

Tesis de Posgrado

Estudio de las proteínas quinasas del hongo dimórfico *Mucor rouxii*

Moreno de Colonna, Silvia

1979

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Moreno de Colonna, Silvia. (1979). Estudio de las proteínas quinasas del hongo dimórfico *Mucor rouxii*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1623_MorenodeColonna.pdf

Cita tipo Chicago:

Moreno de Colonna, Silvia. "Estudio de las proteínas quinasas del hongo dimórfico *Mucor rouxii*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1979.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1623_MorenodeColonna.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LAS PROTEINAS QUINASAS
DEL HONGO DIMORFICO MUCOR ROUXII

Autor: Silvia Moreno de Colonna

Director: Dra. María Susana Di Bernardo de Passeron

Lugar de Trabajo: Departamento de Química Biológica, Facultad
de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

-1623-
EJ: 3

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

Gracias, Susana
Silvia
9/79

A mis padres

A Agustín

AGRADECIMIENTOS

A Susana Passeron por haberme enseñado a trabajar rigurosamente en la investigación científica y por su excelente dirección de este trabajo.

Al Dr. Carlos E. Cardini por el generoso apoyo brindado en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio por su colaboración y afectuoso estímulo.

Al Dr. Eduardo F. Recondo que posibilitó mi iniciación en la investigación bioquímica.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas, en especial al Laboratorio del Dr. Héctor N. Torres por su constante cooperación.

A los Laboratorios de Embriología Animal y Química Orgánica por haberme facilitado el uso de numerosos aparatos.

Al CONICET por haberme otorgado durante dos años una beca de perfeccionamiento para realizar parte de este trabajo.

Al personal de mantenimiento de la Facultad de Ciencias Exactas por su excelente disposición para solucionar problemas técnicos imprevistos.

A la Dra. Inge Thiel por el asesoramiento que me brindó en la impresión de esta tesis.

ABREVIATURAS

ATP	5'-adenosina trifosfato
ADP	5'-adenosina difosfato
cAMP	3',5'-adenosina monofosfato cíclico
cGMP	3',5'-guanosina monofosfato cíclico
NAD	difosfopiridin nucleótido oxidado
EDTA	etilendiamino tetraacetato
EGTA	etilenglicol bis (β -aminoetil eter) tetraacetato
P _i	ortofosfato
DEAE-celulosa	dietilaminoetilcelulosa
pmoles	picomoles
umoles	micromoles
nmoles	nanomoles
min	minutos

INDICE

	pag.
INTRODUCCION	
Diferenciación vegetativa y dimorfismo.....	1
Dimorfismo en <u>Mucor</u>	1
Acción del cAMP en organismos superiores.....	9
Objetivos.....	17
MATERIALES Y METODOS	
Preparación de material biológico.....	19
Preparación de los extractos.....	23
Determinación de actividades enzimáticas.....	24
Gradientes de sacarosa.....	30
Técnicas cromatográficas.....	31
Síntesis de ATP [γ - ³² P]	32
Contaje de Radiactividad.....	33
Otras técnicas.....	34
RESULTADOS	
Distribución subcelular de actividades de proteína quinasa en sayadas sin sustrato exógeno y con caseína.....	35
Distribución subcelular de la actividad de proteína quinasa dependiente de cAMP.....	35
Cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción S ₁₀₀ de células levaduriformes.....	40
Algunas propiedades de los picos I y II de caseína quinasa....	43
Purificación de la proteína quinasa dependiente de cAMP.....	45

Caracterización de la proteína quinasa dependiente de cAMP....	52
Estructura polimérica de la proteína quinasa dependiente de cAMP.....	61
RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	79
BIBLIOGRAFIA.....	91

I N T R O D U C C I O N

DIFERENCIACION VEGETATIVA Y DIMORFISMO

Se denomina dimorfismo a la habilidad que poseen ciertos hongos de crecer de dos modos: en forma de micelio filamentosos, o como células esféricas semejantes a las de las levaduras, que se reproducen por brotación. Este fenómeno no está sólo circunscripto a algunos organismos comunmente conocidos como levaduras, tales como Endomycopsis y Sporobolomyces, sino que también se lo puede observar en algunos otros ascomycetes, phycomycetes y basidiomycetes. Muchos hongos patógenos para el hombre y para otras especies animales son dimórficos, y curiosamente sólo la fase levaduriforme se encuentra en el tejido infectado.

Diferentes factores ambientales controlan el dimorfismo de estos hongos. Así, el anhídrido carbónico en el caso de Sporotrichum schenkii (1), la temperatura en Blastomyces dermatitidis (2) y Paracoccidioides brasiliensis (3) y los factores nutricionales en Candida albicans (4) se sabe que son inductores de la fase infecciosa.

DIMORFISMO EN MUCOR

Desde hace más de un siglo este género de hongos (clase: zygomycetes, orden Mucorales) ha atraído la atención de los científicos debido a su habilidad de crecer bajo dos formas según la atmósfera en la cual se hallen.

En presencia de aire, ya sea en medios sólidos o líquidos, desarrollan un micelio típico. El extremo de los filamentos muy frecuentemente se fragmenta para producir células redondas conocidas como artrosporas. En la punta de las hifas aéreas se desarrollan esporangios que contienen innumerables esporas asexuales llamadas esporangiosporas o simplemente esporas. Dentro del género Mucor existen especies homotálicas y heterotálicas que se reproducen sexualmente a través de la formación de zigosporas.

Hace más de un siglo el botánico alemán Bail (5) observó que en las partes más profundas de cultivos líquidos aeróbicos de Mucor racemosus, un hongo típicamente filamentoso, aparecían células esféricas o hifas cortas muy engrosadas que se reproducían por brotación.

Posteriormente, Pasteur (6) demostró que la aparición de estas células levaduriformes no era más que el resultado de la adaptación de Mucor a una atmósfera pobre en oxígeno y demostró que esta fase levaduriforme desaparecía con aereación suficiente.

Desde estos primeros experimentos de Pasteur, la adaptación morfogénica de ciertas especies de Mucor a una atmósfera aeróbica o anaeróbica ha sido objeto de innumerables estudios que continúan hasta el presente.

Mucor resultó ser así un excelente sistema para el estudio de las bases bioquímicas de la diferenciación morfológica. Diversos factores están involucrados en el proceso de diferenciación.

Dimorfismo y pared celular

La morfología de los hongos depende de manera fundamental de

la forma de la pared celular, estructura rígida que está determinada por la disposición espacial y la estructura molecular de sus diversos componentes. Bartnicki-García y Nickerson (7) hallaron que la composición química de la pared celular de la forma filamentosa y de las células levaduriformes de Mucor rouxii eran diferentes.

El mayor contenido en mananos de la forma levaduriforme está en correspondencia con el mayor espesor de su pared celular y la existencia de diversas capas del polímero.

Modificaciones de la pared celular asociadas a cambios de morfología se han observado en otros hongos tales como Neurospora crassa (8), Paracoccidioides brasiliensis (9), Schizophyllum commune (10).

Bartnicki-García propuso en 1963 (11) que el dimorfismo en Mucor rouxii podía resultar de dos modos diferentes de construcción de la pared celular: 1) formación de la pared a partir del extremo de la hifa, es decir, de crecimiento polarizado; 2) síntesis de la pared celular uniforme, sin dirección definida. Esta hipótesis está avalada por la observación directa de las zonas de formación de la pared por medio de técnicas autoradiográficas (12). Se pudo observar que en las hifas, la incorporación de precursores radiactivos de la pared celular, ocurre en la región apical, mientras que en las células levaduriformes, la radiactividad aparece uniformemente distribuida en la superficie celular.

Factores ambientales y metabolismo celular

Tal como se dijo anteriormente, Pasteur demostró que la morfología levaduriforme de algunas especies de Mucor aparecía cuando la atmósfera del cultivo se hacía anaeróbica.

Muy posteriormente, Bartnicki-García y Nickerson (13) estudiaron el papel que podían tener los distintos factores ambientales asociados al crecimiento anaeróbico como eventuales agentes morfogenéticos. Así demostraron que la presencia de anhídrido carbónico era necesaria para el desarrollo de la fase levaduriforme. A bajas presiones de anhídrido carbónico o en su ausencia (atmósfera de nitrógeno puro) obtenían crecimiento puramente filamentosos. De estos estudios concluyeron que el anhídrido carbónico participa directamente en el mantenimiento del crecimiento levaduriforme.

Haidle y Storck, (14) trabajando con la misma especie de Mucor, obtuvieron crecimiento levaduriforme en atmósfera de nitrógeno puro a condición de que este gas estuviera libre de trazas de oxígeno y concluyeron que otros factores distintos del anhídrido carbónico están involucrados en el control del dimorfismo.

Sin embargo, muy recientemente, Mooney y Sypherd (15), demostraron que en Mucor racemosus, es posible obtener crecimiento levaduriforme o filamentosos en atmósfera de nitrógeno puro (o cualquier otro gas inerte) dependiendo la morfología del cultivo de la velocidad de flujo del gas. Así, a alto flujo obtuvieron crecimiento levaduriforme, mientras que a bajo flujo de nitrógeno el crecimiento era puramente filamentoso. Para explicar estos resultados los autores postularon la existencia de una sustancia volátil (factor filamentosos), aún no identificada, la cual sería la desencadenante del crecimiento apical. Con un alto flujo de gas, dicha sustancia hipotética, sería arrastrada de los cultivos permitiendo entonces el crecimiento levaduriforme. En atmósfera de anhídrido carbónico, a alto o bajo flujo de gas, el crecimiento era siempre de tipo levaduriforme. Surge inmediatamente de estos resul

tados que la acción morfogenética de la sustancia volátil sería anulada por el anhídrido carbónico.

Influencia de los hidratos de carbono

Bartnicki-García (16) y Friedenthal, Epstein y Passeron (17) estudiaron la influencia de la concentración de hexosas sobre la morfología de Mucor rouxii en condiciones anaeróbicas. Se requiere una concentración mínima de glucosa para obtener una población netamente levaduriforme; por debajo de ella y a medida que la concentración disminuye, los cultivos tienden a hacerse más filamentosos. Este efecto de la concentración de glucosa no puede ser atribuido al incremento de la producción de anhídrido carbónico, ya que la máxima liberación de este gas se logra con solo 0,1 % de glucosa. Bartnicki-García interpreta la acción de la glucosa como el resultado de la represión catabólica ejercida por metabolitos de este azúcar sobre los procesos de morfogénesis de la hifa.

Acción de inhibidores

Algunas sustancias químicas alteran los caminos morfogenéticos normales, y del estudio de su modo de acción han surgido nuevas hipótesis sobre las causas del dimorfismo. Terenzi y Storck (18) encontraron que el alcohol fenético, inhibidor del crecimiento celular en bacterias, hongos y células animales, induce la formación de células levaduriformes en cultivos aeróbicos de Mucor rouxii, siempre y cuando la fuente de hidrato de carbono sea un azúcar fermentable en concentración superior al 2 %. El alcohol fenético estimula la producción de anhídrido carbónico y etanol e inhibe la fosforilación oxidativa.

Posteriormente, Friedenthal, Epstein y Passeron (17) encontraron que el cianuro de potasio, inhibidor clásico de la respiración, agregado a cultivos aeróbicos produce efectos similares al alcohol fentílico, o sea, induce el crecimiento levaduriforme. En presencia de diferentes concentraciones de cianuro de potasio, es posible observar la transición entre la morfología filamentosa y levaduriforme, pasando por formas intermedias, es decir células con hifas cortas y engrosadas.

En base a estos resultados se concluyó que el metabolismo oxidativo sería un determinante importante en el desarrollo filamentoso de Mucor.

Cambios respiratorios durante la diferenciación levadura-micelio

Pese a las conclusiones enunciadas en el párrafo anterior, trabajos posteriores de Rogers, Clark-Walker y Stewart (19) y de Paznokas y Sypherd (20) demostraron que el metabolismo respiratorio en Mucor no estaba correlacionado con la morfología.

Rogers y colaboradores cultivaron Mucor genevensis en condiciones de exceso de glucosa o con glucosa limitante a distintas concentraciones de oxígeno disuelto. Encontraron que el desarrollo filamentoso y el metabolismo oxidativo son inhibidos por exceso de glucosa, sin mayores efectos sobre el desarrollo mitocondrial. Por el contrario, la adición de cloranfenicol a cultivos filamentosos aeróbicos, en condiciones de glucosa limitante, inhibe el desarrollo mitocondrial sin inducir la transformación a células levaduriformes. Los autores concluyen que el metabolismo oxidativo no es esencial para el desarrollo filamentoso.

Paznokas y Sypherd estudiaron algunos aspectos del metabolismo respiratorio en Mucor racemosus que es esencialmente comparable a

Mucor rouxii. Lograron obtener cultivos filamentosos en condiciones estrictamente anaeróbicas, en atmósfera de nitrógeno o argón y a bajo flujo de gas. Por otra parte, obtuvieron cultivos levaduriformes en condiciones aeróbicas, por el agregado de dibutiril AMP cíclico al medio de cultivo. Midieron el metabolismo respiratorio de estas células y lo compararon con el de cultivos levaduriformes y filamentosos obtenidos en las condiciones habituales.

Hallaron que el micelio obtenido en atmósfera de nitrógeno posee un metabolismo netamente fermentativo, análogo al de las células levaduriformes obtenidas en atmósfera de anhídrido carbónico. Este micelio carece de mitocondrias y el sistema de citocromos no se ha desarrollado.

Por el contrario, las células levaduriformes obtenidas en atmósfera de oxígeno con dibutiril cAMP, poseen un metabolismo oxidativo enteramente similar al del micelio que se obtiene normalmente.

Por los resultados reseñados anteriormente parece evidente que la capacidad oxidativa y el desarrollo mitocondrial de la célula no son factores importantes en el proceso de diferenciación.

Acción del cAMP

Quizá el avance más importante en cuanto al conocimiento de las bases bioquímicas del dimorfismo en Mucor se debe a los experimentos de Larsen y Sypherd (21) sobre la acción del cAMP en Mucor racemosus. Los autores encontraron que la adición de dibutiril cAMP a cultivos aeróbicos del hongo, produce la represión del crecimiento apical y promueve el crecimiento levaduriforme. Para que estos cambios ocurran es necesaria la presencia en el medio de cultivo de un azúcar fermentable; en

su ausencia, no hay acción morfogenética del nucleótido. También pudieron establecer que existe una buena correlación entre los niveles intracelulares de cAMP y la morfología. Las células levaduriformes contienen mayores niveles de cAMP que el micelio.

Posteriormente, Paveto, Epstein y Passeron (22) encontraron en Mucor rouxii resultados completamente similares a los de Paznokas y Sypherd.

Ya ha sido establecido en varios laboratorios que el cAMP participa en la morfogénesis de numerosos microorganismos, incluyendo hongos (23-26), algas (27) y bacterias (28,29).

Así por ejemplo, Cohen (30) estableció que el cAMP está involucrado en la respuesta fototrófica de los esporangiosporos de Phycomyces blakesleanus, proceso íntimamente relacionado a la respuesta zigotrófica durante la diferenciación sexual.

Schwalb (31) encontró que una mutante del basidiomycete Schizophyllum commune que produce cuerpos de fructificación defectuosos, tiene alterado el metabolismo de cAMP.

También el cAMP participa en la morfogénesis de Neurospora crassa. Torres y colaboradores (32,33), encontraron que ciertas mutantes morfológicas del hongo están asociadas con muy bajos niveles de adenilato ciclasa. La adición de dibutiril cAMP a los cultivos de las cepas mutantes restaura algunas propiedades morfológicas características de la cepa salvaje.

ACCION DEL cAMP EN ORGANISMOS SUPERIORES

En 1957, Rall, Berthet y Sutherland (34) descubrieron que la acción activadora de la epinefrina y del glucagón sobre la fosforilasa de hígado, una de las enzimas responsables de la degradación del glucógeno, estaba mediada por un compuesto termoestable, que resultó ser el cAMP. A partir de entonces se han ido describiendo numerosos efectos del nucleótido cíclico sobre todos los niveles de organización celular; desde un órgano aislado hasta una enzima purificada. Algunos ejemplos de estos efectos son: activación de la fosforilasa en varios tejidos (35), inactivación de la glucógeno sintetasa de hígado (36), aumento de la lipólisis en tejido adiposo (37), aumento de la esteroidogénesis (38), aumento de la velocidad de contracción del músculo cardíaco (39) y del potencial de membrana del músculo liso (40), regulación del crecimiento y de la inhibición por contacto de células de mamíferos (41,42).

Este grupo de investigadores le asignó al cAMP el papel de segundo mensajero (43). El primer mensajero serían las diferentes hormonas, encargadas de llevar la información desde el tejido donde se producen hasta la célula receptora y el segundo mensajero transferiría esa información a la maquinaria celular. La mayoría de las hormonas peptídicas, las catecolaminas y las prostaglandinas producen una modificación de los niveles intracelulares de cAMP en las células receptoras. El primer paso en este proceso es la unión de la hormona a un receptor específico en la superficie externa de la membrana plasmática.

Como consecuencia de esta unión, se produce la activación de la enzima adenilato ciclasa, que cataliza la síntesis de cAMP a partir de ATP, y por consiguiente un aumento en los niveles intracelulares de cAMP en respuesta a la hormona específica.

El mecanismo íntimo por el cual la hormona produce la activación de la adenilato ciclasa aún no está completamente aclarado.

Ahora bien, cuál es el mecanismo por el cual el cAMP produce efectos tan diversos en los diferentes tejidos en respuesta a los estímulos hormonales?

En 1968, se describió (44-48) un grupo de enzimas llamadas proteínas quinasas, que catalizan la fosforilación de diversos sustratos proteicos tales como protamina, caseína, histona, etc. y cuya actividad es dependiente de la presencia de cAMP. Pronto se vió que estas enzimas estaban ampliamente distribuidas en los organismos eucariontes. Precisamente la universalidad de su distribución llevó a Kuo y Greengard en 1969 (49) a proponer que ellas serían las mediadoras de las diversas acciones del cAMP en los distintos tejidos. Esta hipótesis lleva implícita la idea de que las proteínas quinasas de todos los sistemas pueden actuar sobre múltiples sustratos.

La distribución de las proteínas quinasas en los distintos tejidos se determinó utilizando histona, caseína, o protamina como sustratos proteicos exógenos. Estos sustratos resultaron ser una herramienta muy útil para el estudio de las proteínas quinasas, sin entrar a investigar la importancia fisiológica de la fosforilación de los mismos.

Krebs propuso en 1973 (50), un conjunto de criterios que debían ser satisfechos para poder decidir si un efecto particular del

cAMP era mediado por fosforilación proteica o no. Estos criterios son en cierto modo análogos a los propuestos por Robinson, Butcher y Sutherland para decidir si un cierto efecto hormonal está mediado por el cAMP. Los criterios de Krebs son los siguientes:

- 1- El tipo de célula involucrado en el efecto del cAMP contiene una proteína quinasa dependiente de cAMP.
- 2- Existe un sustrato proteico que tiene una relación funcional al proceso mediado por cAMP.
- 3- La fosforilación del sustrato altera su función in vitro.
- 4- El sustrato proteico se modifica in vivo en respuesta al cAMP.
- 5- Existe una fosfoproteína fosfatasa para revertir el proceso.

El primer criterio parece ser universalmente satisfecho en células animales. Hay tres efectos del cAMP que hoy ya son clásicos, para los cuales se cumplen todos estos criterios: 1) aceleración de la glucogenolisis, proceso en el cual ya se ha demostrado la cadena de fosforilaciones que llevan a la activación de la glucógeno fosforilasa (51,52); 2) reducción de la síntesis de glucógeno, por inactivación de la glucógeno sintetasa (53-55); y 3) aumento de la lipólisis en tejido adiposo por activación de la lipasa (56-58).

Se ha demostrado que estos efectos primarios del cAMP son más complejos. Por ejemplo, el aumento de la lipólisis en tejido adiposo no está mediado únicamente por fosforilación de la lipasa, sino que también son capaces de ser reguladas de la misma manera otras enzimas que intervienen en este proceso, tales como la acetil-CoA carboxilasa (59), la glicerofosfato aciltransferasa (60), colesterol éster hidrolasa (61), hidrolasas de di y monoglicéridos (61).

Año tras año se han ido encontrando nuevas enzimas cuya actividad está regulada por fosforilación dependiente de cAMP y son en última instancia las responsables de los efectos (hormonales o no) del cAMP descritos desde hace años.

Características de la fosforilación y especificidad de sustrato

Las proteínas quinasas dependientes de cAMP (EC 2.7.1.37, ATP: proteína fosfotransferasa) catalizan la siguiente reacción:

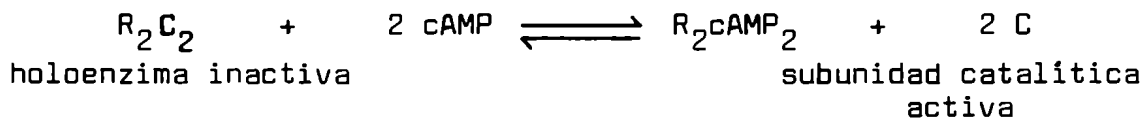


La fosforilación ocurre principalmente sobre el grupo hidroxilo de la serina y, en mucho menor grado, sobre el hidroxilo de la treonina. Este tipo de unión se demostró por primera vez en la fosvitina, fosfoproteína del vitelo, y en la caseína (62). Este fosfato esterificado a residuos serina y treonina es álcali lábil a través de una reacción de β -eliminación del fosfato que ocurre cuando los aminoácidos están formando parte de una unión peptídica (63). En HONa 1 N la unión se rompe completamente después de 1 hora a 37°C, mientras que es completamente resistente a la hidrólisis ácida en ClH 1 N, 1 hora a 100°C.

Mecanismo de activación de las proteínas quinasas dependientes de cAMP

En 1970 se dilucidó independientemente en varios laboratorios, el mecanismo de activación de las proteínas quinasas por el cAMP (64-67), luego de descubrir que este tipo de enzimas estaba formado por dos tipos de subunidades: subunidades catalíticas (C), que catalizan la transferencia del fosfato γ del ATP a ciertas proteínas, y subunidades regulatorias (R) que, en ausencia de cAMP, inhiben la actividad de las subunidades catalíticas. El cAMP activa estas proteínas quinasas provocan

do la disociación de la holoenzima intacta en subunidades catalíticas libres activas y un complejo de cAMP-subunidad regulatoria. Se ha establecido para las enzimas de músculo esquelético (68) y corazón bovino (69,70) que el mecanismo de activación puede esquematizarse así:



Hay muchos factores que pueden afectar el equilibrio de esta reacción y por lo tanto influir sobre la activación de las proteínas quinasas por cAMP in vivo. Algunos de los factores estudiados son: a) unión de ATPMg a las proteínas quinasas tipo I y su efecto sobre la recombinación de subunidades (68,70); b) autofosforilación de la subunidad regulatoria de proteínas quinasas tipo II y su efecto en la unión de cAMP y disociación de la enzima (69,70); c) disociación y activación de las proteínas quinasas por sustratos proteicos básicos (71,72); d) presencia de una proteína inhibitoria, diferente a R, que es capaz de unirse a C (73).

Analogías y diferencias de las proteínas quinasas dependientes de cAMP

Las numerosas proteínas quinasas dependientes de cAMP que han sido caracterizadas, independientemente de su origen, muestran gran similitud con respecto a propiedades que se relacionan aparentemente con la función biológica, tales como afinidad por el cAMP y especificidad de sustrato. Hay numerosos ejemplos en la literatura que muestran la semejanza de diferentes proteínas quinasas (74,75). En apoyo de esta analogía están los experimentos en los que se demuestra la actividad de la enzima de un tejido sobre sustratos de otros tejidos y otros en los que se reconstituyen proteínas quinasas dependientes de cAMP utili

zando subunidades catalíticas y regulatorias de diferente origen (56,57,75,76). Estas analogías se hacen extensivas aún a las proteínas quinasas dependientes de cAMP firmemente unidas a componentes subcelulares (77-79).

Se podría suponer que hay múltiples proteínas quinasas dependientes de cAMP, cada una con especificidad para un solo sustrato proteico y con respuesta probablemente diferencial respecto a las concentraciones de cAMP. Sin embargo, la experiencia indica que no hay diferencias con significado funcional evidente entre las proteínas quinasas aisladas de varias fuentes.

La mayoría de las proteínas quinasas estudiadas tienen un peso molecular que oscila entre 140.000-160.000 daltones y un coeficiente de sedimentación de 6,8-7 S (71,76,80,81). Los pesos moleculares de la subunidad catalítica (C) y del dímero de la subunidad regulatoria (R_2) son similares a los determinados para la proteína quinasa de corazón bovino (38.000 y 98.000 respectivamente) (82).

Todas las proteínas quinasas unen 2 moles de cAMP por mol de holoenzima y se disocian en dos subunidades catalíticas libres y un dímero de subunidad regulatoria que contiene dos moles de cAMP unido. Las subunidades aisladas de las proteínas quinasas se recombinan estequiométricamente para formar una holoenzima dependiente de cAMP con una constante de sedimentación igual a la de la enzima original (70).

Las diversas proteínas quinasas dependientes de cAMP se distinguen por cromatografía de intercambio aniónico y cada tejido tiene una distribución característica de las mismas (70,83). Algunos tejidos como el corazón bovino, poseen una forma predominante de la enzima,

mientras que en otros, como el músculo esquelético porcino y el cerebro bovino, aparecen dos formas enzimáticas (84).

