

## Tesis de Posgrado

# Adenilato ciclasa en neurospora crassa : Aislamiento, purificación, propiedades y regulación

Flawiá, Mirtha María

1972

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Flawiá, Mirtha María. (1972). Adenilato ciclasa en neurospora crassa : Aislamiento, purificación, propiedades y regulación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1418\\_Flawia.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1418_Flawia.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Flawiá, Mirtha María. "Adenilato ciclasa en neurospora crassa : Aislamiento, purificación, propiedades y regulación". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1972. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1418\\_Flawia.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1418_Flawia.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"ADENILATO CICLASA EN NEUROSPORA CRASSA  
 AISLAMIENTO, PURIFICACION, PROPIEDADES Y REGULACION"

Autor: Mirtha María Flawiá

Director: Dr. Héctor N. Torres

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones  
Bioquímicas-Fundación Campomar

1418<sup>==</sup>

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR  
ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA

## AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Héctor N. Torres, sin cuya constante guía y apoyo no hubiera podido realizar este trabajo. Con él se discutieron y a él pertenecen los aportes más valiosos de esta tesis.

A los Doctores Luis F. Leloir y Carlos E. Cardini por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

A los Doctores José M. Olavarría y Porrúa, Otto G. Gödeken y a las autoridades de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán quienes posibilitaron mi ingreso al Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

Al Doctor Héctor Terenzi por su ayuda y consejos en el comienzo de esta investigación.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Eduardo Miguel De Robertis, Estela Surian, Norberto Judewicz, Patricia Leoni, Pedro Ezcurra, Plácido Pucci, Juana Tandecarz y Alfredo Vallota, por su colaboración y afectuoso estímulo.

A los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas por su cooperación y críticas.

A los Doctores María T. Tellez-Iñón, César A. Chelala y Clara R. Krisman por su constante apoyo.

A Margarita Mazzardi por su abnegada colaboración.

A los míos

## INDICE

	<u>Pág.</u>
Abreviaturas	1
<u>INTRODUCCION</u>	
Consideraciones generales	2
3',5' Adenosina monofosfato cíclico	4
Adenilato ciclasa	7
Papel del AMP cíclico en el metabolismo celular	29
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	
I- <u>Reactivos y Enzimas</u>	45
II- <u>Preparación del ATP-<math>\alpha</math>-P<sub>32</sub></u>	46
III- <u>Preparación y Purificación de las Membranas</u>	
Cultivo de células	49
Preparación de la enzima Adenilato ciclasa	50
Purificación de las membranas	50
Preparaciones celulares para ensayos de Glucógeno sintetasa y Fosforilasa	51
Síntesis y aislamiento del Glucógeno	51
Transporte de Glucosa	52
IV- <u>Ensayo de Adenilato ciclasa y otras enzimas</u>	53
V- <u>Solubilización y Purificación de la enzima particulada</u>	55
VI- <u>Procedimientos Analíticos</u>	56

RESULTADOS

I- <u>Mutante "slime" de Neurospora crassa</u>	
Neurospora crassa	59
Estructura de la célula "slime"	60
Morfología del "slime" antes y después de la lisis	63
Estructura de la membrana	67
II- <u>Adenilato ciclasa</u>	
Localización	69
Solubilización	71
III- <u>Propiedades de la enzima</u>	
Autenticidad del producto de reacción	74
Requerimientos para la actividad enzimática	74
Modificadores de la Adenilato ciclasa	79
IV- <u>Cinética</u>	82
V- <u>Purificación y Peso Molecular</u>	102
IV- <u>Regulación Hormonal</u>	
Activación por Glucagón	113
Inhibición por Insulina	125
Cinética de la acción hormonal	133

DISCUSION

I- <u>Localización y Propiedades generales</u>	149
II- <u>Purificación y Peso Molecular</u>	151
III- <u>Cinética</u>	152
IV- <u>Regulación Hormonal</u>	154
V- <u>Modelo del mecanismo de control de la Adenilato ciclase</u>	158
<u>CONCLUSIONES</u>	161
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	166

## ABREVIATURAS

ATP	5' Adenosina trifosfato
ADP	5' Adenosina difosfato
AMP	5' Adenosina monofosfato
AMP cíclico	3',5' Adenosina monofosfato cíclico
GTP	5' Guanosina trifosfato
UDPG	5' Uridina difosfato glucosa
G-6-P	Glucosa-6-fosfato
PEP	Fosfo-enol-pirúvico
Pi	Fosfato inorgánico
PPi	Pirofosfato
Tris	Tris-(Hidroximetil)-amino metano
DNA	Acido desoxiribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
CAP	Cyclic Activator Protein
IPTG	Isopropil-( $\beta$ -D-tiogalactósido
PGE <sub>1</sub>	Prostaglandina E <sub>1</sub>
ACTH	Adrenocorticotrofina
DEAE	Dietil-amino-etil-celulosa
Pipes	Piperazina-N-N'-bis-etano sulfonato de sodio
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
TSH	Tirotrofina
STH	Somatotrofina
GMP cíclico	3',5' Guanosina monofosfato cíclico
ATPasa	Adenosina trifosfatasa
PK	Piruvato quinasa
P.M.	Peso molecular
pmoles	pico moles
nmoles	nano moles



## INTRODUCCION

### Consideraciones generales.

Tanto los organismos unicelulares como los seres superiores están constituidos, fundamentalmente, por macromoléculas.

Polisacáridos, proteínas y lípidos representan para estos sistemas vivientes los basamentos estructurales, las sustancias de reserva y las fuentes de energía. Los ácidos nucleicos les permiten conservar los caracteres propios de la especie, a través de la información genética. Hormonas y vitaminas controlan crecimiento, reproducción, metabolismo y diferenciación.

Una característica propia de los seres vivos radica en la forma extraordinariamente ordenada con que desempeñan sus múltiples funciones en base a una serie de reacciones químicas, controladas por variados tipos de mecanismos, que dirigen y coordinan las distintas formas de expresión biológica. Por supuesto, cuanto más complejo sea el organismo, mayor ha de ser el número y la variedad de formas que exhiben dichos mecanismos.

Considerables progresos se han hecho en los últimos años en el estudio de los procesos de control del metabolismo celular. Se ha establecido claramente que organismos tan simples como las bacterias poseen intrincados sistemas regulatorios que encauzan los distintos intercambios de materia y energía. En algunos casos, ha sido posible develar la forma en que se desenvuelve el

mecanismo de regulación, al haberse determinado la existencia de una interacción elemental de control constituida por una enzima, proteína de actividad biológica específica y de un agente activo, generalmente un metabolito de bajo peso molecular.

En los organismos diferenciados, a un nivel de complejidad mucho mayor, existen actividades controladas por sistemas con capacidad de decidir entre varias posibilidades y elegir la más correcta. Tal es el caso del sistema nervioso en el mantenimiento de la homeostasis, en la coordinación tisular y en la secreción hormonal.

Hasta el presente, es prácticamente imposible interpretar estos complicados mecanismos de control a nivel molecular. Considerando, sin embargo, que todas las estructuras implicadas en la actividad biológica son básicamente similares, posiblemente la regulación de las mismas se haga por mecanismos comunes.

Quizás, la aparentemente simple forma de control:

metabolito regulador-enzima

sea la fórmula básica y universal de una compleja y correcta política celular.

### 3',5' Adenosina monofosfato cíclico

El 3',5'Adenosina monofosfato cíclico, llamado comunmente AMP cíclico es una molécula pequeña que cumple importantes funciones como metabolito regulador, tanto en bacterias como en organismos superiores. No solamente sus funciones son de control a nivel de actividad enzimática sino también a nivel genético.

Los primeros experimentos que llevaron al descubrimiento del AMP cíclico fueron exitosamente realizados por el grupo de E.W. Sutherland en 1957, al estudiar las ya conocidas funciones de la adrenalina, en la degradación del glucógeno y aumento de la glucemia (1-4).

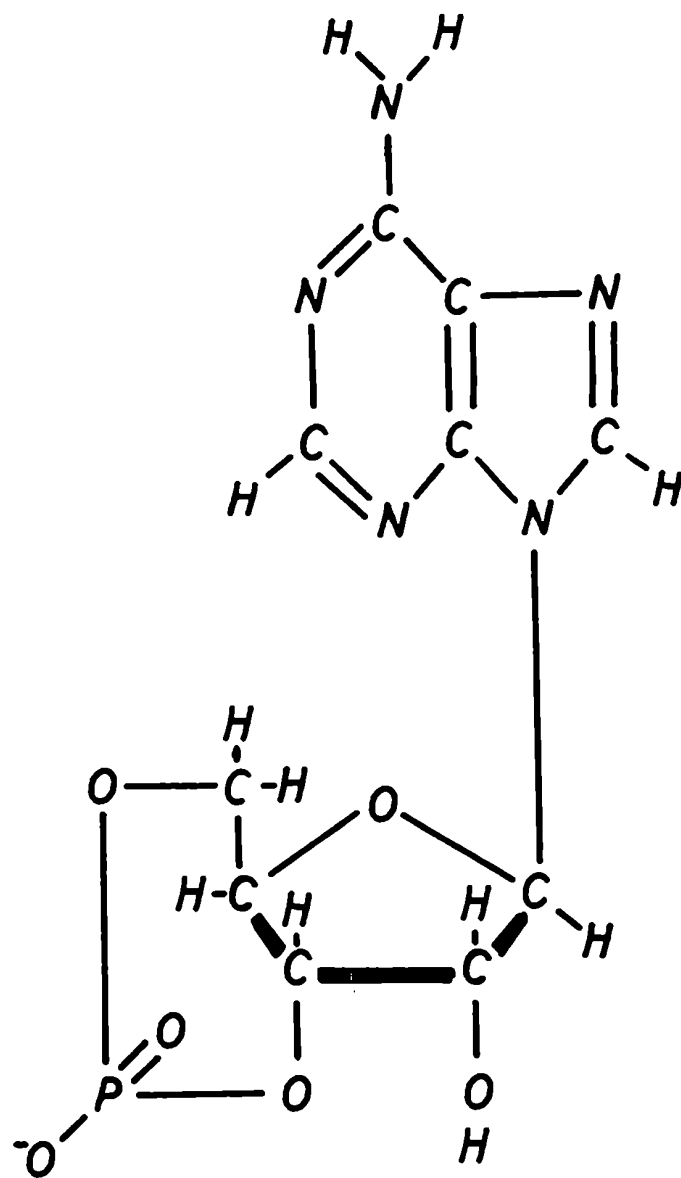
Utilizaron homogenatos de hígado de perro, em los cuales la concentración de fosforilasa de glucógeno activa (E.C. 2.4.1.1 :  $\alpha$ 1,4-glucán-ortofosfato glucosil transferasa) (5,6) representa un balance entre su inactivación por la fosforilasa fosfatasa (fosforilasa fosfohidrolasa, E.C.1.3.1.7) (7,8) y su fosforilación por la fosforilasa b quinasa (ATP: fosforilasa fosfotransferasa E.C. 2.7.1.38) (9). Describieron, que en presencia de adrenalina o glucagón, se producía un aumento de la fosforilasa a (activa) con la subsiguiente degradación del glucógeno. Este proceso se realizaba en dos etapas: a) formación de un factor activo en presencia de hormonas, en la fracción particulada y b) estimulación de la fosforilasa por este factor en la fracción sobrenadante del homogenato, en el cual las hormonas por sí mismas, no tenían efecto.

Aislaron este factor activo, lo purificaron a través de columnas de intercambio iónico, estudiaron sus propiedades, efectos biológicos y distribución.

Sutherland y su grupo determinaron la estructura química del compuesto aislado, caracterizándola como una adenosina diesterificada en sus posiciones 3' y 5' por un solo grupo fosfato. Este compuesto fue idéntico al ácido adenílico cíclico estudiado por Cook, Lipkin y Markham (11) y obtenido por digestión alcalina del ATP con hidróxido de bario.

Esta, comparativamente, pequeña molécula es llamada segundo mensajero entre las hormonas y sus efectos en el interior de la célula. Es un compuesto termoestable, dializable que se encuentra intracelularmente en concentraciones mil veces menores a las del ATP. Es muy resistente a la inactivación por ácidos y por álcalis. Tiene su máximo de absorción a 256 mμ.

La presencia del AMP cíclico fue descripta en una gran variedad de seres vivientes, desde bacterias hasta el hombre y está presente en casi todos los diferentes tipos celulares. Cumple funciones de regulación en la mayor parte de los caminos metabólicos, controlando la velocidad de síntesis y degradación de las macromoléculas.

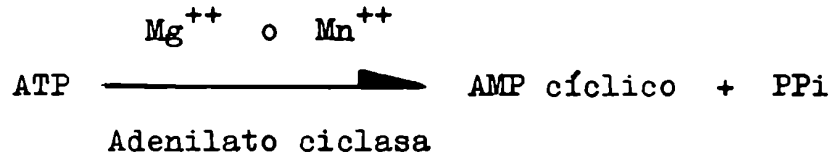


3',5' ADENOSINA MONOFOSFATO CICLICO

## Adenilato ciclasa

### 1- Aislamiento

Adenilato ciclasa es la enzima que cataliza la formación de AMP cíclico y pirofosfato a partir de ATP y  $Mg^{++}$  o  $Mn^{++}$ .



Fue descrita por primera vez por Sutherland y colaboradores en 1962 (13,14). Se utilizó como fuente de enzima una fracción particulada de homogenato de hígado de perro. Utilizando ATP-8-C<sub>14</sub> como sustrato, aislaron el AMP-C<sub>14</sub> cíclico formado a través de columnas de Dowex 2-X8 y posterior recromatografía en columnas de Dowex 50 X8; eluyendo en ambos casos con HCl 0.05 N.

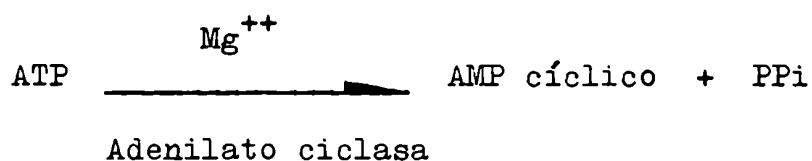
La enzima aislada de hígado era bastante estable a 2°C y actuaba óptimamente en un rango de pH entre 7.2 y 8.2. Utiliza como co-sustrato al catión Mg y es activada por el F<sup>-</sup> a una concentración de 10 mM (15). El  $Mn^{++}$  puede reemplazar al  $Mg^{++}$  en ciertas preparaciones mientras que el  $Co^{++}$  y  $Ca^{++}$  no son sustratos para esta enzima. Es inhibida en un 80 % por el  $Zn^{++}$ .

Al ser tratada la fracción particulada con Tritón 1.8% (detergente no-iónico) se perdía actividad en esta fracción recuperándose en el sobrenadante. La fracción particulada no correspondía a mitocondrias o microsomas pero podría tratarse de membranas plasmáticas o núcleos.

## 2- Equilibrio de la reacción

A partir de una preparación parcialmente purificada de enzima de Brevibacterium liquefaciens, Colowick y colaboradores (35, 36) estudiaron el equilibrio de la reacción. La ventaja de este sistema radica en que la adenilato ciclasa de B. liquefaciens es soluble y por lo tanto fácilmente purificable.

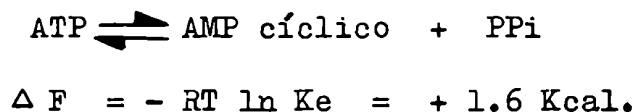
La reacción:



se considera termodinámicamente reversible, con una constante de equilibrio de 0.08M. Utilizando AMP cíclico 10 mM, PPi 10 mM , grandes concentraciones de enzima, largos tiempos de incubación (10 a 20 horas) a pH 7.3, 25°C y a una concentración de  $\text{Mg}^{++}$  libre de  $10^{-3}$  M (p.Mg = 3, calculada en base a las constantes de disociación de los complejos del  $\text{Mg}^{++}$  con ATP y PPi) (37), obtenemos una constante de equilibrio de :

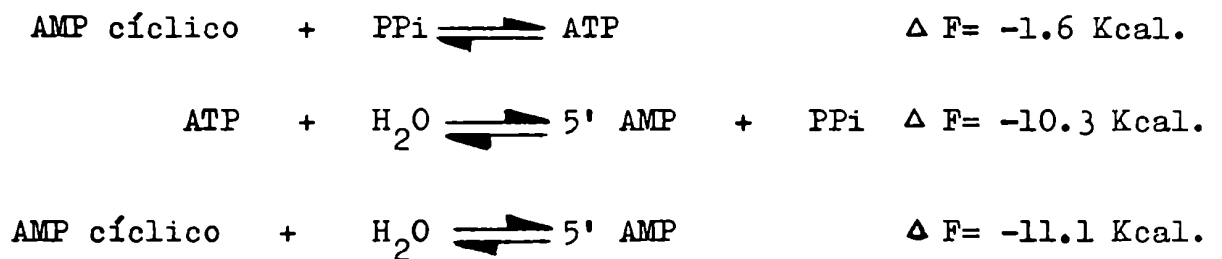
$$K_e = \frac{[\text{AMP cíclico}][\text{PPi}]}{[\text{ATP}]} = 0.08 \text{ M}$$

A partir de la  $K_e$  podemos calcular la energía libre de la reacción.



Es una reacción endergónica, donde el equilibrio tiende a desplazarse hacia la síntesis de ATP.

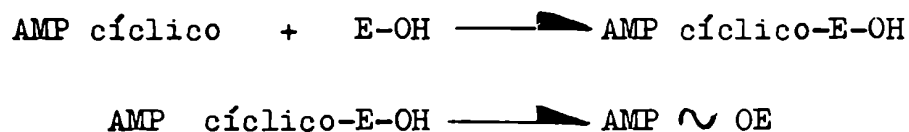
El enlace 3' P del AMP cíclico representa una unión de alta energía. De acuerdo a las siguientes ecuaciones:



El AMP cíclico nos muestra una energía libre de hidrólisis sorprendentemente alta.

Confirmada por las mediciones de entropía ( $\Delta H$ ) de la reacción  $\Delta H = -14,1$ . Los valores de entropía  $T\Delta S$  son de  $-2.2$  Kcal.

Esta alta energía libre de hidrólisis es utilizada por la célula para catalizar la unión del AMP cíclico a proteínas específicas con una gran afinidad de "binding" por el nucleótido.



en reacciones de adenililación.

Como vemos, termodinámicamente, la reacción catalizada por la adenilato ciclasa se produce en el sentido de la síntesis del ATP.



Desde el punto de vista fisiológico es prácticamente imposible que se sintetice ATP a partir de AMP cíclico y P<sub>Pi</sub>, por dos razones fundamentales:

a) La concentración de ATP intracelular ( $2.5 \times 10^{-3} \text{M}$ ), es mil veces superior a la del AMP cíclico ( $10^{-6}$  a  $10^{-8} \text{M}$ ). Estos bajos niveles de AMP cíclico hacen que la reacción nunca se produzca en el sentido de la síntesis de ATP.

b) El AMP cíclico formado es rápidamente utilizado por la célula en numerosas reacciones de los distintos caminos metabólicos. La pirofosfatasa inorgánica destruye rápidamente al pirofosfato formado. Por lo tanto, al ser utilizados los productos de reacción, el equilibrio tiende a desplazarse en el sentido de la síntesis de los mismos.

### 3- Distribución y localización

Posteriormente al descubrimiento de Sutherland, numerosos grupos de investigadores detectaron actividad enzimática en bacterias (16,17), plantas (18,19) y animales (19,20).

En mamíferos se encontró en todos los tejidos ensayados, con excepción de eritrocitos caninos (13) y una cepa de hepatoma de rata (21).

Generalmente se encuentra localizada en la fracción particulada correspondiente a membranas plasmáticas, tal es el caso del hepatocito (22), células grasas (23,24), eritrocitos de aves (25), riñón de mamíferos (26), huevos de erizo de mar ( 27 ).

Menos frecuentemente es una forma mitocondrial encontrada en corteza cerebral (28), músculo esquelético de conejo (29), testículos de perro (30) y espermatozoides de caracol (31).

En células grasas (32) y en retículo sarcoplasmático de corazón (33) se encontró actividad enzimática asociada al retículo endoplasmático.

También se describió una adenilato ciclasa soluble en Brevibacterium liquefaciens (34) y una forma parcialmente soluble en Escherichia coli (17).

#### 4- Propiedades

Dijimos anteriormente que la mayor parte de las adenilato ciclasas conocidas se encuentran asociadas a la fracción particulada correspondiente a membranas plasmáticas.

Las actividades específicas más altas para esta enzima fueron encontradas en tumor adrenal de ratón (39) y en corteza cerebral de perros (13).

Son muy pocas las evidencias acerca del comportamiento cinético basal de esta enzima, casi todos los estudios se refieren a efectos hormonales.

Rodbell, Birnbaumer y colaboradores estudiaron exhaustivamente la adenilato ciclasa de células grasas (40,41). Utilizaron como preparados enzimáticos, "ghosts" o sacos vacíos de membranas plasmáticas de células grasas, obtenidas de tejido epididimal de ratas. Es una enzima bastante inestable, tanto a 0° como a 37°, se inactiva por tripsina; tiene como sustrato al ATP y al  $Mg^{++}$  como catión divalente. Este último puede ser reemplazado por el  $Mn^{++}$ , no así por el  $Ca^{++}$  que inhibe su actividad. El ATP libre es un inhibidor de la reacción. Su pH óptimo es 7.4.

Cinéticamente se puede inferir, que su comportamiento es el de una enzima alostérica. Tiene un sitio catalítico al que se une el sustrato ATP- $Mg^{++}$  y un sitio regulatorio con gran afinidad por el  $Mg^{++}$  libre. Gráficos de Hill para el  $Mg^{++}$  nos dan un n de aproximadamente 2. El  $K_m$  para el ATP oscila entre 0.25 y 0.50 mM.

La enzima es activada entre 5 y 6 veces por el  $F^-$ , este anión incrementa la afinidad de la ciclasa por el  $Mg^{++}$ , pero no modifica su  $K_m$  para el ATP. Las hormonas presentan el mismo efecto sobre este sitio.

La enzima aislada de membrana plasmática de músculo esquelético (42) manifiesta el mismo comportamiento en cuanto a sustrato, catión divalente,  $K_m$  para el ATP y activación por  $F^-$ . Cinéticamente se lo clasificó como un sistema alostérico "V" dado que el catión y el  $F^-$  aumentan la velocidad máxima de la reacción enzimática.

Uno de los efectos más discutidos es el del  $F^-$  como activador. Con excepción de la adenilato ciclasa de Brevibacterium liquefaciens(43), la mayoría de las adenilatos ciclasas descriptas hasta el momento , incluida la de Escherichia coli, se activan por el  $F^-$ . En concentraciones entre 5 y 10 mM de  $F^-$  se incrementa la actividad enzimática de 3 a 8 veces en homogenatos de células, más de 10 veces en preparaciones de tumor adrenal de ratón (39) o en preparaciones de músculo cardíaco tratado con detergentes (44). En eritrocitos de rana, la actividad depende de la presencia de  $F^-$  en la reacción (45) este ión incrementa 20 veces la formación de AMP cíclico.

Inicialmente se pensó que el  $F^-$  activaba protegiendo al ATP durante el curso de la reacción. Sin embargo, esto no explicaba el hecho bastante conocido, de que en presencia de  $F^-$  no se tiene estimulación hormonal (La única excepción es la ciclasa de glándula pineal de rata, estimulada por adrenalina, en presencia de  $F^-$ ) (46). Por otra parte, se observó, que no disminuía el efecto activador del  $F^-$  en presencia de un sistema regenerante de ATP(40). Finalmente, inhibiendo la actividad ATPasa con iones  $Ni^{++}$  en membranas de eritrocitos de rana (45), no se observó ningún efecto sobre la actividad de la ciclasa.

El  $F^-$  no afecta el  $K_m$  de la enzima con respecto al ATP y por si solo no es activador, necesita al catión divalente para actuar. Posiblemente se forme un complejo "metalo-fluoruro" con el componente del sistema encargado de regular la actividad adenilato ciclasa (40). La acción del  $F^-$  con respecto a otros activadores hormonales, es "no competitiva" indicando que actúan en sitios separados del sistema.

El pirofosfato inorgánico (0.5 mM) inhibe en forma no competitiva la respuesta enzimática al  $F^-$  pero no modifica la acción hormonal. El  $Na^+$  actúa en forma inversa, modifica la acción hormonal pero no el efecto del  $F^-$ . Los detergentes, que solubilizan a la enzima de la membrana, no modifican el efecto activador del  $F^-$  (47). Como vemos, aún sigue sin dilucidarse su acción. Posiblemente, mediante interacciones cooperativas con los componentes del sitio catalítico de la enzima, ejerza su acción.

En Escherichia coli el GMP cíclico, lo mismo que el PEP, activan a la enzima a altas concentraciones.

##### 5- Inhibidores de la adenilato ciclasa

Los cationes divalentes,  $Ca^{++}$ ,  $Ba^{++}$  y  $Zn^{++}$  inhiben a la enzima. Aloxano, a concentraciones de 1 mM, inhibe la actividad enzimática en un 85 % en preparaciones de hígado de rata, músculo cardíaco, riñón y cerebro (48).

Algunas purinas inhiben las preparaciones enzimáticas. La ciclasa de tumor adrenal es inhibida por deoxiATP (39), este nucleótido inactiva también la ciclasa de eritrocitos de rana (45); el GTP inhibe la ciclasa de Brevibacterium liquefaciens, pero no tiene efecto en preparaciones de riñón, adrenales (49) o tumor

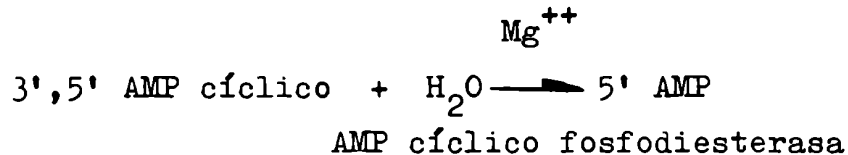
adrenal (39). En este último caso el 5' AMP y el ADP en concentraciones de 3.5 mM tienen algún efecto inhibitorio.

En Escherichia coli la enzima es inhibida por altas concentraciones de piridoxal fosfato, oxaloacetato y malato (50).

#### 6- 3',5' AMP cíclico fosfodiesterasa

El único mecanismo fisiológico conocido de degradación del AMP cíclico, está catalizado por la 3',5' fosfodiesterasa del AMP cíclico.

La enzima cataliza específicamente la ruptura de la unión 3',5' fosfodiester y transforma al AMP cíclico en 5' AMP.



El 5' AMP es el único producto formado en la reacción.

Esta enzima fue descripta en 1958 por Sutherland (4) quien posteriormente la purificó y estudió sus propiedades (51). Se la encontró en numerosos tejidos, especies y tipos celulares (51, 52). Podemos decir que su distribución es paralela a la de la adenilato ciclasa, sin embargo, mientras la localización de ésta última está asociada a membranas, la AMP cíclico fosfodiesterasa

se puede ubicar tanto en la fracción particulada como en la soluble (52,53,28). Tal es el caso, por ejemplo, de la enzima extraída de cerebro y corazón (51). Totalmente localizada en la fracción soluble se encuentra la AMP cíclico fosfodiesterasa de hígado (54). De Robertis describió en la fracción de corteza cerebral, rica en terminaciones nerviosas, una fosfodiesterasa localizada en la fracción soluble y en la microsomal (28).

En cuanto a sus propiedades, podemos decir, que su actividad es dependiente del catión  $Mg^{++}$ . Generalmente se activan por imidazol. Cheung comunicó un efecto activador sobre la fosfodiesterasa de cerebro bovino ejercido por una proteína, estable al calor bajo pH y urea 8 M, que se encuentra presente en los extractos crudos de cerebro (55).

Con excepción de la fosfodiesterasa soluble de Escherichia coli (56) y de la segregada al medio por la ameba Dictyostelium discoideum (52), la mayoría de las fosfodiesterasas se inhiben por metilxantinas. El orden decreciente de eficiencia, como inhibidores, es el siguiente: teofilina, cafeína y teobromina.

Otras sustancias menos frecuentes como inhibidores son las bencil-isoquinonas, el alcaloide papaverina (57) y el ácido bromolisérgico (58).

## 7- Efectos hormonales

Podemos dividir la historia del AMP cíclico en tres etapas. Un primer período que involucra su descubrimiento, identificación y caracterización de la enzima que cataliza su formación (59). Un segundo período comprende los estudios realizados sobre la purificación, propiedades, mecanismos cinéticos y distribución de la adenilato ciclasa (60).

Quizás la etapa más importante, desde el punto de vista fisiológico y farmacológico, sea la tercera. En este período se intensificaron y completaron los estudios acerca de los efectos hormonales sobre la adenilato ciclasa (61,62).

La mayor importancia metabólica de la adenilato ciclasa radica, fundamentalmente, en el hecho de que su actividad puede ser regulada por acción de las hormonas.

Podemos recapitular los efectos hormonales en los siguientes puntos:

1- Las hormonas estimulan la adenilato ciclasa, en preparaciones apropiadas de células, en concentraciones fisiológicas.

2- Las hormonas incrementan la concentración intracelular de AMP cíclico hasta niveles, que a pesar de ser bajos, son lo suficientemente adecuados para producir una respuesta fisiológica.

3- Puede potenciarse el efecto hormonal (para incrementar la magnitud de la respuesta fisiológica, o aumentar la sensibilidad del tejido por la hormona) agregando a la preparación inhibidores de la AMP cíclico fosfodiesterasa.

4- El efecto fisiológico de las hormonas puede mimificarse por el agregado de AMP cíclico exógeno.



En la tabla I, detallamos las principales hormonas "primer mensajero" que interaccionan con la adenilato ciclasa, el tejido en el cual actúan y los efectos que producen en el metabolismo a través del AMP cíclico, "segundo mensajero".

TABLA I. Hormonas que modifican la concentración intracelular de AMP cíclico.

Hormona	Tejido	Respuesta principal
<u>Adrenalina</u>	Hígado	Glucogenolisis (59)
	Músculo	Glucogenolisis (59)
	Corazón	Efecto inotrópico (63)
	Glándula salival	Secreción de amilasa (64)
	Tejido adiposo	Lipólisis (65)
<u>Nor-adrenalina</u>	Sist. nervioso	Liberación de acetilcolina (66)
	Glándula pineal	Síntesis de melatoninas (67)
<u>Glucagón</u>	Hígado	Glucogenolisis (59)
	Tejido adiposo	Lipólisis (68)
<u>Adrenocorticotrofina</u>	Adrenales	Producción de esteroides (69)
		....

Tabla I- continuación ....

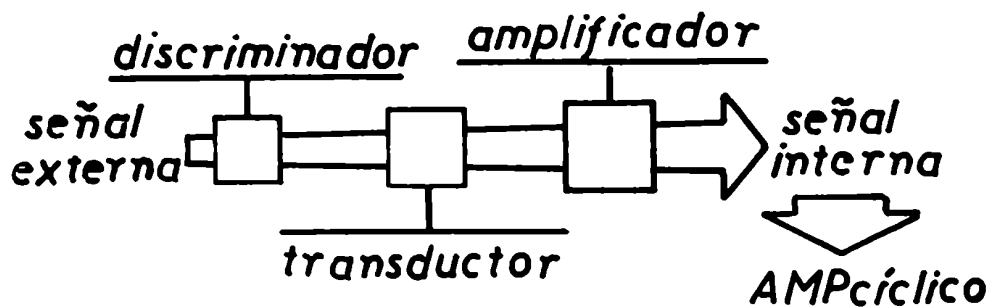
Hormona	Tejido	Respuesta principal
<u>Adrenocorticotrofina</u>	Tejido adiposo	Lipólisis (68)
<u>Tirotrofina</u>	Tiroides	Hidrólisis de la tiroglobulina (70)
		Ioduración (71)
		Oxidación de la glucosa (72)
<u>Hormona paratiroidea</u>	Corteza renal	Fosfaturia (73)
	Huesos	Reabsorción de calcio (73)
<u>Hormona luteinizante</u>	Cuerpo lúteo	Síntesis de esteroides (74)
<u>Vasopresina</u>	Médula renal	Reabsorción de agua (75)
<u>Tiroxina</u>	Corazón	Taquicardia (76)
<u>Prostaglandinas</u>	Hipófisis (77)	
	Tiroides (78)	
	Bazo (79)	
	Músculo esquelético (80)	
<u>Giberelinas</u>	Plantas y microorganismos (18,19)	

## 8- Receptores hormonales

El primer paso en la acción hormonal, es el "reconocimiento" de la hormona por la adenilato ciclasa y la posterior iniciación de la reacción a nivel de los sitios catalíticos de la enzima. Por lo tanto el "receptor hormonal" tiene dos propiedades fundamentales: 1) discriminar entre una hormona u otra y 2) iniciar una reacción o una serie secuencial de reacciones, que lleven a una modificación de la actividad adenilato ciclasa.

Por lo tanto, cada sistema enzimático deberá contener un componente sumamente "sensible" para detectar la hormona específica, llamado discriminador; un amplificador que transmite la "señal externa" dada por la hormona ( en concentraciones de  $10^{-12}$ - $10^{-8}$  M ) en una "señal interna" que aumente los niveles de AMP cíclico de  $10^{-8}$  M a  $10^{-3}$  M bajo ciertas condiciones. Por lo tanto, el sistema es capaz de transformar la señal externa hormonal (catecol-aminas u hormonas peptídicas) en una señal interna: AMP cíclico. Esta transferencia, requiere necesariamente, un tercer componente llamado transductor, que una al discriminador con el amplificador. El conjunto constituye la unidad de transferencia de información del sistema adenilato ciclasa.

Podemos representar esquemáticamente esta unidad, de acuerdo al modelo propuesto por Rodbell (81).



En células grasas, varias hormonas tienen efecto sobre la adenilato ciclasa: ACTH, glucagón, secretina, tirotrófina, hormona luteinizante aumentan los niveles de AMP cíclico en ghosts de células grasas y en membranas purificadas por el método de Neville (22,82). Pero estas hormonas también aumentan la actividad enzimática en sus correspondientes tejidos específicos: tiroides, cuerpo lúteo, corteza cerebral, etc., por consiguiente podemos pensar que el discriminador para cada hormona está unido covalentemente a su correspondiente amplificador en cada uno de los tipos celulares específicos.

No se observa aumento en la estimulación de la adenilato ciclasa cuando actúan dos o más hormonas en forma combinada; es decir, no se detectan "efectos aditivos". De acuerdo a estos resultados, podemos llegar a la siguiente conclusión: existen varios discriminadores hormonales acoplados a un amplificador común en el sistema de células grasas. Otro ejemplo de un amplificador regulado por varios discriminadores es la enzima de músculo cardíaco, estimulada por glucagón y adrenalina (83). El  $F^-$ , conocido activador de la mayoría de las adenilato ciclasas, tampoco afecta la acción hormonal en forma aditiva (40,84,85).

La especificidad del discriminador por cada hormona se demuestra por las distintas curvas que se obtienen de actividad de adenilato ciclasa en respuesta a diferentes hormonas. Por otra parte (84, 85), Hetcher (86) y colaboradores observaron que empleando como inhibidores análogos de la adrenalina o ACTH, desaparece el efecto de estas hormonas pero no el del glucagón, secretina o  $F^-$ .

En cuanto a la naturaleza del discriminador, podemos decir,

que el pretratamiento de los "ghosts" con tripsina destruye el efecto hormonal en el caso del glucagón, secretina o ACTH, sugiriendo que los receptores para estas hormonas están expuestos externamente a la acción de la enzima proteolítica. En el caso del  $F^-$  o adrenalina, los efectos se mantienen después de la proteólisis debido a que estos receptores son menos accesibles a la destrucción por tripsina.

El transductor es el componente del sistema encargado de comunicar, directa o indirectamente, los diferentes discriminadores específicos con el amplificador.

El pretratamiento de los "ghosts" con fosfolipasa C purificada(86) destruye la estimulación hormonal en células grasas. Esto nos indicaría que los fosfolípidos son esenciales para obtener una respuesta hormonal. Otra evidencia respecto al rol de los lípidos, la obtenemos de la acción de los detergentes, particularmente de los no-iónicos; el tratamiento con digitonina, reduce notablemente la respuesta del sistema al ACTH, glucagón o adrenalina, pero aumenta el efecto del  $F^-$  como activador.

Como disminuyen los efectos hormonales, por acción de los detergentes, es posible que la unión de los lípidos al discriminador involucre un tipo de interacción a través de los grupos polares de los fosfolípidos, o entre la región no-polar de los lípidos con los componentes hidrofóbicos de las distintas estructuras discriminadoras. Por lo tanto, modificaciones conformacionales de las proteínas o cambios en la fuerza iónica, podrían producir una alteración en la zona de unión con los lípidos o en el estado físico de los mismos.

Es necesario establecer claramente que en células animales, la adenilato ciclasa constituye un sistema complejo, integrado por distintos componentes macromoleculares susceptibles a ser modificados independientemente, permitiéndole al sistema distintos grados de regulación.

En la figura 1, se esquematiza, de acuerdo al modelo propuesto por Rodbell (81), la posible participación de los lípidos en el acoplamiento de discriminador, transductor y amplificador. Una estimulación en el sistema endocrino, produce la secreción hormonal, cada una de estas hormonas específicas tiene receptores adecuados en el sistema adenilato ciclasa. La unión de la hormona a la membrana produce una "señal externa" que se transmite a través del transductor hacia el sitio catalítico de la enzima donde el ATP, en presencia del  $Mg^{++}$ , es transformado en AMP cíclico, "señal interna" o segundo mensajero. Debido al aumento o a la disminución de la concentración intracelular de este nucleótido originan cambios metabólicos en respuesta a la acción hormonal.

Por lo tanto, las diferentes respuestas fisiológicas producidas como consecuencia de las distintas hormonas, se deben fundamentalmente a la modificación en la actividad de la adenilato ciclasa.

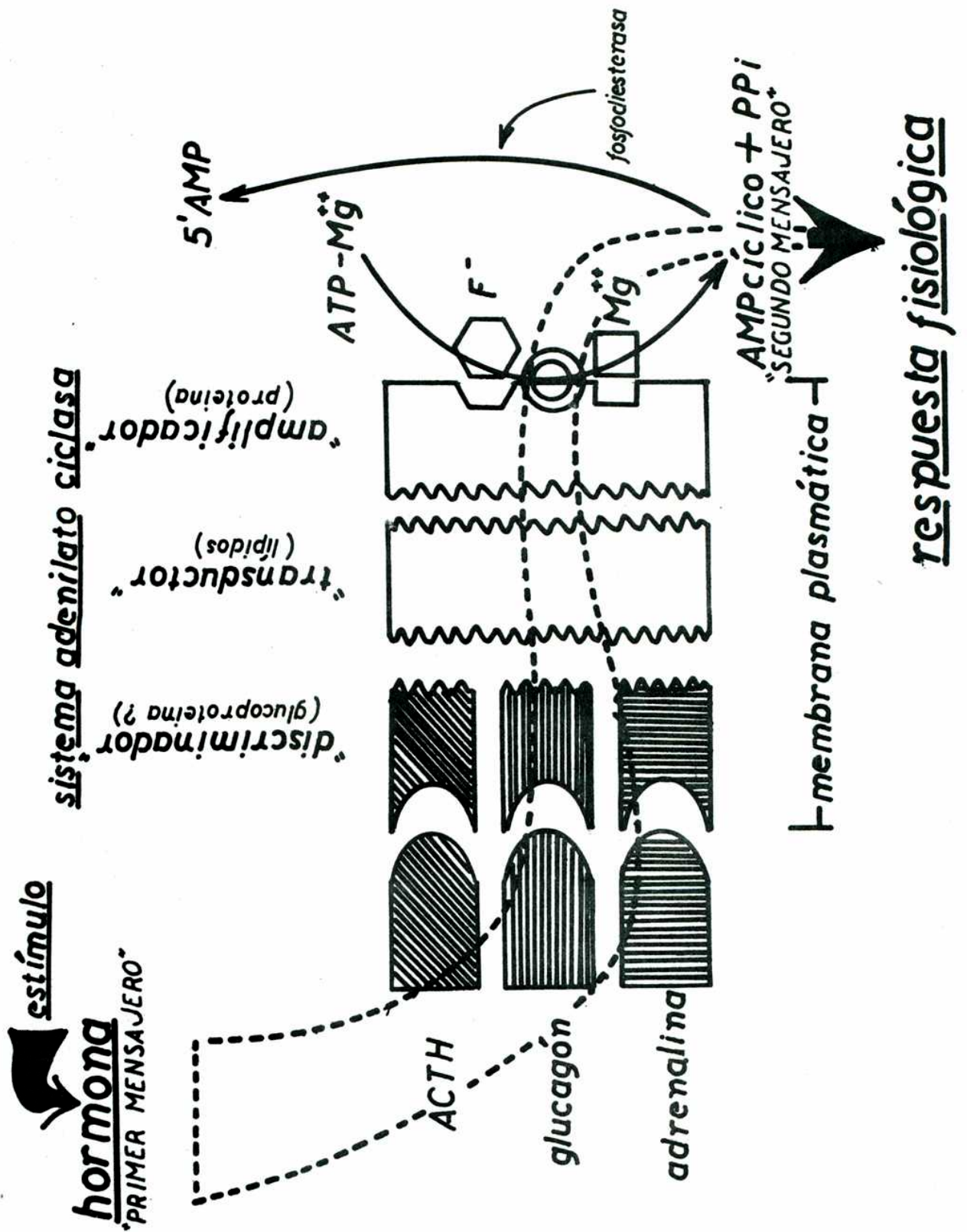


Figura 1- Modelo propuesto por Rodbell para el sistema de adenilato ciclasa.

Uno de los sistemas hormona-ciclusa más estudiados por Birbaumer, Rodbell y colaboradores, fue el del glucagón en células hepáticas(47,87-90).

Utilizaron membranas de hígado purificadas por el método de Neville (82). El glucagón en concentraciones de  $10^{-10}$  -  $10^{-7}$  M incrementa más de 10 veces la actividad enzimática, lo mismo que el  $F^-$ . La adrenalina solamente produce un 10% de la estimulación observada en presencia del glucagón. La urea en concentraciones de 0.4 M reduce notablemente la afinidad del sistema por el glucagón lo mismo que el tratamiento de las membranas con dodecil sulfato de sodio o fosfolipasa A.

Se estudió la unión ("binding") de la hormona a la enzima empleando glucagón  $I_{121}$  y se observaron los siguientes efectos:

a) la radiactividad pegada a membranas aumenta paralelamente al aumento de la actividad enzimática; b) el "binding" se reduce notablemente por el agregado de glucagón no marcado ; c) el "binding" no se altera por el agregado de ACTH, adrenalina o péptidos producidos por la degradación parcial del glucagón nativo, lo que nos está indicando la "especificidad" del discriminador.

Se determinó un número finito de sitios de unión del glucagón con el sistema ciclusa, en la membrana plasmática, estimado en 2.6 pmoles por mg de proteína de membrana. Estos sitios tienen las características de lipoproteínas y forma un tipo de asociación no-covalente con el glucagón.

Como el "binding" es temperatura dependiente y se modifica por el agregado de EDTA puede estar, también influenciado, por factores adicionales distintos de los factores intrínsecos entre la hormona y la enzima.



Uno de los efectos más notables del "binding" del glucagón es producido por los nucleótidos de guanina, GDP y GTP en concentraciones de 0.05 mM. Estimulan la respuesta de la adenilato ciclasa a la hormona, aumentan la velocidad y el grado de disociación del glucagón unido disminuyendo la aparente afinidad de los sitios de "binding".

No son conocidos los mecanismos por los cuales actúan. Se sabe que no requieren para su acción cationes divalentes o reacciones de fosforilación.

A bajas concentraciones, no producen una interacción competitiva con el glucagón por los sitios de "binding", indicando que los nucleótidos ejercerían un tipo de modificación alostérica en los sitios de unión de la hormona. La acción del GTP y GDP es inhibida por los reactivos de grupos sulfidrilos (p-Cl-mercuribenzoato) que también inhibe el "binding" con el glucagón, confirmando la posibilidad de que se trate de efectos alostéricos.

Los guanil nucleótidos inhiben la respuesta de la ciclasa al  $F^-$ , actuando en la misma concentración en que aumentan el efecto activador de la hormona.

Se unen a la membrana en sitios distintos a los del glucagón; desde allí cumplen un rol obligatorio y específico en la activación de la enzima por la hormona y posiblemente en los mecanismos de acción del  $F^-$  en ese sistema.

Birnbaumer (91) presentó nuevas evidencias que indican, que la activación de la ciclasa por el glucagón, en células hepáticas, es el resultado de dos procesos rápidos, uno inducido por la estimulación de la hormona, y el otro por el GTP o ATP.

La estimulación por el glucagón no persiste si se extrae la hormona del medio de incubación, o si se la desplaza por el agregado de un inhibidor competitivo (des-l-histidina glucagón) biológicamente inactivo. Estos datos indican, que la reacción del glucagón con su receptor, es reversible y que la proporción de la enzima estimulada depende continuamente de la concentración del glucagón libre en el medio. La acción simultánea de GTP o ATP y glucagón llevan a un incremento en la actividad adenilato ciclasa y permiten que tanto los receptores del glucagón como la enzima existan en rápidos y reversibles estados de actividad ( Figura 2 ).

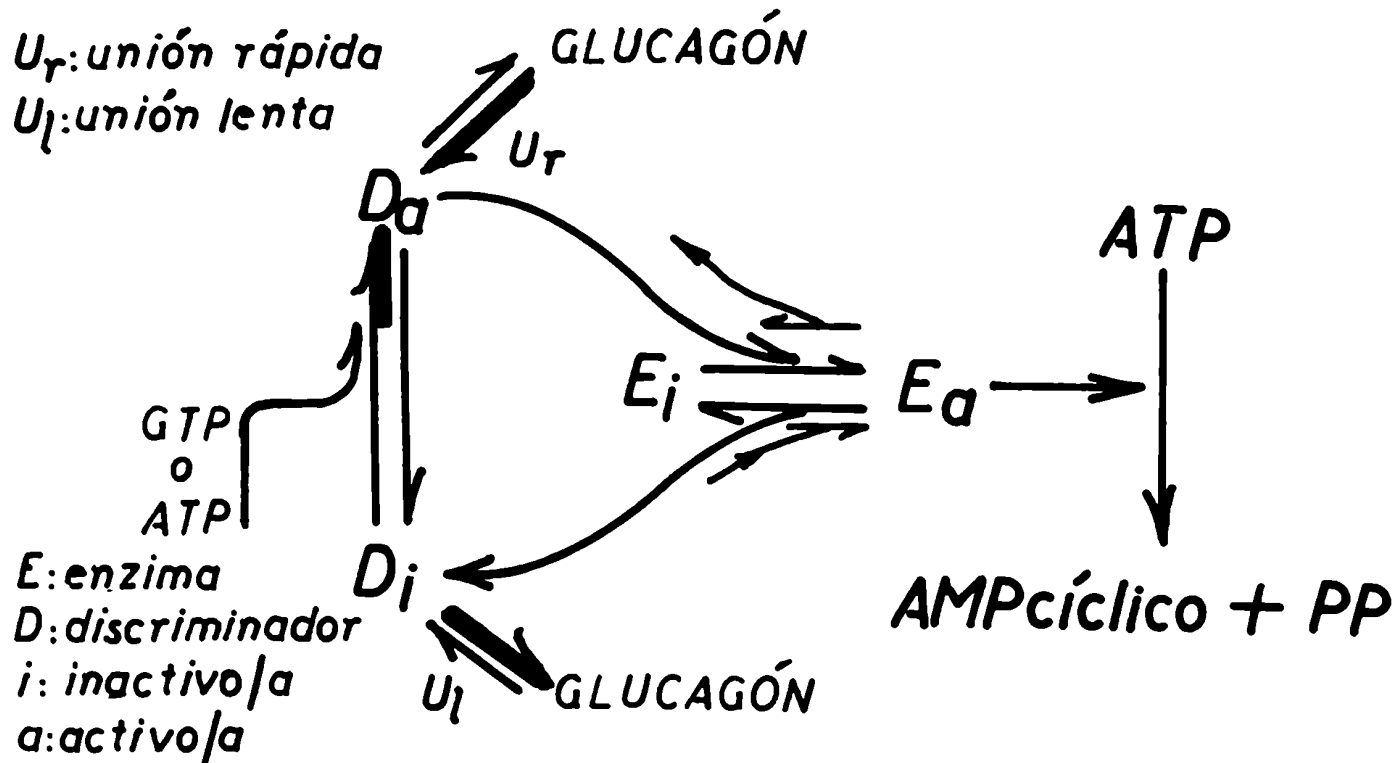


Figura 2.

Levey (100) solubilizó la adenilato ciclasa de músculo cardíaco por tratamiento con el detergente iónico Lubrol. Esta preparación soluble, no responde a la activación por adrenalina, posiblemente los receptores hayan sido inactivados o disociados en sus distintos componentes.

Trabajos de Cuatrecasas (93) demuestran que la insulina, en concentraciones de 10 y 100  $\mu$ unidades por ml, inhiben en un 33% el efecto activador del glucagón y de la adrenalina sobre la adenilato ciclasa de membranas de hígado. Este es el único efecto inhibitorio de esta hormona sobre la ciclasa, descrito hasta ahora.



El aumento producido por las hormonas, de la concentración intracelular de AMP cíclico, desplaza el equilibrio de la ecuación anterior hacia la formación de la subunidad C, que es la forma activa de la proteína quinasa.

Concomitantemente con la activación de las enzimas responsables de la degradación del glucógeno, se produce una modificación en la actividad de la glucógeno sintetasa (UDP-glucosa:  $\alpha$ -1-4 glucán- $\alpha$ -4- glucosil transferasa E.C. 241.11) (96). Esta enzima existe en dos formas: una forma fosforilada, inactiva (D) y una forma no fosforilada, activa (I). La misma proteína quinasa que cataliza la activación de la fosforilasa b quinasa, puede fosforilar la glucógeno sintetasa convirtiéndola en inactiva (97). In vitro, la forma D se activa sólo en presencia de glucosa-6-P, mientras que la I se independiente de glucosa-6-P.

Cuando la concentración intracelular de AMP cíclico disminuye se producen los mecanismos inversos: la desfosforilación de la fosforilasa y de la glucógeno sintetasa, catalizada por fosfatasas específicas. Estas fosfatasas también existen bajo dos formas: activa e inactiva. La interconversión de la forma inactiva a la activa es catalizada por el AMP cíclico a través de la proteína quinasa.

En la figura 3, presentamos un esquema general de lo dicho anteriormente.

