereas its potency to activate isoforms of the cPKC family is the lowest among the isoforms investigated. The present study supports that the reported euxanthone-induced differentiation of neuroblastoma cells [1] may be due to a direct activation of PKC isoforms by euxanthone. However, the high potency of euxanthone to activate PKC- ζ , observed in the present study, contrasts with the observation that PKC- ζ was only slightly up-regulated when compared with other PKC isoforms [2]. This discrepancy questions the use of isoform up-regulation as an indicator of the potency and selectivity of a PKC activator.

Material and Methods

Euxanthone (1,7-dihydroxyxanthone) was isolated from the wood of *Cratogeomys maingayi* as described previously [7]. The xanthone was found to have a purity $\geq 95\%$ by TLC [7]. Arachidonic acid sodium salt, chelerythrine chloride and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) were from SIGMA (Sigma Aldrich Química, Sintra, Portugal). Drugs were dissolved in DMSO and the final concentration in the yeast cultures never exceeded 0.1% (v/v). Yeast transformation was performed as described for PKC- α , - β I, - δ and - ζ [6]. YEplac181, encoding the cDNA for the mouse PKC- η (kindly offered by Dr. Nigel Goode, Royal Veterinary College, London, UK) was also used. Cell lysis, immunoblotting and the yeast phenotypic assay was carried out basically as described previously [6].

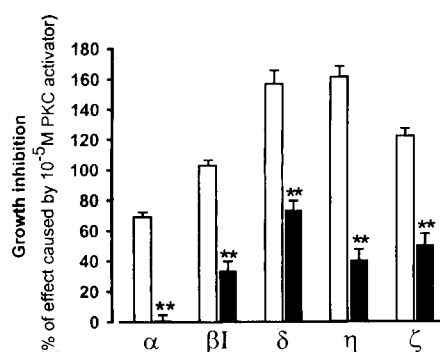


Fig. 3 Effect of the PKC-inhibitor chelerythrine on the euxanthone-induced inhibition of growth of yeast expressing the indicated mammalian PKC isoforms (α , β I, δ , η or ζ). Euxanthone (10^{-6} M) was tested in the absence (open columns) or in the presence of chelerythrine (10^{-5} M) (filled columns). Results are expressed as % of the effect caused by 10^{-5} M of the respective standard PKC activator. Shown are means $\pm$ SEM of 24 determinations. Yeast growth significantly different from that caused by euxanthone alone: ** $P < 0.001$ (unpaired Student's t test).

OD_{620} was routinely monitored and the difference between the maximal OD_{620} reached and that measured at the beginning of incubation was used as an index of yeast growth. Drugs or solvent were added at the beginning and kept throughout incubation. Yeast growth in the presence of drugs was expressed as percentage of growth observed in parallel experiments in the presence of solvent; it was further transformed into growth inhibition by subtracting that value from 100. Because growth inhibition caused by a maximal concentration of the standard PKC activator varied between isoforms, 100% growth inhibition was assumed to be that caused by 10^{-5} M PMA (or arachidonic acid for PKC- ζ), in order to standardise the maximal inhibition reachable; 0% growth inhibition would occur when growth in the presence of drugs was identical to that in the presence of solvent.

Effects of drugs were expressed as percentage of that effect. Concentration-response curves were obtained by incubating yeast cells with euxanthone (10^{-11} – 10^{-5} M); Fig. 2 shows mean values of 5–8 experiments. IC_{50} values were obtained from individual experiments by estimation of the concentration that caused 50% of the growth inhibition caused by 10^{-5} M of the standard PKC activator.

References

- Mak N-K, Li W-K, Zhang M, Wong RN-S, Tai L-S, Yung KK-L, Leung H-W. Effects of euxanthone on neuronal differentiation. *Life Sciences* 2000; 66: 347–54
- Mak N-K, Lung HL, Wong R-NS, Leung H-W, Tsang HY, Leung KN. Expression of protein kinase C isoforms in euxanthone-induced differentiation of neuroblastoma cells. *Planta Medica* 2001; 67: 400–5
- Jaken S. Protein kinase C isozymes and substrates. *Current Opinion Cell Biology* 1996; 8: 168–73
- Wooten MW. Function for NF- κ B in neuronal survival: regulation by atypical protein kinase C. *Journal of Neuroscience Research* 1999; 58: 607–11
- Wooten MW, Seibenhener ML, Zhou G, Vandenplas ML, Tan TH. Overexpression of atypical PKC in PC12 cells enhances NGF-responsiveness and survival through an NF- κ B dependent pathway. *Cell Death and Differentiation* 1999; 6: 753–64
- Saraiva L, Fresco P, Pinto E, Portugal H, Gonçalves J. Differential activation by daphnetoxin and mezerein of PKC-isotypes α , β I, δ and ζ . *Planta Medica* 2001; 67: 787–90
- Kijjoo A, Gonzalez MJ, Pinto MM, Damas AM, Mondranondra I-O, Silva AM, Herz W. Xanthenes from *Cratogeomys maingayi*. *Phytochemistry* 1998; 49: 2159–62
- Nakanishi H, Exton JH. Purification and characterization of the ζ isoform of protein kinase C from bovine kidney. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 16347–54
- Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1990; 172: 993–9

CAPÍTULO VIII

DERIVADOS XANTÓNICOS: XANTONAS ACTIVADORAS DA PKC

SARAIVA L., FRESCO P., SOUSA E., PINTO E., PINTO M., GONÇALVES J. (2002)
Synthesis and *in vivo* modulatory activity of protein kinase C of xanthone
derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 3219-3227.



Pergamon

Bioorganic & Medicinal Chemistry 10 (2002) 3219–3227

BIOORGANIC &
MEDICINAL
CHEMISTRY

Synthesis and In Vivo Modulatory Activity of Protein Kinase C of Xanthone Derivatives

Lucília Saraiva,^{a,b} Paula Fresco,^a Eugénia Pinto,^b Emília Sousa,^c Madalena Pinto^c and Jorge Gonçalves^{a,*}

^a*Serviço de Farmacologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal*

^b*Serviço de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal*

^c*Serviço de Química Orgânica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal*

Received 2 April 2002; accepted 22 May 2002

Abstract—The modulatory activity of a series of 20 simple xanthenes on isoforms α , β I, δ , η and ζ of protein kinase C (PKC) was evaluated using an in vivo yeast phenotypic assay. Hydroxy and/or methoxyxanthenes were synthesised. The majority of these compounds caused an effect compatible with activation of PKC and some showed to be more effective than the standard PKC activator (PMA or arachidonic acid). The xanthenes tested differ in their efficacy and potency towards individual PKC isoforms and some showed higher selectivities for PKC- δ , - η or - ζ , suggesting that xanthone derivatives can become valuable research tools to elucidate the physiological roles of these isoforms. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Introduction

Protein kinase C (PKC) is a multifamily of serine-threonine kinases. According to their primary structure and cofactor requirements, PKC isoforms are grouped into at least three families: the classical PKCs (cPKCs), which include the isoforms α , β I, β II and γ ; the novel (nPKCs), which include the isoforms δ , ϵ , θ , and η ; and the atypical PKCs (aPKCs), which include the isoforms λ and ζ .^{1,2} Important roles in cellular functions such as growth, differentiation, tumor promotion and apoptosis^{3,4} have been ascribed to PKC. The knowledge of specific roles attributable to individual PKC isoform has been hampered by the lack of isoform-selective drugs. Similarly, the search for selective drugs has also been prevented by the lack of an in vivo method in which effects of drugs on a single mammalian PKC isoform can be tested. The in vitro assays use single isoforms, which are, nevertheless, difficult to isolate and purify. Furthermore, in this type of assays it is not possible to fully reproduce the interactions occurring in vivo between PKC and cellular constituents. These methodological difficulties can be circumvented by using the yeast phenotypic assay. This is an in vivo assay, based

on the growth inhibition (reflecting an increase in the cell doubling time) of yeast expressing an individual mammalian PKC isoform, which is proportional to the degree of PKC activation.^{5,6}

Natural and synthetic xanthenes have been reported to mediate several important biological activities namely anti-tumor,^{7–11} anti-inflammatory,¹² anti-thrombotic¹³ and neuropharmacological effects.^{14–16} Recently, some studies have suggested that these compounds may act, at least in part, by interacting with PKC. Prenylated xanthenes have been shown to interact with eukaryote kinases in vitro, namely PKC.^{17,18} Norathyriol (1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone) reduced the PMA-induced respiratory burst and aggregation, an effect ascribed to a PKC inhibition.¹⁹ Furthermore, 1,7-dihydroxyxanthone can mimic the induction of neuroblastoma cell differentiation caused by PKC activators, such as PMA, an effect blocked by PKC inhibitors.²⁰

In the present study, the effects of a series of twenty simple xanthenes (9H-xanthen-9-ones) on PKC isoforms α and β I (cPKCs), δ and η (nPKCs) and ζ (aPKCs) were characterized using the yeast phenotypic assay. With the exception of the xanthone itself, all xanthenes were obtained by synthesis by our group. The criteria for the design of the compounds was the molecular rigidity associated with the xanthone nucleus

*Corresponding author. Tel.: +351-22-2078-932; fax: +351-22-2078-969; e-mail: jorge.goncalves@ff.up.pt

and the absence of groups with the possibility of conformational isomerism. All the compounds are mono or dioxygenated in one or in the two aromatic rings (Table 1).

Our results show that these simple xanthenes interact with PKC causing an effect compatible with a PKC activation. This screening also revealed that these compounds differ on their efficacy and potency to activate individual PKC isoforms and some showed effects higher than the standard PKC activators (PMA for cPKCs and nPKCs and arachidonic acid for aPKCs), what can be explored to develop new selective PKC activators.

Results

Expression of mammalian PKC- α , PKC- β I, PKC- δ , PKC- η and PKC- ζ was confirmed by immunoblotting, using protein extracts of yeast cells, transformed with the gene of a single mammalian PKC isoform, grown in the presence of the transcription inducer (2% galactose). Expression of each of these PKC isoforms resulted in a single antigenic band, which co-migrated with the respective recombinant protein. Protein extracts of transformed yeast cells grown in the absence of galactose did not present antigenic bands (Fig. 1).

A wide range of concentrations of PMA (considered as a standard activator for the classical and novel PKC isoforms) was tested in yeast expressing PKC- α , PKC- β I, PKC- δ and PKC- η . Concentrations higher than 10^{-5} M were not possible to test due to its low solubility in the medium. Since atypical PKC isoforms are not activated by phorbol esters,²¹ arachidonic acid was used as the standard activator for PKC- ζ .²²

In the presence of galactose, PMA caused a concentration-dependent inhibition on the growth of yeast expressing individual cPKCs or nPKCs isoforms, with IC_{50} values (nM) of 112 ± 18 (PKC- α), 243 ± 69 (PKC- β I), 574 ± 37 (PKC- δ) and 0.1 ± 0.01 (PKC- η) ($n = 20$). In yeast expressing PKC- ζ , arachidonic acid, but not PMA, caused a concentration-dependent inhibition on the growth of yeast expressing this isoform, with an IC_{50} of 205 ± 33 nM ($n = 20$).

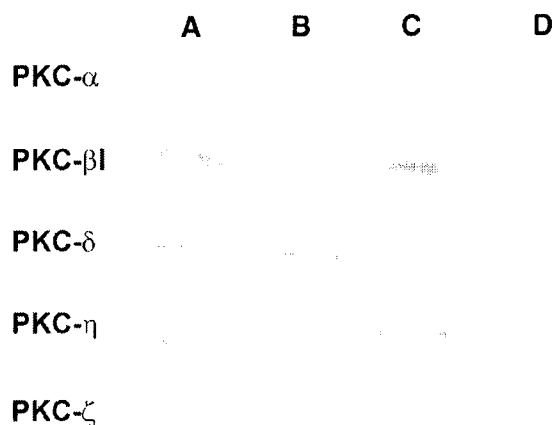
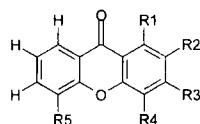


Figure 1. Immunodetection of PKC- α , - β I, - δ , - η and - ζ isoforms expressed in transformed *Saccharomyces cerevisiae* (CG379). Individual immunoblots are presented in a horizontal arrangement and were obtained from proteins extracted from cultures grown in selective medium in the presence of 2% galactose (lanes A and B; duplicate samples) or in the absence of 2% galactose (lane D). Positive controls (lane C) were obtained using recombinant proteins PKC- α (MW 76,799 Da), PKC- β I (MW 76,790 Da), PKC- δ (MW 77,517 Da), PKC- η (MW 77,600 Da) and PKC- ζ (MW 67,740 Da).

Table 1. Chemical structures of xanthone derivatives



Compound		R1	R2	R3	R4	R5
1	Xanthone	H	H	H	H	H
2	1-Hydroxyxanthone	OH	H	H	H	H
3	1-Methoxyxanthone	OCH ₃	H	H	H	H
4	2-Hydroxyxanthone	H	OH	H	H	H
5	2-Methoxyxanthone	H	OCH ₃	H	H	H
6	3-Hydroxyxanthone	H	H	OH	H	H
7	3-Methoxyxanthone	H	H	OCH ₃	H	H
8	4-Hydroxyxanthone	H	H	H	OH	H
9	4-Methoxyxanthone	H	H	H	OCH ₃	H
10	1,2-Dihydroxyxanthone	OH	OH	H	H	H
11	1,2-Dimethoxyxanthone	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H
12	2,3-Dihydroxyxanthone	H	OH	OH	H	H
13	2,3-Dimethoxyxanthone	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
14	3,4-Dimethoxyxanthone	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
15	3,5-Dihydroxyxanthone	H	H	OH	H	OH
16	3,5-Dimethoxyxanthone	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃
17	3-Hydroxy-4-Methoxyxanthone	H	H	OH	OCH ₃	H
18	3-Hydroxy-5-Methoxyxanthone	H	H	OH	H	OCH ₃
19	4-Hydroxy-3-Methoxyxanthone	H	H	OCH ₃	OH	H
20	1,3-Dihydroxy-2-Methylxanthone	OH	CH ₃	OH	H	H

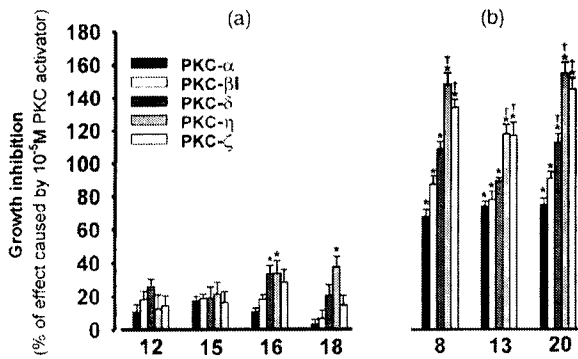


Figure 2. Effects of xanthenes on the growth of yeast expressing individual PKC isoforms (α , β I, δ , η or ζ): (a) not effective xanthenes; (b), xanthenes effective in all PKC isoforms. Yeast cells expressing the indicated mammalian PKC isoform were incubated with xanthenes (10^{-5} M) or solvent (DMSO, 0.1% final concentration; see Experimental for details). Shown are means $\pm$ SEM of 30–48 determinations. Yeast growth significantly different from solvent: * p < 0.05 (paired Student's t -test), $^{\dagger}p$ < 0.05 significantly higher than the maximal effect caused by 10^{-5} M of PKC activator (unpaired Student's t -test).

In the absence of galactose, neither PMA nor arachidonic acid altered yeast growth. Furthermore, the solvent used (DMSO; final concentration 0.1%) did not change yeast growth either in the presence or in the absence of galactose (not shown).

To investigate whether xanthone derivatives (Table 1) could behave as PKC activators, yeast cells expressing PKC- α , PKC- β I, PKC- δ , PKC- η or PKC- ζ were incubated in the presence of each of these compounds. On a first approach each xanthone was tested in a single concentration (10^{-5} M). In the absence of galactose, none of the xanthenes tested altered yeast growth (data not shown). In the presence of galactose, the majority of these compounds were able to inhibit the growth of yeast expressing individual PKC isoforms.

The series of 20 xanthone derivatives tested in the present study were first grouped according to their efficacy. Efficacy was evaluated by their ability to elicit a significant growth inhibition, compared to growth in the presence of solvent (DMSO; 0% growth inhibition) and growth in the presence of 10^{-5} M of the respective PKC acti-

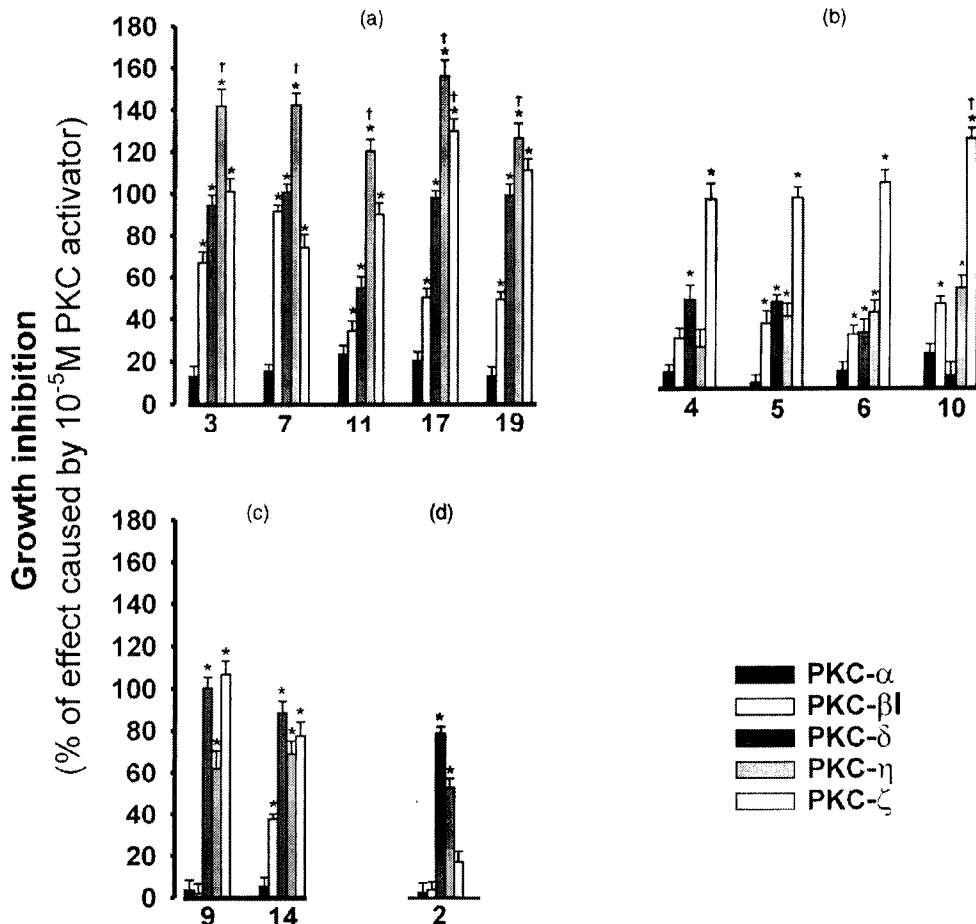


Figure 3. Effects of xanthenes showed to be not effective on PKC- α , on the growth of yeast expressing individual PKC isoforms (α , β I, δ , η or ζ): (a) xanthenes highly effective on PKC- η ; (b) xanthenes highly effective on PKC- ζ ; (c) xanthenes effective on nPKC and aPKC isoforms; (d) xanthenes only effective on nPKC isoforms. Yeast cells expressing the indicated mammalian PKC isoform were incubated with xanthenes (10^{-5} M) or solvent (DMSO, 0.1% final concentration; see Experimental for details). Shown are means $\pm$ SEM of 30–48 determinations. Yeast growth significantly different from solvent: * p < 0.05 (paired Student's t -test), $^{\dagger}p$ < 0.05 significantly higher than the maximal effect caused by 10^{-5} M of PKC activator (unpaired Student's t -test).

vator (PMA for PKC- α , - β I, - δ and - η ; arachidonic acid for PKC- ζ ; 100% growth inhibition). From the series of xanthenes tested, a group of four (**12**, **15**, **16** and **18**) was considered not effective in any PKC isoform (Fig. 2a) because they did not cause a growth inhibition that reached at least half of the growth inhibition caused by the respective PKC activator.

A group of three xanthenes (**8**, **13** and **20**) was effective in all PKC isoforms (Fig. 2b). It is important to highlight the efficacy of these xanthenes on yeast expressing nPKCs (δ and η) and aPKC (PKC- ζ) isoforms. With the exception of xanthone **13** on yeast expressing PKC- δ , all caused inhibition of yeast growth that exceeded those caused by the standard PKC activator. On cPKCs the efficacy of these xanthenes was lower than that caused by the standard PKC activator.

The remaining xanthenes were effective in some but not in all PKC isoforms. They were tentatively grouped according to the isoform(s) in which they were not effective. A group of 12 xanthenes was found to be inactive on PKC- α (Fig. 3). From this group, compounds **3**, **7**, **11**, **17**, and **19** (Fig. 3a) presented high efficacies on PKC- η , causing maximal inhibitions higher than those caused by PMA. Compounds **4**, **5**, **6** and **10** (Fig. 3b) caused a growth inhibition on yeast expressing PKC- ζ much more pronounced than that observed on yeast expressing the other isoforms. Compounds **9** and **14** were similarly effective on yeast expressing nPKCs and aPKC isoforms (Fig. 3c). Compound **2** was effective only on yeast expressing nPKCs isoforms (Fig. 3d).

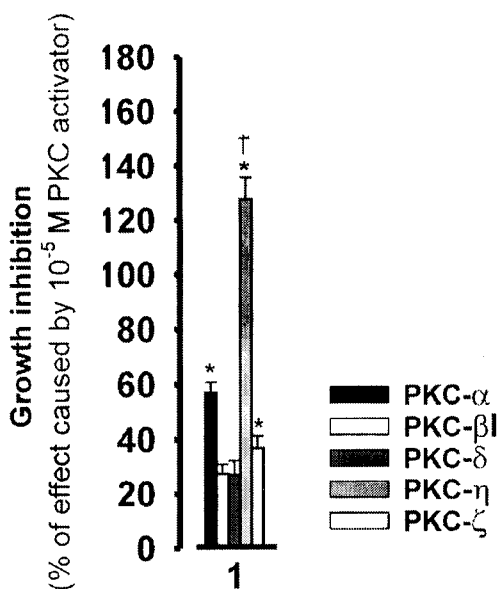


Figure 4. Effects of a xanthone showed to be effective on PKC- α and highly effective on PKC- η , on the growth of yeast expressing individual PKC isoforms (α , β I, δ , η or ζ). Yeast cells expressing the indicated mammalian PKC isoform were incubated with xanthone **1** (10^{-5} M) or solvent (DMSO, 0.1% final concentration; see Experimental for details). Shown are means $\pm$ SEM of 24–42 determinations. Yeast growth significantly different from solvent: * p < 0.05 (paired Student's t -test), [†] p < 0.05 significantly higher than the maximal effect caused by 10^{-5} M of PKC activator (unpaired Student's t -test).

Compound **1** presented a high efficacy on PKC- η , causing a maximal inhibition higher than that caused by 10^{-5} M PMA (Fig. 4), but differs from the group of compounds in Figure 3a because it was also effective on yeast expressing PKC- α .

The effective compounds were grouped, afterwards, according to their potency by comparing their IC_{50} values, that is the concentration of the xanthone that caused half of the growth inhibition caused by the standard PKC activator PMA (10^{-5} M; arachidonic acid for PKC- ζ). For this purpose, concentration-response curves were obtained and xanthenes tested in the concentration range of 10^{-11} – 10^{-5} M (see Fig. 5 for typical concentration-response curves obtained for xanthone **20**).

Compounds **8**, **13** and **20**, although effective in all isoforms tested, presented marked differences on their potency (see Table 2). In general they presented an higher potency on yeast expressing PKC- η . Compound **20** presented also a comparable high potency on yeast expressing PKC- ζ . They have also in common a low potency on yeast expressing cPKC isoforms, with the exception of compound **13** on yeast expressing PKC- β I. According to the IC_{50} values, the rank order of potency was, for compound **8**, PKC- η > δ = ζ > α > β I; for compound **13**, PKC- η > ζ = β I > δ > α and for compound **20**, PKC- η = ζ > δ > β I > α (for definition of the rank order of potency, the signal > was applied only when the IC_{50} of the compound placed at the left was significantly lower than that of the IC_{50} placed at the

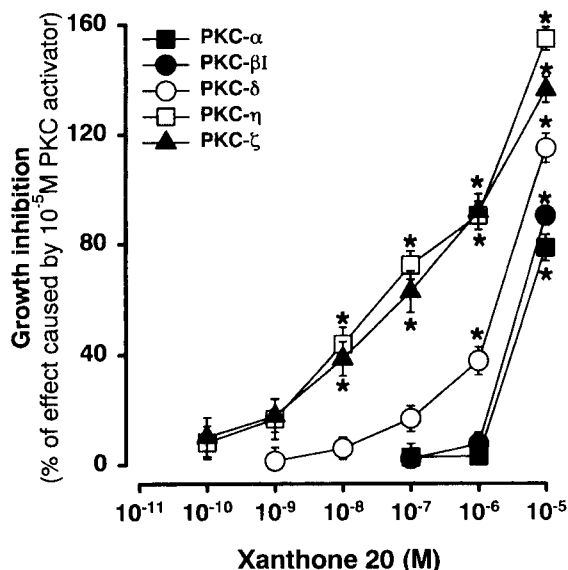


Figure 5. Typical concentration-response curves for the effects of a xanthone (**20**) on the growth of yeast expressing the indicated mammalian PKC isoforms (α , β I, δ , η or ζ). Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10^{-5} M of PKC activator (100% growth inhibition was considered in each isoform that caused by 10^{-5} M of PKC activator). Shown are means $\pm$ SEM of 20–32 determinations. Yeast growth significantly different from solvent: * p < 0.05 (paired Student's t -test).

Table 2. IC₅₀ values of xanthone derivatives at the mammalian PKC- α , - β I, - δ , - η or - ζ

Compound	IC ₅₀ (nM)				
	PKC- α	PKC- β I	PKC- δ	PKC- η	PKC- ζ
1	6300 $\pm$ 812**	ND	ND	7 $\pm$ 2	ND
2	ND	ND	2510 $\pm$ 630	9579 $\pm$ 2055*	ND
3	ND	3981 $\pm$ 744**	50 $\pm$ 18**	2 $\pm$ 0.7	13 $\pm$ 2**
4	ND	ND	ND	ND	626 $\pm$ 73
5	ND	ND	ND	ND	188 $\pm$ 41
6	ND	ND	ND	ND	16 $\pm$ 4
7	ND	101 $\pm$ 12*	19 $\pm$ 2	25 $\pm$ 8	2000 $\pm$ 986*
8	2512 $\pm$ 367**	5000 $\pm$ 507**	141 $\pm$ 14**	9 $\pm$ 2	151 $\pm$ 21**
9	ND	ND	1032 $\pm$ 190 [†]	8700 $\pm$ 916 [†]	6 $\pm$ 2
10	ND	ND	ND	ND	501 $\pm$ 37
11	ND	ND	ND	3 $\pm$ 1	2460 $\pm$ 690**
13	2500 $\pm$ 577**	126 $\pm$ 34**	248 $\pm$ 27**	1 $\pm$ 0.8	79 $\pm$ 16**
14	ND	ND	5 $\pm$ 2	2876 $\pm$ 1143*	2522 $\pm$ 1090*
17	ND	9897 $\pm$ 3580 [†]	2410 $\pm$ 414 [†]	188 $\pm$ 62 [†]	4 $\pm$ 0.8
19	ND	ND	1021 $\pm$ 232**	2 $\pm$ 1	21 $\pm$ 10
20	5623 $\pm$ 681** [†]	3660 $\pm$ 352** [†]	1585 $\pm$ 127** [†]	16 $\pm$ 4	28 $\pm$ 10

IC₅₀ values were considered to be the concentration that caused 50% growth inhibition (assuming that 100% growth inhibition was that caused by 10⁻⁵ M PMA for PKC- α , - β I, - δ and - η or by 10⁻⁵ M arachidonic acid for PKC- ζ). Xanthones were tested in a concentration range of 10⁻¹¹–10⁻⁵ M. Shown are means $\pm$ SEM of 20–32 determinations. ND; non determinable (when the maximal response reached was lower than 50% growth inhibition). Significant differences: relatively to PKC- δ , **p* < 0.05; relatively to PKC- η , ***p* < 0.05; relatively to PKC- ζ , [†]*p* < 0.05 (unpaired Student's *t*-test).

right of the signal; otherwise = was applied; *p* < 0.05; unpaired Student's *t*-test).

Compounds **3**, **7**, **11** and **17** were all inactive on yeast expressing PKC- α and presented high potencies on yeast expressing PKC- η . Compound **7** presented also a comparable high potency on yeast expressing PKC- δ whereas compounds **3** and **17** also presented high potencies on yeast expressing PKC- ζ (see Table 2). According to the IC₅₀ values, the rank order of potency obtained was, for compound **3**, PKC- η > - ζ > - δ > - β I; for compound **7**, PKC- η = - δ > - β I > - ζ , for compound **11**, PKC- η > - ζ and for compound **17**, PKC- ζ > - η > - δ > - β I.

Compounds **1** and **11** presented a remarkable potency and selectivity towards PKC- η (see Table 2). Compound **1** presented an IC₅₀ value 900 times lower than that for the other isoform in which it was also active (PKC- α). Similarly, compound **11** presented an IC₅₀ value 820 times lower than that for the other isoform in which it was active (PKC- ζ).

Compounds **4**, **5**, **6** and **10** presented a high selectivity towards PKC- ζ . For these xanthones IC₅₀ values were determinable only on PKC- ζ . Nevertheless, they differ on their potency, being compound **6** the most potent followed by **5** and then by compounds **4** and **10** (see Table 2).

Compounds **9**, **14** and **19** have IC₅₀ values determinable only on yeast expressing isoforms of the nPKC and aPKC families (see Table 2). Interestingly, each xanthone showed to be particularly potent on a different PKC isoform: **9** on PKC- ζ ; **14** on PKC- δ and **19** on PKC- η .

Compound **2** was active only on yeast expressing nPKC isoforms, with a potency higher on yeast expressing

PKC- δ than on yeast expressing PKC- η (see Table 2). However, the IC₅₀ values were much higher (in the micromolar range) than those presented by xanthones referred as selective to nPKC isoforms.

Discussion

The yeast phenotypic assay, which uses transformed yeast expressing individual mammalian PKC isoforms, has been proposed as an alternative rapid and simple experimental assay for the study of PKC-activating potential of drug candidates. In the present study the mammalian PKC- α , - β I, - δ , - η or - ζ isoforms were expressed in the same yeast strain. After exposure to the PKC activator (PMA or arachidonic acid), a concentration-dependent growth inhibition was detected in yeast expressing each of the PKC isoforms tested. Since the PKC activator-induced growth inhibition was observed only when there was expression of a mammalian PKC isoform (as confirmed by immunoblotting) it is assumed that, under the present experimental conditions, the drug-induced growth inhibition reflects activation of the expressed mammalian PKC isoform.

The majority of the xanthones tested revealed effects compatible with activation of PKC isoforms of the cPKC, nPKC and aPKC families, although, in general, they showed a very low activity on isoforms of the cPKC family, particularly on PKC- α : among the 20 xanthones tested only four (**1**, **8**, **13** and **20**) were able to activate this isoform.

PKC activators like phorbol esters and arachidonic acid, activate PKC by interacting at the regulatory domain²³ but by a distinct mechanism.²⁴ To activate

PKC, phorbol esters seem to require two cysteine-rich zinc-fingers at the C1 region of the regulatory domain (C1a and C1b).⁴ Atypical PKC isoforms lack the second cysteine-rich motif, what explains the inactivity of phorbol esters on isoforms of this family. Arachidonic acid activates PKC by a mechanism that does not require the repeated zinc finger motifs and, thus, arachidonic acid acts as an universal PKC activator.²⁵ Xanthenes activated isoforms of all PKC families, including isoforms of the aPKC family, suggesting that xanthenes interact with PKC by a mechanism similar to that of arachidonic acid.

The xanthenes tested showed marked activities on nPKC and aPKC. Some were more potent than the standard PKC activator and presented a remarkable selectivity for a specific isoform. These simple xanthenes were especially active on PKC- η and on PKC- ζ , in which only four compounds (**4**, **5**, **6** and **10**) and two compounds (**1** and **2**) were inactive, respectively.

