

Tesis de Posgrado

Quinasas de proteínas y fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos en *Neurospora Crassa*

Glikin, Gerardo Claudio

1981

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:

Glikin, Gerardo Claudio. (1981). Quinasas de proteínas y fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos en *Neurospora Crassa*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1659_Glikin.pdf

Cita tipo Chicago:

Glikin, Gerardo Claudio. "Quinasas de proteínas y fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos en *Neurospora Crassa*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1981. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1659_Glikin.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

U N I V E R S I D A D D E B U E N O S A I R E S

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"QUINASAS DE PROTEINAS Y FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS
CICLICOS EN NEUROSPORA CRASSA"

AUTOR: Gerardo Claudio Glikin
DIRECTOR: Dr. Héctor Norberto Torres
LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Investigaciones
Bioquímicas "Fundación Campomar"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

- 1 9 8 1 -

1659

5-2

AGRADECIMIENTOS

Al Dr.Héctor N. Torres cuyo aporte crítico, incesante impulso y constante actitud docente han sido valiosas bases para la concreción de esta tesis.

A los miembros del Consejo Directivo del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar": Dr.Israel D. Algranati, Dr.Carlos E. Cardini, Dr.Héctor Carminatti, Dr.Marcelo A. Dankert, Dr.Luis F. Leloir, Dr.José M. Olavarría y Porrúa, y Dr.Héctor N. Torres por haberme permitido llevar a cabo este trabajo en el Instituto.

Al Dr.Ricardo R. Rodríguez por la comprensión y cooperación prestadas.

A la Dra.Clara R. Krisman de Fischman, Consejera de Estudios, por su orientación en la elección de cursos del Doctorado.

A la Dra.María T. Téllez de Iñón y al Dr.Norberto D. Judewicz por haber sido copartícipes "en las buenas y en las malas" de las experiencias cotidianas.

A la Dra.Mirtha M. Flawiá y al Dr.Alberto R. Kornblihtt por su ininterumpido estímulo y generosa transmisión de conocimientos.

A todos los otros colegas y amigos del I.I.B. que me han brindado su ayuda, contribuyendo a la realización de este trabajo.

A Mary B. de Iozzolino y Beile Wolf por haber colaborado en forma constante y eficiente desde el área administrativa.

A Silvia E. de Campoamor por su cuidadosa y paciente labor dactilográfica.

A Norberto E. Malarini por su dedicación y responsabilidad en la confección de los gráficos.

A la Srta. Margarita Mazzardi, a la Sra. Soledad Giménez y al Sr.Francisco Irusta por la esmerada asistencia técnica proporcionada.

A living cell is the epitome of ingenious design; although highly complex, it functions with orderliness and efficiency. Its ability to coordinate a wide range of biological activities rests with an elaborate communications system directed toward a single goal - homeostasis and survival. Uncoordinated activities invariably lead to pathological conditions and, if not checked, to uncontrolled proliferation or cell death.

In a multicellular organism, communication poses an added complexity. Apart from coordinating its own activities, each cell must act in concert with neighbouring cells. To meet the need for intercellular communication, each cell possesses a set of messenger molecules and cell-surface receptors that transduce the chemical messages into a recognizable signal. The signal either activates or inhibits a biochemical reaction that is controlled by a rate-limiting step, which is usually governed by a cellular regulator, defined here as a molecule that controls one or more critical processes.

Wai Yiu Cheung
MCMLXXX

I N D I C E

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

I. FOSFORILACION Y DESFOSFORILACION DE PROTEINAS	5
A. Antecedentes	5
B. Modificaciones covalentes de proteíñas y fosforilación	6
C. Clasificación de las quinasas de proteíñas	7
D. Quinasas de proteíñas dependientes de AMP cíclico	7
E. Quinasas de proteíñas dependientes de GMP cíclico	11
F. Quinasas de proteíñas dependientes de Ca ²⁺	12
G. Quinasas de proteíñas independientes de nucleótidos cíclicos y Ca ²⁺	14
H. Fosfatasas de fosfoproteíñas	14
I. Fosforilación-desfosforilación de proteíñas específicas	15
II. SINTESIS Y DEGRADACION DE NUCLEOTIDOS CICLICOS	18
A. Adenilato ciclasa	18
B. Guanilato ciclasa	19
C. Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos	20
D. Calmodulina	24
III. EL CICLO DE VIDA DE <u>NEUROSPORA CRASSA</u>	25
A. Clasificación	25
B. Requerimientos nutricionales	26
C. Ciclo de reproducción asexual	26
D. Ciclo de reproducción sexual	28
IV. EL AMP CICLICO Y ENZIMAS RELACIONADAS EN <u>NEUROSPORA CRASSA</u>	29
A. Regulación de las reservas de glucógeno	29

B. Adenilato ciclasa	30
C. Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos y quinasas de protefnas	32
D. Diferenciación y mutantes	32
V. EL AMP CICLICO Y ENZIMAS RELACIONADAS EN PROTISTAS	35
A. <u>Blastocladiella</u>	35
B. <u>Mucor</u>	38
C. <u>Saccharomyces</u>	41
D. <u>Coprinus</u>	44
E. Hongos varios, líquenes y algas	45
F. <u>Dictyostelium</u>	45
G. <u>Physarum</u>	48

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

I. ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO	49
II. HOMOGENEIZACION Y FRACCIONAMIENTO	49
III. SEPARACION DE QUINASAS Y FOSFODIESTERASAS EN COLUMNAS DE DEAE-CELULOSA	50
IV. PREPARACION DEL INHIBIDOR Y ACTIVADOR TERMOESTABLES	50
A. Cromatografía en DEAE-celulosa	50
B. Purificación del activador por hidroxilapatita	51
V. ENFOQUE ISOELECTRICO EN COLUMNA	52
VI. PARAMETROS MOLECULARES	52
A. Tratamiento de las distintas preparaciones enzimáticas	52
B. Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa	52
C. Filtración en geles de agarosa	53

D. Cálculo de parámetros moleculares	54
VII. ENSAYOS ENZIMATICOS	56
A. Preparación de γ - ^{32}P -ATP	56
B. Quinasas de proteínas	57
C. Unión de AMP cíclico	58
D. Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos	58
E. Otras determinaciones realizadas	59
VIII. REACTIVOS UTILIZADOS	59

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

I. QUINASAS DE PROTEINAS EN <u>NEUROSPORA CRASSA</u>	61
A. Sistemas crudos	61
B. Separación por cromatografía en DEAE-celulosa	61
C. Especificidad de sustrato proteico	63
D. Requerimientos de Mg^{2+} y ATP. Influencia del AMP cíclico y del pH	64
E. Efecto de los nucleótidos cíclicos sobre PK I	65
F. Relación entre PK II, <u>R</u> y AMP cíclico	67
G. Inhibidor termoestable	67
II. PARAMETROS MOLECULARES DE LAS QUINASAS	69
A. Quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico y actividad de unión de AMP cíclico	69
B. Quinasas de proteínas independientes de nucleótidos cíclicos	72
III. ACTIVADOR TERMOESTABLE DE LA QUINASA PK III	73
A. Obtención por cromatografía en DEAE-celulosa	73
B. Recromatografía en hidroxilapatita	74

	4
C. Especificidad de acción	75
D. Efectos de metales divalentes	77
IV. FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS EN <u>NEUROSPORA CRASSA</u>	78
A. Sistemas crudos	78
B. Separación por cromatografía en DEAE-celulosa	79
C. Especificidades de sustrato y de metal divalente	80
D. Efectos de metilxantinas y reactivos de grupos sulfhidrilos	81
V. PARAMETROS MOLECULARES DE LAS FOSFODIESTERASAS	82
A. Fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos no específica	82
B. Fosfodiesterasa de GMP cíclico	84

C O N C L U S I O N

I. QUINASAS DE PROTEINAS EN <u>NEUROSPORA CRASSA</u>	86
II. FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS EN <u>NEUROSPORA CRASSA</u>	88
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	90
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	104
NOMENCLATURA DE LAS ENZIMAS	105

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

I. FOSFORILACION Y DESFOSFORILACION DE PROTEINAS

A. Antecedentes

A principios de la década del 30, Lipmann y Levene (1,2) demostraron la existencia de fosfato covalentemente unido a grupos hidroxilos de residuos serina en las proteínas caseína y fosvitina.

En el año 1954 Burnett y Kennedy (3) aislaron por primera vez la actividad enzimática de hígado de rata que cataliza la formación del enlace monoéster por transferencia del fosfato terminal del ATP a grupos hidroxilo de serina o treonina (Fig.1).

Por otro lado, en 1957, Sutherland y Rall (4,5) descubrieron un compuesto termoestable requerido para la activación de la fosforilasa hepática, que resultó ser el AMP cíclico (Fig.1). La actividad enzimática que cataliza la síntesis de este compuesto, presente en fracciones particuladas de hígado, fue llamada adenilato ciclasa. Para la formación de dicho compuesto era necesario agregar ATP y Mg^{2+} , siendo la adrenalina y el glucagon activadores de la reacción. Unos años más tarde, Butcher y Sutherland (6) informaron sobre el hallazgo de la actividad enzimática que hidroliza al AMP cíclico convirtiéndolo en 5'-AMP: la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos.

Tomando como base sus propios resultados, Sutherland dio el primer paso en un nuevo campo, la Endocrinología Molecular, al postular su modelo de acción hormonal. El modelo asigna a la hormona el papel de señal externa o primer mensajero. La hormona actuaría sobre moléculas especializadas de la superficie celular llamadas receptores hormonales, que a su vez interactuarían con el sistema de producción-degradación del AMP cíclico. Este nucleótido cíclico sería el mensajero intracelular o segundo mensajero, teniendo la capacidad de interactuar sobre los sistemas de regulación del metabolismo en todos sus niveles (Fig.2).

Hubo que esperar casi diez años más para encontrar el nexo entre los procesos de fosforilación de proteínas y el control de las distintas rutas

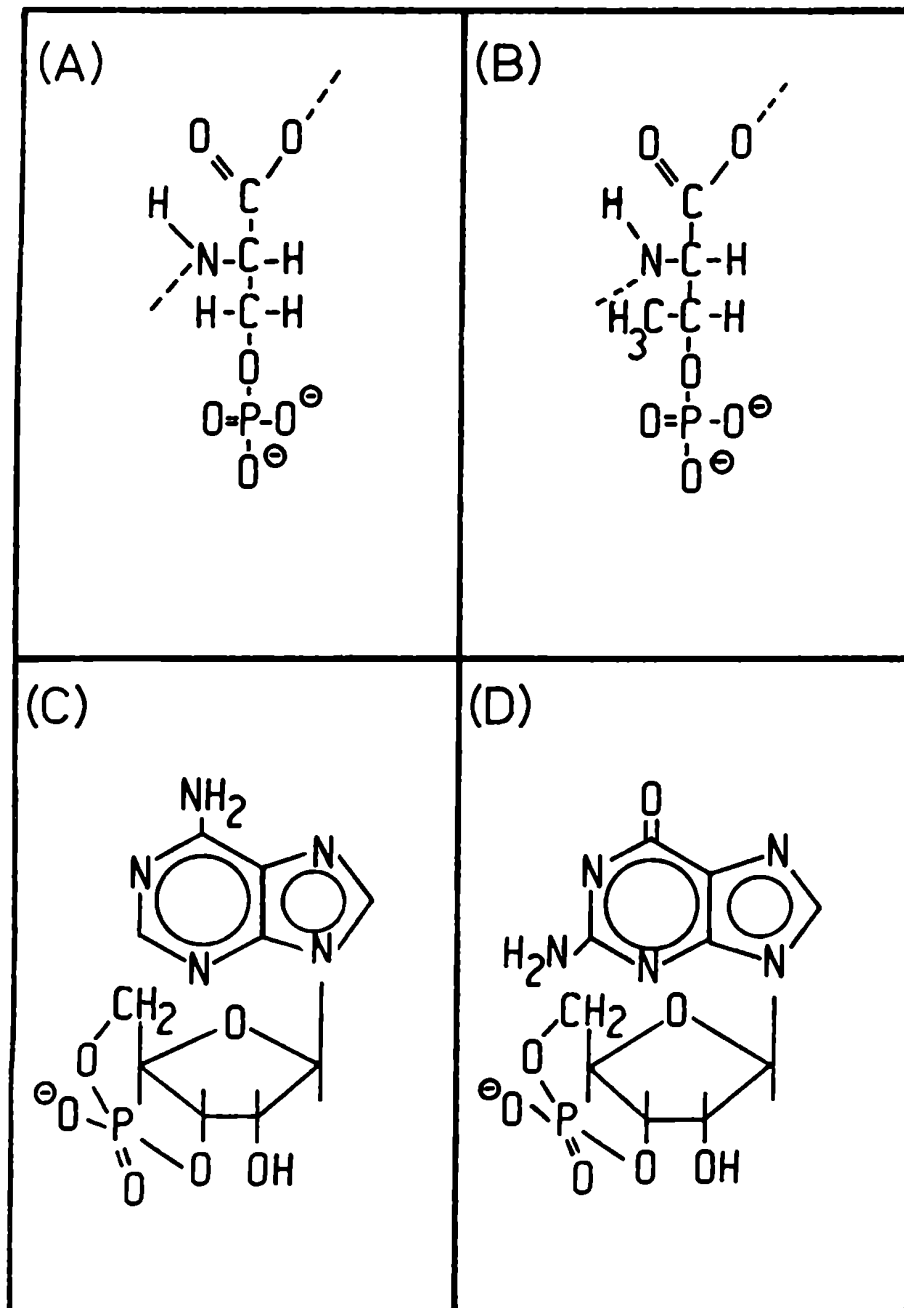


Figura 1. Estructura de aminoácidos fosforilados: fosfoserina (A) y fosfotreonina (B). Estructura de los nucleótidos cíclicos: AMP cíclico (C) y GMP cíclico (D).

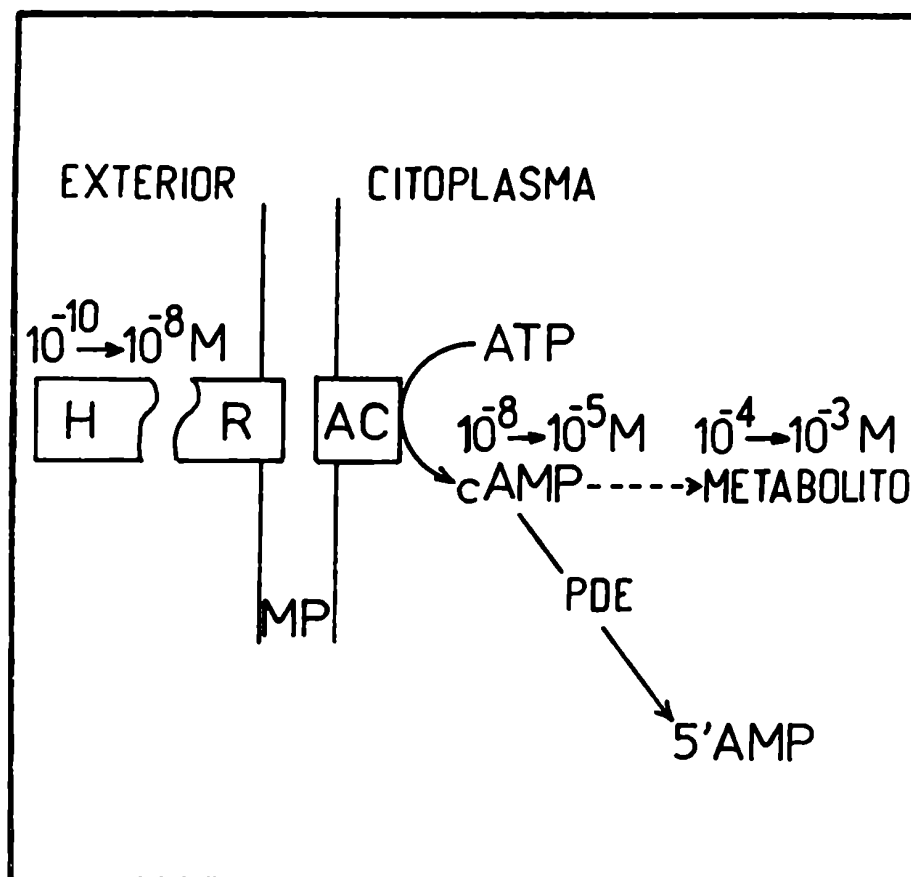


Figura 2. Modelo de los dos mensajeros propuesto por Sutherland (1964). La hormona (H) (primer mensajero) al unirse al receptor (R) que se encuentra en la superficie externa de la membrana plasmática (MP) interacciona con la adenilato ciclasa (AC) que está en la cara interna de la misma provocando una variación en los niveles de AMP cíclico (segundo mensajero), que actuando sobre las quininas de proteínas, será el responsable de los cambios en el metabolismo. Otra enzima, la fosfodiesterasa (PDE), será también un punto de acción hormonal aunque los mecanismos de dicha regulación todavía no fueron elucidados.

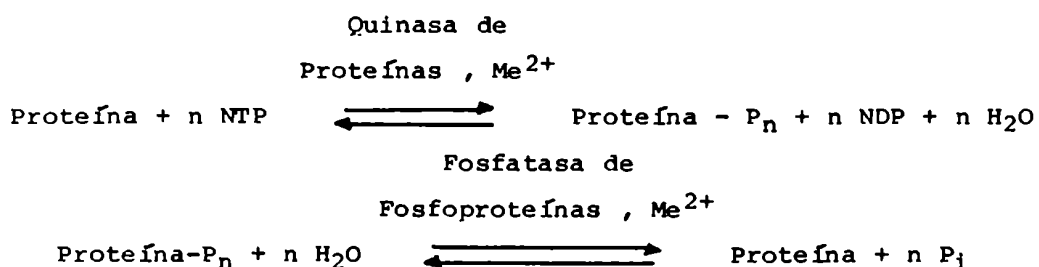
El sistema de acción hormonal es un sistema de amplificación dado que un aumento de concentración de hormona entre 10^{-10} y 10^{-8} M provoca un aumento de concentración de AMP cíclico de 10^{-8} a 10^{-5} M y éste a su vez da lugar a cambios de concentración de metabolitos que se encuentran en concentraciones de 10^{-4} - 10^{-3} M. De este modo se produce una amplificación de señal de 100 000 000 de veces.

metabólicas. En el año 1968 Walsh, Perkins y Krebs (7) descubrieron las quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico. Este hallazgo provocó un intenso estímulo en el estudio del control de la actividad biológica de las proteínas a través de reacciones de fosforilación-desfosforilación, así como de los agentes responsables de las mismas: las quinasas de proteínas y las fosfatasas de fosfoproteínas.

B. Modificaciones covalentes de proteínas y fosforilación

Si bien existe más de un centenar de modificaciones post-traduccionales de proteínas que involucran reacciones que dan lugar a derivados de los residuos aminoácidos por formación de enlaces covalentes, sólo pocos de ellos resultan reversibles en condiciones fisiológicas. Dichos procesos son los siguientes: (a) fosforilación-desfosforilación, descubierto por primera vez para la fosforilasa de glucógeno (8,9); (b) acetilación-desacetilación (10); (c) adenilación-desadenilación (11); (d) metilación-desmetilación (12); y (e) conversiones sulfhidrilo-disulfuro.

Las reacciones de fosforilación catalizadas por las quinasas de proteínas y de desfosforilación catalizadas por las fosfatasas de fosfoproteínas se esquematizan en las siguientes ecuaciones:



La reacción de fosforilación requiere la presencia de un metal divalente que en la mayoría de los casos es Mg^{2+} o Mn^{2+} , siendo el sustrato de la reacción el nucleótido trifosfato Mg ATP^{2-} ó Mn ATP^{2-} respectivamente, aunque existen algunas quinasas que pueden utilizar GTP (13,14). Los gru-

pos fosfato se transfieren generalmente a serina o treonina aunque algunas quinasas específicas pueden hacerlo a histidina, lisina (15) o tirosina (16).

C. Clasificación de las quinasas de proteínas

La mayor parte de las quinasas de proteínas es modulada por interacción directa con agentes reguladores que son mensajeros de señales provenientes desde el exterior de la célula. Se ha podido establecer una clasificación basada en dicho criterio. La quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico fue la primera nombrada refiriéndose al modulador (7). En músculo de langosta marina (17) se descubrió una quinasa de proteínas dependiente de GMP cíclico (Fig. 1) que luego se encontró también en mamíferos (18, 19). La tercera clase de enzimas que apareció en la clasificación fue la de quinasas de proteínas dependientes de Ca^{2+} (20,21). Finalmente la última clase en agregarse a la familia de quinasas dependientes de algún modulador, fue la que aparece en células tratadas con interferón y en lisados de reticulocitos: la quinasa de proteínas dependiente de RNA de cadena doble (22,23).

Existe además un grupo de quinasas a cuya actividad no le ha sido asignada una dependencia de algún factor y por ello se las designa como quinasas de proteínas independientes. Estas quinasas se clasifican simplemente por sus sustratos proteicos.

D. Quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico

En las fracciones solubles de células de mamíferos se encuentran por lo menos dos clases diferentes de quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico, variando sus proporciones relativas según el tejido y la especie analizados. Ambas isoenzimas, llamadas tipo I y II (por su orden de elución de la DEAE-celulosa), son proteínas tetraméricas cuya actividad qui-

nasa es estimulada por el AMP cíclico que provoca la disociación de la holoenzima inactiva (R_2C_2) en una subunidad regulatoria dimérica que une AMP cíclico (R_2) y dos subunidades catalíticas activas (C) (24,25).



Las subunidades catalíticas de ambas isoenzimas tienen pesos moleculares, composición de aminoácidos y especificidades de sustrato muy similares. Esto indicaría que se trata de una subunidad común a ambos tipos, siendo 40 000 el peso molecular de la misma. Las subunidades regulatorias difieren en sus pesos moleculares siendo 49 000 para el tipo I y 56 000 para el tipo II (25,26).

Las principales diferencias entre ambos tipos se refieren a su localización celular y al comportamiento de la subunidad regulatoria frente al ATP. En músculo cardíaco casi toda la enzima de tipo II está unida a membrana (27,28), mientras que la tipo I se encuentra en el citosol (Fig. 3). Por otro lado la enzima de tipo II se autofosforila en presencia de ATP (29), incrementando la sensibilidad de la enzima al AMP cíclico (26). La subunidad catalítica transfiere un fosfato a cada polipéptido de la subunidad regulatoria (R_2) (Fig. 4). Esta modificación hace que la concentración de AMP cíclico necesaria para la disociación sea menor y al mismo tiempo disminuye la velocidad de reasociación en ausencia del nucleótido (30).

La quinasa tipo I, si bien no es modulada por autofosforilación, es regulada por un mecanismo que involucra también al ATP (Fig. 4). La enzima no disocia una o dos moléculas de ATP con muy alta afinidad, lo cual reduce su afinidad por el AMP cíclico, siendo entonces necesaria una mayor concentración de segundo mensajero para su disociación y activación. El ATP provoca además un aumento de la velocidad de reasociación en ausencia de nucleótido cíclico. Como el ATP se encuentra en concentraciones celulares bastante altas, este proceso eleva el requerimiento de AMP cíclico

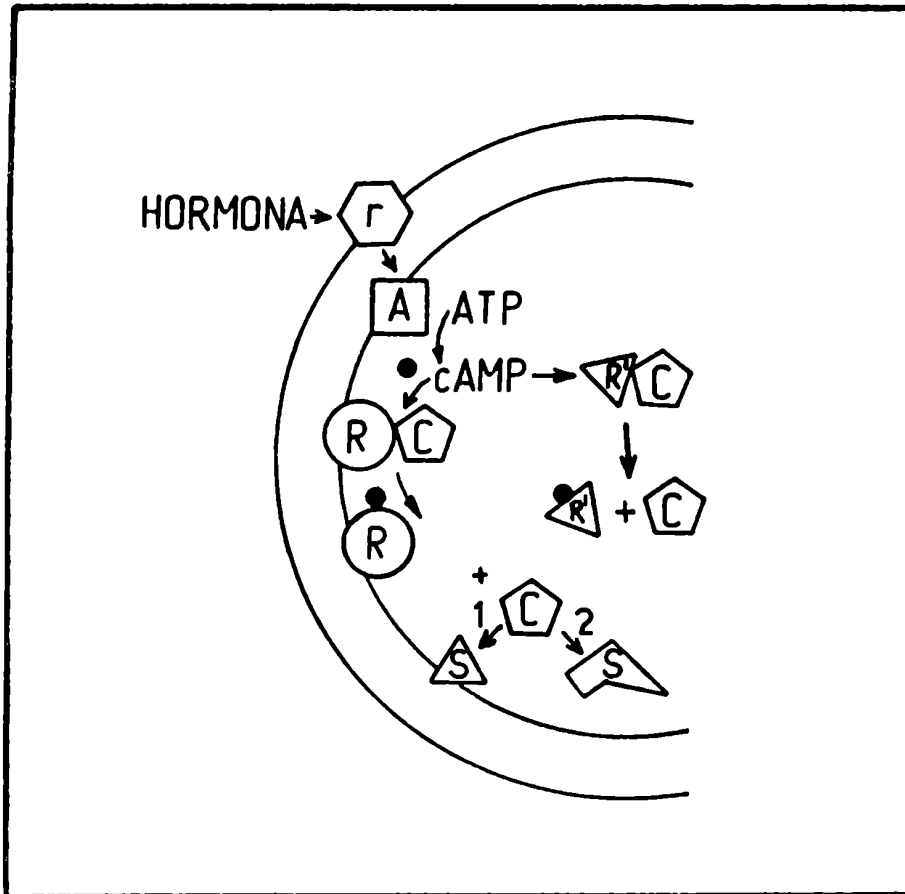


Figura 3. Modelo propuesto por Corbin (28) para el mecanismo de acción hormonal. Este modelo, en el que se amplía el modelo de Sutherland (Fig. 2), propone la compartimentalización de las quinasas de proteínas. La subunidad reguladora (R) de la quinasa de tipo II estará unida a la cara interna de la membrana plasmática, mientras que la de tipo I (R') estará libre en el citoplasma. De este modo la subunidad catalítica (C) (que es común a ambas) podría actuar de modo más eficiente sobre sustratos proteicos (S) localizados en la membrana como primera respuesta a la acción hormonal.

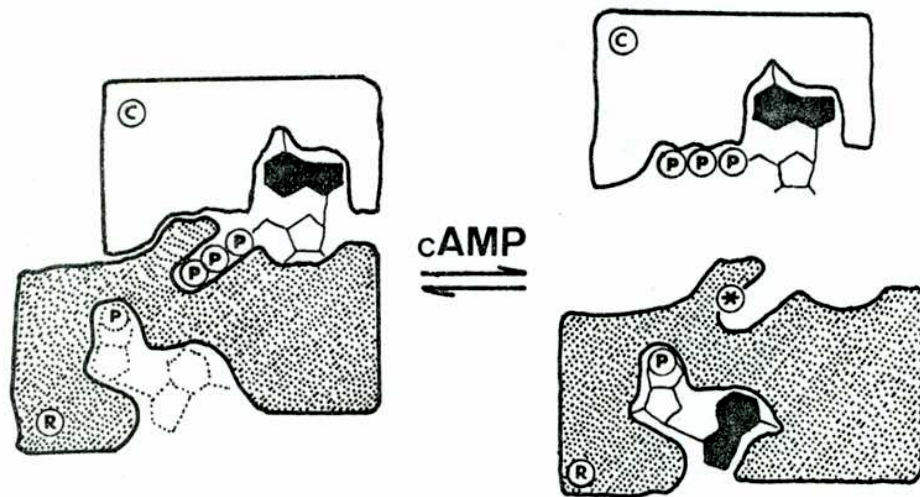
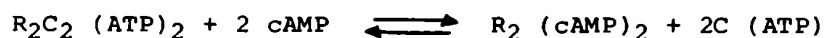


Figura 4. Mecanismo propuesto para la activación de la quinasa de proteínas de tipo I. En la célula viva altos niveles de AMP cíclico causan la disociación y activación de la enzima: el nucleótido cíclico se une con alta afinidad al sitio $R_{(I)}$ y la subunidad C transfiere el fosfato γ del ATP a sus proteínas sustrato. La reducción de los niveles de AMP cíclico lleva a la formación de las moléculas asociadas de enzima ($R_{(I)2}C_2$). A través de esta asociación el sitio para el sustrato ATP de C se convierte en un sitio de alta afinidad para el nucleósido trifosfato para lo cual contribuye también R . Esta transformación del sitio del ATP causa la inhibición de la actividad fosfotransferasa. Por otra parte, el sitio de alta afinidad para AMP cíclico en la subunidad $R_{(I)2}$ libre queda transformado en un sitio de baja afinidad por causa de la reasociación. Si la enzima es de tipo II, el asterisco marca el sitio de posible fosforilación. La incorporación de fosfato en dicho sitio de $R_{(II)}$ induce la disociación de la quinasa y podría inhibir el "binding" de alta afinidad del ATP a la holoenzima $R_{(II)2}C_2$.

necesario para la activación. Esto significa que en condiciones fisiológicas la concentración necesaria de AMP cíclico para activar esta quinasa está en el orden de micromolar, mientras que "in vitro", en ausencia de ATP la disociación de la holoenzima ocurre a concentraciones del orden nanomolar (24,31). En la célula viva, la ecuación de activación de la quinasa de tipo I sería:



La existencia simultánea de dos quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico implicaría diferentes papeles fisiológicos de acuerdo a sus distintas subunidades regulatorias. Las del tipo I serían más sensibles a un aumento de AMP cíclico que las del tipo II. Estas últimas se reasocian más rápidamente al bajar los niveles del nucleótido (27). Dicha reasociación podría ser acelerada por la hidrólisis de los fosfatos unidos a R catalizada por una fosfatasa de fosfoproteínas (32).