## Papel del AMP cíclico en el metabolismo celular

### 1- A nivel de los hidratos de carbono

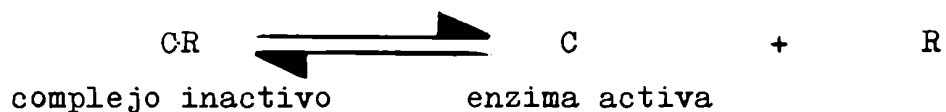
El AMP cíclico modula la actividad de numerosas enzimas y en su mayor parte los efectos fisiológicos del nucleótido se deben a su capacidad para transformar de:

activa  $\rightleftharpoons$  inactiva

en presencia de ATP y  $Mg^{++}$ , las enzimas claves de un determinado camino metabólico.

En el caso del metabolismo del glucógeno, la regulación de la glucogénesis y glucogenolisis, nos sirve de modelo para explicar la forma de acción del AMP cíclico.

El glucógeno, en su degradación, es hidrolizado a glucosa-1P por la enzima fosforilasa (5,6) la cual existe en el hígado y en el músculo bajo dos formas: fosforilasa a (activa) y b (inactiva). La fosforilasa b, es convertida en a por la fosforilasa b quinasa (9) la cual existe también bajo una forma activa y en otra inactiva. La fosforilasa b quinasa inactiva es activada por otra enzima, una proteína quinasa cuya actividad depende fundamentalmente de la presencia de AMP cíclico (94,95). La proteína quinasa tiene dos subunidades: catalítica (C) y regulatoria (R), las cuales pueden disociarse en presencia del AMP cíclico pasando de un estado activo a otro inactivo.



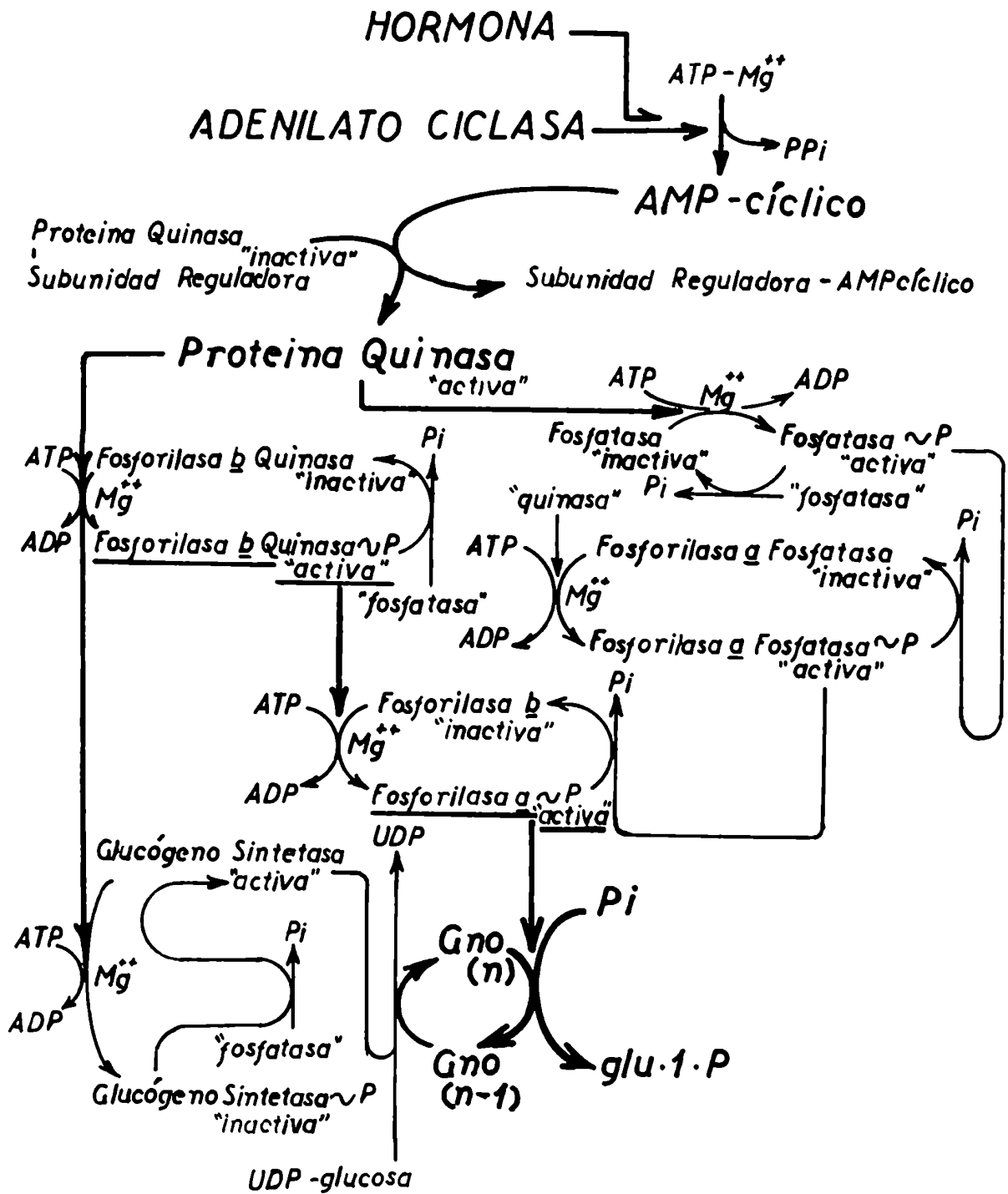


Figura 3-Regulación de la síntesis y degradación del glucógeno por el AMP cíclico.

## 2- Tejido adiposo

En el tejido adiposo la hidrólisis de los triglicéridos es catalizada por una lipasa. La actividad de esta proteína es incrementada por la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (99). Los pasos individuales aún no están aclarados. En la figura 4 presentamos un esquema de lo que se conoce hasta el momento acerca del rol del AMP cíclico en la lipólisis.

## 3- Fosforilación de histonas

Otra función importante de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico es la de fosforilar histonas, proteínas de carácter básico asociadas al DNA. La histona quinasa dependiente de AMP cíclico se aisló de varios tejidos en numerosas especies animales, fue purificada la de hígado y cerebro (101-103). Langam demostró que después de la administración de AMP cíclico o glucagón en ratas, se produce un aumento de la fosforilación de las fracciones  $f_1$  y  $f_2$  de las histonas (104,105).

Recientemente Jost y colaboradores (106) encontraron que el AMP cíclico aumenta la velocidad de síntesis del RNA en preparaciones purificadas de núcleos de hígado de rata, activando la RNA polimerasa ( $Mg^{++}$  y  $Mn^{++}$  dependientes). La fosforilación de proteínas no histónicas y de la fracción  $f_1$  de histonas precede, en todos los casos, al incremento de la síntesis del RNA.

En hígado, el AMP cíclico induce la síntesis de varias enzimas: tirosina transaminasa, PEP-carboxiquinasa y serina deshidrogenasa (107). En la inducción de la tirosina transaminasa, el AMP cíclico actúa a nivel traduccional. Como vemos, su intervención en la fosforilación de histonas, no está aún dilucidado.

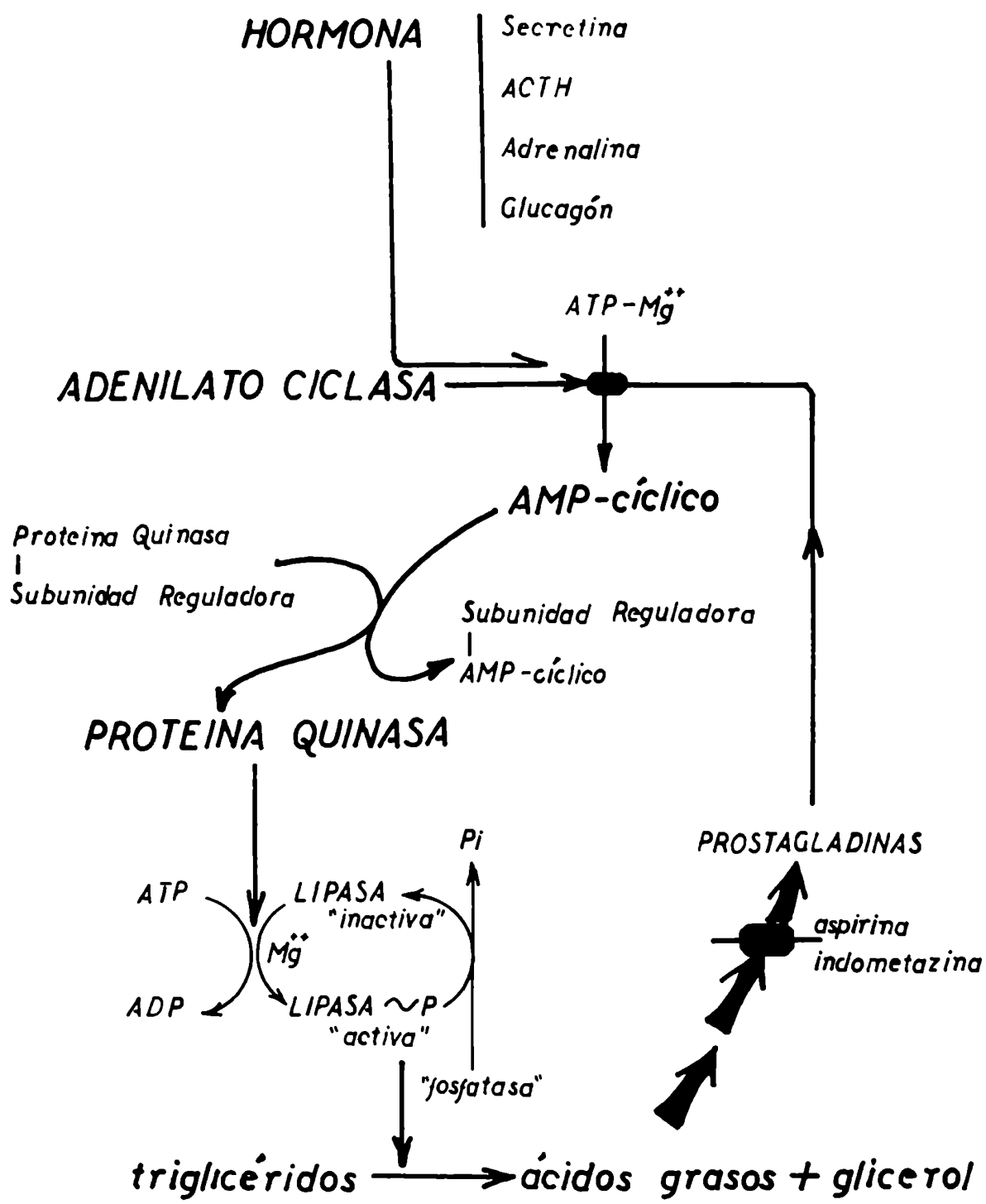


Figura 4- Rol del AMP cíclico en la lipólisis.



En médula adrenal , probablemente el AMP cíclico también actúe a nivel ribosómico. Su acción es bloqueada por la puromicina y la cicloheximida, pero no por la actinomicina D, sugiriendo que estimula la síntesis de alguna proteína requerida para la producción de esteroides. Garron y Gill (108) aislaron esta proteína con gran afinidad por el AMP cíclico, distinta de la proteína quinasa adrenal, y que podría regular la actividad de esta última(109).

#### 4- AMP cíclico en la transcripción genética.

Dijimos anteriormente que el AMP cíclico se describió , no solamente en animales superiores, sino también en bacterias, euglenas, levaduras y amebas. En la ameba Dictiostelium discoideum se lo identificó como la acrasina, "hormona" encargada de producir la agregación de los organismos para prepararse a la formación de esporas (110).

Solamente en Escherichia coli, se estudió detalladamente el papel del AMP cíclico y se aclaró su mecanismo de acción.

Durante varios años, diferentes grupos de investigadores, trataron de aclarar los procesos por el cual distintas cepas de E. coli creciendo en glucosa como fuente de carbono, producían menor cantidad de enzimas inducibles, que las mismas cepas creciendo en glicerol, lactato o succinato. Este fenómeno producido por la glucosa fue conocido como represión catabólica o represión metabólica.

En 1965 Makman y Sutherland (111) demostraron que en presencia de glucosa, la concentración intracelular de AMP cíclico es mucho menor, que las correspondientes bacterias crecidas en glicerol.

Determinaciones del nucleótido en el medio extracelular confirmaron los datos anteriores; en presencia de glucosa se produce una salida del 99% del AMP cíclico intracelular al medio de cultivo. Los resultados anteriores fueron confirmados por datos recientes de Peterkofky y Gazdar (112).

De estos experimentos surgió la hipótesis de que el AMP cíclico es necesario para la síntesis de  $\beta$  galactosidasa y otras enzimas inducibles; la glucosa reprime la síntesis de estas enzimas disminuyendo los niveles de AMP cíclico. Si se agrega el nucleótido a células que están creciendo en glucosa, se estimula fuertemente la síntesis de enzimas inducibles (113). Estas enzimas incluyen, además de  $\beta$  galactosidasa, galactoquinasa, triptofanasa, glicerolquinasa, glicerofosfatopermeasa, arabinosapermeasa, D-serina deaminasa y timidina fosforilasa. En estos sistemas, el AMP cíclico, no estimula la síntesis total de RNA ni la síntesis de enzimas biosintéticas o "no-represibles", siendo su acción altamente específica.

Para estimular la síntesis de las enzimas, no interactúa directamente con el DNA, solo lo hace cuando está presente el "inductor específico". Se aislaron de E. coli mutantes incapaces de sintetizar AMP cíclico, son adenilato ciclasa deficientes (114) y por lo tanto no producen  $\beta$  galactosidasa u otras enzimas inducibles, al menos que se agregue AMP cíclico al medio de cultivo.

Numerosos estudios se hicieron acerca de la posible acción del AMP cíclico en la represión catabólica. Se descartaron varias posibilidades: que actúe a nivel de membranas, aumentando la permeabilidad al inductor; que inhiba el metabolismo de la glucosa;

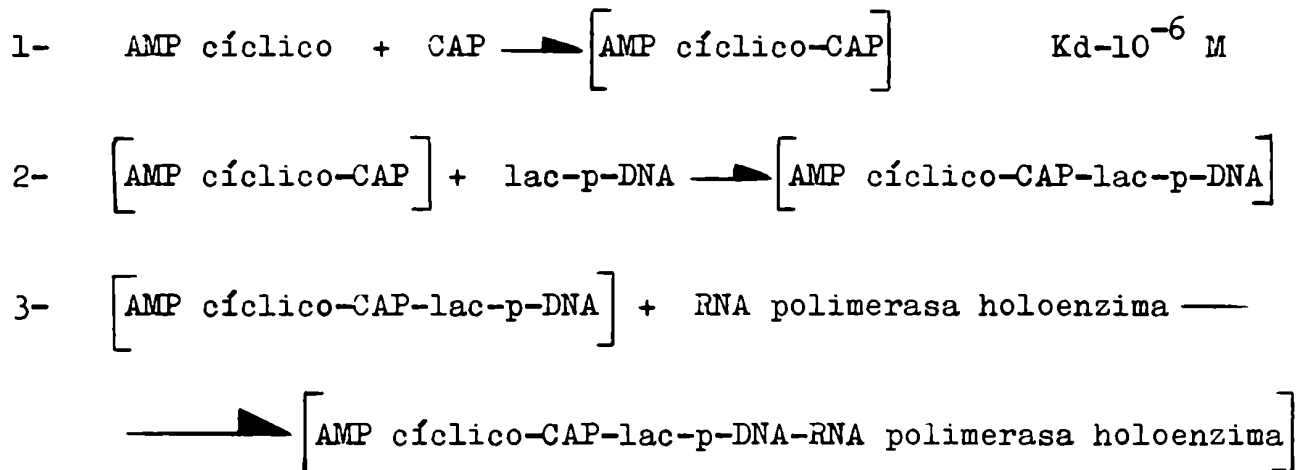
que actuase prolongando la vida media del RNA mensajero para  $\beta$  galactosidasa u otras enzimas (115).

El operón lactosa fue el más estudiado, llegándose a importantes conclusiones. En este sistema el AMP cíclico actúa a nivel transcripcional, aumentando los niveles de RNA mensajero específico de  $\beta$  galactosidasa, tanto en células enteras como en sistemas "in vitro" de síntesis proteica (116-117).

El AMP cíclico actúa teniendo como intermediario a una proteína de gran afinidad por el nucleótido. A esta proteína se la denominó CAP ( cyclic activator protein) o proteína activadora del AMP cíclico. Se estudiaron también mutantes deficientes en CAP, las cuales no producen  $\beta$  galactosidasa. El CAP fue purificado 200 veces, su peso molecular oscila alrededor de 45.000. Tiene un sitio de "binding" para el AMP cíclico por cada 250.000 daltons de proteína. La constante de disociación para el AMP cíclico es de  $10^{-6}$  M. El GMP cíclico inhibe el "binding" en un 80 %, los otros nucleótidos no interactúan con esta proteína (118,119).

Trabajos posteriores de Beckwith (120), demostraron que el complejo [AMP cíclico- CAP] se une al DNA a nivel de promotor, en un sitio distinto al de la RNA polimerasa. Mutantes de promotor no responden al AMP cíclico.

El mecanismo general sería el siguiente (121).



Correspondiente al complejo activo de iniciación a nivel del locus promotor (Figura 5).

El control de la síntesis de triptofanasa, difiere al de  $\beta$ galactosidasa. Em AMP cíclico estimula su síntesis a nivel de traducción ribosomal (122).

##### 5- AMP cíclico en la transformación celular.

La transformación celular es un fenómeno que da lugar a un conjunto de cambios a nivel de crecimiento, y en las propiedades morfológicas, fisiológicas e inmunológicas de las células. Estos cambios son ocasionados, al sufrir las células una infección

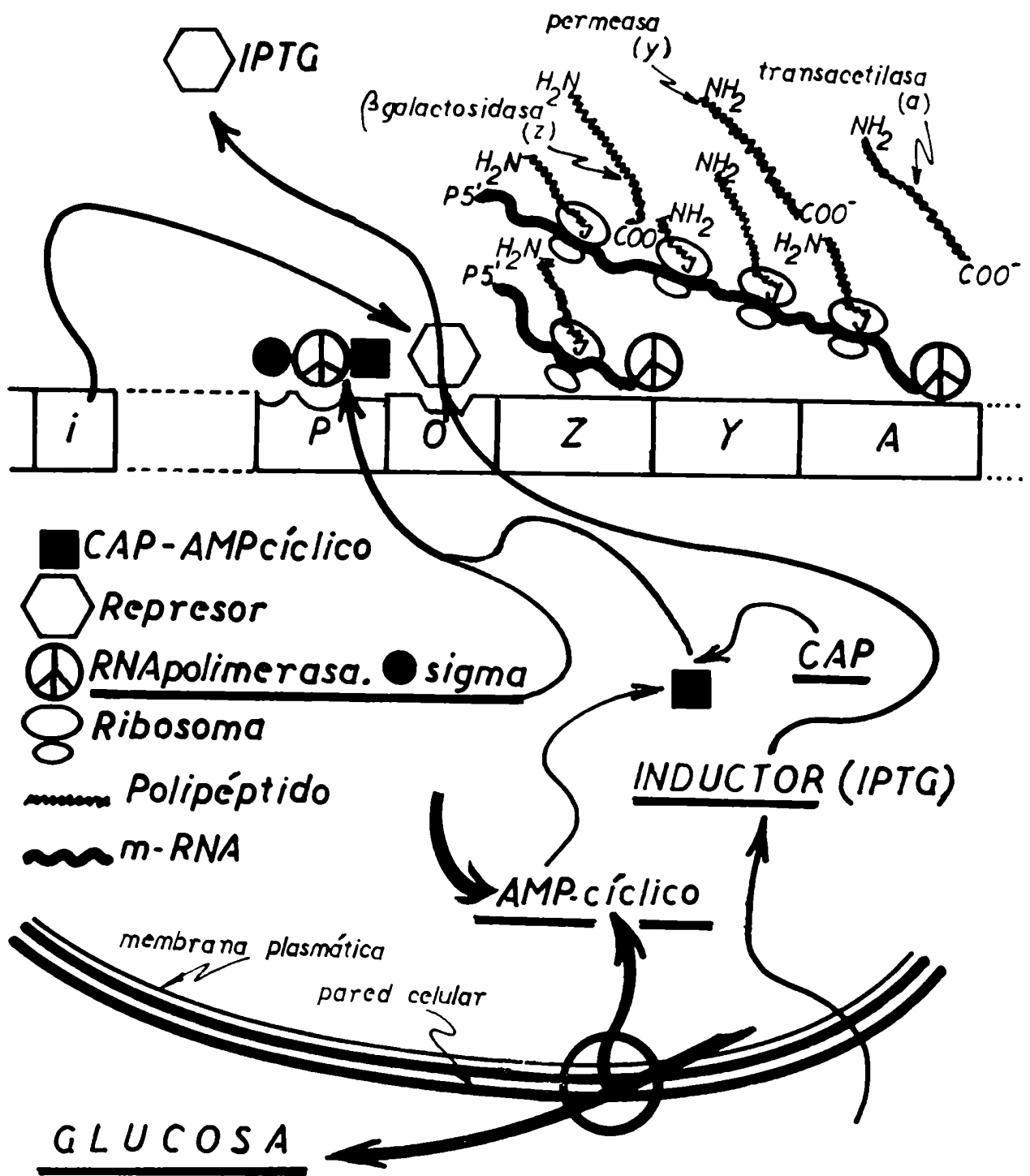


Figura 5- Papel del AMP cíclico en la transcripción genética.

por virus oncogénicos o luego de ser tratadas por agentes químicos o radioactivos de alta energía.(123)

Entre las características más relevantes de una célula transformada, figura la pérdida de la inhibición por contacto (topoinhibición). Esto es, la célula deja de crecer y dividirse cuando se contacta con las vecinas. Sin embargo, en un cultivo transformado las células continúan creciendo, se apilan y forman tumores. Paralelamente a ello, ocurren drásticos cambios en la forma de las células.

Diversos factores pueden modificar el proceso de transformación celular. Por ejemplo, si a un cultivo de células transformadas por virus oncogénicos se lo trata con dibutiril AMP cíclico, éste tiende a recuperar la morfología de un cultivo normal (124, 125) y viceversa, si a un cultivo normal se lo trata con insulina, éste adquiere las características morfológicas de un cultivo transformado (126).

Existen evidencias de que la concentración intracelular de AMP cíclico, es un factor de singular importancia en el condicionamiento de un estado transformado. En general, parecería, que aquellos factores que tienden a incrementar los niveles de AMP cíclico, disminuyen la velocidad de crecimiento de las células y facilita la diferenciación de las mismas. Tal es el caso de los cultivos con metilxantinas, dibutiril AMP cíclico o prostaglandina  $E_1$  (124-129). Por el contrario, aquellos factores que disminuyen la concentración intracelular de AMP cíclico, tales como la insulina y la infección viral oncogénica, determinan una pérdida de la topoinhibición y el pasaje al estado transformado (123,126, 130). En este sentido el papel de estos últimos factores es relevante.

Tanto en la infección por un virus oncogénicos como el tratamiento con insulina, parecen operar primariamente a un mismo nivel; esto es, la actividad de la adenilato ciclasa. En ambos casos se pudo comprobar que la actividad de la misma se encuentra disminuída. En el caso de la hormona, recientes evidencias indican que la insulina es un fuerte y específico inhibidor de la enzima (126). En cuanto a la infección viral oncogénica, se sabe que de alguna forma, determina cambios drásticos en las propiedades de la membranas plasmáticas, y como resultado de ello, una manifiesta reducción en la actividad adenilato ciclasa (131). Dichos cambios se evidencian a nivel de la composición en glucoproteínas de las membranas (132,133). Con respecto a éstas últimas, existen muchos datos que indican que las mismas son componentes de los receptores para hormonas y lecitinas (concanavalina A, fitohemoaglutinina) así también factores predominantes en la determinación de las características antigénicas de las células(134-136).

#### 6- AMP cíclico y permeabilidad de las membranas

La vasopresina y la hormona antidiurética aumentan la permeabilidad de ciertas membranas epiteliales al agua, sodio y moléculas de bajo peso molecular (urea).

Orloff y Handler (137-139) demostraron que este efecto era debido a la acumulación de AMP cíclico (140). Otras evidencias confirmaron esta hipótesis; vasopresina estimula la producción de AMP cíclico en riñón (141) y vejiga de sapo (142) aumentando el flujo de agua a través de la pared de la vejiga. La prostaglandina  $E_1$  disminuye significativamente el aumento de permeabilidad producido en respuesta a la vasopresina pero no es respuesta al

AMP cíclico (143). Este efecto podría explicarse por una competición entre  $PGE_1$  y vasopresina, por el sitio receptor de la adenilato ciclasa.

Vasopresina, teofilina y AMP cíclico aumentan el transporte de sodio a través de la membrana de piel de rana (144).

Adrenalina, ACTH, teofilina y AMP cíclico aumentan el flujo de potasio en células grasas (145).

En hígado perfundido de rata, glucagón y AMP cíclico aumentan el flujo de calcio (146); en animales paratiroideoprivos el AMP cíclico aumenta el nivel de  $Ca^{++}$  en la sangre (147).

El efecto inotrópico producido por la adrenalina y el glucagón es debido a un aumento en la concentración de  $Ca^{++}$  en los sarcotúbulos del músculo cardíaco. Este efecto también es mediado por el AMP cíclico (148), lo mismo que el transporte de  $Ca^{++}$  en la mucosa intestinal. Este último depende de la presencia de un factor inducido por la vitamina D (149).

#### 7- AMP cíclico en Neurospora crassa

La *Neurospora crassa* es un organismo biológicamente clasificado en la clase Protista. Este eucariote es un hongo perteneciente a la subclase Ascomicetes, y al orden de los Pirenomicetes.

En su estado salvaje presenta la morfología clásica de un micelio, con hifas muy ramificadas de 5  $\mu$  de diámetro. Cada hifa está subdividida por septas o "crosswalls", en compartimientos que contienen varios núcleos. Cada septa tiene un poro central por el que se intercambian núcleos y citoplasma.

Como todos los ascomicetes, tiene dos tipos de reproducción: una vegetativa o asexual, por medio de conidios, esporas de color



rosado que le permiten propagarse en la naturaleza. La conidia representa la forma clonal de reproducción. En el tipo de reproducción sexuada, forma ascosporos, con intercambio de material genético y meiosis entre la macro y micro conidia del peritecium (cuerpo de fructificación).

De acuerdo a los trabajos de Tellez-Iñón y Torres (151-153), el metabolismo del glucógeno en Neurospora crassa se regula mediante un mecanismo similar al de hígado, en mamíferos.

Estudiaron la interconversión de la glucógeno sintetasa (154), enzima responsable de la síntesis de glucógeno en la fracción sobrenadante de un homogenato de la cepa St.L 74 de Neurospora crassa. Describieron dos formas de glucógeno sintetasa, una dependiente (D) y la otra independiente (I) de glucosa-6-fosfato. La conversión de la forma I en D requiere "in vitro" ATP-Mg<sup>++</sup>.

Como vemos, la regulación se produce a nivel de la sintetasa, como en hígado y no a nivel de la pirofosforilasa de los nucleótidos azúcares como ocurre en bacterias.

La regulación por el AMP cíclico, se produce a nivel de la fosforilasa, enzima encargada de la degradación del glucógeno.

La glucógeno fosforilasa en Neurospora crassa (StL74), se encuentra bajo dos formas interconvertibles: fosforilasa a, activa y fosforilasa b, inactiva en ausencia de 5'AMP. La conversión de la forma b a la a requiere ATP-Mg<sup>++</sup> y es incrementada notablemente por la presencia de AMP cíclico.

También se describió la transformación inversa: de fosforilasa a a fosforilasa b, catalizada por una fosforilasa a fosfatasa. Esta fosfatasa posee dos formas interconvertibles; la reactivación de la forma inactiva hacia la forma activa, se produce incubando la preparación con ATP-Mg<sup>++</sup> y sistema regenerante de ATP. No se observó efecto de AMP cíclico a este nivel.

## Objeto de la presente investigación

El propósito del trabajo que presentamos es el de contribuir al esclarecimiento de los distintos mecanismos, por los cuales el AMP cíclico intervienen en el control del metabolismo celular.

Estudiamos la adenilato ciclasa en Neurospora crassa, su aislamiento, purificación y propiedades. Presentamos evidencias acerca de su regulación hormonal, convirtiendo a este eucariote en un nexo evolutivo y regulatorio entre los complejos sistemas de mamíferos y los metabólicamente más simples organismos bacterianos.

## PARTE EXPERIMENTAL

### MATERIALES Y METODOS

- I- Reactivos y Enzimas
- II- Preparación del ATP- $\alpha$ - $P_{32}$
- III- Preparación y Purificación de las Membranas
  - Cultivo de células
  - Preparación de la enzima Adenilato ciclasa
  - Purificación de las membranas
  - Preparaciones celulares para ensayos de Glucógeno sintetasa y Fosforilasa
  - Síntesis y aislamiento del Glucógeno
  - Transporte de Glucosa
- IV- Ensayo de Adenilato ciclasa y otras enzimas
- V- Solubilización y Purificación de la enzima particulada
- VI- Procedimientos analíticos

## I- Reactivos y Enzimas

Los distintos materiales se obtuvieron de los siguientes lugares: Piruvato quinasa (tipo II), ACTH, L- $\beta$ -3-4- dihidroxifenilalanina, 5 hidroxitriptamina, histamina, tiramina, adrenalina, noradrenalina, 3 hidroxitriptamina, ATP, AMP cíclico, PEP, buffer Pipes, de Sigma. Isopropiliden-adenosina y tricloroacetoneitrilo de Aldrich Chemical Co. Dimetil-sulfóxido, acetoneitrilo y trietilamina de T. Schwartz, Merck y Coleman, respectivamente. Todos estos solventes fueron bidestilados y conservados sobre hidruro de calcio. La resina Bio Rad AG 50 W-X8 (100 a 200 mesh) se obtuvo de Calbiochem. Se la lavó de acuerdo al método descrito por Butcher (175). El Lubrol-PX de Duperial-Imperial Chemical Industries

La adenilato quinasa se preparó de músculo esquelético de conejo, según Colowick (174). Fosfodiesterasa de corazón bovino, se obtuvo según el método de Butcher y Sutherland (175).

El glucagón fue generosamente donado por el Dr. L. Birnbaumer (National Institute of Health, Bethesda, Maryland) y por el Dr. Anderson de Lilly (Argentina). La insulina (libre de  $Zn^{++}$ , 21 unidades por mg. Lote 192-2358-188) y la insulina porcina recristalizada y tratada con tripsina, libre de glucagón (24 unidades por mg. Lote P.J.5589) se obtuvieron de Eli Lilly (Indianápolis USA) por cortesía del Dr. O.K. Behrens. La insulina de bovino, cristalina de Lilly (Buenos Aires). La hormona de crecimiento bovina fue donada por los Drs. Dellacha y Santomé (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires). Vasopresina se obtuvo de Parke-Davis.

El fosfato inorgánico radioactivo de la Comisión Nacional de Energía Atómica (Argentina).

## II - Preparación del ATP- $P_{32}$

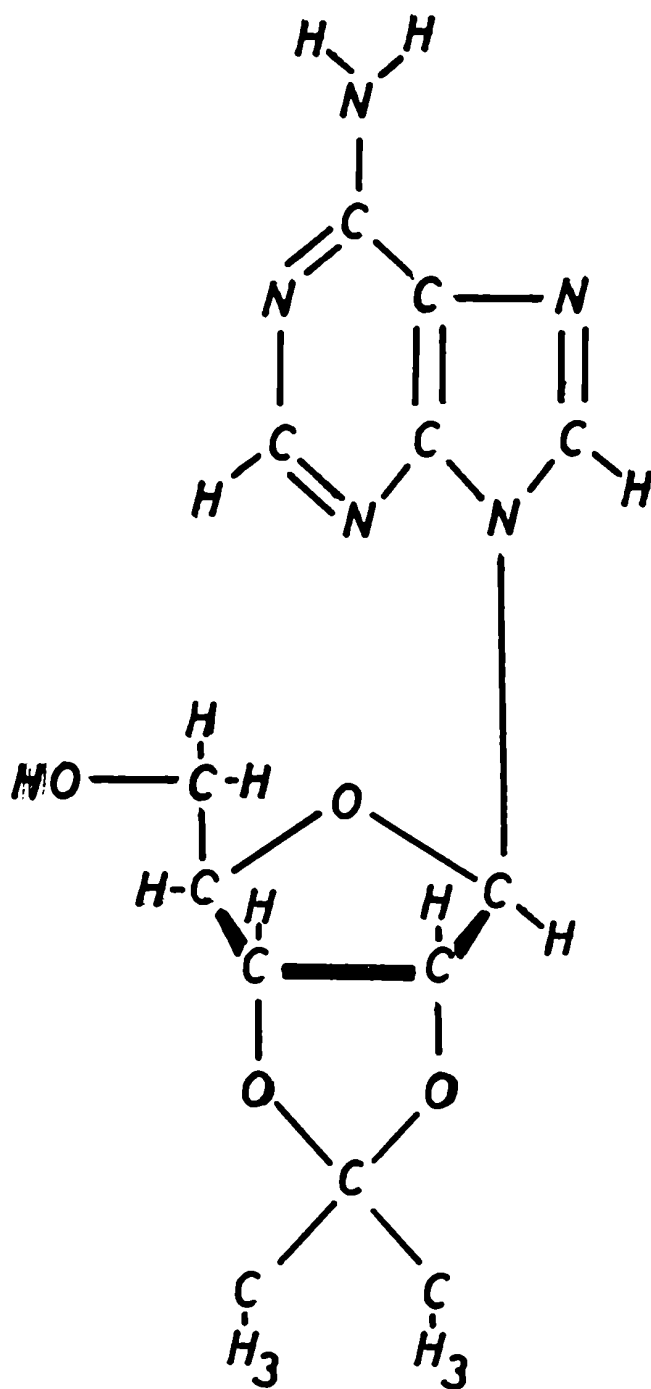
El ATP- $P_{32}$  se prepara a partir de 5' AMP- $P_{32}$ . Este compuesto se obtiene por medio de una síntesis química, de acuerdo al método de Symons (156), en la siguiente forma:

Se coloca la solución de fosfato inorgánico ( $P_{32}$ ), marcado y libre de portador, en un evaporador rotatorio. Se evapora a se quedad, se resuspende en 2 ml de  $H_2O$  y se evapora nuevamente. Es te procedimiento se repite de 3 a 4 veces. El fosfato radioactivo se disuelve en 1 ml de  $H_2O$ , se lo pasa a través de una columna (0.4 x 8cm) de Dowex 50W-X8 (100 a 200 mesh, forma  $H^+$ ) y se lo convierte en sal de trietilamonio agregando un exceso de trietilamina al percolado. Después de esta operación, el percolado se e vapora a sequedad en el balón preparado para la reacción ( bulbo de 3 cm de diámetro; cuello de 10 cm de longitud y 1 cm de diámetro interno). A esta solución evaporada de  $P_{32}$  se le agrega 15.5 miligramos (50  $\mu$ moles) de isopropiliden-adenosina y se seca perfectamente con acetonitrilo en la línea de vacío descrita por Ge enless y Symons (157).

Una vez que está totalmente seca la preparación, con acetoni trilo, se realiza la síntesis química del  $P_{32}$  en el carbono de la posición 5' de la isopropiliden-adenosina.

Utilizamos 0.4 ml de una solución conteniendo los siguientes componentes:

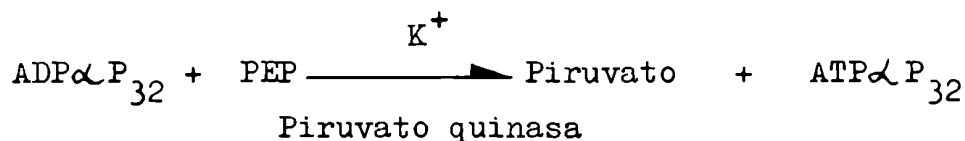
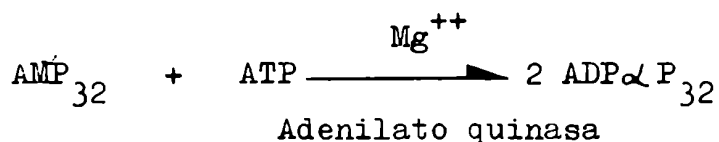
Tricloroacetonitrilo	62.5 mM,	agente condensante
Trietilamina	50.0 mM,	catalizador
Dimetilsulfóxido	0.8 ml,	solvente



ISOPROPILIDEN-ADENOSINA

Esta mezcla se agrega rápidamente al balón de reacción, se tapa perfectamente (adaptadores especiales) y se incuba a 37° C durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo, se agrega 1.5 ml de ácido acético 5N, se calienta 90 minutos a 100 °C para hidrolizar el grupo isopropilo y obtener el 5'AMP<sub>32</sub>. Luego del calentamiento se evapora el acético en el evaporador rotatorio, en un tubo de 1.3 x 12.5cm. Esta operación se lleva a cabo a 75°. Se obtiene un producto siruposo que se resuspende en 2 ml de agua y se evapora nuevamente, repitiendo el proceso de resuspensión y lavado cinco veces.

Para transformar el 5'AMP<sub>32</sub> en ATP $\alpha$ P<sub>32</sub> se realiza una síntesis enzimática de acuerdo a las siguientes reacciones:



Se incuba el 5'AMP durante 1h a 37° con los siguientes agregados: ATP 0.5mM; MgCl<sub>2</sub> 7.5mM; KCl 100mM; PEP 15mM; buffer-Tris-HCl 100mM pH 7.4; piruvato quinasa 20µg por ml y adenilato quinasa 200 µg por ml. El volumen total es de 0.8 ml. Se para la reacción con el agregado de 3ml de metanol y calentamiento de 3 minutos a 100°.

Para separar el ATP $\alpha$ P<sub>32</sub> obtenido, se realiza una cromatografía descendente utilizando papel Whatman N° 3 MM y empleando como solvente de corrida etanol-acetato de amonio, pH 7.3 (2:5:1) (178). Luego de una corrida de 24 horas, se detecta la radioactividad con un Scanner (modelo 385 Packard) y se eluye el ATP $\alpha$ P<sub>32</sub> con agua. El rendimiento de esta preparación es de un 50 %.

### III- Preparación y Purificación de las Membranas plasmáticas

#### 1- Cultivo de células

En todos los trabajos que realizamos utilizamos la mutante "slime" de Neurospora crassa, cepa Fz:Os-1:N1118-FGSC (159). El uso de esta mutante presenta dos importantes ventajas: a) crece como "protoplastos" aislados rodeados por una membrana plasmática, con ausencia de pared celular, característica de la cepa salvaje de Neurospora y b) es muy escasa la cantidad de membranas intracelulares.

Los cultivos, tanto en medio líquido como en medio sólido, se realizan de acuerdo a Woodward y Woodward (160). Los tubos de medio sólido, para repicar la cepa, contienen 2% de sacarosa, 0.75% de caldo de nutrientes, 0.75% de extracto de levadura y 2.5% de agar disuelto en el medio mínimo de Vogel (161), con sales y vitaminas. Los tubos que contienen el medio permanecen en estufa a 30° y se hacen repiques periódicos cada 5 o 6 días.

Para obtener el volumen suficiente de células necesario para las preparaciones enzimáticas, se hacen cultivos en medio líquido. Este medio está compuesto por los mismos elementos usados para el medio sólido pero omitiendo el agregado de agar. Se utilizan erlenmeyers de 1000 ml, con 200 ml de medio líquido. Utilizamos inóculos de medio sólido conteniendo  $10^7$  células por ml. Se incuban a 37° durante 24 horas en agitadores rotatorios (120 ciclos por minuto), cuando se colectan tenemos un cultivo de  $10^6$  células por mililitro.



## 2- Preparación de la enzima Adenilato ciclasa.

Las células obtenidas de los cultivos de 24 horas en medio líquido se colectan por centrifugación a 900 g durante 7 minutos. Decantamos el sobrenadante y el precipitado celular se resuspende en una cantidad de  $\text{NaHCO}_3$  1 mM, igual a la décima parte del volumen total del cultivo, se deja 30 minutos en frío. En este nivel a la preparación le llamamos lisado. La suspensión en  $\text{NaHCO}_3$  se centrifuga durante 15 minutos a 15.000 x g y el sobrenadante obtenido se centrifuga nuevamente a 105.000 x g durante 3 horas. El precipitado obtenido constituye la fracción que denominamos membranas crudas; a esta fracción la resuspendemos en  $\text{NaHCO}_3$  1 mM hasta una concentración de proteínas de 5 mg por ml y la usamos como fuente de enzima en la mayor parte de los experimentos descritos en este trabajo.

## 3- Purificación de las membranas

La purificación posterior de la fracción de membranas crudas se lleva a cabo de la siguiente forma: se resuspende el precipitado de 105.000 x g en  $\text{NaHCO}_3$  1 mM conteniendo sacarosa 0.25 M. El preparado se siembra en un gradiente discontinuo de sacarosa entre 0.85 y 0.40 M, sobre un colchón de sacarosa 1.3M. Se centrifuga durante 3 horas a 105.000 x g (centrifuga preparativa Spinco, modelo L, rotor SW 65). Luego de esta corrida se observan 2 bandas turbias de material. Una de las bandas localizada en la mitad superior del gradiente, contiene una adenilato ciclasa de gran actividad específica. Después de una dilución con  $\text{NaHCO}_3$  1 mM, la enzima contenida en esta banda, puede ser sedimentada por centrifugación a 105.000 xg durante 120 min. A esta preparación la denominamos membranas purificadas.

#### 4 - Preparaciones celulares para ensayos de Glucógeno sintetasa y Fosforilasa.

Las preparaciones celulares para estas enzimas se realizan de la siguiente manera: se toman alícuotas de 20 ml de medio de cultivo y se las coloca inmediatamente en hielo. Las células se colectan por centrifugación 5 minutos a 10.000 g. El precipitado se resuspende en 1 ml de una solución fría que contiene buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4; mercaptoetanol 10mM; NaF 50 mM y EDTA 20 mM. La suspensión se homogeneiza en un homogeneizador de vidrio-teflón, hasta ruptura total de las células. Posteriormente se filtra la preparación a través de una columna de Sephadex G 25 equilibrada con la misma solución buffer utilizada anteriormente.

#### 5- Síntesis y aislamiento del Glucógeno en la mutante "slime" de Neurospora crassa.

Se cultivan las células en 200 ml de medio de cultivo. Se colectan por centrifugación durante 7 minutos a 2000 r.p.m. y se resuspenden nuevamente en 100 ml de medio mínimo (sin sacarosa) con extracto de levadura (0.75%) y caldo de nutrientes (0.75%). Se incuban las células en este medio durante 2 horas. Al tiempo "0" se toman alícuotas de 2 ml, se agrega glucosa  $C_{14}$  (10  $\mu$ C) y se separa el cultivo en 2 fracciones de 4 ml cada una, con y sin el agregado de insulina 0.1 unidad por ml. A los tiempos 15 y 30 minutos se toman alícuotas, se mide la radioactividad incorporada al glucógeno y se dosa este polisacárido de acuerdo al método de Krisman (213).

Para determinaciones de glucógeno se extraen 2 ml de medio de cultivo, se los centrifuga durante 15 minutos a 12.000 x g . El precipitado obtenido se resuspende en KOH al 33 % y se calienta durante 15 minutos a 100°.

El glucógeno se aísla de estas muestras tratadas con álcalis por precipitación con etanol, de acuerdo el método de Piras (167). Se determina la radioactividad usando como mezcla centelleante el sistema naftaleno-dicxano (162).

#### 6- Transporte de glucosa

Tomamos células de 24 horas de cultivo en medio líquido, las colectamos por centrifugación durante 7 minutos a 2000 r.p.m. y las resuspendemos en 10 ml de medio de cultivo mínimo (solo sales y vitaminas). Le agregamos glucosa  $C_{14}$  0.5mM (10  $\mu$ C) y se divide al cultivo en 2 fracciones de 4 ml cada una. A una de las fracciones le agregamos insulina 0.1 unidad por ml. A distintos tiempos de cultivo ( 0-10-20 y 30 minutos) extraemos alícuotas, las filtramos por millipore y medimos su radioactividad en un contador de centelleo.

Al millipore quedan retenidas las células enteras, permitiéndonos hacer una determinación exacta de la radioactividad incorporada.

#### IV- Ensayo de Adenilato ciclasa y otras enzimas

##### 1- Ensayo de Adenilato ciclasa.

La mezcla de incubación para adenilato ciclasa, salvo agregados específicos está compuesta de la siguiente forma: ATP  $\alpha$   $P_{32}$  2.5 mM con una actividad específica entre 100 y 5000 c.p.m por pmol;  $MnCl_2$  2.5 mM; buffer piperazina-N-N'-bis etanosulfonato de sodio, pH 6.35 100 mM; 0.2 mg de proteína enzimática. Las mezclas se incuban a 37° entre 1.5 y 5 minutos. La reacción se para por el agregado de 0.1 ml de una solución compuesta de: ATP 40 mM, AMP cíclico 12.5 mM y posterior calentamiento a 100° durante 3 minutos.

El AMP cíclico  $P_{32}$  obtenido se aísla de acuerdo al método de Krishna (38) descrito por Rodbell (41). La base del método consiste en separar el AMP cíclico radioactivo de los otros nucleótidos marcados (ATP, ADP y AMP) pasándolo a través de una columna de resina intercambiadora de cationes; los grupos  $H^+$  de la resina se intercambian con los  $NH_2^+$  de los nucleótidos. El AMP cíclico se pega a la resina más fuertemente que el resto de nucleótidos, por estar la carga positiva de la adenosina menos contrarrestada por las cargas negativas de los grupos fosfatos. Para todos nuestros ensayos usamos una adaptación del método de Rodbell, cuyos pasos se detallan a continuación.

Una vez parada la reacción y calentada 3 minutos a 100° agregamos 0.4 ml de  $H_2O$ , para precipitar proteínas insolubles, centrifugamos 5 minutos a 2000 r.p.m. y utilizamos el sobrenadante. Pasamos esta preparación a través de una columna (8 cm de largo por 4 cm de diámetro interno) de resina Bio Rad AG 50 W-X8 (100 a 200 mesh) forma  $H^+$ , previamente lavada con ácido

1 ml de resina

clorhídrico 2N y luego con agua hasta neutralidad. Después del pasaje de los 0.5 ml de la muestra, lavamos con 2.5 ml de agua, percolado y líquido de lavado se descartan (ATP y ADP marcados). Con el pasaje posterior de 4 ml de agua se eluyen el AMP y el AMP cíclico. Esta fracción se recoje en tubos de 1.2 por 10cm. Separamos el AMP cíclico del otro nucleótido por el agregado de 0.3 ml de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  0.3 N y 0.3 ml de  $\text{ZnSO}_4$  al 5%. Se agita la preparación en un vortex antes de cada agregado. El AMP formado precipita con el  $\text{BaSO}_4$  formado, quedando el AMP cíclico en el sobrenadante. Se centrifuga a 2000 r.p.m. durante 30 minutos. Se descarta el precipitado y se pasa el sobrenadante a otro tubo donde se efectúa una reprecipitación en las mismas condiciones anteriores. Después de esta última centrifugación, se pasa el sobrenadante a otro tubo de ensayo y se mide radioactividad en alícuotas de 3 ml de sobrenadante, usando el sistema naftaleno dioxano (162).

Los blancos de la reacción, con o sin el agregado de enzima, pero sin ser incubados, son del orden de las 200-300 cpm. Las diferencias entre tubos incubados y blancos varían con las distintas condiciones en diferentes tipos de experimentos, pero generalmente oscilan entre 1500 y 15.000 c.p.m. Las diferencias entre los duplicados son de un 5 a un 10%.

Salvo condiciones expresamente indicadas, los resultados se expresan como nano-moles de AMP cíclico formado por mg de proteína y por minuto.

Se mide absorción a 260  $\mu$  para calcular la recuperación de las muestras pasadas por columnas, usualmente son de un 50% a un 60%. La determinación se realiza en alícuotas de 0.5 ml de la misma fracción que utilizamos para medir radioactividad.

## 2- Glucógeno sintetasa

Se midió la enzima de acuerdo a los trabajos de Tellez-Iñón y Torres (151) determinando actividad enzimática en presencia y en ausencia de glucosa-6-fosfato, 2 mM. La relación de independencia se determina midiendo la relación entre actividades enzimáticas medidas sin y con glucosa-6-fosfato.

## 3- Glucógeno fosforilasa

Se midió en ausencia de 5'AMP de acuerdo a Tellez-Iñón y Torres (152).

## 4- Succinato citocromo c reductasa

Se determinó de acuerdo al método de Fleischer y Fleischer (163).

## 5- Piruvato quinasa

Según el método de Carminatti y colaboradores (164).

## V- Solubilización y Purificación de la Adenilato ciclasa

### 1- Solubilización de la enzima

La enzima se prepara hasta la etapa de membranas crudas de acuerdo a la técnica descrita anteriormente. En esta fracción se recupera más de un 80% de la actividad enzimática. El precipitado de 105.000 x g, que contiene aproximadamente 50 mg de proteína, se homogeneiza en 20 ml de una solución de  $\text{NaHCO}_3$  1mM y 20 mM de detergente no iónico Lubrol-Px (polioxietilen-eter). Utilizamos para homogeneizar un Potter-Elvehjem (vidrio-teflon).

El extracto se centrifuga a 165.000 x g durante 120 minutos. Después de esta etapa un 80% de la actividad adenilato ciclasa se recupera en la fracción soluble.

Una alícuota del sobrenadante, conteniendo 10 mg de proteína por ml, se siembra en una columna de DEAE celulosa (1.3cm por 12 cm) equilibrada con buffer Tris-HCl pH 7.4, 50mM. Se eluye la enzima activa, libre de Lubrol, con un gradiente lineal de KCl (de 0 a 0.75 M) preparado con el mismo buffer. El volumen total del sistema de elución fue de 75 ml. Se colectan las fracciones de 2.5 ml, teniendo el gradiente una velocidad de flujo de 1 ml por minuto. Bajo estas condiciones, el detergente queda excluido de la columna y la fracción con actividad enzimática se eluye a una concentración de KCl de 0.36M.

## 2- Purificación de la adenilato ciclasa

Las fracciones obtenidas de la columna, con actividad adenilato ciclasa, se dializan contra buffer piperazine-N-N'-bis-etanosulfonato de sodio, pH 6.35, 25 mM, conteniendo EDTA 0.4 mM y ditiotreitól 0.2 mM, durante 3 horas.