Efforts have been made in the past by several groups to study, by using molecular modeling approaches, structure–activity relationships and to establish a common pharmacophore shared by structurally different PKC-activators, despite the lack of 3-D-structural data for individual PKC isoforms.²⁶ Our study shows that small structural changes on the xanthone framework can lead to dramatic alterations of its activity/selectivity towards individual PKC isoforms. Furthermore, it revealed some insights about the structural requirements of xanthenes for PKC activation. Positions 3 and 5 do not seem to be recommendable for introduction of hydroxy/methoxy substituents, once xanthenes **15**, **16** and **18** were not effective in any PKC isoform studied. On the other hand, the methoxylation of positions 2 and 3 were shown to be the most favoured substitution to achieve activity in all PKC isoforms tested (compound **13** compared with compound **12**).

The present study revealed new compounds which showed high selectivity for individual PKC isoforms: compound **14** for PKC- δ and compounds **4**, **5**, **6**, **9** and **10** for PKC- ζ , isoforms reported to be of crucial importance in the apoptotic process;³ and compounds **1** and **11** for PKC- η , an isoform suggested to be involved in growth, differentiation and carcinogenesis of epithelial tissues.²⁷ Therefore xanthenes can be useful for a detailed study of the physiological and pathophysiological roles of PKC isoforms.

Conclusions

This study shows that simple xanthenes can interact with mammalian PKC isoforms of the cPKC, nPKC and aPKC families, causing an effect compatible with PKC activation. The high potency and selectivity presented suggests that xanthenes can become an important group to look for potent and isoform-selective PKC activators which can be useful to elucidate the physiological and pathophysiological roles of individual PKC isoforms.

Experimental

Chemistry

Purifications of compounds were performed by column chromatography using Merck silica gel 60 (0.50–0.20 mm), flash chromatography using Merck silica gel 60 (0.040–0.063 mm) and preparative thin layer chromatography (tlc), using Merck silica gel 60 (GF₂₅₄). Melting points were obtained in a K  fer microscope and are uncorrected. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 257 in KBr. ¹H and ¹³C NMR spectra were taken in CDCl₃ or DMSO-*d*₆ at room temperature, on Bruker AC 200 and DRX 300 instruments. Chemical shifts are expressed in δ (ppm) values relative to tetramethylsilane (TMS) as an internal reference. MS spectra were recorded as EI (electronic impact) mode on a Hitachi Perkin-Elmer.

Xanthone (**1**) was purchased from Sigma Aldrich (Sintra, Portugal). The following materials were synthesized and purified by the described procedures. The synthesis of the following compounds have already been described:²⁸ 1-hydroxyxanthone (**2**), 1-methoxyxanthone (**3**), 2-methoxyxanthone (**5**), 2-hydroxyxanthone (**4**), 3-hydroxyxanthone (**6**), 3-methoxyxanthone (**7**), 4-hydroxyxanthone (**8**), 4-methoxyxanthone (**9**), 3,5-dihydroxyxanthone (**15**), 3,5-dimethoxyxanthone (**16**), 3-hydroxy-5-methoxyxanthone (**18**), 3,4-dimethoxyxanthone (**14**), 3-hydroxy-4-methoxyxanthone (**17**) and 4-hydroxy-3-methoxyxanthone (**19**).

The synthesis of the following compounds have been carried out as follows.

1,2-Dihydroxyxanthone (10). Obtained by demethylation of **11** according to the procedure described.^{29,30} Mp 163–165 °C, methylene chloride/hexane,³¹ 166–167 °C, ethanol aq; ν_{max} (cm⁻¹) KBr: 3467, 1606, 1475, 1365, 1288, 1045, 748; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300.13 MHz) δ : 12.45 (1-OH), 9.42 (2-OH), 8.16 (1H, dd, *J* = 7.9 and 1.6 Hz, H-8), 7.81 (1H, ddd, *J* = 8.4, 7.0 and 1.6 Hz, H-6), 7.60 (1H, dd, *J* = 8.4 and 0.8 Hz, H-5) 7.46 (1H, ddd, *J* = 7.9, 7.0 and 0.8 Hz, H-7), 7.32 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-4), 6.96 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz) δ : 182.3 (C-9), 155.9 (C-4b), 148.3 (C-4a), 147.6 (C-1), 140.2 (C-2), 136.4 (C-6), 125.4 (C-8), 124.5 (C-3), 124.2 (C-7), 119.3 (C-8a), 118.0 (C-5), 108.8 (C-9a), 106.2 (C-4); MS *m/z* (rel int): 230 (1, [M + 2]⁺), 229 (1, [M + 1]⁺), 228 (70, [M]⁺), 199 (13), 126 (5), 115 (4), 78 (95), 63 (100).

1,2-Dimethoxyxanthone (11).³² Mp 133–135 °C, methylene chloride/hexane,³¹ 130 °C; ν_{max} (cm⁻¹) KBr: 3488, 3436, 3377, 1662, 1461, 1292, 1085, 1049, 742; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200.13 MHz) δ : 8.12 (1H, dd, *J* = 7.9 and 1.7 Hz, H-8), 7.81 (1H, ddd, *J* = 7.6, 7.4 and 1.7 Hz, H-6), 7.63 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, H-4), 7.56 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-5), 7.44 (1H, dd, *J* = 7.9, 7.6 and 1.1 Hz, H-7), 7.40 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, H-3), 3.86 (3H, s, 1-OCH₃), 3.80 (3H, s, 2-OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50.03 MHz) δ : 175.2 (C-9), 154.7 (C-4b), 150.3 (C-2), 148.9 (C-1), 147.5 (C-4a), 135.0 (C-6), 126.0 (C-8), 123.9 (C-7), 121.4 (C-8a), 120.7 (C-5), 117.6 (C-3), 116.4 (C-9a), 113.2 (C-4), 61.0

(1-OCH₃), 56.6 (2-OCH₃); MS *m/z* (rel int): 258 (3, [M+2]⁺), 257 (25, [M+1]⁺), 256 (100, [M]⁺), 241 (83), 227 (45), 223 (18), 213 (59), 196 (14), 184 (10), 170 (11), 155 (13), 139 (15), 127 (13), 121 (18), 114 (12), 104 (6), 92 (11), 84 (5), 77 (17), 63 (12).

2,3-Dihydroxyxanthone (12). Obtained by demethylation of **14** according to the procedure previously described.³⁰ Mp >330 °C, acetone/hexane³⁰ >350 °C ethyl acetate,³³ 293–295 °C chloroform/methanol; $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) KBr: 3400, 1624, 1464, 1311, 1290, 1145, 746; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300.13 MHz) δ : 8.12 (1H, dd, *J*=7.5 and 1.6 Hz, H-8), 7.78 (1H, ddd, *J*=8.4, 6.8 and 1.7 Hz, H-6), 7.58 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 7.43 (1H, s, H-1), 7.42 (1H, ddd, *J*=7.5, 6.8 and 1.9 Hz, H-7), 6.92 (1H, s, H-4); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz) δ : 175.0 (C-9), 155.7 (C-4b), 154.2 (C-4a), 151.3 (C-3), 144.1 (C-2), 134.7 (C-6), 125.9 (C-8), 124.1 (C-7), 120.9 (C-8a), 118.1 (C-5), 113.7 (C-9a), 108.9 (C-1), 103.0 (C-4); MS *m/z* (rel int): 230 (0.34, [M+2]⁺), 229 (2.4, [M+1]⁺), 228 (16, [M]⁺), 200 (0.96), 171 (0.80), 126 (1.8), 115 (0.96), 100 (8), 78 (86), 63 (100).

2,3-Dimethoxyxanthone (13). The 2-(3',4'-dimethoxyphenoxy)benzoic acid obtained initially by an Ullman reaction³⁴ underwent an appropriate cyclization to **13** according to the procedure previously described^{35,36} Mp 170–171 °C, methylene chloride/pentane³⁶ 164–165 °C, acetone,³³ 157–158 °C, chloroform; $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) KBr: 3500, 3440, 3407, 1649, 1466, 1313, 1234, 1005, 762; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200.13 MHz) δ : 8.16 (1H, dd, *J*=7.9 and 1.5 Hz, H-8), 7.82 (1H, ddd, *J*=8.4, 7.4 and 1.5 Hz, H-6), 7.60 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 7.49 (1H, s, H-1), 7.44 (1H, ddd, *J*=7.9, 7.4, and 0.9 Hz, H-7), 7.20 (1H, s, H-4), 3.94 (3H, s, 3-OCH₃), 3.87 (3H, s, 2-OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50.03 MHz) δ : 174.8 (C-9), 155.7 (C-4b), 155.6 (C-4a), 152.0 (C-3), 146.7 (C-2), 134.8 (C-6), 125.9 (C-8), 124.3 (C-7), 120.9 (C-8a), 118.0 (C-5), 114.0 (C-9a), 104.7 (C-1), 100.5 (C-4), 56.6 (3-OCH₃), 55.9 (2-OCH₃); MS *m/z* (rel int): 258 (1, [M+2]⁺), 257 (8, [M+1]⁺), 256 (40, [M]⁺), 241 (11), 185 (3), 170 (3), 142 (3), 78 (89), 63 (100).

1,3-Dihydroxy-2-methylxanthone (20). Obtained according to the procedure previously described.^{37,38}

General methods for the in vivo yeast phenotypic assay

Yeast nitrogen base was from DIFCO (Merck Portugal, Lisboa, Portugal). The kit for protein quantification was from Pierce (Biocontec, Lisboa, Portugal). The secondary alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG detection kit (AP-10), recombinant proteins PKC- α (PK11), PKC- β I (PK16), PKC- δ (PK31), PKC- η (PK46) and PKC- ζ (PK41) were from Oxford Biomedical Research (LabClinics, Barcelona, Spain). Nitrocellulose membranes and all the reagents for sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblots were from BioRad (PACI, Lisboa, Portugal). Acid-washed glass beads, antibodies to PKC- α , PKC- β I, PKC- δ , PKC- η and PKC- ζ , aprotinin, arachidonic acid sodium salt, leupeptin, pepstatin A, phenylmethylsulfonyl fluoride, phorbol 12-myristate 13-

acetate (PMA) were from Sigma Aldrich (Sintra, Portugal). All other chemicals used were of analytical grade.

Yeast transformation and cell cultures. Constructed yeast expression plasmids YEp52 and YEp51, encoding the cDNA for bovine PKC- α and for rat PKC- β I, respectively (kindly offered by Dr. Heimo Riedel, Wayne University, Detroit, USA) and YEplac181, encoding the cDNA for the rat PKC- δ , mouse PKC- η or PKC- ζ (kindly offered by Dr. Nigel Goode, Royal Veterinary College, London, UK) were amplified in *Escherichia coli* DH5 α and confirmed by restriction analysis. The plasmids used contain galactose-inducible transcriptional elements and the *leu2* gene for selection. *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*; strain CG379; α *ade5 his7-2 leu2-112 trp1-289 α ura3-52 Kil-O*; Yeast Genetic Stock Center, University of California, Berkeley, USA) was transformed using the lithium acetate method.³⁹ To ensure the selection of transformed yeast, cells were grown in leucine-free medium, in 1.5% agar plates, at 30 °C.

For the yeast phenotypic assay, transformed cells were incubated in leucine-free medium, with slow shaking, at 30 °C. The leucine free-medium contained 0.7% yeast nitrogen base, 2% glucose (w/v) or the indicated carbon source, amino acids, purines and pyrimidines, according to the transformed yeast requirements. Galactose (2%; w/v), instead of glucose, was included to induce transcription of the mammalian PKC gene.

Cell lysis and immunoblotting. Cell lysis was performed basically as described.⁶ Detergent lysates were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels (Mini-Protein II, BioRad, Hercules, CA, USA). Proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes and probed on immunoblots with specific rabbit antibodies to either PKC- α , PKC- β I, PKC- δ , PKC- η or PKC- ζ and with a secondary alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG. Standard recombinants of PKC- α (MW 76,799 Da), PKC- β I (MW 76,790 Da), PKC- δ (MW 77,517 Da), PKC- η (MW 77,600 Da) and PKC- ζ (MW 67,740 Da) were used as positive controls.

Yeast phenotypic assay. Transformed yeast cultures were incubated in leucine-free medium. Optical density values, measured at 620 nm (OD₆₂₀; Cary 1E Varian spectrophotometer, Palo Alto, CA, USA), were used as an indicator of growth. Transformed yeast were grown to an OD₆₂₀ of approximately 1, collected by centrifugation and diluted to an OD₆₂₀ of 0.05, in medium containing 2% (w/v) galactose (gene transcription inducer) and 3% (v/v) glycerol (alternative carbon source). Diluted cultures (200 μ L) were transferred to 96-well microtitre plates and incubated for up to 100 h, with slow shaking at 30 °C, either in the presence of drugs or solvent (DMSO 0.1%; final concentration). Growth was monitored by determining the OD₆₂₀ using a plate reader (BioRad Benchmark Microplate Reader; Hercules, CA, USA). In preliminary experiments, growth curves for individual isoforms were determined

and the duration of the logarithmic and stationary phases identified. Estimation of drug effects was based on OD₆₂₀ measurements at fixed time points (at 65 h for cPKC isoforms or at 48 h incubation for nPKC and aPKC), times occurring during the respective logarithmic phase and when it was reached a 'steady-state growth inhibition' (period of time during which maximal inhibition of growth was reached and remained constant or changed only slightly). In individual experiments, OD₆₂₀ was routinely monitored for up to 100 h to confirm whether the 'fixed time points' chosen were appropriate for all the compounds studied (PMA, arachidonic acid or xanthenes). The difference between the maximal OD₆₂₀ reached and that measured at the beginning of incubation was used as an index of yeast growth. Drugs or solvent were added at the beginning and kept throughout the incubation. Yeast growth in the presence of drugs was expressed as percentage of growth observed in parallel experiments in the presence of solvent; it was further transformed into growth inhibition by subtracting that value from 100. Because growth inhibition caused by a maximal concentration of the standard PKC activator varied between isoforms, 100% growth inhibition was assumed to be that caused by 10⁻⁵ M PMA (or arachidonic acid for PKC- ζ), in order to standardise the maximal inhibition reachable; 0% growth inhibition would occur when growth in the presence of drugs was identical to that in the presence of solvent.

Effects of xanthenes were expressed as percentage of that effect. For determination of concentration-response curves, each drug was tested in concentrations ranging from 10⁻¹¹ to 10⁻⁵ M and the concentration of drug that caused half of the 100% growth inhibition (IC₅₀) was calculated.

Statistical analysis. Results are given as arithmetic means $\pm$ SEM and *n* represents the number of determinations. Differences between means were tested for significance using the paired or unpaired Student's *t*-test, as indicated in the figure legends. A *p* value lower than 0.05 was taken to be statistically significant.

Acknowledgements

The authors thank Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT; I&D no. 226/94), POCTI (QCA III) and FEDER for financial support (CEQOFFUP). E. Sousa is a recipient of a PhD grant from FCT (PRAXIS XXI/BD/15663/98).

References and Notes

- Jaken, S. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 168.
- Webb, B. L.; Hirst, S. J.; Giembycz, M. A. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 1433.
- Musashi, M.; Ota, S.; Shiroshita, N. *Int. J. Hematol.* **2000**, *72*, 12.
- Way, K. J.; Chou, E.; King, G. L. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 181.
- Riedel, H.; Hansen, H.; Parissenti, A. M.; Su, L.; Shieh, H.-L.; Zhu, J. *J. Cell. Biochem.* **1993**, *52*, 320.
- Shieh, H.-L.; Hansen, H.; Zhu, J.; Riedel, H. *Mol. Carcinog.* **1995**, *12*, 166.
- Abou-Shoer, M.; Boettner, F. E.; Chang, C.-J.; Cassady, J. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2795.
- Liou, S.-S.; Shieh, W.-L.; Cheng, T.-H.; Won, S.-J.; Lin, C.-N. *J. Pharm. Pharmacol.* **1993**, *45*, 791.
- Lin, C.-N.; Liou, S.-J.; Lee, T.-H.; Chuang, Y.-C.; Won, S.-J. *J. Pharm. Pharmacol.* **1996**, *48*, 539.
- Liu, H.-S.; Lin, C.-N.; Won, S.-J. *Anticancer Res.* **1997**, *17*, 1107.
- Yoshimi, N.; Matsunaga, K.; Katayama, M.; Yamada, Y.; Kuno, T.; Qiao, Z.; Hara, A.; Yamahara, J.; Mori, H. *Cancer Lett.* **2001**, *163*, 163.
- Lin, C.-N.; Chung, M.-I.; Liou, S.-J.; Lee, T.-H.; Wang, J.-P. *J. Pharm. Pharmacol.* **1996**, *48*, 532.
- Lin, C.-N.; Hsieh, H.-K.; Liou, S.-J.; Ko, H.-H.; Lin, H.-C.; Chung, M.-I.; Ko, F.-N.; Liu, H.-W.; Teng, C.-M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1996**, *48*, 887.
- Marona, H. *Pharmazie* **1998**, *53*, 672.
- Marona, H.; Gorka, Z.; Szneler, E. *Pharmazie* **1998**, *53*, 219.
- Mak, N.-K.; Li, W.-K.; Zhang, M.; Wong, R. N.-S.; Tai, L.-S.; Yung, K. K.-L.; Leung, H.-W. *Life Sciences* **2000**, *66*, 347.
- Lu, Z. X.; Hasmeda, M.; Mahabusarakam, W.; Ternai, B.; Ternai, P. C.; Polya, G. M. *Chem. Biol. Interact.* **1998**, *114*, 121.
- Jinsart, W.; Ternai, B.; Buddhasukh, D.; Polya, G.-M. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3711.
- Wang, J.-P.; Raung, S.-L.; Tsao, L.-T.; Lin, C.-N. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *336*, 81.
- Mak, N. K.; Lung, H. L.; Wong, R. N. S.; Leung, H. W.; Tsang, H. Y.; Leung, K. N. *Planta Med.* **2001**, *67*, 400.
- Ways, D. K.; Cook, P. P.; Webster, C.; Parker, P. J. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 4799.
- Nakanishi, H.; Exton, J. H. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16347.
- Hofmann, J. *FASEB J.* **1997**, *11*, 649.
- Kochs, G.; Hummel, R.; Meyer, D.; Hug, H.; Marmé, D.; Sarre, F. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *216*, 597.
- Bell, R. M.; Burns, D. J. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4661.
- Wang, S.; Zaharevitz, D. W.; Sharma, R.; Marquez, V. E.; Levin, N. E.; Du, L.; Blumberg, P. M.; Milne, G. W. A. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4479.
- Hashimoto, Y.; Osada, S.; Ohno, S.; Kuroki, T. *Tohoku J. Exp. Med.* **1992**, *168*, 275.
- Gnerre, C.; Thull, U.; Gaillar, P.; Carrupt, P. A.; Testa, B.; Fernandes, E.; Silva, F.; Pinto, M.; Pinto, M. M.; Wolfender, J. L.; Hostettman, K.; Cruciani, G. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 552.
- Vermes, B.; Seligmann, O.; Wagner, H. *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 2359.
- Gottlieb, O. R.; Mesquita, A. A. L.; Oliveira, G. G.; Melo, M. T. *Phytochemistry* **1970**, *9*, 2537.
- Davies, J. S. H.; Lamb, F.; Suschitzky, H. *J. Chem. Soc.* **1958**, 1790.
- Gales, L.; Sousa, M. E.; Pinto, M. M. M.; Kijjoa, A.; Damas, A. M. *Acta Crystallogr. C* **2001**, *C57*, 1319.
- Lin, C. N.; Liou, S. S.; Ko, F. N.; Teng, C. M. *J. Pharm. Sci.* **1993**, *82*, 11.
- Jackson, W. T.; Boyd, R. J.; Froelich, L. L.; Gapinski, D. M.; Mallett, B. E.; Sawyer, J. S. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1726.

35. Finnegan, R. A.; Bachman, P. L. *J. Pharm. Sci.* **1965**, *54*, 633.
36. Hassal, C. H.; Lewis, J. R. *J. Chem. Soc.* **1961**, *2*, 2312.
37. Pinto, M. M. M.; Polónia, J. *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57*, 2613.
38. Fernandes, E. G. R.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S.; Silva, F. M.; Borges, F. M.; Pinto, M. M. M. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 305.
39. Ito, H.; Fukuda, Y.; Murata, K.; Kimura, A. *J. Bacteriol.* **1983**, *153*, 163.

CAPÍTULO IX

DERIVADOS XANTÓNICOS: XANTONAS INIBIDORAS DA PKC

SARAIVA L., FRESCO P., SOUSA E., PINTO E., PINTO M., GONÇALVES J. (2003)
Inhibition of protein kinase C by synthetic xanthone derivatives. *Bioorg. Med.
Chem.*, 11, 1215-1225.



Pergamon

Inhibition of Protein Kinase C by Synthetic Xanthone Derivatives

Lucília Saraiva,^{a,b} Paula Fresco,^a Eugénia Pinto,^b Emília Sousa,^c
Madalena Pinto^c and Jorge Gonçalves^{a,*}

^a*Serviço de Farmacologia, CEQOFFUP, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal*

^b*Serviço de Microbiologia, CEQOFFUP, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal*

^c*Serviço de Química Orgânica, CEQOFFUP, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal*

Received 7 June 2002; accepted 4 December 2002

Abstract—The modulatory activity of two xanthenes (3,4-dihydroxyxanthone and 1-formyl-4-hydroxy-3-methoxyxanthone) on isoforms α , β I, δ , η and ζ of protein kinase C (PKC) was evaluated using an in vivo yeast phenotypic assay. Both xanthenes caused an effect compatible with PKC inhibition, similar to that elicited by known PKC inhibitors (chelerythrine and NPC 15437). PKC inhibition caused by xanthenes was confirmed using an in vitro kinase assay. The yeast phenotypic assay revealed that xanthenes present differences on their potency towards the distinct PKC isoforms tested. It is concluded that 3,4-dihydroxyxanthone and 1-formyl-4-hydroxy-3-methoxyxanthone may become useful PKC inhibitors and xanthone derivatives can be explored to develop new isoform-selective PKC inhibitors.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Introduction

Protein kinase C (PKC) is a family of serine-threonine kinases with important roles in cellular functions such as growth, differentiation, tumor promotion and apoptosis.¹ PKC isoforms are grouped into at least three groups: the classical PKCs (cPKCs), which include the isoforms α , β I, β II and γ ; the novel PKCs (nPKCs), which include the isoforms δ , ϵ , θ , and η ; and the atypical PKCs (aPKCs), which include the isoforms ζ and λ / ι .^{2,3} More recently, a fourth group of structurally distinct PKCs has been identified, the so-called PKC-related kinases (PRKs).^{2,3} A new member of the PKC family, PKC μ /PKD has also been reported, but its inclusion remains controversial.²

Knowledge of specific roles attributable to individual PKC isoforms has been hampered by the lack of isoform-selective drugs and the search for selective drugs has been difficult because of several methodological limitations. Examples of these limitations are the coexistence

of several isoforms in the cells used for in vivo assays, and the difficulties to reproduce in vitro the interactions occurring in vivo between PKC and other cellular constituents. These limitations can be circumvented using the yeast phenotypic assay. This is an in vivo assay, using yeast expressing an individual mammalian PKC isoform, based on the growth inhibition (reflecting an increase in the cell doubling time) which is proportional to the degree of PKC activation.^{4,5} In the yeast phenotypic assay, PKC activators cause growth inhibition of transformed yeast^{4,5} while PKC inhibitors block the growth inhibition caused by a PKC activator.^{6,7}

Natural and synthetic xanthenes have been reported to mediate several important biological activities namely anti-tumor,^{8–12} anti-inflammatory,¹³ anti-thrombotic¹⁴ and neuropharmacological effects.^{15–17} Recently, it has been suggested that these compounds may act, at least in part, by interacting with PKC, and cause effects compatible not only with PKC activation¹⁸ but also with PKC inhibition. Prenylated xanthenes were shown to be potent inhibitors of eukaryote kinases in vitro, including PKC¹⁹ and norathyriol (1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone) reduced the PMA-induced respiratory burst and aggregation, an effect ascribed to inhibition of PKC.²⁰

*Corresponding author. Tel.: +351-22-2078932; fax: +351-22-2078969; e-mail: jorge.goncalves@ff.up.pt

The modulatory activity of a series of twenty-two simple xanthenes (9*H*-xanthen-9-ones) on PKC isoforms α and β I (cPKCs), δ and η (nPKCs) and ζ (aPKCs) were characterized in our laboratory using the yeast phenotypic assay. The majority of these compounds caused an effect compatible with PKC activation.²¹ In the present study, we report that two of the xanthenes tested (3,4-dihydroxyxanthone and 1-formyl-4-hydroxy-3-methoxyxanthone) caused effects compatible with PKC inhibition. The effects of these xanthenes were compared with two established potent and selective PKC inhibitors (chelerythrine²² and NPC 15437^{23,24}). The two compounds presented differences on their potency towards the individual PKC isoforms tested. Furthermore, for some isoforms, they showed potencies even higher than those of the PKC inhibitors used. Therefore, 3,4-dihydroxyxanthone and 1-formyl-4-hydroxy-3-methoxyxanthone can be used as PKC inhibitors for characterization of PKC-mediated effects and for the development of new PKC isoform-selective inhibitors.

Results

Expression of mammalian PKC- α , - β I, - δ , - η and - ζ was confirmed by immunoblotting, of protein extracts of yeast cells, transformed with the gene of a single mammalian PKC isoform, grown in the presence of the transcription inducer (2% galactose). Expression of each of these PKC isoforms resulted in a single antigenic band, which co-migrated with the respective recombinant protein. Protein extracts of transformed yeast cells grown in the absence of galactose did not present antigenic bands (Fig. 1).

Yeast phenotypic assay

PMA (considered a standard activator for the classical and novel PKC isoforms) was tested in yeast expressing PKC- α , - β I, - δ or - η , in concentrations up to 10^{-5} M (higher concentrations were not possible to test due to its low solubility in the culture medium). Since atypical PKC isoforms are not activated by phorbol esters,²⁵ arachidonic acid (up to 10^{-5} M) was used as the standard activator for PKC- ζ .²⁶ Effects of drugs were expressed as percentage of the maximal growth inhibition caused by the standard PKC activator (PMA for PKC- α , - β I, - δ , and - η or arachidonic acid for PKC- ζ ; 100% growth inhibition was assumed to be that caused by 10^{-5} M of the respective PKC activator).

In the absence of galactose, neither PMA nor arachidonic acid altered yeast growth. The solvent used (DMSO; final concentration 0.1%) did not change yeast growth either in the presence or in the absence of galactose (not shown).

The influence of established PKC inhibitors (chelerythrine and NPC 15437) and of 3,4-dihydroxyxanthone (1) and 1-formyl-4-hydroxy-3-methoxyxanthone (2) (Fig. 2) on the growth of yeast expressing individual PKC isoforms was also studied. In the absence of galactose, chelerythrine, xanthenes 1 and 2, all tested in

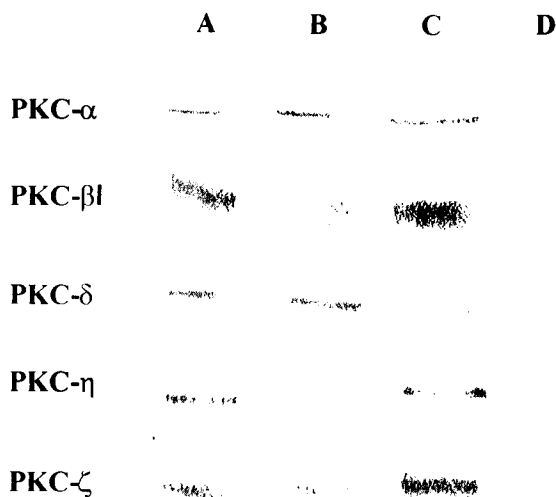


Figure 1. Immunodetection of PKC- α , - β I, - δ , - η and - ζ isoforms expressed in transformed *Saccharomyces cerevisiae* (CG379). Individual immunoblots are presented in a horizontal arrangement and were obtained from proteins extracts ($\sim 40 \mu\text{g}$ protein/lane) from cultures grown in selective medium in the presence of 2% galactose (lanes A and B; duplicate samples) or in the absence of 2% galactose (lane D). Positive controls (lane C; $4 \mu\text{g}$) were obtained using recombinant proteins PKC- α (MW 76,799 Da), PKC- β I (MW 76,790 Da), PKC- δ (MW 77,517 Da), PKC- η (MW 77,600 Da) and PKC- ζ (MW 67,740 Da).

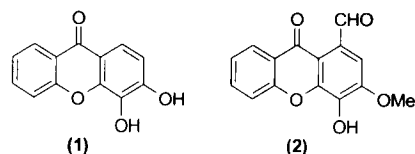


Figure 2. Chemical structure of 3,4-dihydroxyxanthone (1) and 1-formyl-4-hydroxy-3-methoxyxanthone (2).

the concentration of 10^{-5} M, did not influence yeast growth. NPC 15437, in concentrations higher than 10^{-6} M, inhibited yeast growth. Therefore, to avoid these effects non-mediated by the expressed mammalian PKC isoform, 10^{-6} M was the maximal concentration of NPC 15437 tested when expression of mammalian PKC isoforms were induced (galactose present in the medium).

In the presence of galactose, PMA caused a concentration-dependent inhibition on growth of yeast expres-

Table 1. Yeast growth inhibition caused by 10^{-5} M PMA on the PKC isoforms studied

PKC isoforms	Growth inhibition caused by 10^{-5} M PMA
α	40.6 ± 1.9 ($n = 36$)
β I	36.1 ± 1.1 ($n = 56$)
δ	26.6 ± 0.6 ($n = 52$)
η	21.3 ± 0.7 ($n = 52$)
ζ	0.2 ± 1.4 ($n = 36$) ^a

Growth in the presence of solvent was considered to be 0% growth inhibition (100% growth; see Experimental for details). Each value represents the mean $\pm$ SEM of the indicated n determinations.

^aGrowth inhibition caused by 10^{-5} M arachidonic acid was 23.9 ± 0.7 ($n = 56$).

sing cPKCs or nPKCs isoforms. EC_{50} values were (nM) 99.4 ± 10.1 (PKC- α), 214.7 ± 48.0 (PKC- βI), 453.1 ± 32.8 (PKC- δ) and 7.6 ± 0.6 (PKC- η) ($n = 64$), for the isoform indicated. In yeast expressing PKC- ζ , arachidonic acid, but not PMA, caused a concentration-dependent growth inhibition of yeast expressing this isoform, with an EC_{50} of 208.2 ± 30.3 nM ($n = 64$). Maximal values of growth inhibition caused by 10^{-5} M PMA (or arachidonic acid for PKC- ζ), on the PKC isoforms tested are presented on Table 1.

In the yeast phenotypic assay, a PKC inhibitor may be characterized by its capacity to block the growth inhibition caused by a PKC activator^{6,7} and may cause, per se, a stimulation of yeast growth.⁶ Therefore, chelerythrine, NPC 15437 and xanthenes 1 and 2 were tested alone and combined with the appropriate PKC activator (PMA for PKC- α , - βI , - δ and - η ; arachidonic acid for PKC- ζ).