En las fracciones particuladas de células de mamíferos se encuentra hasta un 5% de la actividad total de quinasa dependiente de AMP cíclico (33). Esta actividad unida a membrana puede ser solubilizada con Tritón X-100. En ciertos tejidos se obtiene una enzima con propiedades cromatográficas en DEAE-celulosa, intermedias entre las quinasas tipo I y tipo II. La distinta especificidad por los sustratos proteicos de esta quinasa integrada a las membranas apoyaría la hipótesis de que se trata de una entidad diferente a las enzimas solubles.

-Inhibidores proteicos

Las quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico son inhibidas por factores proteicos termoestables. El inhibidor más estudiado fue el de músculo de conejo, el cual fue purificado a homogeneidad (34). Su peso molecular resultó ser 11 300 y se une a la subunidad catalítica de la

quinasa con una $I_{0,5}$ de $2 \cdot 10^{-9}$ M. La inhibición es competitiva respecto de los sustratos proteicos. La concentración de inhibidor en el tejido permite bloquear el 20% de la actividad dependiente de AMP cíclico (35). Este hecho implicaría un posible papel regulador cuando la concentración intracelular de dicho nucleótido se encuentra en niveles cercanos a los basales, pero no cuando se encuentra incrementada (36). Por otra parte, las cantidades de inhibidor en la célula pueden variar si se la somete a distintas condiciones fisiológicas (37,38).

Un segundo inhibidor de las quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico fue aislado y caracterizado en testículo de rata. Este polipéptido de peso molecular 26 000 es ácido y también inhibe a la fosfodiesterasa de AMP cíclico (39). En cerebro se encontró un tercer tipo de inhibidor que inhibe varias clases de quinasas de proteínas (40).

-Especificidad

La quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico fosforila a la quinasa de la fosforilasa (7), y sus preparaciones parcialmente purificadas pueden fosforilar una gran cantidad de proteínas "in vitro", entre las cuales se pueden destacar: protaminas y caseína (7), histonas (41,42) y fosvitina (42).

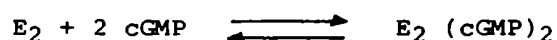
Si bien en un principio se pensó que la configuración tridimensional del sustrato proteico dirigía la especificidad de las quinasas (43), esta teoría fue descartada al encontrarse que dichas enzimas fosforilan también pequeños péptidos (44). Además, las proteínas desnaturalizadas resultan ser mejores sustratos (45). De estos últimos resultados se dedujo que la estructura primaria del sustrato es el factor determinante de la especificidad. Existen dos tipos principales de secuencias de reconocimiento en los sustratos naturales de estas quinasas (46):

(a) Lis-Arg-X-X-Ser(P) y (b) Arg-Arg-X-Ser(P)

En el caso (a) la serina se encuentra a tres lugares de un par de aminoácidos básicos en la dirección C terminal. En el caso (b) la serina fosforilada se encuentra a dos lugares de un par de aminoácidos básicos en la misma dirección. Generalmente aparecen aminoácidos hidrofóbicos a ambos lados de la serina fosforilada. Si bien algunos péptidos son mejores sustratos que algunas proteínas naturales, es probable que las enzimas reconozcan algunas conformaciones preferenciales en dichas proteínas. Por otro lado, en gran número de proteínas, las secuencias en que se encuentran los sitios de fosforilación están en forma de plegamiento β (47).

D. Quinasas de proteínas dependientes de GMP cíclico

Aunque en principio sólo se encontraron en artrópodos (48), también las células de mamíferos contienen tales quinasas de proteínas dependientes de GMP cíclico (49,50). La enzima de pulmón de ternero es un dímero de peso molecular 165 000 formado por dos subunidades idénticas de peso molecular 81 400 (51). La actividad de unión del nucleótido cíclico y la catalítica se encuentran sobre el mismo polipéptido (19) (Fig. 5).



El GMP cíclico estimula la actividad quinasa actuando en concentraciones de orden nanomolar. Para que la activación sea máxima se necesitan altas concentraciones de Mg^{2+} (52) y de fosfato (49), además de agentes reductores (53) y en algunos casos un modulador proteico (54). Por otra parte estas quinasas pueden fosforilarse a sí mismas (55).

-Moduladores proteicos

Las quinasas de proteínas dependientes de GMP cíclico son generalmente moduladas por factores proteicos termoestables. Uno de los activadores más

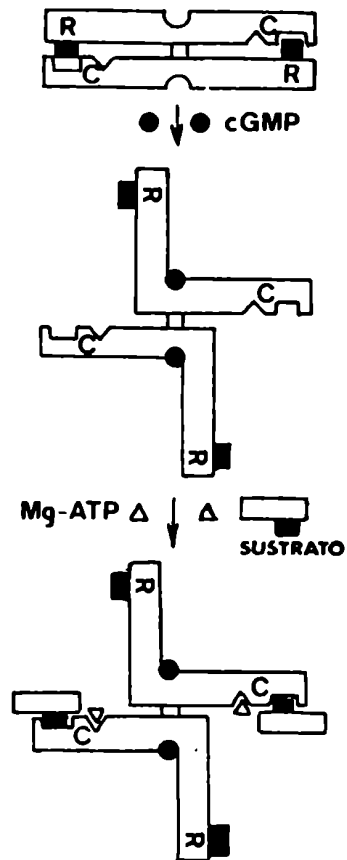


Figura 5. Modelo de acción de la quinasa de proteínas dependiente de GMP cíclico. En cada una de las cadenas del dímero se pueden definir una zona regulatoria (R) y una zona catalítica (C).

estudiado fue el de músculo de langosta marina (56). Su peso molecular resultó ser de 34 000 y mostró tener distinto efecto de acuerdo al tipo de quinasa y a la proteína usada como sustrato aceptor de fosfatos.

Cuando se usa histona rica en arginina como sustrato, el modulador estimula a la enzima dependiente de GMP cíclico e inhibe a la dependiente de AMP cíclico. Sin embargo si el sustrato es histona rica en lisina, ambas quinasas son inhibidas, y si es protamina, ambas resultan estimuladas. En mamíferos el inhibidor de la quinasa dependiente de AMP cíclico es una entidad diferente al activador de la dependiente de GMP cíclico (57). La distribución de estos moduladores depende de cada tejido, mientras en algunos sólo se encuentra uno de ellos (58,59), en la mayoría hay cantidades comparables de ambos.

-Especificidad

La especificidad de las quinasas de proteínas dependientes de GMP cíclico respecto de sustratos proteicos es similar aunque no idéntica a la presentada por las enzimas dependientes de AMP cíclico.

Trabajos hechos con péptidos sintéticos muestran que los determinantes de la secuencia lineal de aminoácidos no son idénticos (60,61). El ejemplo mejor analizado corresponde a las serinas 32 y 36 de la histona H2B (62).

Por otro lado se ha demostrado la existencia de proteínas de membrana muscular cuya fosforilación se estimula específicamente por GMP cíclico (63).

F. Quinasas de proteínas dependientes de Ca²⁺

El requerimiento de concentraciones fisiológicas de Ca²⁺ para la actividad quinasa de la fosforilasa de músculo (64,65) fue el primer indicio de la existencia de este tipo de quinasas. La quinasa de la cadena ligera de la miosina también resultó ser una enzima dependiente de Ca²⁺ (66).

Ambas actividades quinasa han demostrado que adquieren su dependencia hacia el Ca^{2+} a través de su interacción con el modulador dependiente de Ca^{2+} de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (67,68). Por otra parte, esta enzima puede autofosforilarse (69).

-Modulador proteico

El calcio actuaría sobre las quinasas de proteínas a través de un factor proteico termoestable que fue descubierto en primera instancia como activador de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (70). Dicho factor, llamado calmodulina, se ha encontrado en todos los tejidos de mamíferos estudiados y actúa a múltiples niveles como se detallará más adelante. En el caso de la quinasa de fosforilasa, este modulador aparece estrechamente unido a la holoenzima durante los distintos pasos de purificación (68).

-Especificidad

Para la quinasa de la fosforilasa, el sustrato fisiológico es la fosforilasa b de glucógeno. Pero "in vitro" sería capaz de fosforilar otros sustratos (71,72). La secuencia fosforilada de la fosforilasa a de músculo de conejo es (73):

Ser-Asp-Glu-Glu-Lis-Arg-Lis-Glu-Ile-Ser(P)-Val-Arg-Gli-Leu

Los seis primeros aminoácidos no son indispensables, pero los que siguen son determinantes de la especificidad (74). La arginina que está a dos lugares en el sentido C terminal es crítica ya que es un determinante negativo para la quinasa dependiente de AMP cíclico (75). Los péptidos sintéticos no son buenos sustratos lo que en este caso indicaría una mayor importancia de la estructura terciaria .

Respecto de la quinasa de la cadena liviana de la miosina, se puede decir que "in vitro" puede fosforilar otras proteínas (21) y que la secuencia de aminoácidos de su sustrato no revela por sí misma ningún determinante de especificidad (76).

G. Quinasas de proteínas independientes de nucleótidos cíclicos y Ca^{2+}

En cerebro de rata se ha encontrado una quinasa que fosforila protamina en forma preferencial y en alguna medida histona (77). Este tipo de enzima ha sido encontrado también en otros tejidos (78). Aunque se ha descrito que estas quinasas fosforilan tubulina, aún no se conoce su verdadero papel fisiológico (79).

Las quinasas que fosforilan caseína bovina y fosvitina de yema de huevo, llamadas quinasas de fosfoproteínas, se han encontrado primero en hígado de rata y luego en otros tejidos de mamíferos (80-82). Esta última clase de enzimas está asociada principalmente con la cromatina y fosforila entonces fosfoproteínas nucleares (83,84). Las quinasas nucleares de hígado de rata son inhibidas por una proteína ácida termolábil de alto peso molecular presente en los mismos núcleos (85). Mientras algunos oligonucleótidos nucleares resultaron inhibidores de las enzimas de hígado homólogas (85), ciertos polipéptidos básicos se mostraron activadores de las quinasas de caseína hepáticas sin ser sustratos de las mismas (86).

H. Fosfatasas de fosfoproteínas

La actividad fosfatasa de fosfoproteínas que cataliza la desfosforilación de una variedad de sustratos proteicos en forma inespecífica se puede aislar a partir de varios tejidos animales (87-89). Purificada a homogeneidad de hígado (90) y corazón (91), dicha actividad presentó un peso molecular aproximado de 35 000. Esta actividad fosfatasa representaría la porción catalítica de una holoenzima que estaría compuesta por

dos subunidades catalíticas (peso molecular 35 000) y una subunidad de inhibidor (peso molecular 65 000)(46).

La regulación de las fosfatasas de fosfoproteínas puede presentar distintas formas: (a) competencia de varios sustratos por la enzima, (b) interacción no competitiva de modificadores proteicos con la enzima y (c) unión específica de modificadores con los sustratos proteicos. La primera clase de regulación correspondería al efecto inhibitorio de la quinasa de la fosforilasa sobre la desfosforilación de la fosforilasa α (92). El segundo tipo de modulación puede ser ilustrado por medio de los inhibidores termoestables de músculo, llamados inhibidores 1 y 2 (93,94) y por el inhibidor de hígado (95). El inhibidor tipo 1 debe ser fosforilado por una quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico para ser activo (96) (Fig.6). Este modulador se encuentra en concentraciones comparables a las de fosfatasa no específica (97) y ejerce su acción de modo no competitivo respecto del sustrato (98). Un ejemplo de la tercera forma de regulación se ha encontrado en el efecto de la glucosa y glucosa-6-P sobre la configuración de la fosforilasa α que convierte a dicha enzima en mejor sustrato para la fosfatasa de la fosforilasa (99,100). Esta reacción dirigida por sustrato provoca un aumento de la velocidad máxima de hidrólisis de fosfato (101).

Se han encontrado fosfatasas de fosfoproteínas con diferentes especificidades por las sintetasas de glucógeno (102,103). Por otra parte, ha sido posible separar una fosfatasa específica de la subunidad α de la quinasa de la fosforilasa. Se ha postulado la posibilidad de que las fosfatasas con especificidad de sustrato estén compuestas por una subunidad catalítica inespecífica que se combina con distintas subunidades regulatorias que serían las determinantes de especificidad (104).

I. La fosforilación-desfosforilación de proteínas específicas

Numerosos estudios indican que un grupo diverso de agentes regulatorios puede llevar a cabo sus acciones biológicas a través de la fosforilación

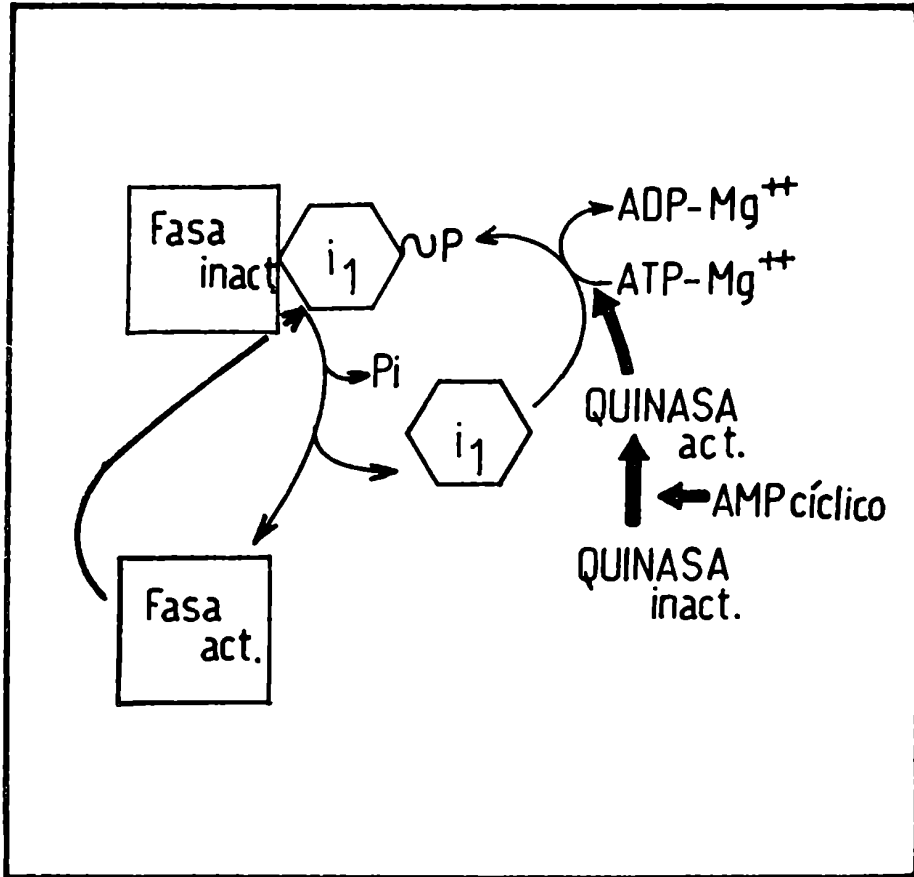


Figura 6. Circuito de regulación de las fosfatasas de fosfoproteínas. La fosfatasa activa se une al inhibidor de tipo I (i_1) que para actuar debe ser fosforilado por una quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico.

de proteínas específicas. En estos procesos mediados por quinasas de proteínas y fosfatasas de fosfoproteínas se podría correlacionar la respuesta biológica de un modo más estrecho con el nivel de fosforilación que con la concentración de un segundo mensajero tal como AMP cíclico, GMP cíclico o Ca^{2+} (105).

Los criterios necesarios para establecer que una proteína sufre un proceso de fosforilación-desfosforilación de significado fisiológico son los siguientes (46): (a) demostración de que la proteína (enzima) puede ser fosforilada "in vitro" a una velocidad detectable por una quinasa de proteínas apropiada y desfosforilada por una fosfatasa de fosfoproteínas; (b) demostración de que las propiedades funcionales de la proteína (enzima) presentan cambios significativos que se correlacionan con el grado de fosforilación; (c) demostración de que la proteína (enzima) puede ser fosforilada y desfosforilada "in vivo" o en sistema de células enteras con los consiguientes cambios funcionales; (d) correlación de los niveles celulares de quinasa de proteínas y/o fosfatasa de fosfoproteínas respecto del grado de fosforilación de la proteína (enzima). En la tabla I se encuentra una lista de enzimas que son reguladas por procesos de fosforilación-desfosforilación.

-Control hormonal del metabolismo del glucógeno

El esquema de los dos mensajeros propuesto por Sutherland (106) implica la transmisión de una señal a través de distintos intermediarios para lo cual se requiere un mecanismo de amplificación. Mientras las hormonas polipeptídicas se encuentran en el rango de 10^{-10} - 10^{-8} M, los cambios de concentración intracelular de AMP cíclico se producen entre 10^{-8} y 10^{-5} y este último puede controlar concentraciones de metabolitos de 10^{-4} a 10^{-2} M.

La fosforilasa de glucógeno de hígado que cataliza la degradación del mismo a glucosa-1-P y resulta activada por adrenalina y glucagon "in

TABLA I

ENZIMAS QUE PARTICIPAN DE PROCESOS DE FOSFORILACION Y DESFOSFORILACION(46)

ENZIMA	INFORMADO EN:
Fosforilasa de glucógeno	1955
Quinasa de fosforilasa	1959
Sintetasa de glucógeno	1963
Lipasa sensible a hormonas	1964, 1970
Fructosa-1,6-difosfatasa	1966, 1977
Pirúvico deshidrogenasa	1969
Hidroximetilglutaril CoA reductasa	1973
Acetil CoA carboxilasa	1973
RNA polimerasa DNA dependiente	1973
Piruvato quinasa	1974
Colesterol ester hidrolasa	1974
Subunidad R de la quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico tipo II	1974
Transcriptasa reversa	1975
Fosfofructoquinasa	1975
Tirosina hidroxilasa	1975
Inhibidor de la fosfatasa de la fosforilasa	1975
Fenilalanina hidroxilasa	1976
Quinasa del factor de iniciación F2	1977
Quinasa de proteínas dependiente de GMP cíclico	1977
Triptofano hidroxilasa	1977
Glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD	1978
Glicerofosfato aciltransferasa	1978

vitro" (107), fue la primera enzima en la que se encontró un efecto mediado por AMP cíclico. Existen dos formas interconvertibles de la fosforilasa, la fosforilasa a (activa) y la fosforilasa b (inactiva). La quinasa de la fosforilasa b fosforila dicha enzima, la cual se convierte en fosforilasa a. Además, la quinasa de la fosforilasa b puede existir en dos formas, una activa fosforilada y otra inactiva desfosforilada. Una quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico es la responsable del pasaje de la forma inactiva a la activa (108).

El esquema del mecanismo de amplificación en "cascada" que da lugar a la activación de la fosforilasa de glucógeno como último evento de la acción hormonal se ve en la Figura 7.

Por otra parte la sintetasa de glucógeno pasa de la forma activa a la inactiva por efecto de la quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico o por efecto de la llamada quinasa 2 de la sintetasa de glucógeno que es independiente de AMP cíclico (109).

La reversibilidad de los procesos de control por fosforilación está garantizada por la presencia de las fosfatasa de fosfoproteínas. La fosfatasa de proteínas tipo III que es multiespecífica puede antagonizar a todas las quinasas que participan en la regulación del metabolismo del glucógeno (110). Por lo menos un inhibidor de la misma, llamado inhibidor 1, debe ser fosforilado por una quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico para ser efectivo sobre la fosfatasa (Fig. 6). Otra actividad, la fosfatasa de fosfoproteínas II, es específica de la quinasa de la fosforilasa (111).

Tal como puede verse en la Figura 8, la acción glucogenolítica mediada por AMP cíclico se efectúa en forma coordinada sobre las enzimas que lo sintetizan y degradan.

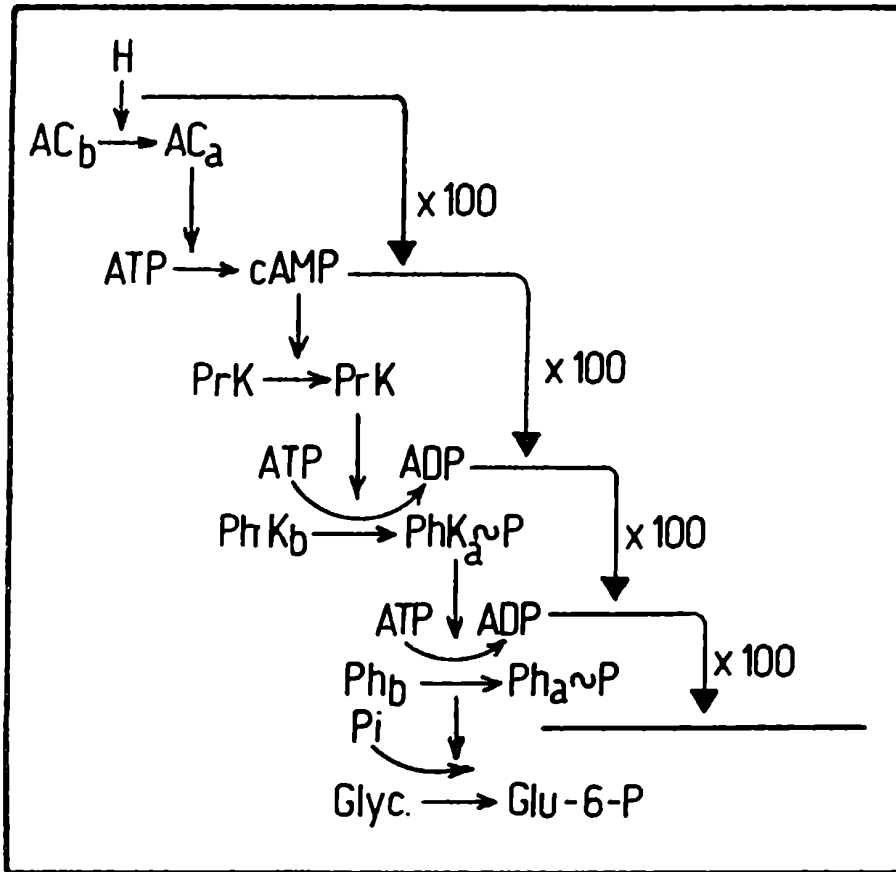


Figura 7. Esquema del mecanismo de amplificación que da lugar a la activación de la fosforilasa. Los símbolos son los usados en las Figs. 2 y 8 a excepción de Glyc (glucógeno) y Glu-6-P (glucosa-6-fosfato).

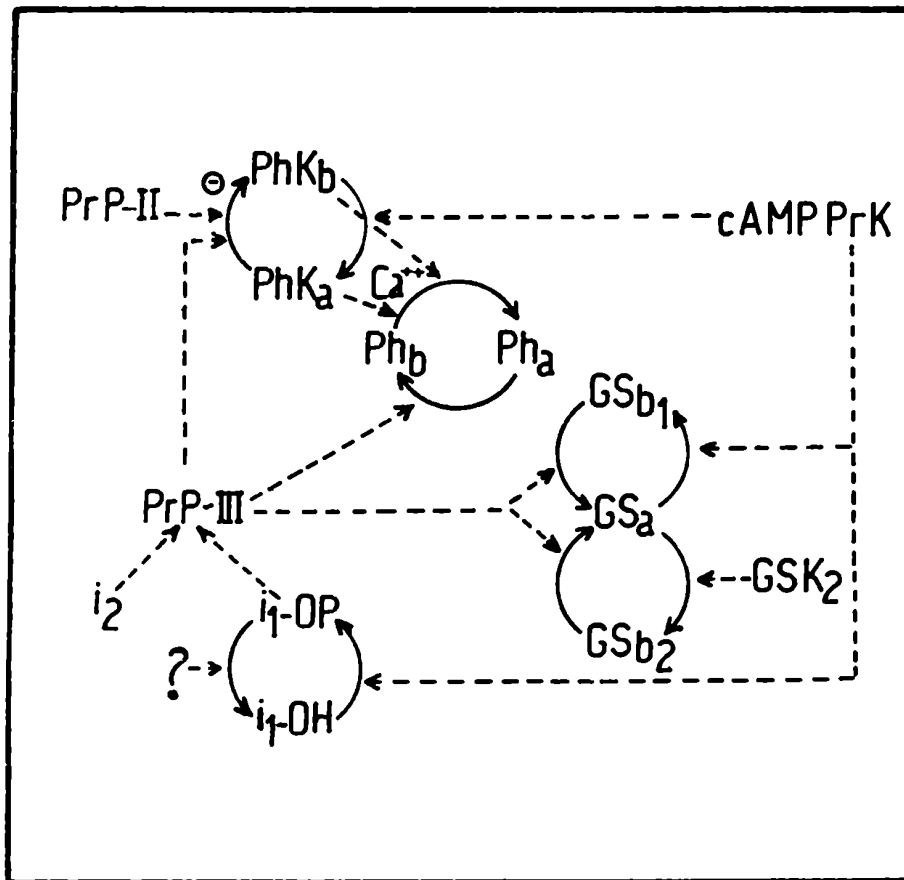
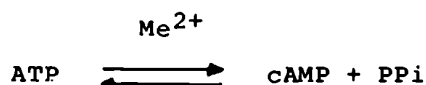


Figura 8. Control del metabolismo del glucógeno en el músculo esquelético de mamíferos. Las formas activas llevan subíndice a y las inactivas b. Los símbolos usados son: Ph (fosforilasa), Ph K (quinasa de la fosforilasa), GS (sintetasa de glucógeno), cAMP PrK (quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico), IP (proteína inhibidora de cAMP PrK), GSK2 (quinasa de la glucógeno sintetasas), PrP-III (fosfatasa de fosfoproteínas III), i₁ e i₂ (inhibidores proteicos fosforilables y no fosforilables de la fosfatasa de fosfoproteínas III).

II. SINTESIS Y DEGRADACION DE NUCLEOTIDOS CICLICOS

A. Adenilato Ciclasa

La adenilato ciclasa es la enzima que cataliza la formación del AMP cíclico según la siguiente reacción:



Los verdaderos sustratos de esta actividad son los complejos Mg ATP^{2-} o Mn ATP^{2-} siendo los metales divalentes activadores de la misma.

Respecto a su localización, se puede afirmar que salvo excepciones se encuentra asociada a las membranas citoplasmáticas (112).

La adenilato ciclasa sensible a hormonas está compuesta por tres subunidades como mínimo (113): la proteína catalítica (C) que es relativamente inactiva y no posee propiedades regulatorias, la proteína ligadora de guanil nucleótidos (G/F) que media la acción de los guanil nucleótidos (114) y del fluoruro (115), y uno o más receptores hormonales (R)(116).