Luego de la diálisis se toman alícuotas de aproximadamente 0.3 ml, conteniendo 0.05 mg de proteína y se las somete a una centrifugación en un gradiente lineal de sacarosa (de 20 a 5 %) durante 13 horas a 120,000 x g (Ultracentrífuga preparativa Spinco, modelo L, rotor SW 65). El gradiente se calibra de acuerdo al método descrito en Procedimientos analíticos

## VI- Procedimientos analíticos

- 1- Proteínas. Se determinó de acuerdo a Lowry y colaboradores (165)
- 2- DNA. Según el método de Burton (166)

3- Glucógeno. Se determinó por el método de Piras (167) y por el método de Krisman (213).

4- Radioactividad. Se mide utilizando el método de Bray, mezcla centelleadora compuesta por naftaleno-dioxano (162).

5- Cromatografía. Para separar cromatográficamente el AMP cíclico de los otros nucleótidos, se utiliza el papel Whatman N° 3 MM y se realizan cromatografías descendentes, utilizando como solvente la mezcla 2 propanol-amoniaco-agua (7:2:1) (168).

6- Gradientes de sacarosa. Son gradientes de centrifugación en sacarosa que se procesa de acuerdo al método de Martin y Ames (169). Son calibrados con RNA polimerasa de Escherichia coli, fosforilasa b de músculo, catalasa hepática y fosfatasa alcalina de E.coli.

7- Electroforesis en gel. Son geles de poliacrilamida, para electroforesis, se preparan de acuerdo al método de Davis (170), empleando un 5% de gel de acrilamida en 100 mM de buffer fosfato de sodio pH 7.5. Para teñir las proteínas se utiliza el colorante coomasie blue (171).

8- Cadenas A y B de insulina. La preparación de las cadenas separadas de insulina, A y B, se realizan de acuerdo al procedimiento de Meek y Bolinger (172) a partir de insulina bovina sulfitolizada.



## RESULTADOS

### I-Mutante "slime" de Neurospora crassa

Neurospora crassa

Estructura de la célula "slime"

Morfología del "slime" antes y después de la  
lisis

Estructura de la membrana

### II-Adenilato ciclasa

Localización

Solubilización

### III-Propiedades de la enzima

Autenticidad del producto de reacción

Requerimientos para la actividad enzimática

Modificadores de la adenilato ciclasa

### IV-Cinética

### V-Purificación y Peso Molecular

### VI-Regulación hormonal

Activación por glucagón

Inhibición por insulina

Cinética de la acción hormonal

I-Mutante "slime" de Neurospora crassa.

1- Neurospora crassa

La Neurospora crassa (St L 74), en su forma salvaje crece formando un micelio compacto con hifas de 5  $\mu$  de diámetro, subdivididas por septas o "crosswalls" y recubiertas por una pared celular compleja. Cada compartimiento contiene varios núcleos, pudiendo existir intercambio nuclear o citoplasmático a través de un poro ubicado en la parte central de cada septa.

En la figura 6, presentamos una fotografía al microscopio óptico de este micelio ( 600 x). Una descripción más detallada del mismo se hizo en la sección correspondiente a Introducción.

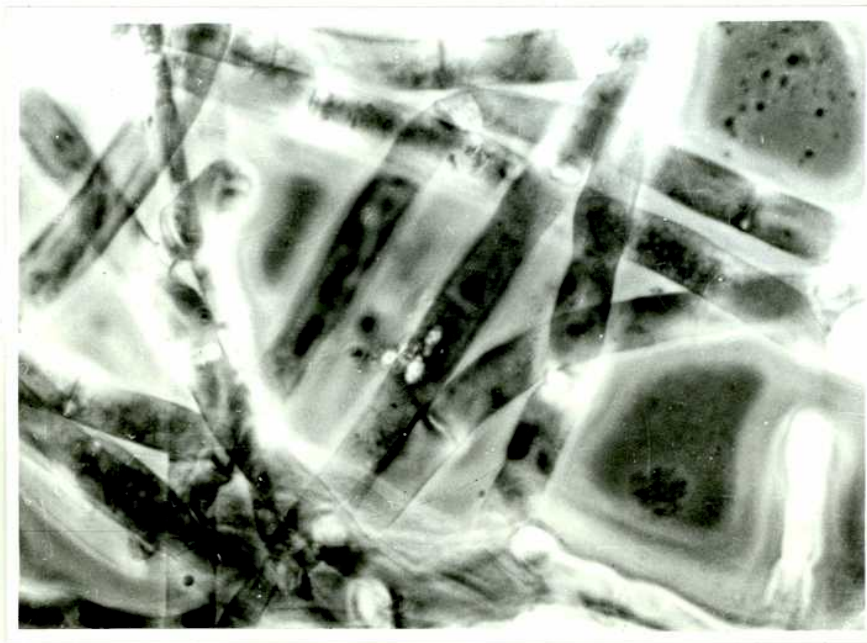


Figura 6

Es muy difícil obtener buenos homogenatos a partir de este micelio. La presencia de una compacta pared celular, dificulta notablemente la obtención de membranas plasmáticas. Por otra parte, existen abundantes ATPasas que destruyen el  $ATP\text{-}^{32}P$  durante el ensayo enzimático. De esto se deduce que los resultados obtenidos con la adenilato ciclasa de micelio no fueron óptimos.

## 2- Estructura de la célula "slime"

La mutante "slime" de Neurospora crassa cepa Fz:Os-1-N1118-FGSC (fenotipo muy complejo donde interactúan varios genes) se caracteriza porque carece de aminoazúcares y polímeros de galactosa. No posee las enzimas encargadas de sintetizar la pared celular (159).

En medio sólido crece como "colonia bacteriana", con escasa o nula compartimentalización interna. La colonia está rodeada por una membrana. Al romperse ésta, se originan partículas esféricas de 10 a 70  $\mu$  de diámetro que carecen de pared celular.

Tanto al microscopio óptico (Figura 7), como al electrónico (Figura 8) la mutante "slime" se presenta como células aisladas. Cada célula está rodeada por una membrana plasmática, es su interior contiene varios núcleos y una vacuola. El tamaño de la célula "slime" y el de la vacuola, varían con el tiempo de cultivo en medio líquido. En cultivos jóvenes de 18 horas, el diámetro de las células es de 15  $\mu$  y la vacuola es pequeña. A las 40 horas de cultivo, las células crecen hasta cerca de 50  $\mu$  de diámetro y la vacuola ocupa un gran volumen celular.

En la fotografía de la figura 8 podemos observar que el citoplasma celular contiene muy poco retículo endoplasmático y escasas estructuras mitocondriales.

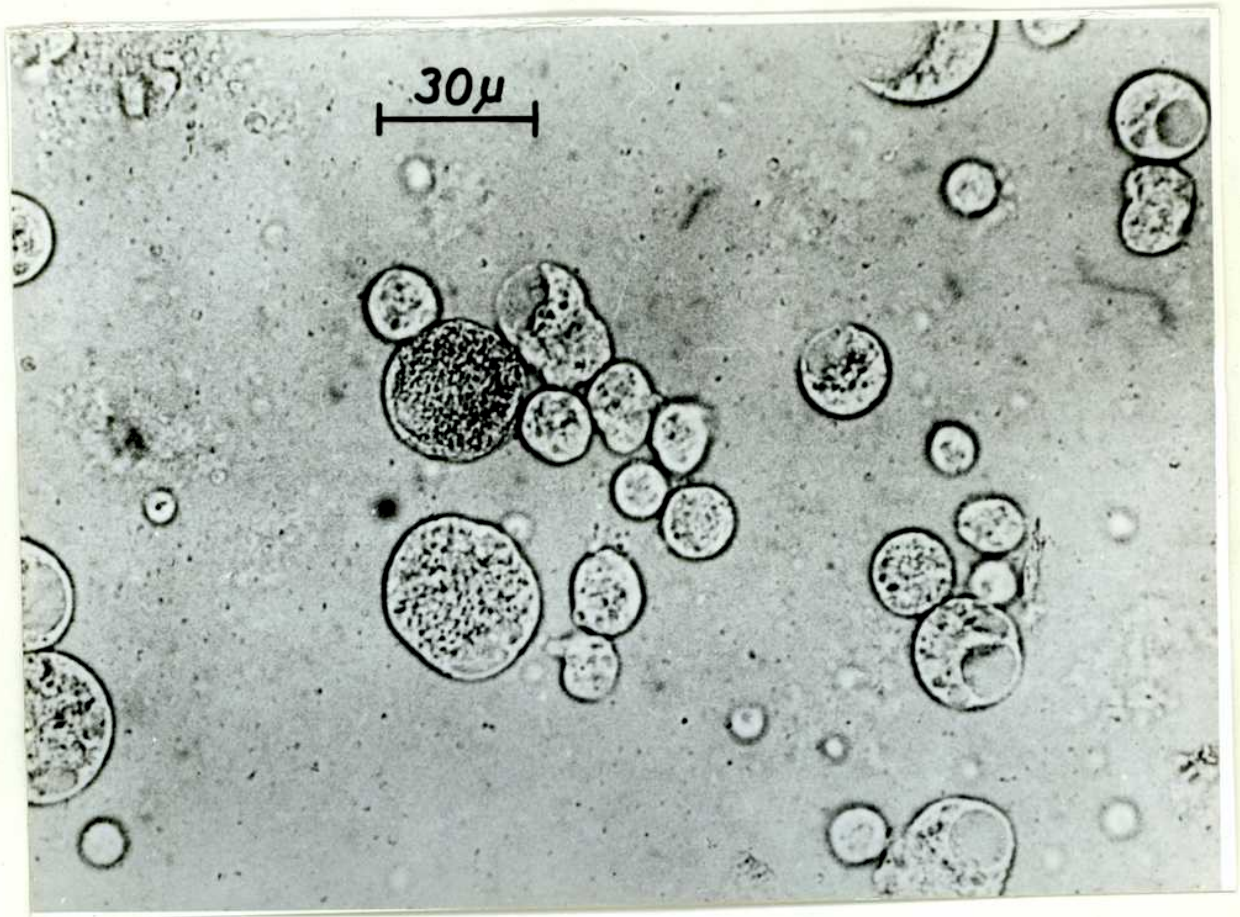


Figura 7- Microfotografía, al microscopio óptico, de la mutante "slime" de Neurospora crassa.

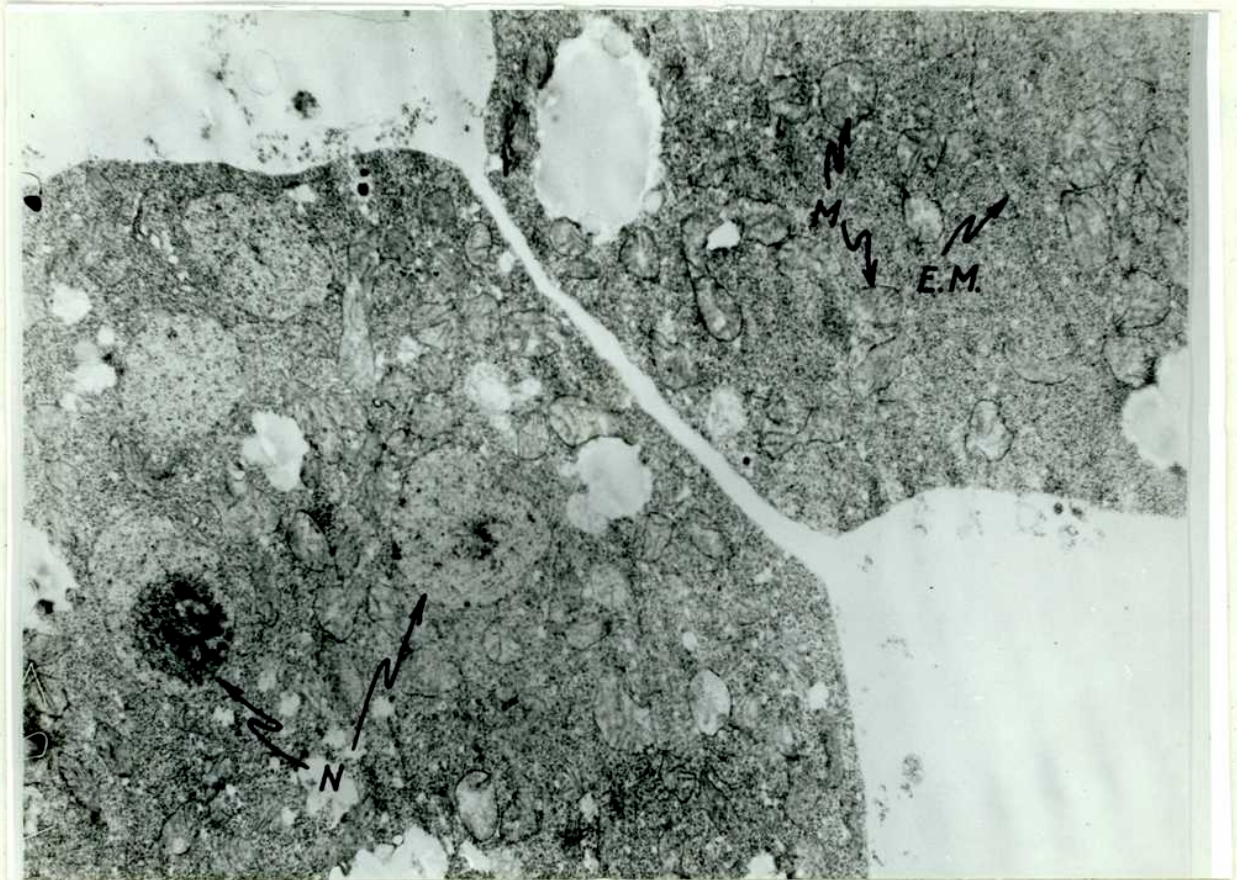


Figura 8 - Microfotografía de la mutante "slime" (10.000 x);  
N, núcleo; M, mitocondria; EM, membranas del retículo endoplasmá-  
tico.

La ausencia de la pared celular, la presencia de una membrana plasmática de fácil separación y la escasa cantidad de membranas correspondiente al retículo endoplasmático, nos permiten decir, que la mutante "slime" representa un material óptimamente apropiado para el estudio de la adenilato ciclasa en Neurospora crassa.

### 3- Morfología del "slime" antes y después de la lisis.

La resuspensión del "slime" en el medio hipotónico, produce drásticos cambios en la morfología celular.

Primeramente, comienza la célula a hincharse, aumenta de tamaño juntamente con la vacuola, el material celular se comprime entre la vacuola y la superficie celular (Figura 9). Esta imagen es muy similar a la obtenida de células grasas "ghosts" en las mismas condiciones. Posteriormente, la membrana celular se rompe, formándose dos tipos de estructuras: a) partículas de material amorfo, compuestas por agregados de membrana; y b) sacos de tamaños variables. Algunos de estos sacos son pequeños (entre 5 y 10  $\mu$  de diámetro) y encierran material celular de intenso movimiento browniano. Los otros son sacos de mayor tamaño (entre 15 y 30  $\mu$  de diámetro) que aparecen ópticamente vacíos. Estos sacos vacíos provienen de la vacuola central.

En las figuras 10 y 11 tenemos fotografías representativas de este tipo de estructuras. Como vemos, algunas de estas imágenes son muy similares a las descritas para "ghosts" de células grasas (41).

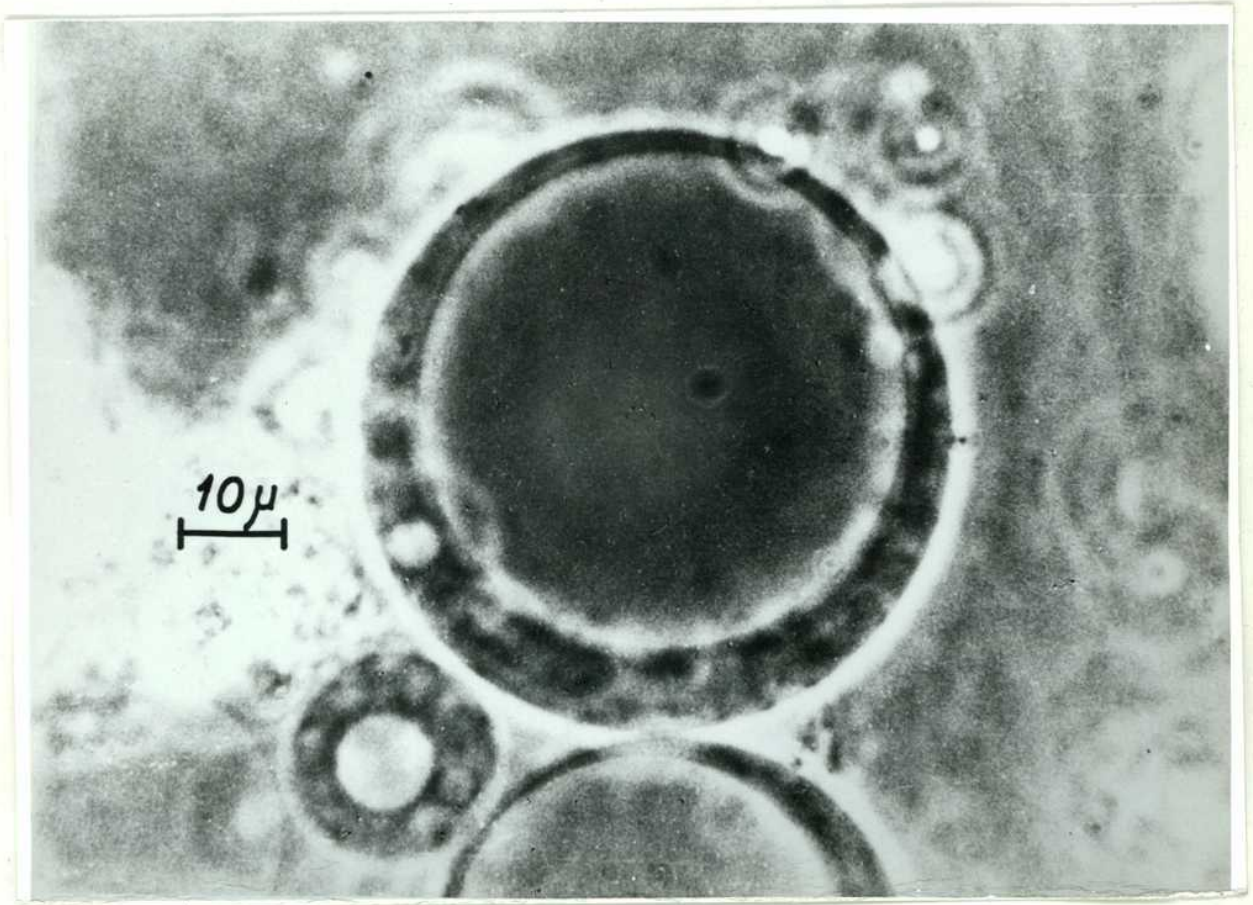


Figura 9- Microfotografía, en contraste de fase, de la célula "slime" hinchada, después de la resuspensión del material en medio hipotónico.

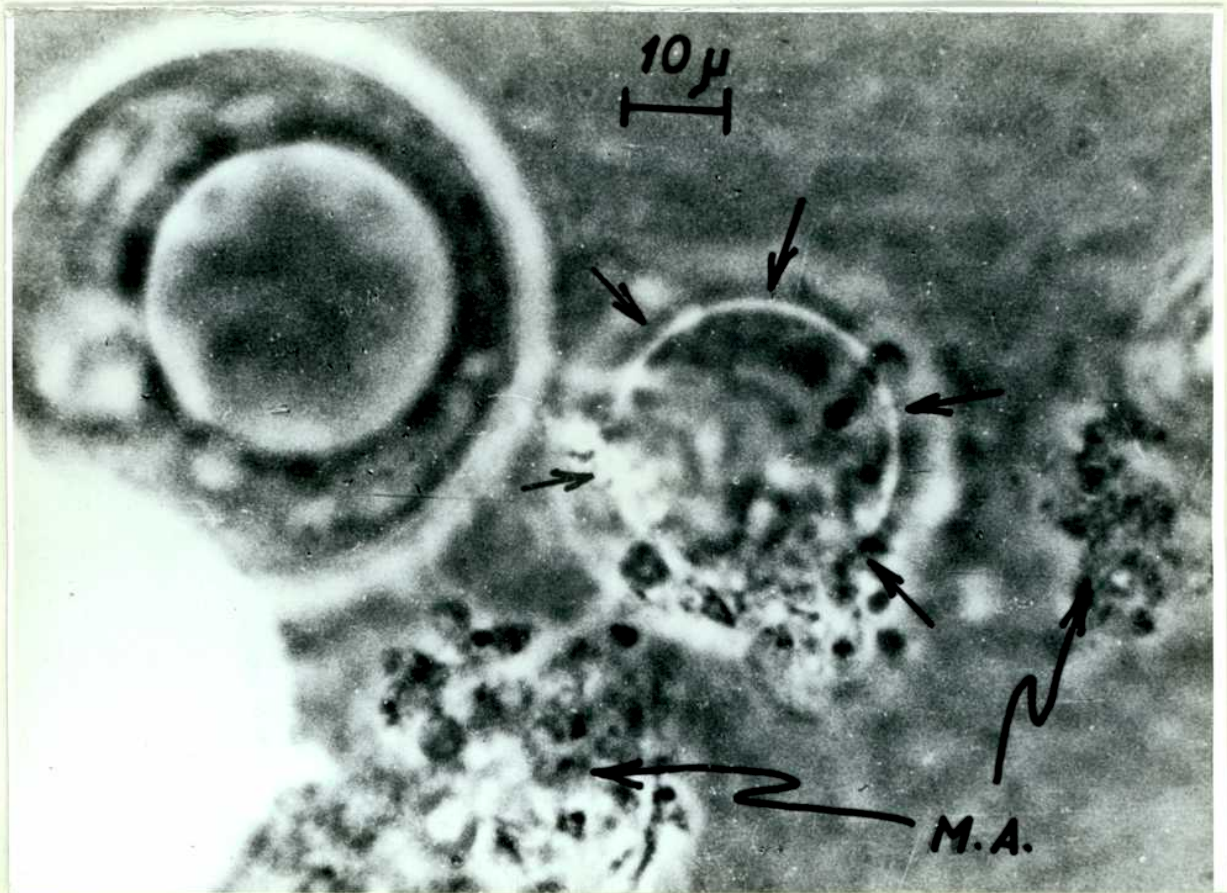


Figura 10- Microfotografía, en contraste de fase, de los sacos con contenido celular inespecífico. M.A., agregados de membranas.



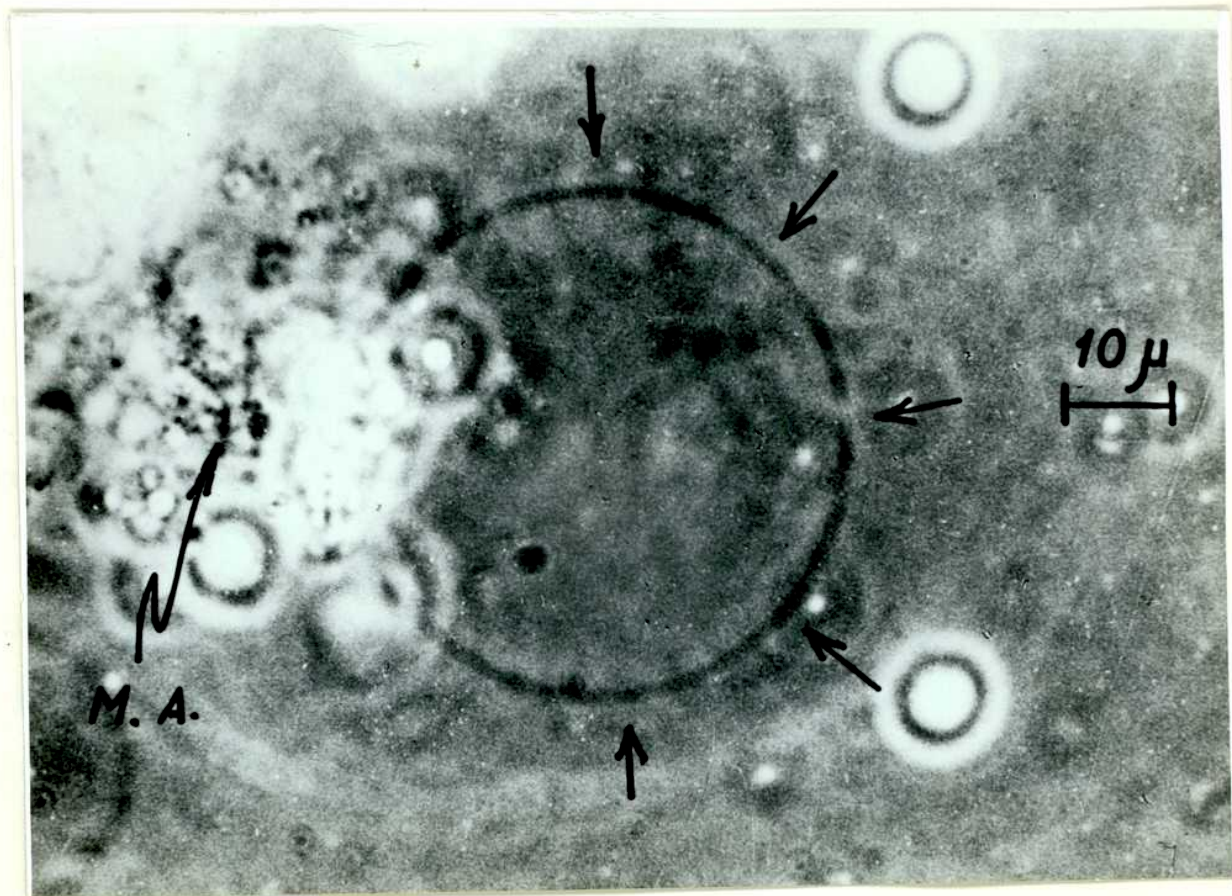


Figura 11- Microfotografía, en contraste de fase, de sacos ópticamente vacíos. M.A., agregados de membranas.

#### 4- Estructura de la membrana.

La morfología de la membrana se obtuvo de microfotografías electrónicas. Estas se efectuaron con preparaciones de membranas purificadas. La figura 12, corresponde a la fracción de mayor actividad específica de adenilato ciclasa. Como podemos observar en la microfotografía, la fracción está altamente enriquecida por componentes que tienen la estructura correspondiente a membranas plasmáticas, esto es, estructuras vesiculizadas rodeadas por una gruesa membrana. En algunas zonas, la membrana aparece difusa, debido a cortes tangenciales de los bordes (Figura 12 A).

En otras (Figura 12 B), el espesor de la imagen, 100 A°, corresponde a membranas plasmáticas, iguales a las descritas en células animales (176). Podemos observar, con un aumento de 80.000 x, la imagen de la unidad de membrana.

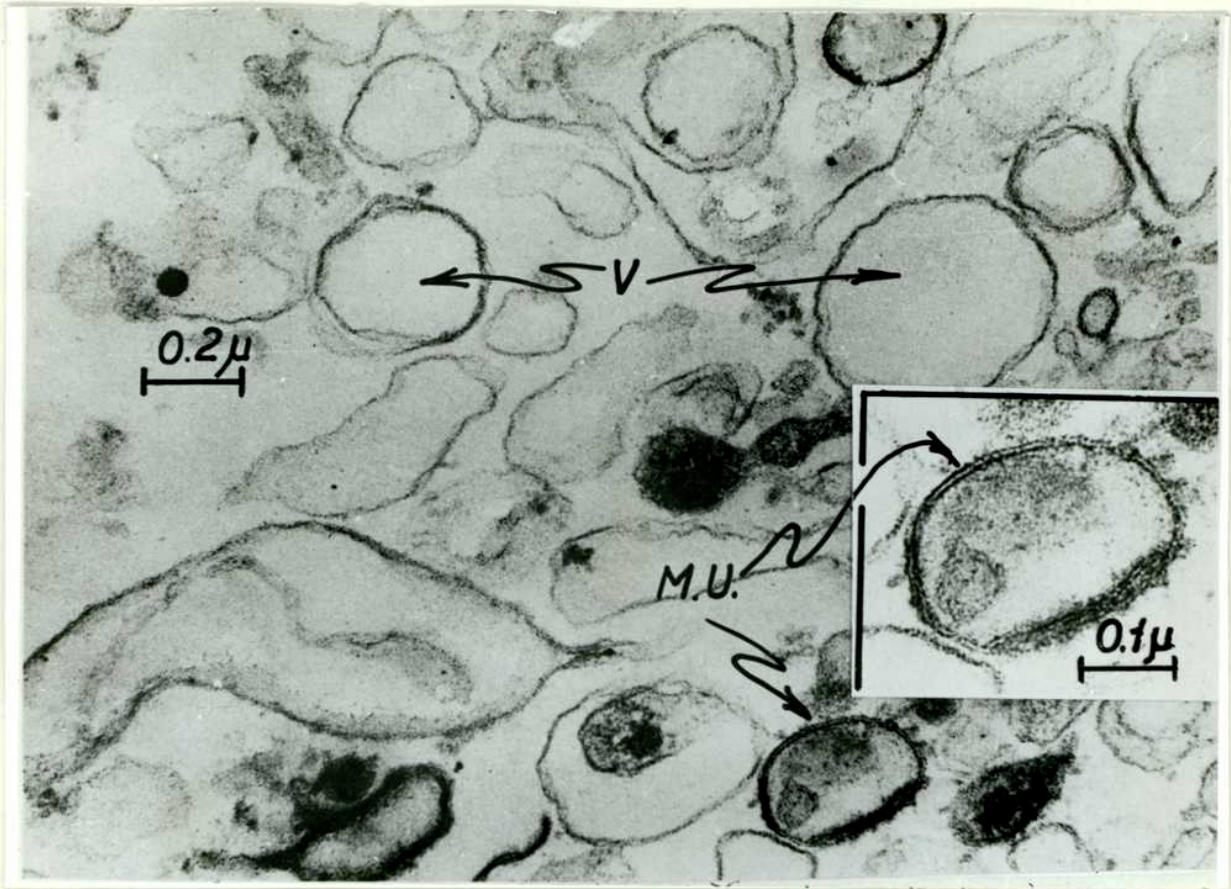


Figura 12 A- Microfotografía electrónica de una preparación de membranas purificadas. V, vesículas; M.U., unidad de membrana (40.000 x).

Figura 12 B- Imagen de la "unidad de membrana" en mayor aumento (80.000 x). La preparación de membranas purificadas se describió en Materiales y Métodos.

## II- Adenilato ciclasa.

### 1- Localización

Con el objeto de identificar correctamente la fracción celu las responsable de la actividad adenilato ciclasa, se realizó u na centrifugación diferencial de un homogenato celular en sacaros a 0.25M.

Los resultados obtenidos se indican en la tabla II. Un 50% de la actividad enzimática sedimenta en la fracción V, correspondiente a una velocidad de centrifugación de 105.000 x g.

DNA y actividad de succinato citocromo c reductasa, sedimentan a una velocidad más baja (Fracciones I,II y IV, respectivamente).

La actividad de adenilato ciclasa remanente, junto a la de piruvato quinasa, se encuentran en el sobrenadante de la fracción V.

Si sometemos este sobrenadante a una segunda centrifugación de 2 horas a 165.000 x g precipita toda la actividad de adenilato ciclasa. A esta fracción con actividad de adenilato ciclasa obtenida en el precipitado de 105.000 x g (Fracción V) la denominamos membranas crudas. Estas membranas pueden ser purificadas en un gradiente discontinuo de sacarosa (La técnica se describió en la parte correspondiente a Materiales y Métodos).

Después de la centrifugación de 3 horas a 105,000 x g, la mayor actividad específica de adenilato ciclasa se obtuvo en una banda localizada en la mitad superior del gradiente (en 0.55 M de sacarosa, aproximadamente), correspondiente a membranas purificadas (Figura 13).

TABLA II. Distribución de las actividades enzimáticas, DNA y proteínas en las diferentes fracciones subcelulares de la mutante "slime" de Neurospora crassa.

FRACCIONES	Centrifugación		Volumen ml	Proteínas totales-mg
	x g.	min.		
I-precipitado	600	5	1	4.4
II-precipitado	600	15	1	5.0
III-precipitado	1.500	20	1	5.5
IV-precipitado	115.000	20	1	3.2
V-precipitado	105.000	60	2	12.0
V-sobrenadante	105.000	60	1 7	22.0

FRACCIONES	DNA Total mg	Succinato citocromo c reductasa n moles/minuto/mg de proteína	Piruvato quinasa	Adenilato ciclase
II-precipitado	0.1	39	130	0.037
III-precipitado		7	100	0.030
IV-precipitado		47	190	0.102
V-precipitado		7	100	0.256
V-sobrenadante			1.800	0.134

Se colectan células de 200 ml de cultivo en medio líquido, se resuspende el precipitado celular en 20 ml de sacarosa fría 0.25M. Se homogenizan las células en un homogenizador Potter (vidrio - teflon) y los extractos son sometidos a una centrifugación diferencial. Las condiciones se indican en Materiales y Métodos.

Estas membranas purificadas, pueden ser sometidas a una posterior repurificación resuspendiéndolas en sacarosa 0.6 M y centrifugándolas a 165.000 x g durante 2 horas sobre un colchón de sacarosa 1.2 M. En estas condiciones, la actividad se recupera en la fracción situada sobre la interfase.

Morfológicamente, estas membranas presentan la estructura descrita en la figura 12, correspondiente a membranas plasmáticas. En algunas condiciones se obtiene en esta fracción una menor contaminación con vesículas mitocondriales.

## 2- Solubilización

Si solubilizamos la enzima de la membrana plasmática con el detergente no iónico Lubrol-PX (polioxietileneter) en una concentración del 1.3% y luego sometemos a la preparación a las diferentes etapas de centrifugación: sobrenadante de 15.000 x g, membranas crudas o purificadas, la mayor parte de la actividad enzimática se recupera en la fracción sobrenadante.

Los resultados obtenidos se detallan en la tabla III.

La preparación de las diferentes fracciones se describen en Materiales y Métodos. La precipitación de la enzima se realiza centrifugando en presencia de sacarosa 0.25 M, 2 horas a 105.000g.

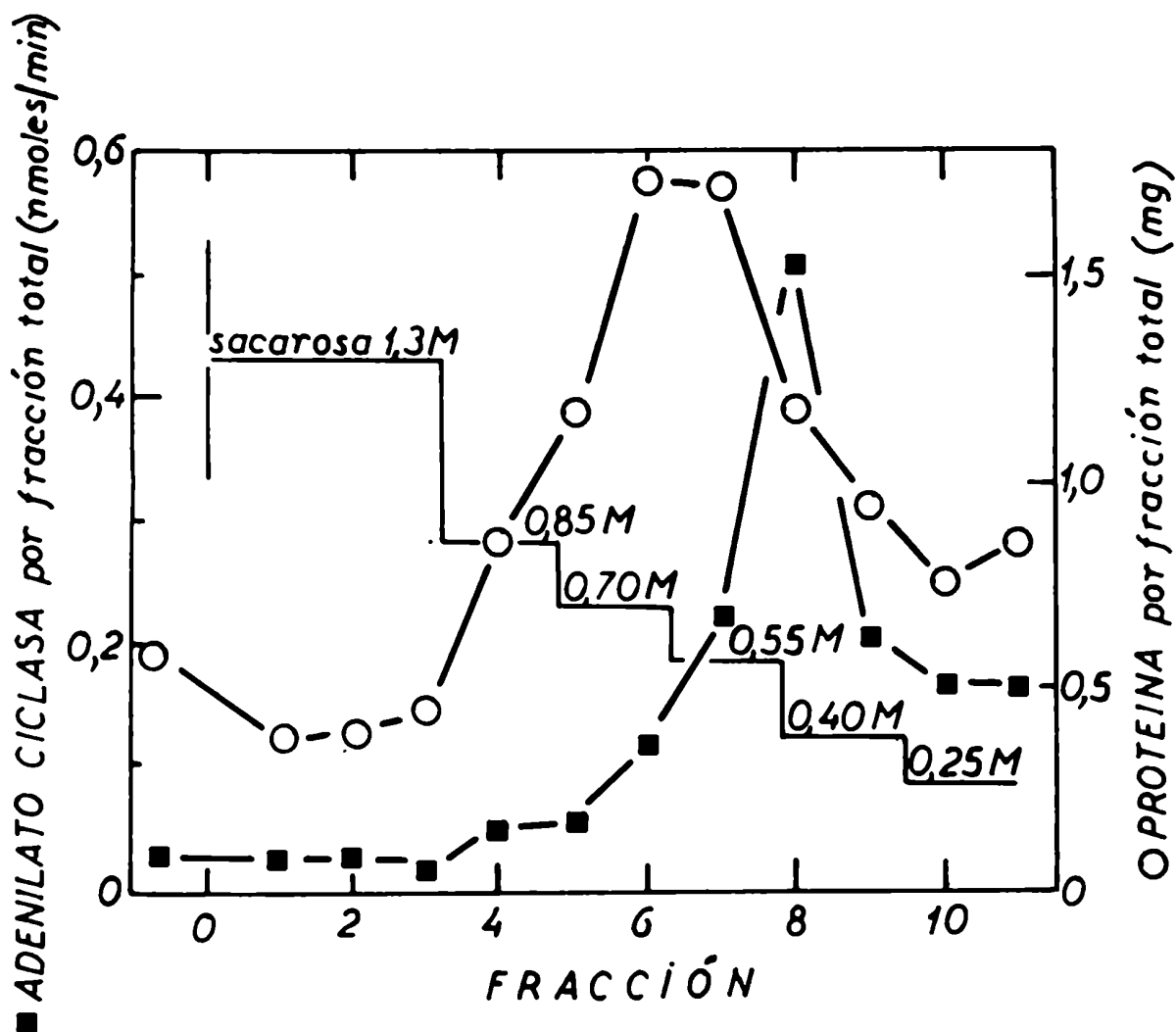


Figura 13- Gradiente de centrifugación en sacarosa de una preparación de membranas crudas (5 mg de proteína por ml). Se siembran 0.5 ml de esta preparación en un gradiente discontinuo de sacarosa. Después del tiempo indicado de centrifugación, se aspiran las diferentes fracciones y se determina en cada una de ellas actividad adenilato ciclasa y proteínas.

TABLA III. Efectos del Lubrol-PX en la sedimentación de la adenilato ciclasa en las diferentes etapas de purificación.

<u>FRACCIONES</u>	centrifugación a 105.000 xg					
	En presencia de Lubrol			En ausencia de Lubrol		
	Sob.	Ppdo.	% de NS.	Sob.	Ppdo.	% de NS.
	nmoles por minuto					
Lisado						
Sobrenadante de 15.000 xg	37.5	8.5	82	7.4	27.2	22
Membranas crudas	25.0	1.9	93	4.1	18.2	18
Membranas purificadas	15.0	1.2	93	3.3	13.1	20

<u>FRACCIONES</u>	Actividad específica	Actividad total
	nmoles/min./mg de proteína	nmoles/minuto
Lisado	0.041	30.3
Sobrenadante de 15.000 xg	0.148	34.4
Membranas crudas	0.340	27.2
Membranas purificadas.	0.950	16.3

Ensayada en ausencia de Lubrol, después de la centrifugación a 105.000 xg.

Se utilizó Lubrol-PX a una concentración de 1.3 %.

Sob.-Sobrenadante; Ppdo.-Precipitado; NS.- No-sedimentable



## II- Propiedades de la enzima

### 1- Autenticidad del producto de reacción

En las condiciones de ensayo standard ( Ver Materiales y Métodos) solamente se detecta AMP cíclico como único producto de la reacción.

Se usan dos criterios para testar el producto radioactivo formado (Figuras 14 y 15):

a) El compuesto co-cromatografía con el AMP cíclico empleado como portador.

b) Si se eluye la mancha radioactiva y se trata el compuesto obtenido con fosfodiesterasa de corazón bovino, se obtiene como único producto 5'AMP.

### 2- Requerimientos para la actividad enzimática

Si medimos adenilato ciclasa utilizando la mezcla de incubación standard:

ATP  $\alpha$  P<sub>32</sub> ----- 2.5 mM (Actividad específica  
200-400 c.p.m /pmol)

MnCl<sub>2</sub> ----- 2.5 mM

Buffer Pipes pH 6.35- 100 mM

Proteína enzimática - 0.2 mg

La cantidad de AMP cíclico producida es proporcional al tiempo de incubación y a la concentración de proteína enzimática (Figuras 16 y 17).

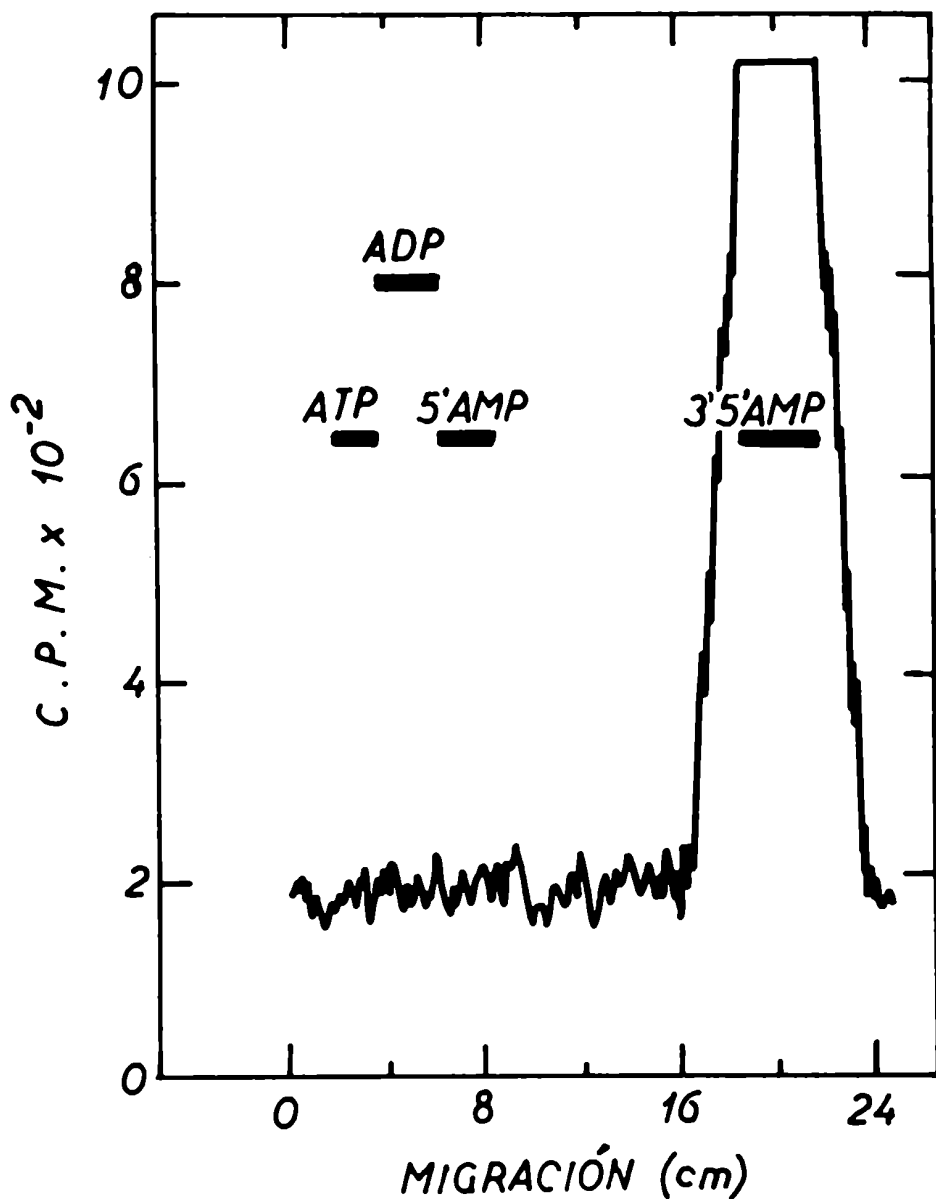


Figura 14- Cromatografía del producto de reacción obtenido después de la incubación de membranas de "slime" con  $\text{ATP}\alpha\text{P}_{32}$  y  $\text{Mn}^{++}$ . Las membranas crudas se incuban 10 minutos a  $37^\circ$ , en las condiciones de ensayo standard. El producto obtenido se purifica por columnas de intercambio Dowex 50W-X8 (100 a 200 mesh) y luego se precipita con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  y  $\text{ZnSO}_4$ , de acuerdo a Materiales y Métodos. La solución obtenida se evapora a presión reducida y se cromatografía en papel Whatman N° 3 MM, usando como solvente 2-propanol-amoníaco-agua. Se detecta la radioactividad en un radiocromatograma Scanner (Packard, modelo 7200). Esta figura representa un "scanning" del papel de cromatografía.

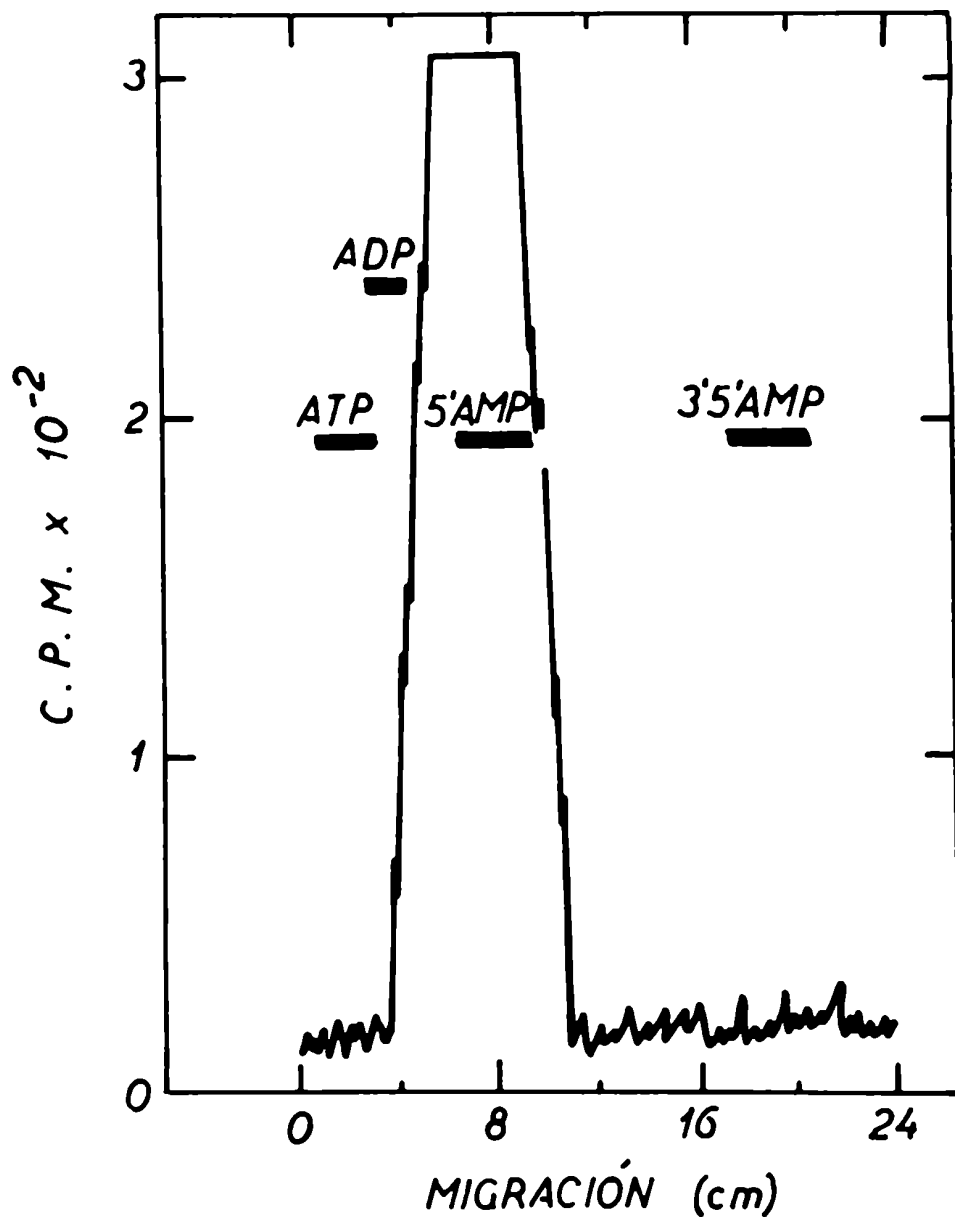


Figura 15- La mancha radioactiva con movilidad correspondiente a AMP cíclico, se lava con alcohol absoluto y se eluye con agua. Después de su evaporación a presión reducida, la muestra se incuba durante 60 minutos a 37°, en presencia de MgCl<sub>2</sub> 5 mM; buffer Tris-HCl pH 7.4, 50 mM y fosfodiesterasa de corazón bovino (50µg) El volumen total fue de 0.2 ml. La reacción se para por el agregado de 0.4 ml de metanol y calentamiento a 100° durante 3 minutos. La mezcla se cromatografía y presentamos en esta figura un "scanning" de la misma (El procedimiento seguido está descrito en la figura 14).