On a first approach, chelerythrine, NPC 15437 and xanthenes were tested alone and only on the maximal

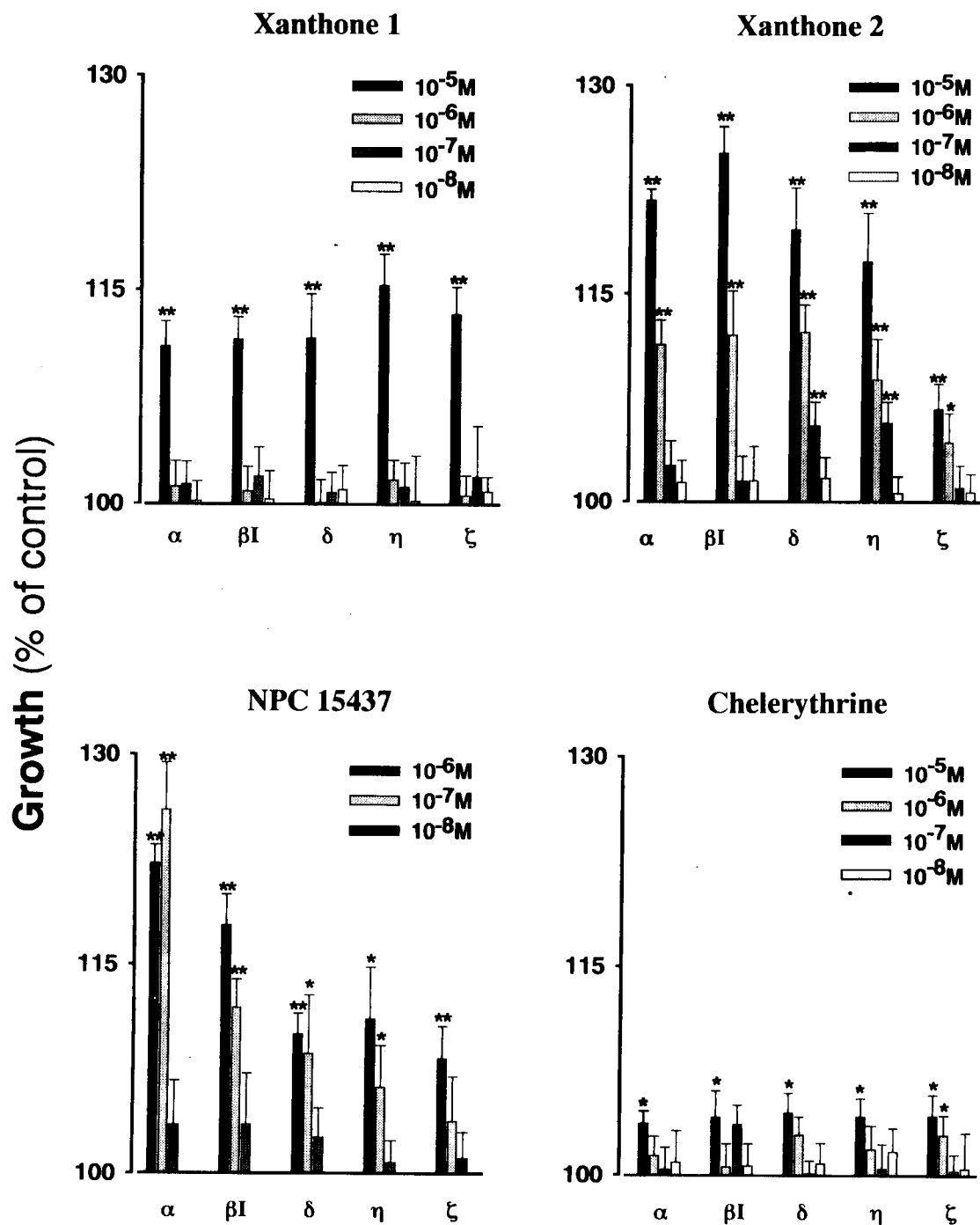


Figure 3. Effects of xanthenes 1 and 2 and of the PKC inhibitors (chelerythrine and NPC 15437) on the growth of yeast expressing individual PKC isoforms (α , βI , δ , η or ζ). Yeast cells expressing the indicated mammalian PKC isoform were incubated with each compound at the concentration indicated or solvent (DMSO, 0.1% final concentration). Results are expressed as % of growth. Shown are means $\pm$ SEM of 16–24 determinations. Significantly different from growth in the presence of solvent: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ (paired Student's t test).

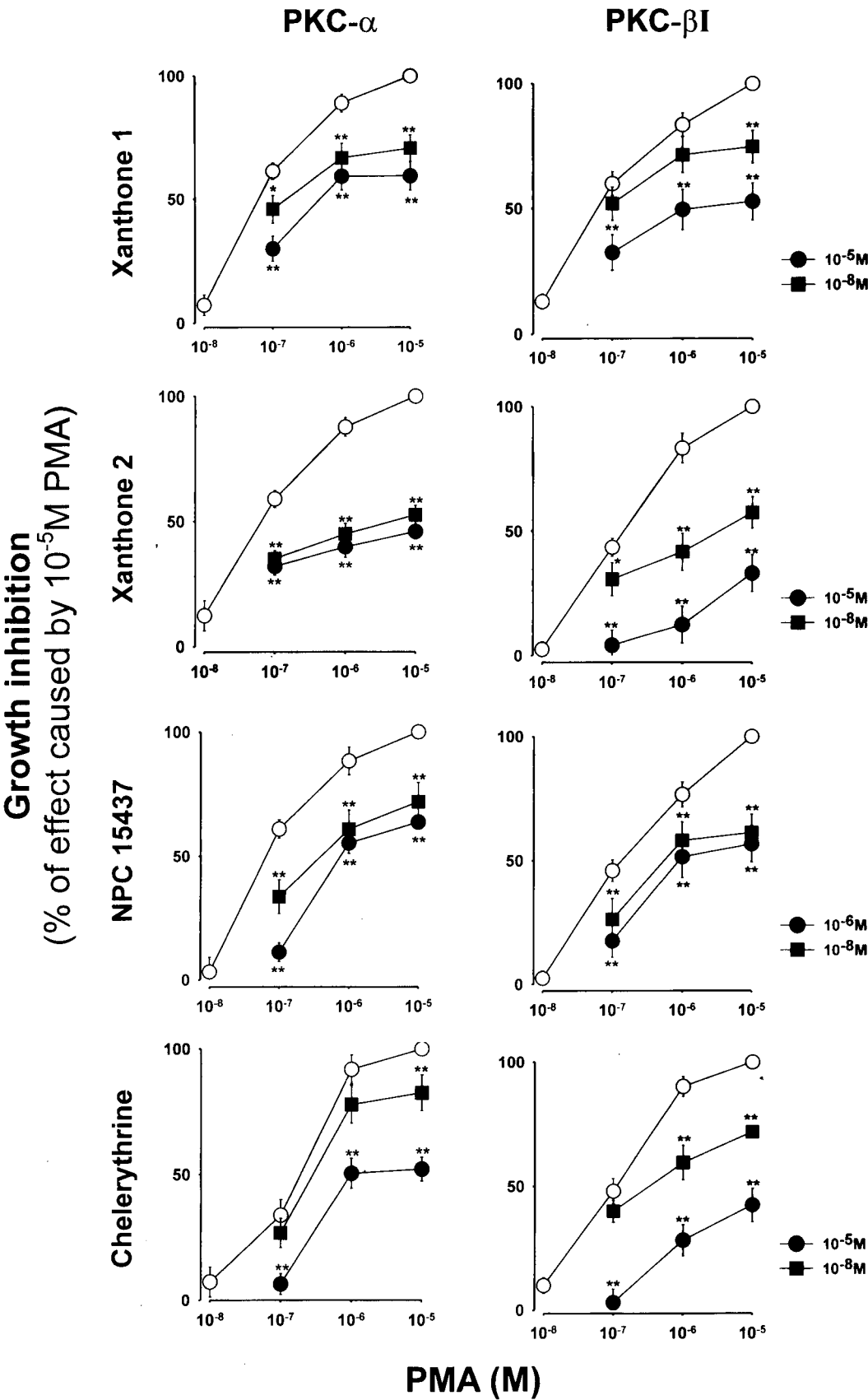


Figure 4. Interaction experiments on cPKCs (α and βI): concentration-response curves for PMA alone (open circles) and in the presence of 10⁻⁵ M xanthone 1, xanthone 2, chelerythrine and 10⁻⁶ M NPC 15437 (filled circles) or 10⁻⁸ M (filled squares). Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10⁻⁵ M PMA. Shown are means ± SEM of 16–20 determinations. Significantly different from growth inhibition caused by PMA alone: **P* < 0.05, ***P* < 0.001 (unpaired Student's *t* test).

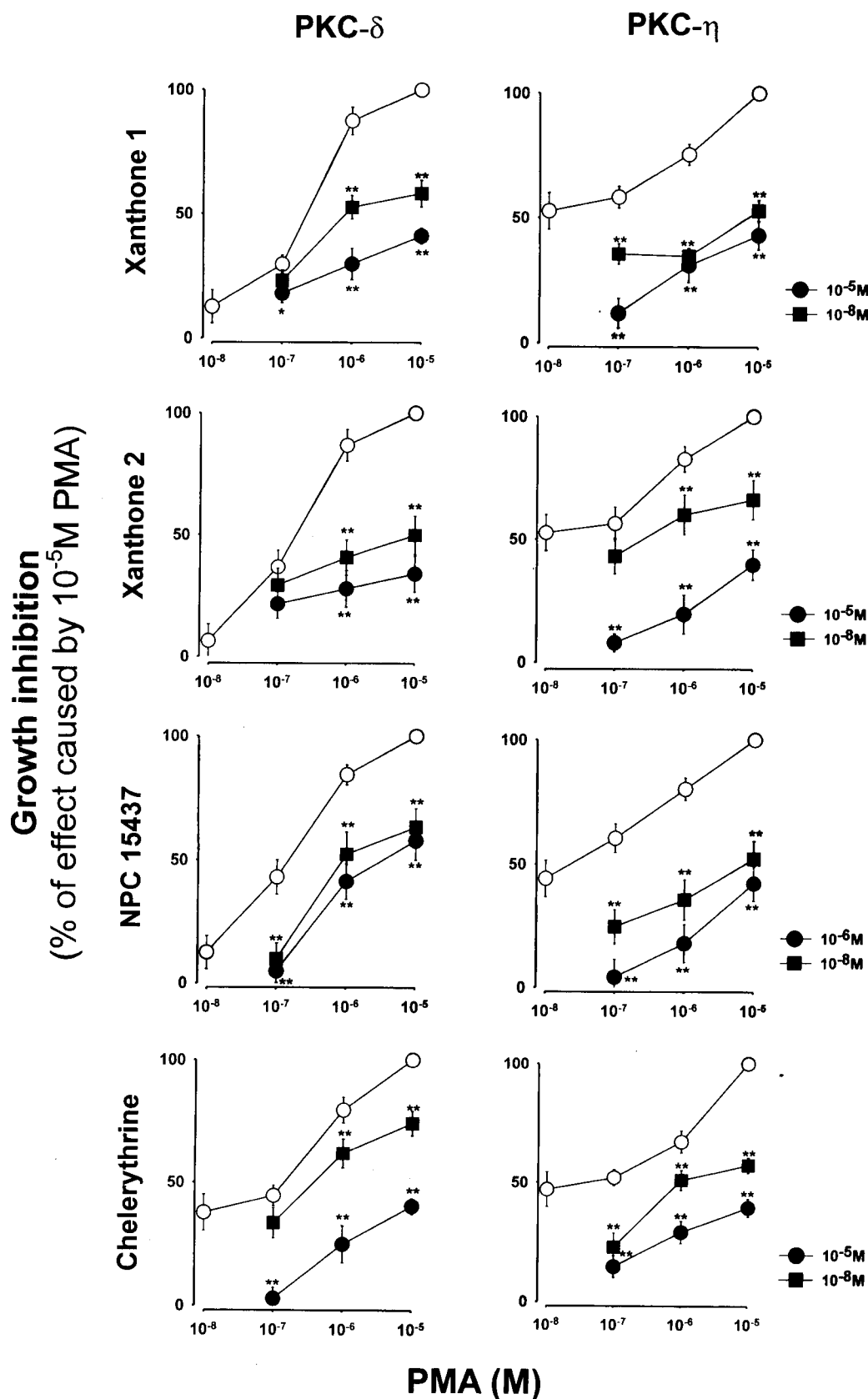


Figure 5. Interaction experiments on nPKCs (δ and η): concentration-response curves for PMA alone (open circles) and in the presence of 10^{-5} M xanthone 1, xanthone 2, chelerythrine and 10^{-6} M NPC 15437 (filled circles) or 10^{-8} M (filled squares). Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10^{-5} M PMA. Shown are means $\pm$ SEM of 16–20 determinations. Significantly different from growth inhibition caused by PMA alone: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ (unpaired Student's t test).

concentration feasible under these experimental conditions: 10^{-5} M for chelerythrine and xanthenes **1** and **2**; 10^{-6} M for NPC 15437. In general, both PKC inhibitors chelerythrine and NPC 15437, and xanthenes **1** and **2** stimulated growth of yeast expressing the individual mammalian PKC isoforms (Fig. 3), although this growth stimulation was less marked with chelerythrine than with NPC 15437 or xanthenes **1** or **2**. A decrease on concentration reduced the growth stimulation induced by these drugs. At 10^{-8} M, chelerythrine, NPC 15437, xanthenes **1** and **2** failed to cause a significant stimulation of yeast growth (Fig. 3).

On a subsequent series of experiments, the ability of chelerythrine, NPC 15437, xanthenes **1** and **2** to block the PKC activator-induced growth inhibition was investigated. These compounds were tested both at the maximal concentration they showed to be selective for PKC (10^{-5} M for chelerythrine and xanthenes **1** and **2**; 10^{-6} M for NPC 15437) and at 10^{-8} M (concentration at which all failed to significantly change growth of transformed yeast). Effects of chelerythrine, NPC 15437 and xanthenes **1** and **2** on the growth inhibition caused by the PKC activator PMA on yeast expressing PKC- α or - β I and on yeast expressing PKC- δ or - η are shown in Figs. 4 and 5, respectively. Figure 6 shows the effects of chelerythrine, NPC 15437 and xanthenes **1** and **2** on the growth inhibition caused by arachidonic acid on yeast expressing PKC- ζ .

In general, both chelerythrine and NPC 15437 reduced the growth inhibition caused by the PKC activator, causing a rightward shift on the concentration-response curve of the PKC activator (compare open and filled symbols in lower panels of Figs. 4–6). The rightward shift was, generally, concentration-dependent being the displacement caused by 10^{-8} M less pronounced than that caused by 10^{-5} M chelerythrine or by 10^{-6} M NPC 15437 (compare filled squares and circles in lower panels of Figs. 4–6). Xanthenes **1** and **2** also caused, in general, a rightward shift of the concentration-response curve of the PKC activator (see upper panels of Figs. 4–6). As observed with chelerythrine and NPC 15437, the rightward shift was, in general, concentration-dependent being the displacement caused by 10^{-8} M less pronounced than that caused by 10^{-5} M xanthenes **1** or **2** (compare filled squares and circles in upper panels of Figs. 4–6). However, in some cases (xanthone **1** on PKC- ζ , xanthone **2** on PKC- α and - δ , NPC 15437 on PKC- β I and - δ), no concentration-dependence was found, being the rightward shift identical for the highest and the lowest concentration of PKC inhibitor tested ($P > 0.05$; unpaired Student's *t* test).

In order to compare the potency of the PKC inhibitors to that of xanthenes **1** and **2** in blocking the effect of PKC activators, EC_{50} ratios of the PKC activator, obtained in the presence and in the absence of PKC inhibitors or xanthenes **1** or **2**, were calculated (EC_{50} is the concentration of the PKC activator that caused half of the growth inhibition caused by 10^{-5} M PMA; arachidonic acid for PKC- ζ). Because the highest concentration of NPC 15437 and xanthenes **1** and **2** caused

Growth inhibition (% of effect caused by 10^{-5} M arachidonic acid)

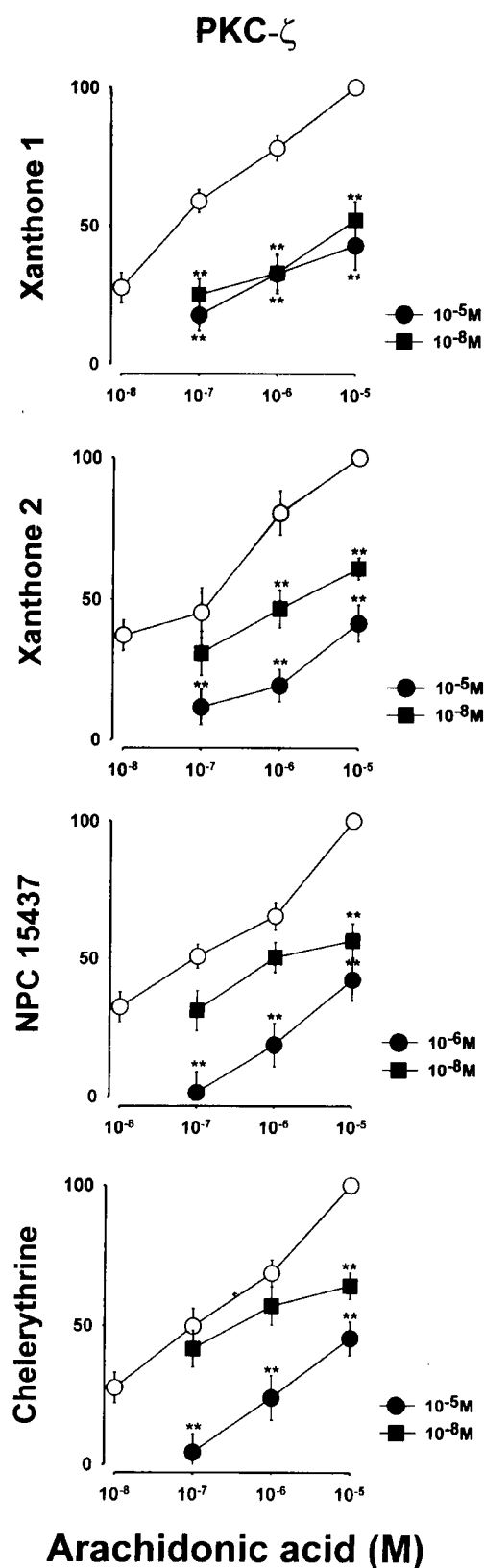


Figure 6. Interaction experiments on aPKC (ζ): concentration response curves obtained for arachidonic acid alone (open circles) and in the presence of 10^{-5} M xanthone **1**, xanthone **2**, chelerythrine and 10^{-6} M NPC 15437 (filled circles), or 10^{-8} M (filled squares). Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10^{-5} M of arachidonic acid. Shown are means $\pm$ SEM of 16–20 determinations. Significantly different from growth inhibition caused by arachidonic acid alone: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ (unpaired Student's *t* test).

Table 2. EC₅₀ ratios for xanthenes **1** and **2**, NPC 15437 and chelerythrine on the individual PKC isoforms tested

Compound	EC ₅₀ ratio ^a				
	PKC-α	PKC-βI	PKC-δ	PKC-η	PKC-ζ
Xanthone 1	1.8 ± 0.2 ^{*§}	0.8 ± 0.1 ^{*§}	4.5 ± 0.8 ^{*§}	600.0 ± 25.4	40.1 ± 1.8 [§]
Xanthone 2	79.2 ± 6.9	28.7 ± 2.4 [†]	24.0 ± 1.6 [†]	20.0 ± 2.8 ^{††}	10.4 ± 1.1 ^{††}
NPC 15437	5.1 ± 0.5 ^{*§}	3.7 ± 0.3 ^{*§}	2.4 ± 0.1 ^{*§}	556.0 ± 44.7	4.5 ± 0.1 ^{*§}
Chelerythrine	1.9 ± 0.3 ^{*§}	2.9 ± 0.3 ^{*§}	1.3 ± 0.1 ^{*§}	63.2 ± 1.7 [‡]	1.4 ± 0.2 ^{*§}

The EC₅₀ values were considered the concentration of PKC activator that caused half of the growth inhibition caused by 10⁻⁵ M of PMA (arachidonic acid for PKC-ζ). Shown are means ± SEM of 16–20 determinations. Significant differences: from xanthone **2**, ^{*}*P* < 0.05; from xanthone **1**, [†]*P* < 0.05; from PKC-α, [†]*P* < 0.05; from PKC-η, [§]*P* < 0.05 (one way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test).

^aEC₅₀ ratio = EC₅₀ (PKC activator + 10⁻⁸ M compound)/EC₅₀ (PKC activator).

growth stimulation, only ratios obtained in the presence of 10⁻⁸ M (which did not cause a significant stimulation of growth) were used for comparisons (Table 2). According to the EC₅₀ ratios obtained, chelerythrine, NPC 15437 and xanthenes **1** and **2** presented differences on their potencies towards the PKC isoforms tested and the following order of potencies for the compounds studied was proposed: for chelerythrine, PKC-η > -βI > -α > -ζ = -δ; for NPC 15437, PKC-η > -α = -βI = -ζ > -δ; for xanthone **1**, PKC-η > -ζ > -δ > -α = -βI and for xanthone **2**, PKC-α > -βI = -δ = -η > -ζ (for definition of the rank order of potency, the signal > was applied only when the EC₅₀ ratio for the isoform placed at the left was significantly higher than that of the isoform placed at the right of the signal; otherwise = was applied; *P* < 0.05; unpaired Student's *t* test). Like NPC 15437 and chelerythrine, xanthone **1** presented an higher EC₅₀ ratio on PKC-η. On the other hand, the

EC₅₀ ratios obtained with xanthone **2** on the different isoforms tested did not differ so markedly, although it was shown to be higher on PKC-α than on other isoforms. Xanthone **1** was the compound which presented the highest EC₅₀ ratio on PKC-η and -ζ, whereas xanthone **2** showed the highest EC₅₀ ratio on PKC-α, -βI and -δ.

In vitro kinase assay

To directly test if xanthenes **1** and **2** were interacting with PKC, their effects were studied in vitro, on purified rat brain PKC. The test used is based on the ability of PKC inhibitors to revert the decrease on the relative fluorescence units (RFU) caused by the recommended endogenous PKC activator phosphatidyl-L-serine (which is assumed to reflect inhibition of the PKC catalytic activity). Xanthenes **1** and **2**, chelerythrine and NPC 15437 were used on the lowest concentration tested (10⁻⁸ M), the same used to obtain the EC₅₀ ratios presented on Table 2. Results are shown in Figure 7. Xanthenes **1** and **2** were able to revert the effect of the endogenous PKC activator being the effects similar to those caused by chelerythrine and NPC 15437.

Discussion

The yeast phenotypic assay, which uses transformed yeast expressing individual mammalian PKC isoforms, has been proposed as an alternative rapid and simple in vivo assay for the screening of potential PKC modulators. In the present study, the mammalian PKC-α, -βI, -δ, -η or -ζ isoforms were expressed in the same yeast strain. According to previous studies,²¹ exposure of transformed yeast expressing a mammalian PKC isoform to a PKC activator, caused a concentration-dependent inhibition of yeast growth, reflecting an increase in the cell doubling time. The inhibition of yeast growth caused by the PKC activator was assumed to be due to its interaction with the PKC isoform expressed, because it did not occur when transformed yeast cells were incubated in medium lacking the expression inducer, galactose. Confirmation that mammalian PKC isoforms were not expressed when galactose was not added to the medium was obtained by immunoblotting. PMA failed to influence growth of yeast expressing PKC-ζ, confirming the well known inactivity of phorbol esters on isoforms of the atypical PKC family²⁵ and provided additional evidence that the growth inhibition caused by

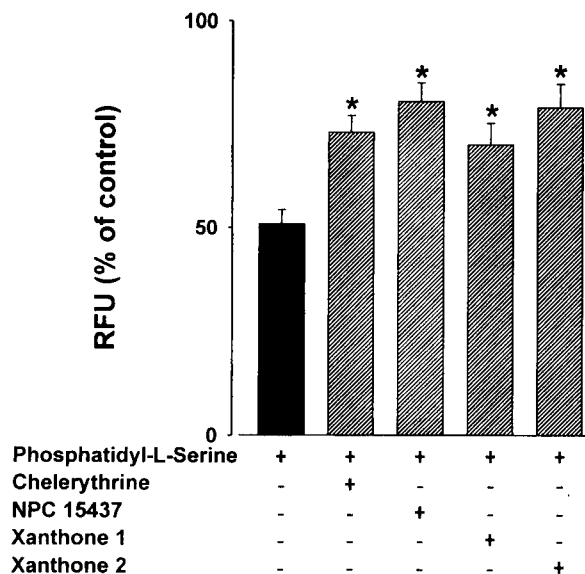


Figure 7. In vitro kinase assay using a purified rat brain PKC enzyme: effects of chelerythrine, NPC 15437, xanthone **1** and xanthone **2** (all tested at the concentration of 10⁻⁸ M). Relative fluorescence units (RFU) were measured in samples without enzyme (100%; control) or with PKC, which caused a decrease on RFU (see Experimental for details). Phosphatidyl-L-serine, the recommended PKC activator, was present in all samples; drugs or solvent, were tested in the absence or in the presence of PKC. Effects of drugs was expressed as % of RFU obtained in the absence of PKC. Shown are means ± SEM of four assays (8 assays for phosphatidyl-L-serine alone). Significantly different from solvent (phosphatidyl-L-serine alone): ^{*}*P* < 0.05 (one way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test).

PMA, in this assay, is due to PKC activation. Therefore, in the present experimental conditions, growth inhibition of yeast expressing an individual mammalian PKC isoform caused by the known PKC activators was assumed to reflect PKC activation.

Absolute values of growth inhibition caused by the PKC activators used (PMA or arachidonic acid) differ among the expressed PKC isoforms. These differences may be ascribed to variations on the degree of expression of the mammalian PKC isoform or to differences on the catalytic potential of the expressed isoform. The later possibility is supported by results obtained *in vitro* that showed that identical amounts of PKC isoforms, in the presence of the same concentration of a PKC activator, led to different degrees of phosphorylation of a given substract.²⁷ In order to avoid the influence of different absolute values on data interpretation, growth inhibition caused by PKC activators was standardized and, for each isoform, growth inhibition caused by a maximal concentration of PKC activator assumed to be the 100% of growth inhibition reachable under the present experimental conditions and EC₅₀ values estimated afterwards.

PKC inhibitors, like chelerythrine and NPC 15437, caused, *per se*, a stimulation of yeast growth. A similar effect was reported to occur with bryostatin 1 on yeast expressing PKC- γ ,⁶ an effect probably due to blockade of the PKC activation caused by endogenous activators. Xanthon 1 and 2, like NPC 15437, also stimulated growth of yeast expressing mammalian PKC isoforms. Nevertheless, chelerythrine, described as a potent PKC inhibitor, only marginally changed growth, what questions the use of growth stimulation as an index of potency for PKC inhibitors. Reasons for the lack of correlation between potency of PKC inhibitors and their ability to increase yeast growth are, at present, not fully understood, but may rely on the different site of interaction between these inhibitors and PKC: NPC 15437 interacts with the C1 region of the regulatory domain^{23,24} whereas chelerythrine interacts with the ATP region of the catalytic domain.²² Xanthon 1 and 2, when tested alone, also stimulated yeast growth, with a pattern of effects similar to those of NPC 15437. This resemblance may indicate that these xanthon interact with PKC at the same domain of NPC 15437.

Blockade of the PKC activators-induced growth inhibition by established PKC inhibitors has been previously reported to reflect inhibition of the mammalian PKC isoform expressed.^{6,7} Under these conditions, PKC inhibitors caused a rightward shift of the concentration-response curve for the PKC activator. The rightward shift was estimated by the ratio between the EC₅₀ of the PKC activator obtained in the presence and in the absence of the PKC inhibitor. The obtained EC₅₀ ratios were used as an index of the potency of the PKC inhibitor on the mammalian PKC isoform expressed.

Chelerythrine and NPC 15437 blocked the growth inhibition caused by PMA (PKC- α , - β I, - δ and - η) or by arachidonic acid (PKC- ζ). Xanthon 1 and 2 also blocked PKC activation caused by PMA or by arachidonic acid.

Comparison of the potency was based on the comparison of EC₅₀ ratios caused by concentrations of chelerythrine, NPC 15437, xanthon 1 and xanthon 2 that, *per se*, did not stimulate yeast growth. Under these conditions xanthon 1 caused a pattern of effects similar to that of NPC 15437: both xanthon 1 and NPC 15437 were very potent upon PKC- η and presented a low potency upon PKC- α , - β I and - δ . Chelerythrine presented also a marked potency on PKC- η , although it was less potent than xanthon 1 and NPC 15437. The high potency of xanthon 1 on PKC- ζ must also be emphasised. On PKC- ζ , xanthon 1 seems to be much more potent than NPC 15437 and chelerythrine. Xanthon 2 did not share the pattern of effects presented by NPC 15437 and chelerythrine, but presented the highest potency on PKC- α , - β I and - δ .

Like other PKC inhibitors, differences on the potency of xanthon 1 and 2 to block the effect of PKC activators may be influenced by their ability to reach their intracellular receptor (PKC) in mammalian cells. The yeast phenotypic assay is an *in vivo* assay, and factors that influence the access of compounds to intracellular receptors in yeast cells are similar to those present in more complex eukariotic cells. Therefore, the activity showed by xanthon 1 and 2 should reflect their potency *in vivo*.

Confirmation that, xanthon 1 and 2 blocked the effect of PKC activators on yeast growth by interacting with PKC was obtained using an *in vitro* kinase assay. At the lowest concentration used on the yeast phenotypic assay, xanthon 1 and 2, like NPC 15437 and chelerythrine, inhibited the PKC catalytic activity, an effect similar to that caused by the established PKC inhibitors.

Previous studies showed that xanthon may act as PKC activators.²¹ The present study extends this observation and shows that xanthon derivatives may also act as potent PKC inhibitors. Given the implication of PKC activation in carcinogenesis and other human diseases, PKC inhibition have become a major research target²⁸ and xanthon derivatives may become an important family to look for potent and selective PKC inhibitors.

Conclusions

This study shows, by using *in vitro* and *in vivo* assays, that simple xanthon can act as inhibitors of mammalian α , β I, δ , η and ζ PKC isoforms. The potencies presented by 3,4-dihydroxyxanthon and 1-formyl-4-hydroxy-3-methoxyxanthon on different PKC isoforms suggest that xanthon may be an important group to look for potent and isoform-selective PKC inhibitors.

Experimental

Chemistry

Purifications of compounds were performed by column chromatography; using Merck silica gel 60 (0.50–0.20 mm)

and preparative thin layer chromatography (tlc), using Merck silica gel 60 (GF₂₅₄). Melting points were obtained in a K  f  r microscope and are uncorrected. IR spectra were recorded on a Perkin Elmer 257 in KBr. ¹H and ¹³C NMR spectra were taken in CDCl₃ or DMSO-*d*₆ at room temperature, on Bruker AC 200 instrument. Chemical shifts are expressed in δ (ppm) values relative to tetramethylsilane (TMS) as an internal reference. MS spectra were recorded as EI (Electronic Impact) mode on a Hitachi Perkin–Elmer.

The synthesis of the following compounds have been carried out as follow.

3,4-Dihydroxyxanthone (1). This compound was obtained by demethylation of 3,4-dimethoxyxanthone according to the procedure described.²⁹ Mp > 330 °C, chloroform (240–241 °C, ethanol/aqueous;³⁰ 238–240 °C, methanol³¹); $\nu_{\max}$ (cm^{−1}) KBr: 3527, 3391, 3088, 1593, 1459, 1340, 1229, 1056, 756; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200.13 MHz) δ : 8.14 (1H, dd, *J* = 8.1 and 1.6 Hz, H-8), 7.81 (1H, ddd, *J* = 8.6, 6.9 and 1.7 Hz, H-6), 7.62 (1H, dd, *J* = 8.6 and 0.9 Hz, H-5), 7.56 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-1), 7.42 (1H, ddd, *J* = 8.1, 6.9 and 0.9 Hz, H-7), 6.93 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50.03 MHz) δ : 175.3 (C-9), 155.5 (C-4b), 151.6 (C-3), 146.4 (C-4a), 134.8 (C-6), 132.7 (C-4), 125.9 (C-8), 124.0 (C-7), 120.8 (C-8a), 118.0 (C-5), 116.6 (C-1), 114.7 (C-9a), 113.2 (C-2); MS *m/z* (rel int): 230 (3, [M + 2]⁺), 229 (22, [M + 1]⁺), 228 (100, [M]⁺), 200 (14), 171 (9), 126 (10), 115 (12), 100 (8), 77 (5), 63 (7).

1-Formyl-4-hydroxy-3-methoxyxanthone (2). This compound was obtained according to the procedure described.³²

General methods for the in vivo yeast phenotypic assay

Yeast nitrogen base was from DIFCO (Merck Portugal, Lisboa, Portugal). The kit for protein quantification was from Pierce (Biocontec, Lisboa, Portugal). The secondary alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG detection kit (AP-10), recombinant proteins PKC- α (PK11), PKC- β I (PK16), PKC- δ (PK31), PKC- η (PK46) and PKC- ζ (PK41) were from Oxford Biomedical Research (LabClinics, Barcelona, Spain). Nitrocellulose membranes and all the reagents for sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblots were from BioRad (PACI, Lisboa, Portugal). Acid-washed glass beads, antibodies to PKC- α , PKC- β I, PKC- δ , PKC- η and PKC- ζ , aprotinin, arachidonic acid sodium salt, chelerythrine chloride, *R*-2,6-diamino-*N*-[[1-(1-oxotridecyl)-2-piperidinyl]methyl]-hexanamide dihydrochloride (NPC 15437 dihydrochloride), leupeptin, pepstatin A, phenylmethylsulfonyl fluoride, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) were from Sigma Aldrich (Sintra, Portugal). All other chemicals used were of analytical grade.