Se puede agrupar a casi todas las proteínas quinasas dependientes de cAMP en dos categorías principales; tipos I y II, según el orden de elución de estas enzimas de una resina de intercambio aniónico (70,83).

Las proteínas quinasas de tipo I eluyen de una columna de DEAE-celulosa con 0,08 - 0,10 M de ClNa, mientras que las de tipo II lo hacen con concentraciones mayores de sal (0,15-0,20 M).

Las diferentes propiedades de los dos tipos de isoenzimas son atribuibles a diferencias en el componente receptor de cAMP, ya que la subunidad catalítica de ambas parece ser idéntica (70,81).

Las diferencias más notables entre ambos tipos de proteínas quinasas pueden resumirse de la siguiente manera:

- a) Las proteínas quinasas tipo II sólo se disocian por cAMP, mientras que las de tipo I lo hacen por cAMP, histona o alta concentración salina (85).
- b) Las proteínas quinasas tipo II son de muy fácil reasociación. Apenas disminuye la concentración del agente disociante (cAMP) se produce la inmediata recombinación de las subunidades, a no ser que haya en el medio ClNa 0,5 M. Las subunidades de las proteínas quinasas tipo I pueden mantenerse disociadas aún en ausencia de cAMP y de ClNa (85).
- c) Las proteínas quinasas tipo I y II se diferencian por las propiedades de sus subunidades regulatorias, las cuales pueden ser distinguidas inmunológicamente (86). Las proteínas quina-

sas de corazón bovino y porcino, prototipo de las enzimas de tipo II, se autofosforilan (87). Se ha demostrado que la fosforilación ocurre en la subunidad regulatoria. Esta fosforilación aumenta la sensibilidad de la holoenzima a la disociación por cAMP. Hasta el momento, no se ha demostrado fosforilación de las proteínas quinasas de tipo I.

Proteínas quinasas dependientes de cGMP

Existe un grupo de proteínas quinasas muy similares a las anteriormente descritas con la diferencia que se activan por cGMP. Este tipo de enzimas se encuentra principalmente en tejidos de artrópodos (88-91) y en unos pocos tejidos de mamíferos tales como pulmón, cerebro, corazón e intestino (92-94). Hasta el momento se han demostrado muy pocas fosforilaciones catalizadas específicamente por proteínas quinasas dependientes de cGMP; por consiguiente, su importancia fisiológica aún no está clara.

A diferencia de las enzimas dependientes de cAMP, las proteínas quinasas dependientes de cGMP no se disocian luego de la activación por cGMP (91,92,95,96).

Se ha demostrado en dos laboratorios (95,96) que la holoenzima está formada por dos subunidades idénticas, ambas con capacidad receptora del nucleótido cíclico y actividad catalítica.

Proteínas quinasas dependientes de cAMP en sistemas eucariontes inferiores

En comparación con la amplia información que existe sobre la estructura y función de las proteínas quinasas dependientes de cAMP en

mamíferos, es poco lo realizado en organismos eucariontes inferiores (97-100).

Takai, Yamamura y Nishizuka (101) aislaron y caracterizaron una proteína quinasa dependiente de cAMP de levadura de panadería. La enzima posee una estructura polimérica similar a la de las enzimas de tejidos superiores, aunque su peso molecular es considerablemente menor. La subunidad catalítica aislada es capaz de interactuar con la subunidad regulatoria purificada de hígado de rata para formar una holoenzima híbrida.

En 1977, Sampson (102) señaló la existencia de dos tipos de proteínas quinasas dependientes de cAMP en Dictyostelium discoideum. Sus propiedades cromatográficas son semejantes a las de las proteínas quinasas I y II de mamíferos.

Recientemente, Silverman por un lado (103) y Juliani y Da Costa Maia por otro (104) encontraron una actividad de proteína quinasa dependiente de cAMP en extractos solubles del hongo acuático Blastocladiella emersonii, pero no llevaron a cabo ninguna caracterización de la estructura de la enzima.

OBJETIVOS

Dada la importancia del cAMP en Mucor como responsable de cambios morfogénéticos, el presente estudio está orientado a esclarecer el mecanismo de acción del nucleótido.

La hipótesis de trabajo toma como base el hecho experimental conocido y ampliamente aceptado de que en tejidos superiores muchas

sino todas las acciones del cAMP están mediadas por las proteínas quinasas dependientes de cAMP según el mecanismo que se discutió ampliamente en las secciones anteriores.

Si en Mucor el cAMP actuara por un mecanismo similar, entonces como primer premisa, el hongo debería poseer este tipo de enzimas. Como hasta el presente no habían sido descritas en ninguna especie de Mucor, la primera parte de este estudio se dedicó a la búsqueda de dicha actividad enzimática. Confirmada su existencia se la caracterizó cinéticamente y se estudió posteriormente su naturaleza polimérica, poniendo especial énfasis en la acción del cAMP sobre la misma.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

PREPARACION DE MATERIAL BIOLÓGICO

Organismo

Mucor rouxii (NRRL 1894), cepa original del Dr. C. W. Hesseltine (Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, Ill.), cedida gentilmente por el Dr. Roger Storck (Rice University, Houston, Texas).

Obtención y cosecha de esporas

Se hizo esporular el hongo en un medio conteniendo agar 5% y jugo de tomate (Noel, Valle de Oro, etc) en partes iguales. El agar y el jugo de tomate se autoclavarón por separado para evitar que la acidez del jugo hidrolizara el agar en caliente, impidiendo su posterior gelificación. El medio caliente se trasvasó en alícuotas de 50 ml a botellas de Roux que se dejaron 24 hs a 25°C antes de la inoculación, como prueba de esterilidad. Al cabo de las 24 hs, se sembró en cada botella 2 ml de una suspensión de esporas (100 esporas/ml). Se dejaron las botellas 24 hs acostadas boca arriba y luego se invirtieron. Las esporas se cosecharon asépticamente luego de 4-6 días de crecimiento a 25-30°C. Para la cosecha se procedió de la siguiente manera. Se agregaron a cada botella 20 ml de agua destilada estéril, se rasparon suavemente los esporangios con ansa de vidrio y se filtró la suspensión de esporas a través de una malla de nylon para remover hifas y trozos de agar. Las esporas fueron lavadas varias veces con agua destilada por centrifugación a 3.000 x g (15 min) y resuspensión. Finalmente las esporas se suspendieron en agua destilada estéril, se contó una dilución

de la suspensión en cámara cuentaglóbulos de tipo Neubauer, se trasvasaron a viales de vidrio estériles, los cuales fueron sellados, rotulados y guardados en heladera. La concentración de esporas osciló siempre entre $3 \cdot 10^8$ - $3 \cdot 10^9$ esporas/ml. Bajo estas condiciones de almacenamiento, las esporas permanecen viables cerca de 4 meses.

Para el mantenimiento de la cepa se inocularon dos tubos en pico de flauta con agar - jugo de tomate y una vez esporulado el micelio se guardaron en heladera.

Medio de Cultivo

(YPG) (13) Extracto de levadura (Difco) 0,3 %, Peptona (Inorp Tipo MC 3) 1 %, glucosa (Roux-Ocefa) 3 %. El pH del medio se ajustó a 4,5 con SO_4H_2 5 N. Se autoclavaron separadamente la glucosa por un lado y el extracto de levadura y la peptona por otro (105).

Crecimiento aeróbico

Se realizó en erlenmeyers de 2 l conteniendo 600 ml de medio YPG. Se inocularon $5 \cdot 10^5$ esporas/ml y se dejaron crecer 16-18 horas a 30°C en un agitador rotatorio New-Brunswick. Se cosechó el micelio por filtración al vacío a través de papel Whatman N°1. Se lavó el micelio con abundante agua destilada fría. Se escurrió bien entre dos hojas de papel de filtro. El micelio cortado en trozos se molió en mortero con N_2 líquido; el polvo obtenido se guardó a -80°C. Se obtuvieron de 7-10 g de micelio a partir de 600 ml de medio. (ver Foto A)

Crecimiento anaeróbico

En el esquema 1 se muestra el sistema que se utilizó para los cultivos anaeróbicos. Se prepararon cultivos de 5,8 l en erlenmeyers de 6 l.

Foto A - Micelio de Mucor rouxii después de 17 hs de crecimiento aeróbico. Aumento de 400 x.

Foto B - Células levaduriformes de Mucor rouxii obtenidas en atmósfera de CO₂ después de 40 hs de crecimiento. Aumento de 400 x.

Esquema 1 - Descripción del sistema utilizado para el crecimiento anaeróbico

A- Tanque de CO₂

B- Manómetro

C- Tubo con lana de vidrio

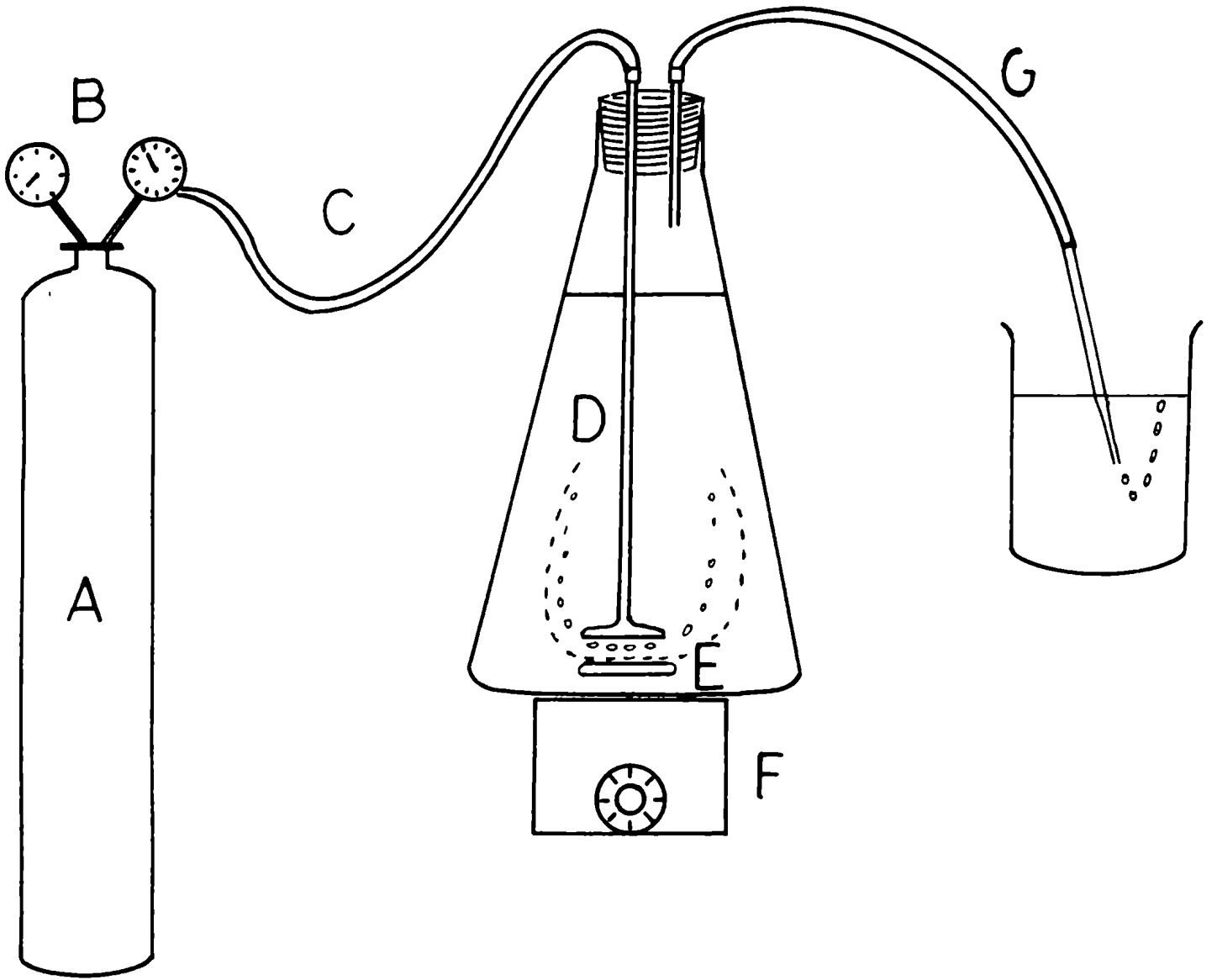
D- Burbujeador que termina en una placa de vidrio porosa

E- Barra magnética

F- Agitador magnético

G- Tubuladura de salida de gas terminada en pipeta Pasteur

(El burbujeo en agua da una medida del flujo de gas).



Se conectó el sistema de gaseo 2 horas antes de la inoculación para desplazar el O_2 disuelto. Al cabo de ese tiempo, se inocularon $5 \cdot 10^5$ esporas/ml y se continuó con gaseo muy lento durante unas 15 horas más hasta que las células comenzaron a fermentar. Al cabo de 40 hs a $30^\circ C$, se cosecharon las células levaduriformes en fase logarítmica tardía (13). El crecimiento se interrumpió enfriando el erlenmeyer con hielo por fuera y por dentro. Las células se filtraron a través de papel Whatman Nº 1. Se lavaron con abundante agua destilada helada, se pesaron y guardaron en congeladora a $-80^\circ C$. De un cultivo de 5,8 l de medio YPG se obtuvieron aproximadamente 25 g de células (peso húmedo). (ver Foto 8)

PREPARACION DE LOS EXTRACTOS

Todas las preparaciones fueron realizadas a $4^\circ C$. Las técnicas de homogenización difirieron según se tratara de células levaduriformes o de micelio. El polvo de micelio se homogenizó en un homogenizador de vidrio (tipo Ten-Broeck) con 2 volúmenes de buffer Tris-ClH 20 mM pH 7,5, Cl_2Mg 5 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM (buffer A). A partir de este extracto total se prepararon diferentes fracciones subcelulares. El homogenizado total se centrifugó a $2.000 \times g$ durante 10 min, en una centrifuga refrigerada Sorvall RC-2. Se guardó la fracción precipitada (P_2) y el sobrenadante se centrifugó 60 min a $100.000 \times g$ en una ultracentrifuga Spinco L. Este sobrenadante, dializado contra 100 volúmenes de buffer fosfato de potasio 5 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 2 mM (buffer B) constituyó la fracción S_{100} . Los precipitados de $2.000 \times g$ (P_2) y de $100.000 \times g$ (P_{100}) fueron resuspendidos en el volumen origi

nal de homogenización (con buffer B) y lavados dos veces antes de la resuspensión final.

Las células levaduriformes se molieron en frío en mortero con 3 volúmenes de arena de mar (BDH, lavada con ácido). La molienda se realizó hasta obtener más del 80 % de células rotas. El grado de ruptura se observó al microscopio con un aumento de 400 veces. El homogenizado se tomó con dos volúmenes de buffer A y se centrifugó 10 min a 2.000 x g. El precipitado se lavó con un volumen de buffer A, y se volvió a centrifugar a 2.000 x g. Se juntaron ambos sobrenadantes y se centrifugaron 60 min a 100.000 x g. El S₁₀₀ fue dializado en la misma forma que la fracción S₁₀₀ de micelio.

DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Todas las medidas de actividades enzimáticas fueron llevadas a cabo en condiciones donde la velocidad era lineal con el tiempo y respecto a la cantidad de enzima.

Proteína quinasa

Las proteínas quinasas son capaces de transferir el fosfato terminal del ATP a residuos serina o treonina de sustratos proteicos (106,107). Por lo tanto, se usó ATP $\left[\gamma \text{-}^{32}\text{P} \right]$ para seguir la reacción. El sustrato proteico fosforilado se aisló por precipitación con ácido tricloroacético.

Se incubó en una mezcla que contenía, en un volumen final de 0,1 ml: buffer glicerofosfato de sodio 50 mM, pH 6,5; EGTA 1 mM, acetato de magnesio 10 mM, ATP $\left[\gamma \text{-}^{32}\text{P} \right]$ 0,1 mM (200-1000 cpm/pmol),

1,5 mg/ml de histona o 3 mg/ml de caseína y cAMP entre 1-10 μ M cuando se indica.

En todos los ensayos se preparó una mezcla del buffer, acetato de magnesio y EGTA de modo de pipetear 10 μ l de esta solución para cada ensayo.

Los sustratos proteicos más usados fueron histona (tipo II-S de Sigma) y caseína (libre de vitaminas, Mann). Ocasionalmente se ensayaron: protamina, fosvitina, albúmina (todas marca Sigma). La preparación de una solución de caseína de 30 mg/ml se hizo de acuerdo con Reimann et al (81). La caseína se suspendió en agua, se calentó a 100°C durante 10 min manteniendo el pH en 9,5, se enfrió, se ajustó la concentración de proteína a 30 mg/ml y el pH a 6.

Este tratamiento aumenta la capacidad de la caseína como sustrato fosforilable.

Los demás sustratos proteicos se disolvieron directamente en agua destilada.

Por simplicidad operativa numerosas veces se preparó una mezcla de incubación con todos sus componentes de la cual se agregaron 50 μ l a cada tubo; el resto del volumen se completó con preparación enzimática y/o agua.

Las incubaciones se realizaron a 30°C durante 10 minutos. La reacción se comenzó con el agregado de enzima y se detuvo agregando 20 μ l de albúmina (50 mg/ml), seguidos de 1 ml de ácido tricloroacético 10 %. La albúmina se agrega para facilitar la precipitación de proteína en los pasos subsiguientes. Los tubos se centrifugaron 5 min a 3000

r.p.m. en centrífuga clínica y se decantó el sobrenadante. El precipitado de proteína se resuspendió en 0,2 ml de $\text{PO}_4\text{HNaNH}_4$ 1 M y la proteína se reprecipitó con 1 ml de ácido tricloroacético 10 %. El procedimiento de centrifugación, resuspensión y reprecipitación se repitió dos veces más. La resuspensión final se realizó en 0,1 ml de KOH 1 N. Se sembró el total de cada muestra en un cuadrado de papel Whatman 3 de 2 x 2 cm, que se secó bajo lámpara infra-roja. Los papeles secos se contaron en solución centelladora en un contador de centelleo líquido (ver contaje de radiactividad).

En los casos en los que hubo que medir actividad de proteína quinasa en fracciones particuladas, las muestras ya lavadas se procesaron de modo diferente debido a la incompleta solubilización del precipitado final de proteína fosforilada en HOK 1 N. Se digirieron los precipitados proteicos con 400 μl de Protosol (New England Nuclear), que es una solución 0,5 M de hidróxido de amonio cuaternario, dejando los tubos toda la noche a temperatura ambiente y media hora a 50°C. Se agregaron luego 3 ml de solución centelladora a cada tubo y se trasvasó su contenido a viales para el contaje de radiactividad.

La técnica de aislamiento de la proteína fosforilada por centrifugación detallada anteriormente fue una modificación de la descrita por Kuo y Greengard para ensayar la actividad de otras proteínas quinasas (47).

Los blancos del ensayo se realizaron agregando la enzima después del ácido tricloroacético. Los valores de los blancos oscilaron entre 400-2000 cpm dependiendo de la actividad específica del ATP $\left[\gamma \text{-}^{32}\text{P} \right]$ usado. Las incorporaciones mínimas fueron de por lo menos cuatro veces

el valor del blanco.

Los resultados se expresaron en nanomoles o picomoles de fosfato incorporado a la proteína a partir del ATP $\left[\gamma\text{-}^{32}\text{P} \right]$ en 10 minutos de incubación a 30°C.

Proteína receptora del cAMP

Las proteínas quinasas dependientes de cAMP unen cAMP con alta afinidad y especificidad. La actividad receptora de cAMP puede medirse utilizando el nucleótido marcado con ^3H , aprovechando la propiedad del complejo proteína receptora-cAMP de ser retenido en membranas de nitrocelulosa, mientras que el cAMP libre no lo hace (108).

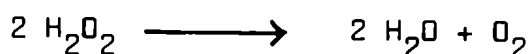
Las condiciones de incubación fueron las siguientes: buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; cAMP- ^3H (New England Nuclear Corporation, 38,4 Ci/mmol) entre 0,15 y 1 μM , en un volumen final de 50 μl . Los tiempos de incubación fueron: 5 minutos a 30°C o 60 min a 0°C. Terminada la incubación se agregó a cada tubo 1 ml de buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,0 y el contenido se filtró por membranas del tipo "Millipore" (Millipore, HA, ó Schleicher & Schüll 8A-85. Se lavaron los filtros con 10 ml del mismo buffer, se secaron las membranas y se contó su radiactividad (ver contaje de radiactividad). En todos los experimentos, las condiciones de incubación fueron tales que el cAMP incorporado no superó el 30 % del cAMP total.

La actividad receptora de cAMP se expresó como picomoles o femtomoles de cAMP unidos en las condiciones del ensayo.

Otros ensayos enzimáticos

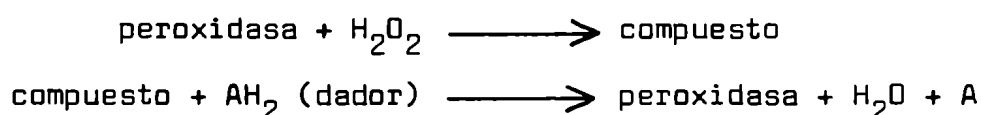
Catalasa (de hígado bovino, Peso Molecular 240.000, Sigma).

La catalasa cataliza la siguiente reacción:



La actividad enzimática se ensayó incubando la enzima en presencia de un exceso de H_2O_2 y midiendo el H_2O_2 remanente con solución de IK (109). La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 0,15 ml, buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7,0, H_2O_2 40 mM (Superoxol, Merck 30 % p/v) y enzima. Después de 5 min a 30°C se detuvo la reacción con 2 ml de IK 10% (p/v). Se leyó la absorbancia a 425 nm.

Peroxidasa (de rábano picante, Peso Molecular 40.000, tipo I de Sigma)

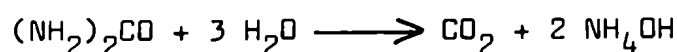


La actividad enzimática se ensayó utilizando como dador o-dianisidina (BDH), cuya forma oxidada desarrolla color (Catálogo de Worthington, 1969) (110).

En la reacción se mezclaron 3 ml de H_2O_2 0,003% (preparada fresca a partir de una solución madre de H_2O_2 0,3%) con 20 μl de o-dianisidina 1 % en metanol (preparada fresca) y la alícuota enzimática. Luego de 15 min a 30°C se leyó la absorbancia a 460 nm.

Ureasa (de soja, Peso Molecular 483.000, tipo IX, Sigma).

La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea

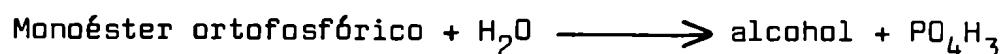


El método de dosaje se basó en la medición del hidróxido de amonio formado por reacción con fenol e hipoclorito de sodio en medio alcalino dando azul de indofenol que se midió espectrofotométricamente (111). La reacción se realizó en dos etapas: en la primera etapa se

incubó 20 μ l de solución de urea (15 mg/ml) con 40 μ l de la fracción enzimática; luego de 7 min a 30°C se agregaron 0,2 ml del reactivo de fenol (fenol 50 g - nitroprusiato de sodio 0,25 g en 1 l de agua destilada) y 0,2 ml del hipoclorito alcalino (25 g de ONa, 2g de ClONa en 1 l de agua destilada); se dejó otros 7 min a 30°C y se leyó la absorbancia a 540nm.

Fosfatasa alcalina (de E.coli, Peso Molecular 80.000, tipo III, Sigma).

Esta enzima, cuya actividad óptima es a pH alcalino, cataliza la siguiente reacción:



Para dosarla se utilizó la técnica de Garen y Levinthal (112), en la cual se mide la liberación de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenilfosfato. La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 2 ml, 1 ml de p-nitrofenilfosfato en buffer Tris-ClH 0,1 M pH 8,0 y una alícuota de la enzima. Luego de incubar 15 min a 30°C se midió la absorbancia a 410nm.

Valoración de marcadores de peso molecular

Estos marcadores fueron valorados midiendo su absorbancia a la longitud de onda óptima de cada compuesto.

Azul-dextrano	254 y 630 nm	(P.M. 2.000.000)
Vitamina B ₁₂	400 nm	(P.M. 1200)
Citocromo c	420 nm	(P.M. 12.400)(Sigma, tipo VI)
Albúmina bovina	230 nm	(P.M. 60.000)(Sigma, fracción V)

GRADIENTES DE SACAROSA

Los gradientes de sacarosa fueron preparados según los lineamientos generales de Martin y Ames (113).

Los gradientes entre 5-20 % de sacarosa (p/v) fueron forma-
dos varias horas antes de ser usados con 7 capas, de 0,65 ml cada una,
de soluciones de concentración decreciente de sacarosa. La solución de
sacarosa fué preparada en buffer B o en buffer B conteniendo ClNa 0,5 M.
Los diversos agregados que se hicieron a cada gradiente se indican en
cada experimento.

La muestra se sembró en un volumen de 200 μ l que incluyó siempre
una mezcla de marcadores de peso molecular. Los marcadores usados
fueron catalasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y citocromo c (114).