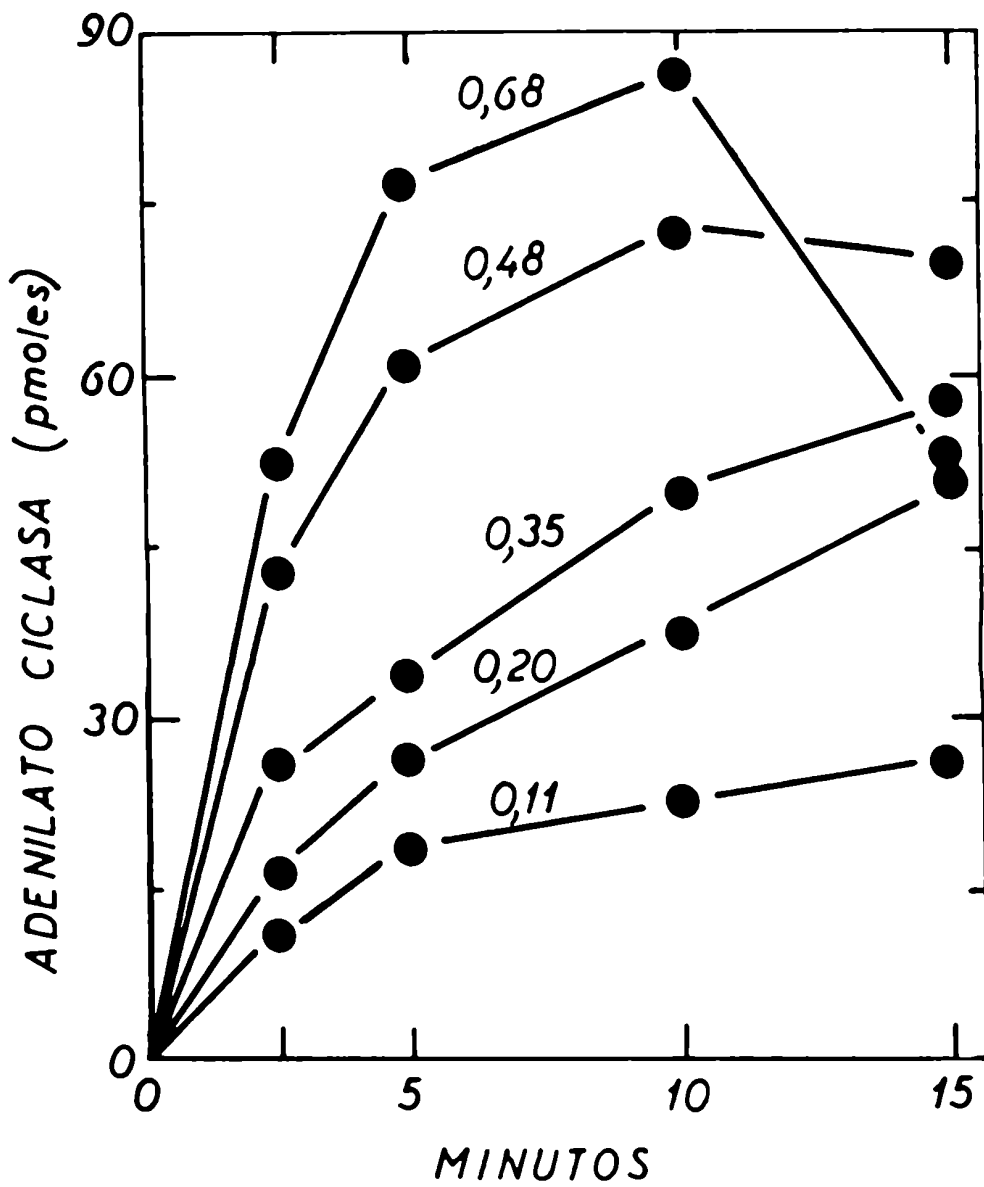


Figura 16- Producción de AMP cíclico en función del tiempo de incubación. La mezcla de ensayo contiene los miligramos de proteínas indicados. Se utilizó una preparación en la etapa de lisado ( Ver Materiales y Métodos )

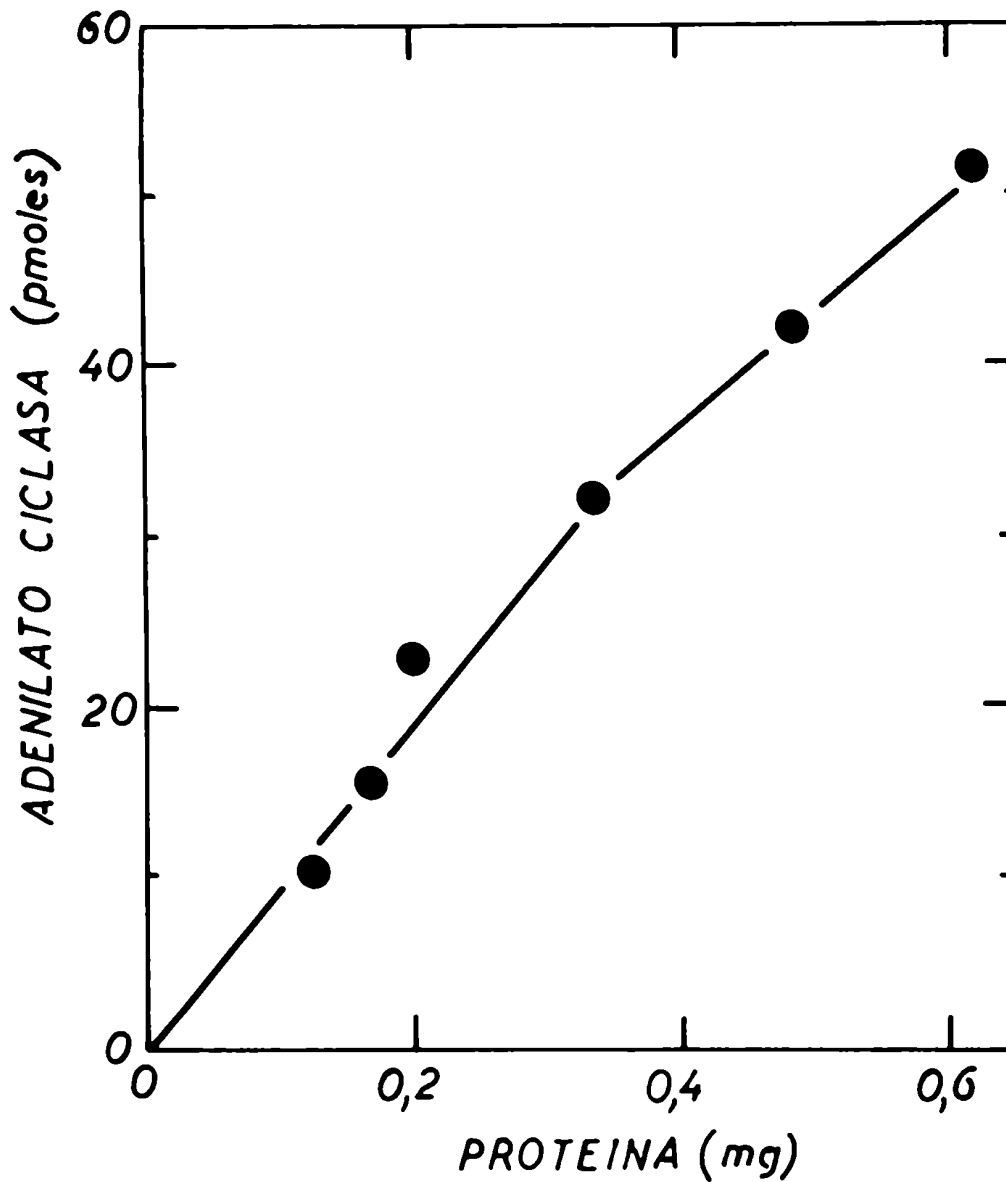


Figura 17- Dependencia de la actividad adenilato ciclasa respecto de la concentración de proteína.

Los picomoles de AMP cíclico producidos durante 2.5 minutos de incubación se grafican en función de los mg de proteína en el ensayo. (Las condiciones de ensayo se especifican en Materiales y Métodos)

La enzima requiere para su actividad el catión  $Mn^{++}$ , específicamente. Si el  $Mn^{++}$  es reemplazado por  $Ca^{++}$  o  $Mg^{++}$  la actividad detectable es insignificante (Figura 18).

La teofilina, inhibidor de la mayor parte de las AMP cíclico fosfodiesterasas, no tiene ningún efecto. El mercaptoetanol estabiliza la actividad enzimática.

En presencia de sistema regenerante de ATP (5 mM fosfo-enol piruvato, KCl 50 mM y 10  $\mu$ g de piruvato quinasa) la producción de AMP cíclico es lineal hasta los 15 minutos.

En la figura 19 graficamos actividad enzimática, en función de distintos pH en la mezcla de ensayo. La actividad máxima se observa en un rango de pH entre 5.5 y 6.3. El  $Mg^{++}$  puede sustituir al  $Mn^{++}$  en ninguno de los rangos de pH utilizados.

### 3- Modificadores enzimáticos

El  $F^-$  activador de la mayoría de las adenilato ciclasas conocidas, no tiene ningún efecto en la enzima de Neurospora crassa. El anión  $F^-$  fue ensayado en distintas condiciones, durante las sucesivas etapas de purificación enzimática. Siempre los resultados fueron negativos, no activa a la enzima.

Con el objeto de encontrar algún compuesto activador de la adenilato ciclasa, se ensayaron numerosas sustancias, tanto a alta como a baja concentración de ATP- $Mg^{++}$  o ATP- $Mn^{++}$ . Se midió actividad enzimática en presencia de: adrenalina, nor-adrenalina, 5-hidroxitriptamina, 3-hidroxitiramina, dihidroxifenilalanina, ACTH. Algunas de estas sustancias representan buenos activadores para las ciclasas animales, sin embargo, no obtuvimos ningún efecto en la ciclasa de Neurospora.

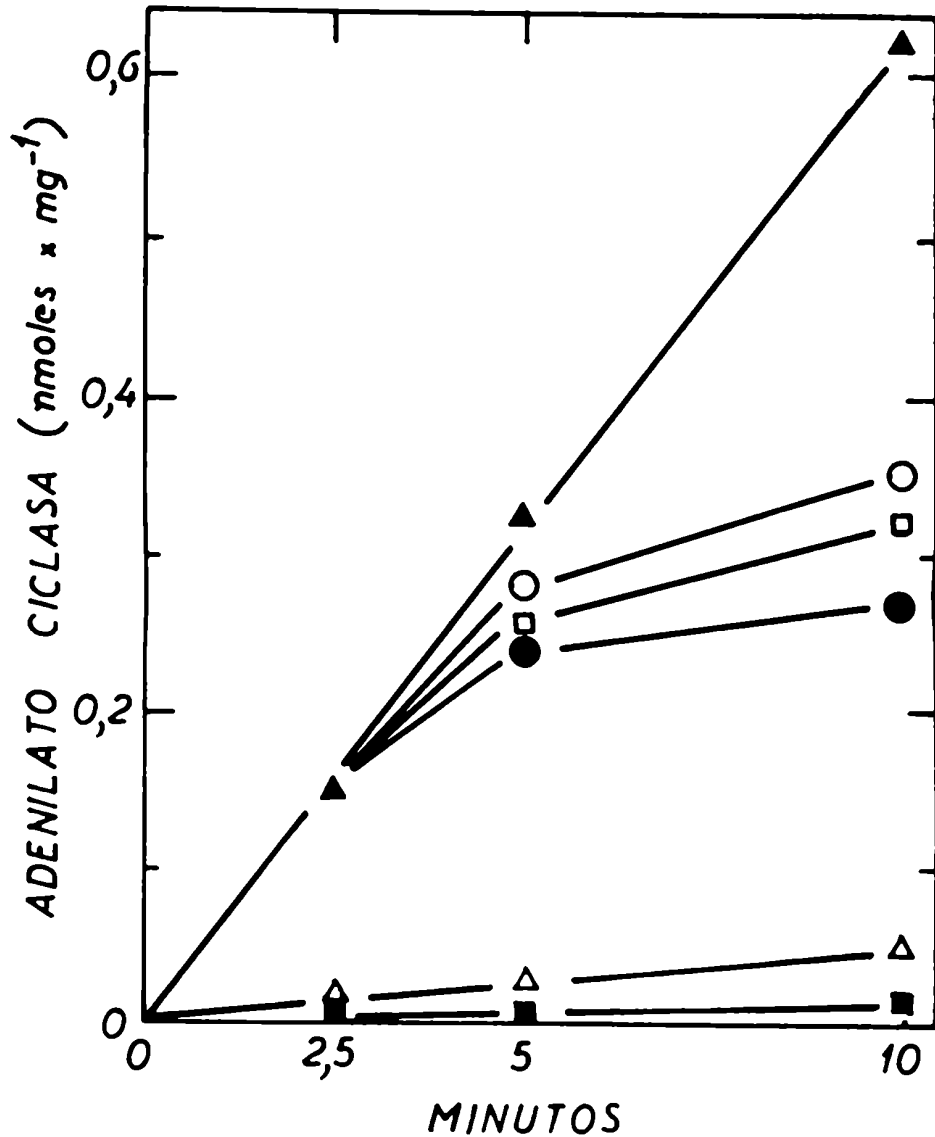


Figura 18- Actividad adenilato ciclasa (preparación en la etapa de lisado) en función del tiempo de incubación. A la mezcla standard de reacción se le agregan los siguientes compuestos: ● nada; ○ mercaptoetanol 0.5 mM; □ teofilina 10 mM; ▲ PEP 5 mM, KCl 50 mM y 10  $\mu$ g de piruvato quinasa. En otras condiciones el  $MnCl_2$  se reemplazó por  $MgCl_2$  (  $\Delta$  ) o  $CaCl_2$  (  $\blacksquare$  ).

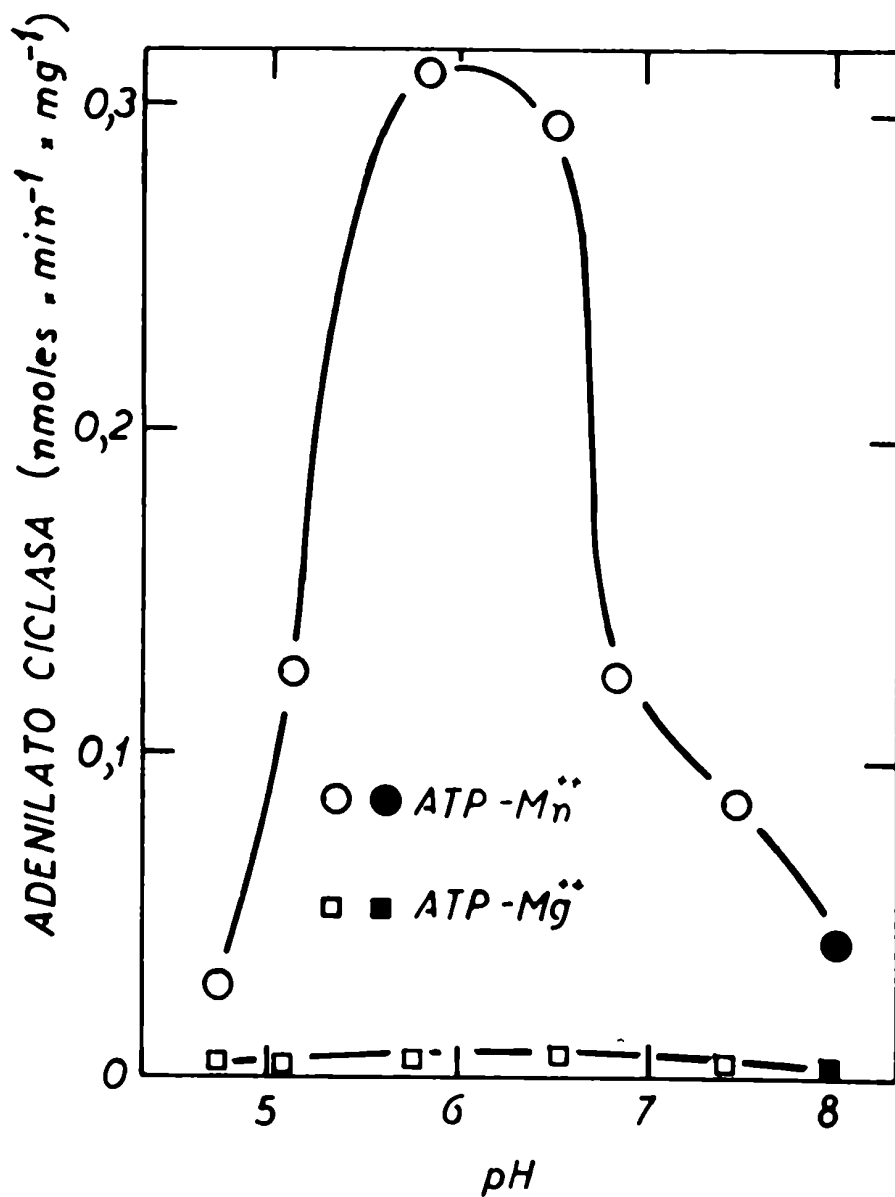


Figura 19- Actividad de adenilato ciclasa en función del pH. La enzima corresponde a una preparación de membranas crudas. Se ensaya en presencia de buffer Tris-maleato, 100 mM (○) o Tris-HCl, 100 mM (●) a los pH indicados en el gráfico. La concentración de ATP y Mn<sup>++</sup> fue de 2.5 mM. Los tiempos de incubación de 2.5 minutos. Las demás condiciones se describen en Materiales y Métodos.



#### IV- Cinética

##### Resultados y discusión

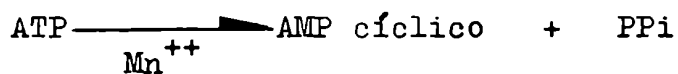
Todos los experimentos de cinética se realizaron durante tiempos muy cortos de incubación, 1,5 minutos, en ausencia de teofilina, mercaptoetanol o sistema regenerante de ATP.

Utilizamos como buffer el piper (Piperazina-N-N'-bis-etanosulfonato de sodio) a pH 6.35. Este buffer no forma complejos estables con los cationes divalentes (177).

La actividad específica del ATP & P<sub>32</sub> osciló entre 200 y 5000 c.p.m. por pmol.

Bajo estas condiciones, la actividad enzimática es proporcional al tiempo de incubación, tanto a altas (2.5 mM) como a bajas (0.25 mM) concentraciones de ATP-Mn<sup>++</sup> (Figura 20).

En la reacción catalizada por la adenilato ciclasa:



El sustrato auténtico es el complejo ATP-Mn<sup>++</sup>. Estos datos son confirmados, por los valores de las constantes de estabilidad de los complejos entre nucleótidos y cationes divalentes. Para los complejos Mg<sup>2-</sup>-ATP y HMg<sup>-</sup>-ATP, las constantes tienen un orden de

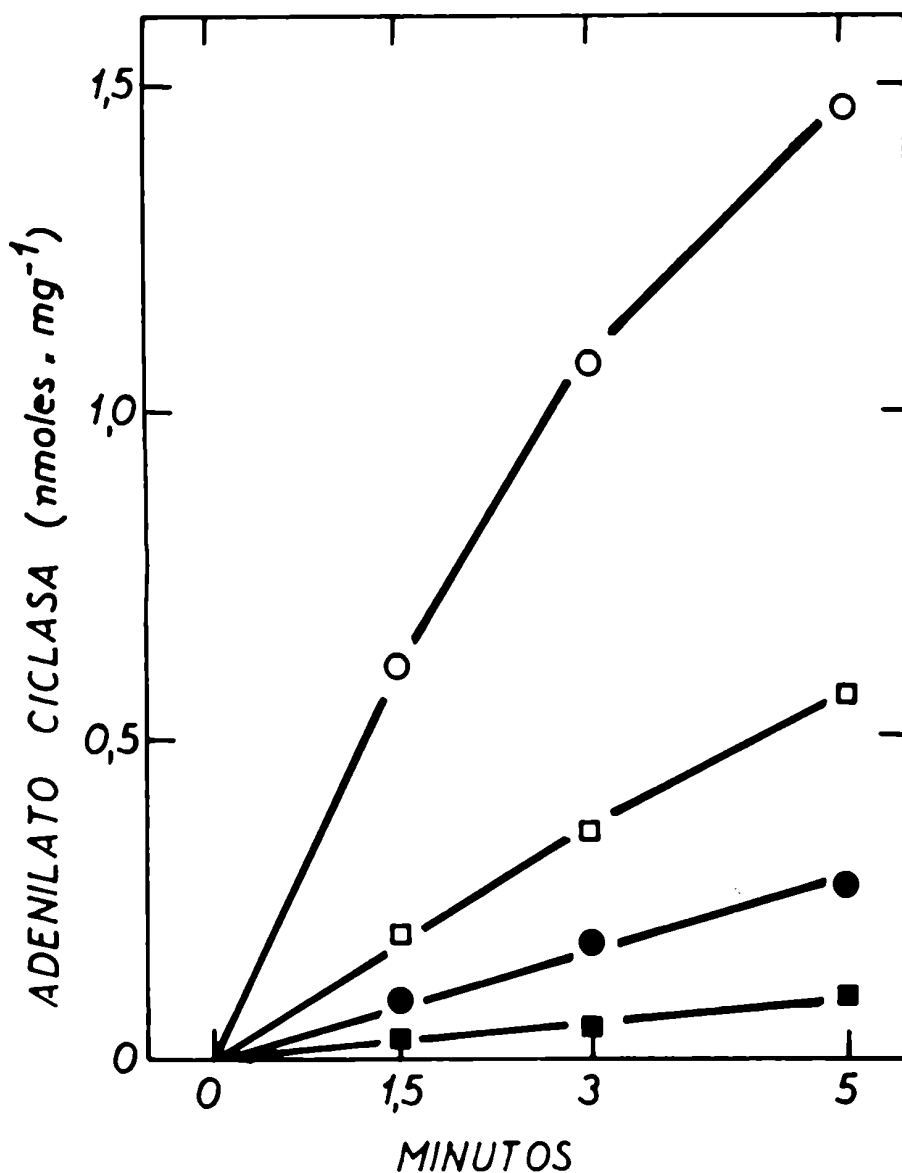


Figura 20- Actividad de adenilato ciclasa en función del tiempo de incubación. La mezcla de reacción contiene: buffer pipes, 100 mM pH 6.35; enzima (preparación de membranas crudas) 0.2 mg de proteína; ATP  $\alpha$  P<sub>32</sub> y MnCl<sub>2</sub>, 2.5 mM (○); o ATP  $\alpha$  P<sub>32</sub> 0.5 mM más MnCl<sub>2</sub> 1 mM (□); o ATP  $\alpha$  P<sub>32</sub> 0.25 mM y MnCl<sub>2</sub> 0.25 mM (■); o ATP  $\alpha$  P<sub>32</sub> 0.5 mM y MnCl<sub>2</sub> 0.5 mM (●). El volumen total fue de 0.1 ml. Las incubaciones se realizaron a 37° durante los tiempos indicados.

magnitud de  $10^5$  y  $10^3$  M respectivamente (178-180).

En la literatura se encuentran pocos datos para los complejos del  $Mn^{++}$  sin embargo, según Walaas (181), las constantes de estabilidad tienen unos valores ligeramente superiores a los del  $Mg^{++}$ -ATP.

El valor del pH determinado para la reacción:



es de 5.25 (177). Por lo tanto, para valores de pH de 5.26 o superiores, predominan las especies con elevadas constantes de estabilidad, pero a pH 5.1, los principales componentes son los complejos con baja constante de estabilidad.

En las figuras 21 y 22, representamos actividad enzimática en función de distintas concentraciones del complejo ATP- $Mn^{++}$ . La curva es sigmoidea, clásica en los sistemas alostéricos. El gráfico de Hill nos da para n un valor de 2.

Cantidades crecientes de  $Mn^{++}$  en exceso (por encima de la concentración necesaria para complejar el ATP), produce una modificación en la cinética de la enzima. La velocidad de reacción aumenta a bajas pero no a altas concentraciones de ATP- $Mn^{++}$ . El comportamiento de la enzima tiende a ser michaeliano, a una concentración de  $Mn^{++}$  en exceso de 0.5 mM. En estas condiciones **el**

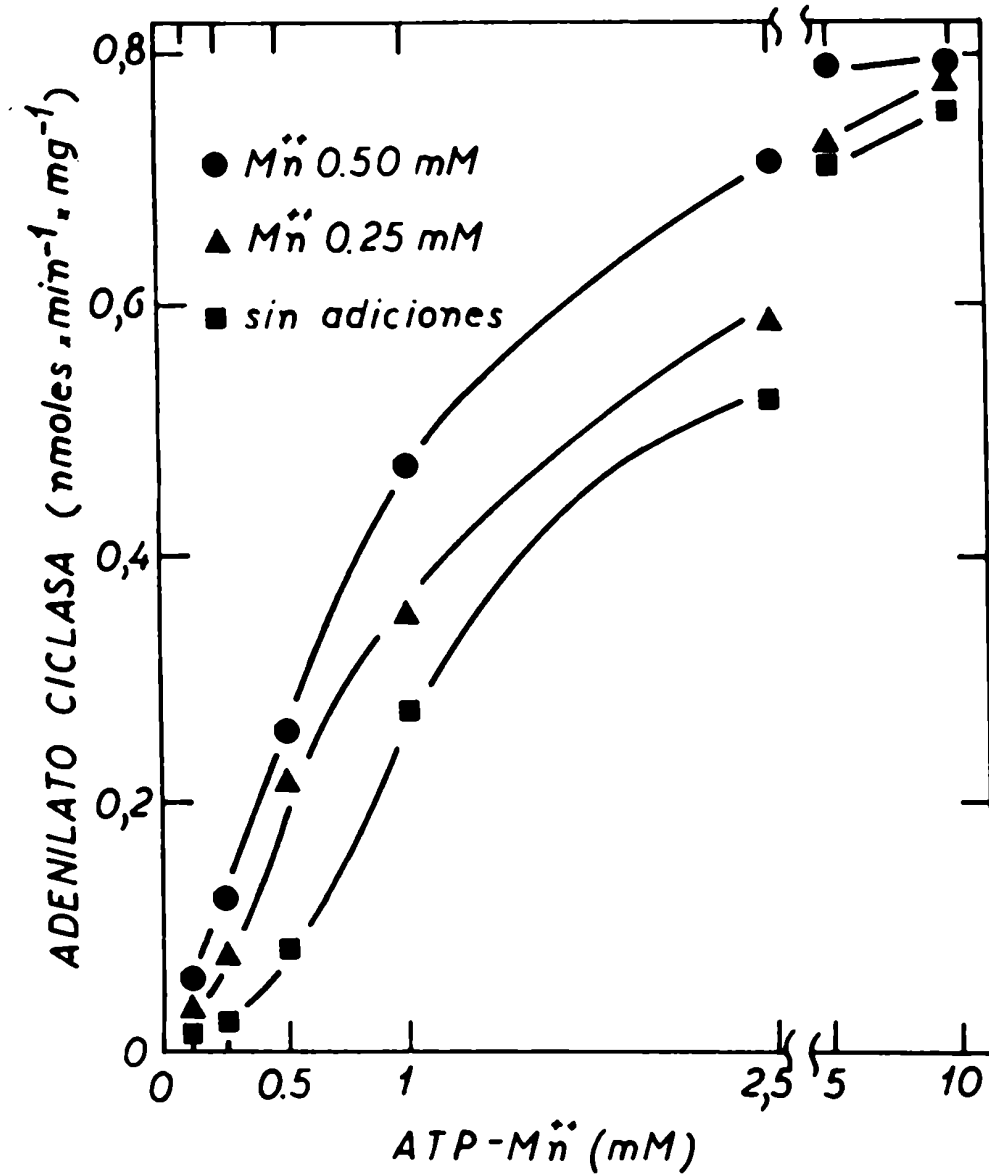


Figura 21- Actividad de adenilato ciclasa en función de distintas concentraciones de ATP-Mn<sup>++</sup>. La mezcla de incubación contiene las concentraciones de ATP y MnCl<sub>2</sub> indicadas en abscisa. Algunas mezclas recibieron una cantidad en exceso de MnCl<sub>2</sub>. Los tiempos de incubación fueron de 1.5 minutos. Las otras condiciones se describen en la figura 20 y en Materiales y Métodos.

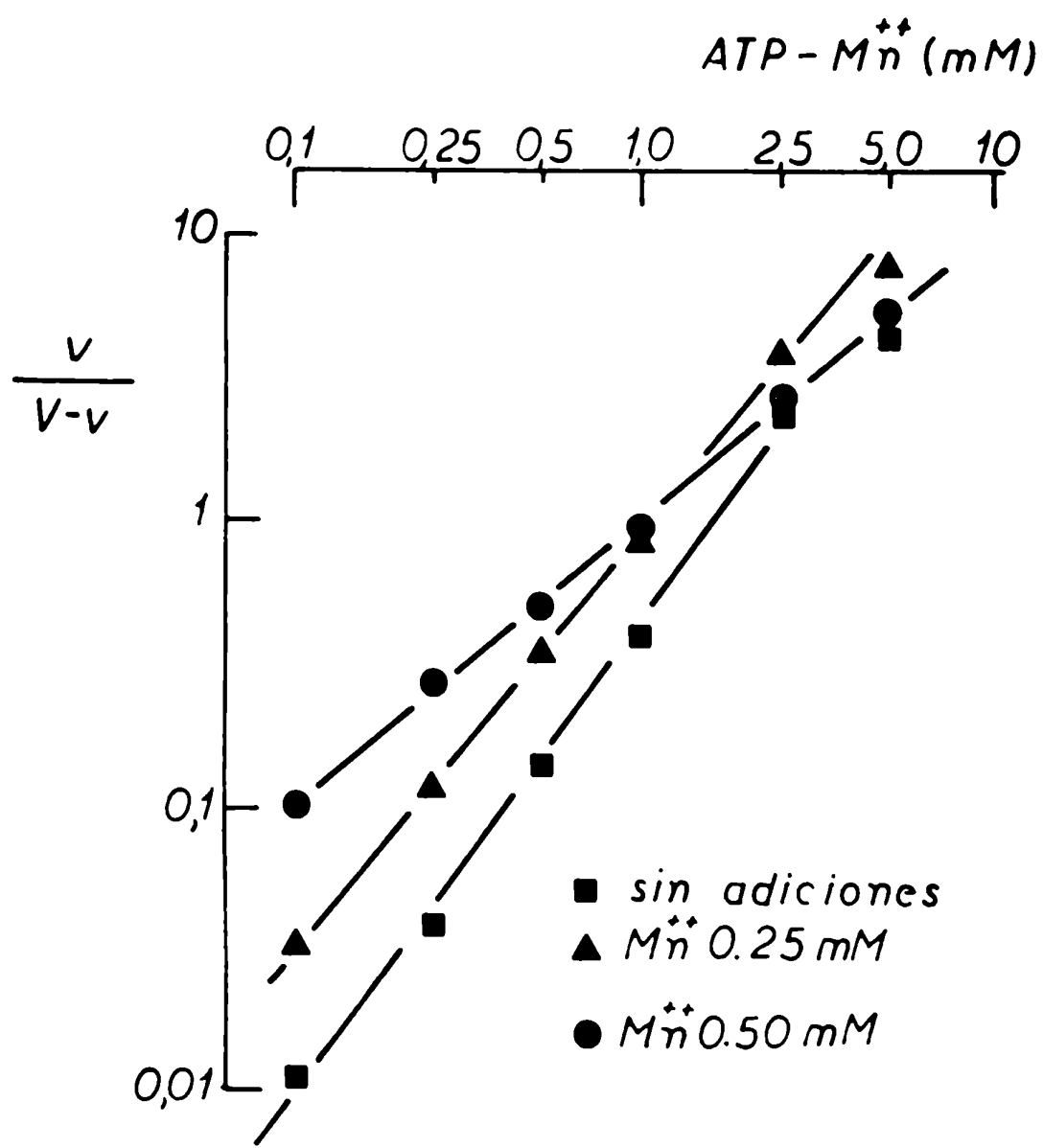


Figura 22- Gráfico de Hill correspondiente a la figura 21. Las condiciones de ensayo se especifican en esa figura.

gráfico de Hill nos da para  $n$  un valor cercano a 1.

Cuando la concentración de  $Mn^{++}$  en exceso se incrementa de 0 a 0.5 mM, la concentración del sustrato en la cual la enzima alcanza la velocidad máxima (L 0.5), disminuye de 1.5 a 1 mM.

Los resultados presentados en las figuras 21 y 22 pueden ser interpretados de dos formas diferentes:

- a) La enzima presenta interacciones cooperativas con su sustrato.
- b) La enzima requiere  $Mn^{++}$  libre para su máxima actividad
- c) Ambas posibilidades

Está claramente establecido que, cuando aumenta la concentración equimolecular de  $ATP-Mn^{++}$ , también se incrementa la concentración de  $Mn^{++}$  o  $ATP$  libres existentes en la mezcla. En el rango de concentraciones de  $ATP-Mn^{++}$ , en el cual se estudió la cinética (0.1 a 10 mM), el incremento en la concentración de especies libres es de 0.1 a 10  $\mu$ molar, si el complejo débil  $HMn^{-}-ATP$  es el único componente, pero si predomina el complejo fuerte  $Mn^{2-}-ATP$ , la concentración de especies libres es de dos órdenes menores de magnitud. Por lo tanto los requerimientos de  $Mn^{++}$  libre fueron posteriormente estudiados.

En las figuras 23 y 24 presentamos los resultados obtenidos

cuando se estudió la cinética, manteniendo constante la concentración de ATP-Mn<sup>++</sup> y variando el Mn<sup>++</sup> en exceso agregado. Se obtuvieron los siguientes resultados:

a) A bajas concentraciones de ATP-Mn<sup>++</sup> (0.25 a 0.50 mM), el gráfico de actividad enzimática en función de la concentración de Mn<sup>++</sup> en exceso es de tipo sigmoideo. El gráfico de Hill nos da para n un valor, aproximadamente, de 2

b) La concentración de Mn<sup>++</sup> necesaria para llegar a la mitad de la máxima estimulación disminuye de 0.50 a 0.25 mM cuando aumenta la concentración del sustrato ATP-Mn<sup>++</sup> de 0.25 a 0.50 mM (Tabla IV). Por consiguiente, el requerimiento por el Mn<sup>++</sup> libre es 25 veces mayor que la concentración del catión libre existente en las condiciones más extremas del experimento presentado en la figura 21: a una concentración de ATP-Mn<sup>++</sup> de 10 mM, sin el agregado de Mn<sup>++</sup> en exceso y suponiendo que existiese como única especie presente el complejo débil HMn<sup>-</sup>-ATP.

c) La activación es parcialmente reversible, cuando la concentración del catión es muy alta. Este inesperado resultado, podría explicarse, suponiendo que la eficiencia del sistema adenilato ciclasa disminuye cuando se favorece la formación del hipotético complejo ATP- (Mn<sup>++</sup>)<sub>2</sub>.

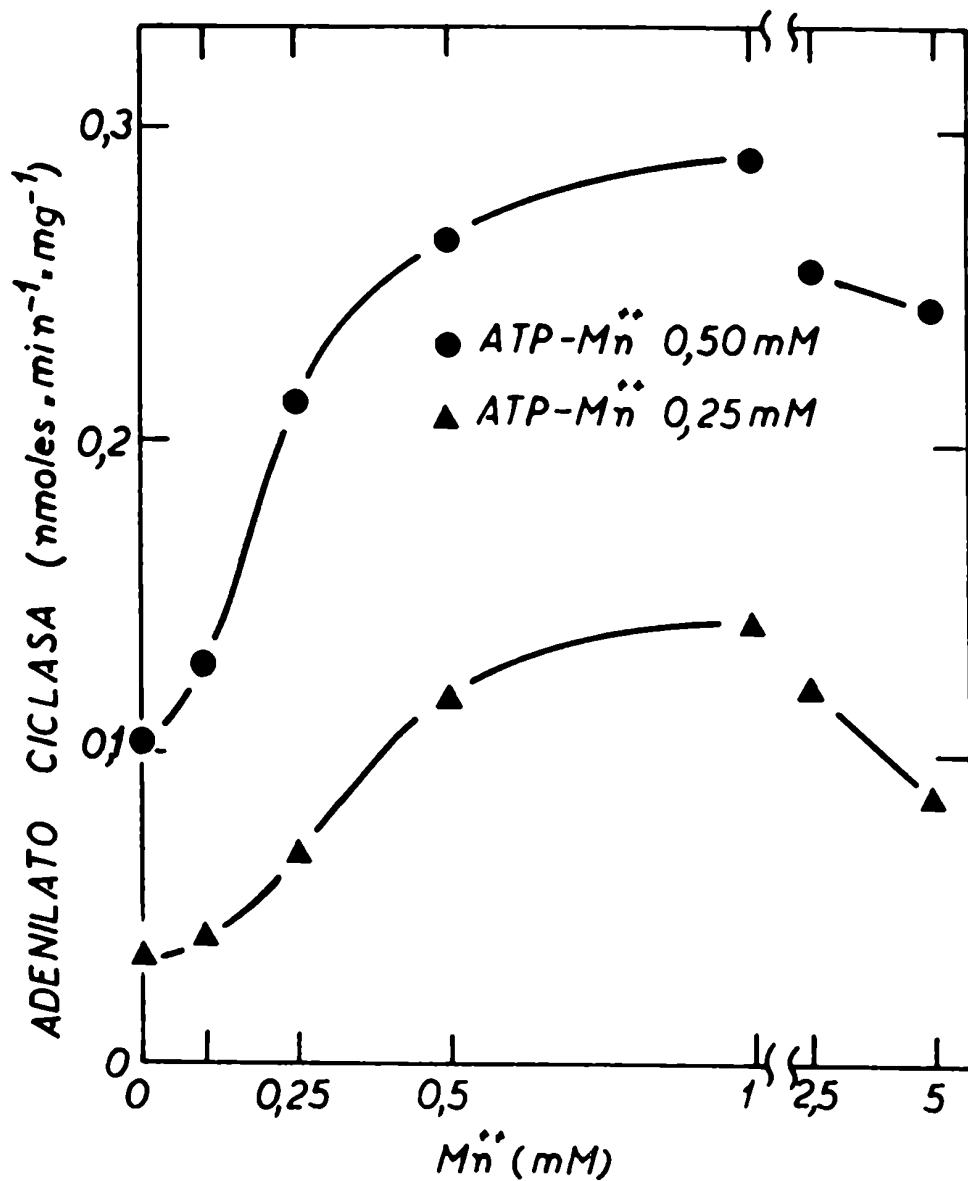


Figura 23- Actividad de adenilato ciclasa en función de la concentración de  $Mn^{++}$  en exceso a la del complejo  $ATP-Mn^{++}$ . Las mezclas de ensayo contienen la concentración de  $Mn^{++}$  en exceso indicadas en la abscisa, además de la concentración correspondiente al complejo  $ATP-Mn^{++}$  0.25 mM o 0.5 mM. El tiempo de incubación fue de 1.5 minutos. Otras condiciones se indican en Materiales y Métodos.



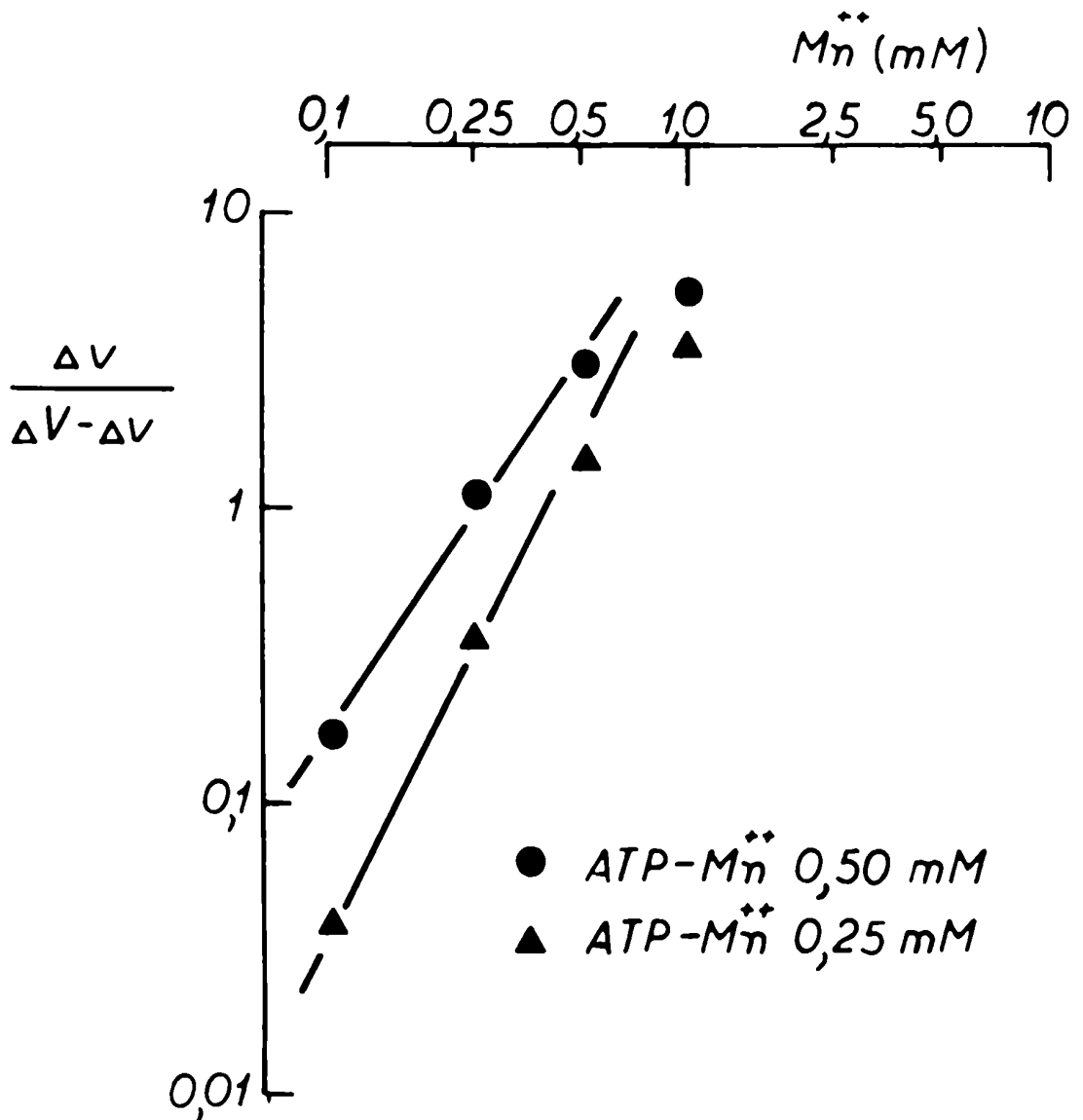


Figura 24- Gráfico de Hill correspondiente a la figura 23.

TABLA IV. Parámetros cinéticos de la reacción catalizada por la adenilato ciclasa de Neurospora crassa.

Enzima	Exp.	Ligando	pH	Efector			$L_{0.5}$	$\bar{n}$
				$Mn^{++}$	ATP- $Mn^{++}$	AMP		
mM								
<u>Membranas</u>								
<u>crudas</u>	1	ATP- $Mn^{++}$	6.35				1.5	1.9
			6.35	0.10			1.4	1.8
			6.35	0.25			1.0	1.0
			6.35	0.50			1.1	1.0
	2	ATP- $Mn^{++}$	5.10				4.0	1.5
			6.35				1.5	1.9
			7.90				5.0	1.8
	3	ATP- $Mn^{++}$	6.35				1.5	1.8
			6.35			1.0	2.0	1.8
	4	$Mn^{++}$	6.35		0.25		0.5	2.3
			6.35		0.50		0.25	2.0
<u>No-sedi- mentable</u>		ATP- $Mn^{++}$	6.35				0.76	2.0
			6.35	0.50			0.60	1.3

Exp- Experimento

También se estudió la cinética de la adenilato ciclasa, fijando la concentración de uno de los componentes del complejo utilizado como sustrato,  $Mn^{++}$  y variando la del otro, ATP. Los resultados obtenidos son presentados en la figura 25. Se observa que utilizando concentraciones de ATP superiores a las del  $Mn^{++}$ , se inhibe la reacción. Este efecto podría explicarse de acuerdo a las siguientes posibilidades:

a) El ATP y el  $Mn^{++}$  compiten por el sitio (s) catalítico. Esta posibilidad se estudió usando el 5'AMP como análogo del ATP. De acuerdo a las figuras 26 y 27, cuando se estudió la cinética de la enzima a concentraciones variables del sustrato ATP- $Mn^{++}$ , el 5'AMP no modificó el  $n$  de Hill. Sin embargo, aumentó el punto correspondiente a la mitad de la máxima saturación (Inhibidor competitivo).

b) La reacción requiere un catión divalente libre. A altas concentraciones el ATP tiene un efecto quelante sobre el  $Mn^{++}$  libre. Sin embargo, en una de las condiciones más extremas (Figura 25) a 10 mM de ATP y 0.50 mM de  $MnCl_2$ , la adenilato ciclasa es aún activa. En estas condiciones, la concentración esperada de  $Mn^{++}$  libre para el complejo débil ( $HMn^- - ATP$ ) es de 0.5  $\mu M$  y de 0.005  $\mu M$  para el complejo fuerte ( $Mn^{2-} - ATP$ ); esta última es la concentración más probable.

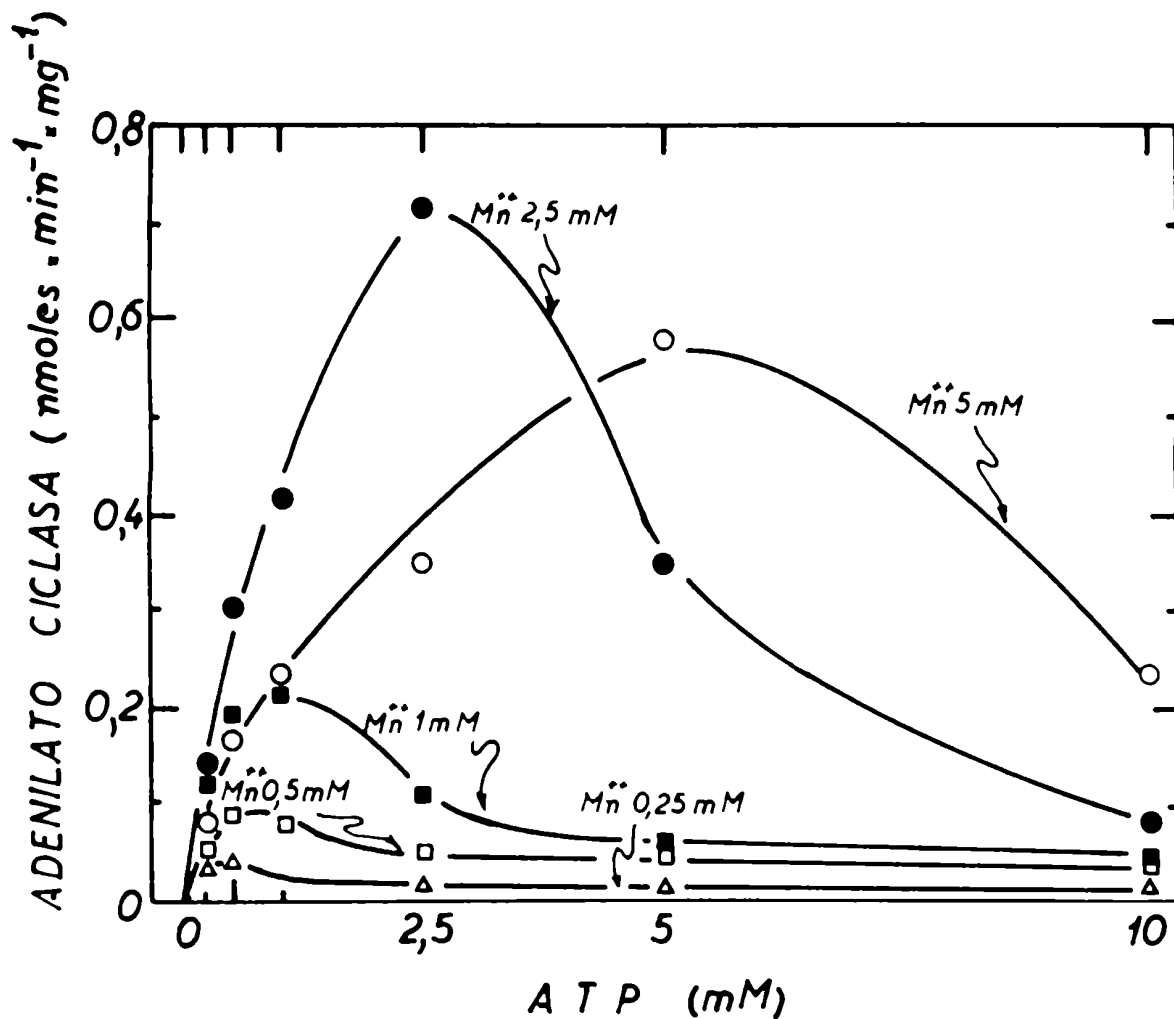


Figura 25- actividad de adenilato ciclasa en función de diferentes concentraciones de  $Mn^{++}$ . La mezcla de incubación contiene las concentraciones de ATP indicadas en la abscisa y las de  $MnCl_2$  indicadas en la figura. En la figura 21 se especifican las demás condiciones de ensayo.

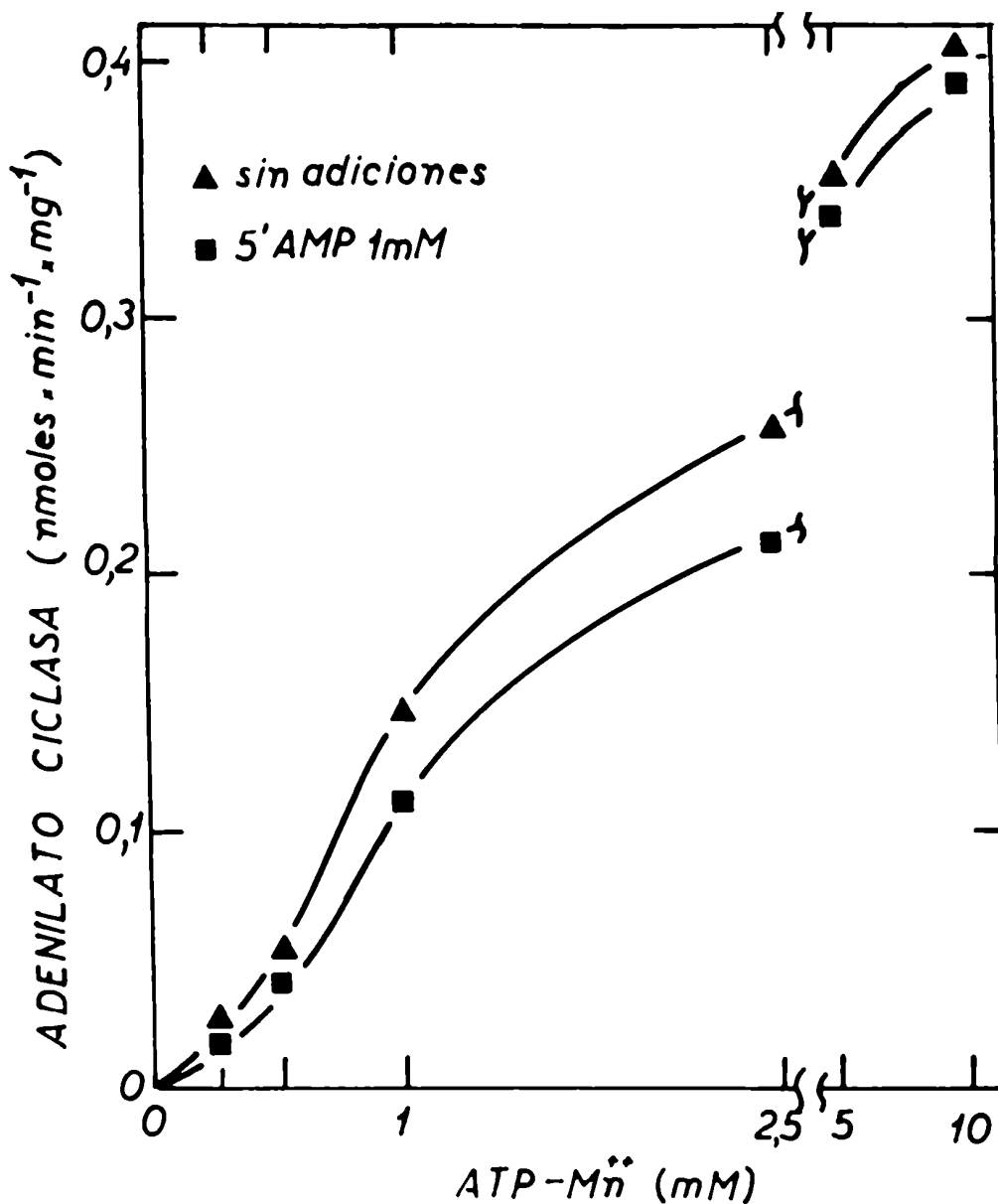


Figura 26- Actividad de adenilato ciclasa en función de la concentración de ATP-Mn<sup>2+</sup>, en presencia ( ■ ) o ausencia ( ▲ ) de 5'AMP, 1 mM.