Yeast transformation and cell cultures. Constructed yeast expression plasmids YEp52 and YEp51, encoding the cDNA for bovine PKC- α and for rat PKC- β I, respectively (kindly offered by Dr. Heimo Riedel,

Wayne University, Detroit, USA) and YEplac181, encoding the cDNA for the rat PKC- δ , mouse PKC- η or PKC- ζ (kindly offered by Dr. Nigel Goode, Royal Veterinary College, London, UK) were amplified in *Escherichia coli* DH5 α and confirmed by restriction analysis. The plasmids used contain galactose-inducible transcriptional elements and the *leu2* gene for selection. *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*; strain CG379; α *ade5 his7-2 leu2-112 trp1-289 α ura3-52 [Kil-O]*; Yeast Genetic Stock Center, University of California, Berkeley, USA) was transformed using the lithium acetate method.³³ To ensure the selection of transformed yeast, cells were grown in leucine-free medium, in 1.5% agar plates, at 30 °C.

For the yeast phenotypic assay, transformed cells were incubated in leucine free-medium, with slow shaking, at 30 °C. The leucine free-medium contained 0.7% yeast nitrogen base, 2% glucose (w/v) or the indicated carbon source, amino acids, purines and pyrimidines, according to the transformed yeast requirements. Galactose (2%; w/v), instead of glucose, was included to induce transcription of the mammalian PKC gene.

Cell lysis and immunoblotting. Cell lysis was performed basically as described.²¹ The protein concentration was determined using a kit for protein quantification (*Coomassie*[®] Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Biocontec, Lisbon, Portugal). Similar amounts of protein (~40 μ g) from protein extracts were then separated on 10% SDS-polyacrylamide gels (Mini-Protean II, BioRad, Hercules, CA, USA). Positive controls (4 μ g) were obtained using recombinant proteins PKC- α (MW 76,799 Da), PKC- β I (MW 76,790 Da), PKC- δ (MW 77,517 Da), PKC- η (MW 77,600 Da) and PKC- ζ (MW 67,740 Da). Proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes and probed on immunoblots with specific rabbit antibodies to the individual mammalian PKC isoforms and revealed with a secondary alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG (AP-10, Oxford Biomedical Research, LabClinics, Barcelona, Spain).

Yeast phenotypic assay. Transformed yeast cultures were incubated in leucine-free medium. Optical density values, measured at 620 nm (OD₆₂₀; Cary 1E Varian spectrophotometer, Palo Alto, CA, USA), were used as an indicator of growth. Transformed yeast were grown to an OD₆₂₀ of approximately 1, collected by centrifugation and diluted to an OD₆₂₀ of 0.05, in medium containing 2% (w/v) galactose (gene transcription-inducer) and 3% (v/v) glycerol (alternative carbon source). Diluted cultures (200 μ L) were transferred to 96-wells microtitre plates and incubated for up to 100 h, with slow shaking at 30 °C, either in the presence of drugs or solvent (DMSO 0.1%; final concentration). Growth was monitored by determining the OD₆₂₀ using a plate reader (BioRad Benchmark Microplate Reader; Hercules, CA, USA). In preliminary experiments, growth curves for individual isoforms were determined and the duration of the logarithmic and stationary phases identified. Estimation of drug effects was based on OD₆₂₀ measurements at fixed time points (at 65 h for

cPKC isoforms or at 48 h incubation for nPKC and aPKC), times occurring during the respective logarithmic phase and where a 'steady-state growth inhibition' (period of time during which maximal inhibition of growth was reached and remained constant or changed only slightly) was reached. In individual experiments, OD₆₂₀ was routinely monitored for up to 100 h to confirm whether the 'fixed time points' chosen were appropriate for all the compounds studied (PMA or arachidonic acid). The difference between the maximal OD₆₂₀ reached and that measured at the beginning of incubation was used as an index of yeast growth. Drugs or solvent were added at the beginning and kept throughout the incubation. Yeast growth in the presence of drugs was expressed as percentage of growth observed in parallel experiments in the presence of solvent; it was further transformed into growth inhibition by subtracting that value from 100. Because growth inhibition caused by a maximal concentration of the standard PKC activator varied between isoforms, 100% growth inhibition was assumed to be that caused by 10⁻⁵ M PMA (or arachidonic acid for PKC- ζ), in order to standardize the maximal inhibition reachable; 0% growth inhibition would occur when growth in the presence of drugs was identical to that in the presence of solvent. Effects of PKC activators were expressed as percentage of that effect.

For interaction experiments, a single concentration of PKC inhibitors or xanthenes **1** or **2** were added to PMA (10⁻⁸–10⁻⁵ M; arachidonic acid for PKC- ζ). Concentration-response curves for the PKC activator alone in the absence or in the presence of PKC inhibitors or xanthenes **1** or **2**, were obtained and the concentration of PKC activator that caused 50% growth inhibition (EC₅₀) determined. For each compound the EC₅₀ ratios [EC₅₀ (PKC activator + 10⁻⁸ M compound)/EC₅₀ (PKC activator)] were calculated on each PKC isoform tested.

In vitro kinase assay

The direct interaction between the compounds tested (PKC inhibitors and xanthenes **1** and **2**) with PKC was studied in vitro using the IQ™ PKC Assay Kit—Pseudo-substrate Peptide Substrate from Pierce Biotechnology (PACI, Lisboa, Portugal). The assay was performed in agreement with the kit procedure for 96-well plate format. Xanthenes **1** and **2**, and the standard PKC inhibitors (chelerythrine and NPC 15437) were tested at the concentration of 10⁻⁸ M. Purified PKC enzyme standard from rat brain (containing a mixture of α , β and γ isoforms) was from Pierce Biotechnology (PACI, Lisboa, Portugal); it was used at the final concentration of 0.01 Units. Reaction mixtures containing the endogenous PKC activator phosphatidyl-L-serine, were incubated for 90 min and fluorescence intensity determined using a microplate spectrofluorometer SPECTRAMax[®] GEMINI XS (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). In the presence of PKC, there was a decrease on relative fluorescence units (RFU), reflecting a phosphorylation of the fluorescent substrate. In the presence of PKC inhibitors, substrate

phosphorylation is reduced causing an increase on RFU. RFU in samples containing no PKC were considered as 100%. Effects of drugs were expressed as percentage of that value.

Statistical analysis. Results are given as arithmetic means $\pm$ SEM and n represents the number of determinations. Differences between means were tested for significance using either paired Student's t test, unpaired Student's t test or one way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test. A P value less than 0.05 was taken to be statistically significant.

Acknowledgements

The authors thank Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT; I&D n. 226/94), POCTI (QCA III) and FEDER for financial support. E. Sousa is a recipient of a PhD grant from FCT (PRAXIS XXI/BD/15663/98).

References and Notes

- Musashi, M.; Ota, S.; Shiroshita, N. *Int. J. Hematol.* **2000**, *72*, 12.
- Webb, B. L.; Hirst, S. J.; Giembycz, M. A. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 1433.
- Ron, D.; Kazanietz, M. G. *FASEB J.* **1999**, *13*, 1658.
- Riedel, H.; Hansen, H.; Parissenti, A. M.; Su, L.; Shieh, H. L.; Zhu, J. *J. Cell. Biochem.* **1993**, *52*, 320.
- Shieh, H. L.; Hansen, H.; Zhu, J.; Riedel, H. *Mol. Carcinog.* **1995**, *12*, 166.
- Keenan, C.; Goode, N.; Pears, C. *FEBS Lett.* **1997**, *415*, 101.
- Keenan, C.; Goode, N.; Pears, C. *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25*, S591.
- Abou-Shoer, M.; Boettner, F. E.; Chang, C. J.; Cassady, J. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2795.
- Liou, S. S.; Shieh, W. L.; Cheng, T. H.; Won, S. J.; Lin, C.-N. *J. Pharm. Pharmacol.* **1993**, *45*, 791.
- Lin, C. N.; Liou, S. J.; Lee, T. H.; Chuang, Y. C.; Won, S.-J. *J. Pharm. Pharmacol.* **1996**, *48*, 539.
- Liu, H. S.; Lin, C. N.; Won, S. J. *Anticancer Res.* **1997**, *17*, 1107.
- Yoshimi, N.; Matsunaga, K.; Katayama, M.; Yamada, Y.; Kuno, T.; Qiao, Z.; Hara, A.; Yamahara, J.; Mori, H. *Cancer Lett.* **2001**, *163*, 163.
- Lin, C. N.; Chung, M. I.; Liou, S. J.; Lee, T. H.; Wang, J.-P. *J. Pharm. Pharmacol.* **1996**, *48*, 532.
- Lin, C. N.; Hsieh, H. K.; Liou, S. J.; Ko, H. H.; Lin, H. C.; Chung, M. I.; Ko, F. N.; Liu, H. W.; Teng, C. M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1996**, *48*, 887.
- Marona, H. *Pharmazie* **1998**, *53*, 672.
- Marona, H.; Gorka, Z.; Szneler, E. *Pharmazie* **1998**, *53*, 219.
- Mak, N. K.; Li, W. K.; Zhang, M.; Wong, R. N. S.; Tai, L.-S.; Yung, K. K. L.; Leung, H. W. *Life Sci.* **2000**, *66*, 347.
- Mak, N. K.; Lung, H. L.; Wong, R. N. S.; Leung, H. W.; Tsang, H. Y.; Leung, K. N. *Planta Med.* **2001**, *67*, 400.
- Lu, Z. X.; Hasmeda, M.; Mahabusarakam, W.; Ternai, B.; Ternai, P. C.; Polya, G. M. *Chem. Biol. Interact.* **1998**, *114*, 121.
- Wang, J. P.; Raung, S. L.; Tsao, L. T.; Lin, C. N. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *336*, 81.

21. Saraiva, L.; Fresco, P.; Pinto, E.; Sousa, E.; Pinto, M.; Gonçalves, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3219.
22. Herbert, J. M.; Augereau, J. M.; Gleye, J.; Maffrand, J. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *172*, 993.
23. Sullivan, J. P.; Connor, J. R.; Shearer, B. G.; Burch, R. M. *Agents Actions* **1991**, *34*, 142.
24. Sullivan, J. P.; Connor, J. R.; Shearer, B. G.; Burch, R. M. *Mol. Pharmacol.* **1992**, *41*, 38.
25. Ways, D. K.; Cook, P. P.; Webster, C.; Parker, P. J. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 4799.
26. Nakanishi, H.; Exton, J. H. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16347.
27. Ryves, W. J.; Evans, A. T.; Olivier, A. R.; Parker, P. J.; Evans, F. T. *FEBS Lett.* **1991**, *288*, 5.
28. Da Rocha, A. B.; Mans, D. R. A.; Regner, A.; Schwartzmann, G. *Oncologist* **2002**, *7*, 17.
29. Gottlieb, O. R.; Mesquita, A. A. L.; Oliveira, G. G.; Melo, M. T. *Phytochemistry* **1970**, *9*, 2537.
30. Grover, P. K.; Shah, G. D.; Shah, R. C. *J. Chem. Soc.* **1955**, 3982.
31. Lin, C. N.; Liou, S. S.; Ko, F. N.; Teng, C. M. *J. Pharm. Sci.* **1993**, *82*, 11.
32. Fernandes, E. G. R.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S.; Silva, F. M.; Borges, F. M.; Pinto, M. M. M. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 305.
33. Ito, H.; Fukuda, Y.; Murata, K.; Kimura, A. *J. Bacteriol.* **1983**, *153*, 163.

CAPÍTULO X

XANTONOLIGNÓIDES

SARAIVA L., FRESCO P., PINTO E., SOUSA E., PINTO M., GONÇALVES J. Inhibition of α , β I, δ , η and ζ Protein Kinase C Isoforms by Xanthonolignoids. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* (Aceite para publicação em Março de 2003).

Inhibition of α , β I, δ , η and ζ Protein Kinase C Isoforms by Xanthonolignoids

LUCÍLIA SARAIVA^{a,b}, PAULA FRESCO^a, EUGÉNIA PINTO^b, EMÍLIA SOUSA^c, MADALENA PINTO^c and JORGE GONÇALVES^{a,*}

^aServiço de Farmacologia, CEQOFFUP, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal;

^bServiço de Microbiologia, CEQOFFUP, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal;

^cServiço de Química Orgânica, CEQOFFUP, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

(Received 6 January 2003; In final form 15 March 2003)

The effect of the xanthonolignoids *trans*-($\pm$)-kielcorin C, *cis*-($\pm$)-kielcorin C, *trans*-($\pm$)-kielcorin D, *trans*-($\pm$)-isokielcorin D and *trans*-($\pm$)-kielcorin E on isoforms α , β I, δ , η and ζ of protein kinase C (PKC) was studied using the yeast phenotypic assay.

All the compounds tested revealed an effect compatible with PKC inhibition, similar to that exhibited by the well established PKC inhibitor chelerythrine, and with differences in their potency towards the distinct isoforms tested, being, in general, potent inhibitors of the atypical PKC isoform (PKC- ζ). PKC inhibition caused by these kielcorins was confirmed using an *in vitro* kinase assay.

The present study constitutes the first attempt to unravel the molecular mechanism of kielcorins activity, and shows that xanthonolignoids are a promising group of compounds to investigate for isoform selective PKC inhibitors.

Keywords: Protein kinase C; PKC isoforms; Yeast phenotypic assay; PKC inhibitors; Xanthonolignoids; Kielcorins

INTRODUCTION

The ubiquitous enzyme protein kinase C (PKC) is a family of serine-threonine kinases with pivotal roles in cellular regulation, signal transduction and neoplastic promotion.^{1,2} PKC isoforms are grouped into at least three groups: the classical PKCs (cPKCs), which include the isoforms α , β I, β II and γ ; the novel PKCs (nPKCs), which include the isoforms δ , ϵ , θ , and η ; and the atypical PKCs (aPKCs), which include the isoforms ζ and λ /I.² More recently, a fourth

group of structurally distinct PKCs has been identified, the so-called PKC-related kinases (PRKs).² A new isoform, PKC μ /PKD, has also been reported, but its inclusion in the PKC family remains controversial.²

Clarification of the role of individual PKC isoforms in the cell has been made difficult by the lack of selective PKC activators and inhibitors,³ which has been hampered by methodological limitations, caused by the coexistence of several PKC isoforms. These limitations can be circumvented by using the yeast phenotypic assay,^{4,5} which uses yeast expressing an individual mammalian PKC isoform. The assay is based on the growth inhibition of transformed yeast (reflecting an increase in the cell doubling time), which is proportional to the degree of PKC activation.^{6,7} Because only one mammalian PKC isoform is functionally expressed, separately, and effects non-mediated by that isoform can be easily detected by measuring growth in the absence of expression, it represents a convenient method to screen potential PKC activators and inhibitors and to elucidate their isoform selectivity. In the yeast phenotypic assay, PKC activators cause a concentration-dependent growth inhibition of transformed yeast,^{6,7} while PKC inhibitors block that growth inhibition.^{8,9} Therefore, the potency of PKC activators can be estimated by the concentration that cause half of the maximal growth inhibition attainable by PKC activators (EC_{50}) and the potency of PKC inhibitors by the increase in the EC_{50} value caused by the PKC inhibitor [EC_{50} ratio = $EC_{50}(\text{PKC activator} + \text{PKC inhibitor})/EC_{50}(\text{PKC activator})$].

*Corresponding author. Tel.: +351 22 2078932. Fax: +351 22 2078969. E-mail: jorge.goncalves@ff.up.pt

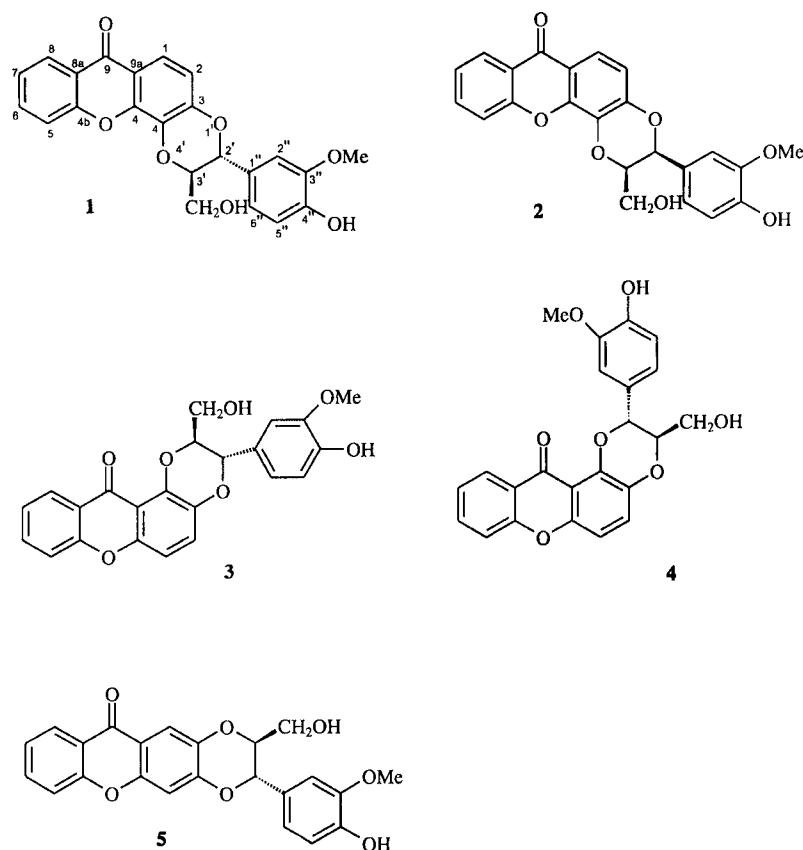


FIGURE 1 Chemical structures of *trans*-(±)-kielcorin C (1), *cis*-(±)-kielcorin C (2), *trans*-(±)-kielcorin D (3), *trans*-(±)-isokielcorin D (4) and *trans*-(±)-kielcorin E (5).

Xanthone derivatives have been reported to mediate several important biological activities.^{10,11,12} Recent studies suggested that these compounds may act, at least in part, by interacting with PKC, causing effects compatible with either PKC activation⁴ or PKC inhibition.⁵

Kielcorins are 1,4-benzodioxane derivatives belonging to the xanthonolignoids family, with a skeleton in which a phenylpropane unit is linked to a xanthone nucleus through a dioxane bridge.^{10,13,14} Recent studies showed that kielcorins have an hepatoprotective effect¹⁵ and an antiproliferative effect against three human tumor cell lines: MCF-7 (breast), TK-10 (renal) and UACC-62 (melanoma).^{13,14} However, to our knowledge, no data is available about the molecular basis of the biological

activity of kielcorins. Previously, the biomimetic synthesis of natural kielcorin and kielcorin B was achieved.^{16,17} In order to obtain new compounds belonging to this family, synthesis of *trans*-(±)-kielcorin C (1), *cis*-(±)-kielcorin C (2), *trans*-(±)-kielcorin D (3), *trans*-(±)-isokielcorin D (4) and *trans*-(±)-kielcorin E (5) (Figure 1) was undertaken.¹³ The synthetic approach of these constitutional isomers was based on the biomimetic pathway, by oxidative coupling of coniferyl alcohol (6) with an appropriate xanthone (7)¹³ (Figure 2).

In the present study, the effects of *trans*-(±)-kielcorin C (1), *cis*-(±)-kielcorin C (2), *trans*-(±)-kielcorin D (3), *trans*-(±)-isokielcorin D (4) and *trans*-(±)-kielcorin E (5) on PKC isoforms α and β I (cPKCs), δ and η (nPKCs) and ζ (aPKCs) were

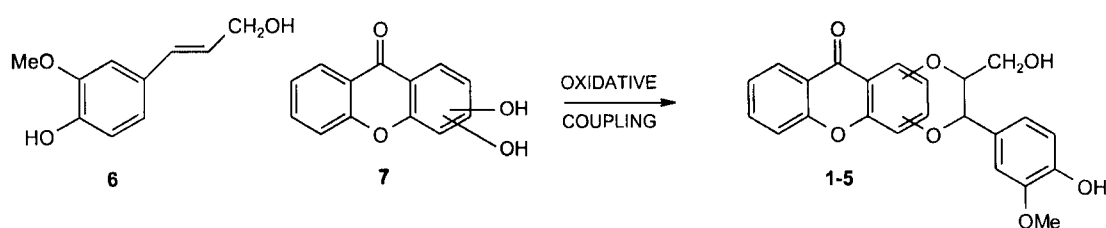


FIGURE 2 General procedure for the biomimetic synthesis of isomeric kielcorins 1–5.

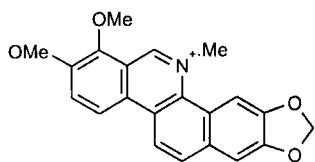


FIGURE 3 Chemical structure of chelerythrine.

characterized in our laboratory using the yeast phenotypic assay. The inhibition of PKC by these five isomeric kielcorin derivatives is reported and their effects and structures were compared to those of the PKC inhibitor chelerythrine¹⁸ (Figure 3). Differences in their potency towards the individual PKC isoforms tested were also detected.

This work represents the first molecular approach for the study of the biological effects of kielcorins and reveals that they act as PKC inhibitors.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis

Purification of compounds was performed by column chromatography, using Merck silica gel 60 (0.50–0.20 mm), flash chromatography [Merck silica gel 60 (0.040–0.063 mm)] and preparative thin layer chromatography (tlc), employing Merck silica gel 60 (GF₂₅₄). M.p. were determined on a Köfler microscope and are uncorrected, IR Spectra on a Perkin Elmer 257 spectrophotometer with KBr microplates, UV Spectra on a Varian CARY 1E spectrophotometer, ¹H and ¹³C-NMR Spectra on a Bruker AC 200, DRX 300, or DRX 500 spectrometer at r.t., in CDCl₃ or (D₆)DMSO with δ in ppm relative to SiMe₄ as an internal reference and coupling constants *J* in Hz. ¹H-NMR assignments were made using 2D COSY experiments, while ¹³C-NMR assignments were made using one-dimensional selective INEPT and 2D HETCOR, HSQC and HMBC experiments (long range C/H coupling constants were optimised to 7 and 1 Hz). NOE experiments were determined by means of NOE difference technique, using an irradiation time of 2 s and a relaxation delay of 4 s. EI-MS Spectra: Hitachi Perkin-Elmer RMU-6M spectrometer, in *m/z*. HR-MS Spectra: VG AutoSpec-Q spectrometer; recorded as EI (electronic impact) mode.

General Procedure for the Synthesis of Kielcorin Derivatives

The appropriate dihydroxyxanthone (7, 615 mg, 2.7 mmol) and coniferyl alcohol (6, 500 mg, 2.7 mmol) in a mixture of 1:1 toluene:acetone were stirred in the presence of silver oxide (860.6 mg, 3.1 mmol) in the dark for 2–3 days. The suspension

was filtered, the filtrate evaporated, and the crude product purified by column chromatography using mixtures of hexane:chloroform (20:80 for compounds 1, 2, and 5) and chloroform:methanol (98:2 for compounds 3 and 4). The isolation of the components 1–2, 3–4 and 5 was then carried out by preparative tlc (CHCl₃:MeOH 95:5).

trans-(±)-Kielcorin C (1)

M.p. 243–247° (Me₂CO). UV (EtOH): 309, 283, 239, 204 nm. IR (KBr): 3398, 1642, 1605, 1562, 1449, 1338, 1264, 1025, 861 cm⁻¹. ¹H-NMR (300.13 MHz, (D₆)DMSO) δ : 9.25 (s, HO-C(4'')), 8.20 (dd, *J* = 7.7, and 1.6, H-C(8)), 7.87 (ddd, *J* = 8.3, 7.4, and 1.6, H-C(6'')), 7.70 (d, *J* = 8.8, H-C(1'')), 7.69 (d, *J* = 8.3, H-C(5'')), 7.49 (ddd, *J* = 7.7, 7.4, and 0.7, H-C(7'')), 7.07 (d, *J* = 8.8, H-C(2'')), 7.07 (d, *J* = 1.7, H-C(2'')), 6.92 (dd, *J* = 8.1 and 1.7, H-C(6'')), 6.83 (d, *J* = 8.1, H-C(5'')), 5.15 (d, *J* = 7.9, H-C(2'')), 5.13 (t, *J* = 6.1, CH₂OH), 4.36–4.40 (m, H-C(3'')), 3.79 (s, MeO-C(3'')), 3.71–3.76 (m, CH₂OH), 3.40–3.50 (m, CH₂OH). ¹³C-NMR (75.47 MHz, (D₆)DMSO): 175.1 (C(9)), 155.4 (C(4b)), 148.8 (C(3)), 147.7 (C(3'')), 147.2 (C(4'')), 145.9 (C(4a)), 135.2 (C(6)), 131.8 (C(4)), 126.7 (C(1'')), 126.0 (C(8)), 124.5 (C(7)), 121.0 (C(8a)), 120.7 (C(6'')), 118.1 (C(5)), 117.5 (C(1)), 115.7 (C(9a)), 115.4 (C(5'')), 113.9 (C(2)), 111.8 (C(2'')), 78.0 (C(3'')), 76.5 (C(2'')), 59.9 (CH₂OH), 55.7 (MeO-C(3'')). EI-MS: 406 (6, M⁺), 356 (26), 341 (22), 327 (17), 306 (18), 292 (12), 281 (100), 261 (38), 253 (5), 228 (13), 215 (8), 180 (10), 165 (8), 141 (10), 115 (18), 105 (9), 91 (17), 77 (18), 63 (10), 55 (13). HRMS for C₂₃H₁₉O₇: Calc. 407.1131; Found: 407.1130.

cis-(±)-Kielcorin C (2)

M.p. 200–202° (Me₂CO). UV (EtOH): 308, 283, 239, 204 nm. IR (KBr): 3420, 1644, 1607, 1511, 1454, 1379, 1267, 1100, 860 cm⁻¹. ¹H-NMR (300.13 MHz, (D₆)DMSO) δ : 9.09 (s, HO-C(4'')), 8.21 (dd, *J* = 7.6 and 1.6, H-C(8)), 7.83 (ddd, *J* = 8.0, 7.5, and 1.6, H-C(6'')), 7.75 (d, *J* = 8.7, H-C(1'')), 7.67 (d, *J* = 8.0, H-C(5'')), 7.46 (dd, *J* = 7.6 and 7.5, H-C(7'')), 7.05 (d, *J* = 8.8, H-C(2'')), 6.99 (br. s, H-C(2'')), 6.95–6.74 (m, H-C(5'') and H-C(6'')), 5.46 (d, *J* = 2.8, H-C(2'')), 4.98 (t, *J* = 5.4, CH₂OH), 4.63–4.68 (m, H-C(3'')), 3.83 (s, MeO-C(3'')), 3.42–3.61 (m, CH₂OH). ¹³C-NMR (75.47 MHz, (D₆)DMSO): 175.5 (C(9)), 155.9 (C(4b)), 148.7 (C(3)), 147.8 (C(3'')), 147.1 (C(4'')), 146.7 (C(4a)), 135.2 (C(6)), 131.1 (C(4)), 126.7 (C(1'')), 126.4 (C(8)), 124.6 (C(7)), 121.5 (C(8a)), 119.5 (C(6'')), 118.4 (C(5)), 118.2 (C(1)), 116.4 (C(9a)), 115.9 (C(5'')), 114.1 (C(2)), 111.4 (C(2'')), 77.8 (C(3'')), 76.4 (C(2'')), 58.6 (CH₂OH), 56.0 (MeO-C(3'')). EI-MS: 406 (19, M⁺), 281 (1.8), 246 (24), 184 (14), 153 (100), 149 (8), 137 (17), 111 (1.3), 93 (60), 83 (22), 72 (8), 65 (38), 59 (14), 57 (41). HRMS for C₂₃H₁₉O₇: Calc. 407.1131; Found: 407.1131.

trans-(±)-Kielcorin D (3)

M.p. 258–260° (Me₂CO). UV (EtOH): 372, 278, 259, 239, 237, 212 nm. IR (KBr): 3498, 1635, 1602, 1309, 1270, 1228, 1047, 762 cm⁻¹. ¹H-NMR (300.13 MHz, (D₆)DMSO) δ: 9.20 (s, HO-C(4'')), 8.04 (dd, *J* = 7.9 and 1.6, H-C(8)), 7.80 (ddd, *J* = 8.1, 7.8, and 1.6, H-C(6)), 7.56 (d, *J* = 8.1, H-C(5)), 7.45 (d, *J* = 9.1, H-C(3)), 7.40 (dd, *J* = 7.9 and 7.8, H-C(7)), 7.14 (d, *J* = 9.1, H-C(4)), 7.10 (d, *J* = 1.7, H-C(2'')), 6.92 (dd, *J* = 8.1 and 1.7, H-C(6'')), 6.83 (d, *J* = 8.1, H-C(5'')), 5.05 (d, *J* = 7.6, H-C(3')), 5.05 (t, *J* = 7.6, CH₂OH), 4.20–4.23 (m, H-C(2')), 3.78 (s, MeO-C(3'')), 3.57–3.62 (m, CH₂OH), 3.41 (under H₂O signal, CH₂OH). ¹³C-NMR (75.47 MHz, (D₆)DMSO): 174.9 (C(9)), 154.6 (C(4b)), 150.9 (C(4a)), 147.6 (C(3'')), 147.0 (C(4'')), 143.1 (C(1)), 138.9 (C(2)), 134.8 (C(6)), 127.1 (C(1'')), 125.9 (C(8)), 124.0 (C(7)), 123.7 (C(3)), 121.7 (C(8a)), 120.5 (C(6'')), 117.6 (C(5)), 115.3 (C(5'')), 111.92 and 111.86 (C(9a) and C(2'')), 109.5 (C(4)), 77.2 (C(2')), 76.1 (C(3')), 60.0 (CH₂OH), 55.7 (MeO-C(3'')). EI-MS: 406 (6, M⁺), 369 (2), 327 (7), 285 (6), 228 (14), 184 (22), 153 (100), 137 (10), 125 (13), 110 (9), 93 (61), 81 (9), 65 (35). HRMS for C₂₃H₁₉O₇: Calc. 407.1131; Found: 407.1130.

trans-(±)-Isokielcorin D (4)

M.p. 136–139° (Me₂CO). UV (EtOH): 374, 280, 260, 240, 209 nm. IR (KBr): 3436, 1626, 1520, 1459, 1383, 1319, 1269, 1110, 1060, 1028, 809 cm⁻¹. ¹H-NMR (500.13 MHz, (D₆)DMSO) δ: 9.20 (s, HO-C(4'')), 8.12 (dd, *J* = 7.8 and 1.4, H-C(8)), 7.81 (ddd, *J* = 8.1, 7.4, and 1.4, H-C(6)), 7.57 (d, *J* = 8.1, H-C(5)), 7.43 (d, *J* = 9.1, H-C(3)), 7.43 (dd, *J* = 7.8 and 7.4, H-C(7)), 7.12 (d, *J* = 9.1, H-C(4)), 7.04 (d, *J* = 1.4, H-C(2'')), 6.89 (d, *J* = 8.1 and 1.4, H-C(6'')), 6.80 (d, *J* = 8.1, H-C(5'')), 5.00 (d, *J* = 7.8, H-C(2')), 4.99 (t, *J* = 7.6, CH₂OH), 4.31–4.34 (m, H-C(3')), 3.77 (s, MeO-C(3'')), 3.71–3.73 (m, CH₂OH), 3.41 (under H₂O signal, CH₂OH). ¹³C NMR (75.47 MHz, (D₆)DMSO): 174.6 (C(9)), 154.5 (C(4b)), 150.0 (C(4a)), 147.7 (C(3'')), 147.3 (C(4'')), 143.2 (C(1)), 139.2 (C(2)), 135.0 (C(6)), 127.3 (C(1'')), 126.2 (C(8)), 123.8 (C(3)), 123.7 (C(7)), 122.3 (C(8a)), 120.8 (C(6'')), 117.7 (C(5)), 115.1 (C(5'')), 111.7 (C(9a) and C(2'')), 107.9 (C(4)), 78.0 (C(3')), 75.2 (C(2')), 59.4 (CH₂OH), 55.4 (MeO-C(3'')). EI-MS: 406 (50, M⁺), 239 (7), 228 (100), 199 (25), 180 (73), 170 (11), 153 (18), 137 (64), 124 (44), 103 (5), 91 (16), 77 (14), 65 (10). HRMS for C₂₃H₁₉O₇: Calc. 407.1131; Found: 407.1131.

trans-(±)-Kielcorin E (5)

M.p. 247–249° (Me₂CO). UV (EtOH): 353, 307, 277, 241 nm. IR (KBr): 3498, 1635, 1602, 1309, 1270, 1228, 1047, 762 cm⁻¹. ¹H-NMR (300.13 MHz, (D₆)DMSO) δ: 9.25 (s, HO-C(4'')), 8.17 (dd, *J* = 7.7 and 1.2, H-C(8)), 7.84 (ddd, *J* = 8.0, 7.6, and 1.2, H-C(6)), 7.62 (d, *J* = 8.0, H-C(5)), 7.61 (s, H-C(1)), 7.46 (ddd, *J* = 7.7 and

7.5, H-C(7)), 7.23 (s, H-C(4)), 7.06 (d, *J* = 1.3, H-C(2'')), 6.90 (dd, *J* = 8.1 and 1.3, H-C(6'')), 6.82 (d, *J* = 8.1, H-C(5'')), 5.13 (d, *J* = 8.1, H-C(3')), 5.06 (br. s., CH₂OH), 4.33–4.35 (m, H-C(2')), 3.78 (s, MeO-C(3'')), 3.58 (br. d, *J* = 11.4, CH₂OH), 3.38 (under H₂O signal, CH₂OH). ¹³C-NMR (75.47 MHz, (D₆)DMSO): 174.8 (C(9)), 155.7 (C(4b)), 151.1 (C(3)), 150.6 (C(4a)), 147.7 (C(3'')), 147.3 (C(4'')), 141.3 (C(2)), 135.0 (C(6)), 126.5 (C(1'')), 125.8 (C(8)), 124.1 (C(7)), 120.8 (C(6'')), 120.6 (C(8a)), 118.0 (C(5)), 115.4 (C(5'') and C(9a)), 111.9 (C(2'')), 111.2 (C(1)), 104.8 (C(4)), 77.8 (C(2')), 77.0 (C(3')), 60.0 (CH₂OH), 55.7 (MeO-C(3'')). EI-MS: 406 (0.02, M⁺), 369 (0.8), 327 (6), 310 (0.8), 285 (6), 267 (0.6), 260 (1.4), 246 (1), 215 (2), 208 (0.6), 184 (21), 153 (100), 137 (3), 125 (12), 110 (9), 93 (62), 81 (8), 65 (35). HRMS for C₂₃H₁₉O₇: Calc. 407.1131; Found: 407.1131.