La centrifugación de las gradientes se realizó en un rotor SW
39 de la ultracentrífuga Spinco modelo L, a 97.000 x g durante 16 ó 40
horas a 4°C. Se recogieron 24 fracciones de 0,2 ml cada una, haciendo
sifón con un catéter, del fondo del tubo a la superficie. El peso molele
cular aproximado de la especie incógnita se calculó utilizando la si-
guiente fórmula:

$$\frac{PM_X}{PM_{Stand}} = \left(\frac{x_X}{x_{stand}} \right)^{3/2}$$

donde x es la distancia, en unidades arbitrarias, recorrida por el marca
dador o por la muestra incógnita desde la superficie del tubo. Esta fórm
mula es sólo aproximada, porque implica suponer que las proteínas son esfé
ricas.

TECNICAS CROMATOGRAFICAS

Cromatografía en DEAE-celulosa

Se utilizó DEAE-celulosa Serva DEAE-SS, capacidad 0,71 mEq/mg, tratada con ClH e HONa, como lo indican Peterson y Sorber (115).

Como las cromatografías se hicieron siempre en presencia de buffer fosfato de potasio, se cambió el contraíón de la resina poniéndola en contacto con una solución de fosfato de potasio 100 mM; luego se filtró y se lavó la resina con el buffer de equilibrio.

Las columnas se sembraron manteniendo una relación de 40 mg de proteína / 10 ml de resina empaquetada. Cuando la elución fué discontinua, se eluyó con dos volúmenes de cada buffer y las fracciones recogidas fueron de 1/10 del volumen de la columna. Cuando la elución fué con un gradiente continuo, los volúmenes usados se indican en cada caso.

Filtración en gel

A lo largo del trabajo se utilizaron diversas filtraciones en gel: Sepharosa 6B, Sephadex G-200 - Sephadex G-100 y Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala).

El volumen muerto de las columnas de Sepharosa 6 B, Sephadex G-200 y G-100 se determinó utilizando Azul Dextrano y el de las columnas de Sephadex G-25 utilizando hemoglobina o azul dextrano.

Para calibrar las columnas (116) se utilizaron los siguientes

marcadores: ureasa, catalasa, fosfatasa alcalina, albúmina bovina, peroxidasa y vitamina B₁₂. Este último es un marcador de inclusión total, para los geles de Sephadex G-200 y G-100.

Haciendo la misma suposición que se hizo para los gradientes de sacarosa, se puede determinar el peso molecular aproximado de una proteína desconocida de la gráfica de calibración de la columna de Sephadex. Se grafica K_{av} versus log peso molecular $K_{av} = \frac{V_E - V_o}{V_{gel} - V_o}$, donde V_E es el volumen de elución de la proteína incógnita o del marcador, V_o es el volumen muerto y V_{gel} es el volumen de la columna empaquetada.

SINTESIS DE ATP [γ -³²P]

Para la síntesis de este nucleótido radiactivo se siguió, en líneas generales, la técnica de Glynn y Chappell (117) con las modificaciones introducidas por Chang et al (118).

El ³²P_i, en solución clorhídrica, fue provisto por la Comisión Nacional de Energía Atómica o donado por el Dr. H. Torres (I.I.B.). La síntesis se realizó en un tubo de ensayo en el que se llevaron a sequedad 5-10 mCi de ³²P_i. La composición de la mezcla de incubación fue la siguiente: buffer Tris-ClH 50 mM pH 8,0, ATP 1 mM, ácido 3-fosfoglicérico 0,5 mM, Cl₂Mg 2 mM, EDTA 0,5 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, NAD⁺ 50 μ M en un volumen final de 200 μ l. Luego de ajustar el pH a 8 con HONa se agregaron 4 μ l de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo (Sigma) y 2 μ l de 3-fosfogliceratoquinasa de levadura, tipo IV (Sigma). Se incubó 30-45 min a 30°C.

Para el aislamiento del ATP radiactivo, se diluyó la mezcla de incubación con agua hasta 4 ml, y se sembró en una columna de DEAE-celulosa (forma HCO_3^-) de 0,3 x 4 cm, equilibrada con $\text{CO}_3\text{H}_2\text{NH}_4$ 20 mM; el fosfato inorgánico se eluyó con 10 ml de $\text{CO}_3\text{H}_2\text{NH}_4$ 80 mM y el ATP con 10 ml de $\text{CO}_3\text{H}_2\text{NH}_4$ 300 mM. El eluido de ATP se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio, luego del agregado de 1,5 ml de trietilamina y 3 ml de etanol. Para asegurar la evaporación de la trietilamina y del bicarbonato de trietilamonio se lavó el tubo dos veces con 3 ml de etanol y se llevó nuevamente a sequedad. El ATP $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ se disolvió finalmente en etanol-EDTA 0,2 mM (1:1) y se guardó a -20°C (119). La actividad específica del ATP $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ osciló entre 5×10^3 - 30×10^3 cpm/pmol.

CONTAJE DE RADIATIVIDAD

Para el conteo de las muestras radiactivas se utilizó un contador de centelleo líquido Packard.

Las muestras resultantes del ensayo de proteína quinasa se contaron en viales de plástico chicos con 3 ml de solución centelladora, apoyados sobre los viales standard del aparato.

Con cualquier otra muestra radiactiva a contar, (síntesis del ATP, por ejemplo) se procedió de la misma manera, previo sembrado y secado del material sobre papel Whatman Nº 3.

Los filtros de nitrocelulosa que se usaron para el ensayo de actividad receptora de cAMP fueron secados bajo lámpara infra-roja y contados como se explicó más arriba.

Composición de la solución centelladora: 0,1 g de dimetil POPOP (1,4-bis [2 (4-metil-5-fenil oxazolil)] benceno), 4 g de PPO (2,5- difeniloxazol) (ambos marca Sigma) por litro de tolueno (Atanor).

Como las muestras insolubilizadas en el papel de filtro o en el filtro de nitrocelulosa no se solubilizan en la mezcla centelladora, ésta pudo ser reusada muchas veces.

La radiactividad de $^{32}\text{P}_i$ se midió a 25 % de ganancia y con una ventana de 50- ∞ , durante 1/2 minuto. La radiactividad de H^3 se midió a 60 % de ganancia y con una ventana de 50-1000, durante 1 min.

OTRAS TECNICAS

La proteína fue valorada por el método de Lowry y col. (120), utilizando albúmina bovina como patrón. En todos los casos la proteína de la muestra fue precipitada con ácido tricloroacético en una concentración final de 10 % y luego resuspendida en HONa 1 N.

El fósforo inorgánico se dosó por el método de Fiske y SubbaRow (121).

R E S U L T A D O S

DISTRIBUCION SUBCELULAR DE ACTIVIDADES DE PROTEINA QUINASA ENSAYADAS

SIN SUSTRATO EXOGENO Y CON CASEINA

Se comenzó el estudio de las proteínas quinasas de Mucor rouxii analizando su distribución subcelular en extractos de micelio preparados como se indica en Materiales y Métodos.

En cada fracción (P_2 , P_{100} y S_{100}) se midió la actividad específica y total de proteína quinasa en presencia de caseína (3 mg/ml) y en ausencia de sustrato exógeno. El ensayo sin agregado de sustrato da una medida de la actividad endógena de proteína quinasa, con las limitaciones que puede tener un ensayo en el que varían simultáneamente la cantidad de enzima y de sustrato.

La Tabla I resume las actividades específicas y totales de proteína quinasa que se obtuvieron cuando se sometieron 2 g de polvo de micelio al fraccionamiento subcelular anteriormente descrito. Los resultados son el promedio de cuatro experimentos.

La distribución de las actividades ensayadas con caseína o con sustrato endógeno es muy similar. Más del 70 % de la actividad de proteína quinasa está asociada a la fracción particulada que sedimenta a bajas revoluciones, o sea a membranas y/o pared celular. Se comprobó que la actividad específica de esta fracción permanecía constante luego de sucesivos lavados y centrifugaciones. Esto significa que esa actividad es propia de la fracción y no es debida a una contaminación del sobrenadante. El hecho de que el 70 % de la actividad endógena sea también

particulada indicaría que por lo menos en dicha fracción hay sustrato (s) para la proteína quinasa.

Para los cálculos de actividad enzimática se utilizó la zona lineal de la curva de actividad versus la concentración de enzima. Para las actividades del S_{100} (+caseína), P_2 (+ caseína) y P_{100} (+ caseína) la linealidad se mantuvo hasta los 20 μg de proteína, mientras que para la actividad endógena del S_{100} y del P_{100} se observó linealidad hasta los 100 μg .

En la Tabla II se puede observar la distribución subcelular de las actividades de proteína quinasa medidas en extractos de células levaduriformes. Esta distribución es aparentemente diferente a la de micelio. Mientras que en éste, el 70% de la actividad sedimenta a 2.000 x g, en las células levaduriformes hay más actividad asociada a la fracción P_{100} . Sin caseína, no se pudo detectar actividad en la fracción P_2 . Muy probablemente estas diferencias en la distribución subcelular de las caseínas quinasa surja del diferente grado de asociación de la membrana a la pared celular en ambas formas del hongo.

Las actividades específicas son muy similares en ambos tipos de extractos. Las actividades totales no pueden compararse por varios motivos: primero, los datos de la Tabla II son el resultado de un único experimento; segundo, la rotura de las células levaduriformes, si bien alta, no fué total y tercero, la igualdad de pesos húmedos de micelio y células levaduriformes no implica igualdad de pesos secos. Lo que llama la atención de estos resultados es que, a diferencia de lo que ocurre en micelio, en células levaduriformes la suma de las actividades totales de las fracciones es sólo el 50 % de la actividad total del extracto.

TABLA II
DISTRIBUCION SUBCELULAR DE ACTIVIDADES DE PROTEINA QUINASA EN EXTRACTOS DE LEVADURA^a

Fracción subcelular	Actividad endógena			Actividad con caseína	
	actividad específica ^b	actividad total		actividad específica ^b	actividad total
		nmoles/10'	% ^c		
Extracto crudo	0,46	18		2,7	106
P ₂	ND	ND		0,4	16,6
P ₁₀₀	0,72	2,7	32	5,0	19,0
S ₁₀₀	0,40	6,4	68	1,3	17,8

^aEste experimento fue realizado con 2 g de células levaduriformes (peso húmedo). En Materiales y Métodos está explicado como se preparó el extracto y las fracciones subcelulares. Estos datos provienen de un único experimento. A la actividad con caseína le fue restada la actividad endógena.

^bExpresada en nmoles por mg de proteína por 10 min.

^cLa suma de las actividades de P₂, P₁₀₀ y S₁₀₀ se tomó como 100 %.
ND: no se detectó actividad.

Esto probablemente indique que la expresión de la actividad total es el resultado complejo de varios factores que necesitan estar juntos para interactuar.

DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD DE PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE

DE cAMP

Los experimentos de distribución subcelular resumidos en las Tablas I y II se realizaron en todos los casos en ausencia de sustrato exógeno o con caseína, en presencia o en ausencia de cAMP 0,1 mM. Si bien en la actividad endógena de la fracción S_{100} se notó una ligera estimulación por cAMP (1,5 veces), la actividad con caseína no mostró variaciones. Cuando se ensayó la actividad de proteína quinasa en las diferentes fracciones subcelulares utilizando como sustrato histona se obtuvieron resultados muy diferentes. El ensayo de actividad de las fracciones particuladas P_2 y P_{100} mostró que la actividad en presencia de histona no superaba la actividad endógena y no había estimulación por cAMP. Esto indicaría que no hay actividad de proteína quinasa dependiente de cAMP asociada a estas fracciones.

Cuando se ensayó actividad de histona quinasa de la fracción S_{100} de micelio o de células levaduriformes, se encontró una actividad específica que osciló alrededor de los 500 pmoles de ATP incorporados por mg de proteína en 10 minutos en presencia de cAMP y de unos 150 pmoles/mg proteína/10 minutos en ausencia de cAMP. Tanto la actividad de histona quinasa como la actividad endógena reflejan la presencia de proteínas quinasas solubles dependientes de cAMP. Estos resultados es-

tán de acuerdo con datos de la literatura (45,49) según los cuales la histona es utilizada preferentemente por las proteínas quinasas dependientes de cAMP.

En la figura 1 se ve un ejemplo clásico de la forma que presentan las curvas de actividad enzimática de la fracción S_{100} de micelio con y sin agregado de histona como sustrato exógeno. De estos datos surge que es muy difícil calcular actividades específicas pues las curvas casi no presentan zona de linealidad. Esta falta de linealidad posiblemente refleje la presencia en el extracto de moduladores de la actividad enzimática (55). Por otra parte, no se sabe cuan lícito es restarle la actividad endógena a la actividad de histona quinasa pues al agregar un sustrato exógeno puede dejarse o no de utilizar el sustrato endógeno. De todos modos, de los datos de las Tablas I y II, surge claramente que sólo hay actividad de proteína quinasa dependiente de cAMP en la fracción soluble. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en el laboratorio sobre la distribución subcelular de la actividad receptora de cAMP. Este estudio (122) mostró que el 92 % de dicha actividad es soluble, sugiriendo que la actividad receptora de cAMP y la de proteína quinasa dependiente de cAMP pudieran estar relacionadas.

CROMATOGRAFIA EN DEAE - CELULOSA DE LA FRACCION S_{100} DE

CELULAS LEVADURIFORMES

En la figura 2 se muestra el perfil de proteínas quinasas obtenido al cromatografiar una alícuota de la fracción S_{100} de células levaduriformes por una columna de DEAE-celulosa y eluir la proteína con

Figura 1 - Curva de actividad de proteína quinasa de la fracción S₁₀₀ de micelio (16 mg/ml de proteína), en presencia y en ausencia de cAMP. a) sin agregado de sustrato exógeno, b) con el agregado de histona (1,5 mg/ml). Actividad específica del ATP: 300 cpm/pmol.

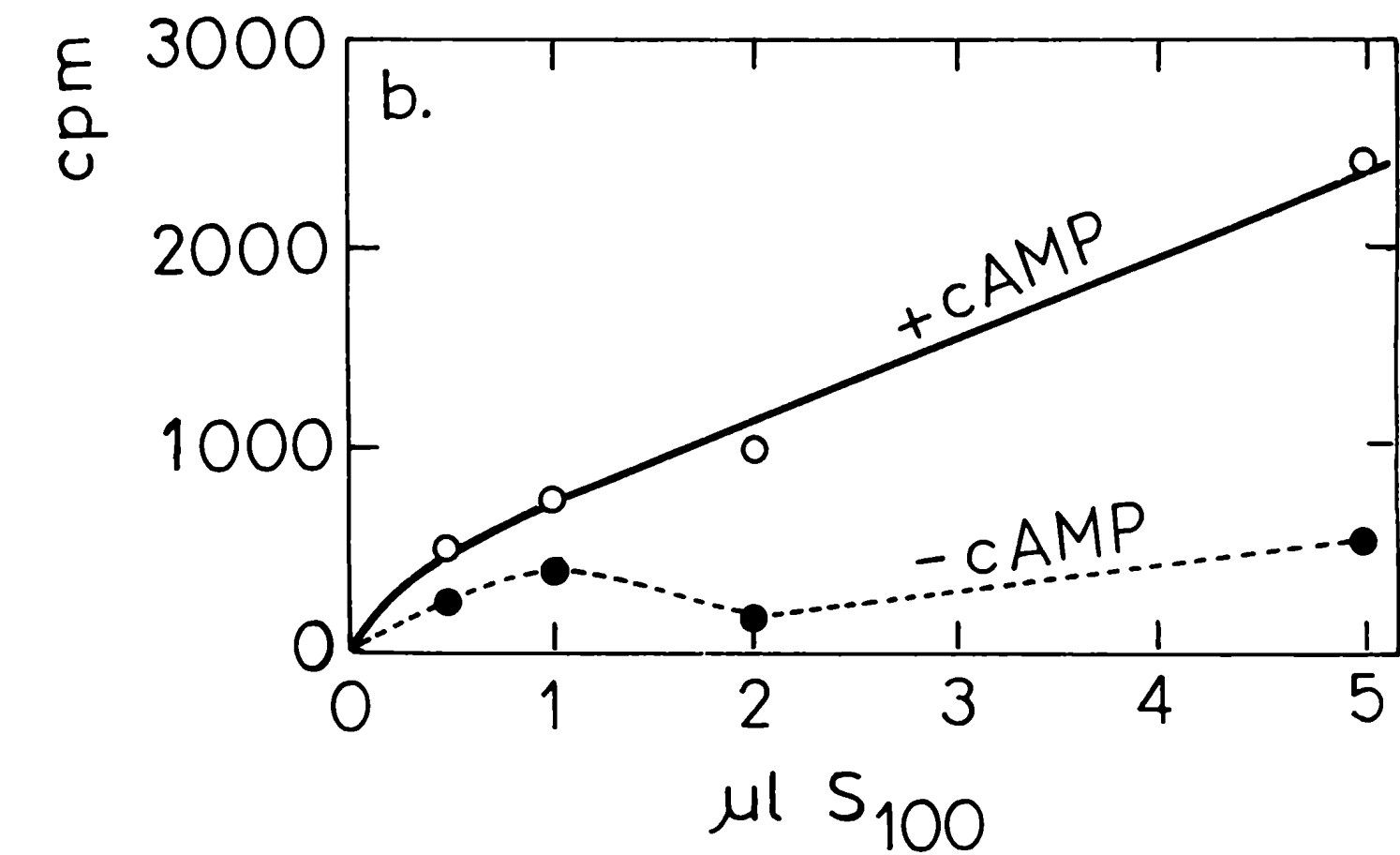
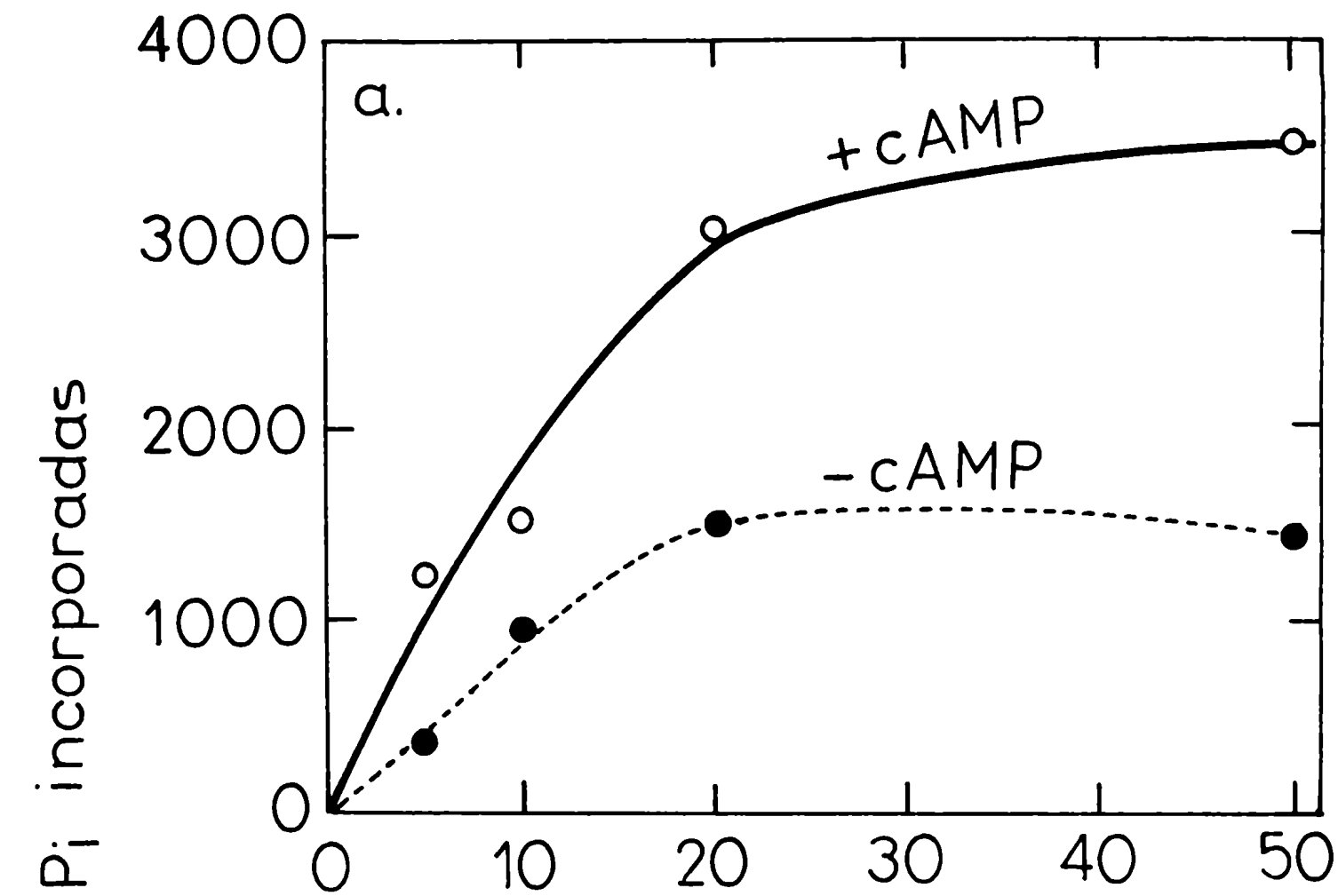
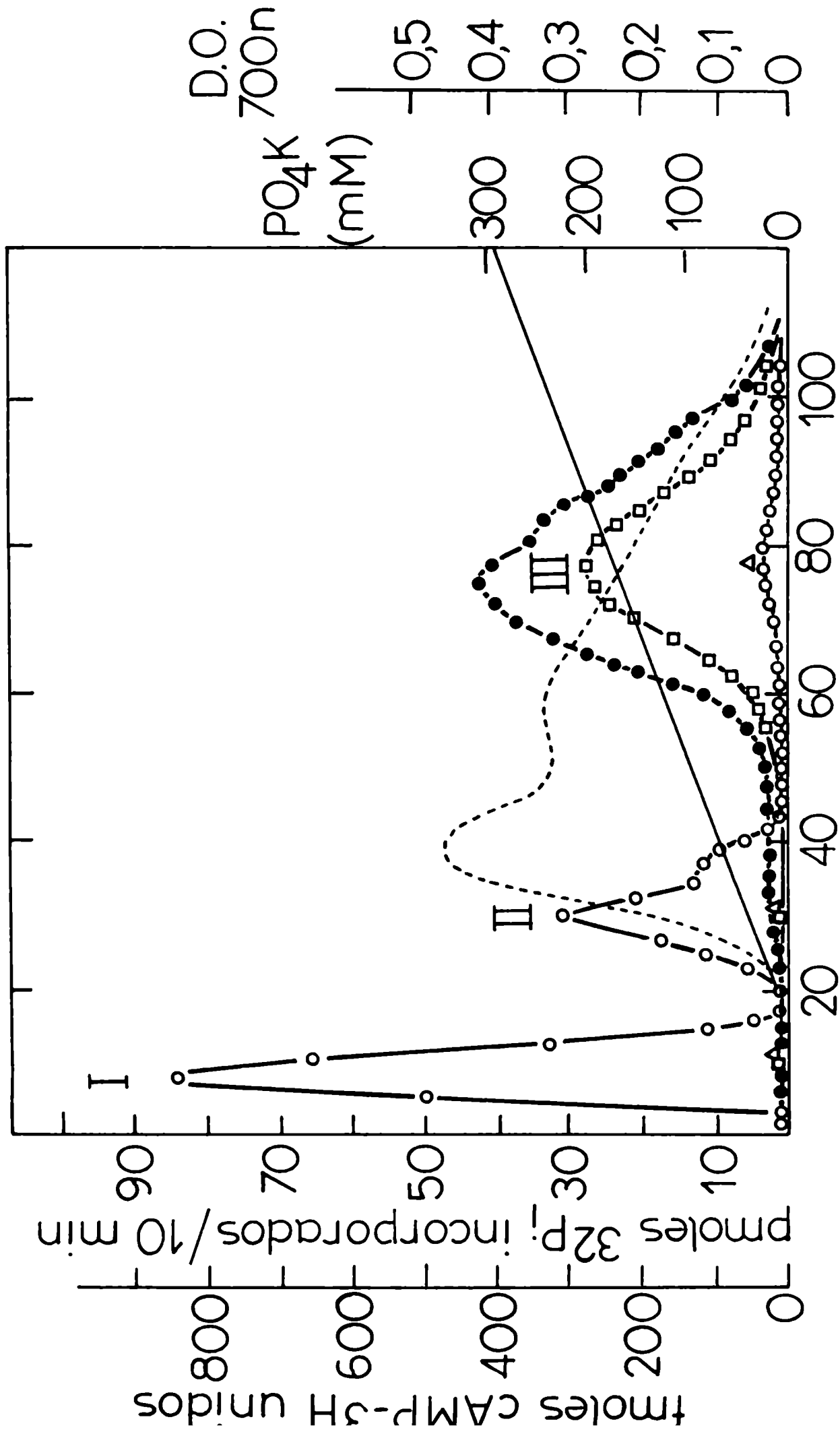


Figura 2 - Cromatografía en DEAE-celulosa de una alícuota de la fracción S₁₀₀ proveniente de células levaduriformes. Se sembraron 35 mg de proteína en una columna de DEAE-celulosa (1 x 11 cm) equilibrada con buffer B. Se recogieron fracciones de 1 ml y se ensayó en alícuotas de 50 ul: actividad receptora de cAMP (—●—); actividad de caseína quinasa en ausencia de cAMP (—○—); actividad de histona quinasa en presencia de cAMP 0,1 mM (—□—) y en ausencia de cAMP (—△—). El fosfato de potasio fue valorado según la técnica de Fiske y SubbaRow (121). El perfil de proteínas se determinó según la D.O. a 700 nm de una alícuota valorada por la técnica de Lowry et al (120) (- - - - -).



un gradiente continuo de fosfato de potasio de 0-0,4 M. Se obtuvieron dos picos con actividad de caseína quinasa, independientes de cAMP. El pico I eluyó junto con el percolado, o sea que no se retuvo en la columna. El pico II eluyó apenas comenzado el gradiente. A una concentración de fosfato de potasio de aproximadamente 0,17 M eluyó el único pico de actividad de histona quinasa dependiente de cAMP (pico III). Junto con esta actividad eluyó la actividad receptora de cAMP, indicando una vez más una probable asociación entre ambas.