Las mezclas de incubación contienen las concentraciones de ATP y MnCl<sub>2</sub> indicadas en la abscisa. En la figura 21 se especifican las demás condiciones de ensayo.

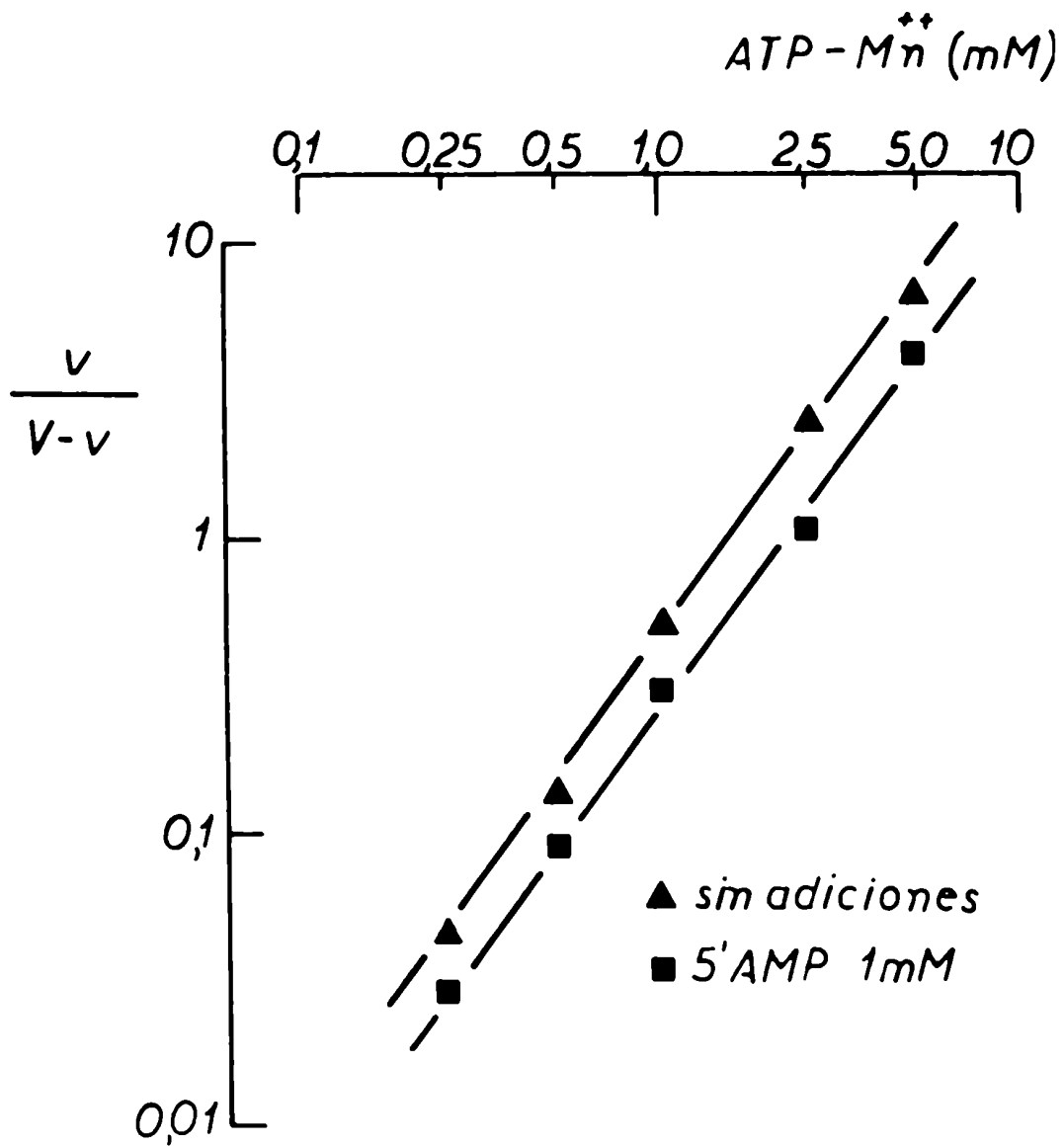


Figura 27- Gráfico de Hill correspondiente a la figura 26.

Estos bajos niveles sólo alcanzarían a formar complejos del tipo metaloproteínas, pero no los esperados en los experimentos presentados en las figuras 21 y 23. Tampoco se pudo aislar de este sistema el tipo de complejo metaloenzima

c) La enzima tiene un sitio adicional para el ATP como metabolito regulador. No existe ninguna evidencia experimental que favorezca esta posibilidad.

Por lo tanto, podemos establecer, que el ATP libre compite con el sustrato  $\text{ATP-Mn}^{++}$  por el sitio (s) catalítico de la enzima.

En las figuras 28 y 29 presentamos resultados de actividad enzimática en función de la concentración de sustrato  $\text{ATP-Mn}^{++}$  a diferentes valores de pH. La máxima velocidad y afinidad se tienen a un pH óptimo de 6.35. Las velocidades máximas son de 0.50, 0.80 y 0.67 nmoles por minuto por mg de proteína a pH de 5.10, 6.35 y 7.90, respectivamente. Los valores de  $K_m$  se presentan en la tabla IV. En esta tabla también podemos observar que la sigmoicidad de las curvas, determinadas por el  $n$  de Hill, disminuye a pH bajos. Esto podría explicarse por un aumento del  $\text{Mn}^{++}$  libre, debido a la disociación del complejo débil  $\text{HMn}^- \text{-ATP}$ , especie predominante a ese pH.

Sin embargo, por las razones discutidas anteriormente, podemos inferir que las interacciones entre los sitios catalíticos son

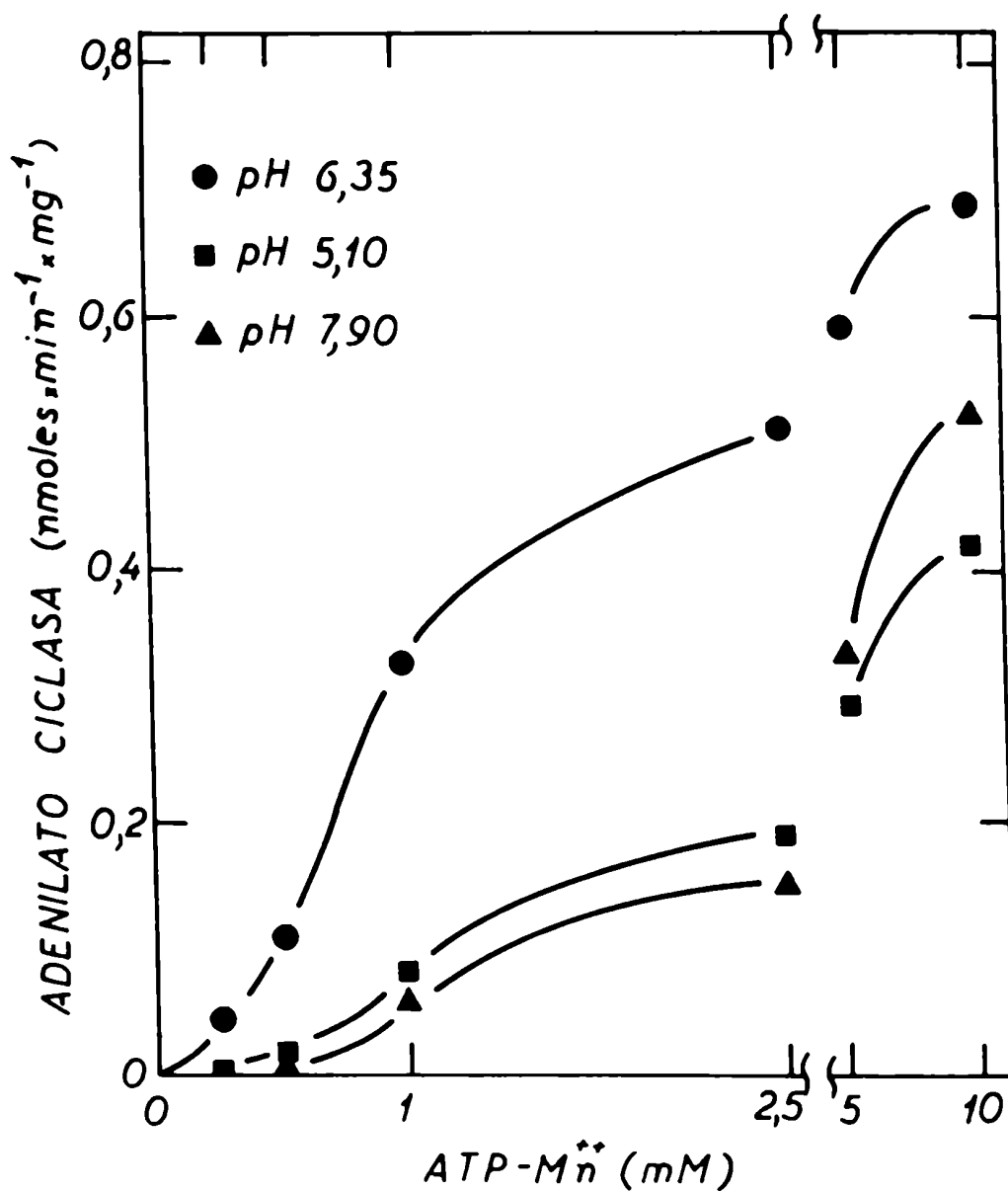


Figura 28- Actividad de adenilato ciclase en función de distintas concentraciones de ATP-Mn<sup>++</sup>, a diferentes pH. La reacción se determina utilizando buffer 2-(N-morfolino) etano sulfonato, pH 5.10, 100 mM o buffer pipes, pH 6.35 y 7.90, 100mM. Las otras condiciones se describen en Materiales y Métodos.



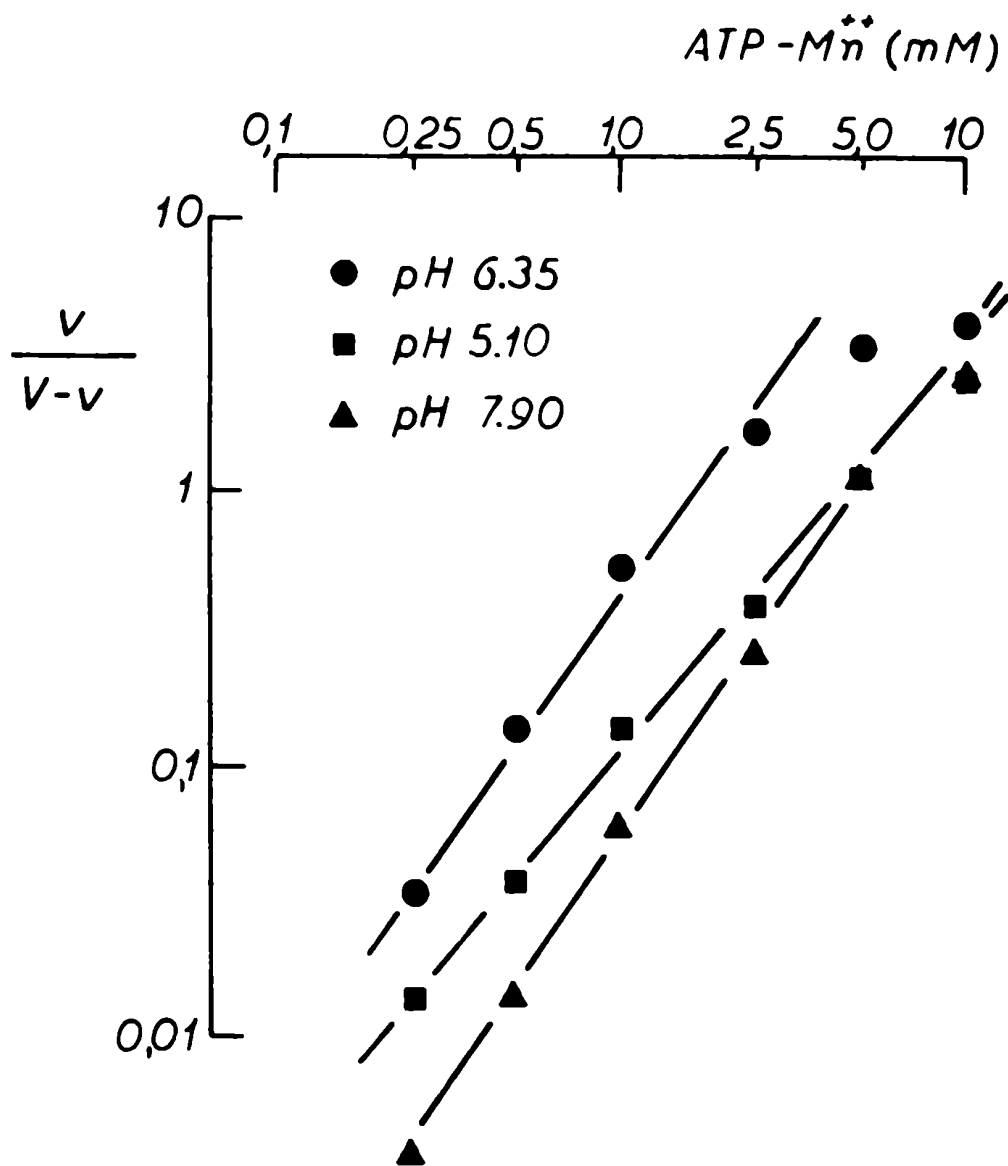


Figura 29- Gráfico de Hill correspondiente a la figura 28.

mayores a bajos pH. En este sentido es bien conocido el efecto del pH como modificador en las interacciones cooperativas de los sustratos, en diferentes sistemas enzimáticos (182-185).

Dijimos anteriormente (Solubilización de la enzima) que el detergente no-iónico Lubrol-PX nos permite obtener a la enzima en forma no-sedimentable. Nos resultó interesante estudiar la cinética de la enzima solubilizada.

En las figuras 30 y 31 presentamos resultados acerca del comportamiento cinético de la enzima tratada con Lubrol.

Alguna de las propiedades cinéticas de esta preparación enzimática son iguales a la obtenida para la adenilato ciclasa pegada a membrana. Cuando determinamos actividad enzimática en función de la concentración del sustrato (ATP-Mn<sup>++</sup>), la curva es de tipo sigmoidal. Los valores de n según el gráfico de Hill son iguales a 2.

La adición de Mn<sup>++</sup> en exceso, respecto a la necesaria para formar el complejo, modifica la cinética enzimática. El comportamiento de la enzima tiende a ser michaeliano. En presencia de Mn<sup>++</sup> en exceso, 0.5 mM, el valor de n es de 1.3.

La concentración de sustrato en la cual la enzima alcanza la mitad de la velocidad máxima (L 0.5) disminuye a medida que aumenta la concentración de Mn<sup>++</sup>. En la tabla IV presentamos un resumen de estos resultados. Podemos observar que el Km para el ATP-Mn<sup>++</sup> obtenido con la enzima no-sedimentable es menor que el obtenido con la particulada.

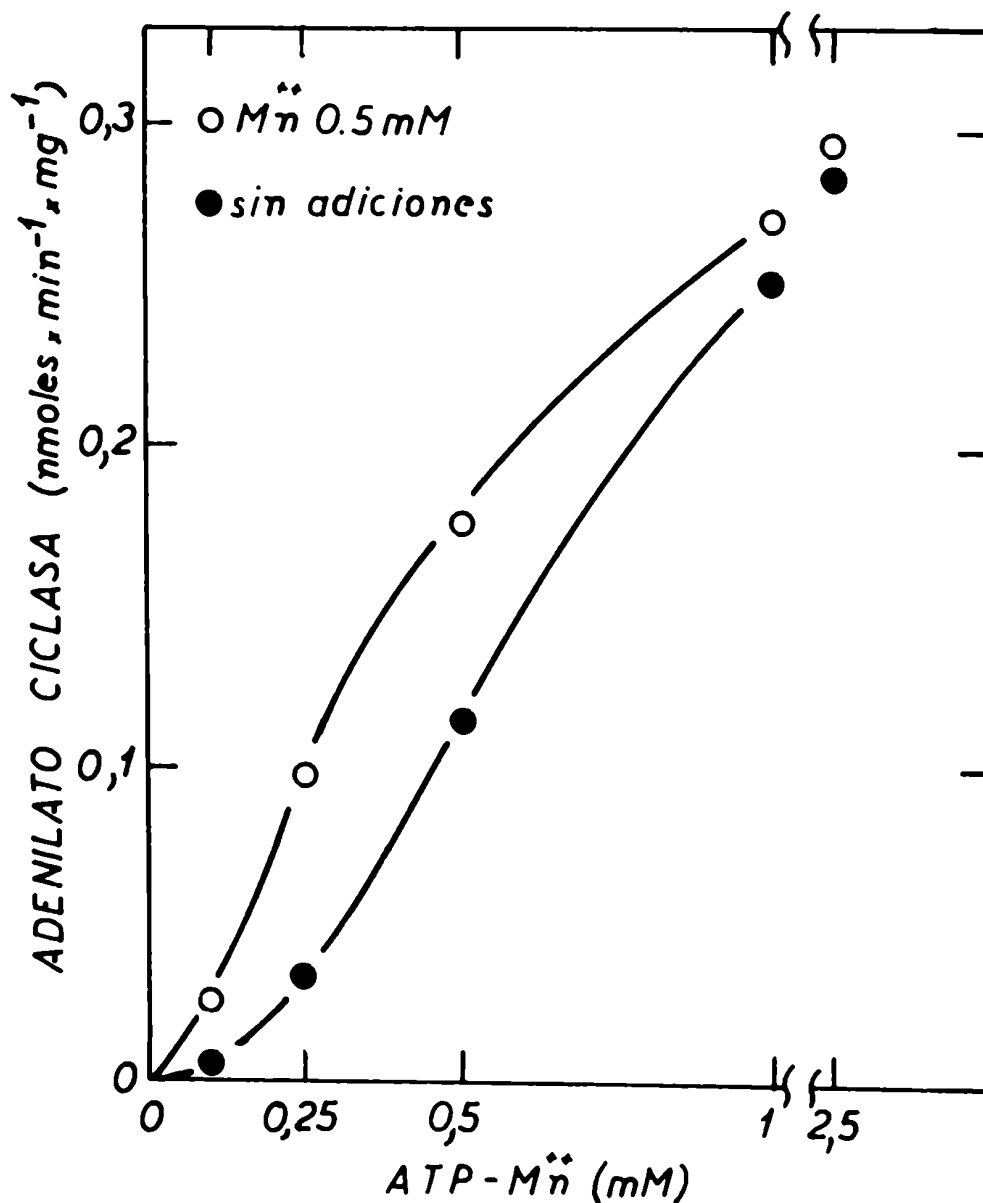


Figura 30- Actividad adenilato ciclasa en función de la concentración de sustrato ATP-Mn<sup>++</sup>, utilizando como fuente de enzima la preparación tratada con Lubrol.

Utilizamos como enzima el sobrenadante obtenido después de la centrifugación de 120 minutos a 105.000 x g, de una preparación de membranas crudas tratadas con Lubrol-Px 1.3%. La mezcla de ensayo contiene las concentraciones de ATP y MnCl<sub>2</sub> indicadas en la abscisa ( ● ). Algunas muestras contienen Mn<sup>++</sup> en exceso 0.5 mM ( ○ ). Las otras condiciones se especifican en Materiales y Métodos.

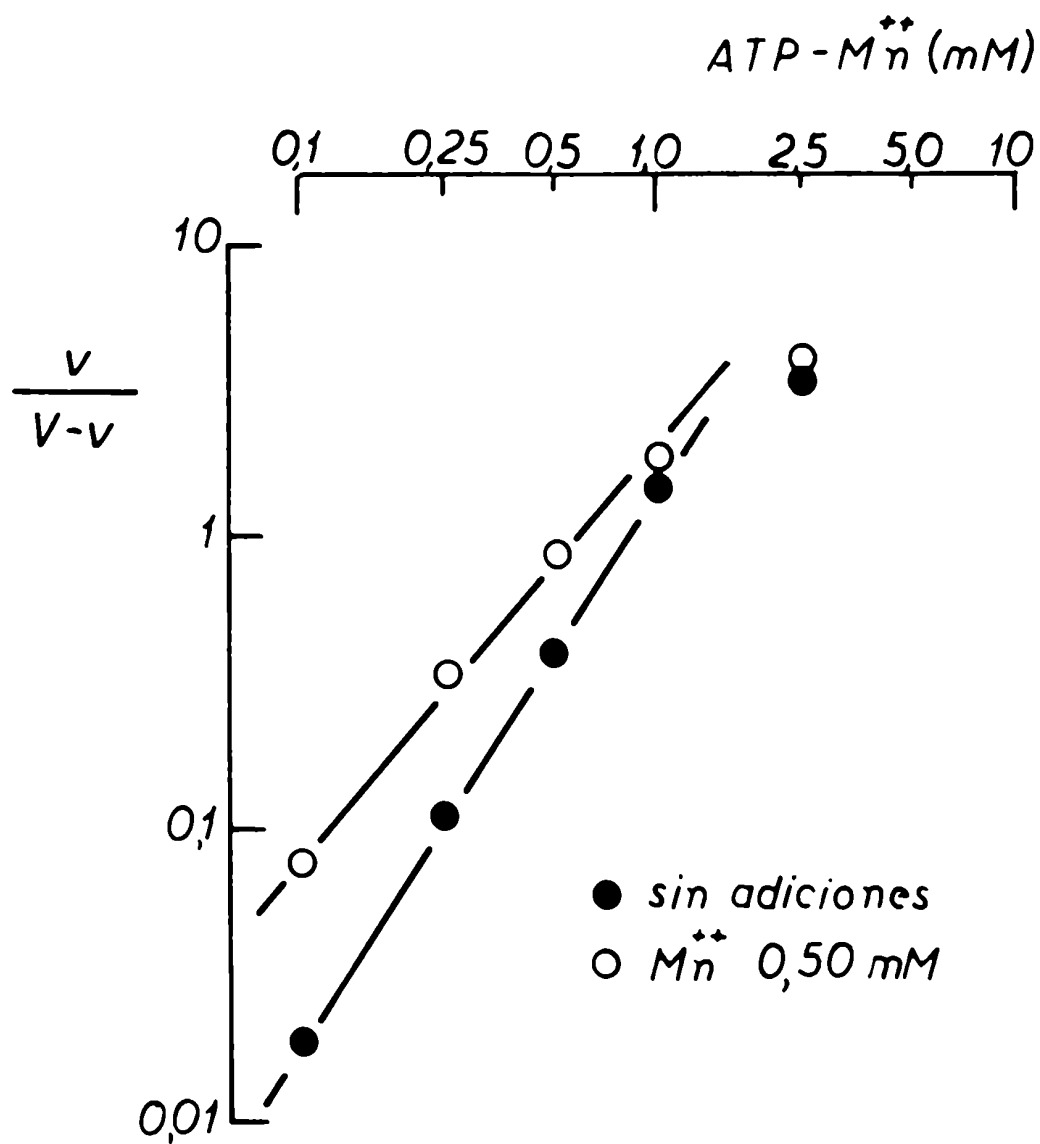


Figura 31- Gráfico de Hill correspondiente a la figura 30.

De los experimentos sumarizados en la tabla IV podemos obtener las siguientes conclusiones:

- a) La enzima tiene como sustrato al complejo ATP-Mn<sup>++</sup>.
- b) El complejo ATP-Mn<sup>++</sup> puede ser desplazado del sitio (s) catalítico de la enzima por el ATP.
- c) El Mn<sup>++</sup> activa la reacción catalizada por la adenilato ciclasa a bajas pero no a altas concentraciones del sustrato.

#### V- Purificación y Peso Molecular

Describimos en Materiales y Métodos la técnica de purificación de la adenilato ciclasa. Los datos obtenidos en las distintas etapas se indican a continuación.

Si tratamos una preparación de membranas crudas con el detergente Lubrol-PX (polioxietileneter) homogeneizamos en un potter-Elvehjem (vidrio-teflón) y luego centrifugamos durante 120 minutos a 165.000 x g más de un 80% de la actividad enzimática pasa a la fracción sobrenadante. Con alícuotas de este sobrenadante (aproximadamente 10 mg de proteína) se carga una columna de DEAE celulosa (1.3cm x 12cm) equilibrada previamente con buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.4. La enzima se eluye de la columna con un gradiente lineal de KCl (de 0 a 0.75M ) preparado con el mismo buffer. Se colectan fracciones de 2.5 ml; el volumen total de

elución es de 75 ml. Bajo estas condiciones, el detergente se excluye de la columna y la enzima se eluye a una concentración de KCl de 0.36 M (Figura 32).

La actividad específica y total de la adenilato ciclasa en las diferentes fracciones, correspondientes a las distintas etapas de purificación, se suman en la tabla V.

La enzima se eluye de la columna de DEAE celulosa con una máxima actividad específica de 4 nmoles por minuto y por mg de proteína. Este valor es 100 veces mayor al correspondiente para el lisado. Después de esta etapa la enzima se vuelve muy inestable, la mayor parte de la actividad adenilato ciclasa se pierde en dos días a 0°.

Las fracciones obtenidas de la columna de DEAE, con actividad de adenilato ciclasa, se dializan durante 3 horas contra buffer pipes 25mM, pH 6.35. Luego de la diálisis se toman alícuotas de la fracción y se las somete a una centrifugación diferencial en un gradiente lineal de sacarosa (de 20 a 5%) durante 13 horas a 120.000 x g.

Después del gradiente de centrifugación, aparecen varios picos de actividad enzimática, con movilidad de 7.1; 14.5 y 17.5 S. Una proporción variable de actividad también sedimenta en el fondo del gradiente.

Los resultados sugieren que después del tratamiento con Lubrol PX, la enzima forma agregados moleculares de distintos tamaños.

En las figuras 33 y 34 presentamos los gráficos de distribución de la actividad adenilato ciclasa en dos gradientes distintos de centrifugación.

El pico de menor movilidad en el gradiente de sacarosa tiene una constante de sedimentación de 7.1 S y corresponde a un P.M.

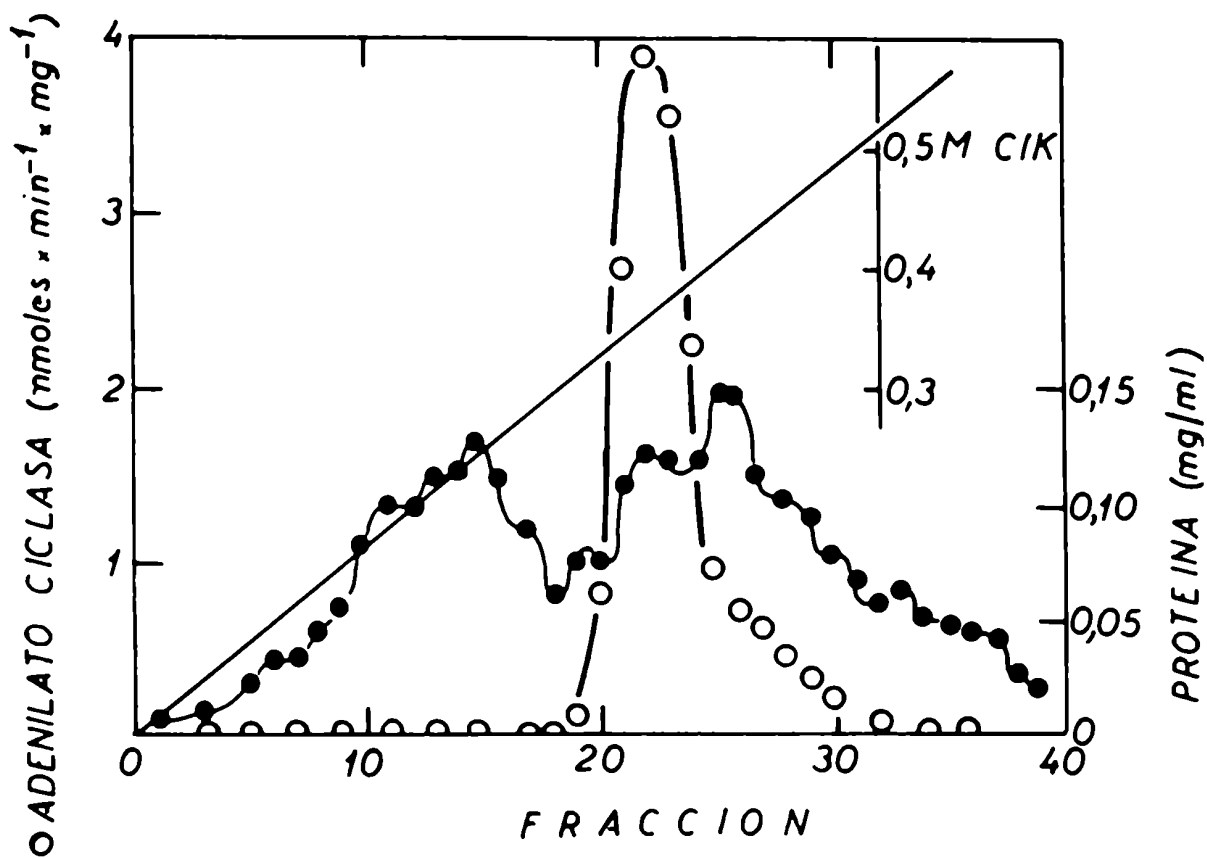


Figura 32- Columna de cromatografía en DEAE celulosa de la forma solubilizada de la enzima ●-●-proteína, -○-○- actividad enzimática. Las condiciones se especifican en Materiales y Métodos.

TABLA V. Purificación de la adenilato ciclasa de Neurospora crassa.

Fracciones	Actividad específica nmoles/min./mg de proteína	Actividad total nmoles/min.
Lisado celular	0.03	30
Sobrenadante de 15.000 xg	0.13	35
Membranas crudas	0.32	25
Sobrenadante-Lubrol de 165,000 xg	0.60	15
Fracción de DEAE	4.00	5

La preparación de las diferentes fracciones se describen en Materiales y Métodos.



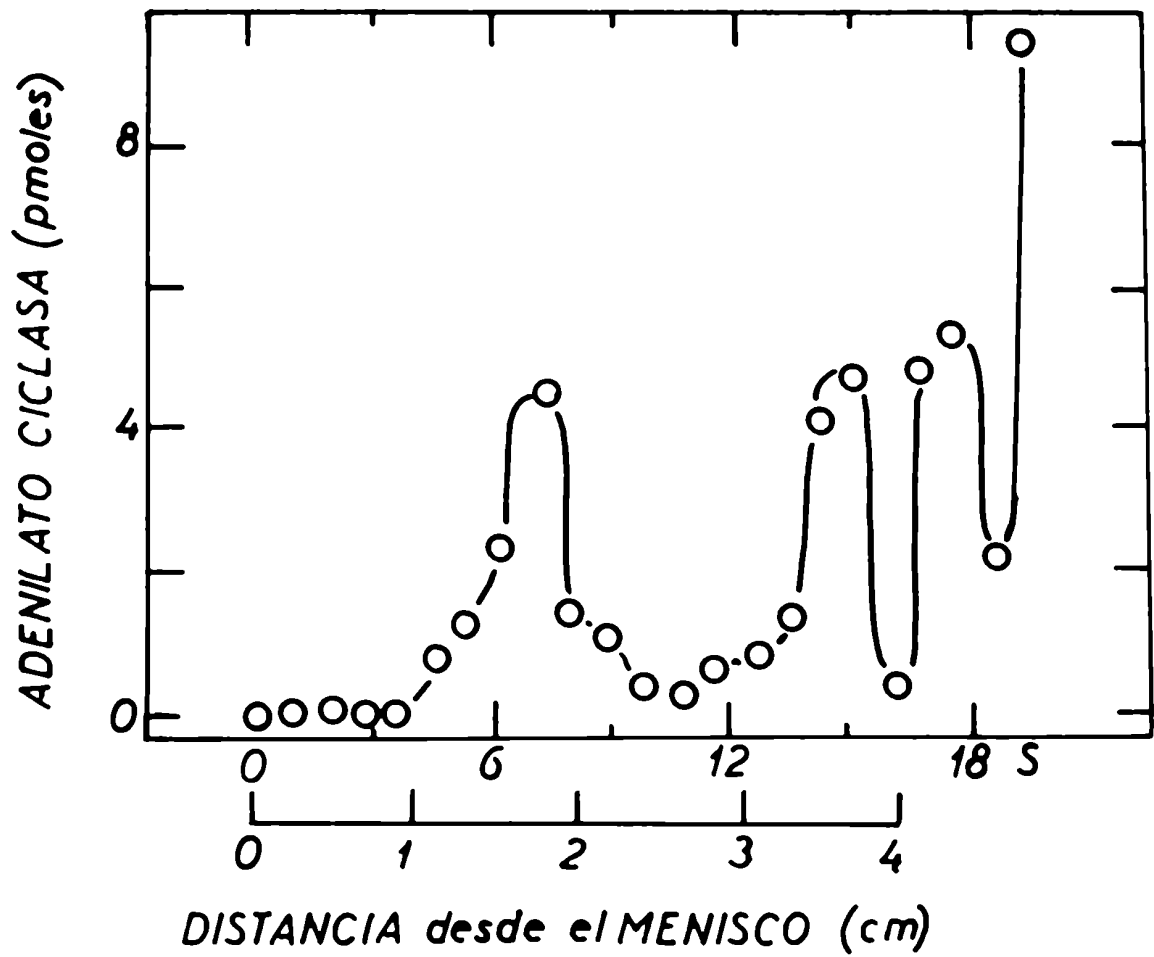


Figura 33- Gradiente de centrifugación en sacarosa de la forma solubilizada de la adenilato ciclasa en Neurospora crassa. El procedimiento seguido se describe en el texto.

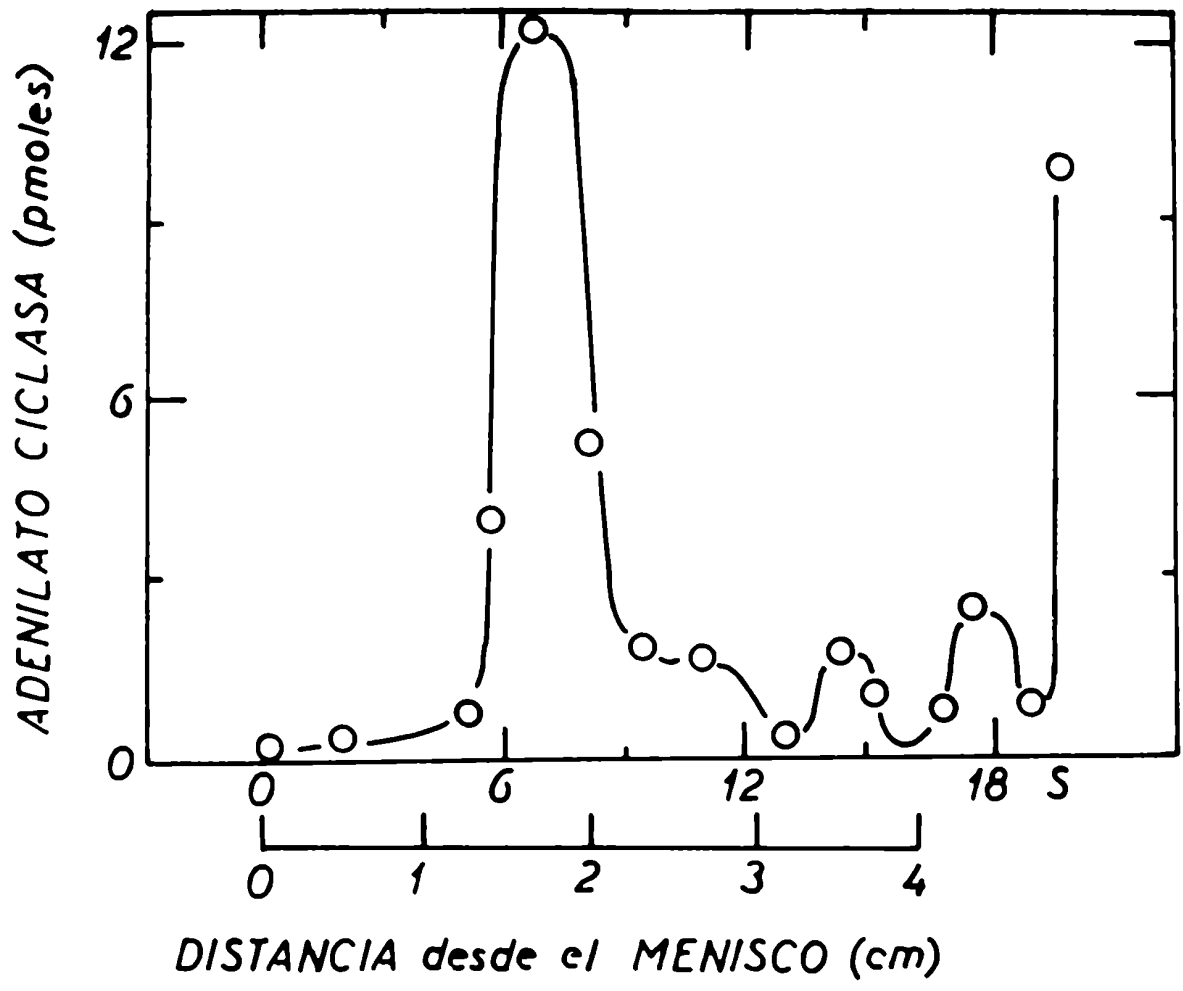


Figura 34- Gradiente de centrifugación en sacarosa de la forma solubilizada de la enzima. El procedimiento se describe en el texto.

entre 120.000 y 150.000 para una proteína de forma globular. Este valor está en el mismo orden de magnitud que el encontrado por Levey (100) para la forma solubilizada de la enzima de miocardio.

La existencia de formas múltiples de tamaños variables no representa una observación inusual ya que este mismo fenómeno fue descrito para la ATPasa microsomal de cerebro, luego del tratamiento con Lubrol (186,187).

Geles de poliacrilamida efectuados con la fracción correspondiente al pico de 7.1 S (De acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos) nos da una sola banda (Figura 35) , correspondiente a un peso molecular aproximado de 110.000.

La obtención de una fracción purificada de proteína con actividad de adenilato ciclasa nos permite estudiar su capacidad de unión ("binding") con el ATP.

Debido a la escasa cantidad de proteína útil para estos experimentos la unión se efectuó directamente en el gradiente de sacarosa. Los resultados se presentan en la figura 36. Se obtiene un pico de unión al ATP -H<sub>3</sub> con una movilidad de 7.1 S. Estudiando la capacidad de unión de este pico a diferentes concentraciones de ATP, los gráficos de las figuras 37 y 38 nos permiten determinar que 1.5 moles de ATP se unen a 100.000 mg de proteína enzimática. Este dato concuerda con el modelo propuesto para la enzima como se verá en la sección correspondiente Discusión.



Figura 35- Electroforesis en gel de poliacrilamida de la enzima adenilato ciclasa. La fracción activa del gradiente de sacarosa correspondiente al pico de 7.1 S se dializa durante 4 horas contra agua y se concentra con nitrógeno líquido. El método de electroforesis en gel de poliacrilamida se describe en  Materiales y Métodos.

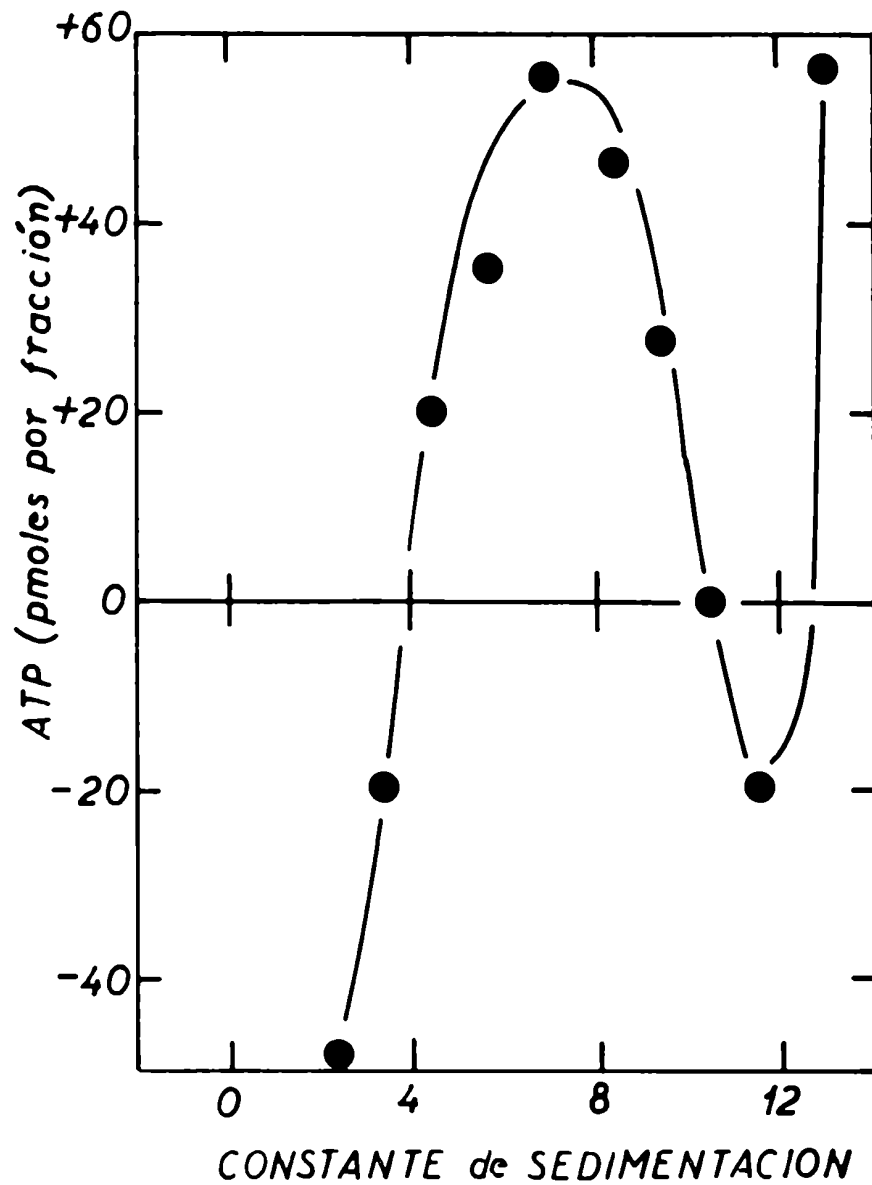


Figura 36- Gradiente de centrifugación en sacarosa de la forma solubilizada de la enzima, en presencia de ATP- $H_3$ . Los resultados se expresan como diferencias de radioactividad entre duplicados de gradientes conteniendo o no la preparación en zimática. La preparación del gradiente se describe en el texto.

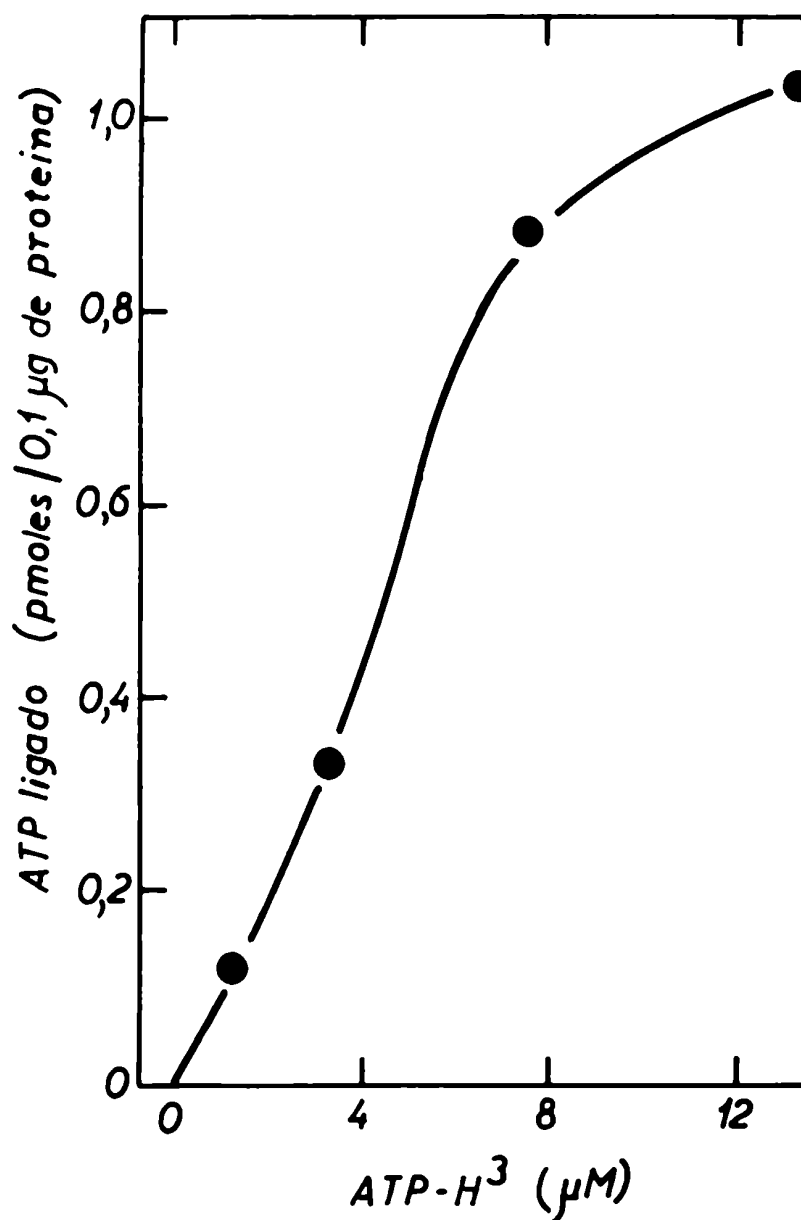


Figura 37- Unión del ATP-H<sub>3</sub> a la fracción de movilidad 7.1 S en función de la concentración de ATP. Las condiciones se indican en la figura 36.

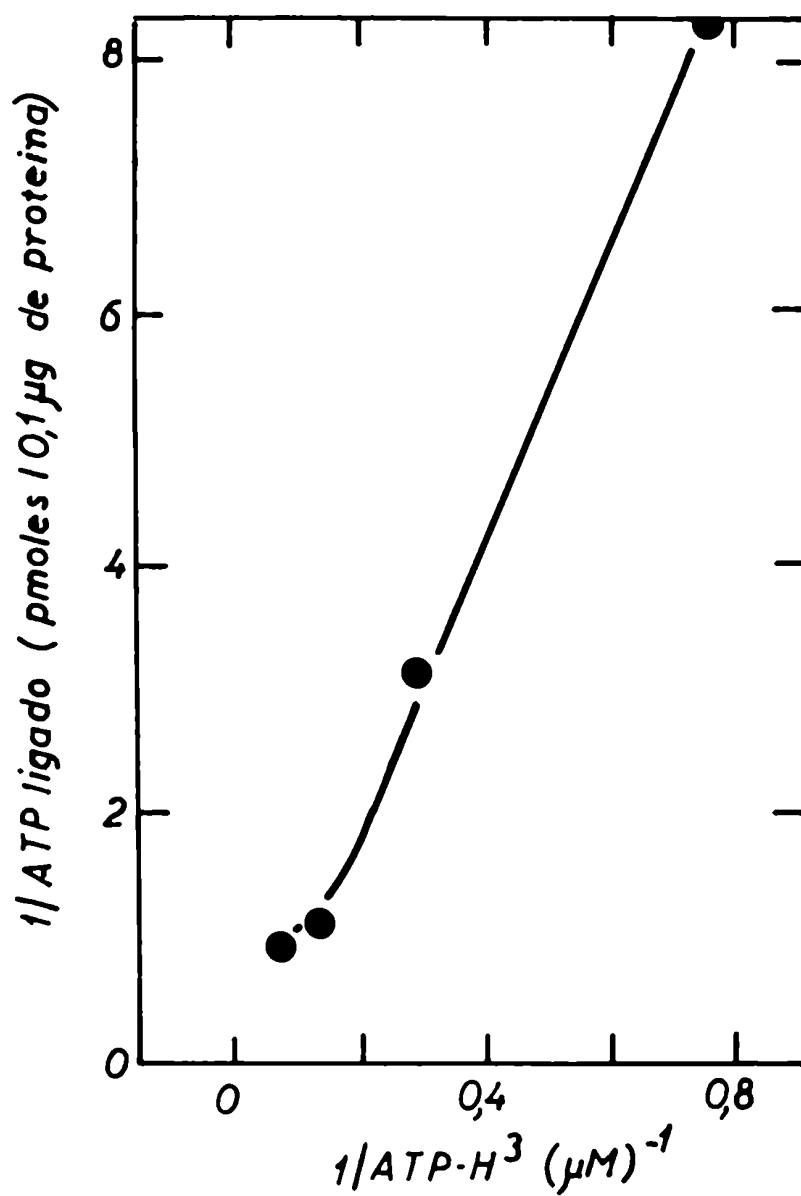


Figura 38- Gráfico de las inversas correspondiente a la figura 37.

## VI Regulación hormonal

### 1- Activación por glucagón

Hasta ahora presentamos evidencias acerca del comportamiento de la adenilato ciclasa de la cepa "slime" de Neurospora crassa referentes a su localización, propiedades, cinética, solubilización, purificación y peso molecular. Los distintos resultados nos permiten observar que su funcionamiento es muy semejante al de las adenilato ciclasas de mamíferos. Por lo tanto, era de esperar su activación por algún polipéptido u hormona, ya que, todas las ciclasas pegadas a membranas plasmáticas en distintos tejidos de organismos superiores se activan por hormonas específicas.