El receptor hormonal presenta el sitio de unión para la hormona en la superficie extracelular y puede haber receptores con distintas especificidades de hormona en la misma célula.

La proteína catalítica tiene baja actividad con Mg ATP^{2-} y no es estimulada por hormonas, F^- o nucleótidos de guanosina.

La proteína ligadora de nucleótidos de guanosina le da a la proteína catalítica la capacidad de utilizar Mg ATP^{2-} como sustrato, presenta unión de F^- y nucleótidos de guanosina permitiendo que modulen la actividad de la subunidad catalítica.

La interacción entre el receptor hormonal y la adenilato ciclasa ha dado lugar a numerosas hipótesis. Cuatrecasas (117) basándose en el concepto de membrana fluida de Singer y Nicholson (118) desarrolló su modelo de receptor móvil (Fig. 9). Los receptores hormonales resultarían, de este

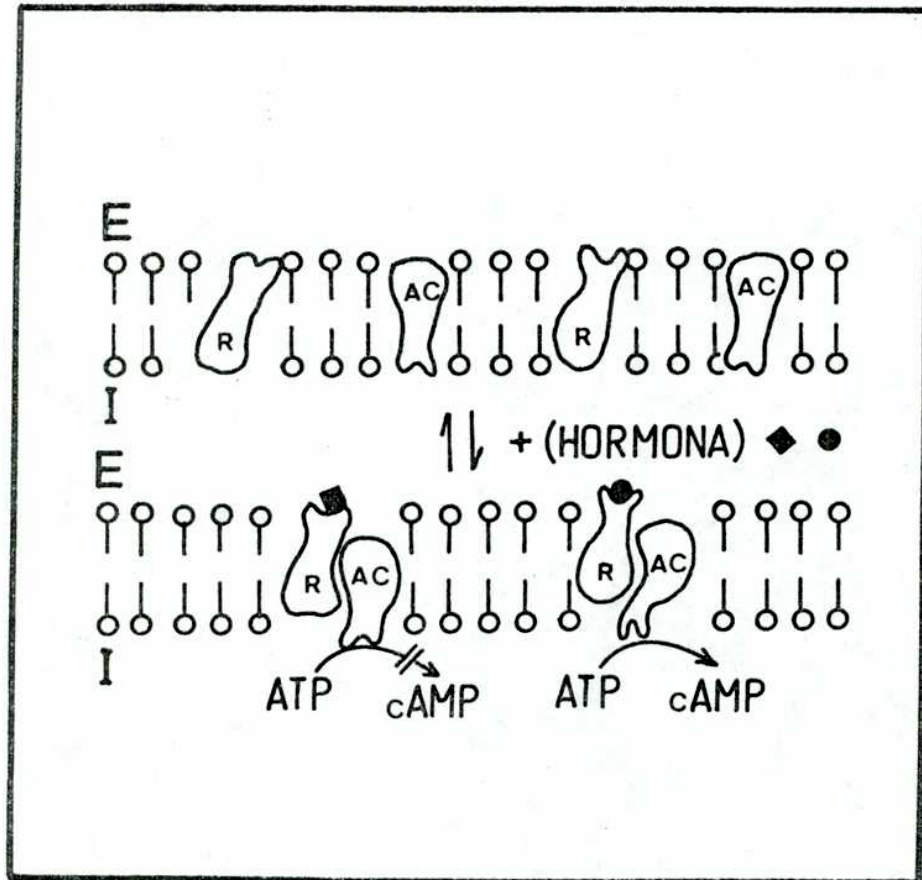
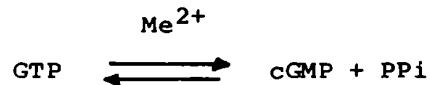


Figura 9. Hipótesis del receptor móvil propuesta por Cuatrecasas para el mecanismo de modulación de la actividad adenilato ciclasa por hormonas. Las hormonas pueden ser activantes (●) o inhibitorias (◆) de dicha enzima. Los símbolos son los usados en la Fig.2.

modo, entidades independientes de la actividad ciclasa. Cuando la hormona se une al receptor, aumentaría la afinidad de este último por enzima, lo que haría posible modificar la actividad de la misma. La probabilidad de un choque entre receptor y enzima existe por causa del libre movimiento de las proteínas integradas a la doble capa lipídica. Schramm y colaboradores comprobaron experimentalmente este modelo transfiriendo, por formación de híbridos celulares, receptores adrenérgicos a una célula que carecía de los mismos pero poseía actividad ciclasa asociada a sus membranas (119).

B. Guanilato Ciclasa

La guanilato ciclasa es la enzima que cataliza la formación del GMP cíclico a partir de GTP según la siguiente reacción (120):



El metal divalente es generalmente Mn^{2+} (121) y el sustrato verdadero el Mn GTP^{2-} . El Mg^{2+} sólo resulta efectivo como activador cuando están presentes bajas concentraciones de Mn^{2+} . En la mayor parte de los tejidos se encontró actividad asociada tanto a fracciones solubles como particuladas. La enzima presente en estas últimas fracciones se expresa a menudo sólo en presencia de detergentes (122).

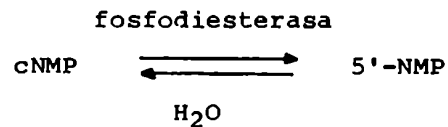
Las propiedades de las actividades en ambas fracciones son diferentes tanto en cuanto a sus requerimientos y cinética como en sus parámetros moleculares, lo que indicaría que cumplen distintos papeles en la regulación del metabolismo (123). Respecto a su estructura en los pocos casos en que se ha purificado a homogeneidad (124,125) se demostró que la enzima está formada por lo menos por dos subunidades diferentes que guardan una relación de pesos moleculares 2:1 y cuyas funciones son desconocidas.

Aún no han sido elucidados los mecanismos generales de regulación de la actividad guanilato ciclasa, si bien cada vez se encuentran más evidencias

de que los niveles de GMP cíclico son influidos tanto por el estado redox de las preparaciones y la formación de radicales libres como por el metabolismo de los ácidos grasos y lípidos. Aunque muchas hormonas pueden inducir la síntesis de GMP cíclico, no se probó que este efecto esté acoplado o asociado a una interacción de un complejo hormona-receptor con la guanilato ciclasa. Por otro lado, los procesos mencionados más arriba podrían ser mediadores de los efectos hormonales sobre dicha actividad ciclasa.

C. Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos son las enzimas que catalizan la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos según la siguiente reacción:



Los nucleótidos cíclicos (cNMP) son AMP cíclico o GMP cíclico y generalmente los metales divalentes Mg^{2+} y Mn^{2+} son estimulantes de la enzima.

-Formas múltiples

A partir del descubrimiento de formas múltiples de fosfodiesterasas en corteza cerebral (126), siempre se han encontrado dos o más formas en todos los tejidos analizados. En extractos de tejidos de mamíferos se han identificado al menos tres diferentes formas de la enzima que difieren en sus parámetros moleculares, cinéticos, especificidades de sustrato y cantidades relativas. El hecho de que sólo una de estas tres formas principales haya sido purificada a homogeneidad deja lugar a la posibilidad de

que las otras actividades estén a su vez compuestas por más de una entidad enzimática.

La primera de estas formas (llamada frecuentemente "de alto K_s ") fue a purificada a partir de corazón (127) y cerebro (128) bovinos, y presenta una velocidad máxima mayor para AMP cíclico que para GMP cíclico. No obstante ello, el K_s para el nucleótido de adenina resultó ser mayor que para el de guanina. Esta enzima, sensible al activador dependiente de Ca^{2+} (70), tiene gráficos de Lineweaver-Burk (129) lineales para ambos sustratos en ausencia o presencia del modulador. Todas las evidencias indicarían que se trata de una sola entidad enzimática que cataliza la hidrólisis de ambos nucleótidos cíclicos (127,128,130). Purificada a homogeneidad en columnas de afinidad de dextrano azul (131) o de activador (132) unidos a agarosa, la enzima de cerebro resultó ser un dímero de peso molecular 120 000 formado por dos subunidades idénticas de peso molecular 60 000.

La segunda clase de fosfodiesterasas (llamada frecuentemente "de bajo K_s " o de "cooperatividad negativa") se encontró en todos los tejidos de mamíferos analizados (133,134). El 90% de esta actividad se encuentra en las fracciones solubles luego de un tratamiento de los extractos con ultrasonido (135). Estas fosfodiesterasas no son sensibles al factor activador, y tienen una selectividad relativa hacia el AMP cíclico. El análisis de los datos cinéticos da lugar a gráficos de Lineweaver-Burk bimodales (136) que pueden ser producto de : (a) varias actividades enzimáticas con distintas afinidades por el sustrato (137), (b) una actividad enzimática con sitios múltiples que interaccionan de modo cooperativo negativo (138) o (c) una actividad enzimática que se agrega en formas que tienen distintas afinidades por el sustrato (139). En este sentido es importante destacar que a bajas concentraciones de enzima en los ensayos se han encontrado gráficos de Lineweaver-Burk lineales (139).

El tercer tipo de fosfodiesterasa no está tan ampliamente distribuido y se distingue porque bajas concentraciones de GMP cíclico estimulan la

hidrólisis del AMP cíclico aunque no sucede el efecto opuesto (133, 140). Si bien la velocidad de hidrólisis es similar para ambos nucleótidos, el GMP cíclico actúa como un activador alostérico para la hidrólisis de AMP cíclico (141).

Además de las fosfodiesterasas solubles, se han encontrado las asociadas a fracciones particuladas. Estudios hechos en riñón de rata (142,143) mostraron que las fosfodiesterasas particuladas son aparentemente proteínas integradas a las membranas, tienen un comportamiento cinético complejo, hidrolizan preferencialmente AMP cíclico, y el GMP cíclico regularía la hidrólisis del AMP cíclico. Por otro lado, las actividades fosfodiesterasa de GMP cíclico generalmente no aparecen asociadas fuertemente a las membranas, exceptuando el caso de la enzima de retina (144). La enzima de retina bovina, purificada a homogeneidad mostró ser una proteína de peso molecular 170 000 formada por una subunidad de 88 000, otra de 84 000 y un péptido asociado de 13 000 (145).

Aún no está claro si las formas moleculares de las fosfodiesterasas observadas "in vitro" existen como entidades en las células intactas. Se ha sugerido que los procedimientos de preparación o una proteólisis limitada podrían dar lugar a la aparición de formas de agregación múltiple (146). Por otro lado la ruptura de los compartimientos celulares en la homogeneización podría provocar la agregación de proteínas (139). Por estos motivos es necesario tener cuidado al comparar resultados obtenidos con enzimas aisladas mediante distintas técnicas, así como en la extrapolación de los resultados "in vitro" a la célula viva (147).

-Inhibidores

Desde que se descubrió que las metilxantinas son inhibidoras de la hidrólisis de nucleótidos cíclicos, han sido usadas para potenciar efectos estimuladores sobre la adenilato o guanilato ciclasa, para aumentar el

efecto del agregado de nucleótidos cíclicos exógenos o para inhibir a las fosfodiesterasas. Las metilxantinas más comunmente usadas son cafeína, teofilina, teobromina, aminofilina, y metilisobutilxantina (MIX) (136).

Existe una gran variedad de inhibidores de las fosfodiesterasas, gran parte de las cuales se utilizan con fines farmacológicos. En la Figura 10 se presentan las variedades más importantes de estos compuestos (148,149).

Diversos péptidos son inhibidores de fosfodiesterasas obtenidas de distintas fuentes. En mucosa estomacal de rana (150), células grasas (151), testículo de rata (152), cerebro bovino (153) y retina bovina (154); se han encontrado compuestos no dializables y termoestables que inhiben a las fosfodiesterasas homólogas de modo no competitivo.

-Efectos de las hormonas

La regulación de la actividad fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos está probablemente sujeta a variados mecanismos de control (147). Muchas hormonas alteran su actividad. En el caso de la insulina se han estudiado sus efectos sobre la enzima, pero se desconoce el papel fisiológico de dichos cambios de actividad (155). Algunas veces la acción de la hormona se ejerce sobre las formas de enzima de alta afinidad unidas a membrana sin que exista síntesis de proteínas (156). Por otro lado las interacciones entre células, factores del suero y condiciones de crecimiento en células en cultivo pueden alterar los parámetros cinéticos de las fosfodiesterasas por mecanismos independientes de la síntesis proteica (157,158). Sin embargo la activación de la enzima de células BHK por insulina es sensible a los inhibidores de síntesis de proteínas (147). Además los mismos nucleótidos cíclicos son capaces de afectar sus propias velocidades de hidrólisis así como las de otros nucleótidos en forma independiente (159) o dependiente (160,161) de la inducción de nueva enzima.

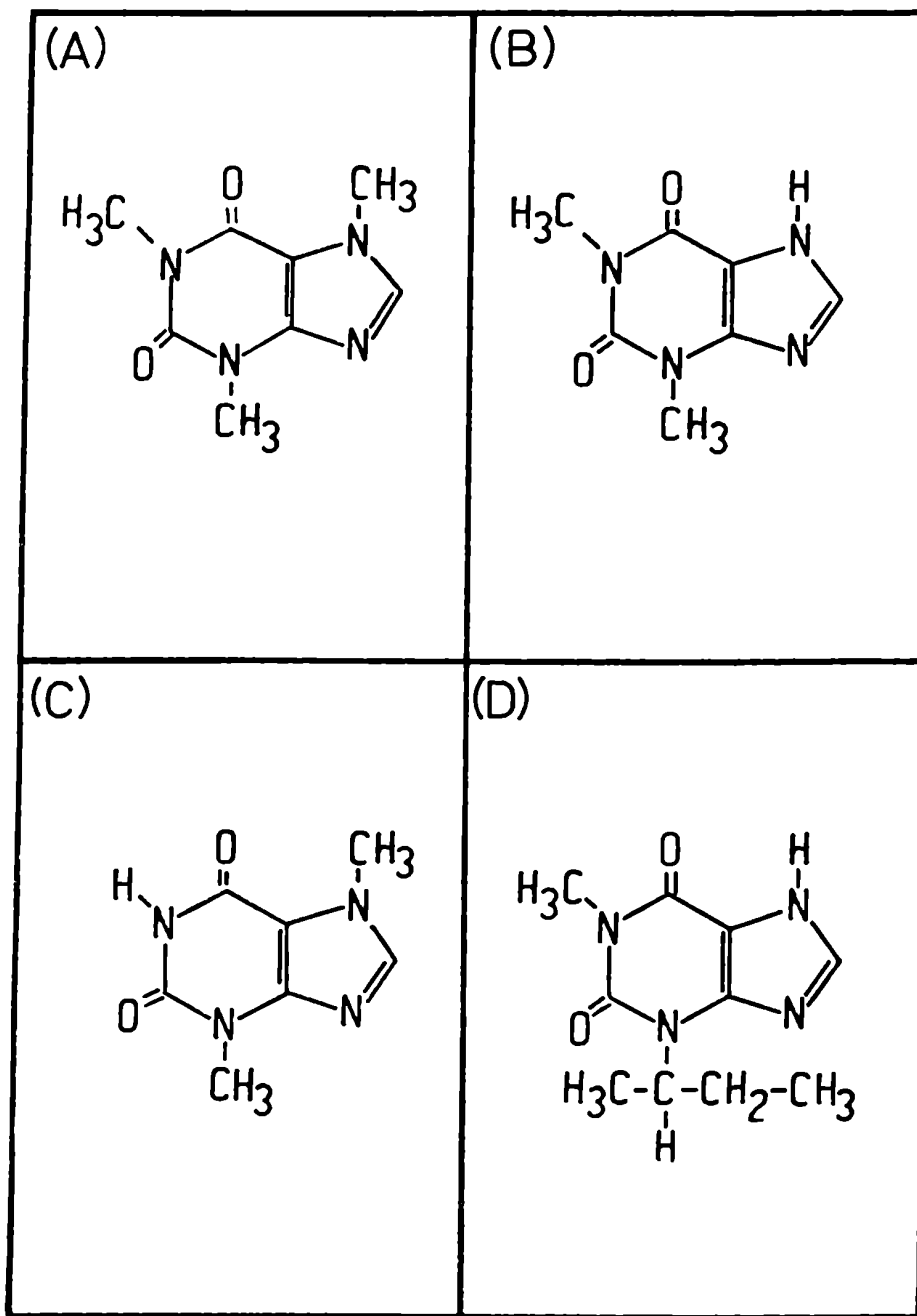
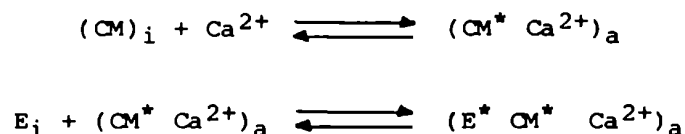


Figura 10. Estructura de metilxantinas: cafeína (A), teofilina (B), teobromina (C), metilisobutilxantina (D).

D. Calmodulina

Durante la purificación de la fosfodiesterasa de cerebro bovino, Cheung (162) encontró que un factor activador endógeno se disociaba de la enzima. Este modulador requiere la presencia de Ca^{2+} para su acción (163) y es capaz de actuar sobre diversas actividades enzimáticas, como puede observarse en la Tabla II (164). En base a su requerimiento absoluto de Ca^{2+} (posee 4 sitios de unión por molécula con K_d 10 μM) y de ser probablemente el principal receptor intracelular del mismo, el factor fue llamado calmodulina. En cuanto a su distribución, fue hallado en todos los tejidos de organismos eucariotes. Es un polipéptido de peso molecular 18 000, de carácter ácido y estructura flexible (165). el ión Ca^{2+} al unirse al péptido provoca un cambio conformacional en el mismo que resulta en un aumento de la porción helicoidal de la molécula (166). El mecanismo general de acción de la calmodulina sobre una enzima E consta de dos etapas:



Donde CM es la calmodulina, el asterisco (*) indica un cambio conformacional, el subíndice i indica un estado inactivo y el a uno activo.

Tanto el EGTA que compleja el Ca^{2+} como el agente antipsicótico trifluoroperazina que se une al complejo Ca^{2+} -calmodulina, son inhibidores de la activación dependiente de Ca^{2+} . Por otro lado, existen dos proteínas ligadoras de Ca^{2+} de estructura y función relacionada a la calmodulina, la troponina C y las parvalbúminas (167,168). La calmodulina actúa sobre la fosfodiesterasa sensible a Ca^{2+} y con preparaciones purificadas de la misma se ha demostrado la formación del complejo activo (holoenzima) en presencia de Ca^{2+} : $(\text{CM})_2\text{X}_2$, donde CM es calmodulina con Ca^{2+} unido y X_2 es el dímero que forman las dos cadenas polipeptídicas de la actividad fosfo-

TABLA II

ENZIMAS Y PROCESOS CELULARES REGULADOS
POR CALMODULINA (164)

Adenilato ciclasa

Guanilato ciclasa

Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

Quinasa de proteínas dependiente de Ca^{2+}

Quinasa de la fosforilasa

Quinasa de la cadena ligera de la miosina

Fosforilación de membranas

ATP trifosfatasa dependiente de Ca^{2+}

Fosforilasa A_2

Quinasa de NAD

Desarmado de microtúbulos

Liberación de neurotransmisores

Funciones postsinápticas

Funciones nucleares

diesterasa (131).

Una proteína termolábil hallada en cerebro tiene una alta afinidad por el complejo Ca^{2+} -calmodulina y resulta inhibidora del efecto activador del Ca^{2+} (169). Dicha proteína, llamada ahora calcineurina (170), ha sido postulada como un posible regulador del efecto del Ca^{2+} a través de la calmodulina.

Por otra parte, en cerebro de rata, la calmodulina se encuentra principalmente asociada a las fracciones microsomales. Este activador puede ser liberado de las membranas presentes en dichas fracciones por la fosforilación de las mismas a través de una quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico (171). Este efecto sería muy importante para disminuir los niveles del nucleótido después de la activación postsináptica de la adenilato ciclasa.

III. EL CICLO DE VIDA DE NEUROSPORA CRASSA

A. Clasificación

Neurospora crassa hongo de la familia Sordariaceae de la subclase Euascomycetideae pertenece a la clase Ascomycetes. El hongo es normalmente haploide durante todas sus fases de crecimiento, excepto en la formación del efímero cigoto diploide en un eventual ciclo sexual. En el estado haploide el núcleo contiene siete cromosomas (grupos de ligamiento) en los cuales el 90% del DNA se presenta en secuencias únicas (172,173), 8% es repetitivo y el 2% restante consiste en DNA palindrómico que se renaturaliza consigo mismo en forma de horquillas. La cromatina está organizada en estructuras similares a los nucleosomas pero más pequeñas que en eucariotes superiores (174). Las histonas H1 (175), H2A, H2B, H3 y H4 (176) fueron identificadas cuando se aisló cromatina en condiciones que impedían la proteólisis.

B. Requerimientos nutricionales

Neurospora (177) puede crecer a su máxima velocidad con sólo una fuente de energía (carbohidrato), sales minerales y una vitamina, la biotina. Las fuentes de carbono más usadas han sido: glucosa, manosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, celobiosa y trehalosa. El ión sulfato es buen proveedor de azufre aunque también pueden usarse: tiosulfato, metionina, taurina, ácido cisteico y otros compuestos sulfurados. Sólo el fosfato inorgánico resulta buena fuente de fósforo. El nitrógeno puede tomarlo del ión amonio, ión nitrato, urea, amidas, purinas o aminoácidos. Potasio, magnesio, hierro así como trazas de otros elementos son necesarios para el normal desarrollo del hongo. Puede crecer en un rango de pH de 4.0 a 7.5. El óptimo de temperatura está entre 30 y 35°C aunque crece incluso a muy bajas (5°C) o muy altas (42°C).

Neurospora es un organismo aeróbico absoluto y no es patógeno en humanos, animales o vegetales.

C. Ciclo de reproducción asexual

-Propiedades de las conidias

Neurospora (178) puede producir por mitosis dos tipos de esporas asexuales, las macroconidias (llamadas generalmente conidias) y las microconidias. En el laboratorio las cepas salvajes producen abundantes cantidades de macroconidias. Estas esporas multinucleadas (2,5 núcleos/conidia de promedio) de color naranja, son producidas por brotación en los extremos de hifas aéreas especializadas (179). Cada conidióforo lleva una larga ristra lineal de conidias (180). Las conidias se producen en grandes cantidades, gran parte de la masa del micelio se convierte en estas esporas asexuales cuando llega a la fase estacionaria. Son muy resistentes a la desecación y pueden guardarse indefinidamente con silicagel. Sin em-

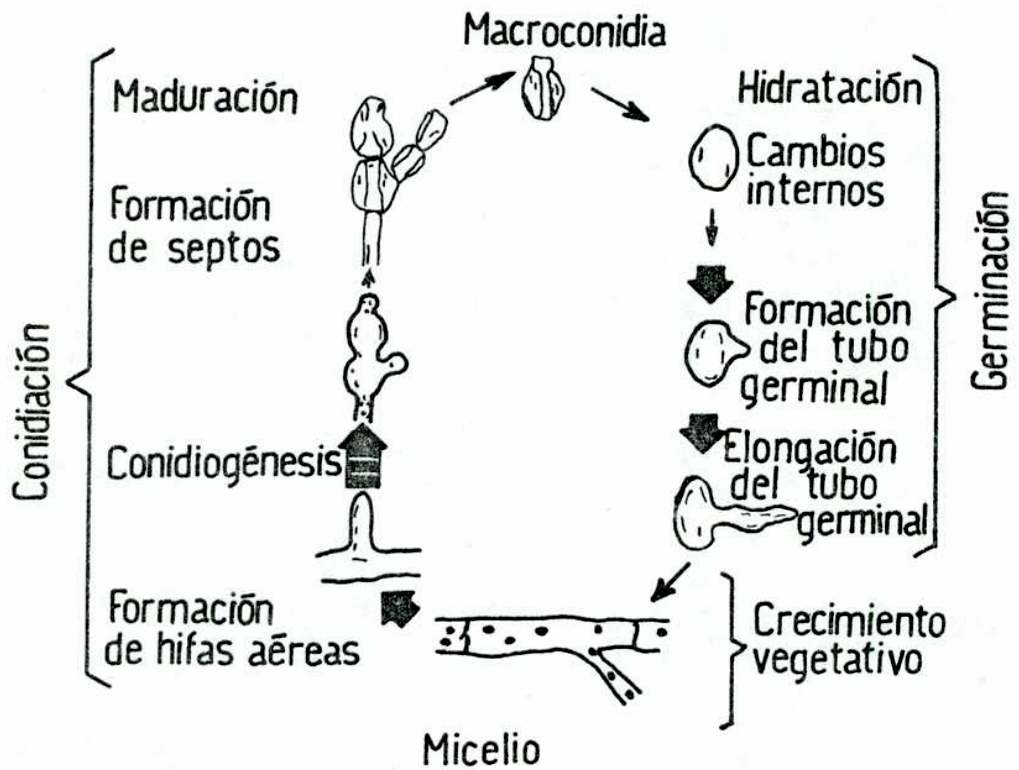


Figura 11. Ciclo de vida asexual de *Neurospora crassa*. Las flechas gruesas continuas indican los pasos posiblemente estimulados por el AMP cíclico mientras que las punteadas los posiblemente inhibidos por el nucleótido.

barco con alta humedad sobreviven sólo 1 ó 2 meses a temperatura ambiente. Son totalmente indiferentes al congelamiento, desecadas resisten altas temperaturas y no se afectan por tratamientos con concentraciones moderadas de ácido.

Las microconidias aparecen en cultivos hechos sobre agar en su fase estacionaria tardía. Son excretadas directamente de las células del micelio, son uninucleadas y obviamente más pequeñas que las macroconidias. Se producen en baja cantidad y su viabilidad es errática (181).

-Germinación

(a) Las conidias maduras antes de ser suspendidas en agua parecen encogidas y arrugadas (182). La hidratación es un proceso pasivo que las vuelve relativamente lisas y de forma ovoidal.

(b) Ocurren cambios internos que requieren energía sea de origen interno o externo.

(c) Un tubo germinal de forma cilíndrica emerge de la macroconidia. Este proceso requiere una fuente externa de carbono y sales inorgánicas (183).

(d) El tubo germinal crece y sus requerimientos son los necesarios para el crecimiento del micelio.

-Crecimiento vegetativo

La fase de crecimiento vegetativo del hongo puede mantenerse casi indefinidamente transfiriendo una parte del micelio a medio fresco. En esta fase el hongo se presenta como un entretejido de hifas cilíndricas tabicadas de 5 μm de diámetro. Los tabiques transversales no son completos, tienen en el centro un poro por donde se continúan las membranas plasmáticas de las células adyacentes. Núcleos y otros materiales granulares pueden fluir de las regiones más viejas del hongo hacia los extremos

en crecimiento. Las hifas se alargan principalmente por crecimiento apical y las zonas más antiguas pueden eventualmente vacuolizarse y cargarse de gotas de lípidos.

Normalmente N. crassa dobla su peso en 2,5 h (184) y la velocidad de extensión lineal de un micelio en medio sólido y condiciones óptimas puede llegar a 0.6 cm/h. Cuando llega a cierta longitud, la hifa se ramifica y esto produce la clásica estructura del micelio.

-Conidiación

(a) La formación de conidias comienza con la aparición de hifas aéreas especiales distintas de las vegetativas.

(b) La conidiogénesis se produce por brotación en los extremos de las hifas aéreas. Se pueden producir muchos brotes por extremo, dando lugar a la aparición de cadenas de conidias.

(c) Se producen tabiques que transforman a las conidias en células separadas.

(d) Las conidias maduran durante tres días. Durante dicho período no germinan con la velocidad normal.

D. Ciclo de reproducción sexual

Neurospora es un organismo heterotálico. Existen dos tipos de micelio, llamados A y a, y no hay apareamiento si no están ambos presentes.

Aunque el fenotipo es idéntico, las dos alternativas están determinadas por un par de alelos que están en un único locus, el locus del tipo de apareamiento. En ambos micelios pueden desarrollarse estructuras masculinas y femeninas, pero la fecundación sólo ocurre entre estructuras de distinto tipo.