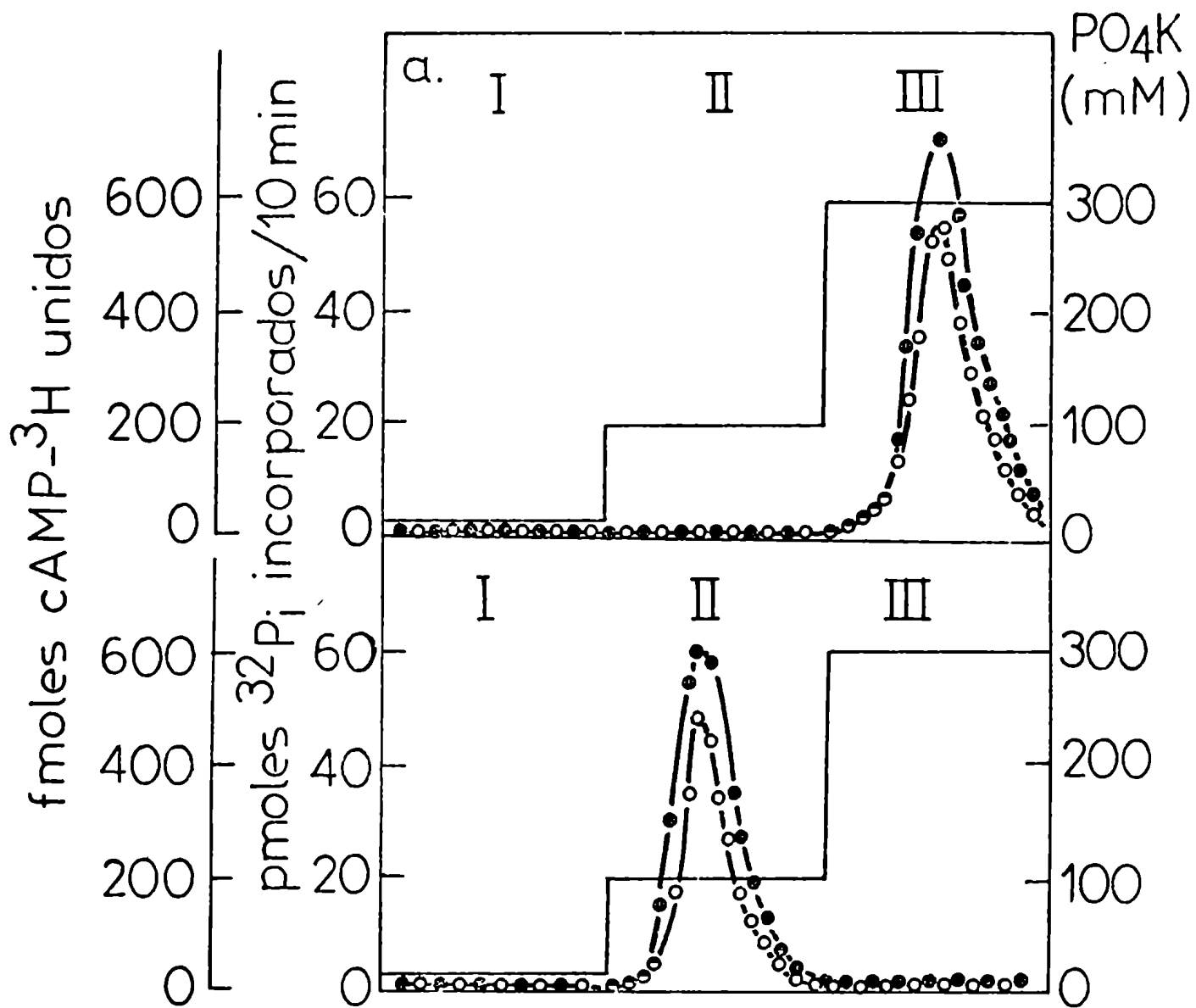
Este perfil se reprodujo cada vez que se procesó un extracto de células levaduriformes. En cambio, los perfiles obtenidos con la fracción S_{100} de micelio fueron variables en cuanto a la histona quinasa y proteína receptora de cAMP. Los perfiles extremos que se obtuvieron fueron: uno como el obtenido a partir de células levaduriformes en que ambas actividades eluyeron a la concentración más alta de fosfato de potasio y otro en el que eluyeron a baja fuerza iónica (figura 3). En algunos casos se obtuvieron perfiles mixtos, es decir, se evidenciaba la presencia de ambos picos.

Debido a que los perfiles obtenidos con extractos de micelio no fueron reproducibles y a que la histona quinasa dependiente de cAMP que eluye a 0,07 M de fosfato era muy inestable, se utilizaron extractos de células levaduriformes para la caracterización de esta proteína quinasa.

ALGUNAS PROPIEDADES DE LOS PICOS I Y II DE CASEINA QUINASA

Se trabajó con un pico I proveniente de la fracción S_{100} de micelio, concentrado por precipitación con sulfato de amonio hasta 80 %

Figura 3 - Cromatografía en DEAE-celulosa con elución discontinua de alícuotas de la fracción S_{100} proveniente de células levaduriformes (a) y de micelio (b). En ambos casos se sembraron 36 mg de proteína en una columna de DEAE-celulosa de 10 ml (1 x 11 cm). La proteína se eluyó sucesivamente con 20 ml de buffer B, 20 ml de fosfato de potasio 100 mM en buffer B y 20 ml de fosfato de potasio 300 mM en buffer B. En cada panel se recogieron 20 fracciones de 1 ml. Se ensayó actividad de histona quinasa en alícuotas de 50 μ l en presencia de cAMP (—●—) y de proteína receptora de cAMP en alícuotas de 40 μ l (—○—).



de saturación, previo agregado de albúmina hasta 2 mg/ml, disolución en buffer B y diálisis contra el mismo buffer.

Por recromatografía en DEAE-celulosa esta actividad de proteína quinasa siguió eluyendo con el percolado, descartándose así que pudiera corresponder a sobrecarga de la primera columna de DEAE-celulosa. Esto indicaría que a pH 7-7,2 esta enzima está negativamente cargada.

Esta actividad de proteína quinasa fosforila con la misma eficiencia caseína o fosvitina y no fosforila histona. Con ninguno de estos sustratos se observó estimulación cuando la actividad se ensayó en presencia de cAMP o de cGMP 0,1 mM.

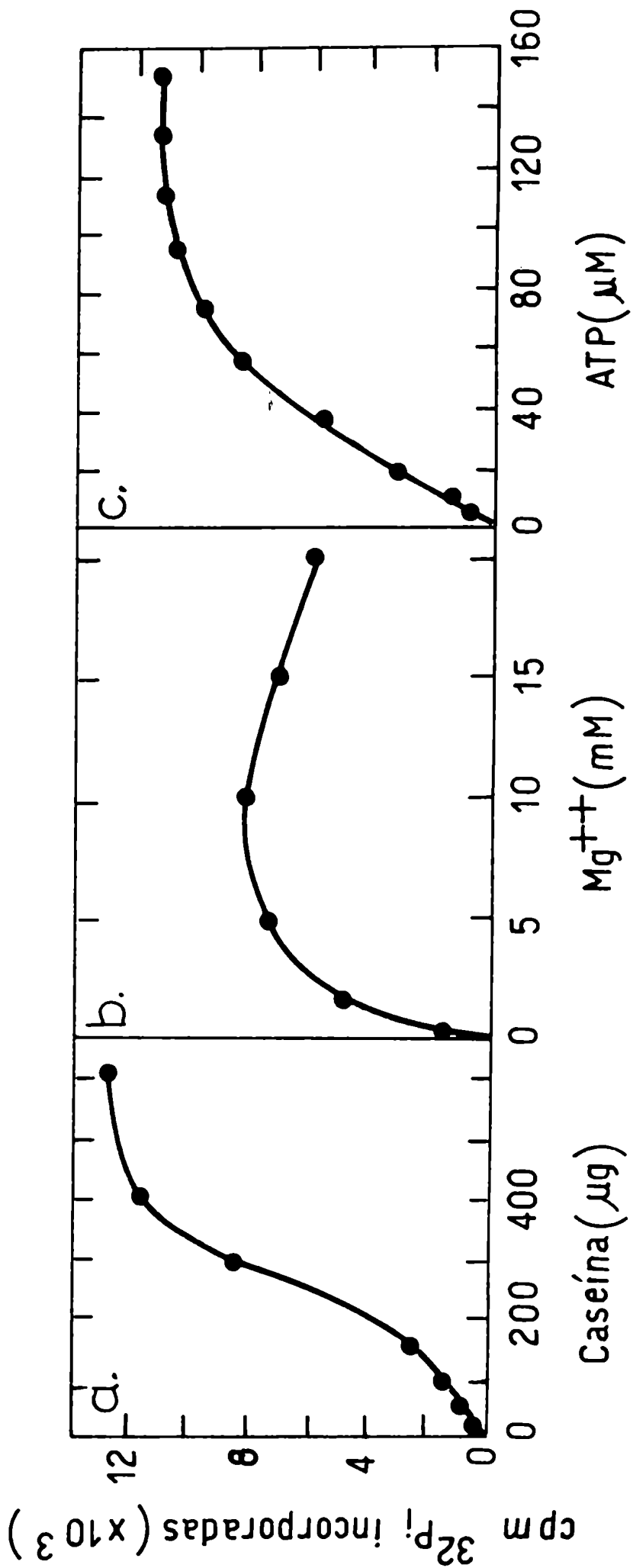
Con esta preparación de caseína quinasa se hicieron algunas medidas cinéticas. En la figura 4-a se ve que la concentración óptima de caseína está por encima de los 4 mg/ml. En la figura 4-b se ve que la actividad es máxima y constante entre 5-15 mM Mg^{++} (como acetato) y en la 4-c que la K_m para el ATP es del orden de 30-40 μM .

El pico II de proteína quinasa, también utiliza caseína o fosvitina como sustrato exógeno y tampoco presenta estimulación por cAMP o cGMP.

PURIFICACION DE LA PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE cAMP

El esquema de purificación fué diseñado en base a las propiedades diferenciales que en este sistema presentan las proteínas quinasas independientes de cAMP y la dependiente de cAMP. En la tabla III se presentan los datos de purificación obtenidos a partir de 20 g (peso

Figura 4 - Dependencia de la actividad del pico I de proteína quinasa con la concentración de: a) caseína, b) Mg^{++} y c) ATP. Para todos los ensayos se utilizaron 3 μ l del concentrado del pico I. Las condiciones standard de los ensayos fueron: 300 μ g de caseína, acetato de magnesio 10 mM y ATP 0,1 mM. La actividad específica del ATP utilizado fue de 100 cpm/pmol.



húmedo) de células levaduriformes. La fracción S_{100} fué preparada como se describió en Materiales y Métodos. Esta fracción se tomó como etapa primera de la purificación. Para calcular la actividad específica de la fracción S_{100} fue necesario trabajar a alta dilución del extracto (200 veces) a fin de obtener linealidad en la curva de enzima. El ATP con el que se hicieron estos ensayos fué de muy alta actividad específica (~ 1000 cpm/pmol).

Para el segundo paso de la purificación, se ensayó un fraccionamiento con sulfato de amonio sólido. La tabla IV resume los resultados obtenidos. Entre 20-45 % de saturación precipita más del 90 % de la actividad de proteína quinasa dependiente de cAMP y de la actividad receptora de cAMP. Debido a que entre 0-20 % de saturación precipita muy poca proteína, se resolvió hacer un fraccionamiento entre 0-45 %. El precipitado, obtenido luego de 20 min. de centrifugación a $12.000 \times g$ se guardó a $-20^{\circ}C$ durante una noche sin apreciable pérdida de actividad enzimática. El precipitado se resuspendió en el mínimo volumen de buffer 3 (2-4 ml), se clarificó por centrifugación a $12.000 \times g$ 20 min y se desaló por pasaje a través de una columna de Sephadex G-25 (volumen de la columna, aproximadamente 10 veces el de la muestra a desalar), calibrada con Azul Dextrano. Este paso purifica bastante. La proteína total disminuye unas 9 veces y se pierde un 35 % de actividad enzimática.

El siguiente paso fué diseñado para separar la proteína quinasa dependiente de cAMP de las independientes de cAMP. En base a la columna de DEAE-celulosa de la figura 2 se diseñó una columna de DEAE-celulosa de elución discontinua. Las dimensiones de la columna se ajustaron a las descriptas en Materiales y Métodos. Se sembró la fracción 2,

TABLA III
PURIFICACION DE PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE CAMP^a

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad total (pmoles x10 ⁻³)	Actividad específica (pmoles/mg)	Purificación (-veces)	Rendimiento %
1- S ₁₀₀	650	448	690	1,0	100
2- SO ₄ (NH ₄) ₂ y Sephadex G-25	74,7	282	3782	5,5	63
3- DEAE-celulosa y con <u>centración</u>	15,0	107	7176	10,4	24
4- Sephadex G-200	4,3	74	17260	25,0	16,5

^aLa actividad de proteína quinasa dependiente de CAMP fué purificada como se describe en el texto. En cada paso de la purificación se determinó actividad total y actividad específica. La purificación fué hecha a partir de 20 g (peso húmedo) de células levaduras.

TABLA IV
FRACCIONAMIENTO POR $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Fracción	Distribución de la actividad ^c %
Experimento 1 ^a	
0-20 %	0,7
20-60 %	93,2
sobrenadante de 60 %	6,0
Experimento 2 ^b	
20-45 %	94,5
45-60 %	5,5

^aEn el experimento 1 se sometió una alicuota de la fracción S_{100} de células levaduriformes a precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ sólido hasta 20 % de saturación. Luego de 20 min. a 12000 x g, se precipitó el sobrenadante con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ hasta 60 %. Se centrifugó nuevamente y se ensayó actividad de proteína quinasa en los precipitados redissueltos en buffer B y en el sobrenadante.

^bEn el experimento 2 se refraccionó el precipitado de 20-60 % redissuelto en buffer B entre 20-45 % y entre 45-60 % de sal. Se disolvieron los precipitados en buffer B y se ensayó actividad de proteína quinasa.

^cSe tomó como 100 % la suma de las actividades de las fracciones.

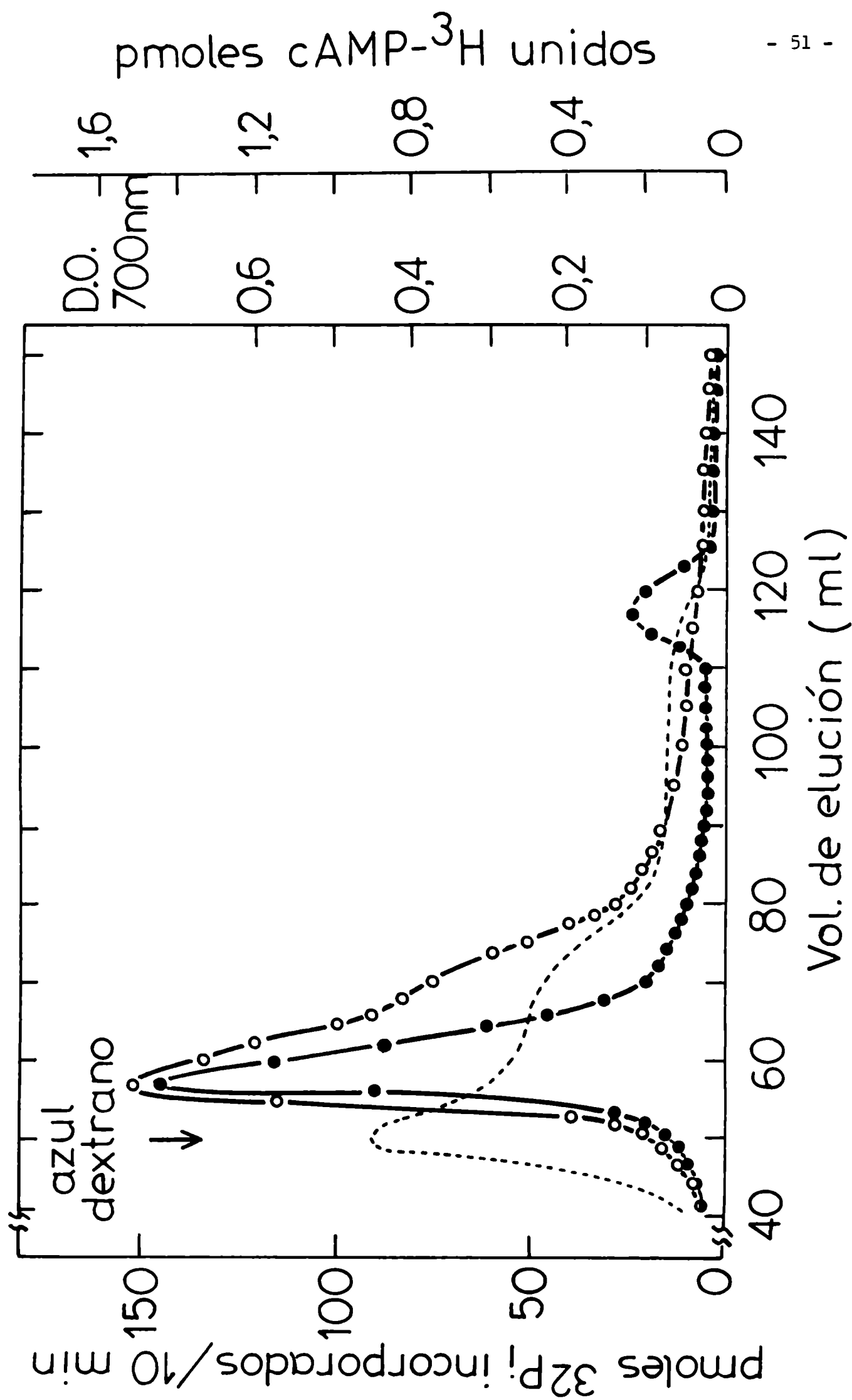
se lavó la columna con dos volúmenes de buffer B, luego con dos volúmenes de fosfato de potasio 100 mM en buffer B y por último con dos volúmenes de fosfato de potasio 300 mM en el mismo buffer. En este último lavado eluyó la proteína quinasa dependiente de cAMP, mientras que las independientes lo hicieron en el primero y segundo lavados. Se juntaron las fracciones activas y se concentraron en un saco de diálisis contra Polietilenglicol 6000 (Carbowax). El concentrado fue dializado exhaustivamente contra buffer B, constituyendo la etapa 3 de purificación. Si bien en este paso, el rendimiento es bajo y la purificación es de sólo dos veces, se logra eliminar la interferencia producida por las otras proteínas quinasas.

A partir de esta etapa se pierde la actividad endógena, o sea la capacidad de fosforilar sustrato (s) presentes en el extracto. Esta actividad endógena, buena parte de la cual es independiente de cAMP, interfiere bastante en las determinaciones de actividad de histona quinasa, sobre todo en las etapas 1 y 2 de purificación. Para eliminar esta interferencia hay que realizar los ensayos de actividad enzimática a alta dilución del extracto.

En el último paso de purificación, se filtró la fracción 3, disuelta en un volumen final de 1 ml, por una columna de Sephadex G-200 (1,7x 63 cm) equilibrada con buffer fosfato de potasio 20 mM, EDTA 1 mM, mercaptoetanol 2 mM. La holoenzima, o sea, la proteína quinasa sin disociar, eluyó muy poco después del marcador de exclusión total (Azul Dextrano) (figura 5). Este paso separa eficazmente a la holoenzima de subunidades disociadas preexistentes.

En todo el proceso de purificación se siguieron siempre las

Figura 5 - Filtración de la proteína quinasa parcialmente purificada por columna de Sephadex G-200. 1 ml de la preparación enzimática (etapa 3 de purificación) conteniendo 12 mg de proteína, se filtró a través de una columna de Sephadex G-200 (1,7 x 63 cm) equilibrada con buffer fosfato de potasio 30 mM, pH 7,2, EDTA 1 mM, mercaptoetanol 2 mM. Se recogieron fracciones de 1 ml. Se ensayaron las actividades de histona quinasa en presencia de cAMP (—●—) y de proteína receptora de cAMP (—◊—) en alícuotas de 50 μ l. El perfil de proteínas se determinó según la D.O. a 700 nm de una alícuota valorada por la técnica de Lowry et al (120) (-----).



dos actividades asociadas a la proteína quinasa dependiente de cAMP: la actividad catalítica y la actividad receptora de cAMP. Si bien en la tabla III sólo se expresa la actividad catalítica, la actividad receptora siguió el mismo esquema de purificación, con una actividad específica inicial de 3,2 pmoles de cAMP unidos/mg de proteína. O sea que ambas actividades siguieron estando asociadas entre sí a través de estas cuatro etapas.

CARACTERIZACION DE LA PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE cAMP

Activación por cAMP

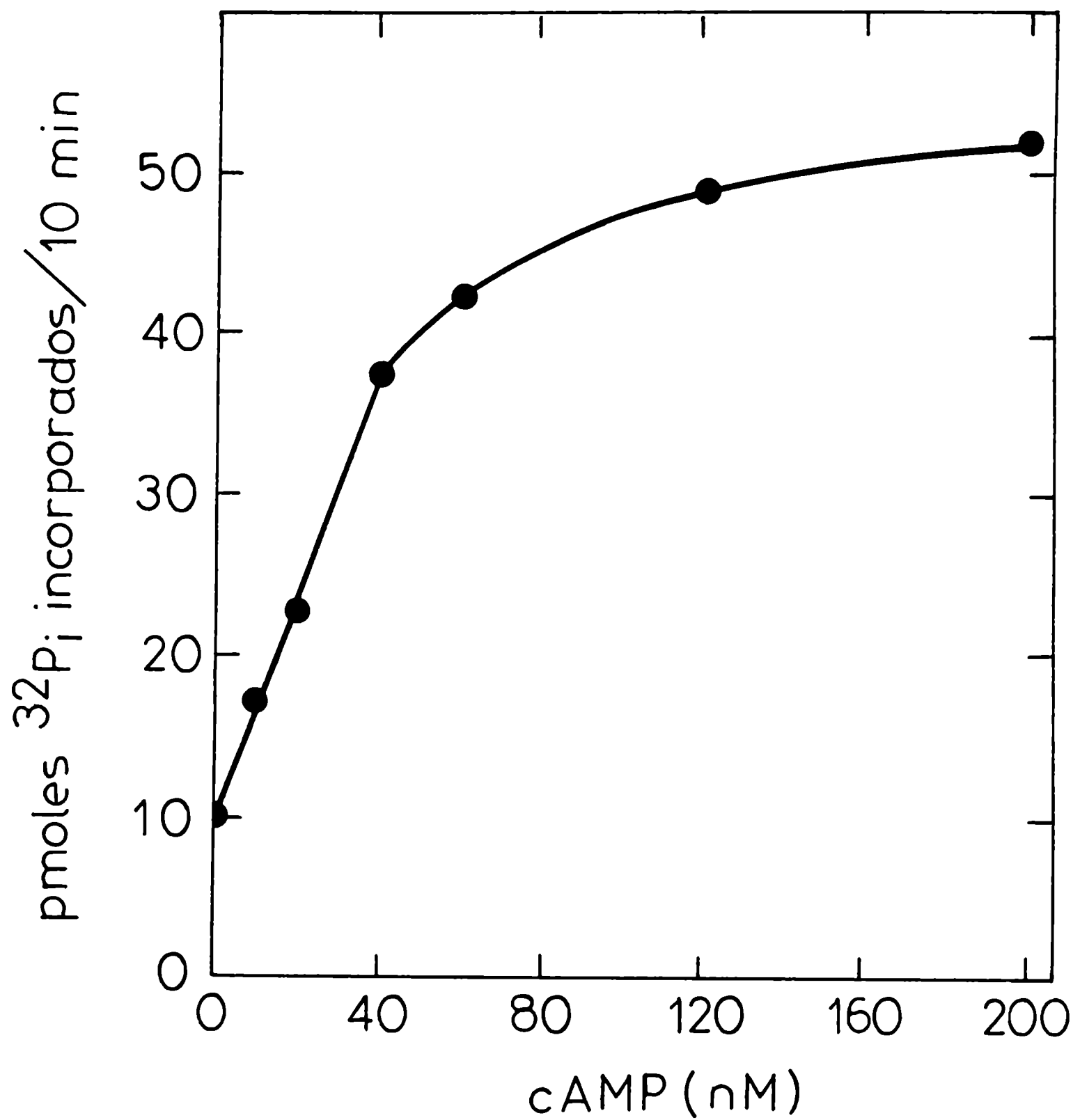
En la figura 6 se muestra la activación de la proteína quinasa (fracción 4 de purificación) por concentraciones crecientes de cAMP. La mitad de la estimulación máxima se logra con una concentración de cAMP de aproximadamente 30 nM y la máxima estimulación con 200 nM. Se necesita una concentración de cGMP 100 veces mayor para obtener la misma estimulación máxima.