Medimos actividad enzimática en presencia de varias aminas y hormonas; todos los resultados fueron negativos. No ejercían ningún efecto activador sobre la enzima. Probamos adrenalina, nor-adrenalina, ACTH, dihidroxifenilalanina, 5-hidroxi-triptamina, 3-hidroxitiramina sin ningún resultado.

De acuerdo a los trabajos de Rodbell, Birnbaumer y colaboradores (87-92), el glucagón actúa como activador de la adenilato ciclasa en células grasas (ghosts) y en membranas purificadas de hepatocitos.

Probamos el efecto activador del glucagón en la enzima de Neurospora con los siguientes resultados:

El glucagón aumenta la velocidad de la reacción catalizada por la adenilato ciclasa. Incrementa entre 2 y 3 veces la cantidad de pmoles producidos en función del tiempo. A baja concentración de proteína, la reacción es lineal con el tiempo, tanto en



presencia como en ausencia de glucagón (Figura 39).

La activación no requiere una incubación previa de la enzima con la hormona por el contrario, la preincubación disminuye el efecto activador del glucagón sobre la enzima.

La activación por el glucagón se observa a concentraciones bajas de ATP-Mn<sup>++</sup> (0.25 mM). Cuando se incrementa la concentración de ambos componentes del complejo (sustrato) de 0.25 a 2.5mM o cuando se incrementa la concentración de Mn<sup>++</sup> hasta un exceso de tres veces sobre la concentración de ATP, el efecto del glucagón sobre la velocidad de reacción es mínimo.

Estos resultados se presentan en la tabla VI. Los experimentos se realizaron con la enzima en la etapa de membranas crudas (Ver Materiales y Métodos)

La respuesta de la adenilato ciclasa al glucagón se produce a concentraciones fisiológicas de la hormona. Estudiamos el efecto activador del glucagón en función de la concentración de la hormona (Figura 40).

El 50% de la máxima estimulación se produce a una concentración de glucagón de 10 mM. Esta curva de respuesta en Neurospora es bastante similar a la de adenilato ciclasa de membranas de hígado (87), la cual presenta una sensibilidad al glucagón 10 veces mayor que la ciclasa de células grasas (84).

De acuerdo a lo que dijimos anteriormente, el detergente Lubrol-PX nos permite obtener la enzima en su forma no sedimentable. Ensayando el efecto del glucagón en la enzima solubilizada éste tendría que anularse debido a que los receptores hormonales se encuentran en la membrana plasmática (84,87,100).

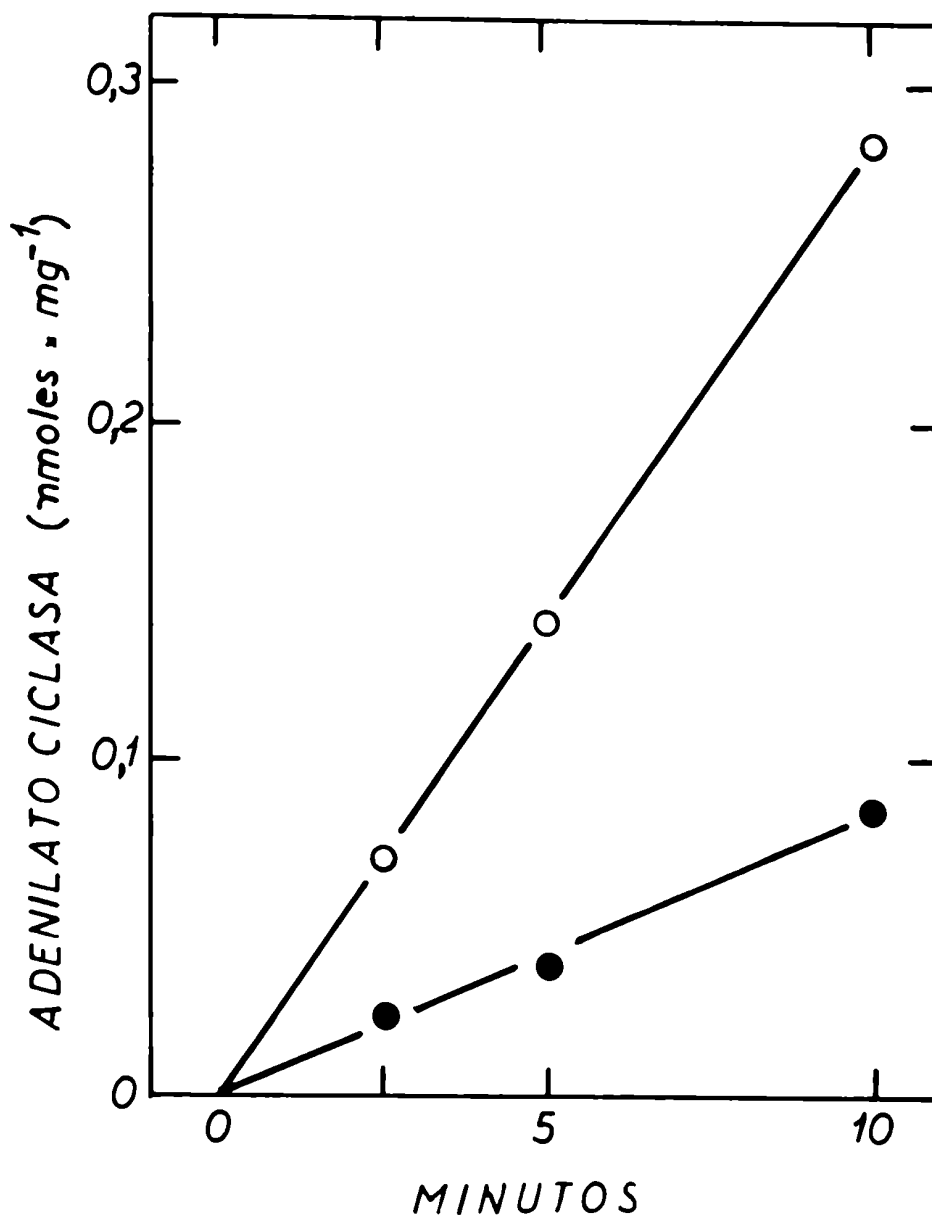


Figura 39- Actividad de adenilato ciclasa en función del tiempo en presencia y en ausencia de glucagón 0.1 μM.

La mezcla de ensayo contiene 100 mM buffer pipes pH 6.35; ATP α P<sub>32</sub> (25 μC) 0.25 mM; MnCl<sub>2</sub> 0.25 mM y 0.05 mg de proteína enzimática (membranas crudas)<sup>2</sup> El tiempo de incubación se indica en la abscisa. Las incubaciones se realizaron a 37°C.  
 -●-●- Sin glucagón; -○-○- glucagón 0.1 μM.

TABLA VI. Efecto de las diferentes concentraciones de ATP y Mn<sup>++</sup>  
sobre la activación de la adenilato ciclasa por el  
glucagón.

ATP	MnCl <sub>2</sub>	Actividad enzimática	
		sin glucagón	con glucagón
p moles por minuto por mg de proteína			
0.25	0	0	0
0.25	0.25	5	15
2.50	2.50	108	115
0.25	0.75	38	40

El tiempo de incubación fue de 2,5 minutos. La concentración de glucagón agregada fue de 0.1  $\mu$ mol. Las otras condiciones se describen en la figura 39 y en Materiales y Métodos.

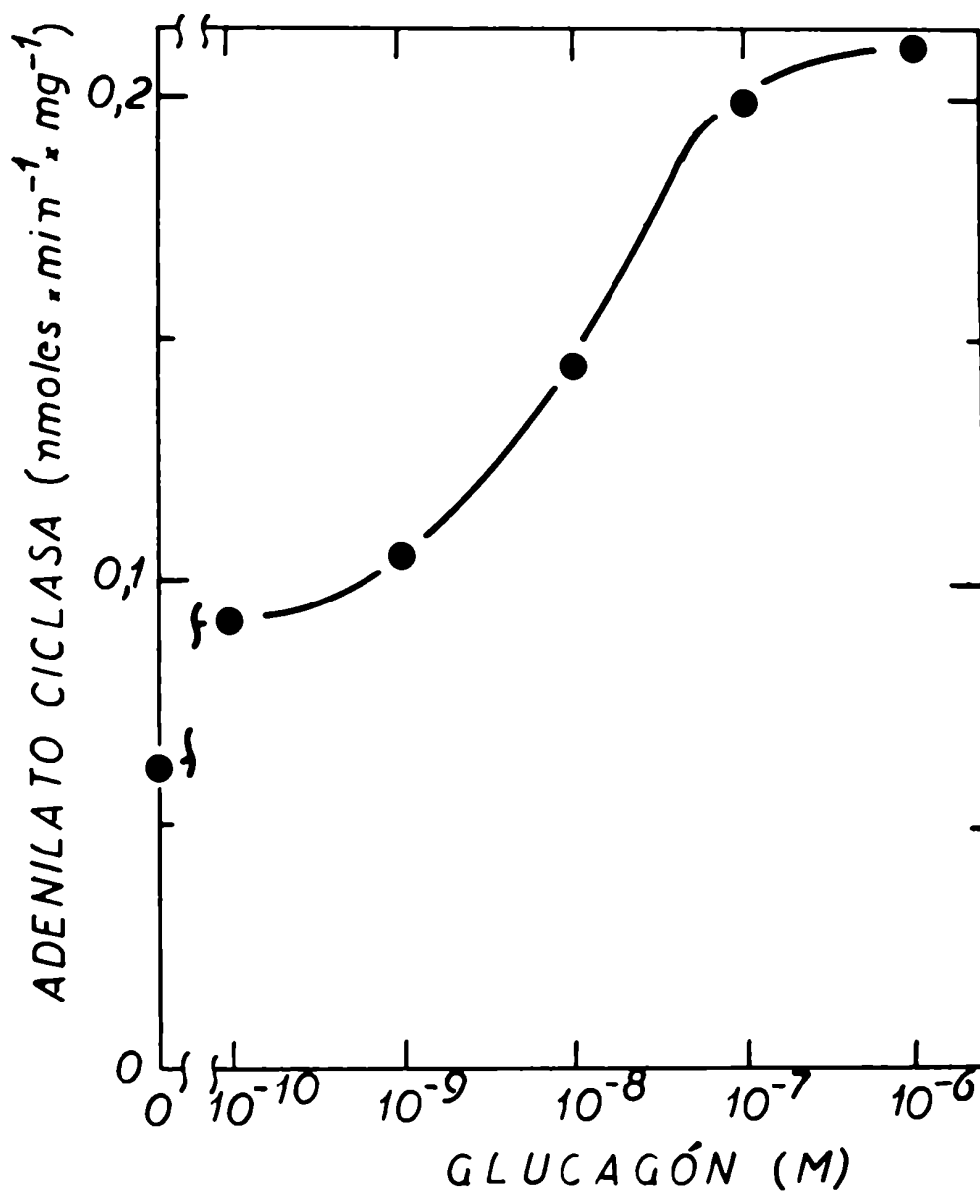


Figura 40- Actividad de adenilato ciclasa en función de distintas concentraciones de glucagón. El tiempo de incubación fue de 2.5 minutos.

Si tratamos a la ciclasa de la cepa "slime" de *Neurospora* con Lubrol-PX después de una centrifugación de 120 minutos a 105.000 x g (Ver Materiales y Métodos), se obtiene el 80% de la actividad enzimática en forma soluble. Esta enzima no sedimentable presenta las mismas propiedades cinéticas que la enzima pegada a membranas. Sin embargo, de acuerdo a los experimentos presentados en las figuras 41 y 42, no presenta activación por el glucagón; esto confirmaría los resultados presentados con ciclasa de mamíferos acerca de la ubicación de los receptores hormonales en la membrana plasmática.

Por otra parte, evidencias recientes (89-92) indican que el GTP incrementa el efecto estimulatorio sobre la adenilato ciclasa de membranas de hígado. (Este efecto fue discutido en la parte correspondiente a Introducción ).

Como vemos en la figuras 41 y 42, el efecto del GTP en la adenilato ciclasa de la cepa "slime" de Neurospora crassa, es mínimo.

Con el objeto de corroborar si efectivamente el efecto del glucagón en *Neurospora* podría ser comparable al de células de mamíferos, estudiamos la síntesis y la degradación del glucógeno en la mutante "slime".

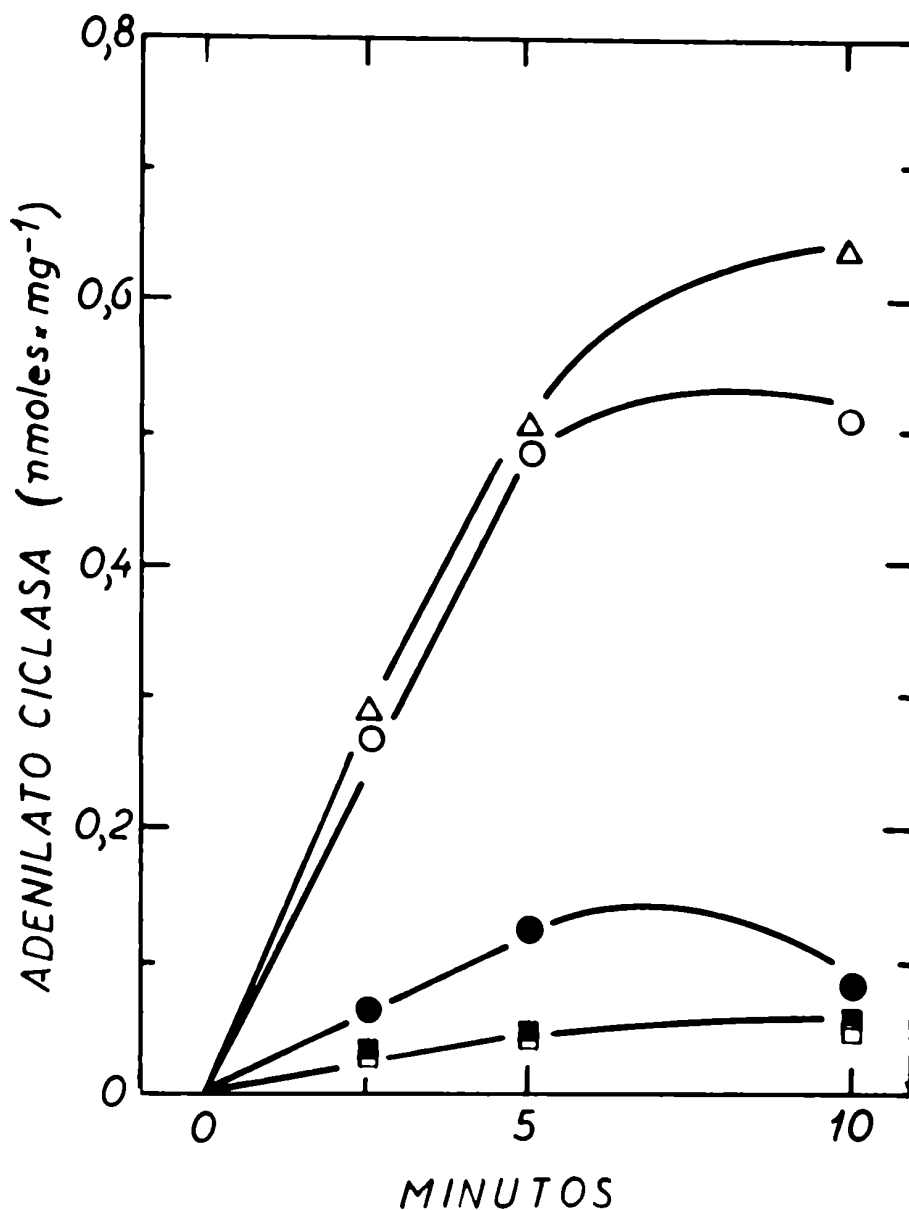


Figura 41- Efecto del glucagón en las preparaciones de enzimas correspondientes a membranas crudas y a enzima no-sedimentable. Se grafica actividad enzimática en función del tiempo de incubación.

Ensayo con enzima de membranas crudas: -●-●- sin adiciones; -○-○- glucagón; -△-△- glucagón más GTP.

Ensayo con enzima no-sedimentable: -■-■- sin adiciones; -□-□- glucagón. La concentración de glucagón en ambos casos fue de 1  $\mu$ molar. La cantidad de proteína enzimática fue de 0.1 y 0.5 mg para enzima no-sedimentable y pegada a membranas, respectivamente.

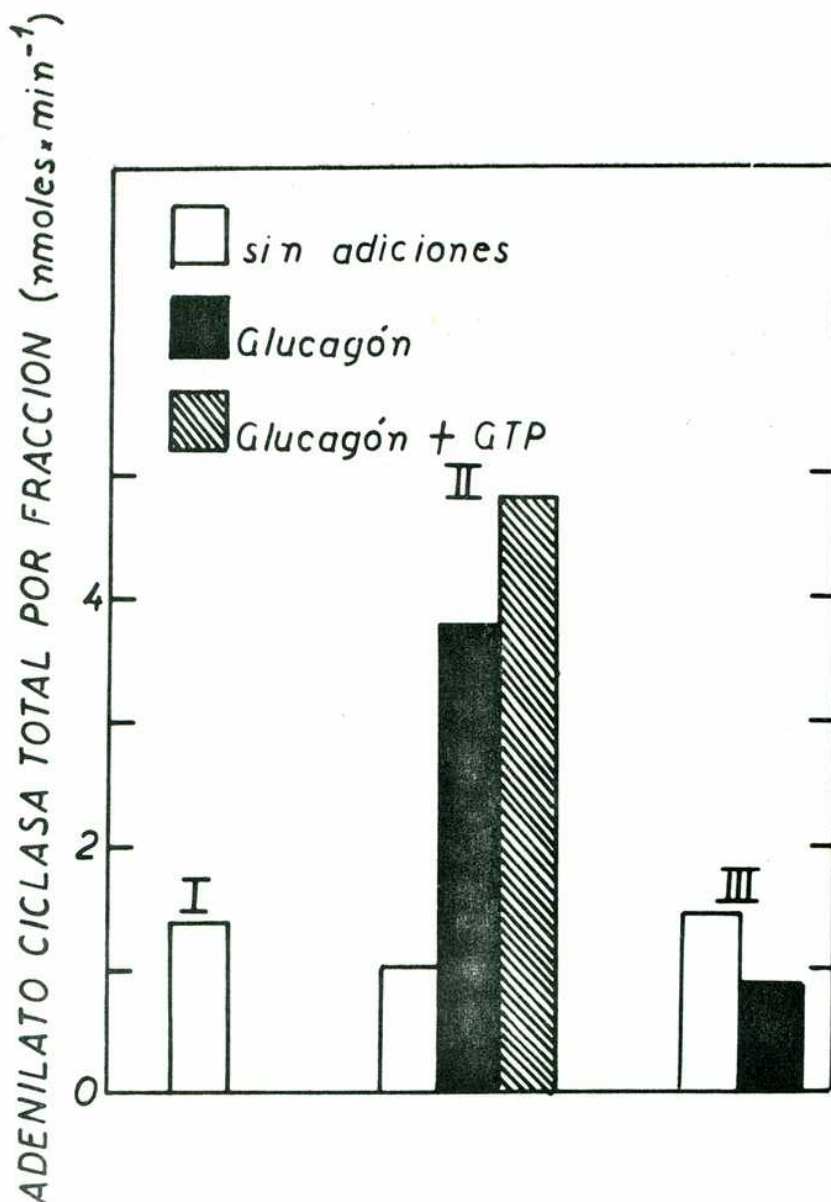


Figura 42- Efecto del glucagón sobre preparaciones particuladas y solubilizadas de adenilato ciclasa de la cepa "slime" de Neurospora crassa.

Actividad enzimática total bajo diferentes condiciones: I- sobrenadante de 15.000 x g (0.2 mg de proteína en el ensayo). II- enzima pegada a membrana (0.5 mg de proteína en el ensayo). III- enzima solubilizada (0.1 mg de proteína en el ensayo).

Los tiempos de incubación fueron de 2.5 minutos. La concentración de glucagón de 1  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$  la del GTP. Otras condiciones de ensayo se describen en la figura 39.

Las figuras 43 y 44 representan experimentos en los que medimos el efecto del glucagón sobre la fosforilasa y la glucógeno sintetasa del "slime".

Como vemos, el glucagón estimula la glucógeno fosforilasa (Figura 43) y disminuye la actividad de la glucógeno sintetasa (Figura 44).

También probamos la acción del glucagón sobre la velocidad de glucogenolisis. En la figura 45 presentamos estos datos. A tiempos cortos incrementa alrededor de tres veces la velocidad de degradación del glucógeno en células enteras, permitiéndonos obtener una prueba definitiva de la similitud de mecanismos de control entre la mutante "slime" de Neurospora crassa y la célula hepática en mamíferos.



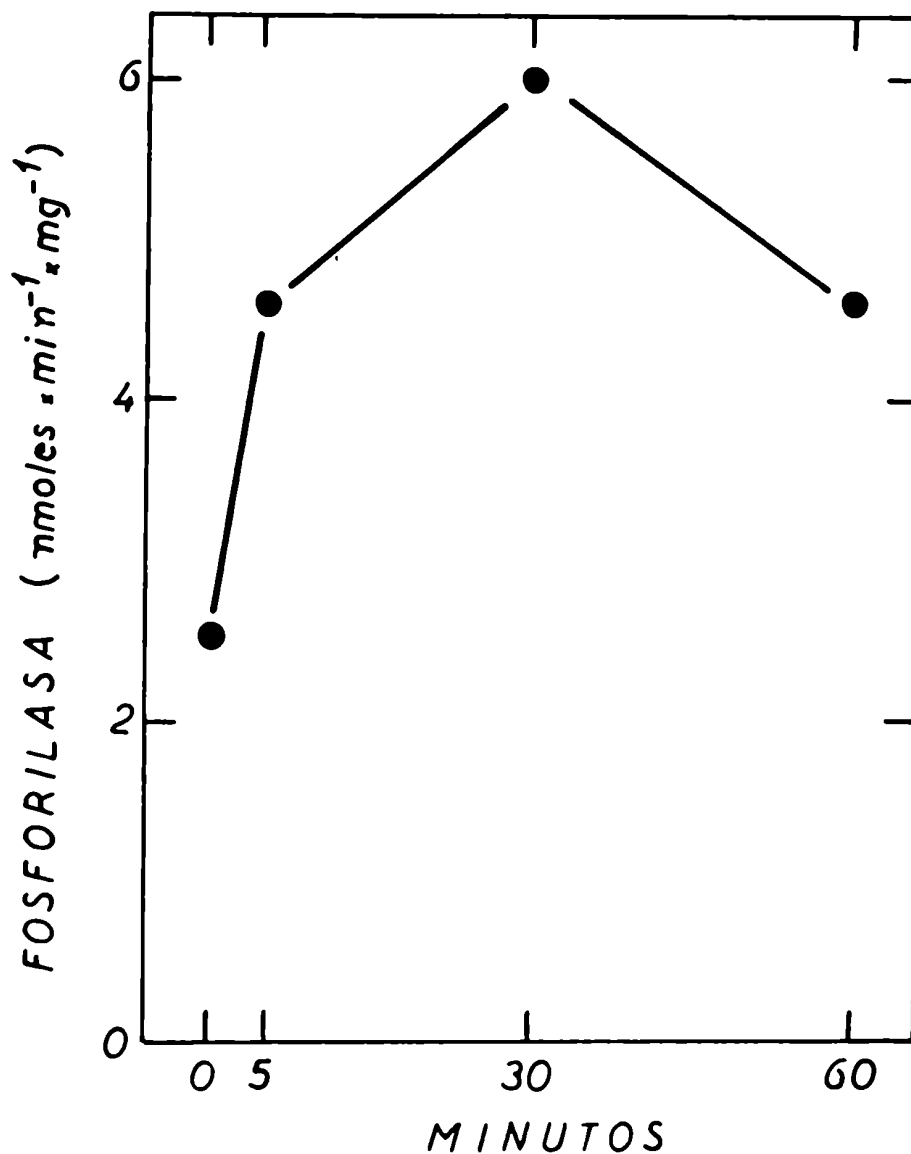


Figura 43- Efecto del glucagón sobre la glucógeno fosforilasa de la mutante "slime" de Neurospora crassa.

Las células crecen en medio líquido (200 ml) durante 18h. Luego de este tiempo se toman alícuotas de 20 ml de medio de cultivo y a tiempo "0" se agrega el glucagón al medio de cultivo hasta una concentración final de 2.5 mM. A los tiempos indicados se ensaya glucógeno fosforilasa de acuerdo a Tellez-Iñón y Torres (152). La preparación enzimática se describe en Materiales y Métodos.

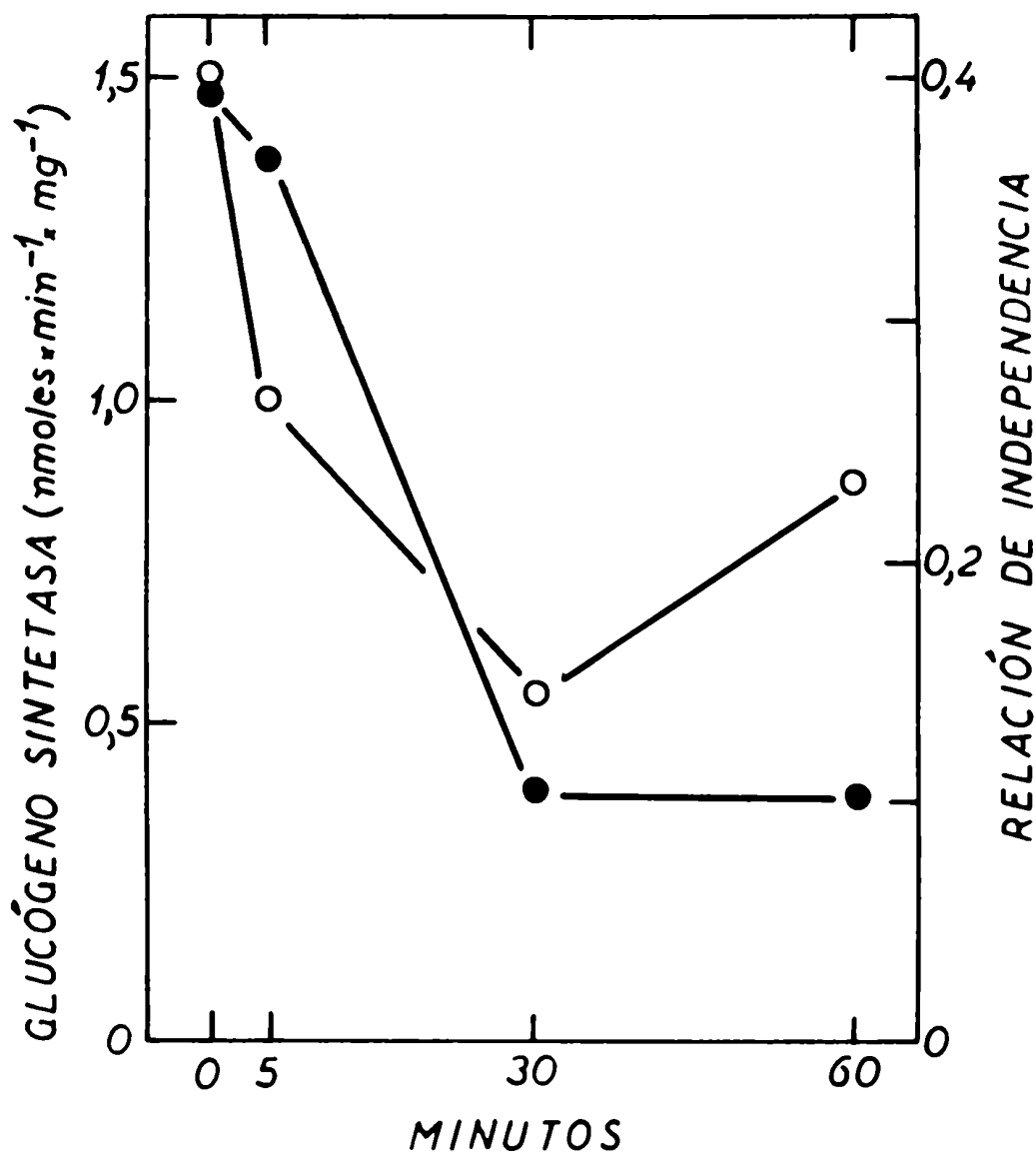


Figura 44- Efecto del glucagón sobre la glucógeno sintetasa de la mutante "slime" de Neurospora crassa. La obtención de las células se describe en la figura 43. La actividad enzimática se determina de acuerdo a Tellez-Iñón y Torres (151).

La relación de independencia se calcula de acuerdo a la actividad medida en ausencia de glucosa-6-fosfato, comparada con la obtenida en presencia de glucosa-6-fosfato.

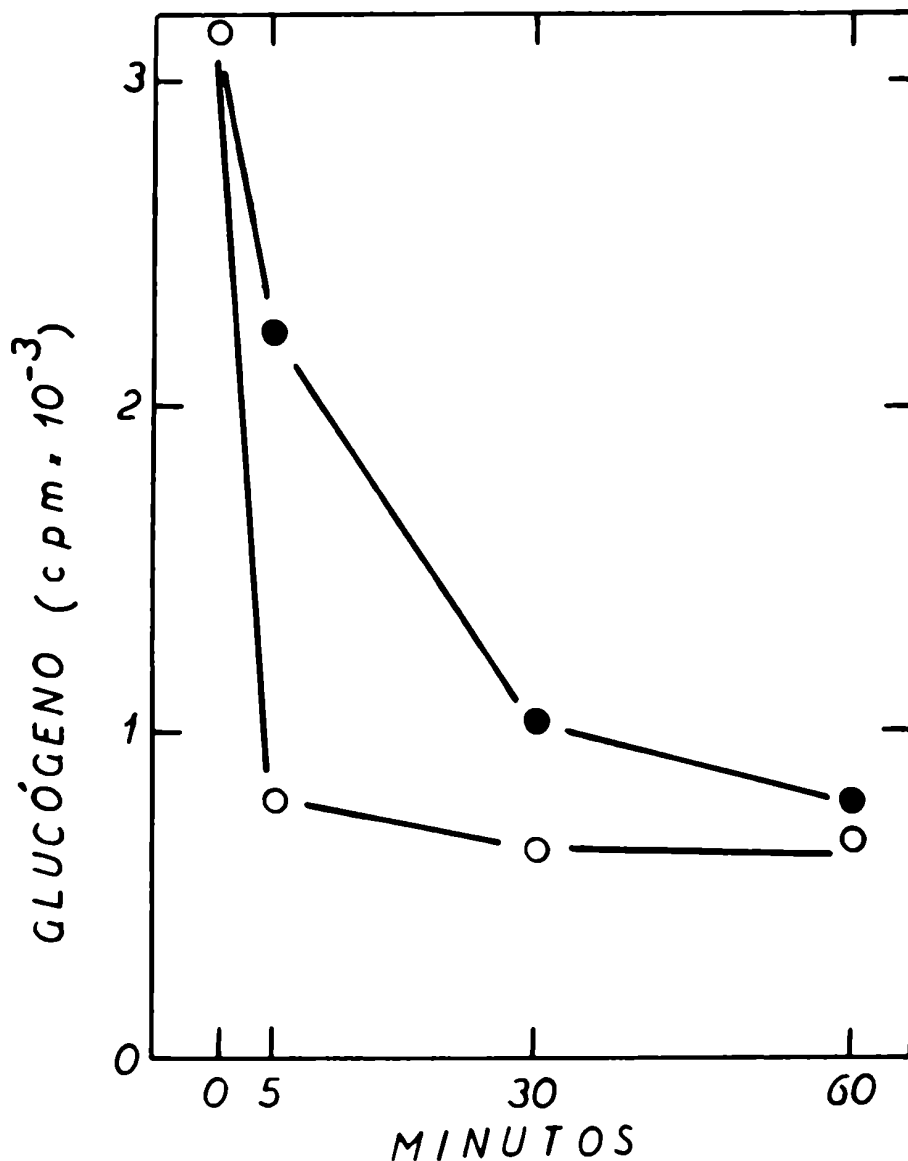


Figura 45- Efecto del glucagón sobre la velocidad de glucogenólisis en la mutante "slime" de Neurospora crassa. Los cultivos celulares crecen durante 18 horas tal como se describe en la figura 43, se centrifuga a 9.000 x g durante 5 minutos. El precipitado se resuspende en 200 ml de medio mínimo de Vogel (161) conteniendo 0.75 % de extracto de levadura, 0.75% de caldo de nutrientes, y glucosa (10  $\mu$ C; 261 Ci/mol). Los cultivos se incuban 60 min. y se centrifugan. Las células marcadas se resuspenden en 20 ml de medio de Vogel conteniendo extracto de levadura (0.75%) y caldo de nutrientes (0.75%), la suspensión se distribuye en 2 erlenmeyers de 125 ml. Se toman alícuotas de 2 ml de cada frasco y a tiempo "0" se agrega el glucagón a una de las suspensiones, hasta una concentración final de 20 nmol. Los erlenmeyers fueron incubados posteriormente y a los tiempos indicados en la abscisa se toman alícuotas de 2 ml. Se aísla glucógeno (Materiales y Métodos) y se mide radioactividad: ●●-control; ○○-glucagón

## 2- Inhibición por insulina

Quizás el efecto hormonal más importante sobre la adenilato ciclasa en la mutante "slime" de Neurospora crassa sea el de la insulina como inhibidor.

Utilizando como fuente de adenilato ciclasa una preparación de membranas crudas, ensayando la enzima en las condiciones standard a 37° durante 2.5 minutos, en ausencia de teofilina, mercaptoetanol o sistema regenerante de ATP, la actividad enzimática es lineal con el tiempo de incubación en presencia o en ausencia de insulina (Figura 46).

El efecto inhibitorio no requiere incubación previa de la enzima con la hormona por el contrario, la preincubación minimiza el efecto.

Las siguientes evidencias nos permiten asegurar que el efecto inhibitorio de la insulina no es un artificio de escaso significado bioquímico.

a) El efecto inhibitorio no se debe a un aumento en la degradación del AMP cíclico formado, desde que no es modificado por el agregado de AMP cíclico o teofilina en la mezcla de ensayo (Tabla VII).

b) La inhibición no puede ser debida al catión  $Zn^{++}$ , usualmente presente en las preparaciones de insulina. En la figura 47 presentamos los datos de un experimento realizado con una preparación de insulina libre de  $Zn^{++}$ . Por otra parte, concentraciones del catión de  $10^{-4}$  M, no producen efecto sobre la adenilato ciclasa de Neurospora crassa (Tabla VII).

c) El efecto inhibitorio no se observó al ser reemplazada la insulina por otras hormonas polipeptídicas que poseen puentes disulfuros en su molécula, tales como vasopresina u hormona de crecimiento. (Tabla VII).

d) Las cadenas A y B de insulina aisladas, no poseen ningún efecto en la actividad de la adenilato ciclase (Tabla VII).

e) La mitad de la máxima inhibición se observó a una concentración de insulina entre 30 y 60  $\mu$  unidades por ml ( $1-2 \cdot 10^{-10}$  M), pero no se observa un efecto significativo en un rango entre 1 y 10  $\mu$  unidades por ml ( $7 \cdot 10^{-12}$  a  $7 \cdot 10^{-11}$  M), según podemos apreciar en la figura 47. Estas concentraciones de insulina son consideradas como fisiológicas; están en el mismo rango en el cual la hormona tiene efecto sobre células animales (188,189).

f) Como veremos posteriormente, el efecto de la insulina es parcialmente revertido por el glucagón, conocido antagonista de los efectos metabólicos de la insulina.

Para corroborar los datos anteriores realizamos experimentos con el objeto de determinar si la insulina tiene efecto sobre el transporte de la glucosa al interior de las células, realizamos experimentos cuyos resultados se presentan en la figura 48. La técnica seguida se describe en la sección correspondiente a Materiales y Métodos.

Observamos en la figura 48 que la insulina aumenta la incorporación de glucosa al interior de la célula y que este proceso es lineal con el tiempo.

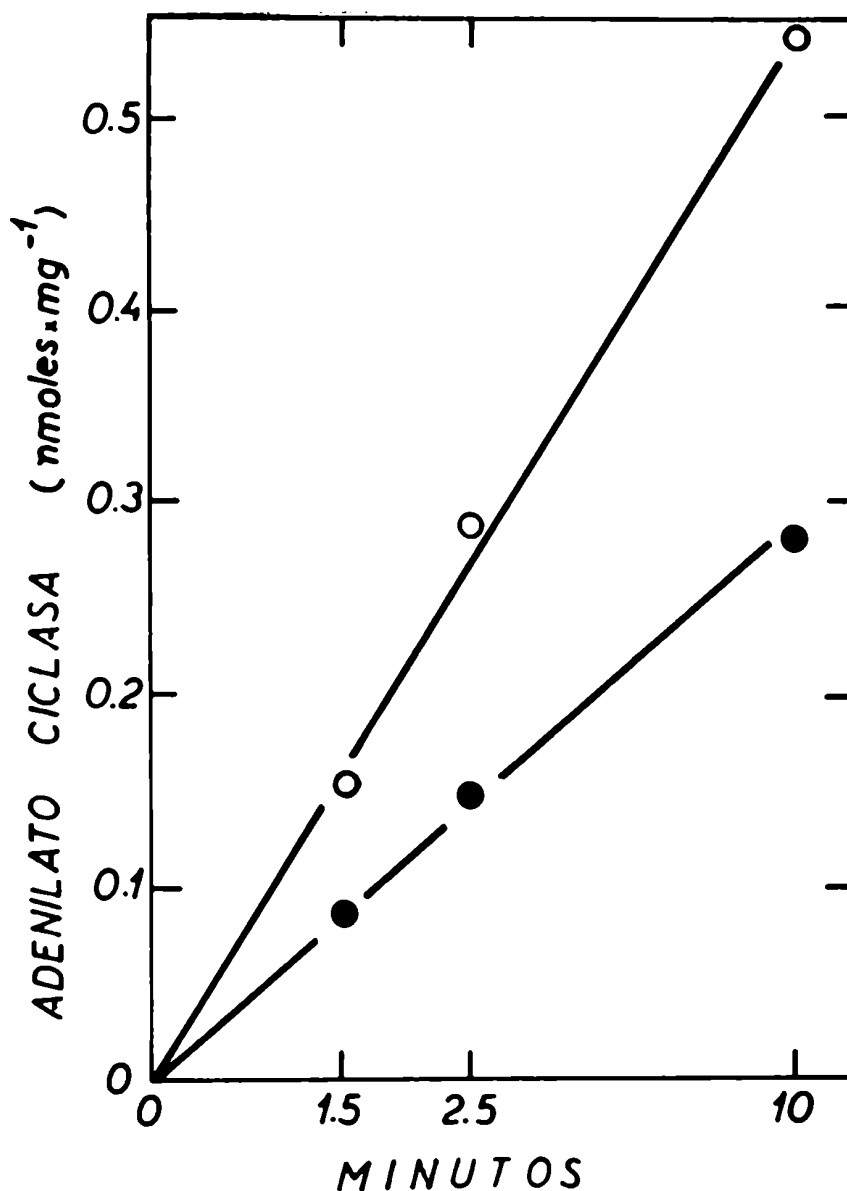


Figura 46- Actividad de adenilato ciclasa en función del tiempo de incubación, en presencia ( ● ) o en ausencia ( ○ ) de insulina (de porcino, amorfa 100  $\mu$  unidades/ml).

Las mezclas de incubación contienen: buffer pipes, 100 mM, pH 6.35;  $MnCl_2$  0.5 mM; ATP  $\alpha P_2$  (500 c.p.m por pmol) 0.5 mM ; enzima (membranas crudas) 0.1  $\mu$ g de proteína. El volumen total de la mezcla fue de 0.1 ml. Las incubaciones se efectuaron a 37° durante los tiempos indicados en la abscisa. Se para la reacción y se aisla el AMP cíclico formado de acuerdo a Materiales y Métodos.

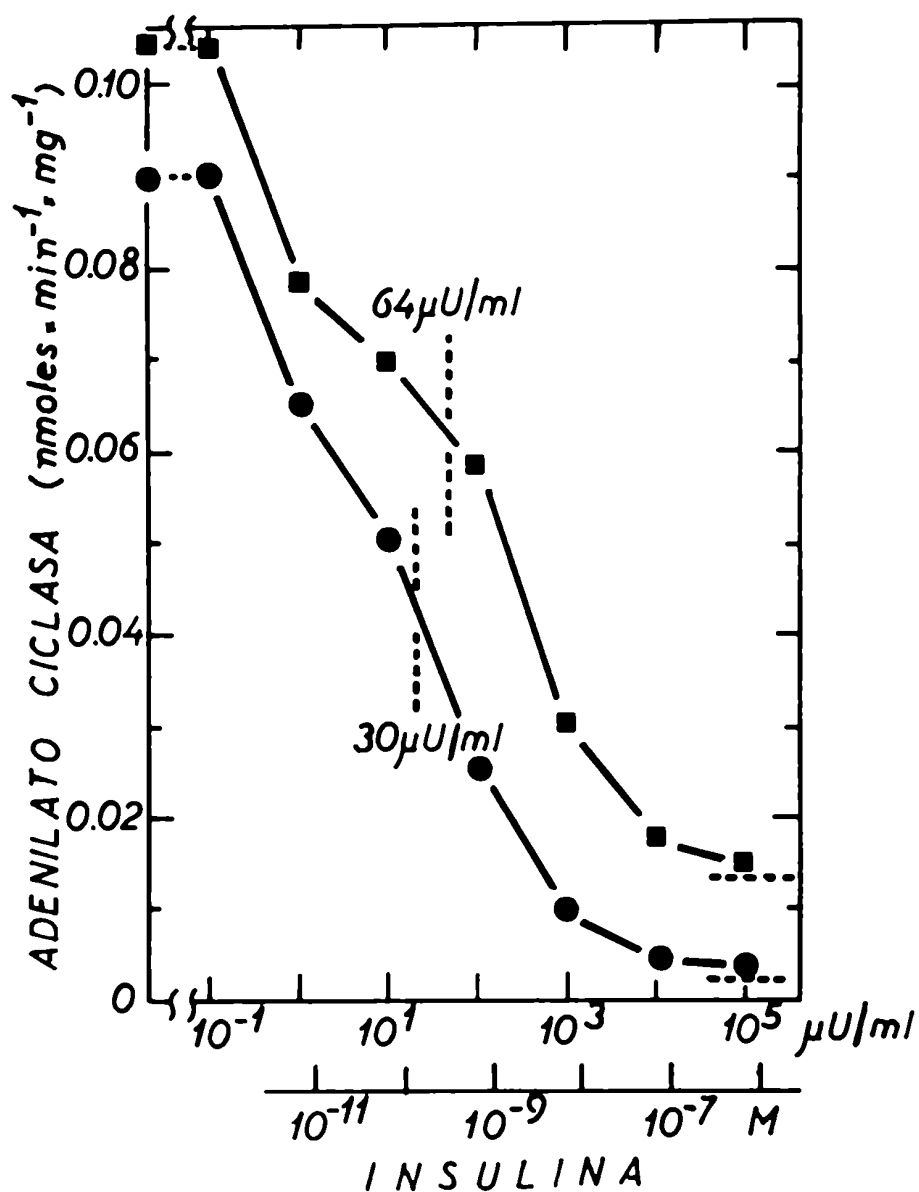


Figura 47- Actividad de adenilato ciclasa en la mutante "slime" de Neurospora crassa, en función de la concentración de insulina.

-■-■-Insulina de porcino, amorfa; -●-●-insulina recristalizada, tratada con tripsina, libre de Zn.

Los tiempos de incubación fueron de 2.5 minutos. Las otras condiciones se indican en la figura 46.

TABLA VII. Efecto de diferentes sustancias sobre la actividad adenilato ciclasa en Neurospora crassa.

Las condiciones se especifican en la figura 46 y en Materiales y Métodos. Los tiempos de incubación fueron de 2.5 minutos. Se utilizó insulina bovina, cristalina.

Adiciones	Actividad de adenilato ciclasa
	nmoles/min.por mg de proteína
Sin agregados	0.076
Insulina, 100 $\mu$ U/ml (4ng/ml)	0.033
AMP cíclico, 1 mM	0.072
AMP cíclico 1 mM más insulina 100 $\mu$ U/ml	0.030
Teofilina, 10 mM	0.069
Teofilina 10 mM más insulina 100 $\mu$ U/ml	0.034
AMP cíclico 1 mM más teofilina 10 mM	0.069
AMP cíclico 1 mM, teofilina 10 mM más insulina 100 $\mu$ U/ml	0.036
ZnCl <sub>2</sub> 10 <sup>-4</sup> M	0.080
ZnCl <sub>2</sub> 10 <sup>-5</sup> M	0.067



Tabla VII continuación....

Cadena A ( 4 ng/ml )	0.090
Cadena A ( 40 ng/ml )	0.078
Cadena A ( 400 ng/ml )	0.078
Cadena B ( 4 ng/ml )	0.067
Cadena B ( 40 ng/ml )	0.072
Cadena B ( 400 ng/ml )	0.072
Cadena A más cadena B ( 4 ng/ml )	0.067
Cadena A más cadena B ( 40 ng/ml )	0.071
Cadena A más cadena B ( 400 ng/ml )	0.071
Vasopresina $7 \cdot 10^{-8}$ M	0.080
Vasopresina $7 \cdot 10^{-8}$ M más insulina 100 $\mu$ U/ml	0.030
Hormona de crecimiento $2,5 \cdot 10^{-10}$ M	0.085
Hormona de crecimiento $2,5 \cdot 10^{-10}$ M más insulina 100 $\mu$ U/ml	0.032

---

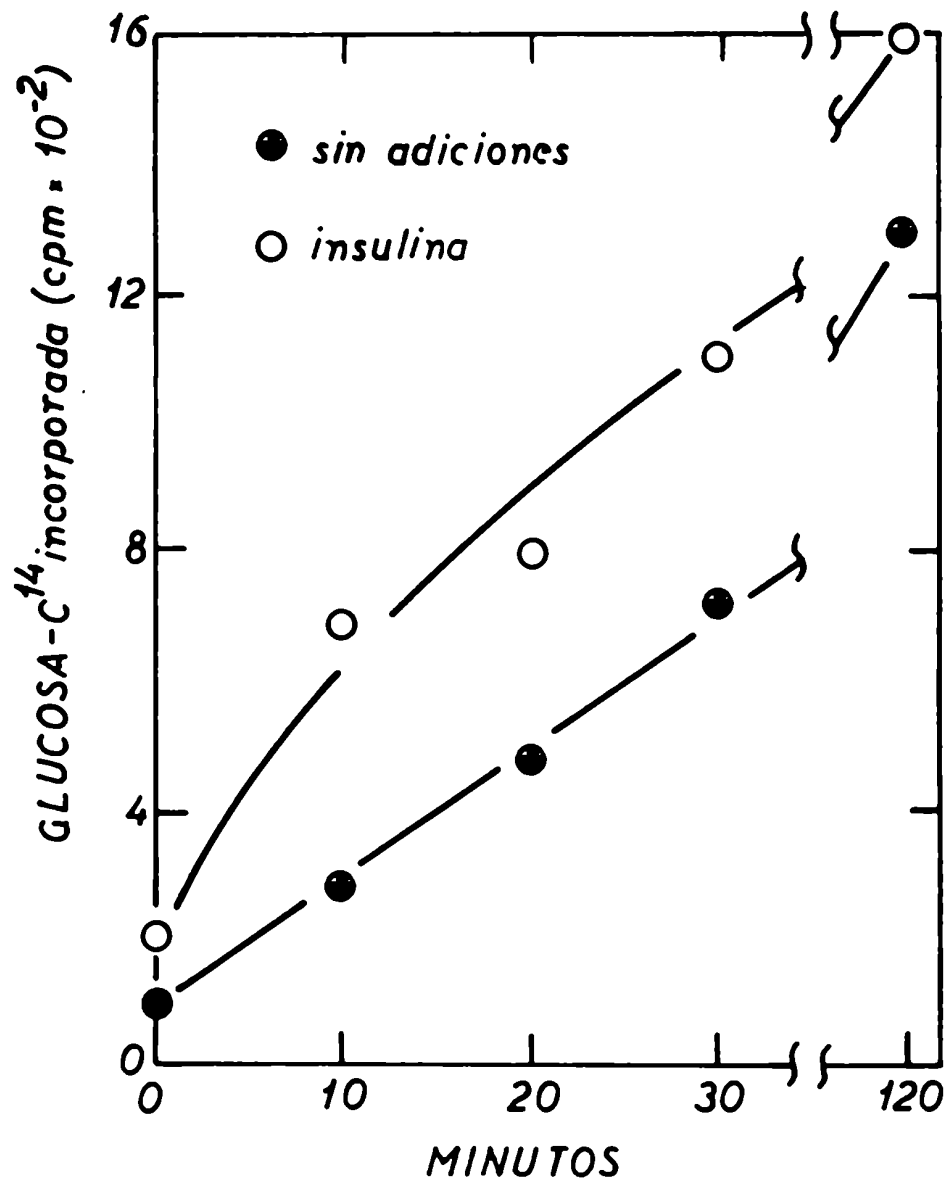


Figura 48- C.p.m. de glucosa  $C_{14}$  incorporadas en función del tiempo, en presencia y en ausencia de insulina.

Las células se cultivan en medio normal, se colectan por centrifugación y se resuspenden nuevamente en un medio mínimo (Ver Materiales y Métodos) con el agregado de glucosa  $C_{14}$  0.5mM (10  $\mu$ C). Se separan en dos fracciones, con y sin el agregado de insulina (0.1 Unidad/ml). A los tiempos indicados en la abscisa se toman alícuotas, se las filtra por millipore y se determina la radioactividad de las muestras: -●-●- sin agregados; ○-○- insulina 0.1 Unidad/ml.

La insulina incrementa la velocidad de síntesis del glucógeno en Neurospora crassa. Este dato no es sorprendente, ya que, según lo que dijimos anteriormente el metabolismo del glucógeno en la mutante "slime" se regula en forma idéntica a los sistemas de mamíferos.

En la tabla VIII presentamos los resultados de síntesis del glucógeno en presencia y en ausencia de insulina. Como vemos, aumenta la incorporación de glucosa en el polisacárido. A los 15 minutos la síntesis del glucógeno llega a un estado estacionario. El espectro de absorción nos da picos con máximos a 460 y 520  $\mu$ , lo que nos indicaría la síntesis de un polisacárido de tipo amilopectinoso.