Molecular Calculations

All calculations were performed with *Gaussian 98*.¹⁹ The geometry optimisation was performed using the AM1 semi-empirical method. The optimised conformations were submitted to a single point calculation, using the density functional theory, with the B3LYP functional at 3-21G basis set. The potential iso-surfaces were obtained using the cubegen utility present in the *Gaussian* package. All visualizations were obtained with *Molekel 4.2*.²⁰

General Methods for the Yeast Phenotypic Assay

Yeast nitrogen base was from DIFCO (Merck Portugal, Lisboa, Portugal). The kit for protein quantification was from Pierce (Biocontec, Lisboa, Portugal). The secondary alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG detection kit (AP-10) and recombinant proteins, PKC-α (PK11), PKC-βI (PK16), PKC-δ (PK31), PKC-η (PK46) and PKC-ζ (PK41), were from Oxford Biomedical Research (LabClinics, Barcelona, Spain). Nitrocellulose membranes and all reagents for sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblots were from BioRad (PACI, Lisboa, Portugal). Acid-washed glass beads, antibodies to PKC-α, PKC-βI, PKC-δ, PKC-η and PKC-ζ, aprotinin, arachidonic acid sodium salt, chelerythrine chloride, leupeptin, pepstatin A, phenylmethylsulfonyl fluoride, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) were from Sigma Aldrich (Sintra, Portugal). All other chemicals used were of analytical grade.

Yeast Transformation and Cell Cultures

Constructed yeast expression plasmids YEp52 and YEp51, encoding the cDNA for bovine PKC-α and for rat PKC-βI, respectively (kindly provided by Dr. Heimo Riedel, Wayne University, Detroit, USA) and YEplac181, encoding the cDNA for the rat

PKC- δ , mouse PKC- η or PKC- ζ (kindly provided by Dr. Nigel Goode, Royal Veterinary College, London, UK) were amplified in *Escherichia coli* DH5 α and confirmed by restriction analysis. The plasmids used contain galactose-inducible transcriptional elements and the *leu2* gene for selection. *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*; strain CG379; α *ade5 his7-2 leu2-112 trp1-289 α ura3-52* [Kil-O]; Yeast Genetic Stock Center, University of California, Berkeley, USA) was transformed using the lithium acetate method.²¹ To ensure the selection of transformed yeast, cells were grown in leucine-free medium, in 1.5% agar plates, at 30°C.

For the yeast phenotypic assay, transformed cells were incubated in leucine free-medium, with slow shaking, at 30°C. The leucine free-medium contained 0.7% yeast nitrogen base, 2% glucose (w/v) or the indicated carbon source, amino acids, purines and pyrimidines, according to the transformed yeast requirements. Galactose (2%; w/v), instead of glucose, was included to induce transcription of the mammalian PKC gene.

Cell Lysis and Immunoblotting

Cell lysis was performed basically as described.⁴ The protein concentration was determined using a kit for protein quantification (Coomassie[®] Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Biocontec, Lisboa, Portugal). Similar amounts of protein (~40 μ g) from protein extracts were then separated on 10% SDS-polyacrylamide gels (Mini-Protean II, BioRad, Hercules, CA, USA). Positive controls (4 μ g) were obtained using recombinant proteins PKC- α (M_r 76,799 Da), PKC- β I (M_r 76,790 Da), PKC- δ (M_r 77,517 Da), PKC- η (M_r 77,600 Da) and PKC- ζ (M_r 67,740 Da). Proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes and probed on immunoblots with specific rabbit antibodies to the individual mammalian PKC isoforms and revealed with a secondary alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG (AP-10, Oxford Biomedical Research, LabClinics, Barcelona, Spain).

Yeast Phenotypic Assay

Transformed yeast cultures were incubated in leucine-free medium. Optical density values, measured at 620 nm (OD_{620} ; Cary 1E Varian spectrophotometer, Palo Alto, CA, USA), were used as an indicator of growth. Transformed yeast were grown to an OD_{620} of approximately 1, collected by centrifugation and diluted to an OD_{620} of 0.05, in medium containing 2% (w/v) galactose (gene transcription-inducer) and 3% (v/v) glycerol (alternative carbon source). Diluted cultures (200 μ l) were transferred to 96-wells microtitre plates and incubated for up to 100 h, with slow shaking at

30°C, either in the presence of drugs or solvent (DMSO 0.1%; final concentration). Growth was monitored by determining the OD_{620} using a plate reader (BioRad Benchmark Microplate Reader; Hercules, CA, USA). In preliminary experiments, growth curves for individual isoforms were determined and the duration of the logarithmic and stationary phases identified. Estimation of drug effects was based on OD_{620} measurements at fixed time points (at 65 h for cPKC isoforms or at 48 h incubation for nPKC and aPKC), times occurring during the respective logarithmic phase and where a "steady-state growth inhibition" (period of time during which maximal inhibition of growth was reached and remained constant or changed only slightly) was reached. In individual experiments, OD_{620} was routinely monitored for up to 100 h to confirm whether the "fixed time points" chosen were appropriate for all the compounds studied (PMA or arachidonic acid). The difference between the maximal OD_{620} reached and that measured at the beginning of incubation was used as an index of yeast growth. Drugs or solvent were added at the beginning and kept throughout the incubation. Yeast growth in the presence of drugs was expressed as percentage of growth observed in parallel experiments in the presence of solvent; it was further transformed into growth inhibition by subtracting that value from 100. Because growth inhibition caused by a maximal concentration of the standard PKC activator varied between isoforms, 100% growth inhibition was assumed to be that caused by 10^{-5} M PMA (or arachidonic acid for PKC- ζ), in order to standardise the maximal inhibition attainable; 0% growth inhibition would occur when growth in the presence of drugs was identical to that in the presence of solvent. Effects of PKC activators were expressed as a percentage of that effect.

For interaction experiments, a single concentration of PKC inhibitor chelerythrine or kielcorins 1–5 was added to PMA (10^{-8} – 10^{-5} M; arachidonic acid for PKC- ζ). Concentration-response curves for the PKC activator in the absence or in the presence of chelerythrine or kielcorins 1–5, were obtained and the concentration of PKC activator that caused 50% growth inhibition (EC_{50}) calculated. For each compound the EC_{50} ratios [EC_{50} (PKC activator + compound)/ EC_{50} (PKC activator)] were calculated on each PKC isoform tested.

In Vitro Kinase Assay

The direct interaction between the compounds tested (PKC inhibitor chelerythrine and kielcorins 1–5) with PKC was studied *in vitro* using the IQ[™] PKC Assay Kit—Pseudosubstrate Peptide Substrate from Pierce Biotechnology (PACI, Lisboa, Portugal).

The assay was performed according to the manufacturer instructions for the 96-well plate format. Kielcorins 1–5 and the standard PKC inhibitor chelerythrine were tested at the concentration of 10^{-8} M. Purified PKC enzyme standard from rat brain (containing a mixture of α , β and γ isoforms) was from Pierce Biotechnology (PACI, Lisboa, Portugal); it was used at a final concentration of 0.01 U. Reaction mixtures containing the endogenous PKC activator phosphatidyl-L-serine, were incubated for 90 min and fluorescence intensity determined using a microplate spectrofluorometer SPECTRAMax[®]GEMI NI XS (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). In the presence of PKC, there was a decrease in relative fluorescence units (RFU), reflecting phosphorylation of the fluorescent substrate. In the presence of PKC inhibitors, substrate phosphorylation is reduced causing an increase in RFU. RFU in samples not containing PKC were considered as 100%. Effects of drugs were expressed as a percentage of that value.

Statistical Analysis

Results are given as arithmetic means $\pm$ SEM and *n* represents the number of determinations. Differences between means were tested for significance using either paired Student's *t* test and unpaired Student's *t* test. A *P* value less than 0.05 was taken to be statistically significant.

RESULTS

Expression of mammalian PKC- α , - β I, - δ , - η and - ζ was confirmed by immunoblotting, using protein

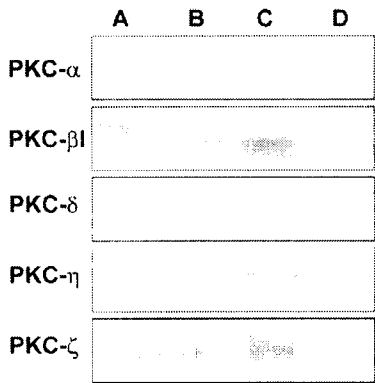


FIGURE 4 Immunodetection of PKC- α , - β I, - δ , - η and - ζ isoforms expressed in transformed *Saccharomyces cerevisiae* (CG379). Individual immunoblots are presented in a horizontal arrangement and were obtained from proteins extracts ($\sim 40 \mu\text{g}$ protein/lane) from cultures grown in selective medium in the presence of 2% galactose (lanes A and B; duplicate samples) or in the absence of 2% galactose (lane D). Positive controls (lane C; $4 \mu\text{g}$) were obtained using recombinant proteins PKC- α (M_r 76,799 Da), PKC- β I (M_r 76,790 Da), PKC- δ (M_r 77,517 Da), PKC- η (M_r 77,600 Da) and PKC- ζ (M_r 67,740 Da).

extracts of yeast cells, transformed with the plasmid containing the gene for a single mammalian PKC isoform, grown in the presence of the transcription inducer (2% galactose). Expression of each of these PKC isoforms resulted in a single antigenic band, which co-migrated with the respective recombinant protein. Protein extracts of transformed yeast cells grown in the absence of galactose did not present antigenic bands (Figure 4).

Yeast Phenotypic Assay

PMA (considered a standard activator for the classical and novel PKC isoforms) was tested in yeast expressing PKC- α , - β I, - δ or - η , in concentrations up to 10^{-5} M (higher concentrations were not possible to test due to its low solubility in the culture medium). Since atypical PKC isoforms are not activated by phorbol esters,²² arachidonic acid (up to 10^{-5} M) was used as the standard activator for PKC- ζ .²³ Maximal values of growth inhibition caused by 10^{-5} M PMA (or arachidonic acid for PKC- ζ), on the PKC isoforms tested are presented in Table I and were assumed to correspond to 100% growth inhibition. Effects of drugs were expressed as percentage of that maximal growth inhibition.

In the absence of galactose, neither PMA nor arachidonic acid altered yeast growth. The solvent used (DMSO; final concentration 0.1%) did not change yeast growth either in the presence or in the absence of galactose (not shown).

The influence of the kielcorin derivatives: *trans*-($\pm$)-kielcorin C (1), *cis*-($\pm$)-kielcorin C (2), *trans*-($\pm$)-kielcorin D (3), *trans*-($\pm$)-isokielcorin D (4) and *trans*-($\pm$)-kielcorin E (5) (Figure 1) and of the established PKC inhibitor chelerythrine (Figure 3) on the growth of yeast expressing individual PKC isoforms was studied. In the absence of galactose, chelerythrine and kielcorins 1–5, all tested at a concentration of 10^{-5} M, did not influence yeast growth.

In the presence of galactose, PMA caused a concentration-dependent inhibition of growth of yeast expressing cPKCs or nPKCs isoforms.

TABLE I Yeast growth inhibition caused by 10^{-5} M PMA on the PKC isoforms studied

PKC isoforms	Growth inhibition caused by 10^{-5} M PMA (% of control)
α	40.6 ± 1.9 ($n = 36$)
β I	36.1 ± 1.1 ($n = 56$)
δ	26.6 ± 0.6 ($n = 52$)
η	21.3 ± 0.7 ($n = 52$)
ζ	0.2 ± 1.4 ($n = 36$) ^a

^aGrowth inhibition caused by 10^{-5} M arachidonic acid was 23.9 ± 0.7 ($n = 56$). Growth in the presence of solvent was considered to be 0% growth inhibition (100% growth; see Experimental for details). Each value represents the mean $\pm$ SEM of the indicated *n* determinations.

EC₅₀ values (nM) were, for the isoform indicated, 99.4 ± 10.1 (PKC-α), 214.7 ± 48.0 (PKC-βI), 453.1 ± 32.8 (PKC-δ) and 7.6 ± 0.6 (PKC-η) (*n* = 64). In yeast expressing PKC-ζ, arachidonic acid, but not PMA, caused a concentration-dependent growth inhibition of yeast expressing this isoform, with an EC₅₀ of 208.2 ± 30.3 nM (*n* = 64). In the yeast phenotypic assay, a PKC inhibitor blocks the growth inhibition caused by a PKC activator.^{8,9} Therefore, the effects of chelerythrine and kielcorins 1–5 on growth inhibition caused by the appropriate PKC activator (PMA for PKC-α,

βI, -δ and -η; arachidonic acid for PKC-ζ) were investigated. In a first approach, chelerythrine and kielcorins 1–5 were tested alone. At the maximal concentration feasible under these experimental conditions (10⁻⁵ M), chelerythrine and kielcorins 1–5 caused, *per se*, stimulation of growth of yeast expressing individual mammalian PKC isoforms. A decrease in the concentration reduced this growth stimulation and, at a concentration of 10⁻⁸ M, chelerythrine and kielcorins 1–5 failed to cause a significant stimulation of yeast growth (data not shown).

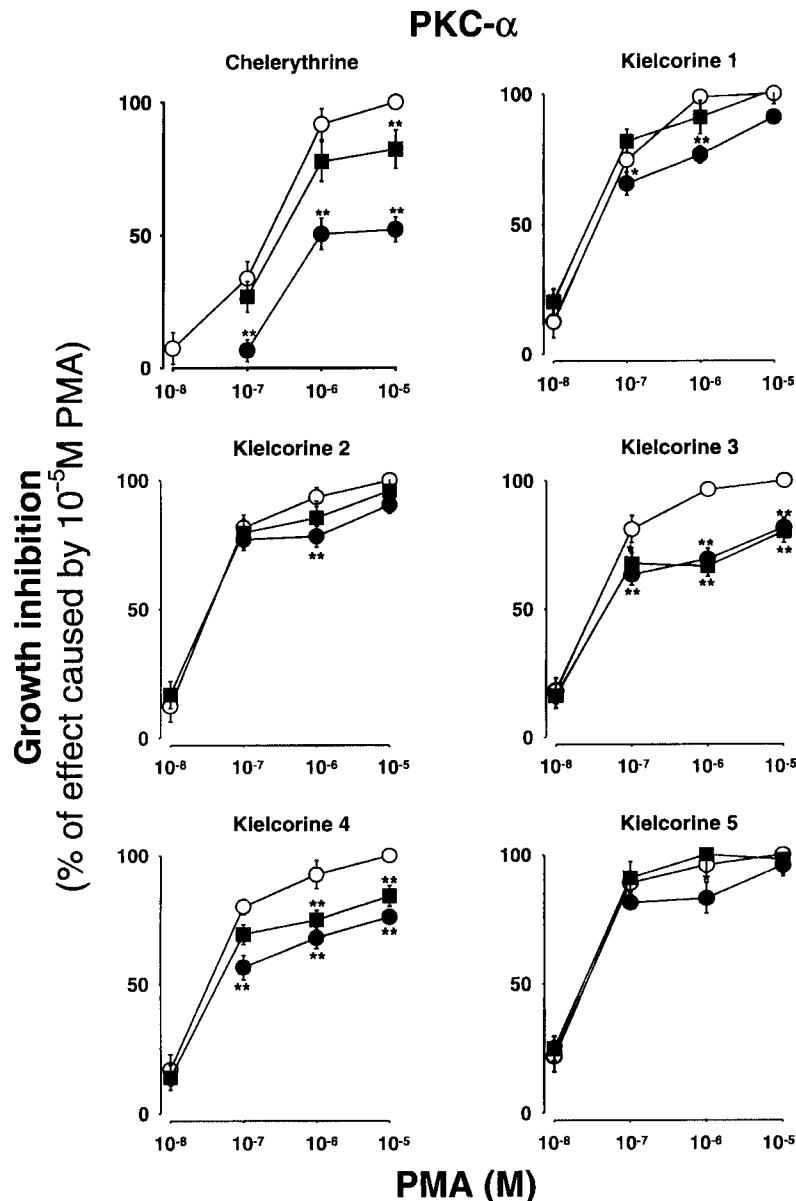


FIGURE 5 Interaction experiments on PKC-α: concentration-response curves for PMA alone (open circles) and in the presence of 10⁻⁵ M (filled circles) or 10⁻⁸ M (filled squares) of chelerythrine or kielcorins 1–5. Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10⁻⁵ M PMA. Shown are means ± SEM of 16 – 20 determinations. Significantly different from growth inhibition caused by PMA alone: **P* < 0.05, ***P* < 0.001 (unpaired Student's *t* test).

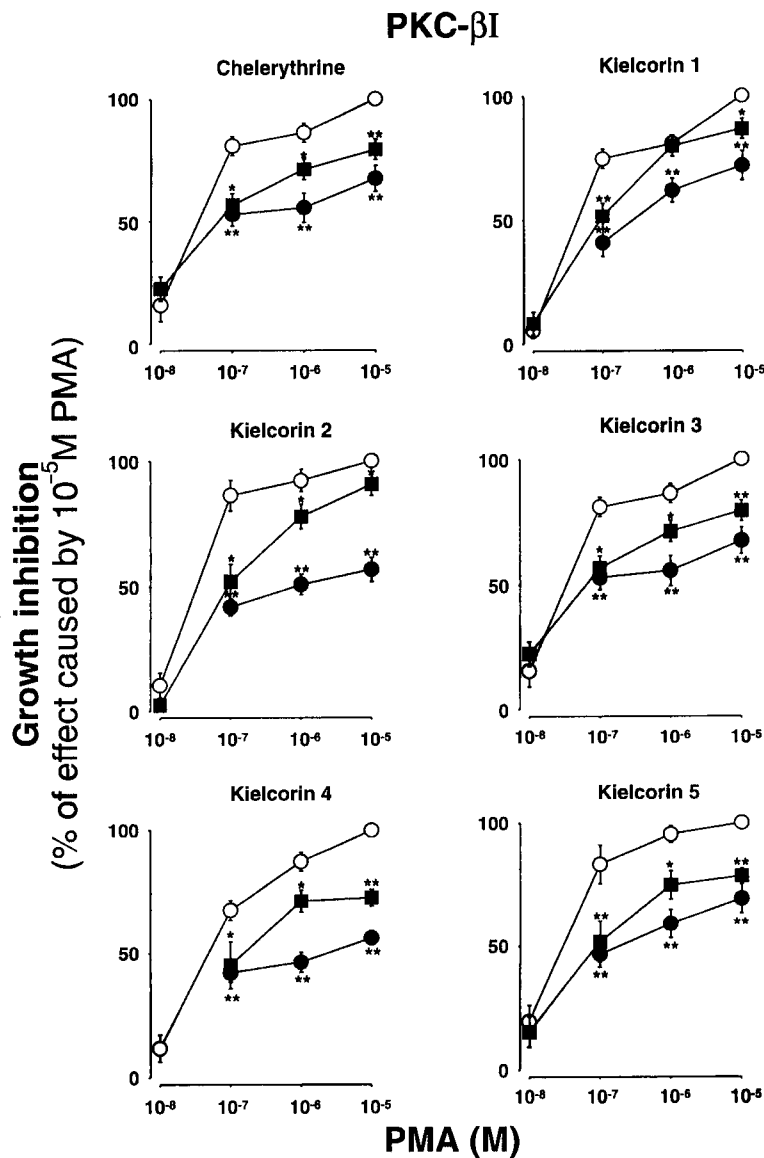


FIGURE 6 Interaction experiments on PKC-βI: concentration-response curves for PMA alone (open circles) and in the presence of 10⁻⁵ M (filled circles) or 10⁻⁸ M (filled squares) of chelerythrine or kielcorins 1–5. Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10⁻⁵ M PMA. Shown are means ± SEM of 16–20 determinations. Significantly different from growth inhibition caused by PMA alone: **P* < 0.05. ***P* < 0.001 (unpaired Student's *t* test).

In a subsequent series of experiments, the ability of chelerythrine and kielcorins 1–5 to block growth inhibition caused by the appropriate PKC activator, was investigated. Chelerythrine and kielcorins 1–5 were tested at the maximal concentration feasible (concentration at which a stimulation of yeast growth was observed) and at 10⁻⁸ M (concentration at which no stimulation of yeast growth was observed). Effects of chelerythrine and kielcorins 1–5 on the growth inhibition caused by the PKC activator PMA on yeast expressing PKC-α, -βI, -δ or -η are shown in Figures 5,6,7 and 8, respectively. Figure 9 shows effects of chelerythrine and kielcorins 1–5 on the growth inhibition caused by arachidonic acid on yeast expressing PKC-ζ.

Chelerythrine reduced growth inhibition caused by the PKC activator (PMA or arachidonic acid), causing a shift to the right for the concentration-response curve of the PKC activator on all isoforms tested (compare open and filled symbols in left upper panel of Figures 5,6,7,8 and 9). This shift to the right was concentration-dependent, being the displacement caused by 10⁻⁸ M chelerythrine which was less pronounced than that caused by 10⁻⁵ M (compare filled squares and circles in left upper panel of Figures 5,6,7,8 and 9). In general, kielcorins also caused a shift to the right of the concentration-response curve for the PKC activator (compare open and filled symbols of Figures 5,6,7,8 and 9). The main exception occurred with PKC-α, where kielcorins 1, 2

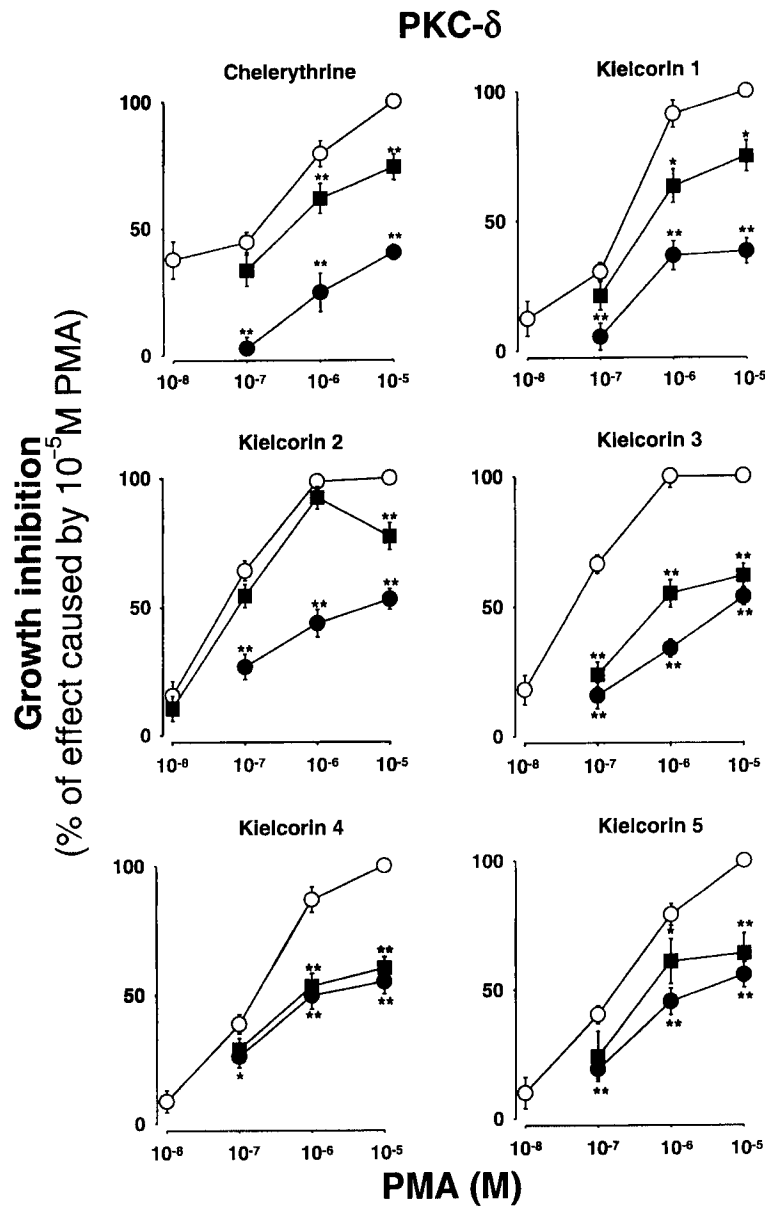


FIGURE 7 Interaction experiments on PKC- δ : concentration-response curves for PMA alone (open circles) and in the presence of 10^{-5} M (filled circles) or 10^{-8} M (filled squares) of chelerythrine or kielcorins 1–5. Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10^{-5} M PMA. Shown are means $\pm$ SEM of 16–20 determinations. Significantly different from growth inhibition caused by PMA alone: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ (unpaired Student's t test).

and 5, at 10^{-8} M, failed to significantly influence the concentration-response curve for PMA (compare open and filled symbols of Figure 5). The shift to the right caused by kielcorins was, in general, concentration-dependent, being the displacement caused by 10^{-8} M which was less pronounced than that caused by 10^{-5} M kielcorins 1–5 (compare filled squares and circles of Figures 5,6,7,8 and 9). Exceptions occurred for kielcorin 5 on PKC- β I, kielcorins 4 and 5 on PKC- δ and kielcorin 3 on PKC- ζ , where no concentration-dependence was detected; in the presence of the highest and lowest concentration of these kielcorins the responses to the PKC

activator were similar ($P > 0.05$; unpaired Student's t test).

In order to compare the potencies of chelerythrine and kielcorins 1–5 to block the growth inhibition caused by the appropriate PKC activator, EC_{50} values (i.e. the concentration of the PKC activator that caused half of the growth inhibition caused by 10^{-5} M PMA; arachidonic acid for PKC- ζ), obtained in the absence and in the presence of 10^{-8} M chelerythrine or kielcorins 1–5, were calculated. When EC_{50} values, obtained in the presence of 10^{-8} M chelerythrine or one of the kielcorins 1–5, were different from the EC_{50} values obtained in their

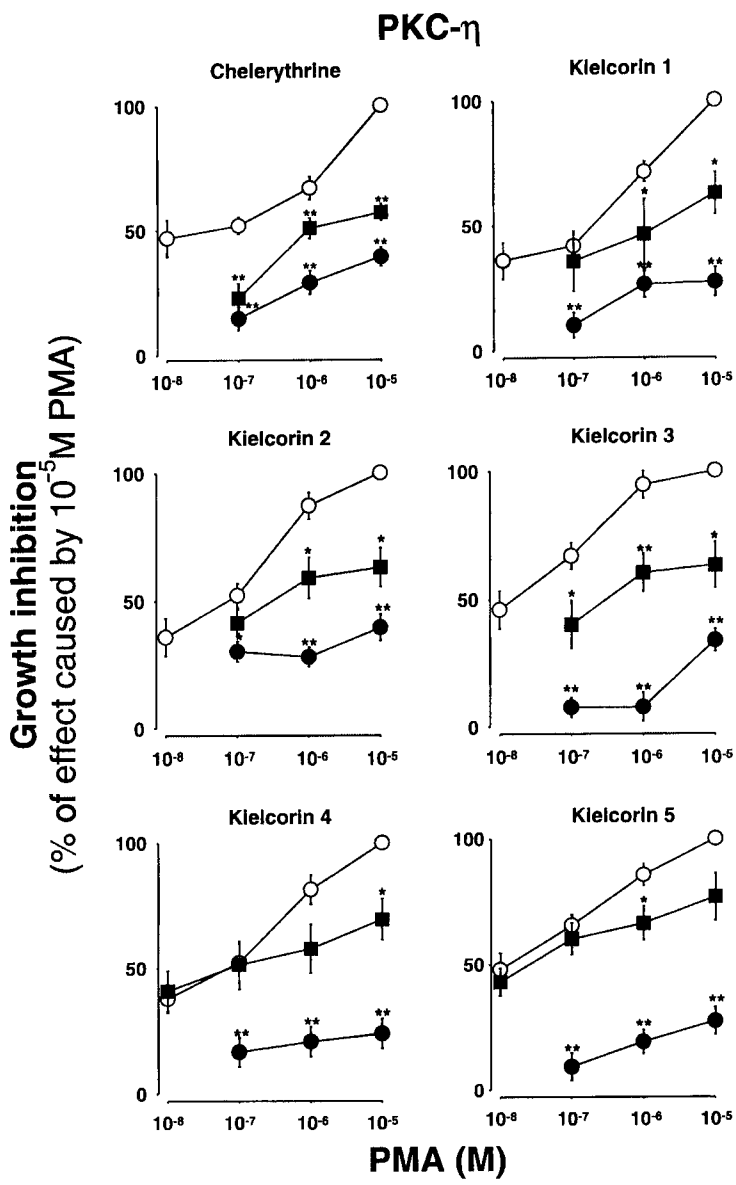


FIGURE 8 Interaction experiments on PKC- η : concentration-response curves for PMA alone (open circles) and in the presence of 10^{-5} M (filled circles) or 10^{-8} M (filled squares) of chelerythrine or kielcorins 1–5. Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10^{-5} M PMA. Shown are means $\pm$ SEM of 16–20 determinations. Significantly different from growth inhibition caused by PMA alone: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ (unpaired Student's t test).

absence, EC₅₀ ratios were calculated. EC₅₀ ratios were used to compare: *i*) the potency of kielcorins with that of chelerythrine and *ii*) the potencies of chelerythrine and kielcorins 1–5 on the different mammalian PKC isoforms individually expressed. Table II presents the EC₅₀ ratios obtained with 10^{-8} M chelerythrine and kielcorins 1–5 (EC₅₀ ratios obtained with 10^{-5} M were not calculated, because of the growth stimulation caused by chelerythrine and kielcorins 1–5, *per se*). Chelerythrine and kielcorins 1–5 presented differences in potencies towards the distinct PKC isoforms tested, as estimated by comparison of the respective EC₅₀ ratios. The following order of potencies for the

compounds studied have been established: chelerythrine, PKC- $\eta > -\beta I > -\alpha > -\zeta = -\delta$; kielcorin 1, PKC- $\zeta > -\eta > -\delta = -\beta I$; kielcorin 2, PKC- $\zeta > -\eta > -\beta I = -\delta$; kielcorin 3, PKC- $\zeta = -\eta = -\delta$; kielcorin 4, PKC- $\zeta > -\delta = -\beta I$; kielcorin 5, PKC- $\zeta = -\beta I = -\delta$ (for definition of the rank order of potency, the $>$ was applied only when the EC₅₀ ratio of the isoform placed at the left was significantly higher than that of the EC₅₀ ratio placed at the right of the sign; otherwise = was applied; $P < 0.05$; unpaired Student's t test). When compared to chelerythrine, kielcorins 1–5 were shown to be less potent on PKC- α , failing, at the concentration tested, to change the PMA EC₅₀

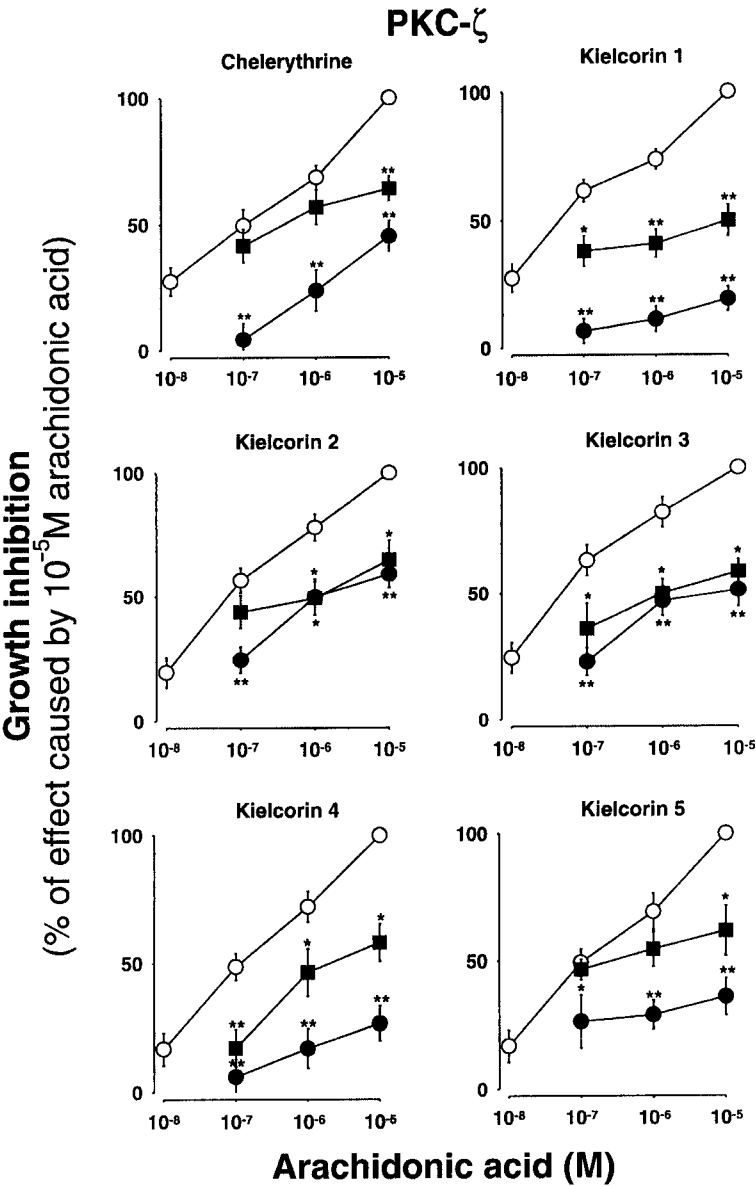


FIGURE 9 Interaction experiments on PKC-ζ: concentration-response curves obtained for arachidonic acid alone (open circles) and in the presence of 10⁻⁵ M (filled circles) or 10⁻⁸ M (filled squares) of chelerythrine or kielcorins 1–5. Results are expressed as % of the maximal effect caused by 10⁻⁵ M of arachidonic acid. Shown are means ± SEM of 16–20 determinations. Significantly different from growth inhibition caused by arachidonic acid alone: *P < 0.05, **P < 0.001 (unpaired Student's *t* test).