Resultados previos indican que la capacidad receptora de nucleótido cíclico asociada a la proteína quinasa también es altamente específica para el cAMP (122).

Por otro lado, la $A_{0,5}$ para el cAMP (figura 6) y la K_d de 20 nM para la proteína receptora (122) son del mismo orden de magnitud.

Todos estos resultados indican que la proteína quinasa de Mucor es una enzima dependiente de cAMP.

Figura 6 - Curva de activación de la proteína quinasa por cAMP. Se utilizaron 8 μ g de proteína (fracción 4 de purificación) para cada ensayo. La incubación se realizó en las condiciones standard descritas en Materiales y Métodos.



Como medida del grado de dependencia de la proteína quinasa por el cAMP se define un parámetro "r" que es el cociente de la actividad medida en ausencia de cAMP respecto de la actividad medida en presencia de cAMP. Una proteína quinasa muy dependiente de cAMP da en general un "r" del orden de 0,1, mientras que una proteína quinasa independiente da un "r" de 1. En todas nuestras preparaciones, en las etapas 3 ó 4 de purificación, la proteína quinasa presentó un "r" entre 0,1 y 0,2.

Curva de tiempo, histona, ATP y Mg⁺⁺

En la figura 7 (a-d) se ven los gráficos de actividad de proteína quinasa en función del tiempo, de la concentración de histona, de la concentración de ATP y de la de Mg⁺⁺, respectivamente. Todas estas determinaciones se hicieron con la fracción 4 de purificación.

De la curva de tiempo (figura 7-a) se ve que la reacción es casi lineal por lo menos hasta los 30 min. y que el "r" no varía a lo largo del tiempo.

De las curvas de histona (figura 7-b), ATP (figura 7-c) y Mg⁺⁺ (figura 7-d) se calcularon K_m aproximadas de 0,2 mg/ml, 15 μM y 5 mM respectivamente. Estos valores, junto con el de la A_{0,5} para el cAMP se asemejan a los descriptos en la literatura para proteínas quinasas dependientes de cAMP de otras especies (101, 123-127).

Especificidad de sustrato

En la tabla V se muestra la actividad de proteína quinasa utilizando diferentes sustratos proteicos. En forma similar a lo que ocurre con otras proteínas quinasas dependientes de cAMP (125,128,129), los

Figura 7 - Curvas de tiempo, histona, ATP y Mg^{++} de la proteína quinasa dependiente de cAMP. En todos los casos se utilizaron 8-10 μg de preparación enzimática (fracción 4 de purificación) para cada ensayo. Excepto el parámetro variable en cada caso, las condiciones del ensayo fueron: 10 min de incubación, cAMP 1 μM , ATP 0,1 mM, histona 1,5 mg/ml y acetato de magnesio 10 mM.

.....
.....
.....
.....

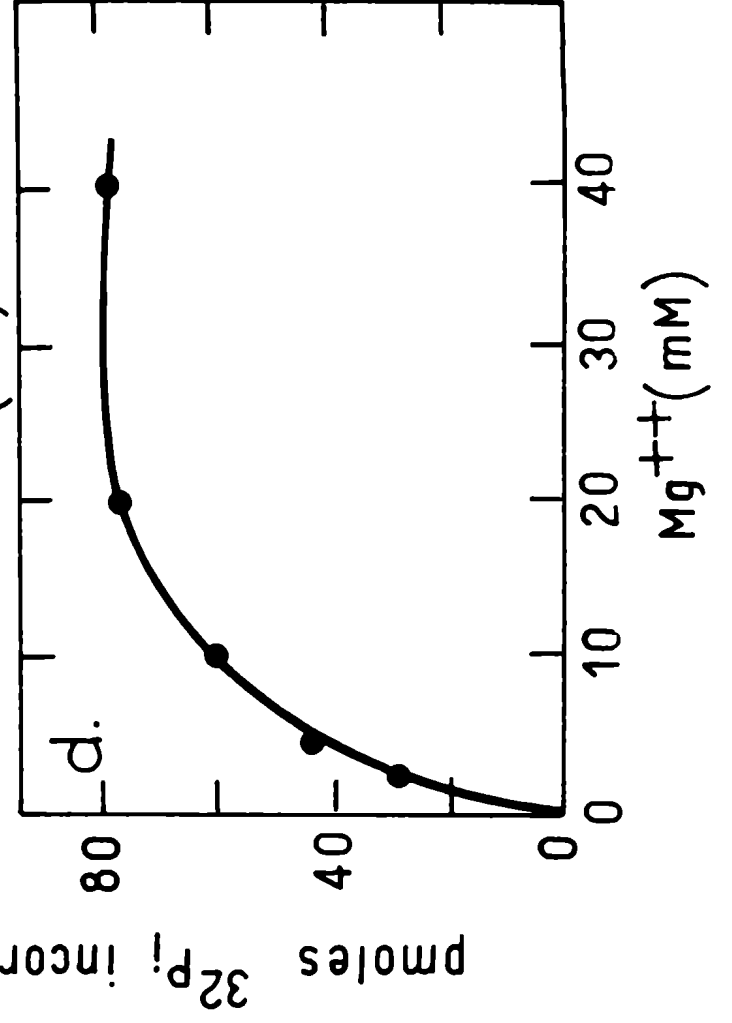
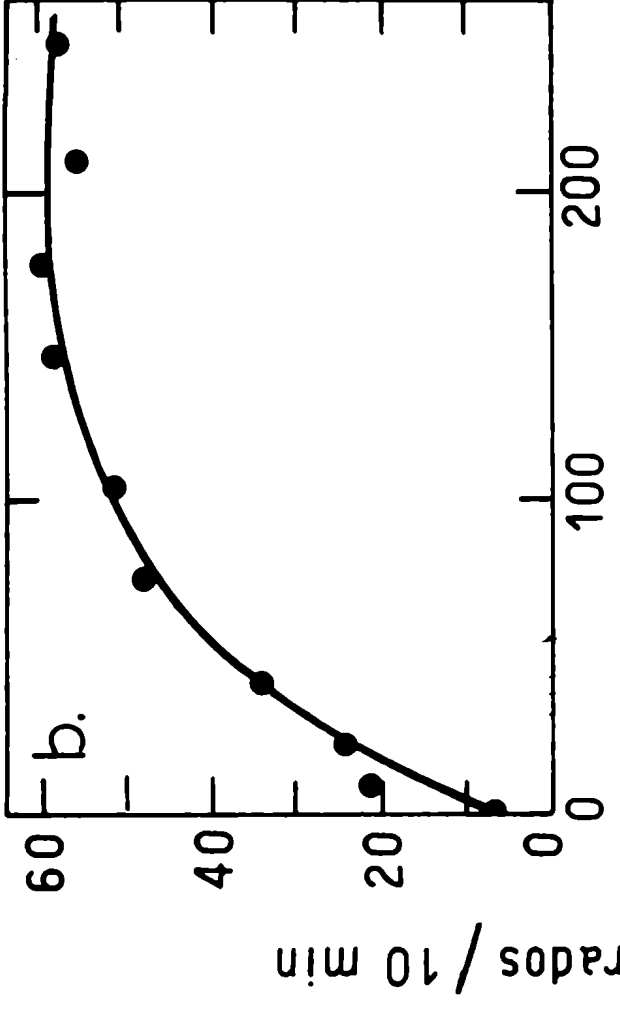
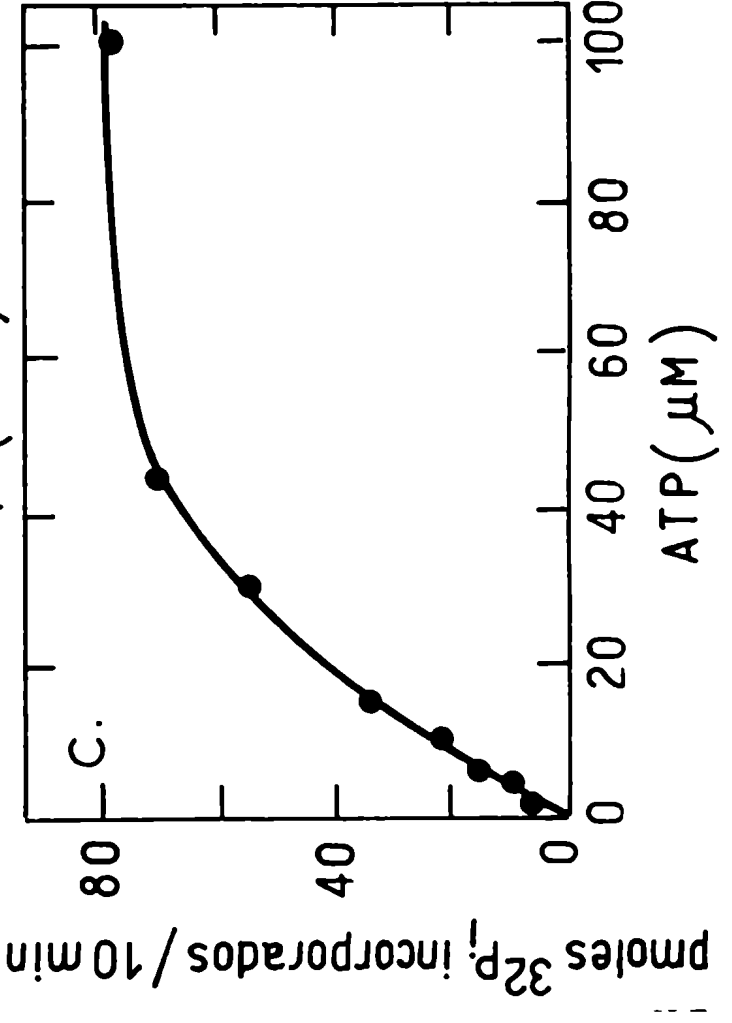
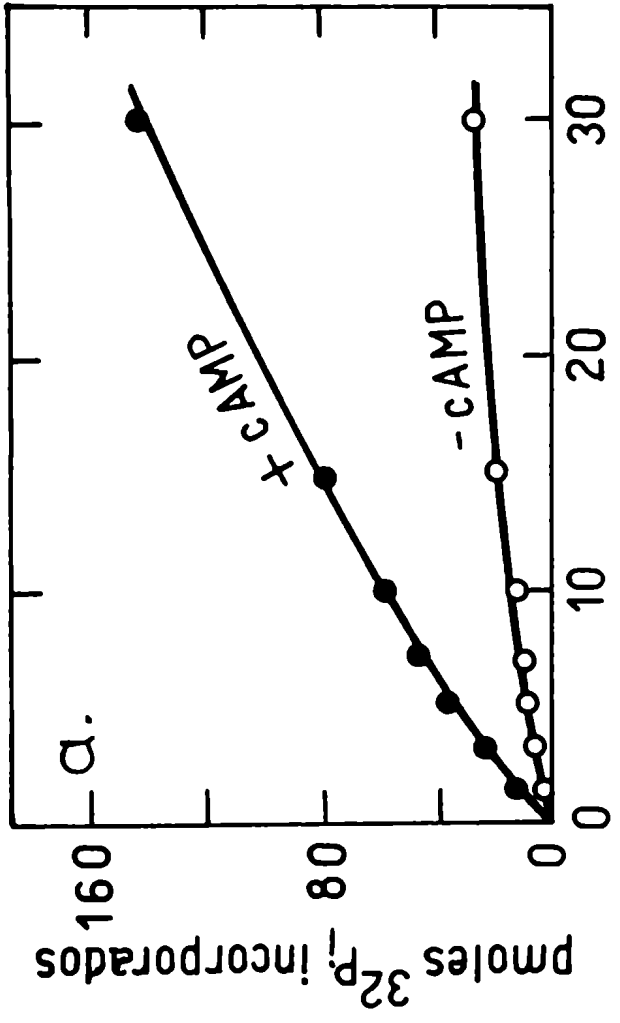


TABLA V
 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO^a

Sustrato (1,5 mg/ml)	pmoles de ³² P incorporados/10'	
	-cAMP	+1 μ M cAMP
histona	8,7	49,1
caseína	1,3	5,7
protamina	9,8	50,7
albúmina	1,3	1,9
fosvitina	0	0

^aLos ensayos fueron realizados con 18 μ g de proteína quinasa, en la etapa 3 de purificación. A cada valor se le restó el valor correspondiente a la incorporación endógena.

sustratos preferenciales son las dos proteínas básicas, histona y protamina. Las proteínas quinasas independientes de cAMP prefieren en general los sustratos ácidos, caseína y fosvitina.

El fosfato incorporado a la histona es totalmente hidrolizado en condiciones alcalinas suaves (1 hora a 37°C en HOK 1 N) indicando que el fosfato está unido a la proteína por una unión éster, como corresponde a la incorporación mediada por proteínas quinasas.

Inactivación térmica

Se sometieron varias alícuotas de proteína quinasa (fracción 3) a distintas temperaturas: 20 - 30 - 40 - 50 y 60°C durante un tiempo fijo de 4 minutos. Las muestras fueron pasadas inmediatamente a un baño de hielo y se ensayaron las actividades de proteína quinasa y de capacidad receptora de cAMP. Un control fue mantenido a 0°C todo el tiempo. Se observó que hasta 40°C ambas actividades se mantenían en un valor igual al del control y que a los 50°C se ha perdido el 90% de ambas.

Retención en filtros de Millipore

Se filtró una alícuota de una preparación de proteína quinasa (fracción 3) a través de un filtro de Millipore (HA) y en el percolado se ensayaron las actividades de proteína quinasa y de capacidad receptora de cAMP. Como resultado de experimentos realizados con varias preparaciones se observó que entre el 85-95 % de ambas actividades quedaba retenida en el filtro. Es conocida la propiedad que tiene la proteína receptora de cAMP de Escherichia coli de quedar retenida en filtros de Millipore aún en ausencia del nucleótido cíclico (130).

Inhibición por sales

El ClNa tiene un notable efecto inhibitorio sobre la actividad de proteína quinasa. Como se ve en la figura 8 el efecto inhibitorio sólo se manifiesta sobre la actividad ensayada en presencia de cAMP. Como consecuencia de esta inhibición diferencial, el valor de "r" (- cAMP/+ cAMP) aumenta a medida que aumenta la concentración de ClNa. Hay algunos trabajos en la literatura que mencionan la inhibición de la actividad de proteína quinasa por alta sal (48, 76, 81). Para saber si el efecto era propio del ClNa o era debido exclusivamente al aumento de la fuerza iónica, se ensayó el poder inhibitorio de otras sales: cloruro de potasio y fosfato de potasio. Si se grafica la inhibición en función de la fuerza iónica (datos que no se muestran) se ve que la inhibición por estas dos sales es igual a la producida por el ClNa.

Determinación del Peso Molecular

La determinación del peso molecular aparente de la proteína quinasa dependiente de cAMP se realizó utilizando la técnica de filtración por gel y de sedimentación en gradientes de sacarosa. Para la filtración por gel se utilizó una columna de Sepharosa 6B (1,7 x 65 cm). El perfil de elución de proteína quinasa dependiente de cAMP se muestra en la figura 9-a. Se utilizaron como marcadores ureasa y catalasa. Se calcularon los K_{av} de los marcadores con los cuales se construyó una curva de calibración como se indica en Materiales y Métodos. En esta curva se interpoló el dato del K_{av} para la proteína quinasa, obteniéndose un peso molecular aproximado de 220.000 daltones.

El perfil de sedimentación en gradientes de sacarosa se muestra en la figura 9-b. Tanto en este caso como en el de la filtración

Figura 8 - Inhibición por ClNa de la actividad de proteína quinasa. En todos los ensayos se utilizaron 34 μg de la preparación enzimática (fracción 3 de purificación). Se ensayó la actividad enzimática en presencia (—●—) y en ausencia (—○—) de cAMP 1 μM y de concentraciones variables de ClNa. r (— Δ —) representa el cociente de actividades -cAMP/+cAMP.

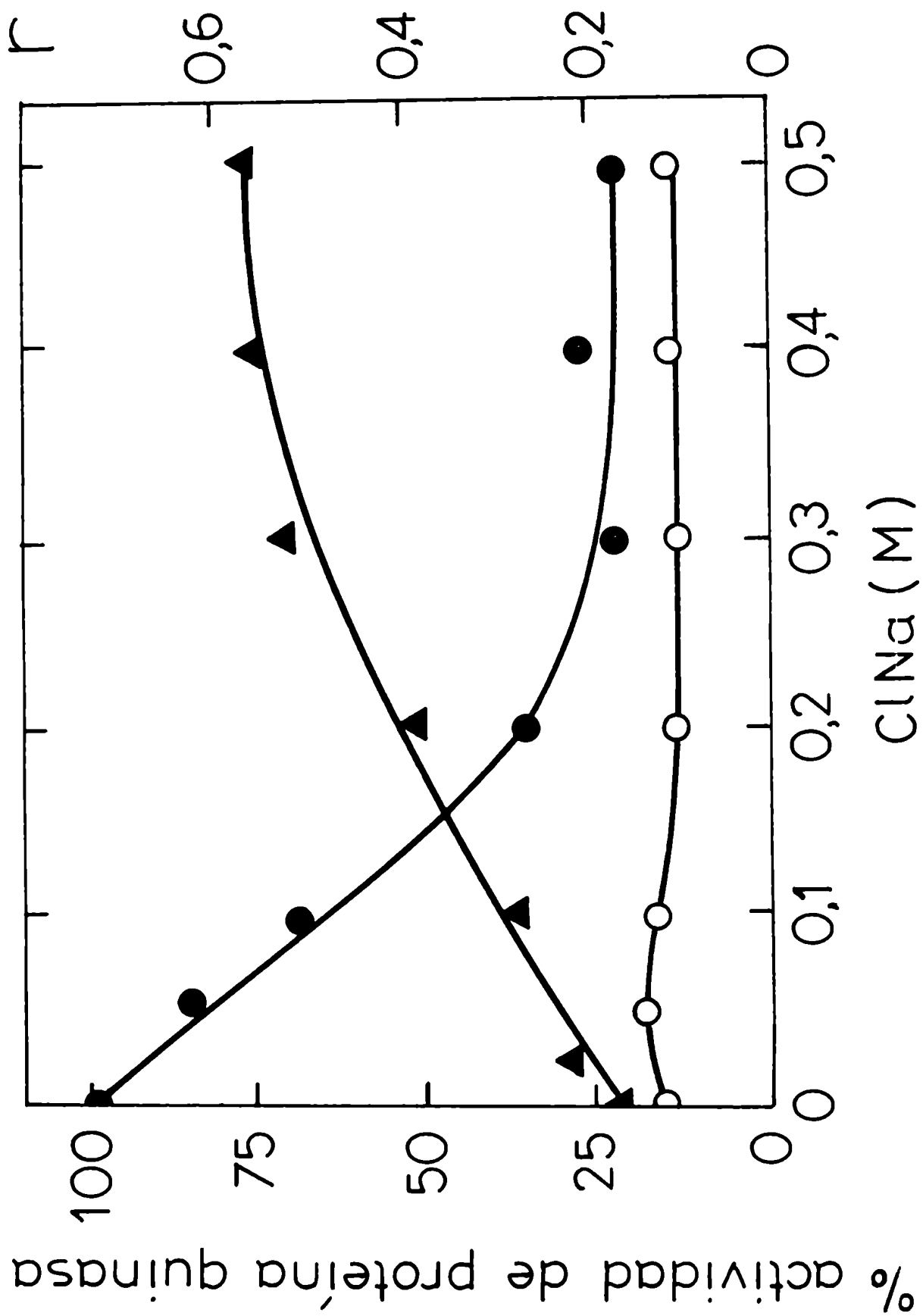
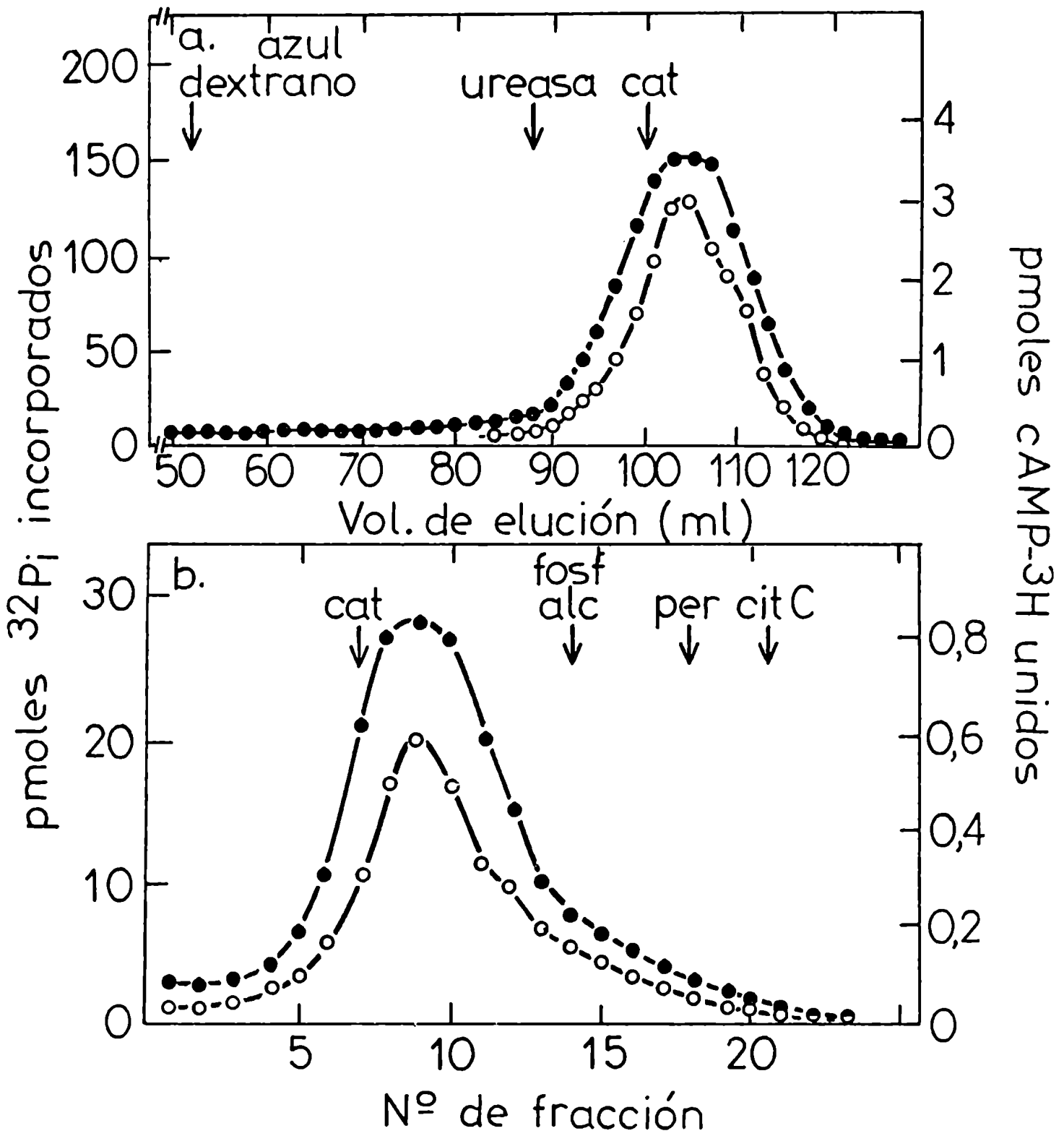


Figura 9 - Cromatografía en Sepharosa 6B y centrifugación en gradientes de sacarosa de la proteína quinasa. a) Se filtraron 8 mg de proteína (fracción 3 de purificación) por una columna de Sepharosa 6B (1,7 x 65 cm) equilibrada con buffer fosfato de potasio 100 mM, EDTA 1 mM, mercaptoetanol 2 mM. Se recogieron fracciones de 1 ml y se ensayó actividad de proteína quinasa en presencia de cAMP en alícuotas de 50 μ l (—●—) y de capacidad receptora de cAMP en alícuotas de 40 μ l (—○—). b) Se sembraron 170 μ g de proteína (fracción 4 de purificación) sobre un gradiente lineal de sacarosa 5-20%, que fue centrifugado y procesado como se indica en Materiales y Métodos. Se ensayó actividad de proteína quinasa en presencia de cAMP en alícuotas de 50 μ l (—●—) y de capacidad receptora de cAMP en alícuotas de 40 μ l (—○—).



por gel se ve que la capacidad receptora de cAMP cocromatografía y cosedimenta con la actividad catalítica de proteína quinasa.

De la comparación de la velocidad de sedimentación de la proteína quinasa con la del marcador catalasa (Ver Materiales y Métodos) surge un peso molecular aparente de 200.000 daltones.

Este peso molecular aproximado está en el orden de los pesos moleculares descritos para proteínas quinasas de otras especies (69,70,83,131).