TABLA VIII. Síntesis de glucógeno en presencia y en ausencia de insulina (0.1U/ml).

Adiciones	c.p.m. incorporadas	mg de glucógeno
15 minutos sin agregados	8.000	0.45
15 minutos con insulina	24.000	0.60
30 minutos sin agregados	5.600	0.40
30 minutos con insulina	12.000	0.55

Los datos experimentales se especifican en Materiales y Métodos. La radioactividad se mide en alícuotas de 0.25 ml con respecto a un volumen total de 1 ml.

El glucógeno se determina sobre una alícuota de 1 ml de medio de cultivo.

### 3- Cinética de la acción hormonal

#### Cinética del glucagón y de la insulina.

De acuerdo con los datos presentados anteriormente sobre las propiedades cinéticas de la adenilato ciclasa de Neurospora crassa sabemos, que el gráfico de actividad eszimática en función de la concentración de sustrato (ATP-Mn<sup>++</sup>) nos da una curva sigmoidea . El Mn<sup>++</sup> activa la enzima a baja pero no a altas concentraciones de ATP-Mn<sup>++</sup>. En presencia de este catión, la curva tiende a ser michaeliana (Figuras 49,53 y tabla IX).

En consecuencia, en primer lugar estudiamos los efectos hormonales a distintas concentraciones de sustrato (Figuras 49,50,51 y 52). De estos experimentos son evidentes las siguientes conclusiones:

a) El glucagón incrementa la actividad enzimática a bajas pero no a altas concentraciones de ATP-Mn<sup>++</sup>. El valor n de Hill disminuye de 1.67, en ausencia de glucagón, a 1.2 en su presencia. Bajo estas condiciones, la concentración de sustrato en el cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima (L0.5) disminuye débilmente (de 0.64 a 0.45). De esto se desprende que el glucagón ejerce sobre la enzima efectos similares a los del Mn<sup>++</sup>.

b) La insulina disminuye la actividad de adenilato ciclasa a bajas pero no a altas concentraciones de ATP-Mn<sup>++</sup>. Cinética - mente la insulina se comporta como un inhibidor "pseudo competi- tivo", esto es, incrementa los valores del L0.5 (de 0.64 a 1.4mM) pero no afecta los valores de la pendiente del gráfico de Hill (Tabla IX).

TABLA IX. Parámetros cinéticos de la reacción catalizada por la adenilato ciclasa de Neurospora crassa.

Ligando	Efector			L 0.5 mM	<u>n</u>
	Mn <sup>++</sup>	glucagón	insulina		
ATP-Mn <sup>++</sup>	-	-	-	0.64	1.67
	2 mM	-	-	0.48	1.25
	-	10 <sup>-6</sup> M	-	0.47	1.2
	-	-	100μU/ml	1.40	1.67
	-	10 <sup>-6</sup> M	100μU/ml	1.25	1.40
	2 mM	10 <sup>-6</sup> M	-	0.27	1.0
	2 mM	-	100μU/ml	1.34	1.2
	2 mM	10 <sup>-6</sup> M	100μU/ml	1.0	1.1

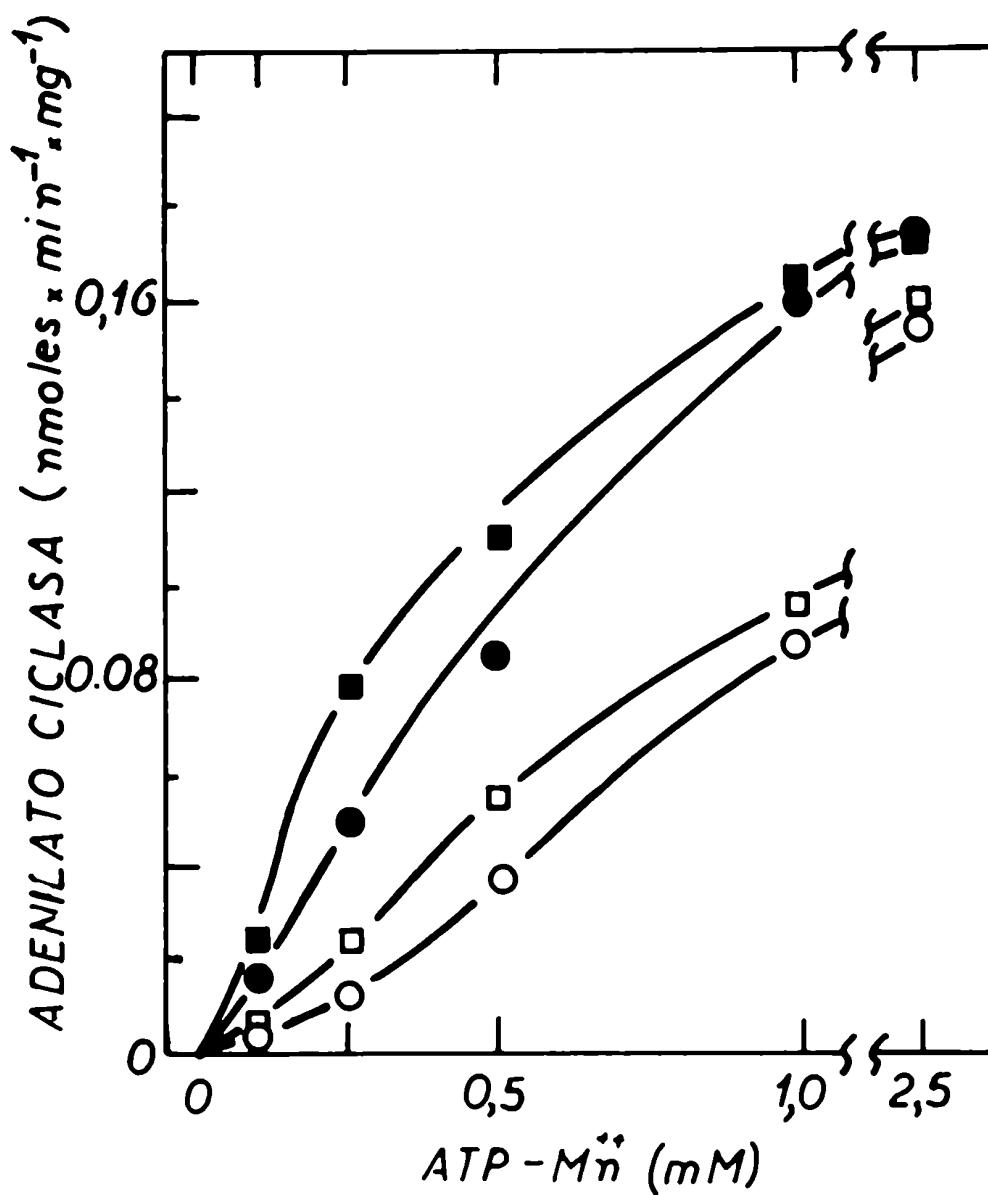


Figura 49- Actividad de adenilato ciclasa en función de distintas concentraciones de ATP-Mn<sup>++</sup>. La mezcla de ensayo enzimático contiene las concentraciones de ATP-Mn<sup>++</sup> indicadas en la abscisa con las siguientes adiciones: ●-●- nada; ○-○-100 μU/ml de insulina (porcina, recristalizada); ■-■-glucagón 10<sup>-6</sup> M; □-□-insulina 100 μU/ml más glucagón 10<sup>-6</sup> M.

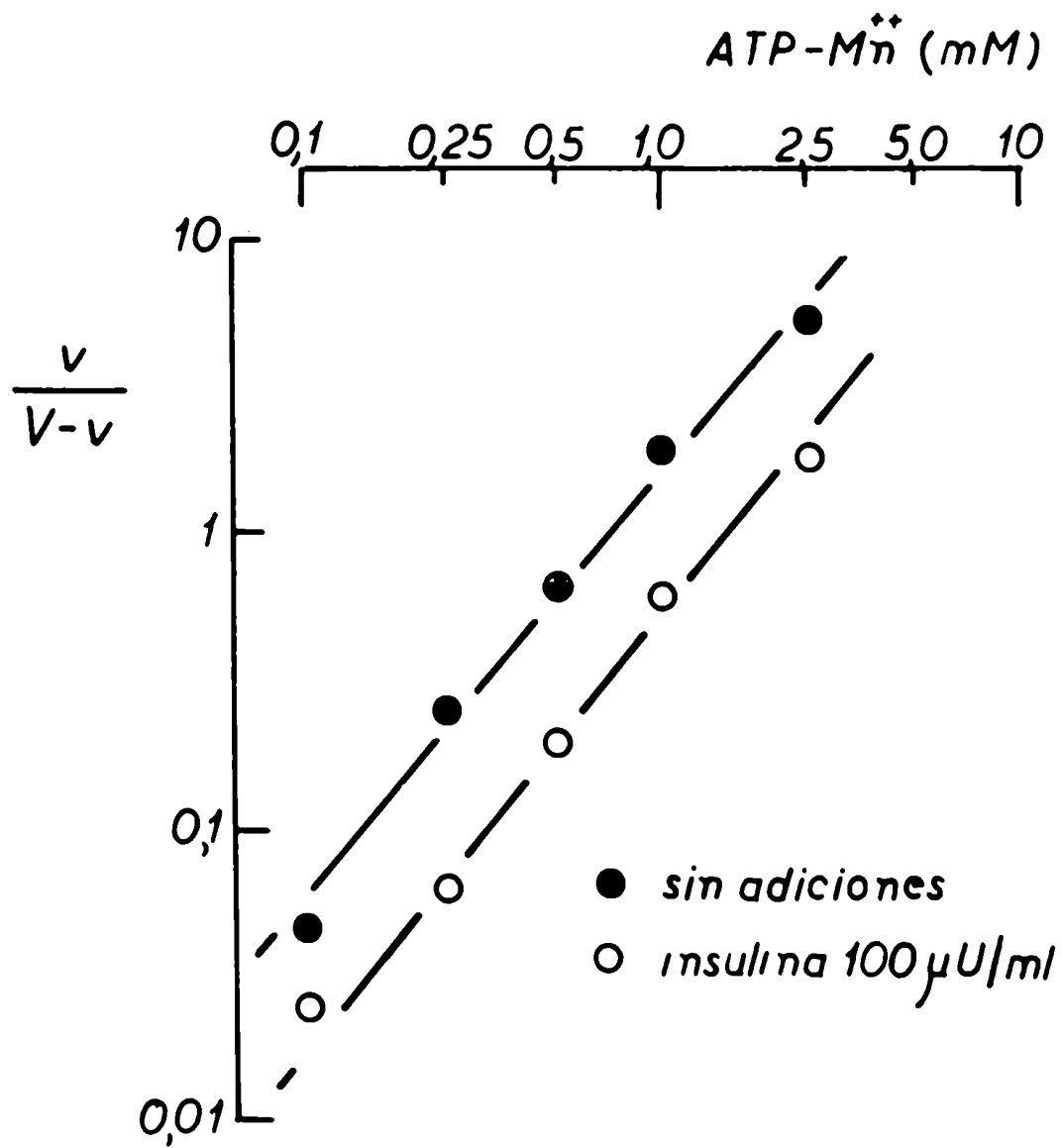


Figura 50- Gráfico de Hill correspondiente a la figura 49

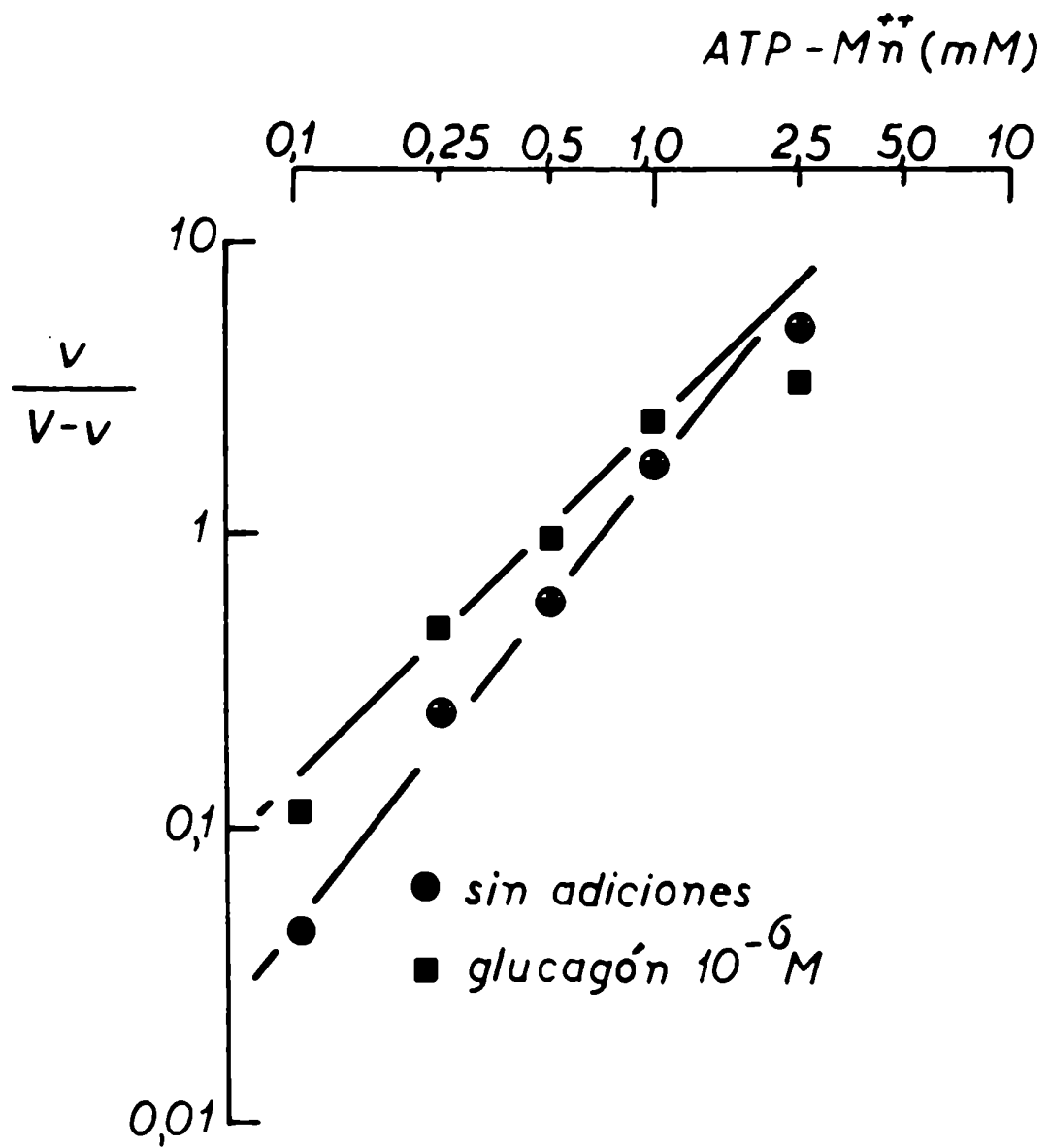


Figura 51- Gráfico de Hill correspondiente a la figura 49.



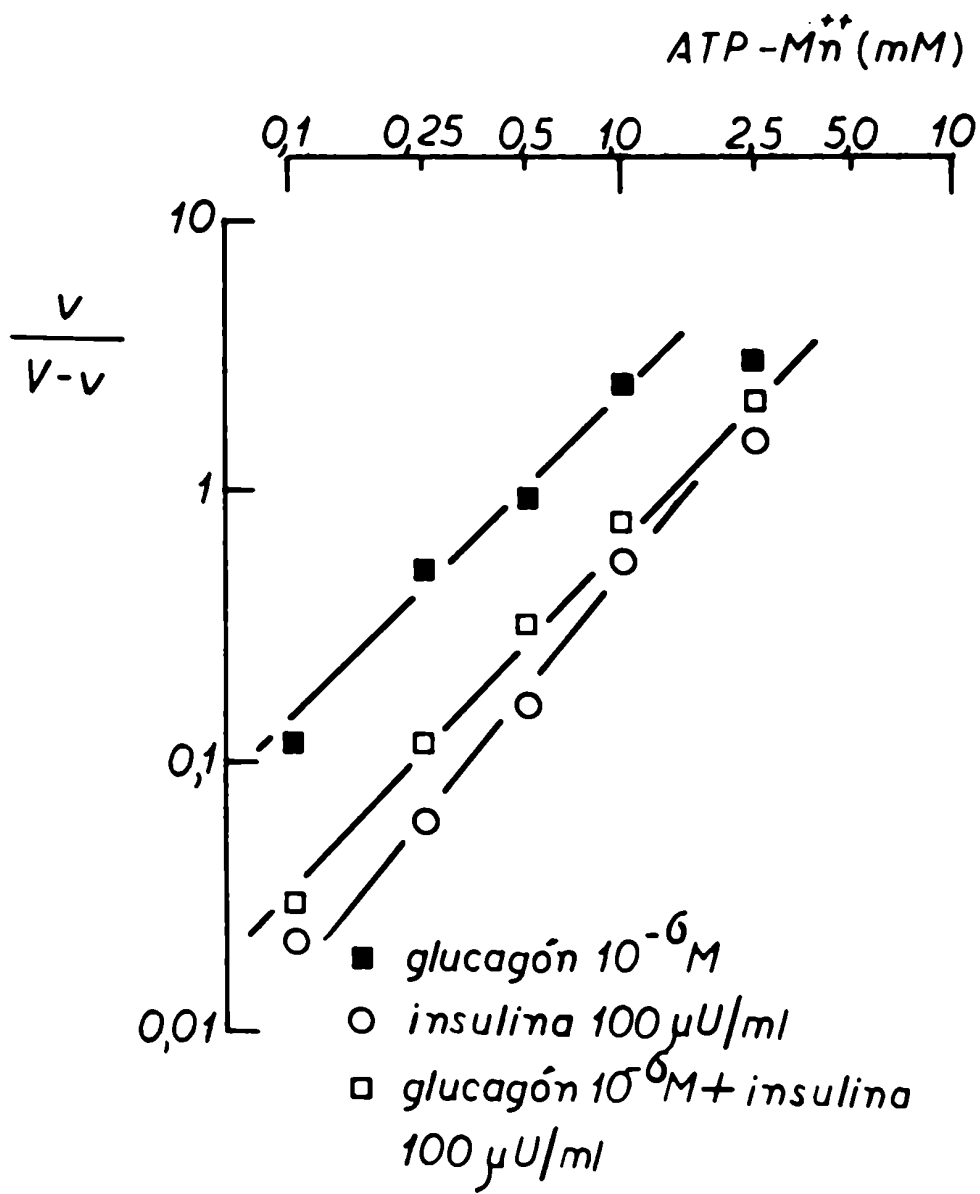


Figura 52- Gráfico de Hill correspondiente a la figura 49

c) Cuando ambas hormonas actúan simultáneamente, el efecto obtenido es intermedio entre los casos extremos de activación por glucagón e inhibición por insulina, pero actuando cada hormona individualmente.

También se estudió la cinética de la reacción variando las concentraciones de ATP-Mn<sup>++</sup> en presencia de una concentración de Mn<sup>++</sup> en exceso con respecto a la necesaria para complejar el ATP. Los resultados se presentan en las figuras 53, 54, 55 y 56. En este caso los efectos hormonales son idénticos a los obtenidos en ausencia de Mn<sup>++</sup>, con excepción de los cambios en las pendientes de los gráficos de Hill; estos son mucho menos evidentes.

En la figura 57 mostramos los resultados obtenidos cuando se estudió la cinética a una concentración constante de ATP-Mn<sup>++</sup> variando la concentración de Mn<sup>++</sup> en exceso. Se observan efectos hormonales a todas las concentraciones de Mn<sup>++</sup> ensayadas, pero la acción hormonal se hace menos evidente cuando la cantidad de Mn<sup>++</sup> utilizadas nos produce actividades enzimáticas altas. Por lo tanto, la acción del glucagón o de la insulina no se debe a una disminución o aumento de la aparente afinidad del sistema adenilato ciclasa por el Mn<sup>++</sup>. Con respecto a este punto debemos decir que nuestros resultados no están de acuerdo a los comunicados por Birnbaumer y colaboradores (40) referentes al efecto activador del ACTH sobre la adenilato ciclasa de células grasas. Estos autores postulan que la activación de la ciclasa por el ACTH puede ser explicada por un incremento de la aparente afinidad de la enzima por el Mg<sup>++</sup>.

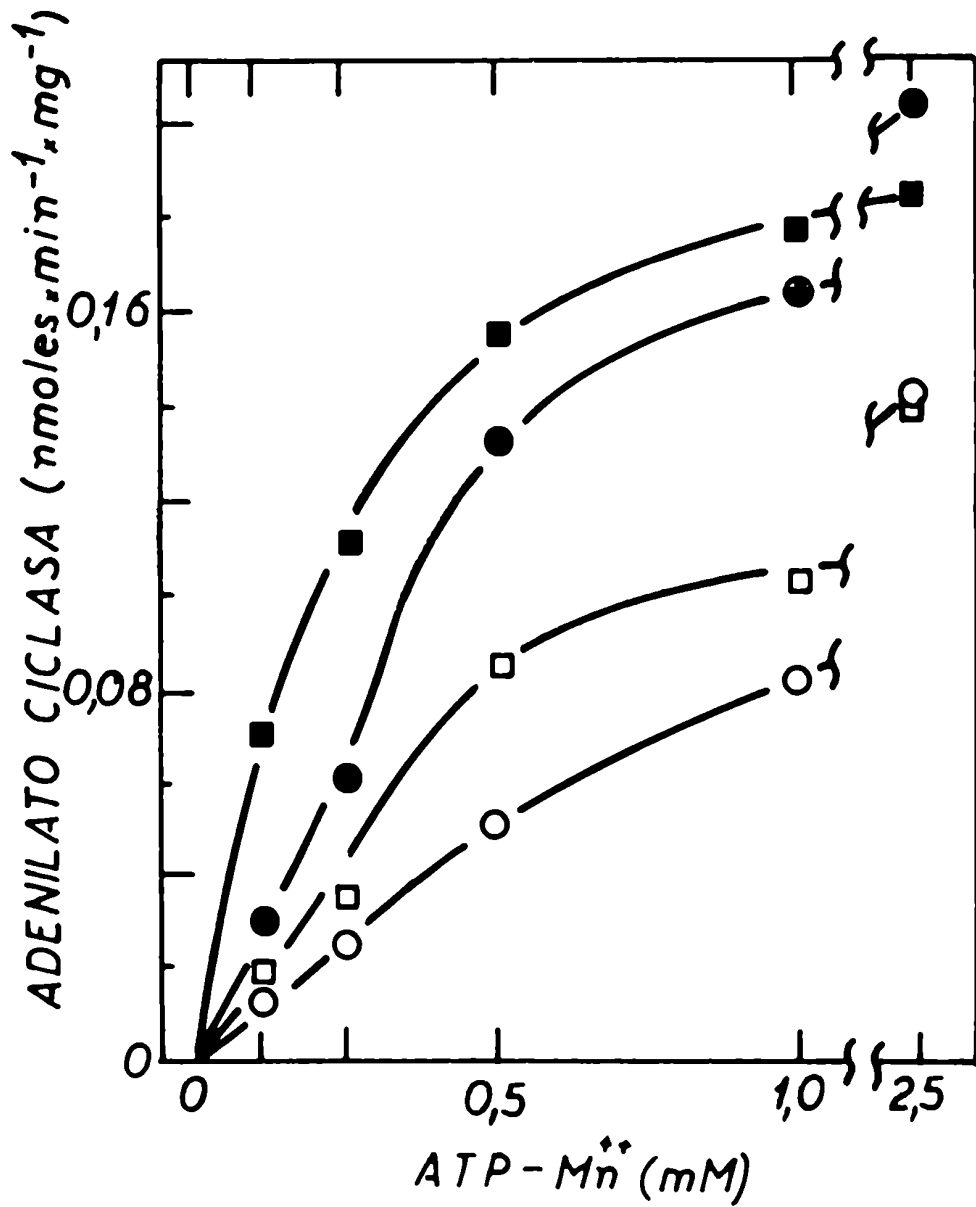


Figura 53- Actividad de adenilato ciclasa en función de distintas concentraciones de ATP-Mn<sup>2+</sup>, en presencia de Mn<sup>2+</sup> en exceso. Las condiciones son semejantes a las descritas en la figura 46 y 49 excepto que la concentración de MnCl<sub>2</sub> es de 2 mM.  
 -●-●- Sin adiciones; -○-○- insulina 100 μU/ml (insulina porcina, recristalizada); -■-■- glucagón 10<sup>-6</sup> M; -□-□- insulina 100 μU/ml más glucagón 10<sup>-6</sup> M.

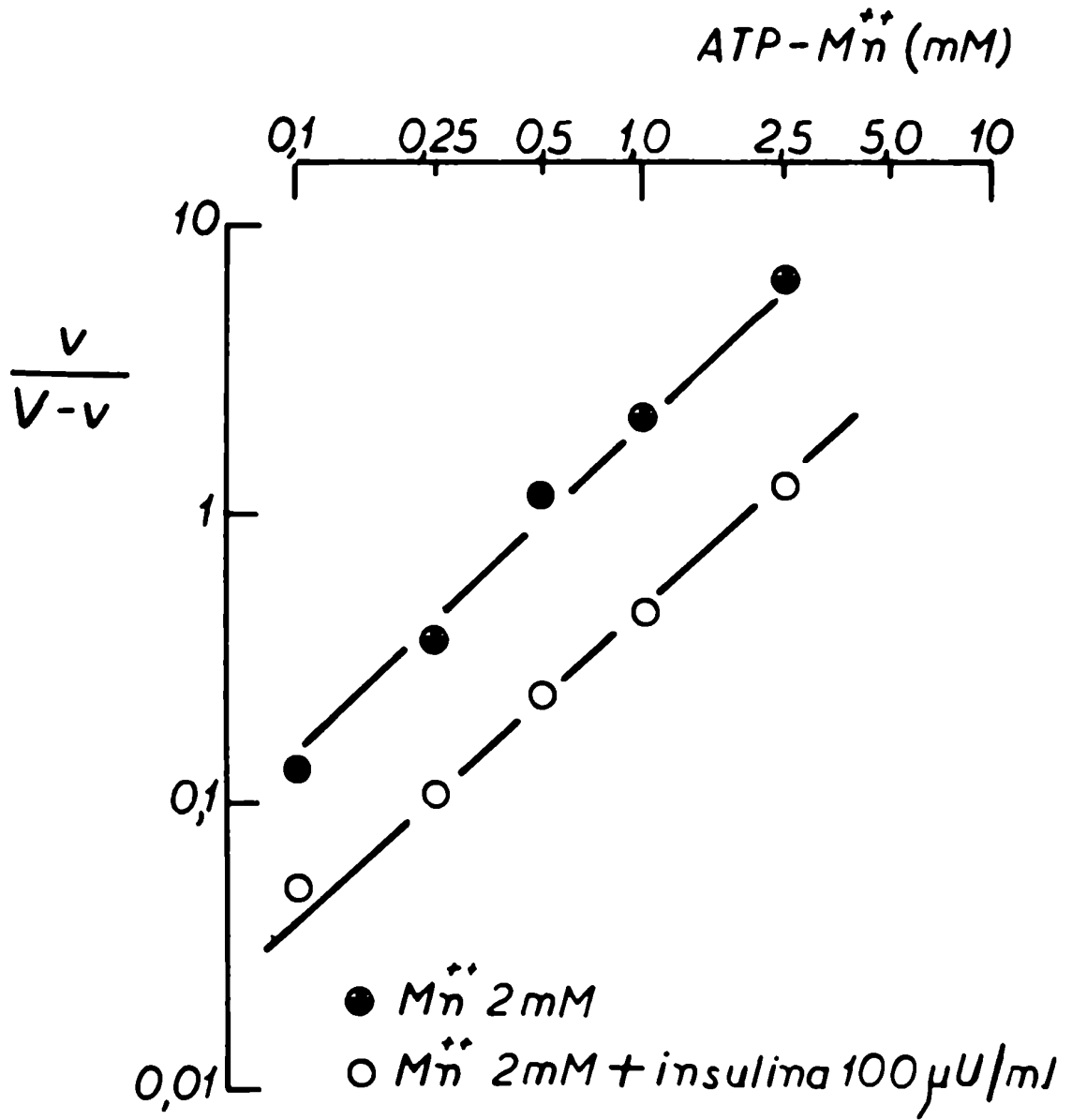


Figura 54- Gráfico de Hill correspondiente a la figura 53.

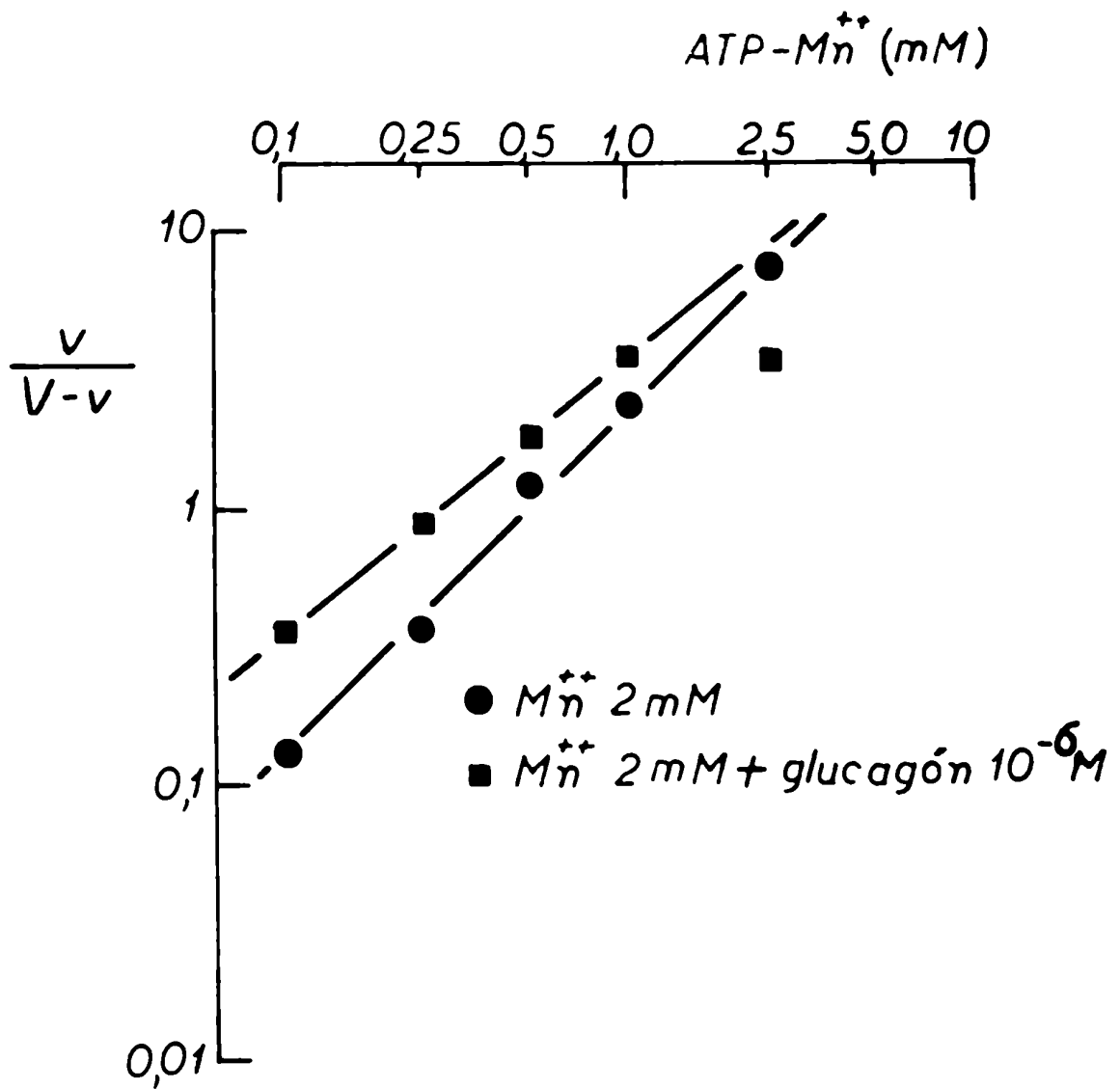


Figura 55- Gráfico de Hill correspondiente a la figura 53.

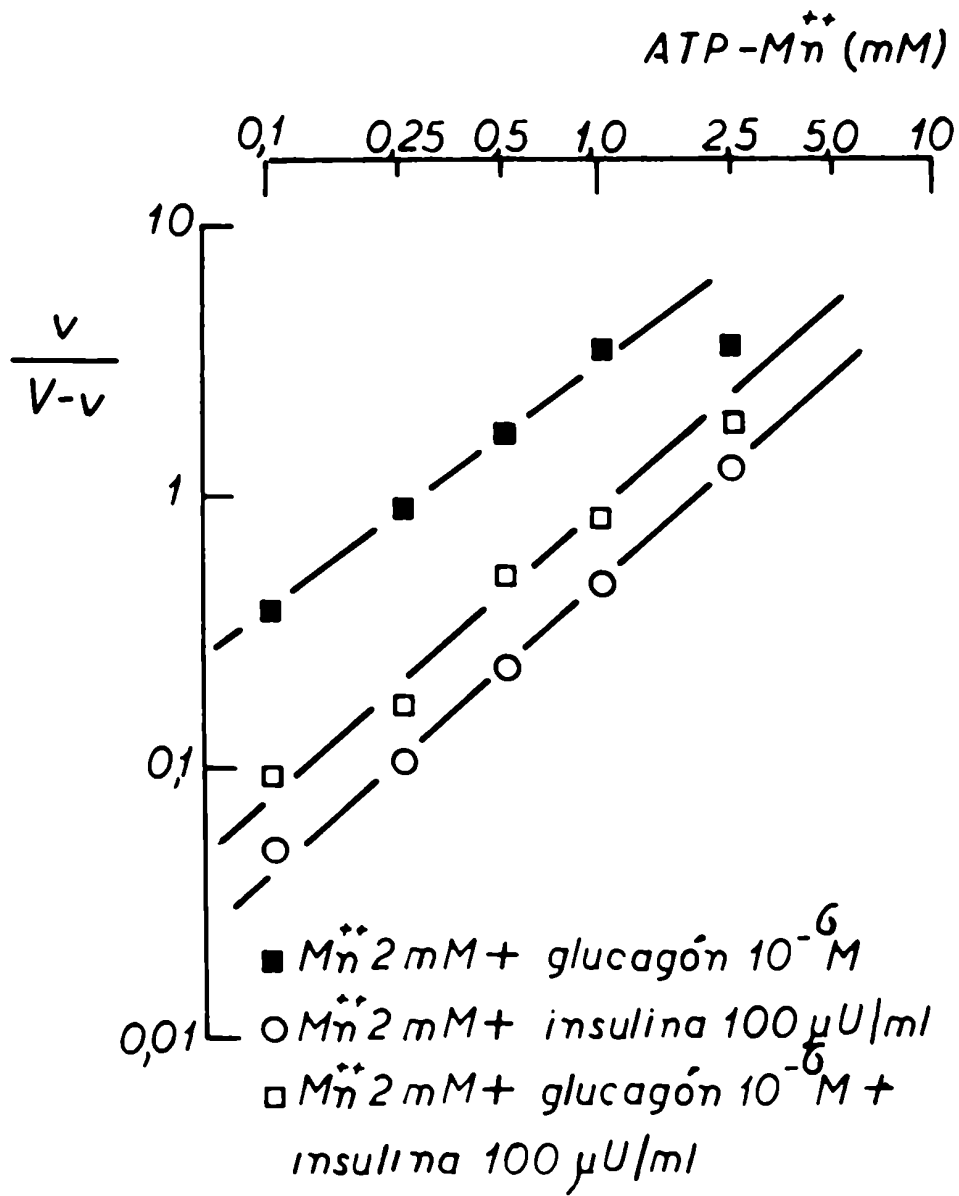


Figura 56- Gráfico de Hill correspondiente a la figura 53.

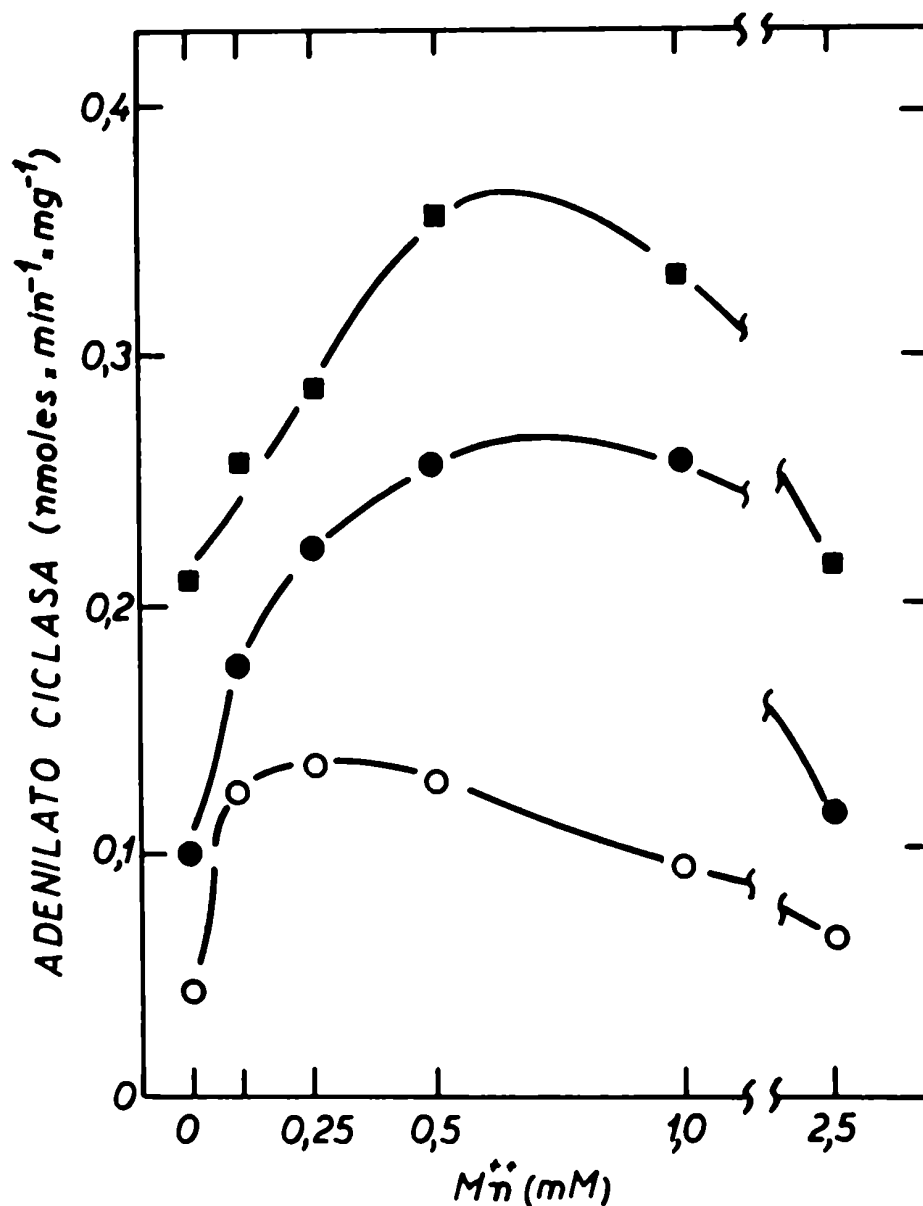


Figura 57- Actividad de adenilato ciclasa en función de la concentración de  $Mn^{++}$  en exceso a la del complejo ATP- $Mn^{++}$ . Las mezclas de ensayo contienen las concentraciones de  $MnCl_2$  indicadas en la abscisa con el agregado de ATP y  $MnCl_2$  0,5 mM. Otras condiciones se especifican en la figura 49 y 46.  
 -●-●- Sin adiciones; -○-○- 100  $\mu$ U/ml de insulina porcina, recristalizada; -■-■- glucagón  $10^{-6}$  M.

#### 4- Cinética de los efectos combinados de insulina y glucagón sobre la adenilato ciclasa de Neurospora crassa.

Los resultados presentados en las figuras 49 y 53 nos señalan que la insulina y el glucagón revierten mutuamente sus efectos. Por lo tanto nos resultó interesante estudiar la acción sobre la adenilato ciclasa de concentraciones crecientes de insulina para una concentración fija de glucagón y viceversa.

Las figuras 58 y 59 presentan estos resultados permitiéndonos obtener las siguientes conclusiones:

a) En todos los rangos de concentraciones de glucagón (Figura 58) o en su ausencia (Figuras 47 y 58), las curvas de respuesta a la insulina se extienden cubriendo un rango mínimo de cuatro órdenes de magnitud. Esto nos podría sugerir que más de un componente cinético se forma como consecuencia de la interacción entre las membranas de Neurospora y la insulina.

Las curvas de la figura 47 son semejantes a las obtenidas para el efecto inhibitorio sobre la producción de glicerol en el tejido adiposo(190), o a la incorporación de aminoácidos a las proteínas en las células grasas (191). El 50% de los efectos máximos se observó a concentraciones de insulina semejante a las empleadas en la mutante "slime" de Neurospora crassa, para obtener efectos inhibitorios sobre la adenilato ciclasa.

b) La concentración de insulina necesaria para obtener el 50% del efecto inhibitorio en la enzima, no experimenta un cambio muy marcado cuando se incrementa la concentración de glucagón hasta  $10^{-6}$  M. Sin embargo, en la máxima concentración de glucagón estudiada,  $10^{-5}$  M, el requerimiento de la insulina necesaria para



obtener el 50% de inhibición aumenta más de 10 veces.

c) En forma semejante a lo que ocurre con la insulina, las curvas de respuesta al glucagón se extienden en un rango de concentraciones que abarca cuatro órdenes de magnitud (Figura 59) . En ausencia de insulina, la mitad de la máxima activación se observa a concentraciones de glucagón entre  $10^{-9}$  y  $10^{-8}$  M. Este valor es similar al obtenido para la activación por glucagón de la adenilato ciclasa de membranas de hepatocitos (40).

A una concentración de insulina de 100  $\mu$  unidades por ml o mayores, la concentración de glucagón necesaria para obtener el 50% del efecto activador, aumenta más de 10 veces. A concentraciones altas de insulina,  $10^4$   $\mu$  unidades por ml, es evidente la existencia de dos componentes cinéticos con diferentes afinidades por el glucagón.

d) El glucagón revierte el efecto inhibitorio de la insulina sobre la adenilato ciclasa, pero los valores de la reversión disminuyen con el aumento de la concentración de insulina. Sin embargo, la activación de la ciclasa por el glucagón que es de dos veces en ausencia de insulina, aumenta hasta cerca de 10 veces cuando utilizamos  $10^4$   $\mu$  unidades por ml de esta hormona.

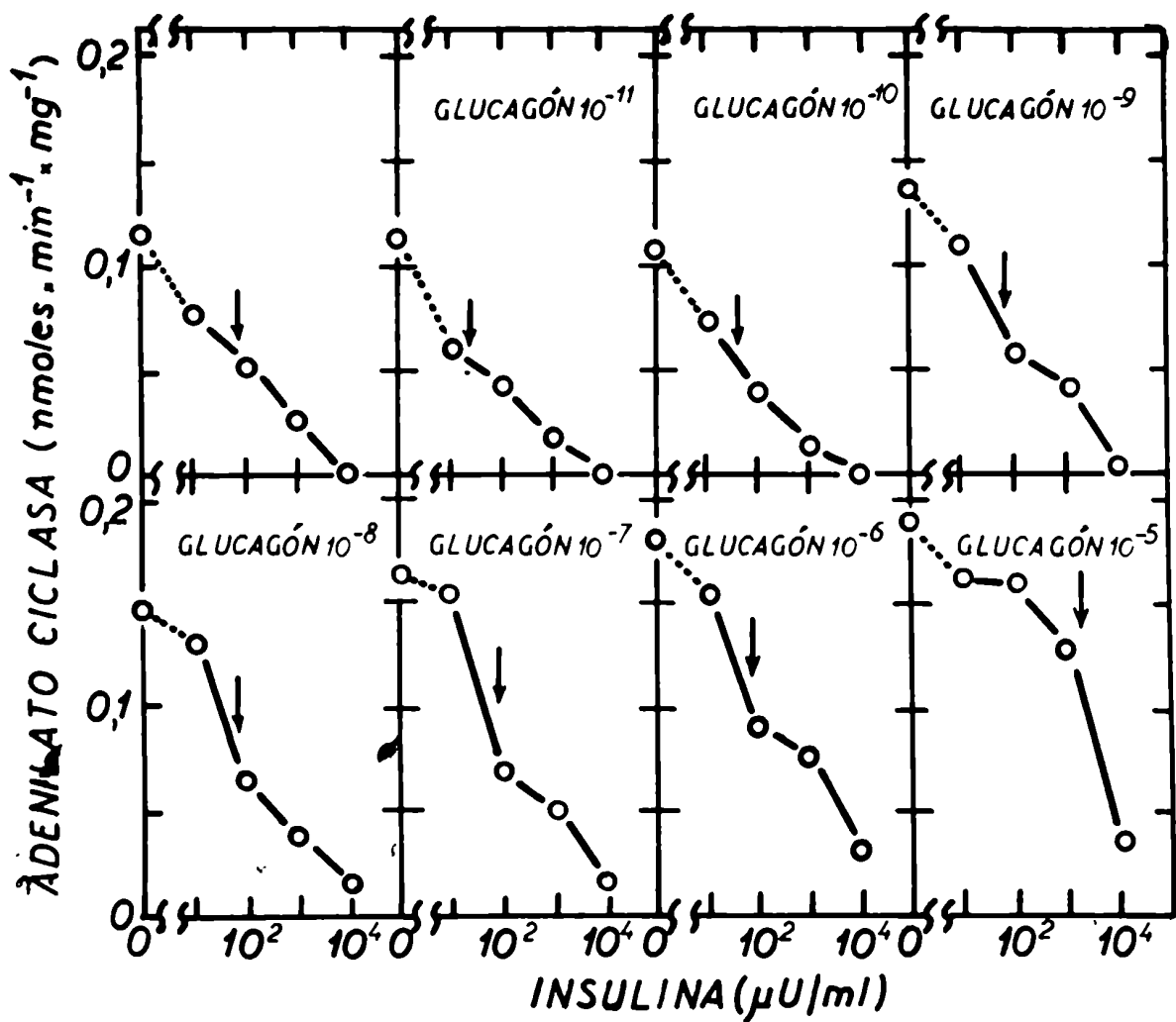


Figura 58- Actividad de adenilato ciclasa en función de concentraciones de insulina (porcina recristalizada) en presencia de las concentraciones indicadas de glucagón.

Los tiempos de incubación fueron de 2.5 minutos. Otras condiciones se especifican en la figura 46.

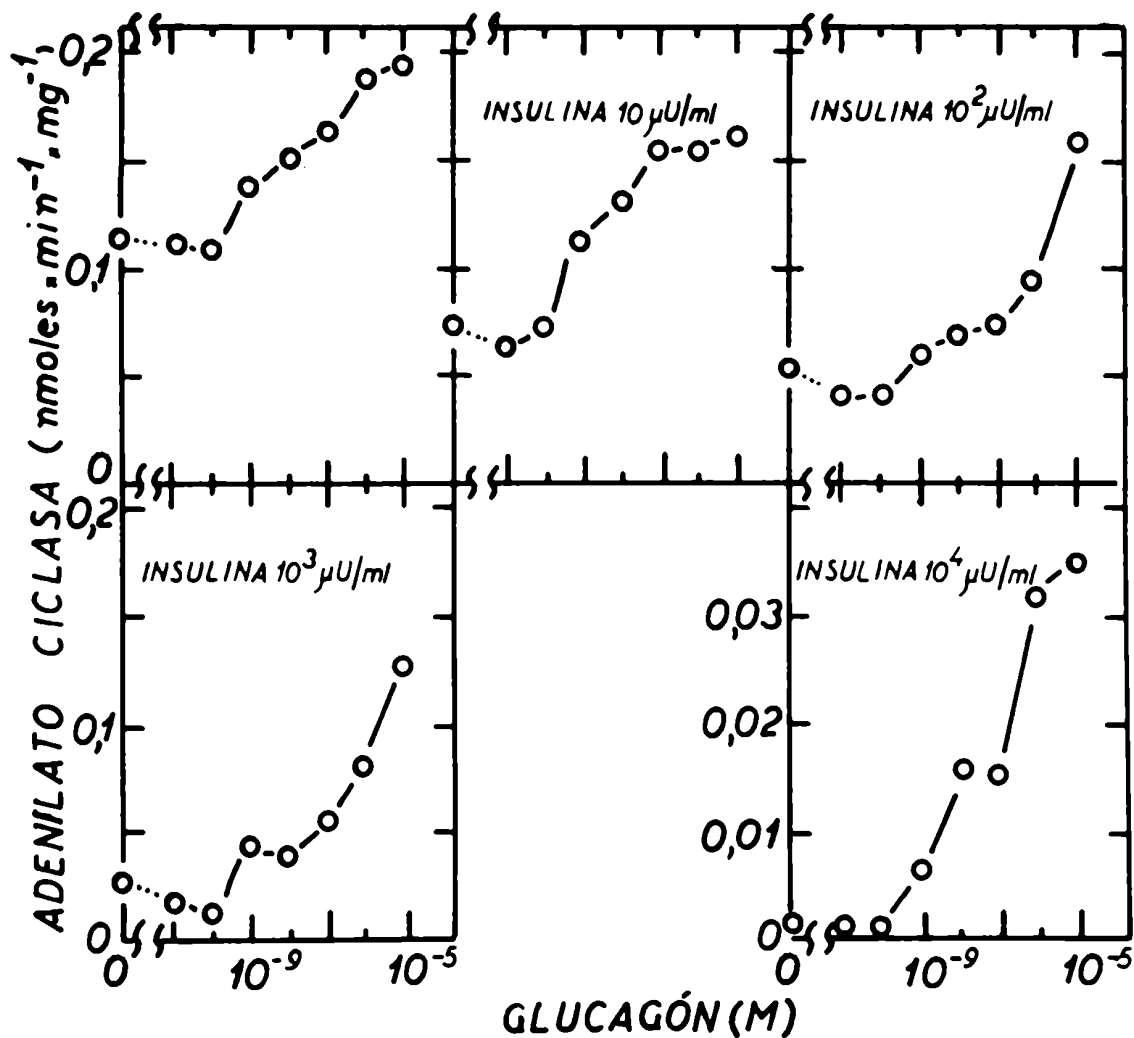


Figura 59- Actividad de adenilato ciclasa en función de distintas concentraciones de glucagón en presencia de las concentraciones indicadas de insulina. Las condiciones de incubación se detallan en la figura 46.