Cuando se inocula Neurospora sobre un medio sólido que carece de algunos nutrientes, algunas hifas se transforman en un órgano especializado,

el ascogonio, que está rodeado por células diferenciadas. Esta estructura femenina es el protoperitecio. El ascogonio es una célula globosa, con numerosos núcleos haploides, que emite una prolongación filiforme llamada tricógino. El tricógino funciona como pelo receptor de las células masculinas. Cuando una conidia, microconidia o hifas de micelio de tipo de apareamiento opuesto se deposita en el tricógino, un núcleo dador (masculino) es descargado en el ascogonio donde encuentra al núcleo residente (femenino). Los dos núcleos no se fusionan de inmediato. Ambos se dividen simultáneamente y generan cierto número de células que contienen un núcleo de cada tipo. Cuando los núcleos se funden, rápidamente comienza la meiosis. Cada núcleo diploide da origen a cuatro pares de núcleos haploides y cada uno de éstos se divide dando origen a ocho ascoporas o esporas sexuales. En las mismas ascoporas estos núcleos se dividen para dar 16 núcleos. Las ascoporas maduras, de color negro y forma ovoidal, quedan localizadas en una estructura en forma de saco llamado asco. La dimensión de un asco es de 20 a 200 μm y puede haber varios centenares de estos en el cuerpo de fructificación maduro que tiene forma de botella, el peritecio. Las ascoporas son producto de un proceso sexual y como tales deben tener las ventajas producidas por la recombinación de los genes parentales. Por otra parte, el metabolismo es extremadamente lento y pueden estar en estado latente en condiciones de humedad y temperatura mucho más extremas que las conidias. Cuando se dan las condiciones adecuadas, las ascoporas germinan, generando nuevamente el micelio vegetativo.

IV. EL AMP CICLICO Y ENZIMAS RELACIONADAS EN NEUROSPORA CRASSA

A. Regulación de las reservas de glucógeno

Estudios realizados por Takahara y Matsuda (185) y por Fontana y Krisman (186) mostraron que Neurospora sintetiza glucógeno como reserva de

energía. Cultivos hechos en presencia de glucosa como fuente de carbono mostraron un contenido máximo de glucógeno en la fase exponencial tardía, que comenzó a decrecer al consumirse totalmente la glucosa del medio. La actividad iniciadora de la síntesis de glucógeno tuvo un máximo 48 horas antes que su producto. Cuppoletti y Segel (187) en cultivos realizados con sacarosa, encontraron aumento de la actividad fosforilasa de glucógeno al disminuir la concentración del azúcar. Téllez de Iñón, Terenzi y Torres (188) demostraron que la sintetasa de glucógeno de Neurospora aparece en dos formas interconvertibles. La forma I (activa) independiente de glucosa-6-fosfato y la forma D (inactiva) que necesita dicho compuesto para expresar su actividad. "In vitro", la conversión de la forma I a la forma D requiere ATP y Mg^{2+} , y la transformación inversa requiere sólo Mg^{2+} . Además, Téllez de Iñón y Torres (189) estudiaron la fosforilasa de glucógeno. Dicha enzima también se presenta en dos formas interconvertibles, la forma a (activa) y la forma b (inactiva) que necesita 5'-AMP para expresar su actividad. La conversión de la forma b a la forma a ocurre en presencia de ATP y Mg^{2+} , siendo estimulada por AMP cíclico en concentraciones del orden de $0,1 \mu M$.

Finalmente, Téllez de Iñón y Torres (190) identificaron las enzimas que modulan a la fosforilasa de glucógeno: la quinasa de proteínas que actúa sobre la fosforilasa b y la fosfatasa de fosfoproteínas que actúa sobre la fosforilasa a. Dicha fosfatasa también existe en dos formas interconvertibles y nuevamente se requiere ATP y Mg^{2+} para obtener la forma más activa.

El mecanismo de regulación del metabolismo del glucógeno es similar al que ocurre en tejidos de mamíferos y distinto al que tiene lugar en bacterias.

B. Adenilato ciclasa

La enzima productora de AMP cíclico, la adenilato ciclasa, fue hallada principalmente asociada a la membrana plasmática en la mutante "slime"

(FGSC 1118) de N. crassa por Flawiá y Torres (191). Dicha mutante carece de pared celular, apareciendo en forma de células aisladas (15 a 30 μm) similares a protoplastos, que contienen una vacuola y varios núcleos. La enzima totalmente dependiente de Mn^{2+} para expresar su actividad, no es activada ni por fluoruro ni por GTP. Los mismos autores (192) demostraron que el sustrato de la adenilato ciclasa es el complejo Mn ATP^{2-} , que el Mn^{2+} es activador de la enzima sólo a bajas concentraciones de sustrato, y que el ATP puede ser inhibidor al desplazar al sustrato del sitio catalítico. Las membranas tratadas con el detergente no iónico Lubrol PX liberaron la enzima en forma soluble, lo cual permitió purificarla por DEAE-celulosa (193). La ultracentrifugación en gradientes de sacarosa de la actividad proveniente de dicha purificación parcial permitió calcular un coeficiente de sedimentación de 7,15 S.

Por otra parte Flawiá, Kornblihtt y Torres (194) encararon el estudio de una forma "soluble" de adenilato ciclasa en cepas miceliales de Neurospora crassa. Preparaciones efectuadas a baja fuerza iónica permitieron obtener de 20 a 30% de actividad ciclasa en el sobrenadante postmicrosomal. Cuando se efectuaron a alta fuerza iónica, un 50% de la actividad apareció en el sobrenadante. Con lavados sucesivos en dichas condiciones fue posible extraer hasta 90% de la actividad ciclasa del precipitado de 105 000 x g. Esta adenilato ciclasa "soluble" tiene propiedades similares a la asociada a membranas respecto de Mn^{2+} , fluoruro, ATP y GTP. Los parámetros moleculares e hidrodinámicos calculados (coeficiente de sedimentación: 6,25 S; radio de Stokes: 7,3 nm; volumen específico parcial: 0,74 g/ml; peso molecular: 202 000; cociente friccional: 1,65; punto isoeléctrico: 4,65) permitieron concluir que la actividad "soluble" es similar a la descrita para el componente catalítico (C) de los sistemas de adenilato ciclasas regulables por hormonas de tejidos de mamíferos.

C. Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos y quinasas de proteínas

Scott y Solomon (195) encontraron actividad fosfodiesterasa de AMP cíclico asociada a fracciones particuladas de extractos de Neurospora crassa. Dicha actividad es inhibida por metilxantinas, ADP y ATP y presenta dos valores de K_m para el AMP cíclico que difieren en más de dos órdenes de magnitud. Gold y Segel (196) describieron una actividad quinasa de proteínas soluble proveniente de extractos de Neurospora crassa. Sólo caseína y fosvitina resultaron buenos sustratos en las condiciones usadas por dichos autores. Esta actividad independiente de AMP cíclico tuvo un coeficiente de sedimentación de 3,8 S, un peso molecular de 60 000 determinado por filtración en geles y un K_m para el ATP de 30 μ M. También Powers y Pall (197) encontraron quinasas de proteínas en Neurospora crassa. Extractos de la cepa salvaje fueron cromatografiados por DEAE-celulosa y obtuvieron dos picos de actividad quinasa, siendo el que eluye a menor fuerza iónica (pico I) el único estimulado por AMP cíclico. El sustrato proteico más activo para el pico I fue la histona H2B, luego protamina y por último histona H2A. Por el contrario para el pico II el orden de actividad fue caseína mayor que fosvitina, y ésta mayor que histona H2B. Además describieron una actividad de unión ("binding") de AMP cíclico asociada al pico I de peso molecular aproximado 47 000. Por otro lado Judewicz y Torres (198) encontraron que el AMP cíclico estimula la fosforilación de proteínas no histónicas en preparaciones de cromatina del mutante "slime" de Neurospora. Esta fosforilación estimula la síntesis del RNA mensajero (transcripción) que es inhibible por α -amanitina.

D. Diferenciación y mutantes

Los mutantes morfológicos de Neurospora, denominados "crisp" se caracterizan por poseer un fenotipo colonial causado por la imposibilidad de formar hifas aéreas, y por una formación uniforme de conidias sobre la su-

perficie del cultivo (199). Existen tres loci que por mutación pueden determinar el fenotipo "crisp": cr-1, cr-2 y cr-3. Estos loci no alélicos están ubicados en el brazo derecho del grupo I de ligamiento (cromosoma) en las proximidades del centrómero (200).

Terenzi, Flawiá y Torres (201) observaron que dos cepas diferentes con mutación en el locus cr-1 presentaban una actividad muy disminuída de adenilato ciclasa. La mutante FGSC 326 tiene morfología "slime" y la FGSC 329 morfología "crisp". La adición de AMP cíclico o su derivado dibutiril-AMP cíclico al medio de cultivo, incrementó varias veces la velocidad de elongación de las hifas de FGSC 329 y produjo un fenotipo similar al de cepas salvajes. Esta reversión morfológica implica un estímulo de la formación de hifas aéreas y una inhibición de la formación de conidias en la superficie del cultivo. Por otra parte Flawiá, Terenzi y Torres (202) encontraron que las cepas portadoras de la mutación cr-1 tienen bajos niveles de actividad ciclasa, 2 a 3% de la encontrada en cepas salvajes. Por otro lado, las mutantes cr-2 y cr-3 que tienen el mismo fenotipo que cr-1, tienen niveles normales de actividad ciclasa. Además Torres, Flawiá, Terenzi y Téllez-Iñón (203) demostraron que no hubo reversión de morfología por efecto de AMP cíclico o su dibutiril derivado en las cepas cr-2 y cr-3. Este hecho podría indicar que dichas mutaciones afectarían alguna etapa de las rutas metabólicas controlada por AMP cíclico.

Respecto a los niveles de AMP cíclico, Terenzi, Flawiá, Téllez-Iñón y Torres (204) encontraron que las cepas salvajes tienen concentraciones que son 10 a 20 veces superiores a las cepas con mutación en cr-1. En cultivos en medio líquido los niveles de dicho nucleótido en la cepa salvaje no variaron durante el período de crecimiento exceptuando un importante incremento durante un corto período al comienzo de la fase estacionaria. La actividad adenilato ciclasa mostró un máximo coincidente con el de su producto, pero la actividad fosfodiesterasa de AMP cíclico no tuvo cambios significativos.

Todos estos trabajos realizados por Torres y colaboradores señalan el

requerimiento de AMP cíclico en la determinación de la morfología y la formación de hifas aéreas en Neurospora.

Rosenberg y Pall (205) no encontraron cambios en niveles de AMP cíclico y GMP cíclico durante la germinación de conidias en cepas salvajes y con mutación *cr-1*. Este resultado se opondría a la hipótesis de cambios metabólicos regulados por nucleótidos cíclicos durante dicho proceso, tal como fue sugerido por la inducción a la germinación de la mutante "crisp" FGSC 329 estimulada por dibutiril-AMP cíclico (203). Por otra parte hallaron que los niveles de AMP cíclico son iguales en conidias de ambos tipos de cepas; ésto implicaría que Neurospora puede expresar más de una actividad adenilato ciclasa o que existen múltiples modos de regulación de la misma. Los mismos autores (206) encontraron que N⁶-monobutiril-AMP cíclico y GMP cíclico estimulan la elongación de las hifas de mutantes *cr-1* y que también los niveles de GMP cíclico son menores en estos mutantes que en las cepas salvajes. Esta última propiedad podía indicar que la mutación *cr-1* también afectaría a la actividad guanilato ciclasa.

Trevillian y Pall (207,208) probaron en Neurospora que antibióticos activos sobre membrana plasmática, como la nistatina, producen despolarización de la misma con un rápido incremento transitorio de los niveles de AMP cíclico. Las mutantes *cr-1* no presentan dicho efecto que se debería a un estímulo sobre la adenilato ciclasa unida a membrana. Scott y Solomon (209) ensayaron el efecto de distintas drogas que disminuyen los niveles de AMP cíclico por inhibición de la adenilato ciclasa o por activación de la fosfodiesterasa. En esas condiciones el micelio salvaje asume un crecimiento colonial o semicolonial semejante al de mutante morfológicas, siendo la anomalía morfológica proporcional a la potencia de las drogas.

La formación periódica de conidias y la periodicidad en los cambios de frecuencia de ramificación de las hifas marcan ritmos biológicos en Neurospora (210). El hongo puede ser afectado en su ritmo circadiano por cambios en la temperatura, medio de cultivo o ciclos oscuridad-luz. Feldman (211) encontró que las metilxantinas alargan el período del ritmo circa-

diano de conidiación. Este efecto de inhibidores de fosfodiesterasa podría involucrar a los nucleótidos cíclicos en el control o regulación del reloj biológico.

Aún no se conocen sustancias extra o intracelulares sintetizadas por la Neurospora que produzcan cambios en los niveles de nucleótidos cíclicos. Tampoco se han elucidado los mecanismos moleculares de acción del AMP cíclico sobre el control de la morfología del hongo.

V. EL AMP CICLICO Y ENZIMAS RELACIONADAS EN PROTISTAS

A. Blastocladiella

-Ciclo de vida

El ciclo asexual de este ficomicete comienza con una zoóspora que es una célula flagelada, sin pared celular, uninucleada y que tiene baja actividad metabólica (212). En condiciones apropiadas el flagelo se retrae, se comienza a sintetizar pared celular y se forma un tubo germinal (germinación) que va a formar un sistema rizoidal que comienza a crecer rápidamente (fase vegetativa). Si los nutrientes se agotan se interrumpe el ciclo vegetativo y comienza la esporulación. Las zoósporas se liberan por la ruptura de la papila que está en un extremo del esporangio.

-Papel de los nucleótidos cíclicos

Silverman y Epstein (213) encontraron un aumento de 50 a 100 veces de los niveles de GMP cíclico durante la esporulación de Blastocladiella emersonii causado por un incremento de la actividad guanilato ciclasa (214). Por otro lado, Vale et al. (215) demostraron que los niveles de AMP cíclico aumentan hasta 5 veces en la primera fase de la germinación

durante la transición de zoóspora a célula redonda previa a la aparición del tubo germinal. La célula vuelve nuevamente a sus niveles normales expulsando el nucleótido al medio extracelular. Además Gomes et al. (216) pudieron inducir dicha diferenciación con AMP cíclico o inhibidores de fosfodiesterasa reemplazando al ión K^+ .

-Adenilato ciclasa

Gomes et al. (217) presentaron evidencias sobre la existencia de una adenilato ciclasa asociada a fracciones particuladas dependiente de Mn^{2+} , no estimulable por F^- y que puede ser solubilizada por Tritón X-100 1%. La actividad es relativamente baja durante el crecimiento vegetativo y se incrementa unas 70 veces durante la formación y liberación de las zoósporas, disminuyendo un 40% al comenzar la diferenciación. Los mismos autores (218) demostraron que esta enzima está asociada a membranas, que el sustrato es $Mn\ ATP^{2-}$, que Mn^{2+} sólo es activador a bajas concentraciones de sustrato y que el ATP no es un buen inhibidor competitivo aunque 5'-AMP y GTP sí lo son.

-Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

Maia et al. (219) encontraron actividad de fosfodiesterasa de AMP cíclico en fracciones solubles de preparaciones de zoósporas o de células vegetativas. Esta actividad resultó ser estimulada por Mg^{2+} , Mn^{2+} y K^+ e inhibida por Ca^{2+} , Li^+ , teofilina o cafeína. El K_s aparente para el AMP cíclico resultó ser de 2 a 4 μM y no fue inhibida por GMP cíclico. También encontraron una actividad fosfodiesterasa de GMP cíclico en las fracciones solubles de Blastocladiella. Sólo resultó estimulada por Mg^{2+} y también fue inhibida por metilxantinas. Los estudios cinéticos dieron como resultado dos valores de K_s aparente, 4 y 40 μM , y la presencia de AMP cíclico no produjo inhibición.

La purificación por columna de DEAE-celulosa permitió obtener un sólo pico de fosfodiesterasa de AMP cíclico proveniente de extractos de zoóspora. Este pico dio una sola banda de actividad en electroforesis en gel de poliacrilamida. Vale et al. (220) probaron que los mismos extractos centrifugados en gradientes de glicerol dieron dos picos con actividad hidrolizante de GMP cíclico, cuando el sustrato no estuvo presente en la corrida, y uno solo cuando sí lo estuvo. En los gradientes de glicerol apareció una única actividad hidrolizante de AMP cíclico en la zona de menor coeficiente de sedimentación.

La fosfodiesterasa de AMP cíclico tiene fluctuaciones periódicas durante el ciclo del hongo con un agudo máximo en la esporulación y migración de zoósporas. Vale y Maia (221) encontraron que la fosfodiesterasa de GMP cíclico también presenta un máximo durante dichas fases. Las variaciones de actividades enzimáticas que serían producto de síntesis y degradación de las mismas permiten explicar las variaciones de niveles de nucleótidos cíclicos durante la diferenciación.

-Quinasas de proteínas

Juliani y Maia (222) hallaron actividades quinasas de proteínas y "binding" de AMP cíclico (K_d 10 nM) en fracciones solubles de extractos de zoósporas. Obtuvieron tres picos de actividad por cromatografía en DEAE-celulosa. El pico I que sale con las fracciones de lavado fosforila caseína; el pico II eluye con NaCl 0,1 M y fosforila histona; y el pico III eluye con NaCl 0,2 M, fosforila histona, resulta el único estimulable por AMP cíclico y presenta "binding" por dicho nucleótido. Los mismos autores (223) demostraron que el pico I no cambia durante el ciclo celular, contrariamente, los picos II y III disminuyen su actividad durante la fase vegetativa. La actividad "binding" de AMP cíclico asociada al pico III y la no asociada (eluye con 0,25 M NaCl) también disminuyen durante dicha fase. Los autores proponen que el pico II y el segundo pico de

"binding" de AMP cíclico podían ser las subunidades catalítica y regulatoria respectivamente de la holoenzima que en ese caso sería el pico III. La inducción de las quinasas dependientes de AMP cíclico durante la esporulación está de acuerdo con la variación de niveles del nucleótido. Por otra parte Silverman (224) usando protamina como sustrato tuvo resultados análogos.

B. Mucor

-Ciclo de vida

El ciclo de vida asexual de este ficomicete se puede resumir en tres etapas: germinación de esporangiosporas, crecimiento vegetativo y formación de esporangiosporas (225). Las esporas son células elipsoides con uno o dos núcleos que germinan en dos fases, siendo la primera un crecimiento manteniendo su forma, y la segunda, la aparición de un tubo germinal (si hay desarrollo de hifas) o de un brote esférico (si va a crecer como levadura). Ambos tipos de células vegetativas (hifas y levaduras) aparecen según las condiciones del medio, siendo en general favorables a las células levaduriformes la alta concentración de hexosa, la anaerobiosis, el incremento en la presión parcial de dióxido de carbono y la presencia de AMP cíclico en el medio. De esta forma, modificando las condiciones de cultivo se puede pasar de uno a otro tipo celular.

-Papel de los nucleótidos cíclicos

En Mucor racemosus Larsen y Sypherd (226) y Paveto et al. en Mucor rouxii (227) encontraron que cuando en los cultivos se cambia una atmósfera de dióxido de carbono por otra de aire se produce una disminución de los niveles de AMP cíclico y una transición de levaduras a la forma filamentosa. Sin embargo, cuando se agregó dibutiril-AMP cíclico dicha tran-

sición no ocurrió. Además, Orlowski y Sypherd (228) hallaron que todos los tipos de células tienen cantidades aproximadamente iguales de GMP cíclico y que se produce un aumento de hasta 7 veces durante la germinación de las esporas, pero no pudieron demostrar una implicancia del GMP cíclico en el dimorfismo ya que sus niveles no variaban durante dicha transición. Por otro lado, el agregado exógeno de su dibutiril derivado no tiene efecto sobre la morfología de los cultivos. Paznokas y Sypherd (229) postularon que la capacidad respiratoria y la morfología no están obligatoriamente ligadas. Mientras que altos niveles de AMP cíclico y una atmósfera de dióxido de carbono son determinantes de la forma levaduriforme, bajos niveles del nucleótido y aire lo son de la forma micelial.

Cantore et al. (230) hallaron en el desarrollo aeróbico de Mucor rouxii que los niveles de AMP cíclico disminuyen durante la germinación para restaurarse en el comienzo de la fase estacionaria. En dicha fase el hongo expulsa el nucleótido cíclico al medio extracelular.

-Adenilato ciclasa

En extractos de Mucor rouxii, Paveto et al. (227) demostraron que la actividad específica de adenilato ciclasa no varía con la morfología del hongo. Esta enzima se encuentra principalmente en las fracciones particuladas y es dependiente de Mn^{2+} . Además, Cantore et al. (230) probaron que dicha ciclasa no es activada por F^- ni por GTP y que el detergente Lubrol PX la solubiliza parcialmente. Por otra parte los niveles más altos de la misma aparecen en las esporangiosporas, disminuyendo inmediatamente al comenzar la germinación durante un ciclo aeróbico, para volver a elevarse al llegar a la fase estacionaria de crecimiento.

-Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

Paveto et al. (227) midieron la actividad fosfodiesterasa de AMP cíclico en extractos de Mucor rouxii, resultando cuatro a seis veces mayor en

la formas micelial que en la levaduriforme. La enzima apareció asociada principalmente a las fracciones solubles y no se excreta al medio de cultivo. Cantore et al. (230) calcularon un K_s aparente de $1 \mu\text{M}$ para el AMP cíclico y la enzima mostró ser dependiente de Mg^{2+} o Mn^{2+} . Las metilxantinas, el GMP cíclico y el ATP no resultaron inhibidores de la fosfodiesterasa de Mucor. Durante el desarrollo aeróbico sólo se ve un aumento de la actividad hidrolizante de AMP cíclico en las esporangiosporas. Por otra parte Galvagno et al. (231) encontraron, en extractos crudos de Mucor rouxii, un sistema de activación de la fosfodiesterasa de AMP cíclico por preincubación con ATP, Mg^{2+} y AMP cíclico. La preincubación con Mg^{2+} revierte el efecto volviendo la enzima activada a niveles normales. Ambas enzimas dan un sólo pico que eluye con NaCl $0,15 \text{ M}$ al ser cromatografiadas en columnas de DEAE-celulosa. Los autores postulan un mecanismo de fosforilación-desfosforilación probablemente indirecto, mediado por una proteasa, para la regulación de la actividad fosfodiesterasa.

-Quinasas de proteínas

Moreno et al. (232) describieron las actividades quinasas de proteínas y "binding" de AMP cíclico (K_d 40 nM) separadas por cromatografía en DEAE-celulosa obtenidas a partir de micelio de Mucor rouxii. Dos picos independientes de AMP cíclico fosforilan caseína, el pico I que se encuentra en las fracciones de lavado y el pico II que eluye con $0,05 \text{ M}$ de fosfato de potasio. El pico III que fosforila histona es estimulable por AMP cíclico ($A_{0,5}$ 24 nM), eluye con fosfato de potasio $0,21 \text{ M}$ y tiene asociada actividad de "binding" de AMP cíclico. Otro pico de "binding" de AMP cíclico eluye a $0,1 \text{ M}$ de sal. Un perfil similar se obtiene con las células levaduriformes. Moreno y Passeron (233) estudiaron la quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico ($\text{ATP}:K_s$ $15 \mu\text{M}$) de cultivos levaduriformes de Mucor rouxii. La holoenzima (tetramero) tendría un peso molecular aproximado de $210\ 000$ y disociada por acción conjunta del AMP cíclico y NaCl o

histona daría dos subunidades catalíticas de peso molecular 40 000 y una regulatoria de 80 000.

C. Saccharomyces

-Ciclo de vida

El ciclo de vida asexual de este ascomicete se reduce al crecimiento vegetativo producido por gemación. Los polos de la célula son el punto de origen de los nuevos brotes (234).

Aunque, como se verá más adelante, es posible obtener células haploides en ciclos vegetativos, las cepas naturales son generalmente diploides. Cuando se encuentran en condiciones adecuadas, las células diploides dan lugar a la formación de ascos y por divisiones meióticas de sus núcleos aparecen las ascoporas. Si se separan estas esporas con un micromanipulador y se colocan en un medio de cultivo, germinan dando células haploides. Dichas células, que contienen sólo la mitad del genoma, pueden mantenerse indefinidamente en ese estado o puede reestablecerse el estado diploide por fusión de dos ascoporas, de dos células haploides, o entre una ascopora y una célula haploide.

Algunas cepas de Saccharomyces cerevisiae son heterotálicas, existiendo células de dos tipos de apareamiento llamadas a y α. Cuando las células de distinto tipo se fusionan, forman rápidamente ascos conteniendo esporas viables de ambas clases.

-Papel de los nucleótidos cíclicos

Van Wijk y Konijn (235) encontraron un aumento de los niveles de AMP cíclico en las células de Saccharomyces carlsbergensis sometidas a un cambio de fuente de carbono. Además Mahler y Lin (236) demostraron que el AMP cíclico agregado a las levaduras crecidas en un medio con glucosa puede

sustraerlas de la represión por catabolitos. Por otra parte Sy y Richter (237) encontraron que células provenientes de cultivos con lactato o de bajo contenido de glucosa doblan sus niveles de AMP cíclico en la fase estacionaria temprana.

-Adenilato ciclasa

En las fracciones de membranas de Saccharomyces fragilis, Sy y Richter (237) hallaron actividad adenilato ciclasa. Esta actividad aumenta de tres a cuatro veces al llegar a la fase estacionaria en cultivos aeróbicos. Por otra parte Varimo y Londesborough (238) solubilizaron la adenilato ciclasa de Saccharomyces cerevisiae con Lubrol PX. Esta enzima dependiente de Mn^{2+} (ATP: K_S 1,6 mM), asociada a las membranas, se comportó como una proteína de peso molecular 450 000 cuando fue sometida a filtración en geles de agarosa.

-Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

Speziale y Wijk (239) presentaron evidencias sobre la existencia de fosfodiesterasa de AMP cíclico en fracciones solubles de extractos de Saccharomyces carlbergensis. Esta enzima tiene un K_S de 220 μ M (baja afinidad) y resultó un ser activada por Mg^{2+} y especialmente por Mn^{2+} . Fujimoto et al. (240) purificaron una actividad fosfodiesterasa soluble de Saccharomyces cerevisiae. La enzima eluyó con NaCl 0,25 M de columnas de DEAE-celulosa. Esta actividad ensayada a concentraciones altas de AMP cíclico fue inhibida por GMP cíclico. El peso molecular calculado para la misma fue de 64 000 y resultó inhibida por teofilina, cafeína y reactivos que actúan sobre grupos sulfhidrilos.

-Quinasas de proteínas

Sy y Richter (241) describieron una actividad de "binding" de AMP cíclico (K_d : 5 nM) en sobrenadantes de extractos de Saccharomyces fragilis. Esta proteína de peso molecular 24 000 no inhibió a la quinasa de proteínas homóloga. Dicha quinasa, presente en fracciones citosólicas no fue estimulada por AMP cíclico. Takai et al. (242) separaron tres actividades quinasas de proteínas a partir de extractos citosólicos de Saccharomyces cerevisiae purificados en columnas de DEAE-celulosa. El pico I eluye a NaCl 0,08 M, fosforila caseína e histona, fue estimulado por AMP cíclico sólo cuando ésta última fue sustrato y presenta actividad de "binding" de dicho nucleótido. El pico II eluye a NaCl 0,15 M, fosforila histona y también protamina (al igual que el pico I), pero no es activado por AMP cíclico. El pico III que eluye con NaCl 0,28 M resulta insensible a dicho nucleótido, tiene como sustrato histona y en menor grado caseína. Un segundo pico de actividad de "binding", que eluye con NaCl 0,12 M, aparece entre las quinasas I y II. La quinasa dependiente de AMP cíclico que fosforila histona (ATP: K_s 12 μ M, cAMP: K_d 20 nM, óptimo de Mg^{2+} : 5 mM) fue separada de la quinasa de caseína del pico I por enfoque isoeléctrico. El peso molecular de la holoenzima (dímero) resultó ser 58 000, el de la subunidad catalítica 30 000 y el de la regulatoria 24 000. Lerch et al. (243) purificaron una quinasa de proteínas independiente de nucleótidos cíclicos de fracciones solubles de Saccharomyces cerevisiae. Esta actividad que no se retuvo en DEAE-celulosa, solo fosforila caseína y fosvitina, tiene un peso molecular de 43 000 y requiere metal divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}). Bell et al. (244) aislaron por otro lado una quinasa de proteínas que copurifica con la RNA polimerasa de Saccharomyces cerevisiae y fosforila los péptidos componentes de dicha actividad. Los mismos autores (245) caracterizaron parcialmente esta quinasa independiente de nucleótidos cíclicos que además utiliza caseína o fosvitina como sustratos exógenos y requiere Mn^{2+} (óptimo: 5 mM). Esta quinasa de coeficiente de sedimentación de 6,8 S

tiene un peso molecular de 135 000 y podría ser oligomérica. Esta actividad fosforilante estaría localizada en el núcleo celular.