Envejecimiento de la proteína quinasa

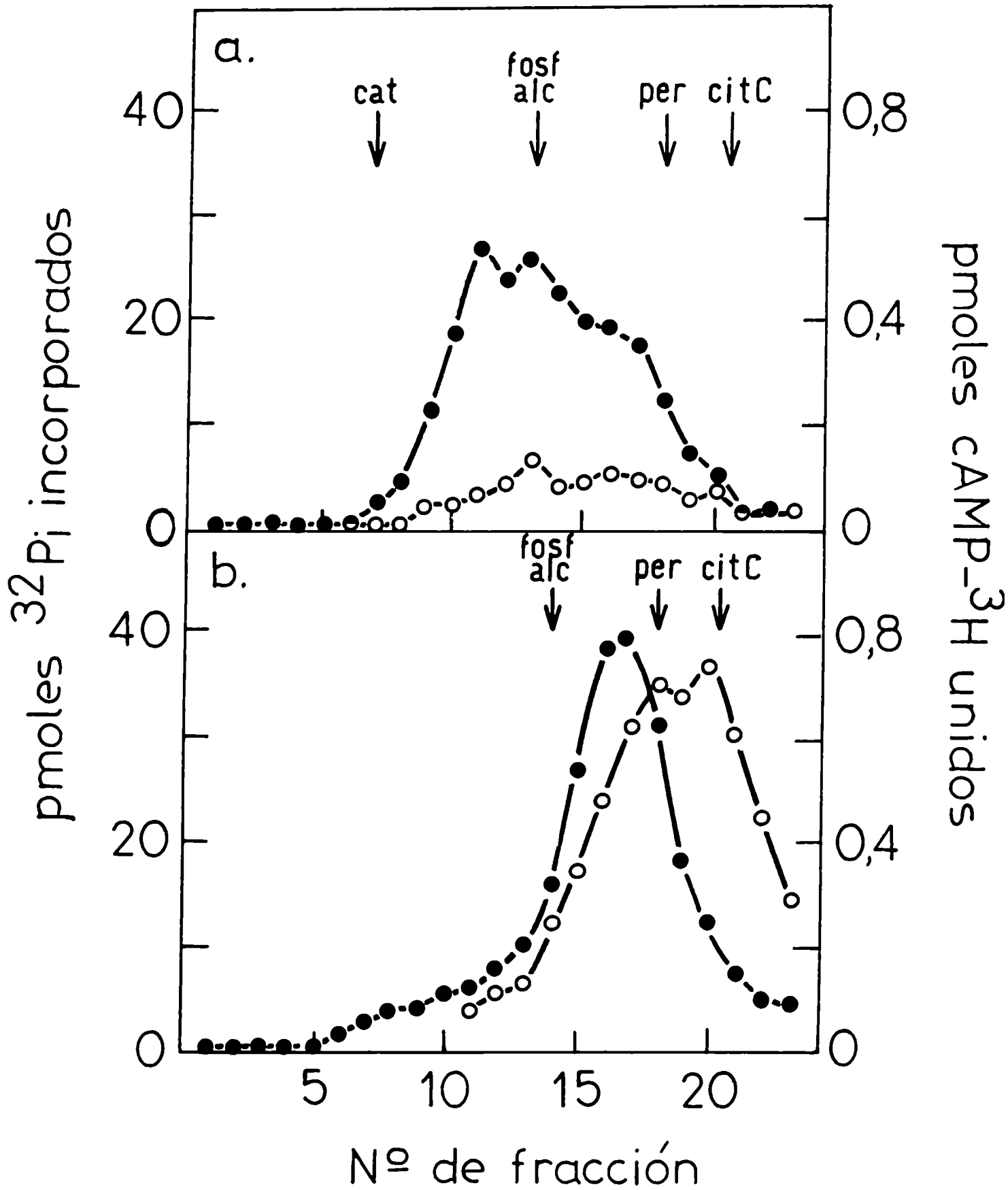
Se observó que al dejar la preparación enzimática (fracción 3) a 0°C por varios días se iba alterando paulatinamente el perfil de sedimentación en gradientes de sacarosa, haciéndose primero polidisperso, y tendiendo luego a una forma de coeficiente de sedimentación definido, como se ve en las figuras 10-a y b. La forma de menor coeficiente de sedimentación, sedimenta en una zona del gradiente intermedia entre la peroxidasa y la fosfatasa alcalina. Esta forma de la enzima sigue teniendo actividad receptora de cAMP y actividad catalítica, y aún sigue manteniendo la dependencia de la actividad con el cAMP, encontrándose con esta preparación valores de "r" entre 0,1-0,2. Es probable que lo holoenzima se haya dissociado a una forma que pudiera ser RC. Los datos de disociación en subunidades de la enzima envejecida, que se verán más adelante, dan un poco más de solidez a esta suposición.

ESTRUCTURA POLIMERICA DE LA PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE cAMP

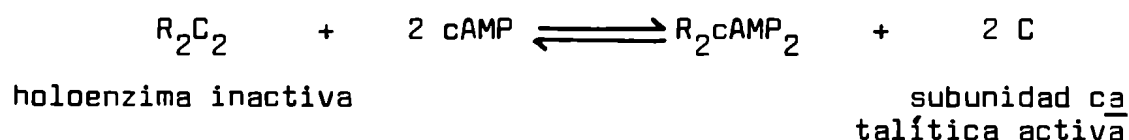
Efecto de cAMP

Tal como se dijo en la introducción, las proteínas quinasas

Figura 10 - Envejecimiento de la proteína quinasa. 200 μg de preparación enzimática (fracción 3 de purificación) con distinto grado de envejecimiento (a-15 días y b-30 días) se sembraron en gradientes de sacarosa 5-20%. Luego de 16 hs de centrifugación, los gradientes fueron procesados como se indica en Materiales y Métodos. La actividad enzimática fue ensayada en presencia de cAMP en alícuotas de 50 μl (—•—) y la capacidad receptora de cAMP en alícuotas de 40 μl (—◦—).



se disocian por acción del cAMP según el siguiente esquema (69,70,83, 131)



R: subunidad regulatoria; C: subunidad catalítica

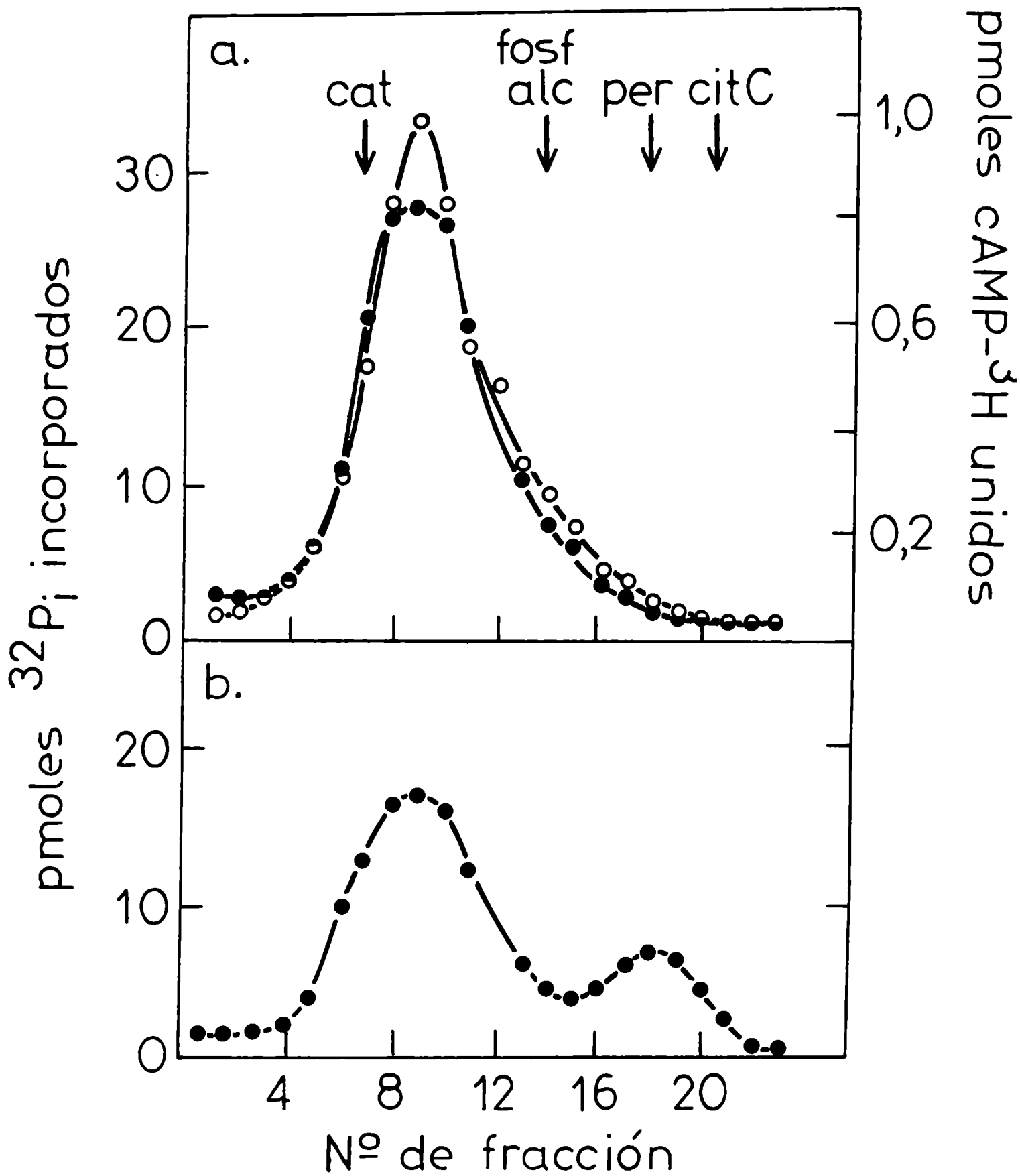
El estado disociado se puede visualizar en un gradiente de sacarosa que separa la holoenzima de la proteína receptora unida al cAMP y de la subunidad catalítica.

En la figura 11-a se ve el perfil de actividad de proteína quinasa y proteína receptora de cAMP en un gradiente de sacarosa de 5-20 % en el cual se sembró una alícuota de la holoenzima preincubada con cAMP-(³H) 1 μM 10 min a 30°C. La concentración de cAMP-(³H) se mantuvo en 0,13 μM en todo el gradiente. Se ve que la holoenzima sedimenta en la misma posición a la que lo hace una alícuota no preincubada (figura 9-b).

La recuperación de actividad receptora de cAMP en el gradiente 11-a es mayor que en el de la figura 9-b. Las condiciones de incubación son bastante diferentes. Mientras que las fracciones del gradiente 9-b se incubaron durante 5 minutos a 30°C en presencia de 200 nM de cAMP-(³H), las fracciones del gradiente 11-a provienen de una preparación incubada durante 5 minutos a 30°C con 1 μM de cAMP-(³H) y luego centrifugadas 16 horas en un gradiente que contenía 0,12 μM cAMP-(³H). (Es probable que en las condiciones clásicas del ensayo no se haya llegado al equilibrio).

Se realizó otro gradiente en las mismas condiciones que el 11-a pero omitiendo el cAMP-(³H) del gradiente. El perfil de proteína

Figura 11 - Centrifugación en gradientes de sacarosa de la proteína quinasa preincubada con cAMP. En los dos gradientes de sacarosa de 5-20 % se sembraron 170 μg de proteína (fracción 4 de purificación) preincubados en un volumen final de 200 μl durante 5 min a 30°C. Los gradientes fueron centrifugados y procesados como se indica en Materiales y Métodos. a) cAMP-(^3H) 1 μM en la preincubación y cAMP-(^3H) 0,12 μM en el gradiente; b) cAMP 0,1 mM en la preincubación y en el gradiente. La actividad enzimática fue ensayada en presencia de cAMP en alícuotas de 50 μl (—•—). En el gradiente a) la actividad receptora de cAMP fue ensayada por filtración directa de una alícuota de 40 μl (—○—).



quinasa (que no se muestra) es exactamente igual al de la figura 11-a. La única diferencia importante reside en que si se filtra directamente una alícuota de cada fracción del gradiente, ya no se encuentra cAMP-^(3H) asociado a la proteína quinasa. Si en cambio, a una alícuota de cada fracción se le ensaya actividad receptora de cAMP se encuentra un pico que reproduce el perfil del control 9-b, demostrando que aún se conserva la capacidad receptora.

De estos gradientes surgen tres conclusiones muy importantes:

- 1) La proteína quinasa de Mucor no es capaz de ser disociada por concentraciones de cAMP más que suficientes para disociar las proteínas quinasas de tejidos superiores (83,131), a pesar que cAMP 1 μ M produce la máxima estimulación en el ensayo de fosforilación.
- 2) La holoenzima es capaz de unir cAMP sin necesidad de disociarse.
- 3) El cAMP se une a la holoenzima muy débilmente pues se separa de ella cuando en el gradiente no se mantiene 0,12 μ M de cAMP-^(3H).

Sería interesante poder saber si la holoenzima con el cAMP-^(3H) unido ya está totalmente activada, pero como surge de los resultados anteriores es prácticamente imposible separar esta especie del exceso de cAMP libre. Con cualquiera de los métodos clásicos que se intentara separarlos (diálisis, filtración por Sephadex) también se perdería el cAMP unido.

En la figura 11-b se observa el perfil obtenido cuando se incubó una alícuota de la preparación enzimática durante 5 minutos a 30°C con cAMP 0,1 mM y se mantuvo esta concentración de cAMP en todo el gradiente. Se observa un 25 % de disociación, con una recuperación de la

actividad de proteína quinasa de 60 %. Si esta baja recuperación se debe a la inactivación de la subunidad catalítica, entonces el porcentaje real de disociación sería un poco mayor. En aquellos casos en los que no hubo disociación (fig. 9-b y 11-a) la recuperación de actividad catalítica fué prácticamente total.

En un experimento similar al mostrado en la figura 11-b pero en el cual la concentración de cAMP se elevó a 0,3 mM, el perfil de actividad obtenido mostró que aún en estas condiciones, la disociación no fué total.

Acción del ATP-Mg⁺⁺

Se ha descrito para la proteína quinasa tipo II de corazón bovino que el complejo ATP-Mg⁺⁺ facilita la disociación de la enzima por el cAMP (132). Debido a ello, y a que en nuestro sistema el cAMP, aún a concentraciones muy altas, no era capaz de producir disociación, se ensayó el efecto del ATP-Mg⁺⁺ como agente disociante sobre nuestro sistema enzimático.

Se preincubó una alícuota de la enzima durante 10 minutos a 30°C en presencia de ATP 0,1 mM, acetato de magnesio 10 mM y cAMP-(³H) 1 μM. Se analizó la estructura polimérica de la enzima preincubada en un gradiente de sacarosa con cAMP-(³H) 0,1 μM. El resultado obtenido (no se muestra) indicó que la enzima no se disoció en estas condiciones.

Influencia de la histona y/o del ClNa sobre la disociación de la proteína quinasa por el cAMP

Ya que concentraciones fisiológicas de cAMP producen la máxima estimulación pero no disociación de la proteína quinasa, se quiso

probar si algún otro componente de la mezcla de incubación participaba en la disociación.

Está descrito por varios autores que las proteínas básicas y el ClNa producen disociación de las proteínas quinasas de tipo I aún en ausencia de cAMP (71,72,81,83). Se ensayó en nuestro sistema qué efecto tenían estos compuestos sobre el estado polimérico de la enzima, el cual se evidenciaría en un cambio en el valor de "r". Los resultados están resumidos en la Tabla VI. De los experimentos 1, 2 y 3 surge que la preincubación de la proteína quinasa con histona o con ClNa no afecta el valor de "r". Por lo tanto, la proteína quinasa no se activó por la preincubación en esas condiciones.

En el experimento 5 se incubó una alícuota de proteína quinasa en las condiciones del ensayo standard con cAMP 0,2 μ M y ATP no radiactivo 0,1 mM. En estas condiciones, se produce máxima activación de la enzima. Sin embargo, al tomar una alícuota de este preincubado y ensayarle su actividad en ausencia y presencia de cAMP en la mezcla standard, no se obtuvo un "r" de 1 sino de 0,55. Este valor de "r" hay que compararlo con el del experimento 4 en el cual se tuvo en cuenta la activación producida en el ensayo por 10 nM de cAMP, que es la concentración de arrastre del cAMP en las condiciones del experimento 5.

Este valor de "r" de 0,55 evidentemente indica que apenas se diluyó la enzima en una solución en la que la concentración de cAMP estaba muy disminuída se produjo una desactivación (reasociación?) de la proteína quinasa.

La incubación de la preparación de proteína quinasa con 0,7 mg/ml de histona, ya sea en presencia o en ausencia de cAMP, trae apa-

TABLA VI
EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES SOBRE LA DISOCIACION DE LA
PROTEINA QUINASA^a

Exp.	Agregados a la preincubación	Actividad de proteína quinasa ^b		r
		-cAMP	+cAMP	
1	-	7,6	63,6	0,12
2	0,5 M ClNa	8,1	62,1	0,13
3	0,7 mg/ml histona	7,9	62,6	0,12
4	-	14,1 ^c	64,1	0,22
5	condiciones similares a las del ensayo standard (0,2 μ M cAMP)	32,7	59,4	0,55

^aEn cada experimento se preincubó una alícuota de 850 μ g de proteína (fracción 3 de purificación) en un volumen final de 100 μ l con los agregados que se indican en cada caso. Luego de 5 min a 30°C se ensayó, en alícuotas de 5 μ l, actividad de proteína quinasa en las condiciones standard (-/+ cAMP). En el experimento 5, los agregados fueron los mismos que los de la mezcla de incubación standard, excepción hecha de la concentración de cAMP que fué de 0,2 μ M y del ATP que no era radiactivo. Los valores son los promedios hechos con triplicados del mismo experimento.

^bExpresado como pmoles de ³²P incorporados en 10 min. En el experimento 5 la actividad se corrigió por la dilución de la actividad específica del ATP introducida por el ATP no radiactivo de la preincubación.

^cEste ensayo se realizó en presencia de 10nM cAMP para que sirviera como control del experimento 5.

rejada la formación de un precipitado. En este precipitado resuspendido se pudo medir capacidad receptora de cAMP y actividad de proteína quinasa. Cuando la incubación se hizo en ausencia de cAMP, el precipitado llevaba el 70 % de ambas actividades. Por agregado de más histona, es mayor la actividad asociada al precipitado. En cambio, cuando la incubación con histona se hizo en presencia de cAMP, el sobrenadante llevaba el 40 % de la actividad de proteína quinasa y 10 % de la actividad receptora de cAMP. La precipitación en este caso parece ser diferencial, pues no se acompañan ambas actividades, lo cual indicaría que hubo cierto grado de disociación.

Cuando se analizó en un gradiente de sacarosa, el sobrenadante obtenido después de preincubar la preparación enzimática con histona 0,7 mg/ml y cAMP 1 μ M y separar el precipitado, se obtuvo el perfil de la figura 12-a. La actividad receptora de cAMP no se pudo detectar pues era muy poca la actividad que quedó soluble y el método de ensayo de unión de cAMP no permite mayor sensibilización. En cambio sí se pudo medir la actividad catalítica, pues a la vez que quedó más actividad en el sobrenadante se pudo sensibilizar el ensayo aumentando la actividad específica del ATP $\left[\gamma -^{32}\text{P} \right]$ y el tiempo de incubación. El perfil que se obtuvo, como se ve en la figura, indica disociación total. Hay que hacer la salvedad que esta conclusión es válida sólo para la actividad soluble; no se puede decir nada sobre la actividad precipitada. Evidentemente, si el cAMP está presente junto con el sustrato de la proteína quinasa hay disociación, al menos parcial.

Cuando la preincubación de proteína quinasa con histona y cAMP se realizó en presencia de ClNa 0,5 M no se formó precipitado. La

Figura 12 - Centrifugación en gradientes de sacarosa de la proteína quinasa preincubada en diversas condiciones. En los cuatro gradientes se sembraron 170 μg de preparación enzimática (fracción 4 de purificación) preincubados en un volumen final de 200 μl durante 5 min a 30°C en las condiciones indicadas en cada caso. a) 0,75 mg/ml de histona y cAMP-(^3H) 1 μM en la preincubación y cAMP-(^3H) 0,12 μM en el gradiente; b) cAMP-(^3H) 1 μM y ClNa 0,5 M en la preincubación y cAMP (^3H) 0,12 μM y ClNa 0,5 M en el gradiente; c) cAMP-(^3H) 1 μM , ClNa 0,5 M en la preincubación, ClNa 0,5 M en el gradiente; d) cAMP-(^3H) 1 μM , ClNa 0,5 M en la preincubación, cAMP-(^3H) 0,12 μM en el gradiente. La actividad enzimática fue ensayada en presencia de cAMP en alícuotas de 50 μl (—•—) en todos los gradientes. La actividad receptora de cAMP fue ensayada en alícuotas de 40 μl por filtración directa en el caso de los gradientes a,b y d y por incubación en el caso del gradiente c (—o—).

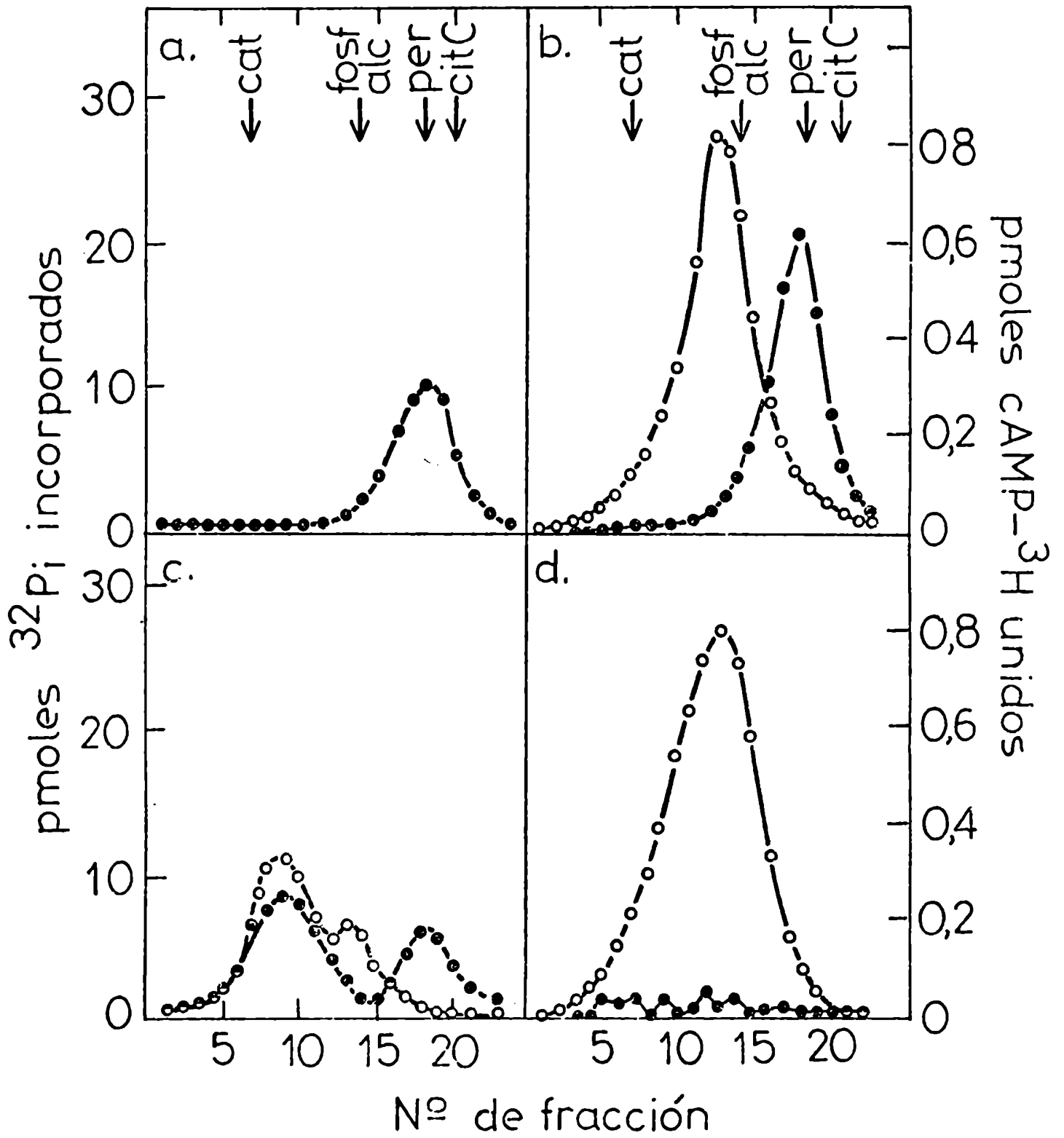


figura 12-b muestra el perfil obtenido cuando se corrió una alícuota de la enzima preincubada en estas condiciones en un gradiente de sacarosa en el cual se mantuvo la concentración de ClNa en 0,5 M, la de histona en 0,7 mg/ml y la de cAMP-(³H) en 0,12 μ M. Se obtuvo exactamente el mismo perfil si se omitía la histona en la preincubación y en el gradiente. De estos resultados se deduce que basta la presencia de ClNa junto con cAMP para producir disociación total.

La comparación del gradiente 12-b con el 11-a ponen de manifiesto el papel del ClNa en la disociación por cAMP. En ambos gradientes se sembró la misma cantidad de actividad enzimática preincubada con cAMP-(³H) 1 μ M. Mientras que en el gradiente de la figura 11-a no se detecta disociación, en el de la figura 12-b la disociación es total.