TABLE II EC₅₀ ratios for chelerythrine and kielcorin derivatives on the individual PKC isoforms tested

Compound	EC ₅₀ Ratio ^a				
	PKC-α	PKC-βI	PKC-δ	PKC-η	PKC-ζ
Chelerythrine	1.9 ± 0.3	2.9 ± 0.3*	1.3 ± 0.1	63.2 ± 1.7*	1.4 ± 0.2
Kielcorin 1	ND	1.8 ± 0.5*	2.2 ± 0.6*	9.8 ± 1.7*†	213.0 ± 20.8†
Kielcorin 2	ND	2.8 ± 0.7*	1.6 ± 0.3*	4.9 ± 0.6*†	17.9 ± 6.4†
Kielcorin 3	ND	ND	12.6 ± 4.1†	24.7 ± 6.2†	25.1 ± 6.6†
Kielcorin 4	ND	3.2 ± 0.9*	5.2 ± 0.9*†	ND	16.7 ± 5.2†
Kielcorin 5	ND	2.6 ± 0.6	2.0 ± 0.8	ND	3.4 ± 0.8†

^a EC₅₀ ratio = EC₅₀ (PKC activator + 10⁻⁸ M compound)/EC₅₀ (PKC activator). The EC₅₀ values were considered the concentration of PKC activator that caused half of the growth inhibition caused by 10⁻⁵ M of PMA (arachidonic acid for PKC-ζ). Shown are means ± SEM of 16–20 determinations. ND: Not determined (identical EC₅₀ values in the absence or in the presence of the compound). Significant differences: from PKC-ζ, *P < 0.05; from chelerythrine, †P < 0.05 (unpaired Student's *t* test).

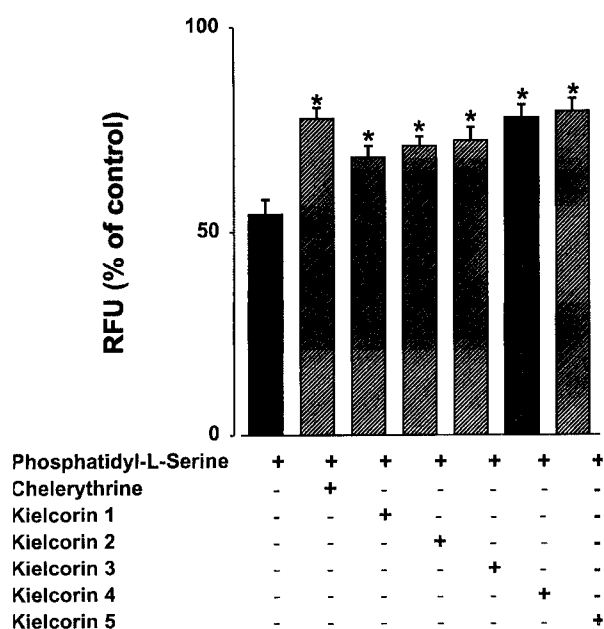


FIGURE 10 *In vitro* kinase assay using a purified rat brain PKC enzyme: effects of chelerythrine, and kielcorins 1–5 (all tested at the concentration of 10^{-8} M). Relative fluorescence units (RFU) were measured in samples without enzyme (100%; control) or with PKC, which caused a decrease in RFU (see Experimental for details). Phosphatidyl-L-serine, the recommended PKC activator, was present in all samples; drugs or solvent, were tested in the absence or in the presence of PKC. Effects of drugs were expressed as % of RFU obtained in the absence of PKC. Shown are means $\pm$ SEM of 4 assays (8 assays for phosphatidyl-L-serine alone). Significantly different from solvent (phosphatidyl-L-serine alone): * $P < 0.05$ (one way ANOVA, followed by Tukey's *post-hoc* test).

value. On PKC- β I, kielcorin 3 also did not change the PMA EC_{50} , but kielcorins 1, 2, 4 and 5 were shown to be as potent as chelerythrine. On PKC- δ , kielcorins 1, 2 and 5 were shown to be as potent as chelerythrine, whereas kielcorins 3 and 4 were more potent than chelerythrine, kielcorin 3 having a much higher potency. On PKC- η , kielcorins 4 and

5 failed to alter the PMA EC_{50} , whereas kielcorins 1, 2 and 3 markedly inhibited PMA effects, although less than chelerythrine, which on this PKC isoform showed its highest potency. On PKC- ζ , all kielcorins were more potent than chelerythrine, kielcorin 1 having an extraordinary high potency when compared with those of other kielcorins or chelerythrine.

In Vitro Kinase Assay

To test whether kielcorins 1–5 were interacting directly with PKC, their effects were studied *in vitro*, using purified rat brain PKC. The assay used is based on the ability of PKC inhibitors to reverse the fluorescence intensity quenching (a decrease on the relative fluorescence units, RFU) caused by the PKC activator (phosphatidyl-L-serine as recommended by the method). Reversing of fluorescence quenching (which reflects a reduction of substrate phosphorylation) is assumed to be an indicator of inhibition of PKC catalytic activity. Kielcorins 1–5 and chelerythrine were used at the lowest concentration tested (10^{-8} M), the same used to obtain the EC_{50} ratios presented in Table II. Kielcorins 1–5 were able to reverse the effect of the endogenous PKC activator. The effects elicited by these compounds were similar to that caused by the PKC inhibitor chelerythrine (Figure 10).

Computational Studies

The optimised geometries of kielcorins 1–5 and chelerythrine were calculated and their potential isosurfaces obtained and these are shown in Figure 11. All kielcorins tested (1–5) contain three main negative potential points, namely, one over the carbonyl of the xanthonic nucleus, another near the hydroxymethyl group and the third located over

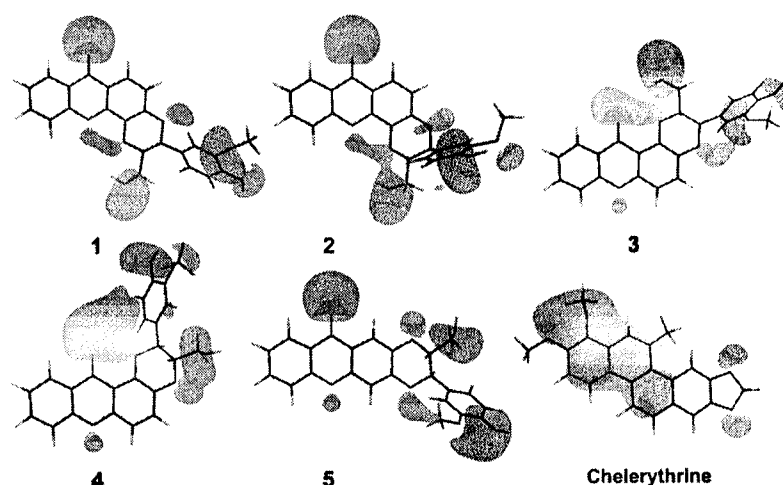


FIGURE 11 Potential isosurfaces at $-20 \text{ kcal mol}^{-1}$ for kielcorins 1–5 and chelerythrine.

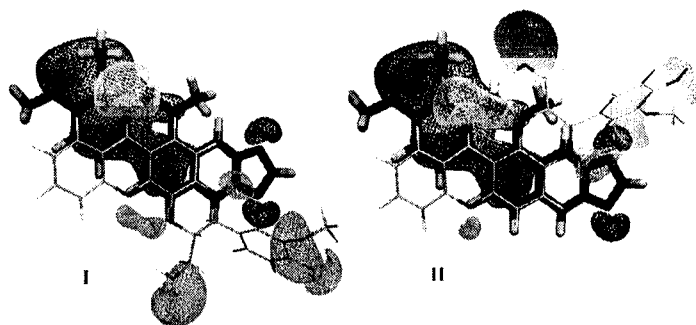


FIGURE 12 Two examples of correspondence of negative potential surfaces: (I) chelerythrine and kielcorin 1; (II) chelerythrine and kielcorin 3.

the oxygenated substituents of the aromatic ring in the coniferyl unit. For kielcorins 3 and 4, the negative potential point over the carbonyl is reinforced by the proximity of the other two regions. Concerning chelerythrine, a strong negative potential over the aromatic area and two others over the methylenedioxy group can be noted. A correspondence of the potential points referred to above for the kielcorins 1–5 with chelerythrine was achieved (Figure 12). For kielcorins 3–5 the correspondence of the potential bulk of the carbonyl group with the aromatic region of chelerythrine, allows a further correspondence among the other potential points. Figure 12 shows the common features of the negative potential surfaces with chelerythrine, for kielcorin 1 (with a very high potency on PKC- ζ) and also for kielcorin 3 (the most potent on PKC- δ and, like chelerythrine, with a high potency on PKC- η).

DISCUSSION

The yeast phenotypic assay, which uses transformed yeast expressing an individual mammalian PKC isoforms, has been proposed as a rapid and simple assay for the screening of potential PKC modulators. In the present study, either mammalian PKC- α , - β I, - δ , - η or - ζ isoforms were expressed using the same yeast strain. According to previous studies,^{6,7} exposure of transformed yeast expressing a mammalian PKC isoform to a PKC activator, led to a concentration-dependent inhibition of yeast growth (reflecting an increase in the cell doubling time). Inhibition of transformed yeast growth caused by the PKC activator was assumed to be due to its interaction with the mammalian PKC isoform expressed because it did not occur when transformed yeast cells were incubated in medium lacking galactose, the expression inducer. Confirmation that mammalian PKC isoforms were expressed in the presence of galactose (and not on its absence) was obtained by immunoblotting.

Absolute values of growth inhibition caused by the PKC activators used (PMA or arachidonic acid) differed among the expressed PKC isoforms. These differences can be ascribed to different levels of expression of the mammalian PKC isoform or to differences in the catalytic potential of the expressed isoform. The latter possibility is supported by results obtained *in vitro* that showed that identical amounts of PKC isoforms, in the presence of the same concentration of a PKC activator, led to different degrees of phosphorylation of a given substrate.²⁴ In order to avoid the influence of different absolute values on data interpretation, growth inhibition caused by PKC activators was standardised. For each isoform, growth inhibition caused by a maximal concentration of PKC activator was assumed to be the 100% of growth inhibition attainable by PKC activators under the present experimental conditions and EC₅₀ values estimated from the concentration-response curves obtained.

Chelerythrine and kielcorins 1–5, when tested in the micromolar range, cause a slight stimulation of growth of transformed yeast. This effect was observed only when a mammalian PKC isoform was expressed and, therefore seems to result from an interaction with the expressed mammalian PKC isoform. A direct stimulation of growth of transformed yeast has been reported previously⁸ and may result from blockade of an endogenous activation of PKC.

Blockade of PKC activator-induced growth inhibition by established PKC inhibitors has been reported to reflect inhibition of the mammalian PKC isoform expressed.^{8,9} Under these conditions, PKC inhibitors caused a shift to the right of the concentration-response curve of the PKC activator. When this occurred, the ratio between the PKC activator EC₅₀ values (obtained in the presence and in the absence of the PKC inhibitor) was used as an index of the PKC inhibitor potency on the mammalian PKC isoform expressed. To avoid putative influences on the shift to the right caused by the growth stimulation observed with the highest

concentration of chelerythrine and kielcorins, their potencies were compared by the shift caused by 10^{-8} M (same concentration for all the compounds tested). As expected, chelerythrine inhibited effects of the PKC activators on growth of transformed yeast, being active in all isoforms tested. Kielcorins also inhibited effects of PKC activators. Kielcorins were particularly potent on PKC- ζ and showed with PKC- α their lowest potency. Kielcorins were less potent than chelerythrine on PKC- η , and were as potent as chelerythrine on PKC- β I. However, on PKC- δ , kielcorins 3 and 4 were more potent than chelerythrine, and on PKC- ζ , all kielcorins 1–5 were more potent than chelerythrine. Among the kielcorins tested, kielcorin 1 presented the most marked difference on potency, being particularly potent on PKC- ζ ; the less marked differences were observed with kielcorin 5. Kielcorin 3 presented a similar high potency on several isoforms (PKC- δ , - η and - ζ).

Confirmation that kielcorins blocked the effect of PKC activators on yeast growth by interacting with PKC was obtained using an *in vitro* kinase assay. At the lowest concentration used on the yeast phenotypic assay, kielcorins 1–5 inhibited PKC catalytic activity, an effect similar to that caused by the established PKC inhibitor chelerythrine.

The similarity of results obtained for chelerythrine and kielcorins, in the yeast phenotypic assay and in *in vitro* kinase assay, raised the possibility that they could have common electronic properties. Although PKC inhibitors are known for their large structural diversity,²⁵ common structural and electronic features were found among kielcorins 1–5 and chelerythrine (preliminary computational studies described in Results) which can explain the functional similarities detected between these two groups of compounds as PKC inhibitors.

This study is, to our knowledge, the first attempt to unravel the molecular basis for the biological activity of kielcorins, and suggests that kielcorin derivatives constitute a promising group from which to obtain new isoform selective PKC inhibitors.

Acknowledgements

The authors thank Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT; I&D n° 226/94), POCTI (QCA III) and FEDER for financial support and Dr. Salomé Gomes, IBMC (Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto) for the use of the microplate spectrofluorometer. We also thank César Portela for the molecular calculations, Dr. Maria João Ramos (Faculdade de Ciências, Universidade do Porto) for the use of computational facilities, and Dr. G. Eaton (Department of Chemistry, University of

Leicester, UK) for HRMS measurements. E. Sousa is a recipient of a PhD grant from FCT (PRAXIS XXI/BD/15663/98).

References

- [1] Musashi, M., Ota, S. and Shiroshita, N. (2000) *Int. J. Hematol.* **72**, 12.
- [2] Webb, B.L., Hirst, S.J. and Giembycz, M.A. (2000) *Br. J. Pharmacol.* **130**, 1433.
- [3] Wang, S., Zaharevitz, D., Sharma, R., Marquez, V., Lewin, N., Du, L., Blumberg, P. and Milne, G. (1994) *J. Med. Chem.* **37**, 4479.
- [4] Saraiva, L., Fresco, P., Pinto, E., Sousa, E., Pinto, M. and Gonçalves, J. (2002) *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 3219.
- [5] Saraiva, L., Fresco, P., Pinto, E., Sousa, E., Pinto, M. and Gonçalves, J. (2002) *Bioorg. Med. Chem.*, In press.
- [6] Riedel, H., Hansen, H., Parissenti, A.M., Su, L., Shieh, H.-L. and Zhu, J. (1993) *J. Cell Biochem.* **52**, 320.
- [7] Shieh, H.-L., Hansen, H., Zhu, J. and Riedel, H. (1995) *Mol. Carcinog.* **12**, 166.
- [8] Keenan, C., Goode, N. and Pears, C. (1997) *FEBS Lett.* **415**, 101.
- [9] Keenan, C., Goode, N. and Pears, C. (1997) *Biochem. Soc. Trans.* **25**, S591.
- [10] Pedro, M., Cerqueira, F., Sousa, M.E., Nascimento, M. and Pinto, M. (2002) *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 3725.
- [11] Pinto, M. and Nascimento, M.S.J. (1997) *Pharm. Pharmacol. Lett.* **2/3**, 125.
- [12] Gonzalez, M.J., Nascimento, M.S.J., Cidade, H.M., Pinto, M.M.M., Kijoa, A., Anantachoke, C., Silva, A.M.S. and Herz, W. (1999) *Planta Med.* **65**, 368.
- [13] Sousa, E.P., Silva, A.M.S., Pinto, M.M.M., Pedro, M.M., Cerqueira, F.A.M. and Nascimento, M.S.J. (2002) *Helv. Chim. Acta* **85**, 2862.
- [14] Pinto, M.M.M. and Sousa, E.P. (2002) *Curr. Med. Chem.* **10**, 1.
- [15] Fernandes, E.R., Carvalho, F.D., Remião, F.G., Bastos, M.L., Pinto, M.M. and Gottlieb, O.R. (1995) *Pharm. Res.* **12**, 1756.
- [16] Pinto, M.M.M., Mesquita, A.A.L. and Gottlieb, O.R. (1987) *Phytochemistry* **26**, 2045.
- [17] Fernandes, E.G.R., Pinto, M.M.M., Silva, A.M.S., Cavaleiro, J.A.S. and Gottlieb, O.R. (1999) *Heterocycles* **51**, 821.
- [18] Herbert, J.M., Augereau, J.M., Gleye, J. and Maffrand, J.P. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 993.
- [19] Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Zakrzewski, V.G., Montgomery, J.A., Jr, Stratmann, R.E., Burant, J.C., Dapprich, S., Millam, J.M., Daniels, A.D., Kudin, K.N., Strain, M.C., Farkas, O., Tomasi, J., Barone, V., Cossi, M., Cammi, R., Mennucci, B., Pomelli, C., Adamo, C., Clifford, S., Ochterski, J., Petersson, G.A., Ayala, P.Y., Cui, Q., Morokuma, K., Malick, D.K., Rabuck, A.D., Raghavachari, K., Foresman, J.B., Cioslowski, J., Ortiz, J.V., Baboul, A.G., Stefanov, O.B.B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Gomperts, R., Martin, R.L., Fox, D.J., Keith, T., Al-Laham, M.A., Peng, C.Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P.M.W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M.W., Andres, J.L., Gonzalez, C., Head-Gordon, M., Replogle, E.S. and Pople, J.A., (1998) Gaussian 98, Revision A.9, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA.
- [20] Portmann, S. and Lüthi, H.P. (2000) "MOLEKEL: an interactive molecular graphics tool", *CHIMIA* **54**, 766.
- [21] Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) *J. Bacteriol.* **153**, 163.
- [22] Ways, D.K., Cook, P.P., Webster, C. and Parker, P.J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 4799.
- [23] Nakanishi, H. and Exton, J.H. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16347.
- [24] Ryves, W.J., Evans, A.T., Olivier, A.R., Parker, P.J. and Evans, F.T. (1991) *FEBS Lett.* **288**, 5.
- [25] Da Rocha, A.B., Mans, D.R.A., Regner, A. and Schwartzmann, G. (2002) *Oncologist* **7**, 17.

CAPÍTULO XI

DISCUSSÃO GERAL

Dado o envolvimento das isoformas da PKC em numerosas funções celulares, como a proliferação e diferenciação celular (Musashi *et al.*, 2000; Hofmann, 2001), tem sido atribuído, a esta família de cínases, um papel chave em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos. Entre estes é de destacar o papel relevante que parece ter na génese de doenças oncológicas (Hofmann, 2001), constituindo os moduladores da PKC promissores agentes farmacológicos na terapia do cancro (Basu, 1993; Gescher, 1998; Jarvis & Grant, 1999; Cartee & Kucera, 2000; Barry & Kazanietz, 2001; Hofmann, 2001).

Apesar de reconhecida como alvo potencial no tratamento de patologias graves, os trabalhos que existem publicados sobre esta cínase revelam, muitas vezes, resultados contraditórios, tornando pouco claras as potencialidades terapêuticas dos moduladores da PKC. Por exemplo, uma possibilidade para aumentar a eficácia da quimioterapia seria a associação de inibidores da PKC aos fármacos antitumorais. No entanto, existem estudos que indicam que a actividade antiproliferativa destes fármacos é inibida e outros potenciada pela inibição da PKC. Por outro lado, a modulação da PKC não tem originado efeitos antitumorais semelhantes em todos os tipos de tumores, existindo também divergências quanto aos efeitos obtidos na regulação da apoptose (Leszczynski, 1996; Hofmann, 2001).

A incongruência de muitos destes resultados pode ser devida à utilização de modelos celulares diferentes, ao facto das funções de cada isoforma nessas células ainda não estarem esclarecidas, ao facto da maioria dos activadores e inibidores usados não serem suficientemente selectivos para uma única isoforma da PKC e/ou de muitos dos moduladores da PKC utilizados serem capazes de actuar noutros alvos moleculares, além das isoformas da PKC (Hofmann, 2001).

Um dos grandes desafios que se colocam nesta área é o de conseguir compostos selectivos para a PKC e, particularmente, para cada uma das suas isoformas para, desta forma, ser mais fácil o estudo das funções de cada uma das diferentes isoformas da PKC nas células de mamífero (Hofmann, 1997; Way *et al.*, 2000; Hofmann, 2001).

Foi neste contexto que surgiu a necessidade de um ensaio que permitisse estudar, isoladamente, cada isoforma da PKC, num ambiente celular, e comparar, em condições experimentais semelhantes, o efeito dos compostos sobre essas várias isoformas. O ensaio fenotípico das leveduras transformadas foi proposto como um método capaz de responder a essas necessidades, colmatando as limitações apresentadas pelos tradicionais ensaios *in vivo* e

in vitro disponíveis para o estudo de moduladores da PKC (Parissenti *et al.*, 1993; Riedel *et al.*, 1993a,b,c; Su *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Shieh *et al.*, 1995; Parissenti *et al.*, 1996; Shieh *et al.*, 1996; Keenan *et al.*, 1997a,b; Parissenti *et al.*, 1999).

Apesar das potencialidades apresentadas por este método, são muito poucos os trabalhos que utilizaram o ensaio fenotípico das leveduras para o estudo de moduladores da PKC. As razões para tal prendem-se com a dificuldade da sua implementação, nomeadamente com a dificuldade de expressar, de forma funcional, na mesma estirpe de leveduras, um conjunto de isoformas representativo das diferentes famílias da PKC, pois só desta forma se poderá comparar o efeito de compostos sobre diferentes isoformas da PKC de mamífero, em condições experimentais semelhantes.

As isoformas da PKC já expressas na *S. cerevisiae* foram: α (Parissenti *et al.*, 1993; Riedel *et al.*, 1993b,c; Su *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Shieh *et al.*, 1995; 1996), β I (Parissenti *et al.*, 1993; Riedel *et al.*, 1993a; Parissenti *et al.*, 1996; Shieh *et al.*, 1996), γ (Shieh *et al.*, 1996) e ϵ (Parissenti *et al.*, 1999); na *S. pombe* foram: γ e δ (Goode *et al.*, 1994; Keenan *et al.*, 1997a,b), η (Goode *et al.*, 1994; Keenan *et al.*, 1997a), ϵ e ζ (Goode *et al.*, 1994). No entanto, em nenhum destes trabalhos foi conseguida a expressão de isoformas das diferentes famílias da PKC na mesma espécie de leveduras, o que limita a realização de estudos comparativos do efeito dos compostos sobre essas isoformas, como referido por Goode e colaboradores (1994).

Com o presente trabalho foi conseguida, pela primeira vez, a expressão de isoformas funcionais das três famílias da PKC: α e β I (cPKCs), δ e η (nPKCs) e ζ (aPKCs), na mesma espécie de leveduras (*S. cerevisiae*) e na mesma estirpe (CG379), o que tornou possível estudar a potência de diferentes compostos sobre isoformas da PKC de mamífero, numa célula eucariota e, assim, caracterizar a selectividade desses compostos e a farmacologia de cada uma das isoformas expressas.

Neste trabalho optimizamos as condições experimentais para a obtenção de leveduras transformadas, capazes de expressar uma das isoformas da PKC de mamífero. Esta fase foi desenvolvida em várias estirpes de *S. cerevisiae*, com o objectivo de encontrar uma onde fosse possível expressar, de forma funcional, o maior número de isoformas da PKC.

Após a obtenção de leveduras capazes de expressar uma das isoformas da PKC, procedeu-se à optimização do ensaio fenotípico das leveduras transformadas.

Foram, de seguida, realizados sete trabalhos, os quais comprovam o interesse do método no estudo e na pesquisa de activadores e inibidores da PKC.

a) Activação das isoformas individuais da PKC pelos ésteres de forbol

Num primeiro estudo foram testados nove ésteres de forbol, que diferem entre si em pontos da sua estrutura considerados críticos para a sua actividade (C-12, C-13, C-4, C-20; Jeffrey & Liskamp, 1986; Wender *et al.*, 1986; Ma, 2001). Comparando os resultados obtidos com os existentes na literatura, este trabalho permitiu avaliar a capacidade do método para comparar a potência de activadores da PKC e realizar estudos de estrutura-actividade, sugerindo-se pontos específicos da molécula como importantes para a actividade desta família de compostos. Além disso, forneceu novos dados a respeito dos compostos testados. Apesar de existirem numerosos trabalhos que estudaram a actividade destes fármacos, a variedade de modelos usados para a realização desses estudos dificulta a comparação dos dados, tornando-os muitas vezes contraditórios. Este constituiu o primeiro trabalho que tentou caracterizar, em simultâneo e nas mesmas condições experimentais, a potência e a selectividade destes ésteres de forbol para as isoformas clássicas, novel e atípicas da PKC, expressas individualmente em células eucariotas. Este estudo demonstrou que o método era capaz de distinguir a actividade de compostos estruturalmente semelhantes, revelando compostos muito activos, compostos com uma actividade intermédia e compostos inactivos para uma dada isoforma da PKC. Este estudo demonstrou, ainda, que um mesmo composto apresentava diferenças na sua potência para as diferentes isoformas da PKC e que alguns deles, em algumas isoformas, eram capazes de causar efeitos opostos aos esperados de uma activação da PKC.

b) Estudo de inibidores da PKC

Com este estudo pretendeu-se testar a capacidade do método para avaliar a actividade de inibidores conhecidos da PKC. Este trabalho forneceu, ainda, novos dados a respeito dos compostos testados. Apesar de serem compostos muito usados não só experimentalmente, como também na clínica, eram escassas as informações a respeito da sua selectividade, *in vivo*, para as isoformas da PKC. Este trabalho constituiu o primeiro esforço no sentido de caracterizar a potência e a selectividade destes compostos para as isoformas clássicas, novel e atípicas da PKC, expressas, individualmente, numa célula eucariota.

c) Activação das isoformas individuais da PKC pela dafnetoxina e mezereína

Com este estudo foi revelada, pela primeira vez, a capacidade da dafnetoxina, um composto extraído da casca do caule de *Daphne gnidium*, para activar a PKC- α , - β I, - δ e - η . Este trabalho mostrou que a dafnetoxina e o conhecido activador da PKC, mezereína, diferiam

nas suas potências e selectividades para as isoformas da PKC testadas, facto que poderá constituir um possível mecanismo para explicar as diferenças entre os efeitos biológicos apresentados por estes dois compostos análogos. Além disso, foi realizado um estudo de estrutura-actividade para estes dois compostos, que apenas diferem entre si no substituinte ao nível do C-12, tendo-se concluído que a ausência deste substituinte, apesar de não abolir a actividade da dafnetoxina, altera a potência para as diferentes isoformas da PKC, aumentando a sua selectividade para as cPKCs, enquanto que a presença deste substituinte, na mezereína, aumenta a selectividade para as nPKCs.

d) Activação das isoformas individuais da PKC pela euxantona

Com a realização deste trabalho foi possível propor um mecanismo molecular para explicar o efeito de diferenciação das células de neuroblastoma Neuro 2A (BU-1), induzido pela euxantona (1,7-di-hidroxixantona), um composto isolado da madeira de *Cratogeomys merriami*. Mak e colaboradores (2001) atribuíram este efeito à activação da PKC. Contudo, a expressão simultânea de várias isoformas desta cinase nas células BU-1 não permitiu conhecer as principais isoformas envolvidas no processo. Neste estudo, usando um sistema onde uma única isoforma da PKC era expressa, confirmou-se que a euxantona é um activador da PKC com diferenças na sua potência e selectividade para as isoformas individuais da PKC. Os resultados obtidos, revelaram uma elevada potência da euxantona para a PKC- ζ , apontando para o envolvimento preferencial desta isoforma no processo de diferenciação induzido por este composto, um resultado sustentado por dados bibliográficos que atribuem à PKC- ζ um papel relevante na diferenciação das células de neuroblastoma (Wooten *et al.*, 1999).

e) Estudo da actividade moduladora da PKC pelos derivados xantónicos

Neste trabalho, a actividade moduladora de vinte e duas xantonas simples (9H-xanthen-9-ones), obtidas por síntese, foi estudada nas isoformas α e β I (cPKCs), δ e η (nPKCs) e ζ (aPKCs). Este ensaio foi capaz de demonstrar que a maioria destes compostos causam um efeito compatível com uma activação da PKC e que xantonas estruturalmente muito semelhantes diferem na sua actividade e potência para as várias isoformas da PKC. Contudo, dois dos derivados xantónicos testados apresentaram um efeito compatível com uma inibição da PKC.

Xantonas activadoras da PKC

Neste trabalho foram revelados novos compostos capazes de activar a PKC, os quais apresentaram diferenças nas suas potências e selectividades para as isoformas individuais desta cínase. Este estudo mostrou, ainda, que pequenas modificações estruturais conduzem a alterações marcadas nas suas actividades e selectividades. Alguns dos compostos estudados apresentaram uma potência muito superior à do activador da PKC usado como padrão e uma selectividade elevada para uma isoforma específica da PKC, nomeadamente para a PKC- δ (3,4-dimetoxixantona), para a PKC- η (xantona e 1,2-dimetoxixantona) e para a PKC- ζ (2-hidroxixantona, 2-metoxixantona, 3-hidroxixantona, 4-metoxixantona e 1,2-di-hidroxixantona). Além disso, com os resultados obtidos foi possível estabelecer relações de estrutura-actividade, fornecendo informações sobre alguns requerimentos estruturais para a activação da PKC por estes derivados xantónicos.