D. Coprinus

En una cepa monocariótica del basidiomicete Coprinus macrorhizus se encontró que el AMP cíclico y el 3'-AMP inducen la formación de cuerpos de fructificación (246). Por otra parte, ciertas mutantes monocariotes capaces de desarrollar dichos cuerpos en presencia de luz, no podían hacerlo en la oscuridad (247). El pasaje de dichos mutantes desde la oscuridad a la luz produce la inducción de la síntesis de adenilato ciclasa, esto provoca un aumento de los niveles de AMP cíclico que precede a la formación de los pilei. El aumento de la actividad ciclasa presenta un máximo previo a la agregación de las células para formar los cuerpos de fructificación, y disminuye inmediatamente (248). El comportamiento de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos es diferente, dado que aparece durante la formación de los cuerpos de fructificación y luego disminuye lentamente durante la maduración. Esta enzima que también es inducible por pasaje de la oscuridad a la luz, resulta estimulada por Mg^{2+} y Mn^{2+} siendo inhibida por teofilina y cafeína (247). La actividad "binding" de AMP cíclico disminuye durante la formación de los cuerpos de fructificación pero aumenta cuando los cultivos son pasados desde la oscuridad a la luz (246). Por otra parte, Uno e Ishikawa (249) encontraron cuatro actividades quinasa de proteínas resueltas por filtración en geles. Numerados por orden de elución, observaron que los picos I y III resultaron inhibidos por AMP cíclico, el pico III estimulado y el pico IV insensible a dicho nucleótido. Todas las actividades fueron estimuladas por Mg^{2+} y Mn^{2+} . Al igual que las otras actividades ya descritas, la actividad quinasa total es baja durante los estados tempranos de crecimiento, para aumentar durante la formación de los cuerpos de fructificación.

E. Hongos varios, líquenes y algas

Las esporangiosporas del ficomicete, Phycomyces blakesleeanus, sufren una rápida disminución de los niveles de AMP cíclico por efecto de la luz. Esta disminución es previa a un aumento de la velocidad de crecimiento (250).

El AMP cíclico provoca la agregación de conidias del ascomicete, Aspergillus niger, por aumento de su adhesividad. Esto podría indicar control de la germinación y del posterior desarrollo de hifas en dicho hongo (251).

Cepas mutantes del basidiomicete, Schizophyllum commune, tienen alterado el metabolismo del AMP cíclico presentan altos niveles intracelulares de dicho nucleótido y éste produce la formación de cuerpos de fructificación anormales (252).

Los líquenes son asociaciones simbióticas de algas y hongos. En el líquen Funaria hygrometrica se encontró que en los estados juveniles (protonema) se desarrollan dos tipos de células que darán origen al cloronema y al caulonema. El AMP cíclico acelera el crecimiento del cloronema y no del caulonema pero los inhibidores de fosfodiesterasa no tienen efecto alguno (253).

Las metilxantinas pueden inhibir el funcionamiento y regeneración de los flagelos del alga chlorophyceae Clamydomonas reinhardtii. Se comprobó que dichos compuestos elevan los niveles de AMP cíclico por inhibición de la actividad fosfodiesterasa (254).

Por otra parte una quinasa de proteínas asociada a fracciones particuladas del alga Euglenophyceae, Euglena gracilis, resultó dependiente de AMP cíclico (255).

F. Dictyostelium

Este mixomicete del orden los Acrasiales es uno de los organismos más estudiados en lo relativo a la diferenciación y papel de los nucleótidos

cíclicos. Cuando amebas de Dictyostelium discoideum son ayunadas se produce la migración de las mismas hacia centros que emiten pulsos periódicos de AMP cíclico (256) que actúa como agente quimiotáctico (257). La capacidad de producir las señales rítmicas es característica de ciertas células diferenciadas (258) que tienen elevada sensibilidad al AMP cíclico, y altos niveles de actividad adenilato ciclasa (259) y fosfodiesterasa de AMP cíclico (260). Cuando una célula es excitada por el AMP cíclico extracelular que se une a moléculas de un receptor específico de la superficie celular (261), se produce un aumento dramático de los niveles internos de AMP cíclico (262). Además, los altos niveles de nucleótido cíclico externo inducen la actividad fosfodiesterasa (263), la diferenciación de las amebas (264) y la inmediata desaparición de los sitios receptores de AMP cíclico (265). La desaparición de la señal quimiotáctica está determinada por una fosfodiesterasa de AMP cíclico extracelular (266) cuya actividad es modulada por un inhibidor excretado por las células en los estadios tempranos de ayuno (267). La adenilato ciclasa de peso molecular 100 000 está unida a membranas, requiere 5'-AMP (268), resulta inhibida por preincubación con ATP (269) y necesita Mg^{2+} y ditiotreitól para expresar su actividad (270). Esta actividad ciclasa puede ser estimulada por AMP cíclico ($A_{0,5}$ 0,1 mM) (271).

La fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos que excretan las amebas (K_S 4 μ M) es distinta del conjunto de fosfodiesterasas intracelulares (272). Por otro lado, dicha actividad, que también se encontraría en fracciones de membrana (273), se excretaría en una forma de alta afinidad (K_S 15 μ M) y se convertiría en ausencia de ditiotreitól en una forma de baja afinidad (K_S 2 mM) (274). Por otra parte, la fosfodiesterasa extracelular se presenta en múltiples formas de distinto punto isoeléctrico que, a su vez, se desdoblan en componentes de distinto tamaño (275). Dos formas de la actividad extracelular aparecen por interacción con el inhibidor: la enzima libre (K_S 10 μ M; sedimenta con 6,0 S) y la forma asociada al inhibidor (K_S 1 mM; sedimenta con 6,7 S). El ditiotreitól inactivaría al inhibidor

(peso molecular 43 000 (276); constante sedimentación 3,0 S)(217). Respecto a los pesos moleculares, para la fosfodiesterasa de AMP cíclico de Dictyostelium se han informado valores contradictorios: 300 000 (266), o un monómero de 65 000 de K_s micromolar y dímero de 132 000 de K_s milimolar (274).

La actividad binding de AMP cíclico presentó un valor de K_d de alta afinidad de 4 (265) ó 10 (278) nM y otro valor de baja afinidad de 100 ó 230 nM (261,265). Por marcación con 8-azido-AMP cíclico se encontraron dos péptidos que unen nucleótidos cíclicos de peso molecular 38 000 y 39 000 respectivamente (279).

En Dictyostelium existirían dos especies distintas de quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico que fosforilan histona durante la primera fase de la diferenciación (280). Dichas actividades separadas por DEAE-celulosa presentan "binding" de AMP cíclico y son estimuladas por el nucleótido con $A_{0,5}$ 4, y 1 μ M para los picos I y II respectivamente. El pico I presenta dos picos de quinasa estimulable por AMP cíclico en centrifugación en gradiente de sacarosa (sedimentan a 5,4 y 7,0 S) mientras que el pico II muestra otros dos picos de igual propiedad (sedimentan a 5,0 y 8,0 S). Además existen dos quinasas independientes de 3,5 y 5,0 S. Usando caseína como sustrato se han detectado cuatro quinasas de proteínas solubles y una asociada a membranas (281). Las enzimas están en las células vegetativas o agregadas, las de mayor peso molecular también fosforilan histona, pero ninguna resultó estimulada por nucleótidos cíclicos. Por cromatografía en DEAE-celulosa se obtienen dos picos: el A que no se une a la resina, y el B que eluye con NaCl 0,2 M. Por filtración en geles el pico A da lugar a la aparición de un pico de peso molecular 120 000 y otro de 10 500, y el pico B da origen a un pico de peso molecular 220 000 y otro de 65 000 cuando se eluye en presencia de NaCl 0,5 M para evitar la agregación de proteínas.

G. Physarum

Mixomicete del orden de los Physariales, Physarum Pollicefalum presenta un aumento transitorio de los niveles de AMP cíclico en la fase G₂ del ciclo mitótico en cultivos sincronizados del plasmodio. El GMP cíclico fue más variable, presentando un máximo durante el período S y otro en la fase G₂ coincidente con el pico de AMP cíclico (282).

Se han detectado dos fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos en Physarum, una asociada a fracciones subcelulares y la otra soluble que es excretada al medio extracelular. Ambas actividades requieren Mg²⁺ (óptimo 1,6 mM), presentan un K_s de 0,5 mM y resultan inhibidas por metilxantinas (283).

Una quinasa de proteínas que fosforila caseína y resulta inhibida completamente por AMP cíclico o GMP cíclico 1 μM es dependiente de Mg²⁺ y fácilmente liberada por los plasmodios. Además, una quinasa de caseína es activada por AMP cíclico (A_{0,5} 60 nM) y también requiere Mg²⁺ (284).

Por otra parte los niveles de quinasa de proteínas independiente de AMP cíclico no varían durante el ciclo mitótico. Sin embargo, en presencia de AMP cíclico se observa un importante pico de inhibición durante la fase G₂, que implicaría una acción coordinada de nucleótido con otros factores para controlar la actividad quinasa durante el ciclo celular (285).

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

I. ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO

La cepa salvaje de Neurospora crassa St.Lawrence 74 fue utilizada como fuente de material biológico. Se la hizo crecer en medio Vogel mínimo (286) con sacarosa 2% (p/v) como fuente de carbono conteniendo 2,5 µg/ml de biotina. Los cultivos se desarrollaron con agitación rotatoria (100 rpm) a 30°C en matraces de Erlenmeyer de 2 000 ml con tapa de algodón, conteniendo 400 ml de medio. Los cultivos se cosecharon a las 25-30 horas de hecho el inóculo, obteniéndose de este modo micelio en su fase exponencial temprana de crecimiento.

Los micelios se recogieron por filtración con vacío en embudo Büchner, se lavó el contenido de cada Erlenmeyer con 500 ml de agua destilada fría. Luego de ello el material se congeló a -20°C y liofilizó. En estas condiciones se obtuvieron entre 30 y 40 g de micelio húmedo que rindieron entre 5 y 8 g de micelio liofilizado.

II. HOMOGENIZACION Y FRACCIONAMIENTO

El material seco se pulverizó en un mortero en presencia de nitrógeno líquido. La suspensión en nitrógeno líquido se trasvasó a un vaso de precipitado, homogeneizó con un equipo Ultra-Turrax (desintegrador de tejidos modelo T 18/10, IKA) durante 1 min a velocidad máxima, repitiendo la operación dos veces más. Seguidamente se dejó evaporar el nitrógeno y se resuspendió el material en solución 25 mM TRIS-HCl pH 7,5 y 0,5 mM EDTA (Buffer A). La cantidad agregada de buffer A fue de 20 ml por gramo de micelio seco. El material fue nuevamente homogeneizado con Ultra-Turrax y luego de ello se transfirió a un homogeneizador Downce donde se hizo pasar la preparación 5 veces con el pistón A y otras 5 con el B. El extracto fue entonces centrifugado a 25 000 x g por 10 min y se centrifugó el líquido sobrenadante obtenido a 105 000 x g durante 60 min. La fracción sobrena-

dante de esta última separación (SN 105) fue dializada durante una noche a 4°C contra 50 volúmenes de solución compuesta por 25 mM TRIS-HCl pH 7,5 (Buffer B).

III. SEPARACION DE QUINASAS Y FOSFODIESTERASAS EN COLUMNAS DE DEAE-CELULOSA

La columna (30 x 2,8 cm) fue equilibrada con buffer B. Se sembraron 60 - 80 ml de sobrenadante de 105 000 g dializado que contenían alrededor de 6 mg/ml de proteínas. Se lavó con 250 ml de buffer B y se eluyó con un gradiente de NaCl de 0 a 0,6 M en el mismo buffer. El volumen total del gradiente fue de 500 ml. Se recolectaron fracciones de 10 - 12 ml a una velocidad aproximada de 1 ml/min.

IV. PREPARACION DEL INHIBIDOR Y ACTIVADOR TERMOESTABLES

A. Cromatografía en DEAE-celulosa

Método 1: Una alícuota del sobrenadante de 105 000 x g dializado se calentó en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos. Luego se enfrió sobre hielo y centrifugó a 10 000 x g durante 10 minutos. El líquido sobrenadante se colocó sobre una columna de DEAE-celulosa (12 x 1,5 cm) previamente equilibrada con buffer B. La columna se lavó con 30 ml del mismo buffer y posteriormente se eluyó con un gradiente de 0 a 0,6 M de NaCl en el mismo buffer. El volumen total del gradiente fue de 100 ml. Se recogieron fracciones de 4,5 ml a una velocidad de 1,5 ml/min.

Método 2: Alícuotas de las fracciones de la columna de DEAE-celulosa (usada en la preparación de quinasas) se calentaron en un baño a 100°C durante 3 minutos. Luego de enfriar sobre hielo, se centrifugaron a 5 000

rpm durante 10 minutos, utilizándose el sobrenadante como fuente de moduladores.

B. Purificación del activador por hidroxilapatita

El activador obtenido por el Método 2 se purificó en una columna de hidroxilapatita (10 x 0,75 cm) previamente equilibrada con buffer fosfato de sodio 5 mM, pH 6,8. Se sembraron 4 ml de factor, se lavó con 15 ml del buffer fosfato y eluyó con un gradiente de 5 a 500 mM de fosfato de sodio, pH 6,8, cuyo volumen total fue de 50 ml. Se recogieron fracciones de 1,5 ml a una velocidad de 0,5 ml/min.

V. ENFOQUE ISOELECTRICO EN COLUMNA

Se utilizó una columna LKB de 110 ml de capacidad. La concentración final de anfolitos (rango de pH 3,5 a 10) fue 1% y se empleó un gradiente de sacarosa como medio estabilizante.

El gradiente se preparó a partir de una solución densa (sacarosa: 27 g; agua: 35 ml, y anfolitos: 2 ml de solución 40% p/v), y una solución diluída (sacarosa: 2,7 g; agua: 52,3 ml, y anfolitos: 0,7 ml de solución 40% p/v).

Una vez formado el gradiente se preenfocaron los anfolitos durante 24 horas y pasado ese lapso, se retiró del centro de la columna un volumen del contenido igual al volumen de la muestra a sembrar (1 ml) por medio de una bomba peristáltica LKB. Se ajustó la concentración de la muestra por agregado de sacarosa y se la introdujo en la zona central del gradiente.

La solución anódica (sacarosa: 15 g; agua: 12 ml, y H_3PO_4 1 M: 4 ml) se localizó en la parte inferior de la columna, y la solución catódica (NaOH 0,25 M: 10 ml) en la porción superior.

La corrida se desarrolló a potencia constante de 5 W durante 20 horas y

al finalizar se recogieron fracciones de 2 ml mediante una bomba peristáltica. El pH de las alícuotas fue medido a 4°C.

VI. PARAMETROS MOLECULARES

A. Tratamiento de las distintas preparaciones enzimáticas

-Quinasas de Proteínas

Las fracciones a ser estudiadas fueron concentradas 10 veces por ultrafiltración sobre filtros PM 30 bajo una presión de nitrógeno de 5 Kg/cm² a 4°C. Estos concentrados fueron sembrados en gradientes de sacarosa y columnas de gel de agarosa.

-Fosfodiesterasas

Las actividades obtenidas de las cromatografías en DEAE-celulosa fueron concentradas por precipitación con (NH₄)₂SO₄ 70% de saturación, agregando la cantidad adecuada de (NH₄)₂SO₄ 100% de saturación, previamente neutralizado con hidróxido de amonio concentrado. El precipitado obtenido por centrifugación a 25 000 x g por 10 min a 4°C fue resuspendido en un décimo del volumen inicial de buffer B. El concentrado fue dializado contra 100 volúmenes del mismo buffer durante una noche a 4°C.

B. Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa

-Quinasas de proteínas

Los gradientes de sacarosa de 5 a 20% p/v se prepararon en buffer TRIS-HCl 10 mM pH 7,5 conteniendo en algunos casos NaCl o AMP cíclico en las

concentraciones que se indican oportunamente. Los gradientes cuyo volumen fue de 4 ml, preparados en tubos de acetato de celulosa (5 x 1,2 cm), se sembraron con 0,25 ml de la preparación enzimática concentrada, conteniendo los siguientes marcadores: catalasa de hígado bovino (0,1 mg/ml), malato deshidrogenasa de corazón porcino (0,01 mg/ml), lactato deshidrogenasa de músculo de conejo (0,03 mg/ml) y citocromo c de corazón de caballo (2 mg/ml). La centrifugación se realizó en el rotor SW 56 de Beckman a 40 000 rpm durante 18 horas a 5°C. Finalizada la corrida se fraccionó el gradiente por succión desde el fondo del tubo con una cánula conectada a una bomba peristáltica. Se recogieron 17 fracciones de 0,26 ml cada una a una velocidad de 1 ml/min.

-Fosfodiesterasas

Los gradientes de sacarosa preparados en buffer TRIS-HCl , pH 7,5, 10 mM conteniendo NaCl 0,1 M se centrifugaron en las mismas condiciones descritas para las quinastas de proteínas. Se sembraron 0,25 ml de las actividades fosfodiesterasa concentradas junto a las proteínas marcadoras.

C. Filtración en geles de agarosa

-Quinastas de proteínas

Para las actividades PK I, R y PK II (ver más adelante) se usó una columna de Bio-Gel A-1,5 m (30 x 0,75 cm) previamente equilibrada con buffer TRIS 10 mM, pH 7,5, conteniendo NaCl 0,1 M. En algunos casos esta concentración de NaCl fue mayor o se adicionó AMP cíclico según se indica en cada caso.

Las columnas se sembraron con 0,3 ml de la preparación enzimática concentrada y se eluyó con el mismo buffer a una velocidad de 0,15 ml/min. La temperatura se mantuvo a 5°C y las fracciones fueron de 0,5 ml. Se sembra-

ron separadamente 0,3 ml de las proteínas marcadoras indicadas más arriba en las mismas concentraciones (MATERIALES Y METODOS VI.B.). Los volúmenes de exclusión y de inclusión de la columna se midieron utilizando dextrano azul y vitamina B₁₂ respectivamente.

La actividad PK III (ver más adelante) fue corrida en una columna de Bio-Gel A-5 m (0,9 x 80 cm) equilibrada con buffer TRIS-HCl 50 mM, pH 7,5, que contenía EDTA 0,5 mM, y NaCl 0,15 M, sembrándose 1 ml de preparación enzimática concentrada. La columna se eluyó con el mismo buffer a una velocidad de 0,5 ml/min. La temperatura se mantuvo a 5°C y las fracciones fueron de 1 ml. Las proteínas marcadoras indicadas más arriba fueron sembradas separadamente en las mismas concentraciones, con el agregado de β -D-galactosidasa de Escherichia coli (0,05 mg/ml) en un volumen de 1 ml. El volumen de exclusión de la columna se midió por medio de una suspensión de Rhizobium meliloti conteniendo 10⁸ bacterias/ml.

-Fosfodiesterasas

Se usó una columna de Bio-Gel A-1,5 m (30 x 0,75 cm) previamente equilibrada con buffer TRIS-HCl, pH 7,5 conteniendo NaCl 0,1 M. Alícuotas de 0,3 ml de cada fracción previamente concentrada se sembraron en la columna que se eluyó y calibró en las condiciones ya descritas para las quinasas de proteínas.

D. Cálculo de los parámetros moleculares

-Coeficiente de sedimentación

El valor del coeficiente de sedimentación (S) fue obtenido a partir del perfil de los gradientes de sacarosa por calibración con proteínas marcadoras (287). En el gráfico de S vs r (distancia recorrida) ó v (volumen de gradiente) obtenido con los patrones enzimáticos, se interpoló el valor

de S de las quinasas de protefñas y fosfodiesterasas (Fig. 37).

-Radio de Stokes

El valor del radio de Stokes (a) fue obtenido a partir del perfil de las filtraciones en geles de agarosa (Bio-Gel). En el gráfico de a vs V_e/V_0 (volumen de elución normalizado respecto del volumen de exclusión) obtenido con los marcadores enzimáticos, se interpoló el valor correspondiente a las quinasas de protefñas y fosfodiesterasas (288) (Fig. 37).

-Pesos moleculares

Los pesos moleculares (MW) se calcularon por medio de la siguiente ecuación (289):

$$MW = \frac{6 \pi N \eta_{20,w}}{1 - \bar{v} \rho_{20,w}} \cdot a \cdot S_{20,w}$$

Siendo N, n° de Avogadro; $\eta_{20,w}$, viscosidad del agua a 20°C (1 100 10⁻² g/cm seg); a, radio de Stokes; $S_{20,w}$, coeficiente de sedimentación a 20°C en agua; \bar{v} , volumen específico parcial (que se supone igual a 0,74 ml/g por tratarse de protefñas solubles); $\rho_{20,w}$, densidad del agua a 20°C (0,9888 cm³/g).

-Cocientes friccionales

Los cocientes friccionales se calcularon por medio de la siguiente ecuación:

$$f/f_0 = a \left(\frac{4 \pi N}{3 MW \bar{v}} \right)^{1/3}$$

-Datos de proteínas marcadoras

En base a los datos recopilados por Haga et al. (290) se confeccionó la tabla III con los parámetros moleculares de las proteínas marcadoras que se usaron para la calibración de gradientes de sacarosa y cromatografías en geles de agarosa.

VII. ENSAYOS ENZIMATICOS

A. Preparación de γ -³²P-ATP

El γ -³²P-ATP fue obtenido por intercambio de fosfato γ del ATP. La mezcla de incubación contuvo: 50 mM buffer TRIS-HCl, pH 8,0; 2 mM MgCl₂; 1 mM mercaptoetanol; 0,50 mM EDTA; 0,050 mM NAD; 0,50 mM ácido 3-fosfoglicérico; 0,10 mM ATP (act. esp. 5 mCi de ³²P-H₃PO₄/mmol); gliceraldehido-3-fosfatodeshidrogenasa de levadura 10 μ g y fosfoglicerato quinasa de músculo de conejo 20 μ g. El volumen final fue de 2 ml. Se incubó a 30°C por 30 min. Una vez realizada la incubación la mezcla se sembró en una columna de DEAE-Sephadex A-25 (5 x 0,5 cm) equilibrada con carbonato de trietilamina 0,1 M (pH 7,5) (preparado por burbujeo de CO₂ sobre la trietilamina en agua).

La columna se eluyó con 60 ml de un gradiente de 0,1 a 1 M de carbonato de trietilamina pH 7,5. Se obtuvieron dos picos de radioactividad, el primero correspondiente al ³²P-PO₄³⁻ que no reaccionó y el segundo al γ -³²P-ATP. Se caracterizó el γ -³²P-ATP por cromatografía ascendente en capa delgada sobre polietilén-imino celulosa (PIC) impregnada en reactivo fluorescente, usando como solvente LiCl 1,5 M. La posición de los nucleó-

TABLA III

PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LAS PROTEINAS MARCADORAS (290)

PROTEINA	VOLUMEN ESPECIFICO PARCIAL	COEFICIENTE DE SEDIMENTACION	RADIO DE STOKES	PESO MOLECULAR
	\bar{v}	$S_{20,w}$	a	PM
	(ml/g)	(S)	(nm)	
CITOCROMO C	0,73	1,7	1,87	13 300
MALATO DESHIDROGENASA	0,74	4,3	3,69	70 000
LACTATO DESHIDROGENASA	0,74	7,3	4,75	142 000
CATALASA	0,73	11,3	5,21	247 000
β -D-GALACTOSIDASA	0,76	15,9	6,84	520 000

tidos patrones (ATP, ADP, AMP y cAMP) se detectó por absorción de la fluorescencia al U.V.

La cuantificación del rendimiento se hizo por conteo de la tira de PIC en un "scanner" para radiocromatogramas. El rendimiento osciló entre 50 y 80% de incorporación de ^{32}P a $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (291).

B. Quinasas de Proteínas

Cuando se usó la histona H2A, protamina o caseína como sustrato, la mezcla de incubación contuvo: 50 mM TRIS-HCl buffer, pH 6,8, 10 mM MgCl_2 , 10 mM NaF, 2,5 mM teofilina, 25 ó 50 μM $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ con una actividad específica de 40 a 100 cpm/pmol, 1 a 10 mg/ml de histona H2A y la preparación enzimática. El volumen total fue de 0,1 ml.

Cuando se usó fosvitina como sustrato la mezcla contuvo 1 mM MgCl_2 , 1 mg/ml de fosvitina, siendo igual el resto de los componentes. En ambos casos la incubación se llevó a cabo a 30°C durante 10 minutos o los períodos indicados oportunamente.

Con histona H2A como sustrato se tomaron alícuotas de 0,08 ml a finalizar la incubación y se vertieron sobre cuadrados de papel Whatman 3 MM (2 x 3 cm) que fueron inmediatamente sumergidos en ácido tricloroacético al 10% (300 ml cada 50 ensayos). Después de agitar (50 rpm) durante 20 min a temperatura ambiente, se virió el ácido tricloroacético y se agregó nuevamente la misma cantidad después de dejar escurrir los papeles. Se repitió el procedimiento una vez más, y el cuarto lavado se realizó con metanol en el mismo volumen. El quinto lavado se realizó con dietileter (100 ml cada 50 ensayos). Los papeles se secaron sobre un papel común y se contó su radioactividad en una mezcla centelleante de tolueno-omnifluor (292).

Con fosvitina, caseína o protamina como sustrato, la reacción se detuvo por el agregado de 3 ml de ácido tricloroacético 5%, enfriado a 4°C. Se agregó a cada tubo 0,05 ml de solución de albúmina bovina de 100 mg/ml

como portador (carrier) y se centrifugó 4 min a 4 000 rpm en una centrifuga clínica. Se descartó el sobrenadante y redisolvió el precipitado con 0,2 ml de NaOH 1 M. Se reprecipitó la proteína con 3 ml de solución de ácido tricloroacético 10%, ácido fosfotúngstico 0,2% y se repitió la centrifugación (293). El precipitado redisoluelto en 0,2 ml de NaOH 1 M se transvasó con 10 ml de mezcla BRAY para centelleo al vial respectivo (294).

C. Unión de AMP cíclico

La mezcla de incubación contuvo: 50 mM buffer acetato de sodio pH 5,0; 0,03 μ M 3 H-AMP cíclico (actividad específica 43 μ Ci/mmol) de la preparación enzimática. El volumen total fue 0,1 ml. Las incubaciones se llevaron a cabo a 30°C durante 15 minutos. Las reacciones se detuvieron por agregado de 2 ml de buffer fosfato de potasio 20 mM (pH 7,0), filtrándose a través de filtro Selectron de nitrato de celulosa (poro de 0,45 μ m de diámetro), y lavándose dos veces con 2 ml del mismo buffer para finalmente, después de secarlos, contar en mezcla de centelleo tolueno omnifluor (295).

D. Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

La mezcla de incubación contuvo: 40 mM buffer TRIS-HCl, pH 8,0; 5 mM MgCl₂; 1 μ M 3 H-AMP cíclico o 3 H-GMP cíclico (alrededor de 70 000 cpm) y preparación enzimática. Las incubaciones se llevaron a cabo a 30°C por 5 a 20 minutos en un volumen total de 0,1 ml.

La reacción se detuvo por calentamiento 1 min a 100°C. Se incubó nuevamente con el agregado de 0,040 ml de veneno de serpiente (King Cobra) 2 mg/ml en 10 mM buffer TRIS-HCl pH 8,0. Esta segunda reacción se detuvo por agregado de 0,050 ml de una solución conteniendo 50 mM EDTA y 5 mM de adenosina o guanosina.