Para poder medir la independencia de cAMP de la subunidad catalítica activa se centrifugó una alícuota de la enzima en un gradiente similar al de la figura 12-b (sin histona) durante 40 horas a 97.000 x g, de modo que la separación entre las subunidades regulatorias y catalítica fuera total. Se juntaron las fracciones con actividad enzimática, se dializaron exhaustivamente contra ClNa 0,5 M en buffer B, y en el dializado se midió el coeficiente "r" de actividad, obteniéndose un valor próximo a 1. Este valor refleja la independencia de cAMP. Si la diálisis se hace en ausencia de ClNa, la actividad catalítica se pierde completamente. En los experimentos que se muestran más adelante y en la Tabla VII, se demuestra la función protectora del ClNa.

De los gradientes que se muestran en las figuras 12-c y 12-d se deducen cuáles son los requisitos mínimos para mantener la enzima en su estado disociado. En todos los casos se sembró en los gradientes la

holoenzima preincubada con cAMP $1 \mu\text{M}$ y ClNa $0,5 \text{ M}$. O sea que se estaban sembrando las especies disociadas, según lo refleja la figura 12-b. En el experimento que se muestra en la figura 12-c, se omitió el cAMP del gradiente. El perfil resultante es de reasociación parcial. De la comparación de los gradientes de las figuras 12-b y 12-c se hace evidente la necesidad del cAMP para mantener las subunidades disociadas.

Cuando en el gradiente se sembró la enzima disociada, pero se disminuyó la concentración de ClNa a $0,15 \text{ M}$ y la de cAMP se mantuvo en $0,1 \mu\text{M}$, el perfil obtenido es idéntico al de la figura 12-c, o sea que es un perfil de reasociación parcial. De estos resultados surge que concentraciones bajas de cAMP ($0,1 \mu\text{M}$) son suficientes para mantener las subunidades disociadas, siempre y cuando haya ClNa a altas concentraciones ($0,5 \text{ M}$).

En el gradiente de la figura 12-d se sembró nuevamente una alícuota de la enzima disociada, con la diferencia que se omitió el ClNa a lo largo del gradiente. El perfil obtenido de proteína receptora de cAMP indica que la posición a la que sedimenta corresponde a la de la subunidad regulatoria disociada (R_2). No se pudo detectar actividad catalítica en ninguna de las fracciones del gradiente. Evidentemente, en ausencia de ClNa, la subunidad catalítica se inactiva. La falta de reasociación puede deberse a que, a la par que la subunidad catalítica se va inactivando, se va separando de la subunidad regulatoria por la centrifugación. Del perfil de este gradiente surge que la actividad de la subunidad catalítica es inestable en ausencia de ClNa.

Este efecto protector del ClNa fué confirmado directamente por los experimentos que se muestran en la Tabla VII, en los cuales se

TABLA VII
EFECTO PROTECTOR DEL ClNa SOBRE LA ACTIVIDAD CATALITICA^a

Tiempo de preincubación (min)	Actividad catalítica	
	preincubada con ClNa (%)	preincubada sin ClNa (%)
0	100	100
30	110	86
60	91	55
120	100	33

^aSe sometieron a condiciones disociantes 50 μ g de preparación enzimática (fracción 3 de purificación), incubándola durante 5 min a 30°C en presencia de cAMP 1 μ M y ClNa 0,5 M en un volumen final de 20 μ l. Una alícuota de 10 μ l se diluyó diez veces en buffer B con cAMP 1 μ M. Otra alícuota igual se diluyó a 100 μ l con buffer B conteniendo cAMP 1 μ M y ClNa 0,5 M. Se dejaron las diluciones a 0°C durante los tiempos indicados en la Tabla. Al finalizar cada período de preincubación se tomaron alícuotas de 20 μ l en las que se ensayó actividad de proteína quinasa en presencia de cAMP. El 100 % de actividad correspondió a 25 pmoles de ³²P_i incorporado en 10 min. La inhibición del ClNa en el ensayo fue de 30 %.

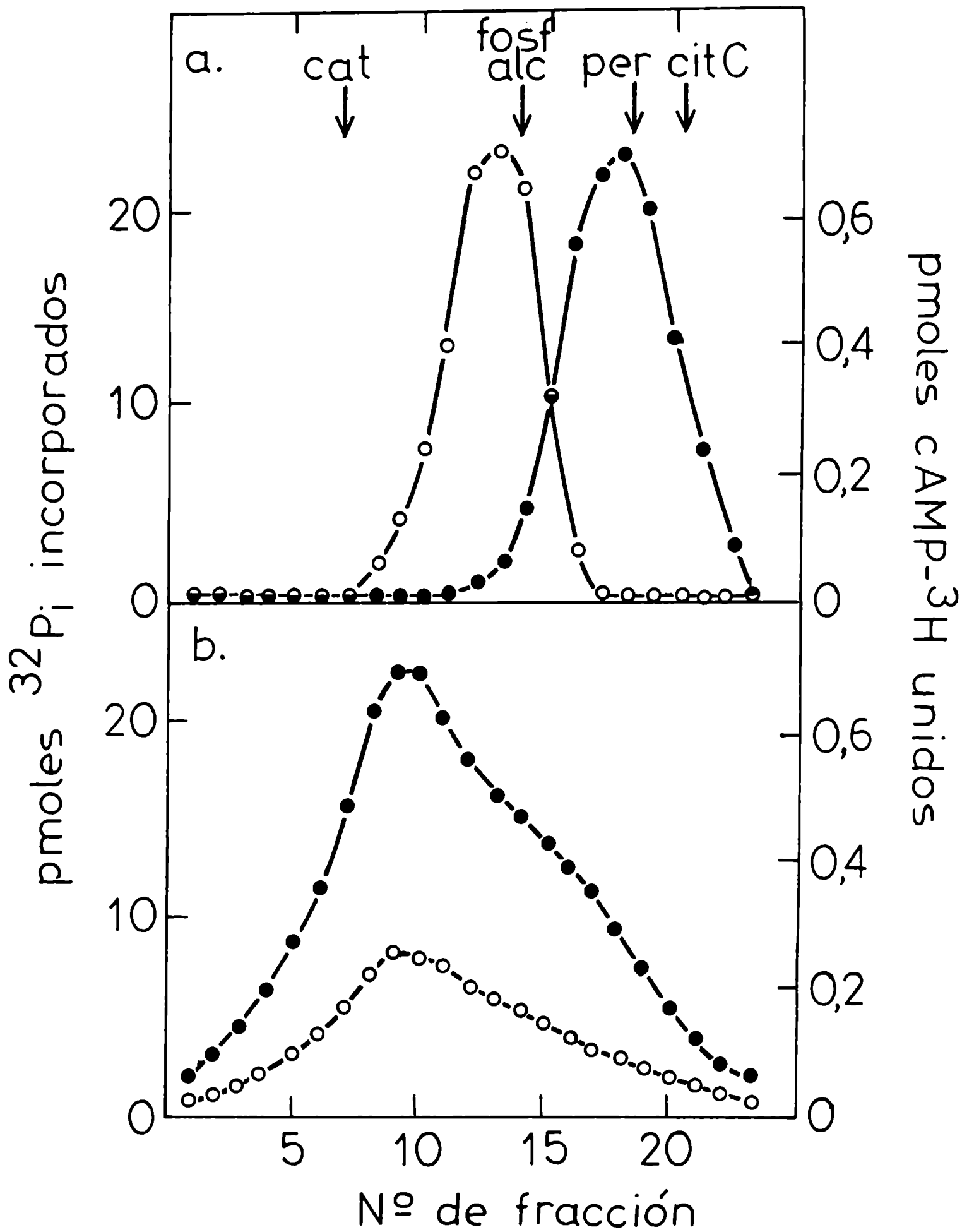
mantuvo la subunidad catalítica hasta un máximo de 2 horas a 0°C en buffer B o en buffer B con ClNa 0,5 M. Se ve que luego de 2 horas a 0°C más del 60 % de la actividad catalítica mantenida en buffer B se perdió, mientras que se conservó totalmente en el buffer con ClNa 0,5 M. Este efecto protector por la alta fuerza iónica ya ha sido descrito por Peters et al (133) para la enzima de corazón bovino.

Reasociación de las subunidades catalíticas y regulatorias

El experimento de la figura 13 fué diseñado para poder demostrar claramente que el proceso de disociación es fácilmente reversible. Para ello, se disoció la proteína quinasa por incubación con cAMP y ClNa. El incubado se dividió en dos alícuotas. Una alícuota se mantuvo a 0°C, mientras que la otra se dializó contra buffer B para eliminar los agentes disociantes y permitir la reasociación. Se analizó el estado polimérico de la enzima en ambas alícuotas por centrifugación en cos gradientes. El que se muestra en la figura 13-a contiene cAMP-(³H) 0,1 µM y ClNa 0,5 M y en él se sembró la alícuota de la enzima disociada. El gradiente que se muestra en la figura 13-b está formado en buffer B sin adiciones y en él se sembró una alícuota de la enzima dializada. En la figura 13-a se ve el perfil clásico de la enzima completamente disociada, y en la figura 13-b se ve un pico ancho con un máximo de la actividad catalítica coincidente con la posición de sedimentación de la holoenzima, indicando que la reasociación fué casi total.

Los experimentos que se muestran en la figura 12-c sugieren que el ClNa es incapaz de evitar la reasociación de las subunidades catalítica y regulatoria. Para poder comprobar este hecho más fehaciente-

Figura 13 - Análisis en gradientes de sacarosa del estado de disociación y reasociación de la proteína quinasa. Se incubó una alícuota de 340 μ g de la preparación enzimática (fracción 4 de purificación) durante 5 min a 30°C en presencia de ClNa 0,5 M y cAMP-(³H) 1 μ M en un volumen final de 0,4 ml. Después de la preincubación, se sembró una alícuota de 0,2 ml sobre un gradiente de sacarosa de 5-20 % en buffer B conteniendo ClNa 0,5 M y cAMP-(³H) 0,1 μ M (a). La otra alícuota de 0,2 ml se dializó 1 hora contra tres cambios de buffer B y se sembró luego sobre un gradiente de sacarosa en buffer B (b). Los gradientes fueron centrifugados y procesados como se indica en Materiales y Métodos. Se ensayó actividad de proteína quinasa en presencia de cAMP en alícuotas de 50 μ l (—●—) y de capacidad receptora de cAMP en alícuotas de 40 μ l (—○—).



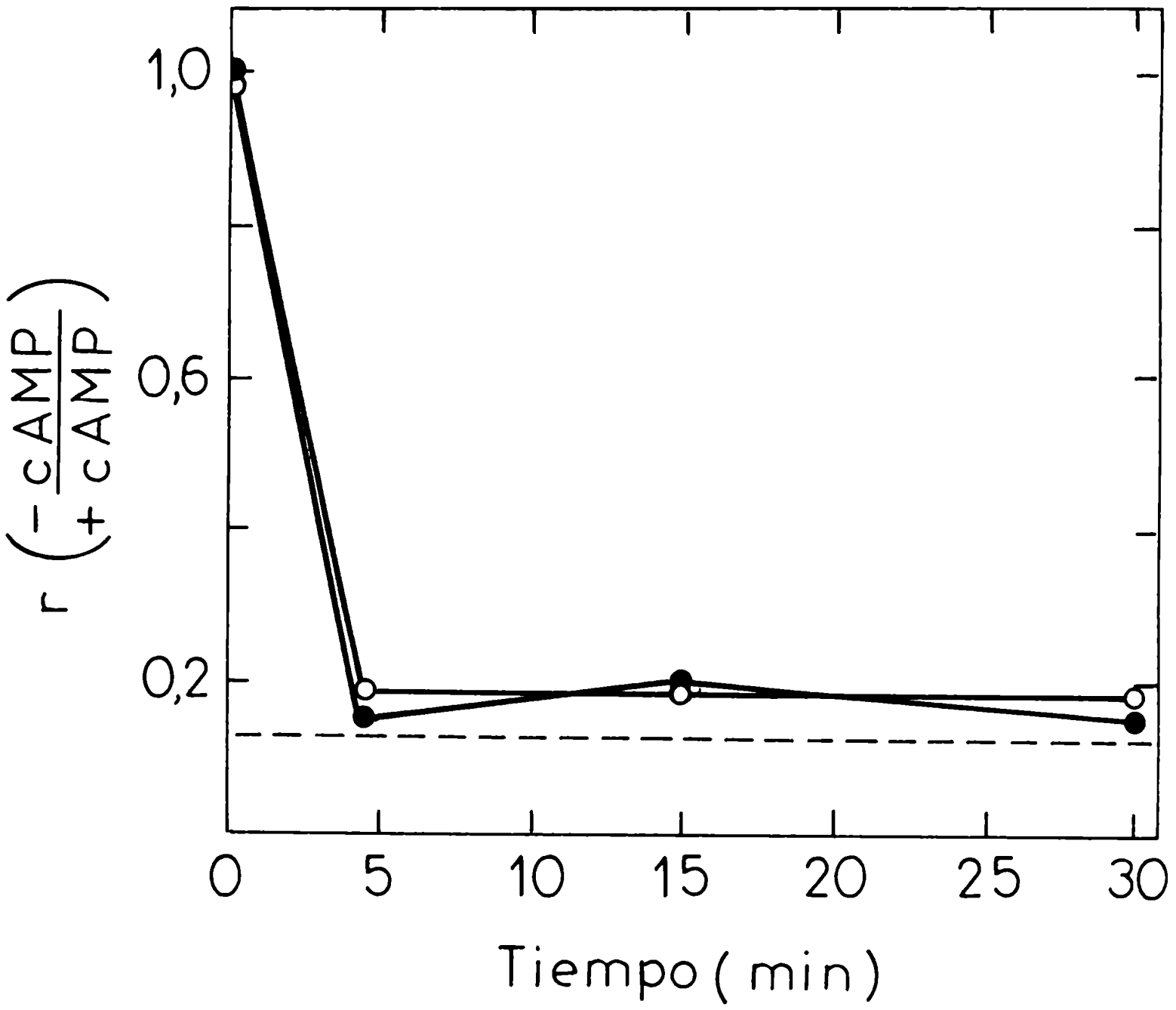
mente, se sometió la preparación enzimática a condiciones disociantes (cAMP $1 \mu\text{M}$, ClNa $0,5 \text{ M}$). Se filtró una alícuota de la preparación pre incubada, por una pequeña columna de Sephadex G-25 equilibrada con ClNa $0,5 \text{ M}$ en buffer B, de modo de eliminar el cAMP. Otra alícuota igual fué filtrada a través de una columna idéntica equilibrada con buffer B sin adiciones de modo de eliminar tanto el cAMP como el ClNa. En los picos de exclusión de ambas columnas se siguió la variación del valor de "r" en función del tiempo después de la cromatografía. Como se ve en la figura 14, luego de eliminar el cAMP (ya sea en presencia o en ausencia de ClNa) hay una reasociación muy rápida de subunidades a O°C, que se evidencia por un valor de "r" muy similar al de la preparación enzimática antes de ser sometida a condiciones disociantes. Para asegurarse que los valores de "r" del pico de exclusión de la columna equilibrada con ClNa representaran la reasociación ocurrida en la etapa de la cromatografía y no durante el ensayo enzimático, se mantuvo ex-profeso la concentración de ClNa en el ensayo en $0,25 \text{ M}$.

Los valores de "r" de la figura 14 indican que la reasociación es casi total. Sin embargo el perfil de la figura 12-c indica reasociación parcial. Esta discrepancia puede explicarse por diferencias en las técnicas de análisis. En la filtración por Sephadex G-25 el cAMP es eliminado del sistema casi inmediatamente, mientras que en las capas superiores del gradiente la concentración de cAMP es quizás lo suficientemente alta de modo de mantener un pequeño grado de disociación.

De los resultados de las figuras 13 y 14 surge que la enzima de Mucor rouxii se asemeja a las proteínas quinasas de tipo II descritas en varios tejidos (83,134) en cuanto a la facilidad y rapidez de

Figura 14 - Efecto del ClNa en la reasociación de las subunidades de la proteína quinasa. 150 μ g de preparación enzimática (fracción 3 de purificación) se disociaron por incubación durante 5 min a 30°C en presencia de cAMP 5 μ M y ClNa 0,5 M, en un volumen final de 200 μ l. Dos alícuotas de 100 μ l se filtraron a través de dos columnas de Sephadex G-25 (0,6 x 19 cm), una equilibrada con buffer B y otra con ClNa 0,5 M en buffer B. El proceso de filtración duró 3 min. A distintos tiempos a 0°C luego de la cromatografía se ensayó actividad de proteína quinasa en 50 μ l del pico de exclusión de las columnas en presencia y en ausencia de cAMP 1 μ M. Los símbolos llenos y vacíos indican actividad enzimática ensayada en los picos de exclusión de las columnas equilibradas con buffer B y buffer B con ClNa 0,5 M respectivamente.

Las actividades totales no cambiaron significativamente durante la in cubación. El valor de r del origen, tomado como 1, es teórico. Los valores con ClNa fueron corregidos por la inhibición producida por la sal. La línea punteada indica el valor r antes de la disociación.



reasociación de sus subunidades. Sin embargo, se diferencia de este tipo de enzimas en cuanto al comportamiento frente al ClNa. Mientras que en Mucor rouxii la alta concentración de sal no mantiene las especies disociadas (fig 12-c y 14), en tejidos superiores el ClNa previene completamente la reasociación (83,134).

Disociación de la proteína quinasa envejecida

Tal como se mencionó anteriormente, cuando una preparación de proteína quinasa (fracción 3 de purificación) se deja envejecer en la heladera, su coeficiente de sedimentación cambia indicando una disminución del peso molecular (figura 10-a). Al preincubar una alícuota de esta preparación con cAMP $1 \mu\text{M}$ y analizar su comportamiento en gradiente de sacarosa (datos que no se muestran), se observó un corrimiento de la actividad receptora de cAMP a una posición intermedia entre la de los marcadores peroxidasa y citocromo C; lo cual indicaría que se trata del monómero R. No se pudo detectar actividad catalítica en ninguna de las fracciones del gradiente, tal como sería de esperar si se tiene en cuenta la inestabilidad de la subunidad catalítica en ausencia de ClNa.

Estos datos, junto con los de la figura 10-a sugieren que la holoenzima tetramérica pasa por envejecimiento a una forma dimérica RC, dependiente de cAMP, la cual se disocia en las subunidades R y C por incubación con el nucleótido cíclico. En este aspecto, el comportamiento del dímero es semejante al de las proteínas quinasas de tejidos superiores.

D I S C U S I O N Y C O N C L U S I O N E S

Se diseñó este estudio con el objeto de dilucidar, al menos parcialmente, el mecanismo de acción del cAMP sobre la morfogénesis del hongo Mucor rouxii.

Las actividades enzimáticas caracterizadas en este trabajo no habían sido descritas anteriormente en ninguna especie de Mucor.

Se encontraron dos tipos de proteínas quinasas: independientes y dependientes de cAMP. Como se puede observar en la Tabla I, en la forma filamentosa del hongo, el 70 % de la actividad de proteína quinasa está asociada a la fracción particulada que sedimenta a 2.000 x g. En la forma levaduriforme (Tabla II), este mismo valor de 70 % se reparte en las dos fracciones particuladas: la que sedimenta a 2.000 x g y la que lo hace a 100.000 x g (35% en cada fracción). Esta diferencia se debe muy probablemente a que en la forma levaduriforme hay una buena proporción de membranas que se separan de la pared celular y sedimentan a 100.000 x g. Estas proteínas quinasas utilizan preferencialmente caseína como sustrato exógeno.

El 30 % de la actividad restante de proteína quinasa independiente de cAMP es soluble.

Sólo se encontró actividad de proteína quinasa dependiente de cAMP en la fracción soluble de ambas formas del hongo. Estas proteínas quinasas utilizan preferentemente proteínas básicas como sustrato exógeno: protamina o histona (Tabla V).

Las preparaciones solubles (S_{100}) sin purificar contienen suficiente sustrato (s) endógeno como para detectar actividad enzimática sin el agregado de proteína. Sin embargo, la adición de protamina o his

tona es capaz de estimular varias veces esta actividad endógena. La activación de la proteína quinasa por el agregado de cAMP se observa en presencia o en ausencia de sustrato exógeno, por lo cual se piensa que se trata de la misma actividad enzimática.

Trabajos previos sobre la distribución subcelular de la proteína receptora de cAMP (122) indican que alrededor del 90 % de esta actividad es soluble. Estos datos están de acuerdo con que sólo se encontró actividad de proteína quinasa dependiente de cAMP en la fracción S_{100} , ya que la dependencia por el nucleótido cíclico es justamente a través de su proteína receptora. Por lo tanto, todos los estudios realizados para caracterizar esta enzima fueron realizados a partir de esta fracción.

El análisis cromatográfico en columnas de DEAE-celulosa de la fracción soluble obtenida a partir de células levaduriformes muestra la existencia de dos picos de actividad de caseína quinasa; uno que eluye con el lavado y otro que lo hace a baja fuerza iónica, ambos independientes de cAMP; y un pico de histona quinasa, que eluye a 0,17 M de sal, dependiente de cAMP y cuya posición coincide con la de la actividad receptora de este nucleótido (fig. 2).

No era la finalidad principal de este trabajo estudiar las proteínas quinasas independientes de cAMP. Interesó ver cuántas había y que propiedades tenían con el solo fin de separarlas de la proteína quinasa dependiente de cAMP, objeto de este estudio.

Con este fin se realizó una caracterización parcial de los dos picos de caseína quinasa. Se piensa que son dos especies diferentes, puesto que después de recromatografía en DEAE-celulosa cada uno eluye

en su posición original. La caseína quinasa I (fig. 2) es similar en sus propiedades cinéticas a la proteína quinasa independiente de cAMP aislada de levadura de panadería (135).

Un perfil como el mostrado en la figura 2, sumamente reproducible, es típico de un extracto de células levaduriformes. En cambio, los perfiles obtenidos con extractos miceliares son variables en cuanto a la actividad de histona quinasa. A veces se obtienen perfiles similares a los de la figura 2 y otras, perfiles en los cuales toda la actividad de histona quinasa eluye a fuerza iónica considerablemente menor (fig. 3). El origen de esta actividad de proteína quinasa que eluye a baja fuerza iónica y es sumamente inestable, no se siguió investigando. Por lo tanto no se sabe si se origina de la actividad que eluye a alta fuerza iónica. Sin embargo, hay que recalcar que esta especie inestable nunca apareció en extractos de células levaduriformes, ya sea que se trabajara con células recién cosechadas o guardadas a -70°C.

Cuando a partir de los extractos de micelio se obtiene la especie de proteína quinasa que eluye a alta fuerza iónica, ésta se comporta, en cuanto a todas las propiedades estudiadas, igual a la especie obtenida de células levaduriformes.

De aquí en más se decidió utilizar la forma levaduriforme del hongo como fuente de enzima para el estudio y la caracterización de la proteína quinasa dependiente de cAMP.

En la tabla III se resume el esquema de purificación parcial de esta enzima. Si bien la purificación no es grande (25 veces) y el rendimiento es bajo (16 %), esta preparación está libre de otras activiu

dades de proteína quinasa así como de subunidades regulatoria y catalítica libres.

Los parámetros cinéticos estudiados con la proteína quinasa así purificada son muy similares a los descritos para otras proteínas quinasas (101, 123-127).: $A_{0,5}$ para cAMP 30 nM, K_m para histona 0,2 mg/ml, K_m para ATP 15 μ M., K_m para Mg^{++} 5 mM. (fig. 6 y 7).

Luego de la caracterización cinética de la enzima, se centró el estudio en el análisis de la estructura polimérica de la misma, y en el hallazgo de las condiciones necesarias para su disociación, pues esta enzima sólo es activa cuando la subunidad catalítica se separa de la subunidad regulatoria.

Este análisis resultó bastante arduo debido a que, como se discutirá más adelante, el modo de disociación de la proteína quinasa de Mucor no se ajusta al esquema de disociación descrito en la literatura para las proteínas quinasas de tipo I ó II (69,70,83,131). Por otra parte la inestabilidad de la subunidad catalítica también dificultó este estudio.

Los intentos de disociación de la proteína quinasa de Mucor rouxii, siguiendo los lineamientos clásicos descritos en la literatura para la disociación de las proteínas quinasas dependientes de cAMP (71), mostraron que la preincubación de la enzima de Mucor con una concentración de cAMP 1 μ M, más que suficiente para la disociación de las enzimas de tejidos superiores, no afecta el estado polimérico de la misma (fig. 11-a). Es de hacer notar que esta concentración de cAMP está muy por encima de la necesaria para producir máxima activación en el ensayo enzimático. Concentraciones de cAMP muy superiores, 0,1 mM o mayores,

sólo producen disociación parcial (fig. 11-b).

De estos resultados se puede concluir o bien que el cAMP actuva a la proteína quinasa sin producir disociación, como ocurre con las proteínas quinasas dependientes de cAMP (95,96), o bien que la enzima necesita disociarse para activarse y que esta disociación la produce, junto con el cAMP, algún otro componente de la mezcla de reacción.

Otro resultado importante y bastante novedoso que surge de la figura 11-a es la existencia de la especie holoenzima-cAMP unido, intermedio que nunca había sido detectado en ningún otro sistema, pero cuya existencia había sido postulada para explicar el comportamiento cinético de algunas proteínas quinasas frente al cAMP (136-138).

Otros componentes de la mezcla de reacción que se ensayaron como agentes disociantes, tales como ATP-Mg⁺⁺ e histona, no mostraron efecto per se. Contrariamente a lo que ocurre con la proteína quinasa de tipo II de corazón bovino (132), el ATP-Mg⁺⁺ tampoco estimula la disociación de la holoenzima en presencia de cAMP.