## DISCUSION

### I- Localización y propiedades generales.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios sobre los mecanismos de regulación del metabolismo del glucógeno en Neurospora crassa, su semejanza con los organismos superiores se hizo evidente.

Los trabajos de Tellez-Iñón y Torres (151,152) confirman la existencia de formas interconvertibles de glucógeno sintetasa y fosforilasa en extractos miceliares de Neurospora crassa. Las condiciones de activación de una de ellas son similares a las necesarias para la inactivación de la otra, en forma semejante a lo que ocurre en mamíferos. La conversión de la forma inactiva a la activa de fosforilasa requiere ATP-Mg<sup>++</sup> y es incrementada notablemente por la presencia de 3',5' adenosina monofosfato cíclico.

Trabajos recientes de Tellez-Iñón y Torres (153) describen la presencia de interconversiones también a nivel de la fosforilasa a fosfatasa.

Las evidencias obtenidas hasta el presente nos indican que es estas enzimas cumplen un rol muy importante en la síntesis y degradación del glucógeno. No obstante, las condiciones de regulación implican la existencia de metabolitos capaces de acelerar o retardar las distintas reacciones, tal es el caso del AMP cíclico.

Los datos experimentales y resultados presentados en esta tesis nos permiten asegurar la existencia de una enzima, adenilato ciclasa, responsable de la síntesis de AMP cíclico en membranas plasmáticas de Neurospora crassa (192).

La presencia de esta enzima se demostró en diferentes células de numerosos tejidos de mamíferos (19,20), con distintas localizaciones intracelulares (22,28,33). En microorganismos se encontró una actividad enzimática similar descrita en Escherichia coli (17) y en Brevibacterium liquefaciens (34).

Se presentaron dificultades al estudiar la adenilato ciclasa en extractos miceliares de Neurospora crassa (cepa St L74), debido a la existencia de numerosas ATPasa que destruían el ATP  $\Delta$ P<sub>32</sub> utilizado como sustrato y a la imposibilidad de obtener buenas preparaciones de membranas plasmáticas. Estos problemas se resolvieron al emplear como fuente de obtención de enzima las membranas plasmáticas de la mutante "slime" de Neurospora crassa (159).

Como ya dijimos anteriormente, esta cepa (Fz:Os-1-N1118-FGSC) crece en forma de protoplastos aislados rodeados de una membrana plasmática fácil de separar (Figura 12 A y B). Cultivos de la mutante "slime" de N crassa en medio líquido, nos permiten disponer de un adecuado volumen celular para los distintos ensayos enzimáticos y abre nuevas posibilidades al estudio de otras enzimas unidas a membranas de N. crassa.

La enzima adenilato ciclasa en la mutante "slime" se encuentra asociada a la fracción subcelular correspondiente a membranas plasmáticas (Tabla II), las cuales pueden obtenerse en forma más purificada por gradientes de centrifugación en sacarosa (Figura 13). La enzima es capaz de ser "solubilizada" de la membrana y obtenida en forma "no-sedimentable" por tratamiento con el detergente Lubrol PX (Tabla III).

Tiene como sustrato al ATP y requiere  $Mn^{++}$  para su actividad

En las condiciones de ensayo standard (Ver Materiales y Métodos), el único producto que se detecta es el AMP cíclico (Figuras 14 y 15) y se obtienen actividades específicas en un rango entre 0.15 y 0.45 nmoles por minuto por mg de proteína. Estas actividades son del mismo orden que las obtenidas para las ciclasas animales, en su máximo estado de estimulación (13,40,45).

La ciclasa de Neurospora crassa presenta algunas diferencias con respecto a las de mamíferos:

a) Requiere específicamente como catión divalente al  $Mn^{++}$  (Figura 18), en lugar del  $Mg^{++}$  (40).

b) No es estimulada por el  $F^-$  conocido activador de la mayoría de las ciclasas (40,39,44,45).

c) En la mezcla de incubación no es necesaria la presencia de teofilina. Esto nos indicaría que la AMP cíclico fosfodiesterasa de N. crassa es soluble o bien, que no se inhibe por metilxantinas (Figura 18).

## II- Purificación y Peso Molecular

Al ser solubilizada la enzima con Lubrol-PX y posterior pasaje de la ciclasa "no-sedimentable" por columna de DEAE celulosa se obtiene un pico de actividad enzimática a una concentración de KCl de 0.36 M (Figura 32). Esta fracción tiene una actividad específica de 4 nmoles por minuto por mg de proteína. Este valor es 100 veces más alto que el obtenido para el lisado (Tabla V). Gradientes continuos de sacarosa (Figuras 33 y 34) nos dan varios picos correspondientes a agregados enzimáticos de diferentes tamaños. El pico de 7.1 S. de menor movilidad corresponde a un peso molecular entre 120.000 y 150.000 (193). Este dato es confirmado por

electroforesis en gel de poliacrilamida de la adenilato ciclase de Neurospora crassa.

Varios autores utilizaron el método de solubilización por Lubrol. Levey lo utilizó para la enzima de miocardio, obteniendo un P.M. semejante (100).

Swanson y Medzihradsky (186,187) lo emplearon para solubilizar la ATPasa ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) de los microsomas de cerebro de cobayo.

### III- Cinética

Los estudios referentes a las propiedades cinéticas de la adenilato ciclase tiene pocos antecedentes en el amplio campo del metabolismo y función del AMP cíclico (39,40,42). Dos son los motivos que explican esta sorprendente situación:

a) La enzima tiene escasa actividad

b) Las preparaciones de membrana poseen ATPasas muy activas, es necesario emplear un método de detección para muy pequeñas cantidades de AMP cíclico y evitar el empleo de ATP-C<sub>14</sub> como sustrato. El ATP-C<sub>14</sub> produce productos marcados difíciles de separar del AMP cíclico, ya que co-cromatografían juntos. Las preparaciones de ATP- $\alpha$ -<sup>32</sup>P<sub>32</sub> (156,157) de actividad específica alta (50-100  $\mu$ Ci por tubo de ensayo) y el método de separación de AMP cíclico de Krishna (38) contribuyen a la obtención de resultados óptimos.

Como los tiempos de incubación para los diferentes ensayos son muy cortos (1 a 1.5 minutos), se hace innecesario el empleo de sistemas regenerantes de ATP, utilizado en la mayoría de los trabajos donde los tiempos de incubación son de 10 o 20 minutos y por lo tanto, el ATP radioactivo es destruido por las ATPasas.

En trabajos previos sobre las propiedades cinéticas de la adenilato ciclasa de mamíferos (39,40,42), se demostró la existencia de dos sitios para el catión divalente  $Mg^{++}$ . Uno de ellos corresponde al sitio catalítico en el cual el  $Mg^{++}$  forma complejo con el ATP; el otro, al sitio regulatorio sujeto a modificaciones hormonales.

En la mutante "slime" de Neurospora crassa, a través de los distintos resultados resumidos en la tabla IV, podemos establecer las siguientes evidencias:

- a) La enzima tiene como sustrato al complejo  $ATP-Mn^{++}$
- b) El  $ATP-Mn^{++}$  puede ser desplazado por el ATP del sitio catalítico.
- c) El  $Mn^{++}$  activa la reacción catalizada por la adenilato ciclasa a concentraciones bajas pero no a altas de  $ATP-Mn^{++}$  (193). Los resultados de las figuras 36, 37 y 38 confirmarían estos datos ya que se unen 1.8 moles de ATP por cada mol de enzima (120.000 a 150.000 de P.M.) indicándonos que existen 2 sitios de unión del ATP por mol de enzima.

De acuerdo a estas condiciones, los niveles intracelulares de AMP cíclico podrían regularse por cambios del radio  $ATP/Mn^{++}$ . En condiciones en que se produce un aumento del mismo disminuiría la concentración de AMP cíclico en el interior de la célula y vice-versa.

Por otra parte, de acuerdo a las propiedades de la enzima y a su localización en la membrana plasmática, podrían modificarse los niveles de AMP cíclico por cambios de alguna señal ambiental: efectos hormonales.



#### IV- Regulación hormonal

Los resultados más sorprendentes de los presentados hasta ahora, sin duda alguna, se refieren a la regulación hormonal de la adenilato ciclasa de *N. crassa*: su activación por glucagón (195) y su inhibición por insulina (196,197). Tienen, además, interesantes implicaciones en lo referente a la evolución de los receptores hormonales. De acuerdo con estos datos, receptores similares en hongos y mamíferos, sugerirían la existencia de proteínas provenientes de genes ancestrales comunes.

Una prueba definitiva de la similitud entre los mecanismos de regulación en *Neurospora* y en células animales la constituye la respuesta glucogenolítica de la célula entera al glucagón.

Evidencias previas indican que la degradación del glucógeno está bajo el control del AMP cíclico (152,199).

Los experimentos presentados en las figuras 43,44 y 45 corroboran lo dicho anteriormente puesto que, el agregado de la hormona al medio de cultivo de la mutante "slime" produce:

- a) Aumento de la velocidad de glucógenolisis.
- b) Aumento de la actividad de la glucógeno fosforilasa
- c) Disminución de la actividad de glucógeno sintetasa

Estos resultados podrían explicarse por una acción del glucagón sobre la adenilato ciclasa de *Neurospora crassa*. El efecto activador, confirmado por repetidos experimentos, se presentan en las figuras 39,41 y 42. El efecto es más evidente a concentraciones bajas de  $ATP-Mn^{++}$  (Tabla VI).

Rodbell, Birnbaumer y colaboradores (87,92) estudiaron detalladamente el efecto del glucagón sobre la ciclasa de membranas purificadas de hígado. Los rangos fisiológicos de concentraciones

del glucagón en la activación son semejantes a los encontrados en *Neurospora* (Figura 40). Rodbell también propone la existencia de receptores hormonales en la membrana plasmática, datos confirmados en el "slime", al perderse el efecto activador del glucagón por tratamiento de las membranas con Lubrol-PX (Figuras 41 y 42).

Hasta el momento, la única evidencia de la existencia de un efecto del glucagón en microorganismos la constituía el trabajo de Rodríguez Candela y Nieto (201). Describen en esferoplastos de *Escherichia coli*, un efecto de glucagón a nivel de la síntesis de RNA y proteínas ( $\beta$  galactosidasa). Datos recientes nos indicarían que este efecto podría ser mediado a través de una estimulación de la adenilato ciclasa por el glucagón (200).

Las bases moleculares de la acción de la insulina representa uno de los más exitantes problemas en el campo del metabolismo hormonal.

Desde los primeros trabajos sobre el aumento de la permeabilidad celular para los azúcares producido por la insulina (202), se han realizado numerosos estudios para postular una hipótesis unitaria sobre los mecanismos de acción de esta hormona (203-205).

Desde un primer momento, se pensó que todas las respuestas celulares a la insulina podrían explicarse solamente por un aumento en la permeabilidad de las membranas (207). Los trabajos iniciales de Sutherland y su grupo, sobre el AMP cíclico y su importante papel en la amplificación de las señales hormonales, representan una etapa crucial en la dilucidación de los mecanismos de acción hormonal (59,206).

Bajo ciertas condiciones, la insulina puede disminuir la

concentración intracelular de AMP cíclico (198,208,209) aumentando la liberación del mismo al medio extracelular.

Uno de los más grandes obstáculos en la resolución de estos problemas fue la pérdida de los efectos de insulina con la ruptura celular.

Algunos resultados obtenidos con preparaciones libres de células indicaron que la disminución de los niveles intracelulares de AMP cíclico, en presencia de insulina, podrían explicarse por una activación de la fosfodiesterasa específica del AMP cíclico, pegada a membranas (210,211).

Por otra parte, evidencias recientes presentadas por Cuatrecasas, indicaron que la insulina revierte parcialmente la activación producida por el glucagón o la adrenalina en la adenilato ciclase de células grasas o hepáticas (93,212).

Los resultados presentados en esta tesis demuestran claramente, que en Neurospora crassa, la insulina es capaz de controlar los niveles de AMP cíclico, inhibiendo la actividad de la adenilato ciclase (Figura 46). Resultados similares se encontraron en cultivos de células de riñón de hamster (BHK 21/13) (126).

La insulina inhibe la actividad de la enzima en concentraciones hormonales consideradas como fisiológicas (188,189). La mitad de la máxima inhibición se produce con valores entre 30 y 60  $\mu$  unidades por ml de insulina (Figura 47). Los efectos inhibitorios se producen a concentraciones bajas de  $ATP-Mn^{++}$ , actúa como un inhibidor "pseudo-competitivo", aumenta el  $L_{0.5}$  pero no modifica el  $n$  de Hill (Tabla IX y figuras 49,50,51 y 52).

La insulina revierte el efecto activador del glucagón y viceversa (Figuras 58 y 59, 49 y 53). En presencia de  $Mn^{++}$  2 mM,

insulina y glucagón hacen menos evidentes sus efectos (Figuras 53,54,55,56,57).

Por lo tanto concluimos en que el efecto de la insulina sobre la concentración intracelular de AMP cíclico puede explicarse por una inhibición de la síntesis del nucleótido. Por otra parte, la insulina aumenta el transporte de glucosa al interior de la célula e incrementa la velocidad de síntesis del glucógeno, quizás, este último efecto sea mediado por el AMP cíclico (Figura 48 y tabla VIII).

Probablemente en Neurospora crassa, el sistema receptor hormonal-enzima unida a membrana sea más resistente a la ruptura celular y por lo tanto no sea afectada la capacidad de respuesta a un mensaje hormonal.

Estos inesperados hallazgos de efectos de glucagón e insulina en Neurospora crassa abren un nuevo campo para los estudios acerca de los mecanismos de acción hormonal en organismos multicelulares.

Actualmente estamos estudiando la existencia de un polipéptido con probables efectos regulatorios sobre la adenilato ciclasa de la mutante "slime" de Neurospora crassa, presente en homogenatos celulares de la mutante.

#### V- Modelo del mecanismo de control de la adenilato ciclasa.

Sobre la base de los resultados descriptos, puede intentarse postular un modelo que represente la forma en que la adenilato ciclasa puede ser controlada. En dicho modelo, primariamente, se supone a la enzima constituida por dos subunidades de interacción recíproca, relacionadas entre sí y con la membrana plasmática. Tal relación está definida operacionalmente en forma tal, que cambios conformacionales en una de las subunidades determinen cambios conformacionales en la otra. Por otra parte, cambios conformacionales en la membrana inducen modificaciones en ambas subunidades.

En el esquema presentado en la figura 60, los mencionados cambios conformacionales están ilustrados en parte por las transiciones a, b, c, d, e y f que resumen algunas de las posibilidades más relevantes del modelo propuesto.

Cada subunidad es portadora de un sitio catalítico para el sustrato  $\text{ATP-Mn}^{++}$  que, eventualmente puede ser ocupado por otros nucleótidos de adenina ATP o 5'AMP y de un sitio regulatorio ocupable por el  $\text{Mn}^{++}$ .

Por otra parte, la membrana es portadora de los receptores correspondientes al glucagón y a la insulina que, bajo ciertas condiciones, son sumamente excluyentes.

En el estado transicional a, puede apreciarse que la unión de una molécula de sustrato a un sitio activo determina 3 cambios conformacionales fundamentales:

a) Modificación del centro activo de la otra subunidad hacia una conformación más favorable para la unión  $\text{ATP-Mn}^{++}$ .

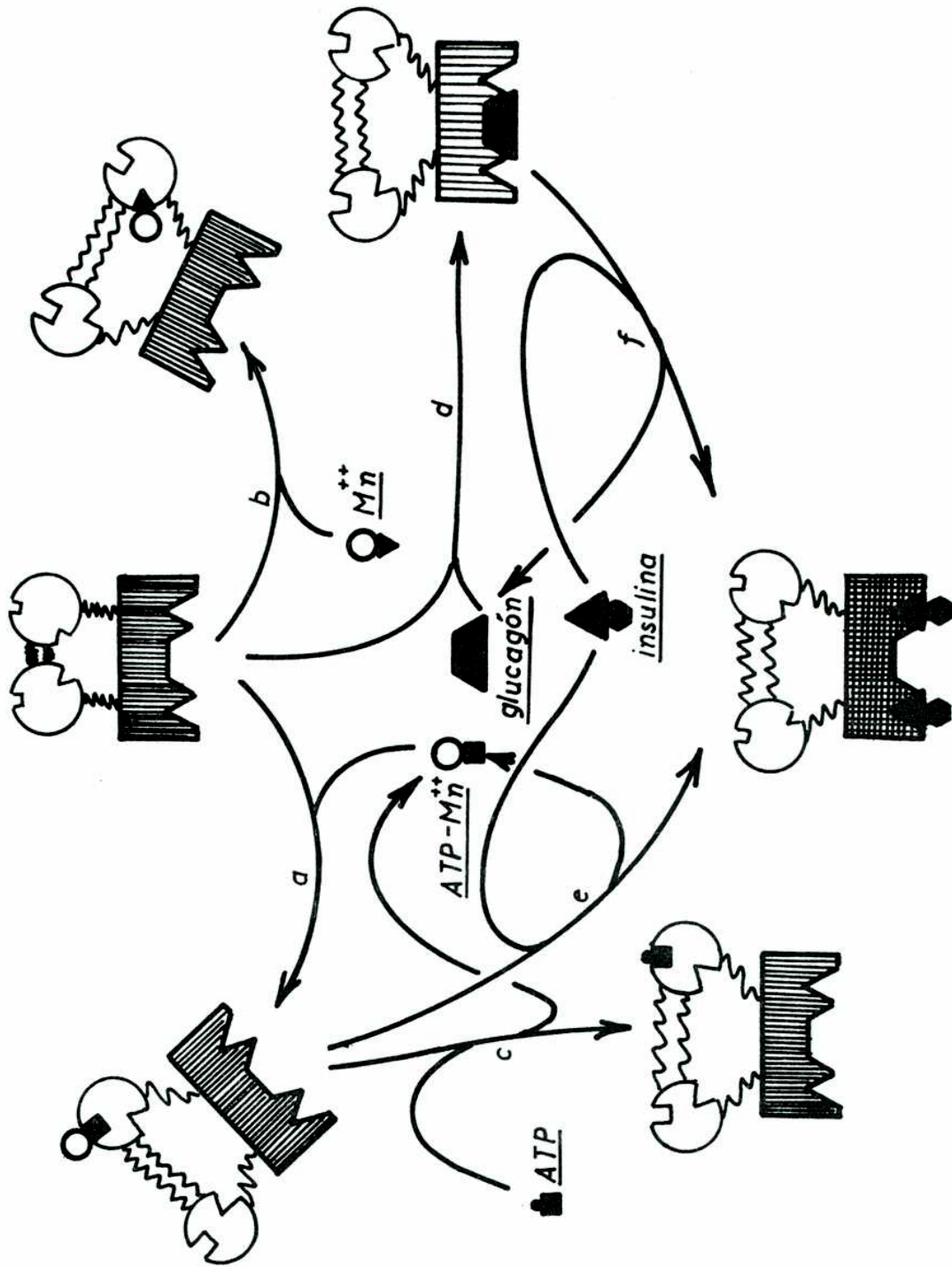


Figura 60- MODELO DEL MECANISMO DE ACCION DE LA ADENILATO CICLASA DE NEUROSPORA CRASSA.

- b) Modificación similar de los sitios para el  $Mn^{++}$ .
- c) Disminución de la interacción entre las subunidades

En la transición b, se ilustra el caso correspondiente a la unión de una molécula de  $Mn^{++}$  que daría lugar a cambios similares a los descritos en la transición a.

Por otra parte, la transición c, indica una simple competencia por el mismo sitio entre el ATP y el  $ATP-Mn^{++}$ , con la salvedad de que el primero no da lugar a la formación de producto.

En las transiciones d, e y f se resumen los principales efectos hormonales. El glucagón (Transición d) determina cambios similares a los que operan por la unión de una molécula de  $ATP-Mn^{++}$  (a) o de  $Mn^{++}$  (b).

En cuanto a la insulina, la situación es más compleja, como se ilustra en las transiciones e y f. Puede apreciarse por un lado, en e que dicha hormona desplaza el estado del sitio activo hacia una conformación menos favorable para la unión del sustrato, sin modificar el grado de interacción entre las subunidades. Por otra parte, f, la insulina es capaz de disminuir la unión del glucagón al receptor.

De hecho, en todos los casos en que esté involucrada una acción hormonal, el efecto primario operaría a nivel del estado conformacional de la membrana; en muchos casos, estos cambios podrían estar determinados por una redistribución de sus componentes proteicos, tal como ha sido propuesto por Singer (214).

## CONCLUSIONES

Los datos experimentales presentados en esta tesis nos permiten obtener las siguientes conclusiones:

1- Existe una enzima con actividad de adenilato ciclasa en la mutante "slime" de Neurospora crassa.

2- La adenilato ciclasa se encuentra localizada en la fracción subcelular correspondiente a membranas plasmáticas. Preparaciones purificadas de la enzima permiten confirmar estas estructuras al microscopio electrónico.

3- A partir de ATP, la adenilato ciclasa sintetiza AMP cíclico como único producto.

4- Requiere para su actividad específicamente al catión  $Mn^{++}$ . No es activada por  $F^{-}$ , adrenalina, nor-adrenalina o ACTH.

La reacción es lineal hasta los 5 minutos sin necesidad del agregado de teofilina, mercaptoetanol o sistema regenerante de ATP.



5- Tiene como sustrato al complejo  $\text{ATP-Mn}^{++}$ . Graficando actividad enzimática en función de la concentración de sustrato, obtenemos una curva sigmoide, clásica en los sistemas alostéricos. El n de Hill para el complejo  $\text{ATP-Mn}^{++}$  es de aproximadamente 2.

6- El  $\text{Mn}^{++}$  en exceso con respecto al necesario para formar el complejo  $\text{ATP-Mn}^{++}$  es un activador. El efecto activante se observa en concentraciones bajas de  $\text{ATP-Mn}^{++}$ .

En presencia del catión la curva sigmoidea tiende a transformarse en michaeliana. El n de Hill se aproxima a 1.

7- A bajas concentraciones de  $\text{ATP-Mn}^{++}$ , gráficos de actividad enzimática en función de la concentración de  $\text{Mn}^{++}$  en exceso nos da una curva sigmoidea con un n de Hill para el  $\text{Mn}^{++}$  cercano a 2.

8- El  $5'\text{AMP}$  es un inhibidor competitivo de la reacción, compete con el sustrato  $\text{ATP-Mn}^{++}$ .

9- El  $\text{ATP}$  es un inhibidor de la reacción, puede desplazar al complejo  $\text{ATP-Mn}^{++}$  del sitio catalítico de la enzima.

10- Si se tratan las membranas plasmáticas con el detergente Lubrol-PX, se obtiene una adenilato ciclasa soluble.

11- Purificaciones por DEAE celulosa y gradientes de sacarosa de la enzima no-sedimentable, nos permiten determinar su peso molecular. Los valores obtenidos confirmados por electroforesis en gel de poliacrilamida se encuentran en un rango entre 120.000 y 150.000.

12- Los estudios de unión ("binding") indican que la enzima tiene una capacidad de unir 1.5 moles de ATP por 100.000 mg de proteína.

13- La adenilato ciclasa de Neurospora crassa está sujeta a una regulación hormonal. Es activada por glucagón e inhibida por insulina.

14- El 50% de la activación por glucagón se obtiene a concentraciones de la hormona consideradas como fisiológicas: 10 nM. Una respuesta significativa se obtiene en concentraciones de 0.1 nM de glucagón.

15- El efecto hormonal se pierde cuando se trata a la enzima con Lubrol-PX, indicándonos que los receptores hormonales se encuentran localizados en la membrana plasmática.

16- El glucagón en Neurospora crassa también aumenta la velocidad de glucogenólisis, incrementa la actividad de la fosforilasa del glucógeno y disminuye la actividad de la glucógeno sintetasa.

17- La adenilato ciclasa se inhibe por insulina. Es la primera vez que se describe el efecto directo de esta hormona sobre la enzima.

18- La insulina actúa en concentraciones consideradas como fisiológicas y el 50% del efecto inhibitorio lo obtenemos con 30-60 unidades de insulina por ml.

19- La insulina actúa produciendo un tipo de inhibición "pseudo-competitiva". Aumenta el  $L0.5$  pero no modifica el  $n$  del gráfico de Hill.

20- Insulina y glucagón revierten mutuamente sus respectivos efectos.

21- La insulina aumenta la velocidad de transporte de la glucosa hacia el interior de la célula entera. Aumenta la incorporación de glucosa a glucógeno, incrementando la velocidad de síntesis del polisacárido.

22- De acuerdo con el modelo propuesto, la adenilato ciclasa estaría constituida por 2 subunidades, con interacciones mutuas. Cada subunidad estaría formada por un sitio catalítico para el  $\text{ATP-Mn}^{++}$  y un sitio regulatorio con afinidad por el  $\text{Mn}^{++}$ .

Por otra parte la membrana plasmática tendría sitios para las interacciones de la insulina y del glucagón.

Los distintos cambios transicionales (Figura 60) se producirían por modificaciones a nivel de la membrana (hormona) y de los sitios catalíticos ( $\text{ATP-Mn}^{++}$ ) o regulatorios ( $\text{Mn}^{++}$ ). Estos cambios aumentarían o disminuirían la afinidad de la enzima por el sustrato  $\text{ATP-Mn}^{++}$ , produciendo, por lo tanto, una mayor o menor cantidad de AMP cíclico.

## BIBLIOGRAFIA

- 1- Rall,T.W., Sutherland,E.W. y Berthet,J., J.Biol.Chem.,224, 463 (1957).
- 2- Sutherland,E.W. y Rall,T.W., J.Am.Chem.Soc.,79, 3608 (1957).
- 3- Sutherland,E.W. y Rall,T.W., J.Biol.Chem., 232, 1065 (1957).
- 4- Sutherland,E.W. y Rall,T.W., J.Biol. Chem. 232, 1077 (1957).
- 5- Green,A.A. y Cori,G.T., J.Biol.Chem., 151, 21 (1943).
- 6- Cori,G.T. y Green,A.A.,J.Biol.Chem., 151, 31 (1943).
- 7- Riley,G.A. y Haynes,J. J.Biol.Chem., 238, 1563 (1963).
- 8- Chelala,C.A. y Torres,H.N., Biochem.Biophys.Acta,198, 504 (1970).
- 9- Fischer,E.H. y Krebs,E.G., J.Biol.Chem. 216, 121 (1955).
- 10- Sutherland,E.W., Robinson,G.A. y Butcher,R.W., Circulation, 37, 279 (1968).
- 11- Cook,N.H., Lipkin,D. y Markham,R., J.Am.Chem.Soc., 79, 3607 (1957).
- 12- Rall,T.W. y Sutherland,E.W., J.Biol.Chem.,237, 1228 (1962).
- 13- Sutherland,E.W., Rall,T.W. y Menon,T., J.Biol.Chem., 237, 1220 (1962).
- 14- Rall,T.W. y Sutherland, E.W., J.Biol.Chem., 237,1228 (1962).
- 15- Berthet,J., Sutherland,E.W. y Rall,T.W., J.Biol.Chem., 229, 351 (1957).

- 16- Hirata,M. y Hayaishi,O., Biochem. Biophys. Res. Commun. ,  
21, 361 (1965).
- 17- Tao,M. y Lipmann,F., Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 63, 86 (1969).
- 18- Pollard,C.J., Biochim.Biophys.Acta ,201, 511 (1970).
- 19- Duffus,C.M. y Duffus,J.H., Experientia 25, 581 (1969).
- 20- Klainer,L.M., Chi,Y.M., Freidberg,S.L., Rall,T.W. y Sutherland,  
E.W., J.Biol.Chem. 237, 1239 (1962).
- 21- Granner,D., Chase,L.R.,Aurbach,G.D. y Tomkins,G.M., Science,  
162, 1018 (1968).
- 22- Pohl,S.L., Birnbaumer,L. y Rodbell,M., Science, 164, 566 (1969).
- 23- Bär,H.P. y Hechter,O., Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 63, 350 (1969).
- 24- Rodbell,M., J.Biol.Chem., 242, 5744 (1967).
- 25- Davoren,P.R. y Sutherland,E.W., J.Biol.Chem., 238, 3016 (1963).
- 26- Chase,L.R. y Aurbach,G.D., Science 159, 545 (1968).
- 27- Castañeda,M. y Tyler,A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 33,  
782 (1968).
- 28- De Robertis,E., Rodriguez de Lores Arnaiz, Alberici,M.,  
Butcher,R.W. y Sutherland, E.W., J.Biol.Chem., 242, 3487 (1967).
- 29- Rabinowitz,M., Desalles,L., Meisler,J. y Lorand,J., Biochim.  
Biophys.Acta 97, 29 (1965).
- 30- Pulsinelli,W.A.y Eik-Nes,K.B., Fed.Proc. 29, 918 (1970).
- 31- Personne,P. y Anderson,W.A., J.Cell.Biol. 44, 20 (1970).
- 32- Vaughan,M.y Murad,F., Biochemistry 3, 3092 (1969).

- 33- Entman, M.L., Levey, G.S. y Epstein, S.E., Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 728 (1969).
- 34- Greengard, P., Hayaishi, O. Colowick, S.P., Fed. Proc., 28, 467, (1969).
- 35- Hayaishi, O., Greengard, P. y Colowick, P., J. Biol. Chem., 246, 5840 (1971).
- 36- Takai, K., Kurashina, Y., Suzuki, C., Okamoto, H., Veki, A. y Hayaishi, O., J. Biol. Chem., 246, 5843 (1971).
- 37- Alberty, R.A., J. Biol. Chem., 244, 3290 (1969).
- 38- Krishna, G., Weiss, B. y Brodie, B.B., J. Pharmacol. Exp. Ther., 163, 379 (1968).
- 39- Taunton, O.D., Roth, J. y Pastan, I., J. Biol. Chem., 244, 247 (1969).
- 40- Birnbaumer, L., Pohl, S. y Rodbell, M., J. Biol. Chem., 244, 3468 (1969).
- 41- Rodbell, M., J. Biol. Chem., 242, 5744 (1967).
- 42- Severson, D., Drummond, G. y Sulakhe, P., J. Biol. Chem., 247, 2949 (1972).
- 43- Hirata, M. y Hayaishi, O., Biochim. Biophys. Acta 149, 1 (1967)
- 44- Klainer, L.M., Chi, Y.M., Friedberg, S.L., Rall, T.W. y Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 237, 1239 (1962).
- 45- Rosen, O.M. y Rosen, S.M., Arch. Biochem. Biophys., 131, 449 (1969).
- 46- Weiss, B., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 166, 330 (1969).

- 47- Birnbaumer, L., Pohl, S. y Rodbell, M., J. Biol. Chem., 246, 1857 (1971).
- 48- Cohen, K.L. y Bitensky, M.W., J. Pharmacol. Exptl. Therp., 169, 80 (1969).
- 49- Cryer, P.E., Jarett, L. y Kipnis, D.M., Biochim. Biophys. Acta, 177 586 (1969).
- 50- Ide, M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 42 (1969).
- 51- Butcher, R.W. y Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 237, 1244 (1962)
- 52- Chang, Y.Y., Science 161, 57 (1968).
- 53- Nair, K.G., Biochemistry 5, 150 (1966).
- 54- Menaham, L.A., Hepp, K.D. y Wieland, O., Eur. J. Biochem., 8 435 (1968).
- 55- Cheung, W.Y., Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 533 (1970).
- 56- Braná, H y Chytil, F., Folia Microbiol. 11, 43 (1966).
- 57- Triner, L., Vulliemaz, Y., Schwartz, I. y Nahas, G.G., Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 64 (1970).
- 58- Kukovetz, W.R. y Pösch, G., Fed. Proc. 28, 741 (1969).
- 59- Sutherland, E.W. y Rall, T.W., Phar. Rev. 12, 265 (1960)
- 60- Rall, T.W. y Sutherland, E.W., Cold Spring Harbor, Symposia on Quantitative Biology XXVI, Long Island New York (1961).
- 61- Sutherland, E.W., Oye, I. y Butcher, R.W., Recent Progress. Hormone Res. 21, 623 (1965).
- 62- Robinson, G.A., Butcher, R.W. y Sutherland, E.W., Ann. Rev. Biochem. 37, 149 (1968).



- 63- Skelton,G.L.,Levey,G.S. y Epstein,S.E., Qirc. Res., 26, 35 (1970).
- 64- Bdolah,A. y Shramm,M., Biochem.Biophys.Res.Comm.,18, 452, (1965).
- 65- Butcher,R.W., Ho,R.J., Meng,H.C. y Sutherland,E.W.,J.Biol. Chem., 240, 4515 (1965).
- 66- Goldberg,A.L. y Singer,J.J., Proc.Natl.Aca.Sci.USA.,64, 134 (1969).
- 67- Shein,H.M. y Wurtman,R.J., Science,166, 519 (1969).
- 68- Butcher,R.W., Baird,C.E. y Sutherland,E.W., J. Biol.Chem. 243, 1705 (1968).
- 69- Hayners,R.C., Konitz,S.B. y Peron,F.G., J. Biol.Chem.,234, 1421 (1959).
- 70- Pastan,I y Wollman,S.H., J. Cell.Biol. 35, 262 (1967).
- 71- Ahn,C.S. y Rosenberg,I.N., Proc.Natl.Acad. Sci. USA. 60, 830 (1968).
- 72-Pastan,I. y Macchia,V., J. Biol.Chem., 242, 5757 (1967)
- 73- Chase,L.R. y Aurbach,G.D., Proc.Natl Aca. Sci.,58, 518 (1967).
- 74- Marsh,J.M., Butcher,R.W.,Savard,K. y Sutherland,E.W., J.Biol. Chem., 241, 5436 (1966).
- 75- Orloff,J. y Hanad,Handler,J.,Amer. J.Med. 42, 757 (1967).
- 76- Levey,G.S. y Epstein,S.E., J.Clin.Invest. 48, 1663 (1969).
- 77- Zor,V.,Kaneko,T.,Schneider,H.P.,Mc.Cann,S., y Field,J.B., J.Biol.Chem. 245, 2883 (1970).

- 78- Rodesch,F., Neve,P., Willems,C., y Dumont,J., Eur.J. Biochem. 8, 26 (1969).
- 79- Butcher,R.W. y Baird.C.E., J.Biol.Chem.,243, 1713 (1968).
- 80- Aurbach,G.D., y Chase,L.R., Fed.Proc. 29, 1179 (1970).
- 81- "The role of Adenyl cyclase and cyclic AMP in biological systems" John E. Fogarty International Center,Proceeding N° 4 p 59 (1970). Editado por Rall,T.W. , Rodbell,M. y Conaliffe,P.
- 82- Neville,D.M., Biochim.Biophys.Acta, 154, 540 (1968).
- 83- Levey,G.S. y Epstein,S.E., Circ.Res.24, 151 (1969).
- 84- Birnbaumer,L., y Rodbell,M.J.Biol.Chem., 244, 3477 (1969).
- 85- Rodbell,M., Birnbaumer,L. y Pohl,S.L.,J.Biol.Chem., 244, 3477 (1969).
- 86- Rodbell,M.,Jones,A.B.,Chiappe de Cingolani,O. y Birnbaumer, L., Rec.Prog.Hormone.Res.,24, 215 (1968).
- 87- Pohl,S.,Birnbaumer,L. y Rodbell,M., J.Biol.Chem., 246, 1849 (1971).
- 88- Rodbell,M., Krans,M.,Pohl,S.L. y Birnbaumer,L., J.Biol.Chem. 246, 1861 (1971).
- 89- Rodbell,M.,Krans,M.,Pohl.S.L. y Birnbaumer,L.,J.Biol.Chem. 246,1872 (1971). y J.Biol.Chem. 246, 1877 (1971).
- 90- Pohl,S.L.,Krans,H.M.,Kozyeff,V.,Birnbaumer,L. y Rodbell,M., J.Biol.Chem.,246, 4447 (1971).
- 91- Birnbaumer,L.,Pohl,S.L. y Rodbell,M., J.Biol.Chem., 247, 2038 (1972).

- 92- Rodbell, M., Birnbaumer, L., y Pohl, S., Proc. of the Biochemical Society, p 58 (1972).
- 93- Illiano, G. y Cuatrecasas, P., Science, 175, 906 (1972).
- 94- Walsh, D.A., Perkins, J.P. y Krebs, E.G., J. Biol. Chem., 243, 3763 (1968).
- 95- Brostrom, C.O., Corbin, J.D., Kurg, C.A. y Krebs, E.G., Proc. Nat. Aca. Sci. USA., 68, 2444 (1971).
- 96- Manners, D.J. "The Molecular Structure of Glycogen" Adv. Carbohydrate. Chem. 12, 269 (1957).
- 97- Villar-Palasi, C. y Schlender, K.K., Fed. Proc. 29, 938 (1970).
- 98- Chelala, C.A. y Torres, H.N., Biochim. Biophys. Acta., 198, 504 (1970).
- 99- Corbin, J.D. y Krebs, E.G., Biochem. Biophys. Res. Commun., 36 328 (1969).
- 100- Levey, G.S., Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 86 (1970).
- 101- Kleinsmith, L.J., Allfrey, V.G. y M<sup>r</sup>sky, A.E., Proc. Natl. Aca. Sci. USA., 55, 1182 (1966).
- 102- Kleinsmith, L.J., Allfrey, V.G. y M<sup>r</sup>sky, Science, 154, 780 (1966).
- 103- Langan, T.A., Science, 162, 579 (1968).
- 104- Langan, T.A., J. Biol. Chem., 244, 5763 (1969).
- 105- Langan, T.A., Proc. Natl. Aca. Sci. USA. 64, 1276 (1969).
- 106- Jost, J.B. y Sahib, M.K., J. Biol. Chem., en prensa

- 107- Wicks, W.D., Kenney, F.T. y Lee, K.L. J. Biol. Chem., 244, 6008 (1969).
- 108- Gill, G.N. y Garren, L.D., Proc. Natl. Aca. Sci. 63, 512 (1969).
- 109- Gill, G.N. y Garren, L.D., Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 335 (1970).
- 110- Konijn, T.M., van de Meene, J.G.C., Bonner, J.T. y Barkley, D.S., Proc. Nat. Aca. Sci. USA. 58, 1152 (1967).
- 111- Makman, R.S. y Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 240, 1309 (1965).
- 112- Peterkofsky, A. y Gazdar, C., Proc. Natl. Aca. Sci. 68, 2794 (1971).
- 113- De Crombrughe, B., Perlman, R.L., Varmus, H.E. y Pastan, I., J. Biol. Chem., 244, 5828 (1969).
- 114- Perlman, R.L. y Pastan, I., Biochem, Biophys, Res. Commun., 37, 151 (1969).
- 115- Perlman, R.L. y Pastan, I., J. Biol. Chem. 243, 20 (1968).
- 116- Varmus, H.E., Perlman, R.L. y Pastan, I., J. Biol. Chem. 245, 2259 (1970).
- 117- Arditti, R., Eron, L., Zubay, G., Tocchini-Valentini, G., Connaway, S. y Beckwith, J., Cold, Spring, Harbor, Symp. Quant. Biol. 1971.
- 118- Emmer, M., Crombrughe B., Pastan, I. y Perlman, R., Proc. Natl. Aca. Sci. USA. 66, 480 (1970).
- 119- Zubay, G., Schwartz, D. y Beckwith, J., Proc. Natl. Aca. Sci. USA. 66, 104 (1970).
- 120- Beckwith, J., Grodzicker, T., Arditti, R., J. Mol. Biol. 69, 155 (1972).

- 121- Crombrugghe, B., Chen, B., Anderson, W., Gottesman, M., Perlman, R. y Pastan, I., J. Biol. Chem., 246, 7343 (1971).
- 122- Pastan, I. y Perlman, R., J. Biol. Chem., 244, 2226 (1969).
- 123- Eckhart, W. (1968). Physiological Rev. 48, 513
- 124- Hsie, A.W. y Puck, T.T., Proc. Natl. Aca. Sci. USA 68, 358 (1971).
- 125- Johnson, G.S., Friedman, R.N. y Pastan, I., Proc. Natl. Aca. Sci., 68, 425 (1971).
- 126- Jimenez de Asua, L.A., Surian, E.S., Flawiá, M.M. y Torres, H.N., Proc. Natl. Aca. Sci. USA., en prensa.
- 127- Sheppard, J.R., Proc. Natl. Aca. Sci. USA 68, 1316 (1971).
- 128- Prosad, K.N., Nature New Biology 236, 49 (1972).
- 129- Prosad, K.N. y Hsie, A.W. Nature New Biology, 233, 141 (1971).
- 130- Sheppard, J.R. Nature New Biology, 236, 14 (1972).
- 131- Burk, R.R., Nature 219, 1272 (1968).
- 132- Buck, C.A., Glick, M.C. y Warren, L. Biochemistry 9, 4567 (1970).
- 133- Warren, L., Critchley, D. y Mac Pherson, I., Nature 235, 275 (1972).
- 134- Cuatrecasas, P., Proc. Natl. Aca. Sci., 68, 1264 (1971).
- 135- Allan, D., Auger, J. y Crumpton, M.J., Nature New Biology, 236, 23, (1972).
- 136- Allan, D., Auger, J. y Crumpton, M.J., J. Exp. Cell. Res. 66, 362 (1971).
- 137- Strauch, B.S., Langdon, R.G., Arch. Biochem. Biophys. 129, 277 (1969).

- 138- Orloff, J., Handler, J.S. J.Clin. Invest. 41, 702 (1962).
- 139- Orloff, J., Handler, J.S., Biochem. Biophys. Res. Commun. 5, 63 (1961).
- 140- Orloff, J., Handler, J.S., Am. J. Med. 42, 757 (1967).
- 141- Anderson, W.A., Brown, E., Biochim. Biophys. Acta, 67, 674 (1963)
- 142- Handler, J.S., Butcher, R.W., Sutherland, E.W. y Orloff, J. J. Clin. Invest., 43, 1297 (1964).
- 143- Orloff, J., Handler, J.S. y Bergstrom, S., Nature, 205, 397 (1965).
- 144- Baba, W.I., Smith, A.J. y Townshend, M.M., Quant. J. Exp. Physiol 52, 416 (1967).
- 145- Peery, M.C., Hales, C.N. Biochem. J. 117, 615 (1970).
- 146- Friedmann, N. y Park, C.R., Proc. Natl. Aca. Sci. USA., 61, 504, (1968).
- 147- Rasmussen, H., Pechet, M., Fast, D., J. Clin. Invest., 47, 1843 (1968).
- 148- Entman, M.L., Levey, G.S. y Epstein, S.E., Circ. Res., 25, 429 (1969).
- 149- Harrison, H.C., y Harrison, H.E., Endocrinology 86, 756 (1970).
- 150- Fincham, J.R.S. y Day, P.R. "Fungal Genetics" IV p.32 (1963).
- 151- Tellez-Iñón, M.T., Terenzi, H. y Torres, H.N., Biochim. Biophys. Acta, 191, 765 (1969).
- 152- Tellez-Iñón, M.T. y Torres, H.N., Proc. Natl. Aca. Sci USA 66 459 (1970).

- 153- Tellez-Iñón, M.T. y Torres, H.N., Biochim. Biophys. Acta, en prensa.
- 154- Traut, R.R. y Lipmann, F., J. Biol. Chem., 238, 1213 (1963).
- 155- Preiss, J., Shen, L., Greenberg, E. y Gentmer, N., Biochemistry 5, 1833 (1966).
- 156- Symons R.H. Biochem. Biophys. Res. Commun., 24, 872 (1966).
- 157- Greenless, A.W., y Symons R.H., Biochim. Biophys. Acta., 119, 241 (1966).
- 158 - Paladini, A.C. y Leloir, L.F., Biochem. J., 426, 51 (1952).
- 159- Emerson, S., Genetica, 34, 162 (1963)
- 160- Woodward, V.W. y Woodward, C.K., Neurospora Newsletter 13, 18 (1968).
- 161- Vogel, H.J., Microbial Genetics Bulletin (Witkin, E.M. ed.) Numero 13, p 42 (1956). Department of Genetics, Carnegie Institution of Washington, Cold Spring Harbor.
- 162- Bray, C., Anal. Biochem. 1, 279 (1960).
- 163- Fleischer, S. y Fleischer, B., Methods Enzymol. 10, 427 (1967).
- 164- Carminatti, H., Jimenez de Asua, L., Recondo, E., Passeron, S. y Rozengurt, E., J. Biol. Chem., 243, 3051 (1968).
- 165- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 166- Burton, K., Method Enzymol. 12, 163 (1968).
- 167- Piras, R., Rothman, L. y Cabib, E., Biochemistry 7, 56 (1968)

- 168- Rabinowitz, M., Desalles, L. Meister, J. y Sorand, L., Biochim. Biophys. Acta, 97, 29 (1965).
- 169- Martin, R.G. y Ames, B.N., J. Biol. Chem., 236, 1372 (1961).
- 170- Davis, B.J., Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 405 (1964).
- 171- Avila, J., Hermoso, J.H., Viñuela, E. y Salas, M., Nature 226, 1244 (1970).
- 172- Meek, J.C. y Bolinger, R.E., Biochemistry 5, 3198 (1966).
- 173- Butcher, R.W., Ho, R.J., Meng, H.C. y Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 240, 2515 (1965).
- 174- Colowick, S.P., Methods Enzymol, 2, 598 (1955).
- 175- Butcher, R.W. y Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 237, 1244 (1962)
- 176- Yamamoto, T., J. Cell Biol. 17, 413 (1963).
- 177- Phillips, R.C., George, P. y Rutman, R.J., J. Amer. Chem. Soc., 88, 2631 (1966).
- 178- Good, N.E., Wingt, G.D., Winter, W., Connoly, T.N., Izawa, S. y Singh, R.M.M., Biochemistry 5, 467 (1966).
- 179- O'Sullivan, W.J. y Perrin, D.D., Biochemistry 3, 18 (1964).
- 180- Phillips, R.C., George, P y Rutman, R.J., J. Biol. Chem., 244, 3330 (1969).
- 181- Walaas, E., Acta. Chem. Scand. 12, 528 (1958).
- 182- Trivedi, B., y Danforth, W.H., J. Biol. Chem., 241, 4110 (1966)
- 183- Gerhart, J.C. y Pardee, A.B., Cold.Spring.Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 491 (1963).



- 184- Dalziel, K., Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., 1, 346 (1968).
- 185- Rozengurt, E., Jiménez de Asúa, L.A., y Carminatti, H., J. Biol. Chem., 244, 3142 (1969).
- 186- Swanson, P.D., Bradford, H.F., y Mc Ilwain Biochem. J., 92, 235, (1964).
- 187- Medzihradsky, F., Kline, M.H., y Hokin, L.E., Arch. Biochem. Biophys., 121, 311 (1967).
- 188- Cahill Jr. G.F., Diabetes, 20, 795 (1971).
- 189- Cahill Jr. G.F., Levis, V., Soeldner, J.S., Sloan, D. y Steimke, J., Metab. Clin. Exp. 13, 769 (1964).
- 190- Chlouverakis, C., Endocrinology, 81, 521 (1967).
- 191- Miller, L.V. y Beigelman, R.M., Endocrinology 81, 386 (1967)
- 192 Flawiá, M.M. y Torres, H.N., J. Biol. Chem., 247, 6873 (1972).
- 193- Flawiá, M.M. y Torres, H.N., Biochim. Biophys. Acta., 289, 428 (1972)
- 194- Flawiá, M.M. y Torres, H.N., J. Biol. Chem., 247, 6880 (1972).
- 195- Flawiá, M.M. y Torres, H.N., Proc. Natl. Aca. Sci. USA. 69, 2870, (1972).
- 196- Flawiá, M.M. y Torres, H.N., FEBS Lett., en prensa.
- 197- Flawiá, M.M. y Torres, H.N., J. Biol. Chem., en prensa
- 198- Flawiá, M.M., Belocopitow, E., Marechal, L, Chelala, C.A., Torres, H.N., en " The role of adenyl cyclase and 3',5' cyclic AMP in Biological System". Editado por Rall, T.W. Rodbell, M. y Conaliffe, P., Fogarty International Center Proceeding N° 4, p.99 (1970).
- 199- Flawiá, M.M., Tellez-Iñón, M.T. y Torres, H.N., "Adenyl Cyclase and the regulation of glycogen metabolism in *Neurospora crassa*". Symposium on the Biochemistry of Glicosidic linkage .Pan American Biochemical Soc., Academic Press N.Y. p.541 (1972).

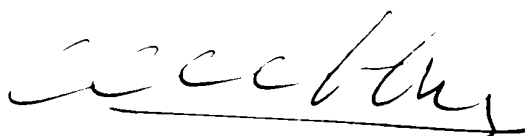
- 200- Raisman,R., Flawiá,M.M. y Torres,H.N., resultados no publicados.
- 201- Rodriguez Candela,J.L. y Nieto,A., Nature,New Biology 237, 85, (1972).
- 202- Levine,R., Goldstein,M.S., Klein,S.P. y Huddleston,B.J., J.Biol.Chem., 179 ,985 (1949).
- 203- Krahl,M.E., (1961). "The action of insulin on cells",Academic Press, N.Y.
- 204- Randle,P.J. (1964) an G. Pincus,Thimenn,K.V., y E.B. Astwood (Editores), The Hormones Vol. 4,p.481, Academic Press.N.Y.
- 205- Hechter,O. y Halkeiston,I.D.K., (1964)an G. Pincus, K.V. Thimenn y E.B. Astwood (Editores), The Hormones,Vol. 5 p.697,Academic Press,N.Y.
- 206- Hardman,G., Robinson,G.A. y Sutherland,E.W., Ann.Rev.Physiol, 33, 311 (1971).
- 207- Norman,D., Menozi,P., Reid,D., Lester,G., y Hechter,O., J. Gen. Physiol. 42, 1277 (1959).
- 208 Butcher,R.W., Sneyd,J.G.T., Park,C.R., y Sutherland,E.W., J.Biol.Chem., 241, 1651 (1966).
- 209- Jefferson,L.S., Exton,J.H., Butcher,R.W., Sutherland,E.W. y Park,C.R., J.Biol.Chem., 243, 1031 (1968).
- 210- Loten,E.G., y Sneyd,J.G.T. Biochem.J., 120,197 (1970).

211- House,P., Poulis,P. y Wiedeman,M.J., Eur.J. Biochem. 24,  
429 (1972).


212- Hepp,K.D., FEBS Lett. 12, 263 (1971)

213- Krisman,C.R., Analytical Biochemistry, 4 , 17 (1962)

214- Singer,S.J. y Nicolson,G.L., Science, 175, 720 (1972)



Mirtha María Flawiá.



Héctor N. Torres.