A continuación se agregó 1,0 ml de una suspensión que contenía un volumen de resina de intercambio iónico AG1-X₄ (200-400 mesh) y 3 volúmenes de etanol 30% en H₂O (cuando el AMP cíclico fue sustrato) o 0,5 ml de una suspensión que contenía volúmenes iguales de AG3-X₄ (200-400 mesh) (126) y H₂O (cuando el GMP cíclico fue sustrato) (296). Después de sedimentar en centrífuga clínica se tomaron alícuotas de los sobrenadantes y se contó la radioactividad en una mezcla que contenía 0,4% (p/v) de Omnifluor y 30% (v/v) de Tritón en tolueno.

E. Otras determinaciones realizadas

1) Proteínas: se realizó por el método de Lowry et al. Como patrón se usó albúmina sérica (297).

2) Citocromo c: se midió su absorción en 410 nm (banda de Soret).

3) Malato deshidrogenasa: la actividad fue detectada por el consumo de NADH en presencia de oxalacetato, midiendo la disminución de su absorbancia a 340 nm (298).

4) Lactato deshidrogenasa: se determinó la actividad por el consumo de NADH en presencia de piruvato, midiendo la disminución de su absorbancia a 340 nm (298).

5) Catalasa: la disminución de la oxidación de ioduro a iodo, acoplada a la reducción del H₂O₂ por la enzima permitió medir su actividad (299).

6) β -D-galactosidasa: se valoró usando o-fenil- β -D-galactopiranosido como sustrato (298).

VIII. REACTIVOS UTILIZADOS

La lactato deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa y fosfoglicerato quinasa, fueron obtenidos de Boehringer. La sacarosa y el sulfato de amonio fueron de Schwartz-Mann. Sigma proveyó ATP, AMP cíclico,

GMP cíclico, citocromo c de corazón de caballo, malato dehidrogenasa de corazón porcino, catalasa de hígado bovino, β -D-galactosidasa de E.coli, dextrano azul, albúmina sérica bovina, TRIS, NAD, NADH, PMSF, veneno de serpiente King Cobra, histona H2A de timo de ternera, fosvitina de vitelo de huevo, caseína de leche vacuna, protamina de esperma de salmón, cafeína, teofilina y aminofilina.

La DEAE-celulosa fue de Serva y la DEAE-Sephadex A-25 de Pharmacia Fine Chemicals. Bio-Rad proveyó las resinas AG1-X₄ y AG3-X₄, los geles de agarosa Bio-Gel A-1,5 m y A-5 m, y la hidroxilapatita (Bio-Gel HTP). El o-fenil- β -D-galactósido fue de Koch-Light; el AMP cíclico (38,15 Ci/mmol) y el GMP cíclico (3,46 Ci/mmol), de New England Nuclear; el ³²P-fosfato, de Radiochemical Center (Amersham). La metilisobutilxantina fue provista por Aldrich y los anfolitos (Ampholine) por LKB.

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

I. QUINASAS DE PROTEINAS EN NEUROSPORA CRASSA

A. Sistemas crudos

El estudio de las actividades quinasas de proteínas en sistemas crudos, ya sean sobrenadantes de 105 000 x g (SN 105) de extractos de micelio, o precipitados obtenidos por centrifugación a distintas velocidades, presentó varias dificultades. En primer lugar, las curvas de tiempo no fueron lineales, mostrando en general un nivel máximo de incorporación de fosfato radioactivo a los pocos segundos para luego decaer. Esto sugeriría la existencia de un complejo sistema de fosforilación y desfosforilación así como la presencia de enzimas que degradan al sustrato radioactivo. La adición de F^- a las mezclas de reacción no hizo variar este tipo de resultados.

En segundo lugar, utilizando sobrenadantes de 105.000 x g como fuente de enzimas no fue posible obtener incremento en las incorporaciones por agregado de sustratos proteicos exógenos a las mezclas de reacción. Tal hecho puede apreciarse en la Fig. 12, donde dichas mezclas fueron suplementadas o no con histona H2A.

En tercer lugar, utilizando esta última preparación resultó muy difícil detectar un efecto estimulatorio por el AMP cíclico de la actividad quinasas medida tanto en presencia como en ausencia de sustrato proteico exógeno. Como se aprecia en la Fig. 12, la estimulación observada es muy pequeña.

Por tales razones los estudios sobre sistemas crudos fueron interrumpidos, decidiéndose la purificación del sistema partiendo de sobrenadantes de 105 000 x g.

B. Separación por cromatografía en DEAE-celulosa

La evidencia obtenida por Terenzi y colaboradores (204) en una cepa salvaje de Neurospora, indica que durante la etapa de crecimiento exponen-

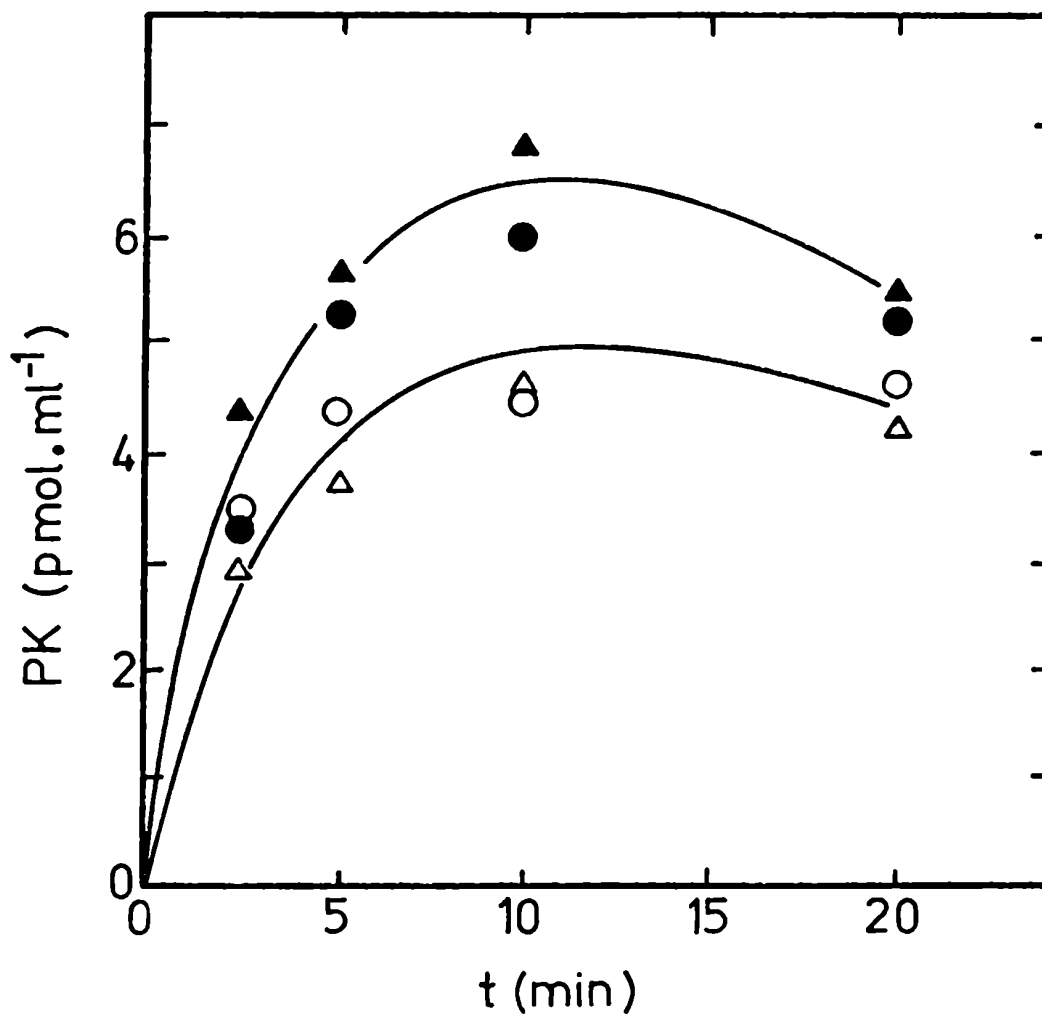


Figura 12. Incorporación de $^{32}\text{P} - \text{PO}_4^{3-}$ en función del tiempo por sobrenadantes de $105\ 000 \times g$ en ausencia (○, ●) o presencia (△, ▲) de histona H2A (1 mg/ml). Los ensayos fueron realizados en presencia (símbolos llenos) o en ausencia (símbolos vacíos) de AMP cíclico $10\ \mu\text{M}$ según se describió en MATERIALES Y METODOS (VII. B). Se tomaron alícuotas de 0,050 ml de la preparación enzimática con una concentración de proteínas de 8,6 mg/ml.

cial tardía, ésta sufre un brusco incremento en los niveles intracelulares de AMP cíclico. Esto hace suponer que los micelios en etapas tempranas del crecimiento podrían ser los más adecuados para la obtención de quinasas dependientes de AMP cíclico en su forma asociada, siendo entonces posible medir la activación provocada por dicho nucleótido. En consecuencia, el material utilizado en este trabajo corresponde a micelio en la fase exponencial temprana.

La elución con gradiente de NaCl de una columna de DEAE-celulosa sembrada con SN 105 dializado, da lugar a la aparición de tres picos de actividad quinasa de proteínas y dos picos parcialmente resueltos con capacidad de unir AMP cíclico (Fig. 13). El pico I de quinasas (PK I) eluyó a una concentración de NaCl $0,19 \pm 0,02$ M (11 preparaciones), resultó ser más activo con histona H2A que con fosvitina, y además eluyó asociado al primer pico de actividad de unión de AMP cíclico. Por otra parte, su actividad fue la única estimulada por AMP cíclico $10 \mu\text{M}$ que activó de 5 a 2 veces dependiendo del tiempo de almacenamiento de la preparación.

El pico II (PK II) de actividad quinasa eluyó con NaCl $0,32 \text{ M} \pm 0,02 \text{ M}$ (12 preparaciones) y también resultó ser más activo con histona que con fosvitina y no presentó ninguna activación por nucleótidos cíclicos. El pico III (PK III) de actividad quinasa, por su parte, eluyó con NaCl $0,44 \pm 0,01$ M (10 preparaciones) y sólo resultó evidente en ensayos con fosvitina, puesto que cuando la columna se ensayó con histona H2A apareció como un hombro del pico II. Tampoco en el caso del pico III se observó efecto alguno de nucleótidos cíclicos.

Se mencionó anteriormente que la actividad de unión de AMP cíclico eluye en dos picos, uno de ellos, el de menor actividad, asociado con el pico I de actividad quinasa. El otro pico de unión de AMP cíclico, aquí denominado R, eluyó con NaCl $0,23 \pm 0,02$ M (5 preparaciones) entre los picos I y II de actividad quinasa. Se ha medido también la actividad de "binding" de GMP cíclico, resultando coincidente en su totalidad con la del AMP cíclico.

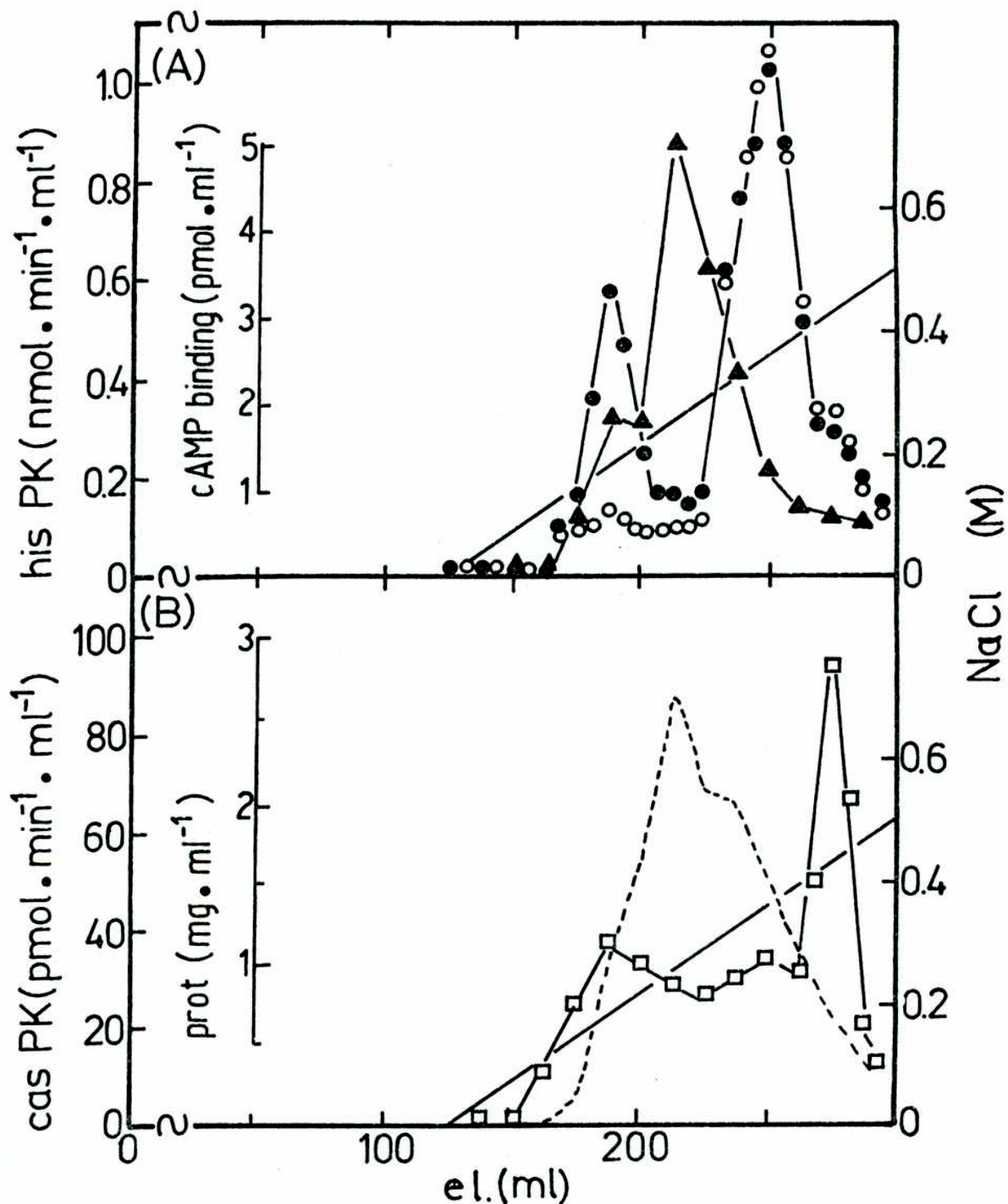


Figura 13. Cromatografía en DEAE-celulosa de un sobrenadante de 105 000 x g. En este caso las dimensiones de la columna fueron 20 x 2,0 cm, la misma fue cargada con 30 ml de SN 105 dializado, lavada con 100 ml de buffer A y eluída con 200 ml de un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,6 M.

(A) Actividades de quinasa de proteínas ensayadas con histona H2A (1 mg/ml) como sustrato en ausencia (○) o presencia (●) de AMP cíclico 10 μM , y actividad de "binding" de AMP cíclico (▲).

(B) Actividades quinasa de proteínas ensayadas con fosvitina como sustrato en ausencia de AMP cíclico (□). La línea punteada indica la concentración de proteínas.

Ante una eventual degradación parcial de las actividades producida por la acción de proteasas durante la preparación, algunas de ellas se efectuaron en presencia del inhibidor de proteasas, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), tanto durante la homogeneización (concentración 1 mM) como en la diálisis posterior (concentración 0,5 mM). Los perfiles de elución de columnas de DEAE-celulosa provenientes de estas preparaciones resultaron idénticos a los de las preparaciones sin inhibidor.

Cuando la preparación se efectuó a partir de micelio proveniente de cultivos cosechados a las 48 horas de efectuado el inóculo (fase exponencial tardía) los perfiles de elución de las columnas de DEAE-celulosa fueron similares a los producidos por micelios de cultivos más tempranos. Sin embargo el pico PK I mostró una activación por AMP cíclico errática y en general no mayor del 10 al 20 %. Esta desaparición del efecto estimulador se debió a un aumento de la actividad basal y no a una disminución de la actividad total. Este fenómeno podría ser explicado en términos de un aumento de los niveles de adenilato ciclasa y su producto (el AMP cíclico) que se encuentra asociado a la aparición de hifas aéreas, produciéndose entonces una disociación parcial de PK I.

La estabilidad de las preparaciones eluidas de las columnas de DEAE-celulosa resultó ser mayor de 40 días cuando la temperatura se mantuvo a 4°C, en presencia de azida sódica (1 mM) para evitar contaminación microbiana.

C. Especificidad de sustrato proteico

Ya se ha mencionado que PK I y PK II resultaron más eficientes en la fosforilación de histona H2A que de fosvitina mientras que PK III manifestó una capacidad de fosforilación similar para ambos sustratos proteicos (Fig. 13). Precisamente este pico de actividad también fue el que con mayor eficiencia fosforiló caseína (Fig. 14). Por otro lado la protamina fue fosforilada preferencialmente por PK II.

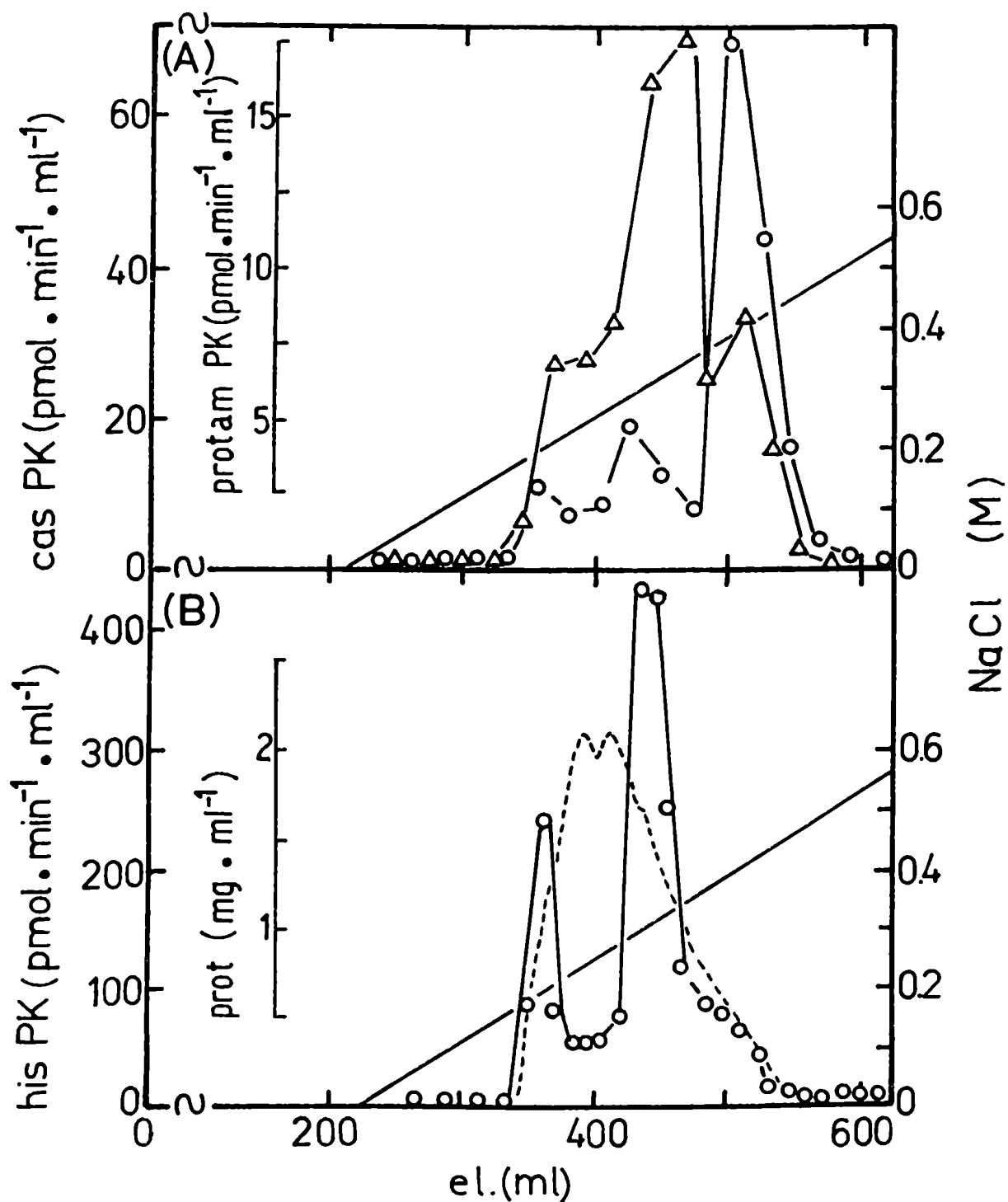


Figura 14. Cromatografía en DEAE-celulosa de un sobrenadante de 105 000 x g. Las dimensiones de la columna y condiciones ya fueron descritas en MATERIALES Y METODOS (III).

(A) actividades quinasa de proteínas ensayadas con protamina (1 mg/ml) (Δ) o caseína (1 mg/ml) (\circ) como sustrato.

(B) actividades quinasa de proteínas ensayadas con histona H2A (1 mg/ml) como sustrato en presencia de AMP cíclico 10 μ M (\circ). La línea punteada indica la concentración de proteínas.

Es importante destacar que si bien PK I fosforiló histona H2A en forma creciente como mínimo hasta una concentración de 10 mg/ml de la misma, PK II llegó a un óptimo de incorporación de fosfato a una concentración de 1 mg/ml siendo inhibida con concentraciones mayores de sustrato (Fig. 15).

Por otro lado, la actividad PK III fue algo mayor con fosvitina que con caseína, cuando la concentración de Mg^{2+} en el ensayo fue de 1 mM (óptima para fosvitina). Ninguno de los dos sustratos proteicos pudo saturar el sistema, aún a concentraciones de 10 mg/ml (Fig. 16).

Cuando la concentración de sustrato proteico exógeno es nula, se puede medir la autofosforilación de las fracciones con actividad quinasa. Sólo resultó apreciable esta autofosforilación en el caso de PK I, que resultó ser un 20 % de la incorporación obtenida sobre histona H2A a concentraciones de 10 mg/ml (Fig. 15). Para PK II y PK III la autofosforilación careció de relevancia (Figs. 15 y 16).

D. Requerimientos de Mg^{2+} y ATP. Influencia del AMP cíclico y del pH.

La concentración óptima de Mg^{2+} resultó ser 10 mM para PK I y PK II. A mayor concentración de metal se produjo una disminución de la actividad probablemente por efecto de la fuerza iónica del medio (Fig. 17). La actividad PK III se comportó frente al Mg^{2+} de distinto modo, dependiendo del sustrato proteico usado. Con fosvitina presentó un máximo de actividad a una concentración de Mg^{2+} 1 mM, para luego caer en forma pronunciada a concentraciones mayores (Fig. 18). Se puede suponer que este efecto fue debido a la insolubilización de la fosvitina provocada por el Mg^{2+} en concentraciones mayores a 1 mM, hecho que se evidenció por la aparición de precipitados en las mezclas de incubación. Por el contrario, con caseína como sustrato, la actividad aumentó en forma creciente hasta llegar a una meseta a partir de Mg^{2+} 5 mM (Fig. 18). En este caso no se observó la formación de los referidos precipitados.

Los requerimientos de ATP (o $Mg\ ATP^{2-}$) variaron con la modificación de

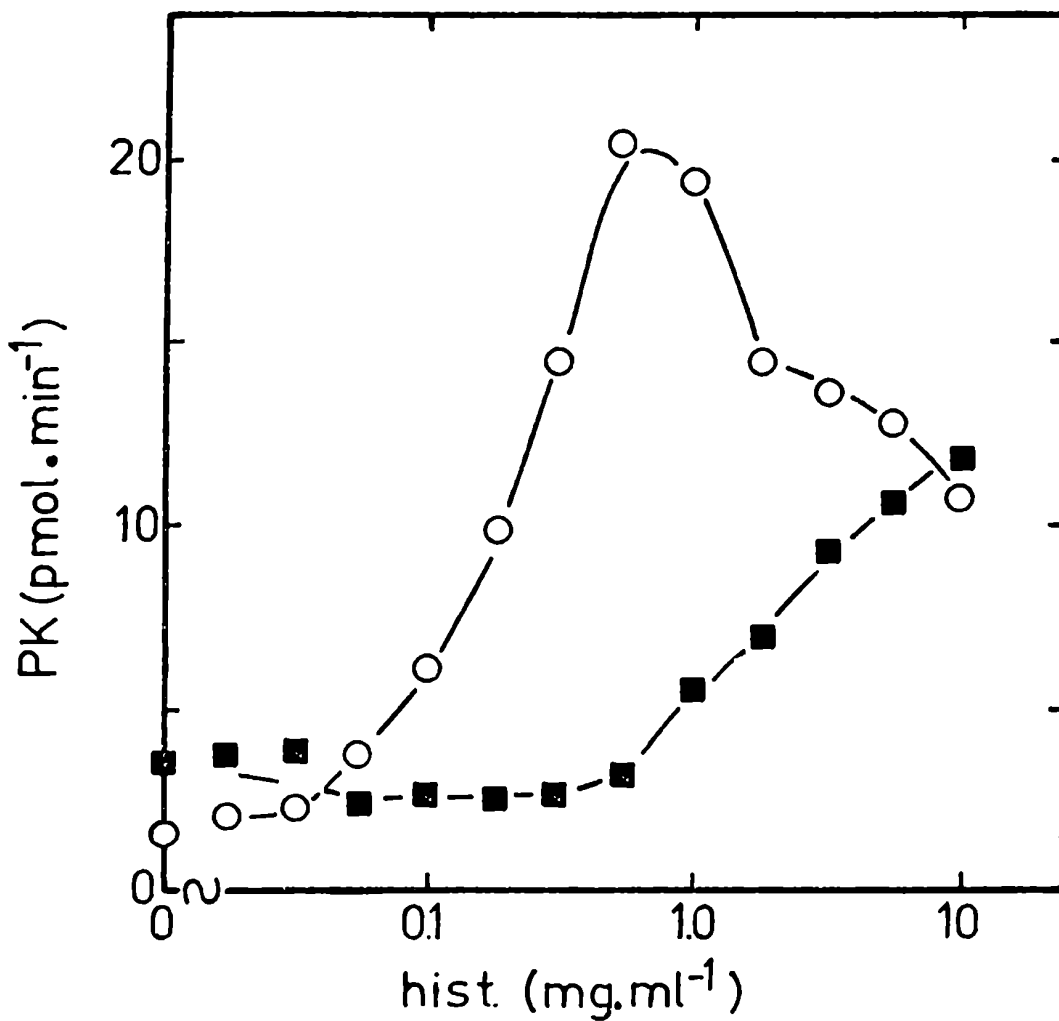


Figura 15. Curvas de concentración de sustrato proteico para las actividades PK I (■) y PK II (○) con histona H2A. Los ensayos fueron realizados en presencia de AMP cíclico 10 μ M con el agregado de 0,050 ml de preparación enzimática de 1,14 mg/ml y 2,28 mg/ml de proteínas para PK I y PK II respectivamente.