La acción de la histona junto con el cAMP sobre la proteína quinasa, mostró ser más compleja. Produce un precipitado muy difícil de redissolver, que lleva consigo gran parte de la actividad enzimática. Sin embargo, el análisis por gradientes del estado polimérico de la enzima soluble remanente, mostró que ésta está disociada (fig. 12-a).

Los resultados más esclarecedores en cuanto al mecanismo de disociación y reasociación de la proteína quinasa de Mucor rouxii se obtuvieron de los experimentos de incubación de la enzima con ClNa y cAMP. Las conclusiones más importantes que se deducen de estos experimentos y que se muestran en las figuras 12 b-d, 13 y 14 se pueden resuu

mir de la siguiente manera.

- a) ClNa 0,5 M, cAMP 1 μ M producen disociación total de la enzima en sus subunidades catalítica (C) y regulatoria (R_2) (fig.12-b).
- b) ClNa 0,5 M, cAMP 0,1 μ M mantienen las especies disociadas a lo largo de su separación en un gradiente de sacarosa (fig. 12-b).
- c) ClNa 0,5 M en ausencia de cAMP es incapaz de mantener las subunidades disociadas (fig. 12-c).
- d) ClNa 0,15 M, aún en presencia de cAMP 0,1 μ M ya no es suficiente para mantener las especies disociadas.

Una vez disociada la holoenzima con ClNa 0,5 M y cAMP 1 μ M, la posterior eliminación del ClNa trae como consecuencia la pérdida total de la actividad catalítica, tal como se ve en la fig. 12-d. La posición de la subunidad regulatoria en este gradiente indica que está separada de la subunidad catalítica.

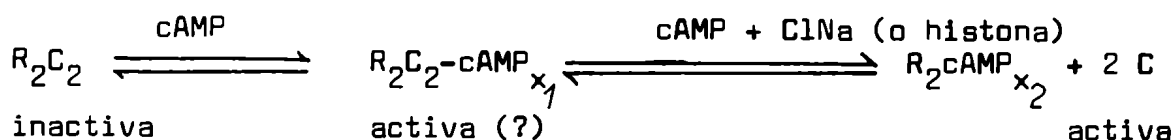
La ausencia de holoenzima en estas condiciones se debería a la rápida inactivación de la subunidad catalítica al mismo tiempo que se está separando de la subunidad regulatoria por la centrifugación en el gradiente.

Si en cambio, una vez producida la disociación de la enzima con ClNa y cAMP, se eliminan los agentes disociantes por diálisis, es posible observar reasociación casi total, lo cual indicaría que en estas condiciones, en que están juntas las subunidades regulatoria y catalítica, es más rápida la reasociación que la inactivación de la subunidad catalítica (fig. 13).

El ClNa tiene dos efectos sobre la subunidad catalítica: es un potente inhibidor (fig. 8) a la vez que la protege de la inactivación

(Tabla VII). Cada uno de estos efectos por separado ya había sido descrito para otras proteínas quinasas (48,76,81,133).

Los pesos moleculares aparentes de la holoenzima (fig. 9-a y b) y de sus subunidades (fig. 12-b) hacen pensar en un esquema de disociación similar al clásico (69,70,83,131) en cuanto al tamaño de las especies que intervienen:



x_1 y x_2 : moles de cAMP unidos/mol de enzima, se desconoce su valor.

El resultado más novedoso es la evidencia directa de un intermedio holoenzima-cAMP.

Algunos de los experimentos detallados y comentados ampliamente en la sección Resultados y resumidos aquí, permiten extraer algunas conclusiones sobre las similitudes y diferencias de la proteína quinasa dependiente de cAMP de Mucor rouxii con respecto a otras proteínas quinasas de organismos eucariontes.

Es sumamente difícil ubicar inequívocamente la proteína quinasa de Mucor rouxii dentro de uno de los dos tipos I y II de la clasificación general propuesta por Corbin y colaboradores (76,83).

Las proteínas quinasas de tipo I eluyen de columnas de DEAE-celulosa a baja fuerza iónica (80-100 mM de sal), se disocian completamente por cAMP 1 μ M, pero también lo hacen por histona o ClNa en ausencia del nucleótido cíclico. Este tipo de enzimas, una vez disociadas en sus subunidades, son de difícil reasociación.

Las proteínas quinasas de tipo II eluyen a mayor fuerza iónica (0,15 - 0,20 M de sal), no se disocian por ClNa o histona y si lo hacen por cAMP 1 μ M o menos. La remoción del nucleótido cíclico produce la inmediata reasociación de las subunidades, mientras que la inclusión de ClNa 0,5 M en los buffers impide esta reasociación.

Por la fuerza iónica a la cual eluye de una columna de DEAE-celulosa (0,17 M de fosfato de potasio, pH 7,2), la proteína quinasa de Mucor rouxii se asemeja a las de tipo II. Por la dificultad de disociación y facilidad de reasociación también se parece a las quinasas de tipo II. Sin embargo se diferencia de estas últimas en que el cAMP per se, no es un agente disociante, sólo produce disociación parcial a muy altas concentraciones. Tampoco lo son la histona o el ClNa. La combinación de ClNa con cAMP o de histona con cAMP sí disocian la holoenzima. Se diferencia de las proteínas quinasas I y II por la facilidad de reasociación aún en presencia de ClNa o bajas concentraciones de cAMP.

Como ya ha sido señalado por Corbin y colaboradores (83), el conocimiento previo de la modalidad de disociación y reasociación de las proteínas quinasas dependientes de cAMP de un sistema determinado es indispensable para cualquier estudio que tenga por finalidad conocer el estado real de la proteína quinasa dentro de la célula. Un estudio de este tipo en el hongo Mucor rouxii sería muy dificultoso, debido a las características peculiares de la proteína quinasa que se mencionaron anteriormente. Por ejemplo, si la preparación del extracto enzimático se realizase con buffer de baja fuerza iónica, como se hizo a lo largo de este trabajo, no se esperaría encontrar más que la proteína quinasa bajo su forma de holoenzima, ya que las subunidades catalíticas que pu-

diesen existir en la célula se habrían inactivado en estas condiciones o se habrían reasociado con subunidades regulatorias disponibles. De hecho, a lo largo de todo el estudio realizado, no se pudo detectar la presencia de subunidades catalíticas libres.

Si en cambio, la extracción de la enzima se hiciese con un buffer de alta fuerza iónica (con ClNa 0,5 M), las subunidades catalíticas libres que pudiesen existir preservarían su actividad. Sin embargo, el ClNa no impediría su reasociación con las subunidades regulatorias disponibles. De hecho, cuando los extractos se realizaron en condiciones de alta fuerza iónica, tampoco se pudo detectar subunidad catalítica libre (datos que no se muestran).

Habría que encontrar condiciones muy particulares de concentración de ClNa y de cAMP, capaces de prevenir la reasociación de subunidades preexistentes sin producir disociación de la holoenzima.

Los resultados presentados en este trabajo pueden relacionarse con otros hechos conocidos sobre la morfogénesis en Mucor. Se ha demostrado en Mucor rouxii (139) y en Mucor racemosus (20) que los niveles de cAMP cambian drásticamente durante la morfogénesis aeróbica. Durante las primeras horas de la germinación se observa un nivel de cAMP intracelular constante (el mismo que el de las esporas sin germinar) seguido de una caída brusca justo antes de la aparición de los tubos germinativos. Estos resultados, junto con la observación de que una concentración exógena elevada de cAMP reprime el crecimiento apical y promueve el desarrollo levaduriforme, sugieren que el cAMP está involucrado en la morfogénesis de Mucor.

Ya ha sido fehacientemente documentado que, en tejidos de especies superiores, los efectos de muchas hormonas (proteicas, catecolaminas, prostaglandinas) se ejercen a través de la elevación transiente en los niveles intracelulares de cAMP. Este aumento produce la disociación y por consiguiente la activación de las proteínas quinasas dependientes de cAMP. Estas enzimas así activadas fosforilan enzimas claves de diferentes caminos metabólicos, según el tejido y la hormona de que se trate. El tejido estimulado por la hormona vuelve a su condición inicial cuando los niveles de cAMP descienden a los valores basales por acción de la cAMP fosfodiesterasa. La disminución de la concentración de cAMP produce la reasociación de las subunidades catalítica y regulatoria, para reconstituir la holoenzima inactiva, cerrando así el ciclo de acción hormonal.

De los resultados del trabajo realizado en Mucor rouxii surge que existe en este hongo una proteína quinasa dependiente de cAMP, cumpliéndose así el primer postulado propuesto por Krebs (50), para poder afirmar que un determinado efecto de cAMP está mediado por fosforilación proteica.

A lo largo de este trabajo también se ha demostrado que la proteína quinasa de Mucor necesita, al menos in vitro, de un sustrato proteico además del cAMP para ser disociada. No se sabe aún si dentro de los sustratos proteicos fosforilables in vivo hay enzimas que intervengan directa o indirectamente en los procesos morfogenéticos. Sin embargo, resultados preliminares indican que la enzima que controla los niveles del nucleótido cíclico (cAMP fosfodiesterasa), es activada por la proteína quinasa dependiente de cAMP (140). Como consecuencia de ello

descenderían los niveles del nucleótido. Si el comportamiento de la enzima in vivo fuese similar al demostrado in vitro se puede inferir que esta disminución involucraría la rápida reasociación de las subunidades para formar la holoenzima inactiva.

Los resultados del presente estudio también sugieren que otra vía de regulación de la actividad de proteína quinasa sería la inactivación de las subunidades catalíticas libres, siempre y cuando éstas fueran in vivo tan inestables como se ha demostrado que lo son in vitro. Esto implicaría la necesidad de nueva síntesis de la parte catalítica de la holoenzima para poder reiniciar un ciclo de respuesta a cambios en los niveles de cAMP.

Parte del presente estudio ha sido publicado en Archives of Biochemistry and Biophysics, (1977) 180, 225-231 y en Acta Physiologica Latinoamericana (1976) 26, 343-348

Los resultados más recientes constituyen otro trabajo que ha sido aceptado para su publicación en Archives of Biochemistry and Biophysics.

B I B L I O G R A F I A

- 1- Drouhet, E. y Mariat, F. (1952) Ann. Inst. Pasteur, 83, 506-514.
- 2- Salvin, S. B. (1949) Mycologia, 41, 311-319.
- 3- Nickerson, W. J. y Edwards, G. A. (1949) J. Gen. Physiol., 33, 41-55.
- 4- Nickerson, W. J. y Mankowski, Z. (1953) Ann. J. of Botany 40, 584-592.
- 5- Bail, T. (1857) Flora (Jena) 40, 417-444.
- 6- Pasteur, L. (1876), en Ouvres de Pasteur, vol V, Masson et Cie. edit. Paris, 1928.
- 7- Bartnicki-García, S. y Nickerson, W. J. (1962) Biochim. Biophys. Acta 58; 102-119.
- 8- Mahadevan, R. R. y Tatum, E. L. (1965) J. Bacteriol. 90, 1073-1081.
- 9- Kanetsuma, F., Carbonell, L. M., Azuma, I. y Yamamura, Y. (1972) J. Bacteriol. 110, 208-218.
- 10- Wang, C.S. y Schwalb, M. (1968) Canad. J. Microbiol. 14, 809-813.
- 11- Bartnicki-García, S. (1963) Bacteriol. Rev. 27, 293-303.
- 12- Bartnicki-García, S. y Lippman, E. (1969) Science 165, 302-304.
- 13- Bartnicki-García, S. y Nickerson, W. J. (1962) J. Bacteriol. 84, 829-840.
- 14- Haidle, C. W. y Storck, R. (1966) J. Bacteriol. 92, 1236-1244.
- 15- Mooney, D. T. y Sypherd, P. (1976) J. Bacteriol. 126, 1266-1270.
- 16- Bartnicki-García, S. (1968) J. Bacteriol. 96, 1586-1594.
- 17- Friedenthal, M., Epstein, A. y Passeron, S. (1974) J. Gen. Microbiol. 82, 15-24.
- 18- Terenzi, H. F. y Storck, R. (1969) J. Bacteriol. 97, 1248-1261.
- 19- Rogers, P. J., Clark-Walker, G. D. y Stewart, P. R. (1974) J. Bacteriol. 119, 282-293.

- 20- Paznokas, J. L. y Sypherd, P. (1975) *J. Bacteriol.* 124, 134-139.
- 21- Larsen, A. D. y Sypherd, P. (1974) *J. Bacteriol.* 117, 432-438.
- 22- Paveto, C., Epstein, A. y Passeron, S. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 169, 449-457.
- 23- Maresca, B., Medoff, G., Schlessinger, D. y Kobayashi, G. S. (1977) *Nature* 266, 447-448.
- 24- Sussman, M. y Schlinder, J. (1978) *Differentiation* 10, 1-5.
- 25- Jones, B. E. y Bu'Lock, J. D. (1977) *J. Gen. Microbiol.* 103, 29-36.
- 26- Uno, I. y Ishikawa, T. (1973) *J. Bacteriol.* 113, 1249-1255.
- 27- Minder, C. y Van den Driessche, T. (1978) *Differentiation* 10, 165-170.
- 28- Campos, J. M. y Zussman, D. R. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 518-522.
- 29- Hamilton, R. W., Achberger, E. C. y Kolenbrander, P. E. (1977) *J. Bacteriol.* 129, 874-879.
- 30- Cohen, R. J. (1974) *Nature*, 251, 144-146.
- 31- Schwalb, M. N. (1978) *FEMS Letters*, 3, 107-110.
- 32- Terenzi, H. F., Flawiá, M. M. y Torres, H. N. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 990-996.
- 33- Terenzi, H. F., Flawiá, M. M., Tellez-Iñón, M. T. y Torres, H. N. (1976) *J. Bacteriol.* 126, 91-99.
- 34- Rall, T. W., Sutherland, E. W. y Berthet, L. (1957) *J. Biol. Chem.* 224, 463-475.
- 35- Haugaard, N. y Hess, M. (1965) *Pharmacol. Rev.* 17, 27-69.
- 36- Rosell-Pérez, M. y Larner, J. (1964) *Biochemistry* 3, 81-88.
- 37- Sutherland, E. W. y Rall, T. (1960) *Pharmacol. Rev.* 12, 265-299.
- 38- Haynes, R. y Berthet, L. (1957) *J. Biol. Chem.* 225, 115-124.

- 39- Krause, E., Hale, W., Kallabis, E. y Wollenberger, A. (1970) J. Mol. Cel. Cardiol. 1, 1-5.
- 40- Somlyo, A., Haeusler, G. y Somlyo, A. (1970) Science, 169, 490-491.
- 41- Johnson, G., Friedman, R. y Pastan, I. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 68, 425-429.
- 42- Ryan, W. L. y Heidrick, M. L. (1968) Science, 162, 1484-1486.
- 43- Robinson, G., Butcher, R. y Sutherland, E. W. (1971) Cyclic AMP, Academic Press, N. Y.
- 44- Walsh, D., Perkins, J. y Krebs, E. G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3763-3765.
- 45- Langan, T. (1968) Science, 162, 579-581.
- 46- Miyamoto, E., Kuo, J. y Greengard, P. (1969) Science, 165, 63-65.
- 47- Kuo, J. y Greengard, P. (1969) J. Biol. Chem. 244, 3417-3419.
- 48- Corbin, J. y Krebs, E. G. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 328-336.
- 49- Kuo, J. y Greengard, P. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 64, 1349-1355.
- 50- Krebs, E. G. (1973) Endocrinology, Proceedings of the 4th. International Congress, Excerpta Medica, Amsterdam.
- 51- Posner, J., Stern, R. y Krebs, E. G. (1965) J. Biol. Chem. 240, 982-985.
- 52- Walsh, D., Perkins, J., Brostrom, C., Ho, E. y Krebs, E.G. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1968-1976.
- 53- Friedman, D. y Larner, J. (1963) Biochemistry 2, 669-675.
- 54- Schlender, K., Wei, S. y Villar-Palasi, C. (1969), Biochim. Biophys. Acta 191, 272-278.

- 55- Soderling, T., Hickenbottom, J., Reimann, E., Hunkeler, F., Walsh, D. y Krebs, E. G. (1970) J. Biol. Chem. 245, 6317-6328.
- 56- Huttunen, J., Steinberg, D. y Mayer, S. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 290-295.
- 57- Corbin, J., Reimann, E., Walsh, D. y Krebs, E. G. (1970) J. Biol. Chem. 245, 4849-4851.
- 58- Huttunen, J. y Steinberg, D. (1971) Biochim. Biophys. Acta 239, 411-427.
- 59- Hardie, D. y Cohen, P. (1978) FEBS Lett. 91, 1-7.
- 60- Nimmo, H. y Houston, B. (1978) Biochem. J. 176, 607-610.
- 61- Khoo, J., Steinberg, D., Huang, J. y Vagelos, P. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2882-2890.
- 62- Lipmann, F. (1933) Bioch. Zeit. 262, 3-10.
- 63- Anderson, L. y Keely, J. (1959) J. Amer. Chem. Soc. 81, 2275-2276.
- 64- Brostrom, M., Reimann, E., Walsh, D. y Krebs, E. G. (1970) Adv. Enzyme Regulation 8, 191-203.
- 65- Gill, G.N. y Garren, L. D. (1970) Biochim. Biophys. Acta 39, 335-343.
- 66- Tao, M., Salas, M. y Lipmann, F. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 408-414.
- 67- Kumon, A., Yamamura, H. y Nishizuka, Y. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1290-1297.
- 68- Beavo, J. A., Bechtel, P. J. y Krebs, E. G. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 241-251.
- 69- Rosen, O. M. y Erlichman, J. (1975) J. Biol. Chem. 250, 7788-7794.
- 70- Hofmann, F., Beavo, J. A., Bechtel, P. J. y Krebs, E. G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 7795-7801.

- 71- Miyamoto, E., Petzold, G. L., Harris, J. S. y Greengard, P. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 305-312.
- 72- Tao, M. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 56-61.
- 73- Ashby, C. D. y Walsh, D. A. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6637-6642.
- 74- Kuo, J. F., Krueger, B. K., Sanes, J. R. y Greengard, P. (1970) Biochim. Biophys. Acta 212, 79-91.
- 75- Yamamura, H., Inoue, Y., Shimomura, R. y Nishizuka, Y. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 589-596.
- 76- Corbin, J., Brostrom, C., Alexander, R. y Krebs, E. G. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3736-3743.
- 77- Maeno, H., Johnson, E. M. y Greengard, P. (1971) J. Biol. Chem. 246, 134-142.
- 78- Lemaire S., Pelletier, G. y Labrie, F. (1971) J. Biol. Chem. 246, 7303-7310.
- 79- Rubin, C. S., Erlichman, J. y Rosen, O. M. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6135-6139.
- 80- Gill, G. N. y Garren, L. D. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66, 786-790.
- 81- Reimann, F. M., Walsh, D. y Krebs, E. G. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1986-1995.
- 82- Erlichman, J., Rubin, C. S. y Rosen, O. M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 7607-7609.
- 83- Corbin, J. D., Keely, S. L. y Park, C. (1975) J. Biol. Chem. 250, 218-225.
- 84- Corbin, J. D. y Keely, S. L. (1977) J. Biol. Chem. 252, 910-916.
- 85- Corbin, J. D., Keely, S. L., Soderling, T. R. y Park, C. R. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 265-279.

- 86- Fleischer, M., Rosen, O. M. y Reichlin, M. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 54-58.
- 87- Erlichman, J., Rosenfeld, R. y Rosen, O. M. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5000-5003.
- 88- Kuo, J. F. y Greengard, P. (1970) J. Biol. Chem. 245, 2493-2498.
- 89- Kuo, J. F., Wyatt, G. R. y Greengard, P. (1970) J. Biol. Chem. 246, 7159-7167.
- 90- Nishiyama, K., Katakami, H., Yamamura, H., Takai, Y., Shimomura, R. y Nishizuka, Y. (1975) J. Biol. Chem. 250, 1297-1300.
- 91- Takai, Y., Nakaya, S., Inoue, M., Kishimoto, A., Nishiyama, K., Yamamura, H. y Nishizuka, Y. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1481-1487.
- 92- Lincoln, T. M., Hall, C. L., Park, C. R. y Corbin, J. D. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 2559-2563.
- 93- Sold, G. y Hofmann, F. (1974) Eur. J. Biochem. 44, 143-149.
- 94- Gill, G. N. y Kanstein, C. B. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 1113-1122.
- 95- Gill, G. N., Holdy, K. E., Walton, G. M. y Kanstein, C. B. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 3918-3922.
- 96- Lincoln, T. M., Dills, W. L. y Corbin, J. D. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4269-4275.
- 97- Kuehn, G. D. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6366-6369.
- 98- Uno, I. y Ishikawa, T. (1974) Biochem. Biophys. Acta 334, 354-360.
- 99- Majumder, G. C., Shrago, E. y Elson, C. E. (1975) Biochim. Biophys. Acta 384, 399-412.
- 100- Keirns, J. J., Carrett, B., Freeman, J., Eisenstadt, J. M. y Bitensky, M. W. (1973) Life Sciences 13, 287-302.

- 101- Takai, Y., Yamamura, H. y Nishizuka, Y. (1974) J. Biol. Chem. 249, 530-535.
- 102- Sampson, J. (1977) Cell, 11, 173-180.
- 103- Silverman, P. (1978) J. Bacteriol. 135, 976-980.
- 104- Juliani, M. H. y Da Costa Maia, J. (1979) Biochim. Biophys. Acta 567, 347-356.
- 105- Englis, D. y Hanahan, D. (1945) J. Am. Chem. Soc. 67, 51-54.
- 106- Krebs, E. G. (1972) Current Topics in Cellular Regulation (Horecker B. L. y Stadtman, E. R., eds.) Vol 5, pp 99-133. Academic Press, N. Y.
- 107- Corbin, J. y Reimann, E. (1974) En Methods in Enzymology, (J. G. Hardman y B. O'Malley, eds.) Vol 38, parte C, Academic Press, New York, p. 287.
- 108- Gilman, A. (1970) Proc. Nat. Sci, USA 67, 305-312.
- 109- Chance, B. y Maehly, A. (1955) en Methods in Enzymology, Vol 2, (Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds) Academic Press, N. Y. p. 764.
- 110- Maehly, A. y Chance, B. (1954) en Methods in Enzymology, Vol 1 (Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds), Academic Press, N. Y., p. 357.
- 111- Chaney, A. L. y Marbach, E. P. (1962) Clin. Chem. 8, 131-136.
- 112- Garen, A. y Levinthal, C. (1960) Biochim. Biophys. Acta 38, 470-483.
- 113- Martin, R. y Ames, B. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1372-1379.
- 114- Dixon, M. y Webb, E. (1962) en Enzymes, Longmans, London, p. 478.
- 115- Peterson, E. A. y Sorber, H. A. (1962) en Methods in Enzymology, vol 5 (Sydney, P. Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds), Academic Press, N. Y. p. 6.

- 116- Andrews, P. (1964) *Biochem. J.*, 91, 222-233.
- 117- Glynn, I. y Chappell, J. (1964) *Biochem. J.* 90, 147-149.
- 118- Chang, K., Marcus, M. y Cuatrecasas, P. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 6854-6865.
- 119- Symons, R. (1977) *Nucleic Acid Res.* 4, 4347-4355.
- 120- Lowry, O. H., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 121- Fiske, C. y Subbarow, J. (1925) *J. Biol. Chem.* 66, 375-400.
- 122- Moreno, S., Paveto, C. y Passeron, S. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 225-231.
- 123- Beyer, J. (1975) *Hoppe-Seyler's Z. für Phys. Chem.* 356, 1937-1941.
- 124- Rubin, C., Erlichman, J. y Rosen, O. M. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 36-44.
- 125- Talmadge, K., Bechtel, E., Salonkangas, A., Huber, P. Jungmann, R. y Eppenberger, U. (1975) *Eur. J. Biochem.* 60, 621-632.
- 126- Leonard, J. y Rosenberg, L. (1977) *Biochim. Biophys. Acta.* 484, 336-348.
- 127- Lincoln, T. y Corbin, J. D. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74, 3239-3244.
- 128- Kumon, A., Nishiyama, K., Yamamura, H. y Nishizuka, Y. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 3726-3735.
- 129- Miyamoto, E., Kuo, J. y Greengard, P. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 6395-6402.
- 130- Nissley, P., Anderson, W. B., Gallo, M. , Pastan, I. y Perlman, R. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 4264-4269.
- 131- Keely, S., Corbin, J. D. y Park , C. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4832-4840.

- 132- Rangel-Aldao, R. y Rosen, O. M. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3375-3380.
- 133- Peters, K., Demaille, J. y Fischer, E. (1977) Biochemistry, 16, 5691-5697.
- 134- Corbin, J. D., Soderling, T. y Park, C. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1813-1821.
- 135- Kudlicki, W., Grankowski, N. y Gasior, E. (1978) Eur. J. Biochem. 84, 493-499.
- 136- Ogez, J. R. y Segel, I. H. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4551-4556.
- 137- Boeynaems, J. M. y Dumont, J. E. (1977) Mol. Cell. Endocrinol. 7, 275-295.
- 138- Tsuzuki, J. y Kiger, J. A. (1978) Biochemistry 17, 2961-2970.
- 139- Cantore, M. L., Galvagno, M. A. y Passeron, S. (1979) (enviado para su publicación).
- 140- Galvagno, M. A., Moreno, S. y Passeron, S. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun., 89, 779-785.