Xantonas inibidoras da PKC

Este trabalho incidiu sobre os dois derivados xantónicos, 3,4-di-hidroxixantona e 1-formil-4-hidroxi-3-metoxixantona, identificados através do ensaio fenotípico das leveduras como potenciais inibidores da PKC. A capacidade destes compostos para interagir com a PKC, inibindo-a, foi confirmada através da realização de um ensaio enzimático *in vitro*. O ensaio fenotípico mostrou que estas duas xantonas constituem inibidores da PKC com uma potência semelhante à de outros inibidores conhecidos desta cínase, diferindo, no entanto, na potência para as distintas isoformas testadas. A 3,4-di-hidroxixantona apresentou uma elevada selectividade para a PKC- η e a 1-formil-4-hidroxi-3-metoxixantona, apesar de não ter apresentado selectividade para nenhuma isoforma em particular, revelou-se muito potente em todas as isoformas testadas, principalmente nas clássicas. Com base nos resultados obtidos neste trabalho foram já desenhados e sintetizados novos derivados xantónicos, com o objectivo de obter inibidores da PKC potentes e selectivos para outras isoformas individuais e de possibilitar a realização de futuros estudos de estrutura-actividade com estes compostos.

f) Estudo da actividade moduladora da PKC por compostos xantonolignóides

Neste trabalho foi estudado o efeito de cinco derivados kielcorínicos, de origem sintética, sobre as isoformas α e β I (cPKCs), δ e η (nPKCs) e ζ (aPKCs). Este estudo constituiu o primeiro esforço realizado na tentativa de encontrar um mecanismo molecular, capaz de explicar as actividades biológicas recentemente atribuídas a estes compostos:

antiproliferativa (Sousa *et al.*, 2002; Pinto & Sousa, 2003) e hepatoprotectora (Fernandes *et al.*, 1995). Os resultados obtidos mostraram que os derivados kielcorínicos apresentam um efeito compatível com uma inibição da PKC. A interacção destes compostos com a PKC e a sua inibição foi confirmada através da realização de um ensaio enzimático *in vitro*. Além disso, este estudo revelou que estes compostos apresentavam diferenças nas suas potências e selectividades para as diversas isoformas testadas. Dos derivados kielcorínicos testados são de destacar o *trans*-(±)-kielcorina C, que apresentou uma elevada selectividade para a PKC- ζ e o *trans*-(±)-kielcorina D que se revelou selectivo para as nPKCs e aPKCs, com baixa potência para as cPKCs. Apesar dos inibidores da PKC se caracterizarem por apresentar uma grande diversidade estrutural (da Rocha *et al.*, 2002), foram encontradas, neste estudo, semelhanças estruturais e electrónicas entre este grupo de compostos e o inibidor da PKC, queleritrina. Os estudos computacionais preliminares efectuados, baseados nas semelhanças funcionais encontradas entre estes dois grupos de compostos, sugerem a existência de semelhanças na distribuição electrónica entre os derivados kielcorínicos testados e a queleritrina, o que vem confirmar as potencialidades do método para realizar estudos de estrutura-actividade.

Em síntese, a aplicação do método que implementamos permitiu confirmar as suas potencialidades para caracterizar a selectividade de activadores conhecidos para diferentes isoformas da PKC, para definir o perfil farmacológico de cada uma das isoformas expressas e demonstrar a capacidade deste como método eficaz e rápido para revelar novos compostos activadores da PKC.

Foi possível, ainda, demonstrar a capacidade deste método para o estudo de inibidores da PKC, utilização que tinha sido questionada anteriormente (Shieh *et al.*, 1995; 1996). Uma tentativa de usar este tipo de ensaio para tal fim tinha sido já realizada por outro grupo (Keenan *et al.*, 1997a,b), tendo sido utilizada a levedura *S. pombe* para o estudo de inibidores conhecidos da PKC. No presente trabalho, foi explorada a capacidade dos inibidores diminuírem o efeito dos activadores da PKC e usado este efeito como um indicador da potência, numa abordagem análoga à usada para caracterizar a potência dos antagonistas dos receptores de membrana.

Em termos concretos, estes trabalhos permitiram já revelar grupos de compostos bastante promissores para a obtenção de novos activadores e inibidores selectivos para as isoformas individuais da PKC e propor, pela primeira vez, um mecanismo molecular para compostos, como a dafnetoxina e vários xantonolignóides.

Outras potencialidades do método

- *Expressar novas cínases*: com este trabalho foram optimizadas técnicas que permitirão a expressão funcional de outras isoformas da PKC e, provavelmente, de outras cínases;
- *Revelar novos moduladores capazes de distinguir as diferentes isoformas da PKC*: a possibilidade de testar activadores e inibidores da PKC nas mesmas condições experimentais e numa única isoforma da PKC, permite avançar mais rapidamente na obtenção de moduladores selectivos para isoformas individuais da PKC tão importantes como a PKC- α , - δ e - ζ , cujos envolvimentos nos processos de proliferação celular e apoptose são bem conhecidos, com um potencial para encontrar compostos com futura aplicabilidade experimental e terapêutica em patologias graves, como o cancro;
- *Conhecer a base molecular da interacção de compostos com a PKC*: com este método poderão ser realizados outros estudos importantes como, por exemplo, identificar os locais da PKC envolvidos na interacção com os diferentes moduladores, recorrendo-se a moléculas de PKC mutadas, preparadas por mutações aleatórias no gene que codifica a PKC. Através de estudos desta natureza foi já possível identificar diferentes interacções moleculares de vários activadores (Shieh *et al.*, 1995; 1996) e inibidores (Rotenberg *et al.*, 1995) com domínios específicos da PKC e complementar os estudos moleculares já realizados, sobre a interacção entre activadores e inibidores com as várias regiões da estrutura primária da PKC (Parissenti *et al.*, 1993; Riedel *et al.*, 1993a,b,c; Su *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Shieh *et al.*, 1995);
- *Conhecer os mecanismos celulares através dos quais a PKC participa na regulação do ciclo celular*: o estudo da regulação do ciclo celular pela PKC, nas células de mamífero, é complicado dada a complexidade genética destas células, a coexistência de várias isoformas e a presença de numerosos receptores que interactuam entre as várias vias de transdução de sinal (Parissenti *et al.*, 1999). Uma vez que existe uma conservação significativa entre as vias de transdução de sinal das leveduras e dos mamíferos, as leveduras poderão constituir um modelo adequado para o estudo da regulação do ciclo celular por isoformas individuais da PKC de mamífero (Parissenti *et al.*, 1999);
- *Conhecer os mecanismos celulares através dos quais a PKC participa na regulação da endocitose*: a regulação dos fenómenos de endocitose oferece uma possível explicação para alguns eventos mediados pela PKC, ao nível da membrana plasmática (Goode *et al.*, 1994). A PKC está envolvida na interiorização e reciclagem/*down-regulation* de

receptores da membrana, induzida por factores de crescimento (Schlessinger, 1988). Contudo, o mecanismo capaz de explicar este efeito é, ainda, pouco claro. Goode e colaboradores (1994) verificaram que a activação das isoformas da PKC de mamífero, expressas na *S. pombe*, originavam um aumento na formação de vesículas. Este trabalho demonstrou o envolvimento da PKC na regulação da endocitose, sugerindo um modelo para a elucidação do mecanismo responsável pelas funções da PKC neste contexto;

- *Conhecer os mecanismos celulares através dos quais a PKC participa na regulação do cálcio intracelular*: o cálcio constitui um importante mensageiro secundário na regulação do ciclo celular, na libertação de neurotransmissores, na contracção muscular e em outros processos (Alkon & Rasmussen, 1988). Vários trabalhos descreveram, em sistemas experimentais de mamíferos, um aumento dos níveis de cálcio intracelular como sendo uma resposta à activação da PKC (Strong *et al.*, 1987; Lacerda *et al.*, 1988; Zherelova, 1989). Por outro lado, estudos demonstraram que a activação da isoforma α (Riedel *et al.*, 1993b), βI (Riedel *et al.*, 1993a,c) e ϵ (Parissenti *et al.*, 1999) da PKC, expressas na *S. cerevisiae*, estimulavam a captação do cálcio extracelular, mostrando a conservação deste processo entre os eucariotas inferiores e superiores. A realização destes estudos, numa célula mais simples, permitirá uma melhor compreensão do mecanismo de regulação da captação do cálcio pelas diferentes isoformas da PKC;
- *Estudo dos mecanismos de translocação da PKC*: uma outra aplicação interessante deste modelo poderá ser o estudo da translocação de cada uma das isoformas da PKC expressas na levedura, em presença de um activador. Estes compostos, ao interagirem com a PKC, desencadeiam um conjunto de fenómenos que incluem, a indução da activação da cínase e a sua translocação para diferentes compartimentos celulares (Stabel & Parker, 1991). Até hoje, a maioria dos novos activadores da PKC apenas foram estudados quanto à sua afinidade de ligação ou capacidade para induzir a activação da PKC. Poucos foram os estudos que distinguiram a capacidade de activação e a capacidade de induzir a translocação (Ma, 2001). Sabendo que, as diferentes isoformas da PKC podem ser influenciadas de forma distinta pelos activadores, este método poderá ser utilizado para comparar a capacidade dos moduladores da PKC para influenciar os processos de translocação, para comparar a susceptibilidade das diferentes isoformas da PKC em sofrerem translocação e para clarificar em que medida a selectividade de um modulador pode ser atribuída à sua afinidade de ligação ou à sua capacidade para induzir a translocação.

BIBLIOGRAFIA

- ALKON, D.L. & RASMUSSEN, H. (1988) A spatial-temporal model of cell activation. *Science*, **239**, 998-1005.
- ALKON, D.L. (1989) Memory storage and neural systems. *Sci. Am.*, **261**, 42-50.
- ANTONSSON, B.; MONTESSUIT, S.; FRIEDLI, L.; PAYTON, M.A. & PARAVICINI, G. (1994) Protein Kinase C in yeast. Characteristics of the *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 gene product. *J. Biol. Chem.*, **269**, 16821-16828.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A. & STRUHL, K. (1995) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York.
- BAIER, G.; BAIER-BITTERLICH, G.; MELLER, N.; COGGESHALL, K.M.; GIAMPA, L.; TELFORD, D.; ISAKOV, N. & ALTMAN, A. (1994) Expression and biochemical characterization of human protein kinase C- θ . *Eur. J. Biochem.*, **225**, 195-203.
- BALTUCH, G.H.; DOOLEY, N.P.; COULDWELL, W.T. & YONG, V.W. (1993) Staurosporine differentially inhibits glioma versus non-glioma cell lines. *J. Neurooncol.*, **16**, 141-147.
- BARRY, O.P. & KAZANIETZ, M.G. (2001) Protein kinase C isozymes, novel phorbol ester receptors and cancer chemotherapy. *Curr. Pharm. Des.*, **7**, 1725-1744.
- BASU, A. (1993) The potential of protein kinase C as a target for anticancer treatment. *Pharmacol. Ther.*, **59**, 257-280.
- BASU, A. & CLINE, J.S. (1995) Oncogenic transformation alters cisplatin-induced apoptosis in rat embryo fibroblasts. *Int. J. Cancer*, **63**, 597-603.
- BERKOW, R.L. & KRAFT, A.S. (1989) Bryostatin, a nonphorbol macrocyclic lactone activates intact human polymorphonuclear leukocytes and binds to the phorbol ester receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 1109-1115.
- BIRCHALL, A.M.; BISHOP, J.; BRADSHAW, D.; CLINE, A.; COFFEY, J.; ELLIOTT, L.H.; GIBSON, V.M.; GREENHAM, A.; HALLAM, T.J.; HARRIS, W.; HILL, C.H.; HUTCHINGS, A.; LAMONT, A.G.; LAWTON, G.; LEWIS, E.J.; MAW, A.; NIXON, J.S.; POLE, D.; WADSWORTH, J. & WILKINSON, S.E. (1994) Ro 32-0432, a selective and orally active inhibitor of protein kinase C prevents T-cell activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 922-999.
- BLOBE, G.C.; STRIBLING, S.; OBEID, L.M. & HANNUN, Y.A. (1996) Protein kinase C isoenzymes: regulation and function. *Cancer Surv.*, **27**, 213-248.
- BLUMBERG, P.M. (1991) Complexities of protein kinase C pathway. *Mol. Carcinog.*, **4**, 339-344.
- BORNER, C.; UEFFING, M.; JAKEN, S.; PARKER, P.J. & WEINSTEIN, B.I. (1995) Two closely related isoforms of protein kinase C produce reciprocal effects on the growth of rat fibroblasts. Possible molecular mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **270**, 78-86.
- BOTSTEIN, D. (1991) Why yeast? *Hosp. Pract. (Off Ed.)*, **26**, 157-161, 164.
- BOURBON, N.A.; YUN, J. & KESTER, M. (2000) Ceramide directly activates protein kinase C ζ to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J. Biol. Chem.*, **275**, 35617-35623.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- BRADSHAW, D.; HILL, C.H.; NIXON, J.S. & WILKINSON, S.E. (1993) Therapeutic potential of protein kinase C inhibitors. *Agents Actions*, **38**, 135-147.
- BROACH, J.R.; LI, Y.-Y.; WU, L.-C. & JAYARAM, M. (1983) *In Experimental Manipulation of Gene Expression*. Ed. Inouye, M., Academic Press, Orlando, 84-117.

- BRODIE, C. & BLUMBERG, P.M. (2003) Regulation of cell apoptosis by protein kinase C δ . *Apoptosis*, **8**, 19-27.
- BROWN, A.J.P. & TUIITE, M.F. (1998) Yeast gene analysis in the next millennium. In *Yeast Gene Analysis, Methods in Microbiology*. Eds. Brown, A.J.P. & Tuite, M.F., Academic Press, London, **26**, 451-461.
- BRUNS, R.F.; MILLER, F.D.; MERRIMAN, R.L.; HOWBERT, J.J.; HEATH, W.F.; KOBAYASHI, E.; TAKAHASHI, I.; TAMAOKI, T. & NAKANO, H. (1991) Inhibition of protein kinase C by calphostin C is light-dependent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 288-293.
- BRUSCHI, C.V.; COMER, A.R.; & HOWE, G.A. (1987) Specificity of DNA uptake during whole cell transformation of *S. cerevisiae*. *Yeast*, **3**, 131-137.
- BURNS, D.J. & BELL, R.M. (1991) Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *J. Biol. Chem.*, **266**, 18330-18338.
- CACACE, A.M.; GUADAGNO, S.N.; KRAUSS, R.S.; FABBRO, D. & WEINSTEIN, I.B. (1993) The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. *Oncogene*, **8**, 2095-2104.
- CARAVATTI, G.; MEYER, T.; FREDHAGEN, A.; TRINKS, U.; METT, H. & FABBRO, D. (1994) Inhibitory activity and selectivity of staurosporine derivatives towards protein kinase C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 399-404.
- CARTEE, L. & KUCERA, G.L. (2000) Protein kinase C modulation and anticancer drug response. *Cancer Invest.*, **18**, 731-739.
- CARTER, C.A. (2000) Protein kinase C as a drug target: implications for drug or diet prevention and treatment of cancer. *Curr. Drug Targets*, **1**, 163-183.
- CASTAGNA, M.; TAKAI, Y.; KAIBUCHI, K.; SANO, K.; KIKKAWA, U. & NISHIZUKA, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7847-7851.
- CHAPLINE, C.; COTTOM, J.; TOBIN, J.; HULMES, H.; CRABB, J. & JAKEN, S. (1998) A major transformation-sensitive PKC-binding protein is also a PKC substrate involved in cytoskeletal remodeling. *J. Biol. Chem.*, **273**, 19482-19489.
- CHOI, P.M.; TCHOU-WONG, K.-M. & WEINSTEIN, B.I. (1990) Overexpression of protein kinase C in HT29 colon cancer cells causes growth inhibition and tumor suppression. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4650-4657.
- CLEMENS, M.J.; TRAYNER, I. & MENAYA, J. (1992) The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. *J. Cell Sci.*, **103**, 881-887.
- COFFER, P.J. & WOODGETT, J.R. (1991) Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur. J. Biochem.*, **201**, 475-481.
- COUSSENS, L.; PARKER, P.J.; RHEE, L.; YANG-FENG, T.L.; CHEN, E.; WATERFIELD, M.D.; FRANCKE, U. & ULLRICH, A. (1986) Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signalling pathways. *Science*, **233**, 859-866.
- CUTLER, R.E. JR.; MAIZELS, E.T.; BROOKS, E.J.; MIZUNO, K.; OHNO, S. & HUNZICKER-DUNN, M. (1993) Regulation of delta protein kinase C during rat ovarian differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1179**, 260-270.
- DA ROCHA, A.B.; MANS, D.R.A.; REGNER, A. & SCHWARTSMANN, G. (2002) Targeting protein kinase C: new therapeutic opportunities against high-grade malignant gliomas? *Oncologist*, **7**, 17-33.
- DAS, K.C.; GUO, X.-L. & WHITE, C.W. (1998) Protein kinase C δ -dependent induction of manganese superoxide dismutase gene expression by microtubule-active anticancer drugs. *J. Biol. Chem.*, **273**, 34639-34645.

- DAVIES, S.P.; REDDY, H.; CAIVANO, M. & COHEN, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.*, **351**, 95-105.
- DAVIS, P.D.; ELLIOTT, L.H.; HARRIS, W.; HILL, C.H.; HURST, S.A.; KEECH, E.; KUMAR, M.K.H.; LAWTON, G.; NIXON, J.S. & WILKINSON, S.E. (1992) Inhibitors of protein kinase C. 2. Substituted bisindolylmaleimides with improved potency and selectivity. *J. Med. Chem.*, **35**, 994-1001.
- DIAZ-MECO, M.T.; MUNICIO, M.M.; FRUTOS, S.; SANCHEZ, P.; LOZANO, J.; SANZ, L. & MOSCAT, J. (1996) The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell*, **86**, 777-786.
- DIETER, P. & FITZKE, E. (1991) RO 31-8220 and RO 31-7549 show improved selectivity for protein kinase C over staurosporine in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 396-401.
- DUNKLEY, P.R. & KEMP, B.E. (1992) The protein kinases and phosphatases. In Communication within animal cells. Ed. Barritt, G.J., Oxford University Press, Oxford, 91-126.
- ECKLY-MICHEL, A.E.; LE BEC, A. & LUGNIER, C. (1997) Chelerythrine, a protein kinase C inhibitor, interacts with cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Eur. J. Pharmacol.*, **324**, 85-88.
- EDWARDS, A.S. & NEWTON, A.C. (1997) Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **272**, 18382-18390.
- ENDO, K.; IGARASHI, Y.; NISAR, M.; ZHOU, Q. & HAKOMORI, S. (1991) Cell membrane signaling as target in cancer therapy: inhibitory effect of N,N-dimethyl and N,N,N-trimethyl sphingosine derivatives on *in vitro* and *in vivo* growth of human tumor cells in nude mice. *Cancer Res.*, **51**, 1613-1618.
- EVANS, F.J.; PARKER, P.J.; OLIVIER, A.R.; THOMAS, S.; RYVES, W.J.; EVANS, A.T.; GORDGE, P. & SHARMA, P. (1991) Phorbol ester activation of the isotypes of protein kinase C from bovine and rat brain. *Biochem. Soc. Trans.*, **19**, 397-402.
- FABBRO, D.; BUCHDUNGER, E.; WOOD, J.; MESTAN, J.; HOFMANN, F.; FERRARI, S.; METT, H.; O'REILLY, T. & MEYER, T. (1999) Inhibitors of protein kinases: CGP 41251, a protein kinase C inhibitor with potential as an anticancer agent. *Pharmacol. Ther.*, **82**, 293-301.
- FERNANDES, E.R.; CARVALHO, F.D.; REMIÃO, F.G.; BASTOS, M.L.; PINTO, M.M. & GOTTLIEB, O.R. (1995) Hepatoprotective activity of xanthenes and xanthonolignoids against tert-butylhydroperoxide-induced toxicity in isolated rat hepatocytes - comparison with silybin. *Pharm. Res.*, **12**, 1756-1760.
- FERRIOLA, P.C.; CODY, V. & MIDDLETON, E. (1989) Protein kinase C inhibition by plant flavonoids: kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 1617-1624.
- FIELDS, F.O. & THORNER, J. (1991) Genetic suppression analysis of the function of protein kinase C (*PKC1* gene product) in *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle progression: the SKCd mutations. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **56**, 51-60.
- FLETCHER, D.J. & WAYS, D.K. (1991) Age-dependent expression of protein kinase C isoforms in rat islets. *Diabetes*, **40**, 1496-1503.
- FUJII, T.; GARCÍA-BERMEJO, M.L.; BERNABÓ, J.L.; CAAMANÓ, J.; OHBA, M.; KUROKI, T.; LI, L.; YUSPA, S.H. & KAZANIETZ, M.G. (2000) Involvement of protein kinase C δ (PKC δ) in phorbol ester-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. Lack of proteolytic cleavage of PKC δ . *J. Biol. Chem.*, **275**, 7574-7582.

- GEIGES, D.; MEYER, T.; MARTE, B.; VANEK, M.; WEISSGERBER, G.; STABEL, S.; PFEILSCHIFTER, J.; FABBRO, D. & HUWILER, A. (1997) Activation of protein kinase C subtypes α , γ , δ , ϵ , ζ and η by tumor-promoting and nontumor-promoting agents. *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 865-875.
- GEILEN, C.C.; HAASE, R.; BUCHNER, K.; WIEDER, T.; HUCHO, F. & REUTTER, W. (1991) The phospholipid analogue, hexadecylphosphocholine, inhibits protein kinase C *in vitro* and antagonises phorbol ester-stimulated cell proliferation. *Eur. J. Cancer*, **27**, 1650-1653.
- GESCHER, A. (1985) Antiproliferative properties of phorbol ester tumour promoters. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 2587-2592.
- GESCHER, A. (1992) Towards selective pharmacological modulation of protein kinase C - opportunities for the development of novel antineoplastic agents. *Brit. J. Cancer*, **66**, 10-19.
- GESCHER, A. (1998) Analogs of staurosporine: potential anticancer drugs? *Gen. Pharmac.*, **31**, 721-728.
- GIETZ, R.D. & SUGINO A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 527-534.
- GOEKJIAN, P.G. & JIROUSEK, M.R. (1999) Protein kinase C in the treatment of disease: signal transduction pathways, inhibitors and agents in development. *Curr. Med. Chem.*, **6**, 877-903.
- GOEKJIAN, P.G. & JIROUSEK, M.R. (2001) Protein kinase C inhibitors as novel anticancer drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **10**, 2117-2140.
- GONZALEZ, R.; EBBINGHAUS, S.; HENTHORN, T.K.; MILLER, D. & KRAFT, A.S. (1999) Treatment of patients with metastatic melanoma with bryostatins - a phase II study. *Melanoma Res.*, **9**, 599-606.
- GOODE, N.T.; HAJIBAGHERI, M.A.N.; WARREN, G. & PARKER, P.J. (1994) Expression of mammalian protein kinase C in *Schizosaccharomyces pombe*: isotype-specific induction of growth arrest, vesicle formation and endocytosis. *Mol. Biol. Cell*, **5**, 907-920.
- GOPALAKRISHNA, R.; CHEN, Z.H. & GUNDIMEDA, U. (1992) Irreversible oxidative inactivation of protein kinase C by photosensitive inhibitor calphostin C. *FEBS Lett.*, **314**, 149-154.
- GREIF, H.; BEN-CHAIM, J.; SHIMON, T.; BECHOR, E.; ELDAR, H. & LIVNEH, E. (1992) The protein kinase C-related PKC-L(η) gene product is localized in the cell nucleus. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 1304-1311.
- GSCHWENDT, M.; HORN, F.; KITTSTEIN, W. & MARKS, F. (1983) Inhibition of the calcium- and phospholipid-dependent protein kinase activity from mouse brain cytosol by quercetin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 444-447.
- GSCHWENDT, M.; MULLER, H.J.; KIELBASSA, K.; ZANG, R.; KITTSTEIN, W.; RINCKE, G. & MARKS, F. (1994) Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 93-98.
- GSCHWENDT, M.; DIETERICH, S.; RENNECKE, J.; KITTSTEIN, W.; MUELLER, H.J. & JOHANNES, F.J. (1996) Inhibition of protein kinase C μ by various inhibitors. Differentiation from protein kinase C isoenzymes. *FEBS Lett.*, **392**, 77-80.
- GSCHWENDT, M. (1999) Protein kinase C δ . *Eur. J. Biochem.*, **259**, 555-564.
- GUILLEMAIN, I. & ROSSIGNOL, B. (1995) Protein kinase C and phospholipase D activation in rat parotid glands. *FEBS Lett.*, **363**, 13-16.
- GUNDIMEDA, U.; CHEN, Z.-H. & GOPALAKRISHNA, R. (1996) Tamoxifen modulates protein kinase C via oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 13504-13514.

- GUSTAFSSON, A.B. & BRUNTON, L.L. (1999) Differential and selective inhibition of protein kinase A and protein kinase C in intact cells by balanol congeners. *Mol. Pharmacol.*, **56**, 377-382.
- HAN, Z.T.; ZHU, X.X.; YANG, R.Y.; SUN, J.Z.; TIAN, G.F.; LIU, X.J.; CAO, G.S.; NEWMARK, H.L.; COONEY, A.H. & CHANG, R.L. (1998) Effect of intravenous infusions of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in patients with myelocytic leukemia: preliminary studies on therapeutic efficacy and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5357-5361.
- HANNUN, Y.A.; LOOMIS, C.R.; MERRILL, A.H. JR. & BELL, R.M. (1986) Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding *in vitro* and in human platelets. *J. Biol. Chem.*, **261**, 12604-12609.
- HANNUN, Y.A. & BELL, R.M. (1988) Aminoacridines, potent inhibitors of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **263**, 5124-5131.
- HANNUN, Y.A. & BELL, R.M. (1989) Regulation of protein kinase C by sphingosine and lysosphingolipids. *Clin. Chim. Acta*, **185**, 333-345.
- HANNUN, Y.A.; OBEID, L.M. & WOLFF, R.A. (1993) The novel second messenger ceramide: identification, mechanism of action and cellular activity. *Adv. Lipid Res.*, **25**, 43-64.
- HASHIMOTO, Y.; OSADA, S.; OHNO, S. & KUROKI, T. (1992) A Ca^{2+} -independent protein kinase C, nPKC η : its structure, distribution and possible function. *Tohoku J. Exp. Med.*, **168**, 275-278.
- HAYASHI, A.; SEKI, N.; HATTORI, A.; KOZUMA, S. & SAITO, T. (1999) PKC δ , a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC μ . *Biochim. Biophys. Acta*, **1450**, 99-106.
- HERBERT, J.M.; AUGEREAU, J.M.; GLEYE, J. & MAFFRAND, J.P. (1990) Chelerytrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 993-999.
- HIDAKA, H.; INAGAKI, M.; KAWAMOTO, S. & SASAKI, Y. (1984) Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry*, **23**, 5036-5041.
- HOFMANN, J. (1997) The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J.*, **11**, 649-669.
- HOFMANN, J. (2001) Modulation of protein kinase C in antitumor treatment. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **142**, 1-96.
- HORGAN, K.; COOKE, E.; HALLETT, M.B. & MANSEL, R.E. (1986) Inhibition of protein kinase C mediated signal transduction by tamoxifen. Importance for antitumour activity. *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 4463-4465.
- HOUSE, C. & KEMP, B.E. (1987) Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science*, **238**, 1726-1728.
- HOUSEY, G.M.; O'BRIAN, C.A.; JOHNSON, M.D.; KIRSCHMEIER, P. & WEINSTEIN, I.B. (1987) Isolation of cDNA clones encoding protein kinase C: evidence for a protein kinase C-related gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1065-1069.
- HOUSEY, G.M.; JOHNSON, M.D.; HSIAO, W.-L.W.; O'BRIAN, C.A.; MURPHY, J.P.; KIRSCHMEIER, P. & WEINSTEIN, I.B. (1988) Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts. *Cell*, **52**, 343-354.
- HOVLAND, P.; FLICK, J.; JOHNSTON, M. & SCLAFANI, R.A. (1989) Galactose as a gratuitous inducer of GAL gene expression in yeasts growing on glucose. *Gene*, **83**, 57-64.
- HU, H. (1996) Recent discovery and development of selective protein kinase C inhibitors. *Drug Discov. Today*, **1**, 438-447.
- HUGHES, B.P. (1992) Interactions between pathways of intracellular communication. In *Communication within animal cells*. Ed. Barritt, G.J., Oxford University Press, Oxford, 315-325.

- HURLEY, J.H.; NEWTON, A.C.; PARKER, P.J.; BLUMBERG, P.M. & NISHIZUKA, Y. (1997) Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci.*, **6**, 477-480.
- HUWILER, A.; FABBRO, D. & PFEILSCHIFTER, J. (1998) Selective ceramide binding to protein kinase C- α and - δ isoenzymes in renal mesangial cells. *Biochemistry*, **37**, 14556-14562.
- IKUTA, T.; CHIDA, K.; TAJIMA, O.; MATSUURA, Y.; IWAMORI, M.; UEDA, Y.; MIZUNO, K.; OHNO, S. & KUROKI, T. (1994) Cholesterol sulfate, a novel activator for the η isoform of protein kinase C. *Cell Growth Differ.*, **5**, 943-947.
- INOBUCHI, T.; BATTAN, R.; HANDLER, E.; SPORTSMAN, J.R.; HEATH, W. & KING, G.L. (1992) Preferential elevation of protein kinase C isoform β -II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11059-11063.
- INOUE, M.; KISHIMOTO, A.; TAKAI, Y. & NISHIZUKA, Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues II. *J. Biol. Chem.*, **252**, 7610-7616.
- ISAKOV, N. & ALTMAN, A. (2002) Protein kinase C θ in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.*, **20**, 761-794.
- ISHII, H.; JIROUSEK, M.R.; KOYA, D.; TAKAGI, C.; XIA, P.; CLERMONT, A.; BURSELL, S.-E.; KERN, T.S.; BALLAS, L.M.; HEATH, W.F.; STRAMM, L.E.; FEENER, E.P. & KING, G.L. (1996) Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC β inhibitor. *Science*, **272**, 728-731.
- ITO, H.; FUKUDA, Y.; MURATA, K. & KIMURA, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168.
- IWAI, T.; FUJISAWA, N.; OGITA, K. & KIKKAWA, U. (1992) Catalytic properties of yeast protein kinase C: difference between the yeast and mammalian enzymes. *J. Biochem.*, **112**, 7-10.
- JARVIS, W.D. & GRANT, S. (1999) Protein kinase C targeting in antineoplastic treatment strategies. *Invest. New Drugs*, **17**, 227-240.
- JEFFREY, A.M. & LISKAMP, R.M. (1986) Computer-assisted molecular modeling of tumor promoters: rationale for the activity of phorbol esters, teleocidin B and aplysiatoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 241-245.
- JIROUSEK, M.R.; Gillig, J.R.; Gonzalez, C.M.; Heath, W.F.; McDonald, J.H.; Neel, D.A.; Rito, C.J.; Singh, U.; Stramm, L.E.; Melikian-Badalian, A.; Baevisky, M.; Ballas, L.M.; Hall, S.E.; Winneroski, L.L. & Faul, M.M. (1996) (S)-13-[(dimethylamino)methyl]-10,11,14,15-tetrahydro-4,9:16, 21-dimetheno-1H, 13H-dibenzo[e,k]pyrrolo[3,4-h][1,4,13]oxadiazacyclohexadecene-1,3(2H)-dione (LY333531) and related analogues: isozyme selective inhibitors of protein kinase C beta. *J. Med. Chem.*, **39**, 2664-2671.
- JOHANNES, F.J.; PRESTLE, J.; EIS, S.; OBERHAGEMANN, P. & PFIZENMAIER, K. (1994) PKC μ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.*, **269**, 6140-6148.
- KASAHARA, K. & KIKKAWA, U. (1995) Distinct effects of saturated fatty acids on protein kinase C subspecies. *J. Biochem.*, **117**, 648-653.
- KASE, H.; IWAHASHI, K. & MATSUDA, Y. (1986) K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **39**, 1059-1065.
- KAWAMOTO, S. & HIDAKA, H. (1984) 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**, 258-264.