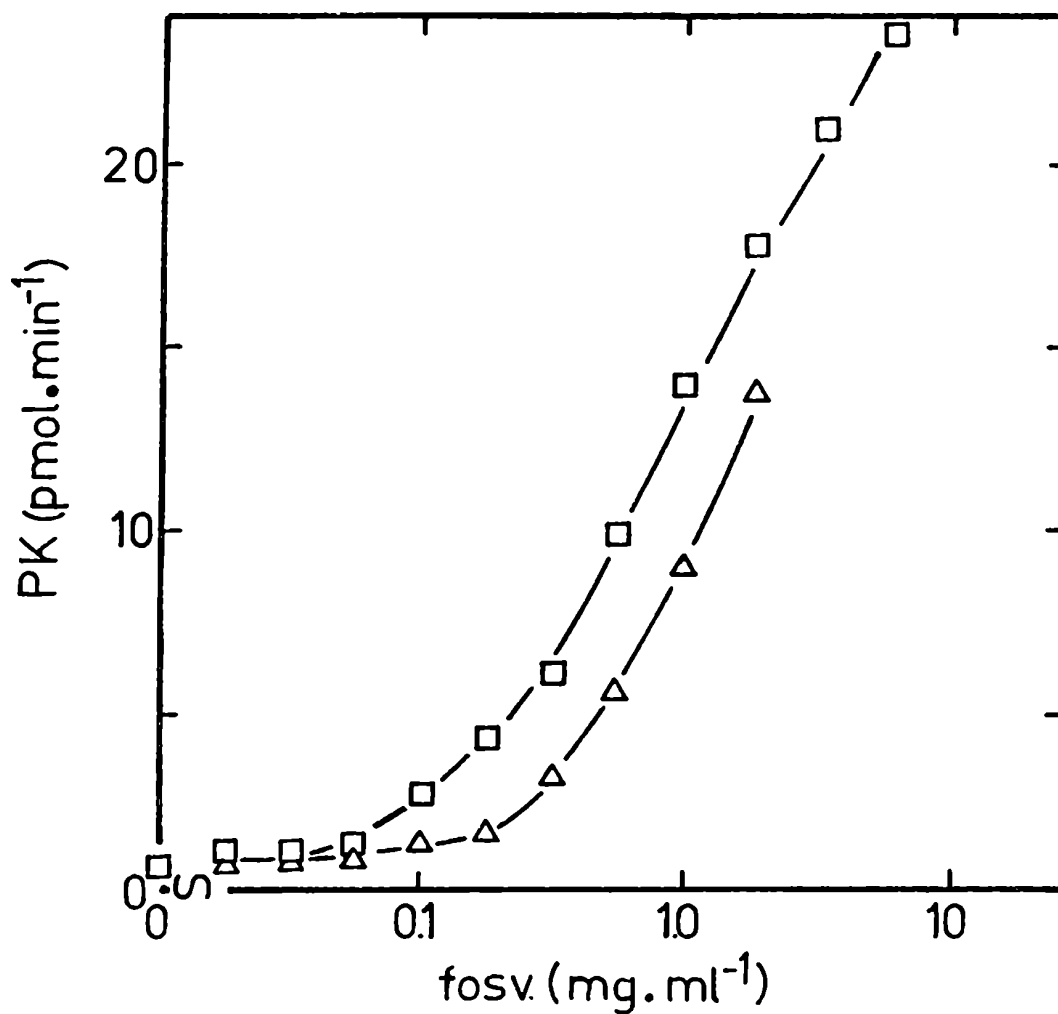


Figura 16. Curvas de concentración de sustrato proteico para la actividad PK III con fosvitina (□) o caseína (△). Los ensayos fueron realizados en presencia de Mg²⁺ 1 mM con el agregado de 0,050 ml de preparación enzimática de 0,86 mg/ml de proteínas.

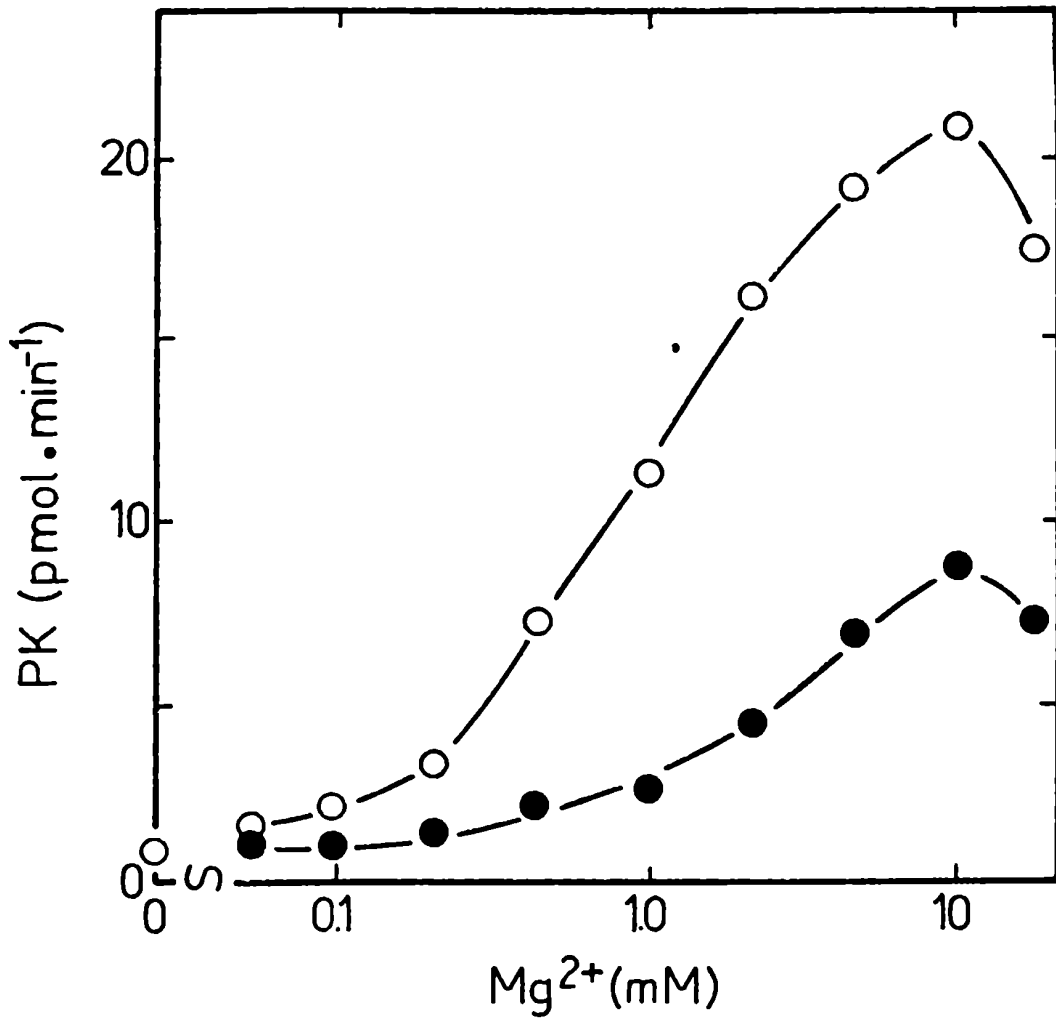


Figura 17. Curvas de concentración de Mg²⁺ para las actividades PK I (●) y PK II (○). Los ensayos fueron realizados en presencia de histona H2A 1 mg/ml y AMP cíclico 10 μM, con el agregado de 0,050 ml de preparación enzimática en las concentraciones indicadas en la Fig.15.

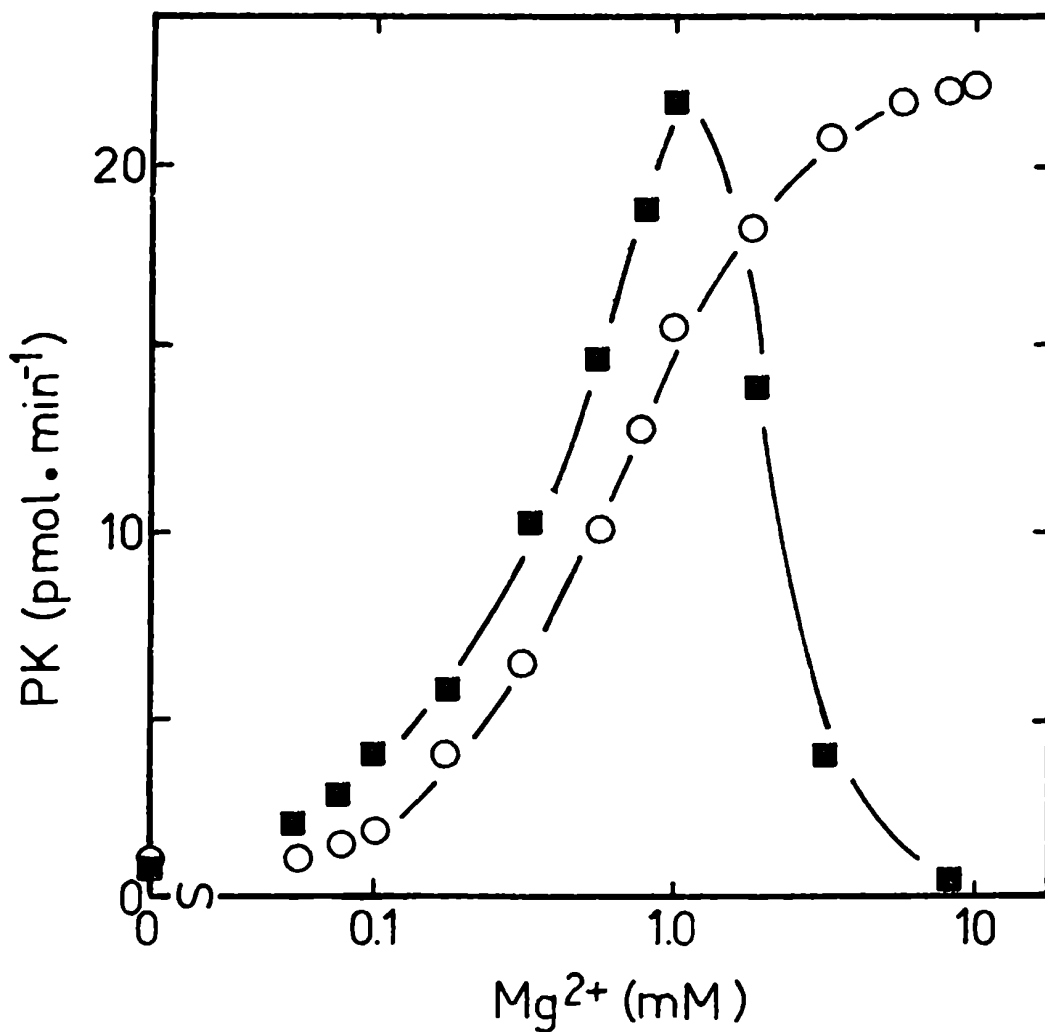


Figura 18. Curvas de concentración de Mg^{2+} para la actividad PK III ensayadas en presencia de 1 mg/ml de fosvitina (■) o caseína (○), con el agregado de 0,050 ml de preparación enzimática en la concentración indicada en la Fig. 16.

las concentraciones de sustrato proteico, Mg^{2+} e incluso de una preparación enzimática a otra. Es por ésto que los valores de K_S para el ATP de las tres actividades quinasa oscilaron entre 20 y 50 μM para el ATP según cálculos realizados a partir de los gráficos de Hanes y Woolf (129)(Fig. 19). Las variaciones entre ensayos no pudieron ser eliminadas aún uniformando las concentraciones de sustrato y en condiciones óptimas de concentración de Mg^{2+} .

Respecto del efecto del AMP cíclico sobre el comportamiento cinético de PK I en función de la concentración de $Mg\ ATP^{2-}$ se observó un aumento de la velocidad máxima sin alteración del K_S para el referido sustrato (Fig. 19 A). Esta propiedad cinética concuerda con el modelo de quinasa de proteínas formada por subunidades regulatorias y catalíticas, donde la unión de ambos tipos de subunidades produce una holoenzima inactiva.

Las tres actividades quinasa han mostrado ser insensibles a los cambios de pH cuando este varió entre 6 y 8. Por esta causa todos los ensayos se llevaron a cabo a pH 6,8 que es intermedio entre ambos valores y cercano al fisiológico.

E. Efecto de los nucleótidos cíclicos sobre PK I

Sólo la actividad PK I resultó ser sensible a la activación por AMP cíclico (Fig. 13). Este efecto comenzó a ser detectable a concentraciones de 0,3 nM de AMP cíclico para continuar en forma creciente hasta 30 nM donde llegó a saturación. El $A_{0,5}$ calculado fue de aproximadamente 2 nM (Fig. 20).

El GMP cíclico activó sólo en forma parcial a concentraciones mayores de 1 μM . Esta diferencia de tres órdenes de magnitud indicaría un alto grado de especificidad del efecto estimulador por el AMP cíclico.

Por otra parte, el efecto del nucleótido cíclico no se modificó por incremento hasta 10 mg/ml en la concentración de histona H2A en el ensayo (Fig. 21). Sin embargo si la preparación de PK I es preincubada en presen-

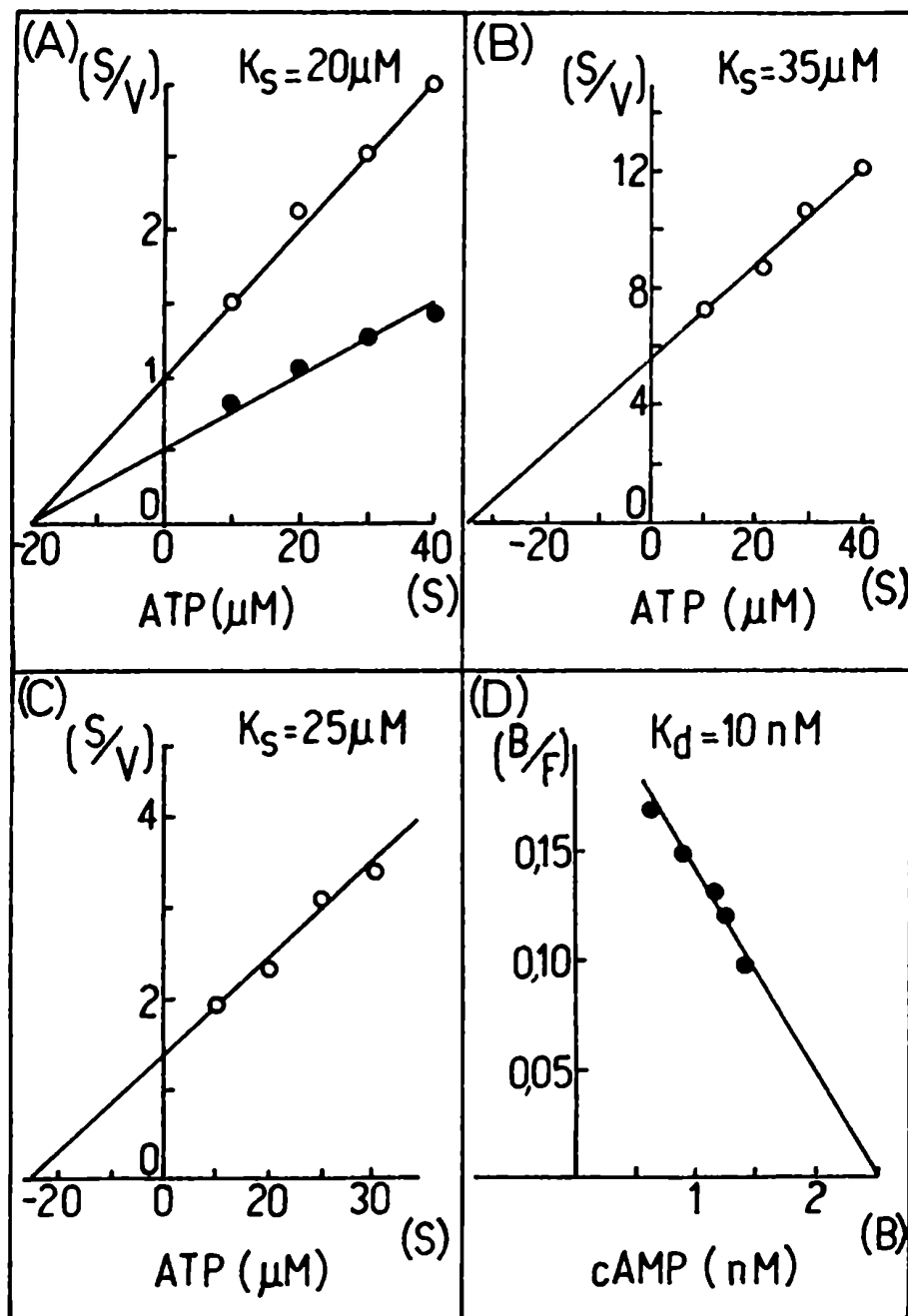


Figura 19. (A), (B) y (C): gráficos de Hanes y Woolf de las actividades quinasa respecto del sustrato Mg ATP^{2-} .

(A) La actividad PK I fue ensayada en ausencia (○) o presencia (●) de AMP cíclico 10 μM , con histona H2A 10 mg/ml y Mg^{2+} 10 mM.

(B) La actividad PK II fue ensayada en ausencia de AMP cíclico (○), con histona H2A 1 mg/ml y Mg^{2+} 10 mM.

(C) La actividad PK III fue ensayada con fosvitina (○) 1 mg/ml y Mg^{2+} 1 mM. En los tres casos se usaron 0,050 ml de preparaciones enzimáticas cuyas concentraciones proteicas fueron indicadas en las Figs. 15 y 16. Las velocidades iniciales se calcularon a partir de curvas de tiempo obtenidas para cada concentración de nucleótido trifosfato.

(D) Gráfico de Scatchard de la actividad de unión de AMP cíclico \bar{R} (●). Para el ensayo de binding se usaron 0,050 ml de una preparación del pico \bar{R} concentrada por ultrafiltración hasta 25,7 mg/ml de proteínas.

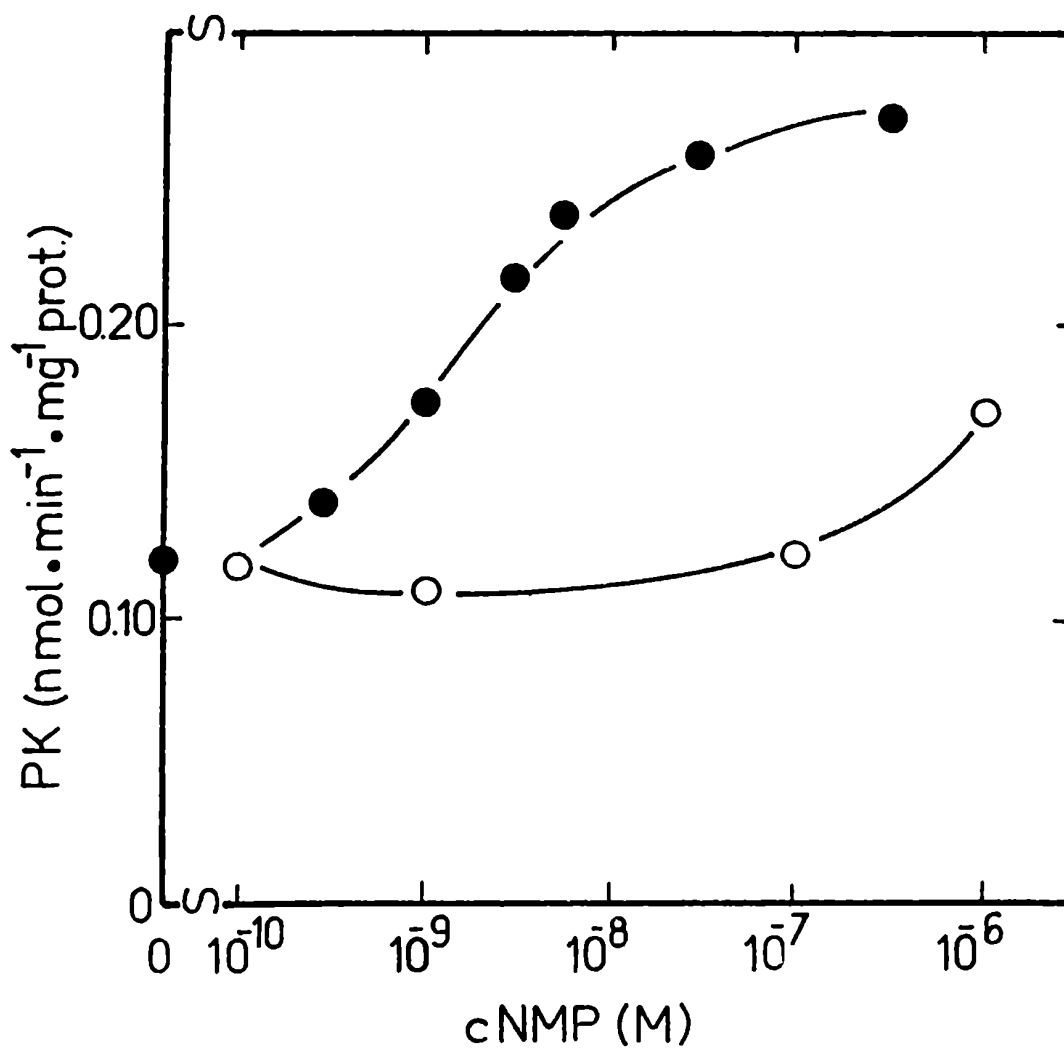


Figura 20. Curva de dosis-respuesta de la actividad PK I para AMP cíclico (●) y GMP cíclico (○). El ensayo fue realizado con histona H2A 1 mg/ml. La concentración de proteínas en el ensayo fue de 0,67 mg/ml.

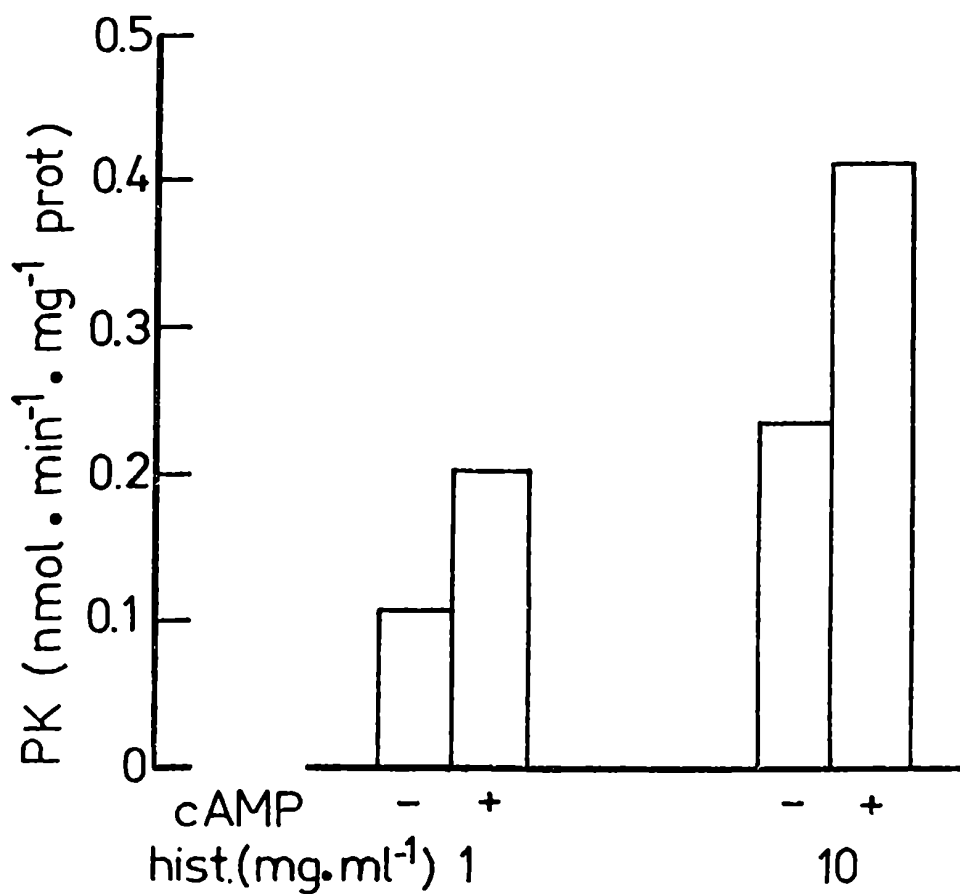


Figura 21. Efecto de la concentración de histona H2A sobre la activación de PK I por el AMP cíclico. Las actividades se ensayaron con la concentración indicada de histona H2A en ausencia o presencia de AMP cíclico 10 μ M. La concentración de proteínas en el ensayo fue de 0,41 mg/ml.

cia de dicho sustrato proteico a la referida concentración, la quinasa aumenta su actividad en la medida que pierde la capacidad de ser estimulada por el AMP cíclico (Fig. 22). Este último resultado puede interpretarse en términos de que ambas condiciones: presencia del nucleótido cíclico en el ensayo o preincubación con el sustrato proteico, producen el mismo efecto sobre la enzima. Esto sería debido a la disociación de una holoenzima putativa en sus subunidades catalíticas y regulatorias.

Respecto de esta última posibilidad, puede suponerse que PK I representa la holoenzima de una quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico, y que a su vez el ya mencionado pico R, que tiene capacidad de unir AMP cíclico, está constituido por típicas "subunidades regulatorias libres". Tal posibilidad ha sido analizada con el experimento que se ve en la Fig. 23. Puede apreciarse que la preincubación de una preparación de PK I con concentraciones crecientes de un preparado de R da lugar a una creciente pérdida de actividad quinasa. El efecto es revertido por la presencia de AMP cíclico en el ensayo o por el calentamiento a 100°C de la preparación de R. Estas observaciones tienden a confirmar que:

- 1) PK I es la holoenzima de una quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico.
- 2) R es un preparado de subunidades regulatorias "libres".
- 3) PK I existe en las condiciones del ensayo sin AMP cíclico en forma parcialmente disociada.
- 4) La adición de R desplaza el equilibrio del sistema hacia la forma asociada.
- 5) En preparaciones crudas R está en exceso respecto del componente catalítico de PK I.

Este tipo de observaciones también se encuentra confirmado por los valores del K_d para el AMP cíclico de preparaciones de R, calculado a partir del gráfico de Scatchard (300) (Fig. 19 D). El valor obtenido, 10 nM, concuerda aproximadamente con la concentración de AMP cíclico que pro-

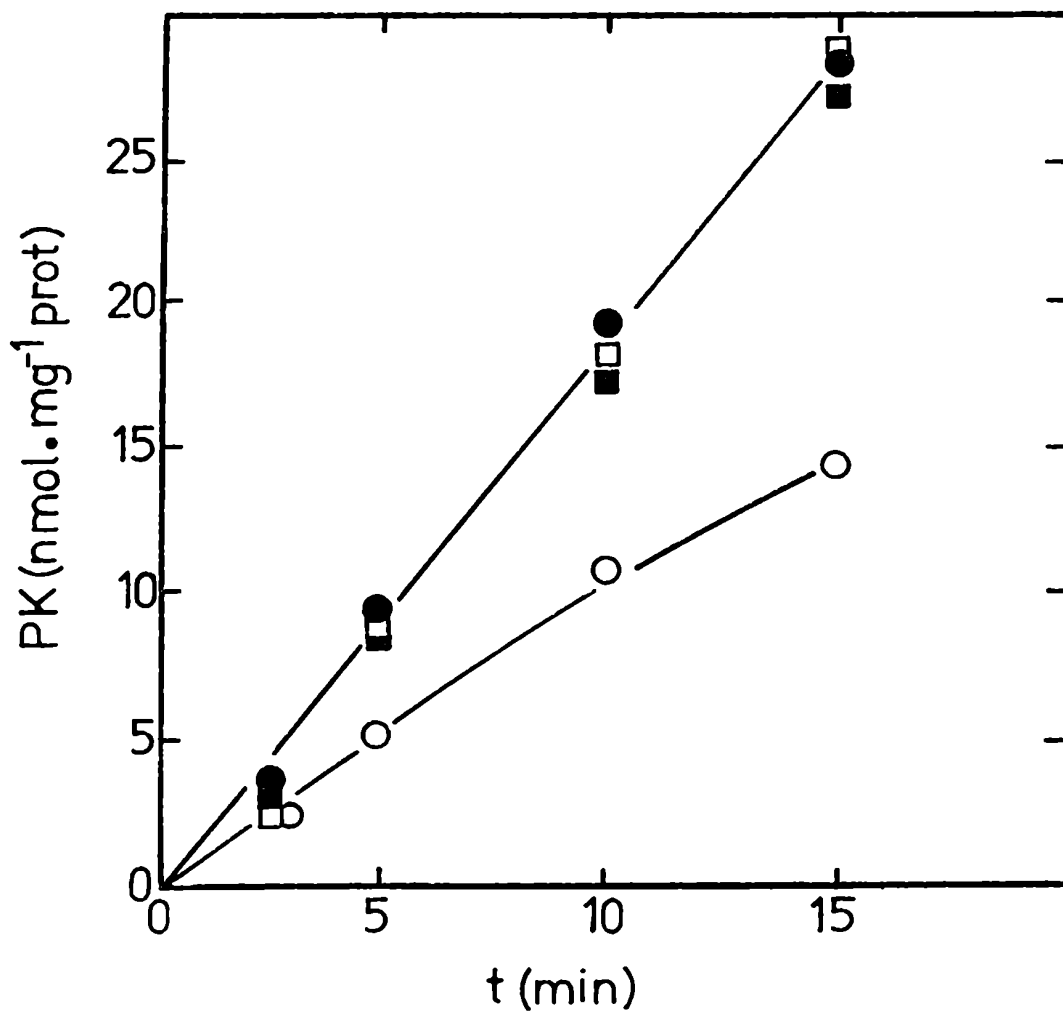


Figura 22. Curvas de tiempo de ensayo para la actividad PK I. Los ensayos se realizaron en ausencia (○, □) o presencia (●, ■) de AMP cíclico 10 μ M. Las preparaciones enzimáticas no fueron preincubadas (○, ●) o fueron preincubadas (□, ■) durante 5 min a 30°C en presencia de histona H2A 10 mg/ml. La incubación fue iniciada con el agregado del ATP y el Mg^{2+} . La concentración de proteínas en el ensayo fue de 0,27 mg/ml.