- KAZANIETZ, M.G.; ARECES, L.B.; BAHADOR, A.; MISCHAK, H.; GOODNIGHT, J.; MUSHINSKI, J.F. & BLUMBERG, P.M. (1993) Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C isozymes. *Mol. Pharmacol.*, **44**, 298-307.
- KAZANIETZ, M.G.; LEWIN, N.E.; BRUNS, J.D. & BLUMBERG, P.M. (1995) Characterization of the cysteine-rich region of the *Caenorhabditis elegans* protein Unc-13 as a high affinity phorbol ester receptor. Analysis of ligand-binding interactions, lipid cofactor requirements, and inhibitor sensitivity. *J. Biol. Chem.*, **270**, 10777-10783.
- KAZANIETZ, M.G. (2000) Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters. *Mol. Carcinog.*, **28**, 5-11.
- KAZANIETZ, M.G.; CALOCA, M.J.; EROLES, P.; FUJII, T.; GARCIA-BERMEJO, M.L.; REILLY, M. & WANG, H. (2000) Pharmacology of the receptors for the phorbol ester tumor promoters: multiple receptors with different biochemical properties. *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1417-1424.
- KEENAN, C.; GOODE, N. & PEARS, C. (1997a) Assay to determine the isoform specificity of protein kinase C inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.*, **25**, S591.
- KEENAN, C.; GOODE, N. & PEARS, C. (1997b) Isoform specificity of activators and inhibitors of protein kinase C γ and δ . *FEBS Lett.*, **415**, 101-108.
- KEENAN, C.; THOMPSON, S.; KNOX, K. & PEARS, C. (1999) Protein kinase C- α is essential for Ramos-BL B cell survival. *Cell Immunol.*, **196**, 104-109.
- KHAN, W.A.; BLOBE, G.C. & HANNUN, Y.A. (1995) Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. *Cell. Signal.*, **7**, 171-184.
- KILEY, S.C.; PARKER, P.J.; FABBRO, D. & JAKEN, S. (1991) Differential regulation of protein kinase C isozymes by thyrotropin-releasing hormone in GH4C1 cells. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23761-23768.
- KISHIMOTO, A.; TAKAI, Y.; MORI, T.; KIKKAWA, U. & NISHIZUKA, Y. (1980) Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.*, **255**, 2273-2276.
- KISHIMOTO, A.; KAJIKAWA, N.; SHIOTA, M. & NISHIZUKA, Y. (1983) Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease. *J. Biol. Chem.*, **258**, 1156-1164.
- KITAGAWA, M.; MUKAI, H.; SHIBATA, H. & ONO, Y. (1995) Purification and characterization of a fatty acid-activated protein kinase (PKN) from rat testis. *Biochem. J.*, **310**, 657-664.
- KITAZAWA, T.; TAKIZAWA, N.; IKEBE, M. & ETO, M. (1999) Reconstitution of protein kinase C-induced contractile Ca^{2+} sensitization in triton X-100-demembranated rabbit arterial smooth muscle. *J. Physiol.*, **520**, 139-152.
- KNOPE, J.L.; LEE, M.-H.; SULTZMAN, L.A.; KRIZ, R.W.; LOOMIS, C.R.; HEWICK, R.M. & BELL, R.M. (1986) Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell*, **46**, 491-502.
- KOBAYASHI, E.; NAKANO, H.; MORIMOTO, M. & TAMAOKI, T. (1989) Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 548-553.
- KRAFT, A.S.; ANDERSON, W.B.; COOPER, H.L. & SANDO, J.J. (1982) Decrease in cytosolic calcium/phospholipid-dependent protein kinase activity following phorbol ester treatment of EL4 thymoma cells. *J. Biol. Chem.*, **257**, 13193-13196.

- LA PORTA, C.A. & COMOLLI, R. (1995) Over-expression of protein kinase C δ is associated with a delay in preneoplastic lesion development in diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, **16**, 1233-1238.
- LACERDA, A.E.; RAMPE, D. & BROWN, A.M. (1988) Effects of protein kinase C activators on cardiac Ca^{2+} channels. *Nature*, **335**, 249-251.
- LEE, S.K.; QING, W.G.; MAR, W.; LUYENGI, L.; MEHTA, R.G.; KAWANISHI, K.; FONG, H.H.S.; BEECHER, C.W.W.; KINGHORN, A.D. & PEZZUTO, J.M. (1998) Angoline and chelerythrine, benzophenanthridine alkaloids that do not inhibit protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **273**, 19829-19833.
- LESZCZYNSKI, D. (1996) The role of protein kinase C in regulation of apoptosis: a brief overview of the controversy. *Cancer J.*, **9**, 308-313.
- LEVIN, D.E.; FIELDS, F.O.; KUNISAWA, R.; BISHOP, J.M. & THORNER, J. (1990) A candidate protein kinase C gene, *PKC1*, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell*, **62**, 213-224.
- LEVIN, D.E. & BARTLETT-HEUBUSCH, E. (1992) Mutants in the *S. cerevisiae PKC1* gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J. Cell Biol.*, **116**, 1221-1229.
- LOOMIS, C.R. & BELL, R.M. (1988) Sangivamycin, a nucleoside analogue, is a potent inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **263**, 1682-1692.
- LOZANO, J.; BERRA, E.; MUNICIO, M.M.; DIAZ-MECO, M.T.; DOMINGUEZ, I.; SANZ, L. & MOSCAT, J. (1994) Protein kinase C ζ isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 19200-19202.
- LUCAS, M. & SANCHEZ-MARGALET, V. (1995) Protein kinase C involvement in apoptosis. *Gen. Pharmacol.*, **5**, 881-887.
- MA, D. (2001) Recent advances in the discovery of protein kinase C modulators based on the structures of natural protein kinase C activators. *Curr. Med. Chem.*, **8**, 191-202.
- MADANI, S.; HICHAMI, A.; LEGRAND, A.; BELLEVILLE, J. & KHAN, N.A. (2001) Implication of acyl chain of diacylglycerols in activation of different isoforms of protein kinase C. *FASEB J.*, **15**, 2595-2601.
- MAK, N.K.; LUNG, H.L.; WONG, R.N.; LEUNG, H.W.; TSANG, H.Y. & LEUNG, K.N. (2001) Expression of protein kinase C isoforms in euxanthone-induced differentiation of neuroblastoma cells. *Planta Med.*, **67**, 400-405.
- MAKOWSKE, M.; BIRNBAUM, M.J.; BALLESTER, R. & ROSEN, O.M. (1986) A cDNA encoding protein kinase C identifies two species of mRNA in brain and GH₃ cells. *J. Biol. Chem.*, **261**, 13389-13392.
- MARTE, B.M.; MEYER, T.; STABEL, S.; STANDKE, G.J.; JAKEN, S.; FABBRO, D. & HYNES, N.E. (1994) Protein kinase C and mammary cell differentiation: involvement of protein kinase C α in the induction of β -casein expression. *Cell Growth Differ.*, **5**, 239-247.
- MARTINY-BARON, G.; KAZANIETZ, M.G.; MISCHAK, H.; BLUMBERG, P.M.; KOCHS, G.; HUG, H.; MARME, D. & SCHACHTELE, C. (1993) Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J. Biol. Chem.*, **268**, 9194-9197.
- MAY, W.S.; LAPETINA, E.G. & CUATRECASAS, P. (1986) Intracellular activation of protein kinase C and regulation of the surface transferrin receptor by diacylglycerol is a spontaneously reversible process that is associated with rapid formation of phosphatidic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1281-1284.
- MELESE, T. & HIETER, P. (2002) From genetics and genomics to drug discovery: yeast rises to the challenge. *TiPS*, **23**, 544-547.

- MELLONI, E.; PONTREMOLI, S.; MICHETTI, M.; SACCO, O.; SPARATORE, B. & HORECKER, B.L. (1986) The involvement of calpain in the activation of protein kinase C in neutrophils stimulated by phorbol myristic acid. *J. Biol. Chem.*, **261**, 4101-4105.
- MELLOR, H. & PARKER, P.J. (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.*, **332**, 281-292.
- MEYER, T.; REGENASS, U.; FABBRO, D.; ALTERI, E.; ROSEL, J.; MULLER, M.; CARAVATTI, G. & MATTER, A. (1989) A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and *in vitro* anti-proliferative as well as *in vivo* anti-tumor activity. *Int. J. Cancer*, **43**, 851-856.
- MISCHAK, H.; GOODNIGHT, J.A.; KÖLCH, W.; MARTINY-BARON, G.; SCHÄCHTELE, C.; KAZANIETZ, M.G.; BLUMBERG, P.M.; PIERCE, J.H. & MUSHINSKI, J.F. (1993) Overexpression of protein kinase C- δ and - ϵ in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.*, **268**, 6090-6096.
- MISHIMA, K.; OHNO, S.; SHITARA, N.; YAMAOKA, K. & SUZUKI, K. (1994) Opposite effects of the overexpression of protein kinase C gamma and delta on the growth properties of human glioma cell line U251 MG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 363-372.
- MOCHLY-ROSEN, D.; KHANER, H. & LOPEZ, J. (1991a) Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3997-4000.
- MOCHLY-ROSEN, D.; KHANER, H.; LOPEZ, J. & SMITH, B.L. (1991b) Intracellular receptors for activated protein kinase C. Identification of a binding site for the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **266**, 14866-14868.
- MOCHLY-ROSEN, D. & GORDON, A.S. (1998) Anchoring proteins for protein. *FASEB J.*, **12**, 35-42.
- MORI, T.; TAKAI, Y.; MINAKUCHI, R.; YU, B. & NISHIZUKA, Y. (1980) Inhibitory action of chlorpromazine, dibucaine and other phospholipid-interacting drugs on calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **255**, 8378-8380.
- MOSCAT, J. & DIAZ-MECO, M.T. (2000) The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep.*, **1**, 399-403.
- MURRAY, N.R.; BAUMGARDNER, G.P.; BURNS, D.J. & FIELDS, A.P. (1993) Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia (K562) cell proliferation and differentiation. Evidence that β II protein kinase C is required for proliferation. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15847-15853.
- MUSASHI, M.; OTA, S. & SHIROSHITA, N. (2000) The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int. J. Hematol.*, **72**, 12-19.
- NAKANISHI, H. & EXTON, J.H. (1992) Purification and characterization of the ζ isoform of protein kinase C from bovine kidney. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16347-16354.
- NAKANISHI, H.; BREWER, K. & EXTON, J.H. (1993) Activation of the ζ isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, **268**, 13-16.
- NEWTON, A.C. (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 161-167.
- NEWTON, A.C. (2001) Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors and macromolecular interactions. *Chem. Rev.*, **101**, 2353-2364.
- NIEDEL, J.E.; KUHN, L. & VANDENBARK, G.R. (1983) Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 36-40.

- NISHIZUKA, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, **308**, 693-698.
- NISHIZUKA, Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, **233**, 305-312.
- NISHIZUKA, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, **334**, 661-665.
- NISHIZUKA, Y. (1989) Studies and perspectives of the protein kinase C family for cellular regulation. *Cancer*, **63**, 1892-1903.
- NISHIZUKA, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, **258**, 607-614.
- NISHIZUKA, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.*, **9**, 484-496.
- O'BRIEN, C.A.; LISKAMP, R.M.; SOLOMON, D.H. & WEINSTEIN, I.B. (1985) Inhibition of protein kinase C by tamoxifen. *Cancer Res.*, **45**, 2462-2465.
- O'BRIAN, C.A.; LISKAMP, R.M.; SOLOMON, D.H. & WEINSTEIN, I.B. (1986) Triphenylethylenes: a new class of protein kinase C inhibitors. *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**, 1243-1246.
- OANCEA, E.; TERUEL, M.N.; QUEST, A.F. & MEYER, T. (1998) Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J. Cell Biol.*, **140**, 485-498.
- OGITA, K.; MIYAMOTO, S.-I.; KOIDE, H.; IWAI, T.; OKA, M.; ANDO, K.; KISHIMOTO, A.; IKEDA, K.; FUKAMI, Y. & NISHIZUKA, Y. (1990) Protein kinase C in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with the mammalian enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5011-5015.
- OHNO, S.; KAWASAKI, H.; IMAJOH, S.; SUZUKI, K.; INAGAKI, M.; YOKOKURA, H.; SAKOH, T. & HIDAKA, H. (1987) Tissue-specific expression of three distinct types of rabbit protein kinase C. *Nature*, **325**, 161-166.
- OHNO, S. (1997) The distinct biological potential of PKC isotypes in protein kinase C. Springer-Verlag, Heidelberg, 179-188.
- OHNO, S. & NISHIZUKA, Y. (2002) Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J. Biochem.*, **132**, 509-511.
- ONO, Y.; KIKKAWA, U.; OGITA, K.; FUJII, T.; KUROKAWA, T.; ASAOKA, Y.; SEKIGUCHI, K.; ASE, K.; IGARASHI, K. & NISHIZUKA, Y. (1987) Expression and properties of two types of protein kinase C: alternative splicing from a single gene. *Science*, **236**, 1116-1120.
- ONO, Y.; FUJII, T.; OGITA, K.; KIKKAWA, U.; IGARASHI, K. & NISHIZUKA, Y. (1988) The structure, expression and properties of additional members of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6927-6932.
- ONO, Y.; FUJII, T.; IGARASHI, K.; KUNO, T.; TANAKA, C.; KIKKAWA, U. & NISHIZUKA, Y. (1989) Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4868-4871.
- OTTE, A.P.; KRAMER, I.M. & DURSTON, A.J. (1991) Protein kinase C and regulation of the local competence of *Xenopus* ectoderm. *Science*, **251**, 570-573.
- PAGLIARO, L.; DALIANI, D.; AMATO, R.; TU, S.M.; JONES, D.; SMITH, T.; LOGOTHETIS, C. & MILLIKAN, R. (2000) A phase II trial of bryostatin-1 for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*, **89**, 615-618.
- PALMER, R.H.; RIDDEN, J. & PARKER, P.J. (1994) Identification of multiple, novel, protein kinase C-related gene products. *FEBS Lett.*, **356**, 5-8.

- PALMER, R.H. & PARKER, P.J. (1995) Expression, purification and characterization of the ubiquitous protein kinase C-related kinase 1. *Biochem. J.*, **309**, 315-320.
- PARISSENTI, A.M.; SU, L.S. & RIEDEL, H. (1993) Reconstitution of protein kinase C alpha function by the protein kinase C beta-1 carboxy terminus. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **98**, 9-16.
- PARISSENTI, A.M.; KIM, S.A.; COLANTONIO, C.M.; SNIHURA, A.L. & SCHIMMER, B.P. (1996) Regulatory domain of human protein kinase C α dominantly inhibits protein kinase C β 1 – regulated growth and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Physiol.*, **166**, 609-617.
- PARISSENTI, A.M.; VILLENEUVE, D.; KIRWAN-RHUDE, A. & BUSCH, D. (1999) Carbon source-dependent regulation of cell growth by murine protein kinase C ϵ expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Physiol.*, **178**, 216-226.
- PARKER, P.J.; COUSSENS, L.; TOTTY, N.; RHEE, L.; YOUNG, S.; CHEN, E.; STABEL, S.; WATERFIELD, M.D. & ULLRICH, A. (1986) The complete primary structure of protein kinase C-the major phorbol ester receptor. *Science*, **233**, 853-859.
- PARKER, P.J.; KOUR, G.; MARAIS, R.M.; MITCHELL, F.; PEARS, C.; SCHAAP, D.; STABEL, S. & WEBSTER, C. (1989) Protein kinase C- α family affair. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **65**, 1-11.
- PARKER, P.J. (1992) Protein kinase C: a structurally related family of enzymes. In Protein kinase C: Current concepts and future perspectives. Eds. Epand, R.M. & Lester, D.S., Ellis Horwood, 3-24.
- PARKER, P.J. (1999) Inhibition of protein kinase C - do we, can we and should we? *Pharmacol. Ther.*, **82**, 263-267.
- PEREGO, P.; JIMENEZ, G.S.; GATTI, L.; HOWELL, S.B. & ZUNINO, F. (2000) Yeast mutants as a model system for identification of determinants of chemosensitivity. *Pharmacol. Rev.*, **52**, 477-491.
- PEREZ, P. & CALONGE, T.M. (2002) Yeast protein kinase C. *J. Biochem.*, **132**, 513-517.
- PERSONS, D.A.; WILKISON, W.O.; BELL, R.M. & FINN, O.J. (1988) Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity of NIH 3T3 fibroblasts transfected with protein kinase C-1 cDNA. *Cell*, **52**, 447-458.
- PETROS, A.M.; GAMPE, R.T. JR.; GEMMECKER, G.; NERI, P.; HOLZMAN, T.F.; EDALJI, R.; HOCHLOWSKI, J.; JACKSON, M.; MCALPINE, J.; LULY, J.R.; PRATT, P.-M.S. & FESIK, S.W. (1991) Substituted 2-(aminomethyl)piperidines: a novel class of selective protein kinase C inhibitors. *J. Med. Chem.*, **34**, 2928-2931.
- PINTO, M.M.M. & SOUSA, E.P. (2003) Natural and synthetic xanthonolignoids: chemistry and biological activities. *Curr. Med. Chem.*, **10**, 1-12.
- QUEST, A.F.; BARDES, E.S. & BELL, R.M. (1994) A phorbol ester binding domain of protein kinase C γ . Deletion analysis of the Cys2 domain defines a minimal 43-amino acid peptide. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2961-2970.
- RAYNOR, R.L.; ZHENG, B. & KUO, J.F. (1991) Membrane interactions of amphiphilic polypeptides mastoparan, melittin, polymyxin B and cardiotoxin. Differential inhibition of protein kinase C, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptosomal membrane Na, K-ATPase and Na⁺ pump and differentiation of HL60 cells. *J. Biol. Chem.*, **266**, 2753-2758.
- RIEDEL, H.; HANSEN, H.; PARISSENTI, A.M.; SU, L.; SHIEH, H.-L. & ZHU, J. (1993a) Phorbol ester activation of functional rat protein kinase C β -1 causes phenotype in yeast. *J. Cell. Biochem.*, **52**, 320-329.
- RIEDEL, H.; PARISSENTI, A.M.; HANSEN, H.; SU, L. & SHIEH, H.-L. (1993b) Stimulation of calcium uptake in *Saccharomyces cerevisiae* by bovine protein kinase C α . *J. Biol. Chem.*, **268**, 3456-3462.

- RIEDEL, H.; SU, L. & HANSEN, H. (1993c) Yeast phenotype classifies mammalian protein kinase C cDNA mutants. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4728-4735.
- ROIVAINEN, R. & MESSING, R.O. (1993) The phorbol derivatives thymeleatoxin and 12-deoxyphorbol-13-O-phenylacetate-10-acetate cause translocation and downregulation of multiple protein kinase C isozymes. *FEBS Lett.*, **319**, 31-34.
- ROMANOVA, L.Y.; ALEXANDROV, I.A.; SCHWAB, G.; HILBERT, D.M.; MUSHINSKI, J.F. & NORDAN, R.P. (1996) Mechanism of apoptosis suppression by phorbol ester in IL-6-starved murine plasmacytomas: role of PKC modulation and cell cycle. *Biochemistry*, **35**, 9900-9906.
- RON, D. & KAZANIETZ, M.G. (1999) New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.*, **13**, 1658-1676.
- ROTENBERG, S.A.; SMILEY, S.; UEFFING, M.; KRAUSS, R.S.; CHEN, L.B. & WEINSTEIN, I.B. (1990) Inhibition of rodent protein kinase C by the anticarcinoma agent dequalinium. *Cancer Res.*, **50**, 677-685.
- ROTENBERG, S.A.; HUANG, M.H.; ZHU, J.; SU, L. & RIEDEL, H. (1995) Deletion analysis of protein kinase C inhibition by calphostin C. *Mol. Carcinog.*, **12**, 42-49.
- ROTENBERG, S.A. & SUN, X. (1998) Photoinduced inactivation of protein kinase C by dequalinium identifies the RACK-1-binding domain as a recognition site. *J. Biol. Chem.*, **273**, 2390-2395.
- ROWLANDS, M.G.; BUDWORTH, J.; JARMAN, M.; HARDCASTLE, I.R.; MCCAGUE, R. & GESCHER, A. (1995) Comparison between inhibition of protein kinase C and antagonism of calmodulin by tamoxifen analogues. *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 723-726.
- RÜEGG, U.T. & BURGESS, G.M. (1989) Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *TiPS*, **10**, 218-220.
- RYVES, W.J.; EVANS, A.T.; OLIVIER, A.R.; PARKER, P.J. & EVANS, F.J. (1991) Activation of the PKC-isotypes α , β_1 , γ , δ and ϵ by phorbol esters of different biological activities. *FEBS Lett.*, **288**, 5-9.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, Cold Spring Laboratory Press, New York.
- SASAKI, Y.; ASAOKA, Y. & NISHIZUKA, Y. (1993) Potentiation of diacylglycerol-induced activation of protein kinase C by lysophospholipids. Subspecies difference. *FEBS Lett.*, **320**, 47-51.
- SCHLESSINGER, J. (1988) The epidermal growth factor receptor as a multifunctional allosteric protein. *Biochemistry*, **27**, 3119-3123.
- SEYNAEVE, C.M.; KAZANIETZ, M.G.; BLUMBERG, P.M.; SAUSVILLE, A.E. & WORLAND, P. (1994) Differential inhibition of protein kinase C isozymes by UCN-01, a staurosporine analogue. *Mol. Pharmacol.*, **45**, 1207-1214.
- SHIEH, H.-L.; HANSEN, H.; ZHU, J. & RIEDEL, H. (1995) Differential protein kinase C ligand regulation detected *in vivo* by a phenotypic yeast assay. *Mol. Carcinog.*, **12**, 166-176.
- SHIEH, H.-L.; HANSEN, H.; ZHU, J. & RIEDEL, H. (1996) Activation of conventional mammalian protein kinase C isoforms expressed in budding yeast modulates the cell doubling time - a potential *in vivo* screen for protein kinase C activators. *Cancer Detect. Prev.*, **20**, 576-589.
- SHIRAI, Y. & SAITO, N. (2002) Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting. *J. Biochem.*, **132**, 663-668.

- SHOJI, M.; RAYNOR, R.L.; FLEER, E.A.; EIBL, H.; VOGLER, W.R. & KUO, J.F. (1991) Effects of hexadecylphosphocholine on protein kinase C and TPA-induced differentiation of HL60 cells. *Lipids*, **26**, 145-149.
- SIMON, A.J.; MILNER, Y.; SAVILLE, S.P.; DVIR, A.; MOCHLY-ROSEN, D. & ORR, E. (1991) The identification and purification of a mammalian-like protein kinase C in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **243**, 165-171.
- SIMON, A.J.; JAMIESON, L.; MACFARLANE, E.J.P.; SAVILLE, S.P.; MILNER, Y.; MOCHLY-ROSEN, D. & ORR, E. (1992) The cloning and partial sequence analysis of PKCII, the mammalian-like protein kinase C in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **8**, S387.
- SMUTZER, G. (2001) Yeast: an attractive, yet simple model. *The Scientist*, **24**, 15-18.
- SODEOKA, M.; ARAI, M.A.; ADACHI, K.; UOTSU, K. & SHIBASAKI, M. (1998) Rational design, synthesis and evaluation of a new type of PKC inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 457-458.
- SODERLING, T.R. (1990) Protein kinases. Regulation by autoinhibitory domains. *J. Biol. Chem.*, **265**, 1823-1826.
- SOLTOFF, S.P. (2001) Rottlerin is a mitochondrial uncoupler that decreases cellular ATP levels and indirectly blocks protein kinase C δ tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 37986-37992.
- SOUSA, E.P.; SILVA, A.M.S.; PINTO, M.M.M.; PEDRO, M.M.; CERQUEIRA, F.A.M. & NASCIMENTO, M.S.J. (2002) Isomeric kielcorins and dihydroxyxanthenes: synthesis, structure elucidation and inhibitory activities of growth of Human cancer cell lines and on the proliferation of Human lymphocytes *in vitro*. *Helv. Chim. Acta*, **85**, 2862-2876.
- STABEL, S. & PARKER, P.J. (1991) Protein kinase C. *Pharmacol. Ther.*, **51**, 71-95.
- STRONG, J.A.; FOX, A.P.; TSIEN, R.W. & KACZMAREK, L.K. (1987) Stimulation of protein kinase C recruits covert calcium channels in *Aplysia* bag cell neurons. *Nature*, **325**, 714-717.
- SU, L.; PARISENTI, A.M. & RIEDEL, H. (1993) Functional carboxyl terminal deletion map of protein kinase C α . *Receptors Channels*, **1**, 1-9.
- SULLIVAN, J.P.; CONNOR, J.R.; SHEARER, B.G. & BURCH, R.M. (1991) 2,6-Diamino-N-([1-oxotridecyl]-2-piperidinyl)methyl)hexanamide (NPC 15437): a selective inhibitor of protein kinase C. *Agents Actions*, **34**, 142-144.
- SULLIVAN, J.P.; CONNOR, J.R.; SHEARER, B.G. & BURCH, R.M. (1992) 2,6-Diamino-N-([1-(1-oxotridecyl)-2-piperidinyl]methyl)hexanamide (NPC 15437): a novel inhibitor of protein kinase C interacting at the regulatory domain. *Mol. Pharmacol.*, **41**, 38-44.
- SWANNIE, H.C. & KAYE, S.B. (2002) Protein kinase C inhibitors. *Curr. Oncol. Rep.*, **4**, 37-46.
- SZALLASI, Z.; SMITH, C.B.; PETTIT, G.R. & BLUMBERG, P.M. (1994) Differential regulation of protein kinase C isozymes by bryostatin 1 and phorbol 12-myristate 13-acetate in NIH 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2118-2124.
- TAKAHASHI, I.; KOBAYASHI, E.; ASANO, K.; YOSHIDA, M. & NAKANO, H. (1987) UCN-01, a selective inhibitor of protein kinase C from *Streptomyces*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **40**, 1782-1784.
- TAKAHASHI, I.; KOBAYASHI, E.; NAKANO, H.; MURAKATA, C.; SAITOH, H.; SUZUKI, K. & TAMAOKI, T. (1990) Potent selective inhibition of 7-O-methyl UCN-01 against protein kinase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **255**, 1218-1221.
- TAKAI, Y.; KISHIMOTO, A.; INOUE, M. & NISHIZUKA, Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, **252**, 7603-7609.

- TAKAI, Y.; KISHIMOTO, A.; IWASA, Y.; KAWAHARA, Y.; MORI, T. & NISHIZUKA, Y. (1979) Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.*, **254**, 3692-3695.
- TAMAOKI, T.; NOMOTO, H.; TAKAHASHI, I.; KATO, Y.; MORIMOTO, M. & TOMITA, F. (1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{++} dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 397-402.
- TAMAOKI, T. & NAKANO, H. (1990) Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. *Biotechnology*, **8**, 732-735.
- TANG, X.; NAKATA, Y.; LI, H.-O.; ZHANG, M.; GAO, H.; FUJITA, A.; SAKATSUME, O.; OHTA, T. & YOKOYAMA, K. (1994) The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 2857-2858.
- TOKER, A.; MEYER, M.; REDDY, K.K.; FALCK, J.R.; ANEJA, R.; ANEJA, S.; PARRA, A.; BURNS, D.; BALLAS, L.M. & CANTLY, L.C. (1994) Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J. Biol. Chem.*, **269**, 32358-32367.
- TOULLEC, D.; PIANETTI, P.; COSTE, H.; BELLEVERGUE, P.; GRAND-PERRET, T.; AJAKANE, M.; BAUDET, V.; BOISSING, P.; BOURSIER, E.; LORIOLE, F.; DUHAMEL, L.; CHARON, D. & KIRILOVSKY, J. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **266**, 15771-15781.
- ÜBERALL, F.; OBERHUBER, H.; MALY, K.; ZAKNUN, J.; DEMUTH, L. & GRUNICKE, H.H. (1991) Hexadecylphosphocholine inhibits inositol phosphate formation and protein kinase C activity. *Cancer Res.*, **51**, 807-812.
- VALVERDE, A.M.; SINNETT-SMITH, J.; VAN LINT, J. & ROZENGURT, E. (1994) Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8572-8576.
- WANG, Q.J.; BHATTACHARYYA, D.; GARFIELD, S.; NACRO, K.; MARQUEZ, V.E. & BLUMBERG, P.M. (1999a) Differential localization of protein kinase C δ by phorbol esters and related compounds using a fusion protein with green fluorescent protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 37233-37239.
- WANG, S.; LIU, M.; LEWIN, N.E.; LORENZO, P.S.; BHATTACHARYYA, D.; QIAO, L.; KOZIKOWSKI, A.P. & BLUMBERG, P.M. (1999b) Probing the binding of indolactam-V to protein kinase C through site-directed mutagenesis and computational docking simulations. *J. Med. Chem.*, **42**, 3436-3446.
- WATANABE, T.; ONO, Y.; TANIYAMA, Y.; HAZAMA, K.; IGARASHI, K.; OGITA, K.; KIKKAWA, U. & NISHIZUKA, Y. (1992) Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C- δ subspecies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10159-10163.
- WATTERS, D.J. & PARSONS, P.G. (1999) Critical targets of protein kinase C in differentiation of tumour cells. *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 383-388.
- WAY, K.J.; CHOU, E. & KING, G.L. (2000) Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *TiPS*, **21**, 181-187.
- WAYS, D.K.; COOK, P.P.; WEBSTER, C. & PARKER, P.J. (1992) Effect of phorbol esters on protein kinase C- ζ . *J. Biol. Chem.*, **267**, 4799-4805.
- WEBB, B.L.J.; HIRST, S.J. & GIEMBYCZ, M.A. (2000) Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 1433-1452.

- WENDER, P.A.; KOEHLER, K.F.; SHARKEY, N.A.; DELL'AQUILA, M.L. & BLUMBERG, P.M. (1986) Analysis of the phorbol pharmacophore on PKC as a guide to the rational design of new classes of analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4214-4218.
- WESSEL, D. & FLUGGE, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.*, **138**, 141-143.
- WETSEL, W.C.; KHAN, W.A.; MERCHENTHALER, I.; RIVERA, H.; HALPERN, A.E.; PHUNG, H.M.; NEGRO-VILAR, A. & HANNUN, Y.A. (1992) Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J. Cell Biol.*, **117**, 121-133.
- WILKINSON, S.E.; PARKER, P.J. & NIXON, J.S. (1993) Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem. J.*, **294**, 335-337.
- WISE, B.C. & KUO, J.F. (1983) Modes of inhibition by acylcarnitines, adriamycin and trifluoperazine of cardiac phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase. *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 1259-1265.
- WOOTEN, M.W.; SEIBENHENER, M.L.; ZHOU, G.; VANDENPLAS, M.L. & TAN, T.H. (1999) Overexpression of atypical PKC in PC12 cells enhances NGF-responsiveness and survival through an NF-kappaB dependent pathway. *Cell Death Differ.*, **6**, 753-64.
- YAMADA, K.; IWAHASHI, K. & KASE, H. (1987) K252a, a new inhibitor of protein kinase C, concomitantly inhibits 40K protein phosphorylation and serotonin secretion in a phorbol ester-stimulated platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**, 35-40.
- YU, R.; MANDLEKAR, S.; TAN, T. & KONG, T. (2000) Activation of p38 and c-jun N-terminal kinase pathways and induction of apoptosis by chelerythrine do not require inhibition of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **275**, 9612-9619.
- ZHAO, F.K.; CHUANG, L.F.; ISREAL, M. & CHUANG, R.Y. (1989) Cremophor EL, a widely used parenteral vehicle, is a potent inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 1359-1367.
- ZHERELOVA, O.M. (1989) Protein kinase C is involved in regulation of Ca^{2+} channels in plasmalemma of *Nitella syncarpa*. *FEBS Lett.*, **242**, 330-332.
- ZHU, J.; HANSEN, H.; SU, L.; SHIEH, H.-L. & RIEDEL, H. (1994) Ligand regulation of bovine protein kinase C α response via either cysteine-rich repeat of conserved region C1. *J. Biochem.*, **115**, 1000-1009.
- ZIMMERMANN, J.; CARAVATTI, G.; METT, H.; MEYER, T.; MULLER, M.; LYDON, N.B. & FABBRO, D. (1996) Phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives: a new class of potent and selective inhibitors of protein kinase C (PKC). *Arch. Pharm.*, **329**, 371-376.