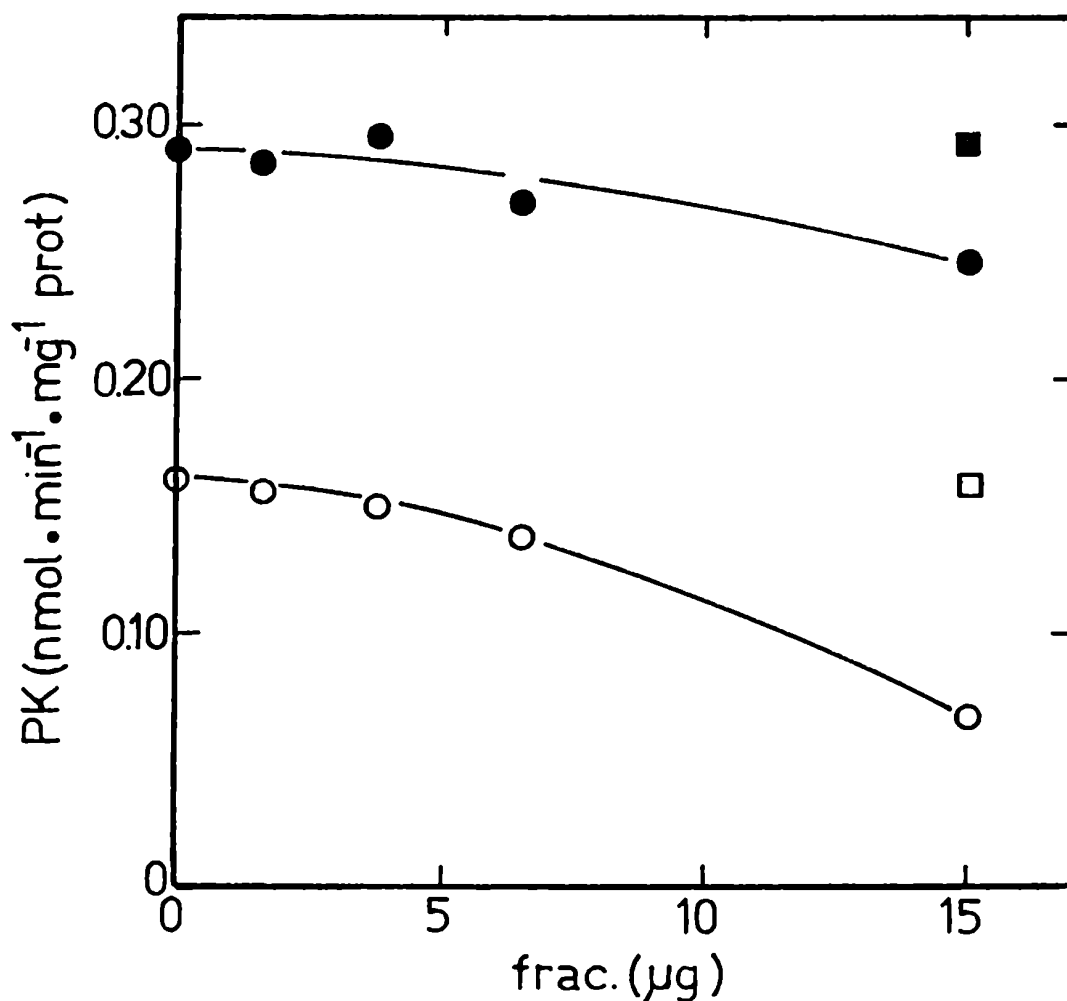


Figura 23. Efecto de la actividad de unión de AMP cíclico \underline{R} sobre PK I. Distintas diluciones de \underline{R} en buffer B se preincubaron en presencia de mercaptoetanol 1 mM a 30°C durante 10 min con alícuotas de 0,030 ml de preparación enzimática en un volumen total de 0,080 ml. Luego se agregaron 0,020 ml de mezcla de incubación sin (○) o con (●) AMP cíclico 10 μM. La incubación se desarrolló según lo descrito en MATERIALES Y METODOS (VII. B). Los símbolos cuadrados indican el efecto de \underline{R} , tratado a 100°C durante 3 min, preincubada en condiciones similares a las recién descritas y con ensayos realizados en presencia (■) o ausencia (□) de AMP cíclico. La concentración de proteínas de la preparación enzimática fue de 0,67 mg/ml.

dujo el 50% de la activación de PK I.

F. Relación entre PK II, R y AMP cíclico

Un punto importante a establecer es la naturaleza de la actividad de PK II. Puede tratarse bien de una quinasa sin relación a PK I, o por el contrario podría corresponder a la actividad de "subunidades catalíticas libres" de la holoenzima PK I.

Como ya se vio, PK II no es modificada por la presencia de nucleótidos cíclicos. El experimento que se muestra en la Fig. 24, indica que las preparaciones de R no afectan la actividad de esta quinasa, hecho que tiende a descartar la posibilidad de que la misma esté formada por subunidades catalíticas libres. Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre con PK I, en el caso de PK II no existe activación por preincubación con histona (Fig. 25). Asimismo el incremento en la concentración de este sustrato proteico en las mezclas de ensayo en lugar de producir activación, inhiben a esta enzima (Fig. 26). Sobre esta base es dable concluir que PK II es una quinasa no relacionada a la actividad de PK I.

G. Inhibidor termoestable

-Obtención por cromatografía en DEAE-celulosa

Los extractos dializados y calentados de Neurospora resultaron inhibidores de la actividad PK I. El inhibidor fue purificado por cromatografía en DEAE-celulosa de sobrenadantes de 100 000 x g dializados y calentados a 100°C durante 3 minutos. En estas condiciones el inhibidor apareció en las fracciones correspondientes al percolado y lavado (4 preparaciones) (Fig. 27 B).

Por otro lado el inhibidor también fue detectado en fracciones calentadas de la columna de DEAE-celulosa de sobrenadantes de 100 000 x g no

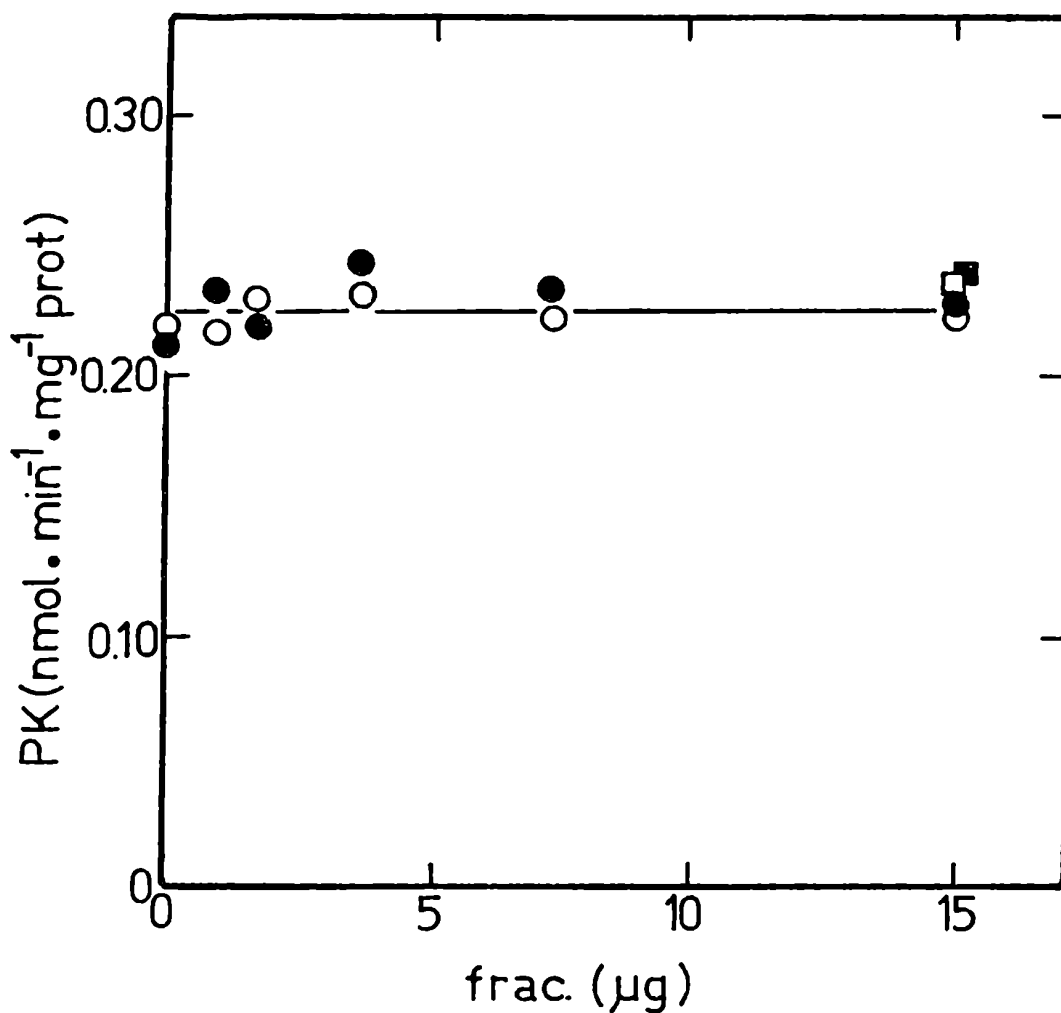


Figura 24. Efecto de la actividad de unión de AMP cíclico \underline{R} sobre PK II. Distintas diluciones de \underline{R} en buffer B se preincubaron tal como fue descrito en la Fig. 23. Las incubaciones, desarrolladas según la leyenda de esa misma figura, se realizaron en ausencia (○) o presencia (●) de AMP cíclico 10 μM . La concentración de proteínas de la preparación enzimática fue de 1,2 mg/ml. Los símbolos cuadrados indican el efecto de \underline{R} tratado según se explicó en la Fig. 23.

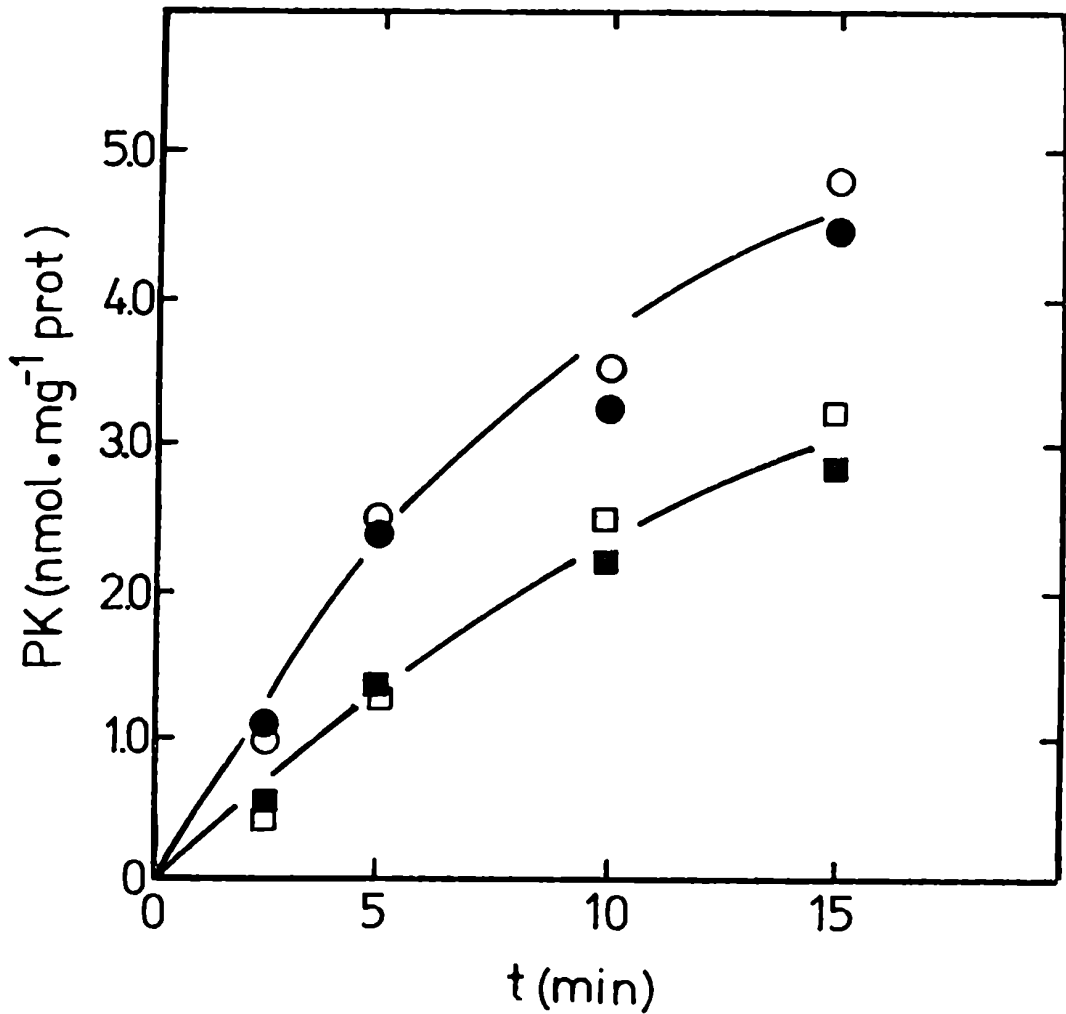


Figura 25. Curvas de tiempo de ensayo para la actividad PK II. Los ensayos se realizaron según fue descrito en la Fig. 22, en ausencia (○, □) o presencia (●, ■) de AMP cíclico 10 μ M. Las preparaciones no fueron preincubadas (○, ●) o sí lo fueron (□, ■) en las condiciones señaladas anteriormente. La concentración de proteínas en el ensayo fue de 0,33 mg/ml.

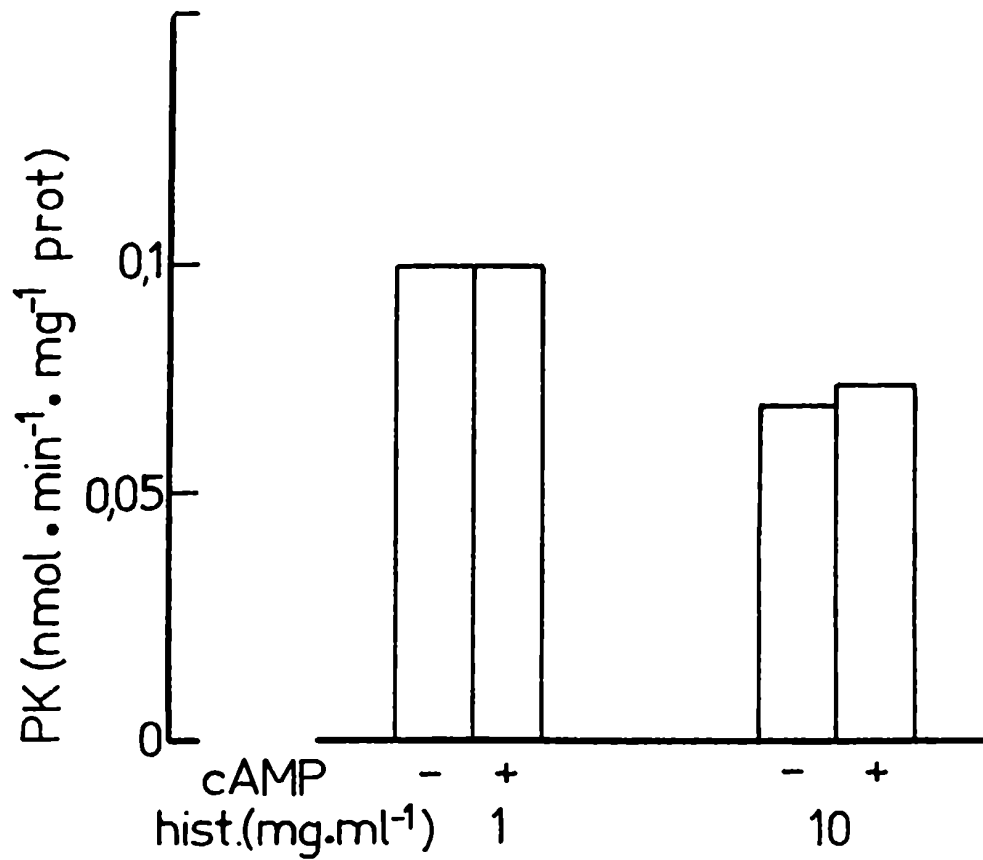


Figura 26. Efecto de la concentración de histona H2A sobre PK II. Las actividades se ensayaron según fue descrito en la Fig. 21. La concentración de proteínas en el ensayo fue de 0,61 mg/ml.

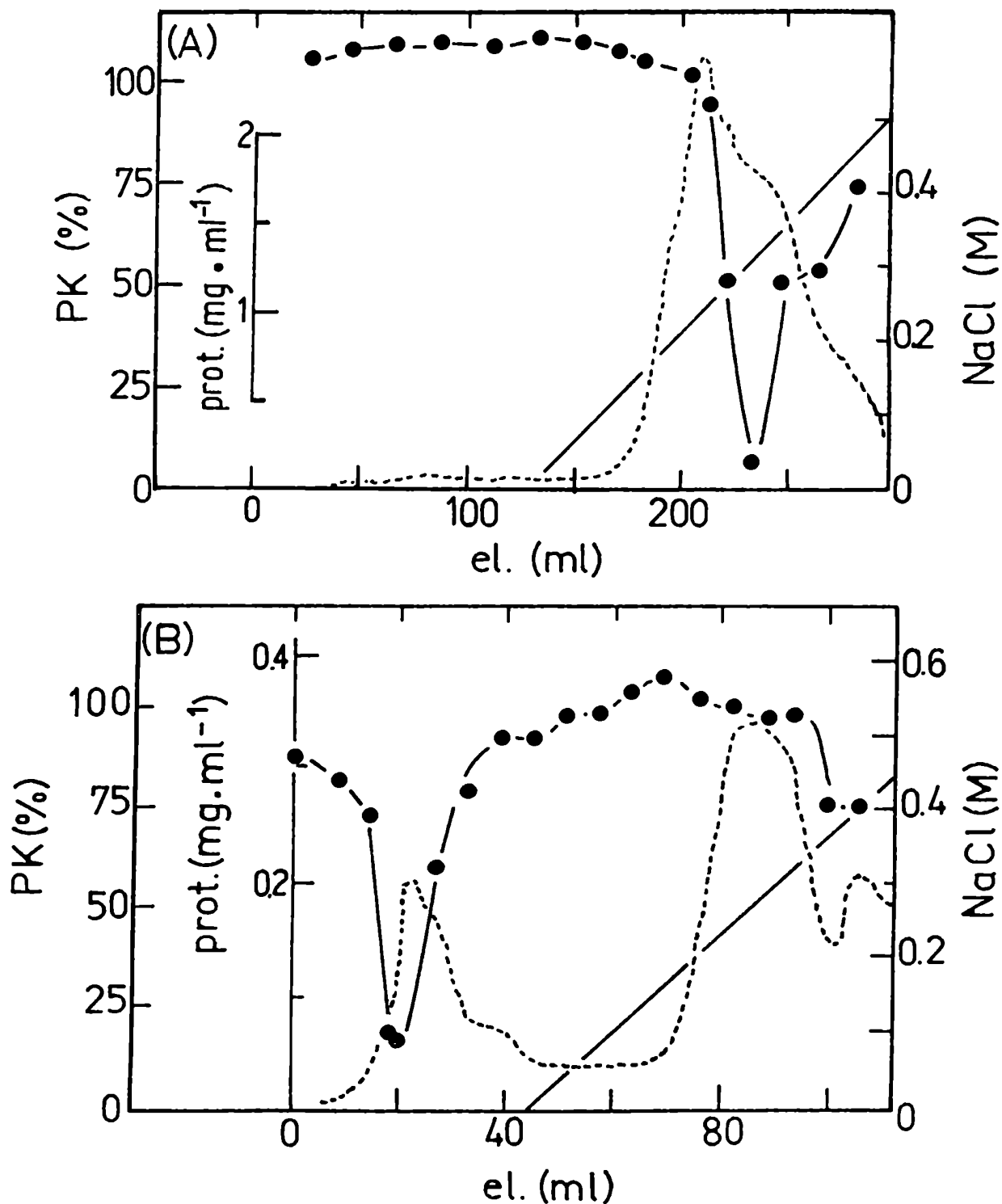


Figura 27. Cromatografía en DEAE-celulosa del inhibidor termoestable. Las condiciones fueron las descritas en la Fig. 13 para (A) y en MATERIALES Y METODOS (IV. A) para (A) y (B). La incubación se realizó en presencia de AMP cíclico 10 μ M, con el agregado de 0,050 ml de cada fracción y 0,030 ml de una preparación conteniendo PK I (0,70 mg/ml de proteína). Las actividades específicas en ausencia de inhibidor (100%) fueron 0,30 y 0,35 nmol/min mg de proteínas para (A) y (B) respectivamente. La línea punteada indica la concentración de proteínas.

calentados. La presencia del inhibidor en los referidos fracciones calentadas a 100° por 3 minutos se muestra en la Fig. 27 A. Dichas fracciones correspondieron a una concentración de $0,29 \pm 0,02$ (4 preparaciones) de NaCl en el gradiente.

Tanto el inhibidor obtenido de la columna de DEAE-celulosa del sobrenadante calentado (Fig. 27 B) como el existente en fracciones calentadas de la cromatografía de un sobrenadante no calentado (Fig. 27 A) no conservan su actividad al ser dializados después del tratamiento térmico. Esto podría significar que la actividad termoestable se encuentra asociada a alguna macromolécula termolábil de naturaleza probablemente proteica. El efecto del calor sería desnaturalizar la porción termolábil liberando al inhibidor termoestable que tendría menor tamaño. Esta interpretación estaría apoyada por el hecho de que la actividad inhibitoria del SN 105 calentado no se ha retenido en la DEAE-celulosa (Fig. 27 B) mientras que la del SN 105 no calentado se retuvo y fue necesario eluirlo con NaCl (Fig.27 A).

Tomando como base la similitud de propiedades y las suposiciones enunciadas se podría suponer que ambas actividades corresponden al mismo factor inhibidor. Por esta causa las siguientes caracterizaciones fueron hechas con el inhibidor preparado por el segundo método (Fig. 27 A).

-Especificidad de acción

El inhibidor resultó más efectivo sobre PK I que sobre PK II y casi no tuvo ningún efecto sobre PK III (Fig. 28). Por otro lado el efecto inhibitorio sobre ambas quinasas no dependió del tiempo de ensayo (Figs. 29 y 31). Referente al efecto del AMP cíclico sobre PK I, se continuó observando activación por dicho nucleótido en presencia del inhibidor (Fig.29). Dicho comportamiento sugeriría que la acción del AMP cíclico se podría ejercer solamente sobre las moléculas de enzima no afectadas por el inhibidor. La preincubación de PK II con el factor no alteró el grado de inhibición, siendo la interacción de la enzima con el factor instantánea

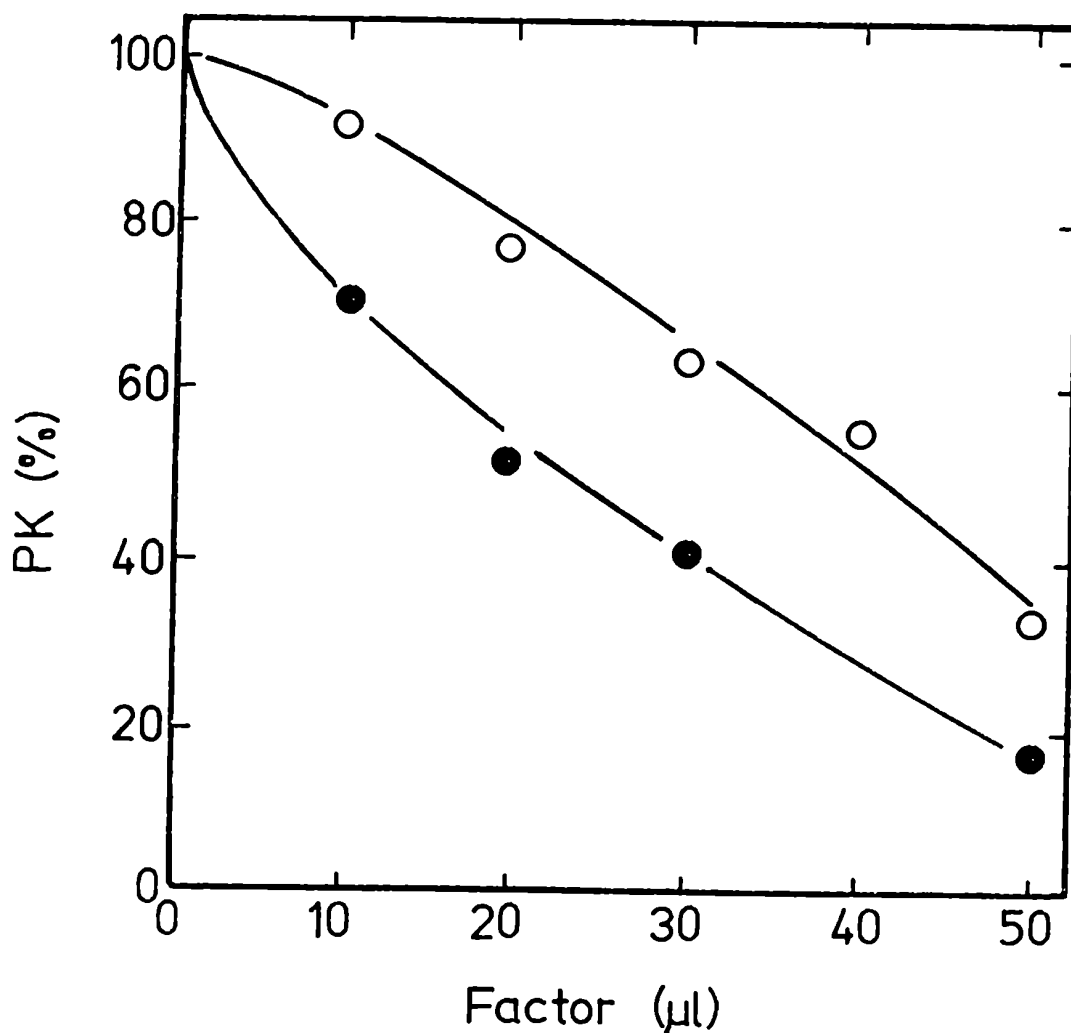


Figura 28. Curva de dosis-respuesta del inhibidor termoestable para las actividades PK I (●) y PK II (○). El factor preparado según la Fig. 27 A se ensayó con histona H2A (5 mg/ml) para PK I e histona H2A (0,5 mg/ml) para PK II. La concentración de Mg^{2+} en el ensayo fue de 5 mM y la de AMP cíclico de 10 μ M. Las actividades específicas en ausencia de inhibidor (100%) fueron de 0,38 y 0,48 nmol/ml mg de proteínas para PK I y PK II respectivamente. La concentración de proteínas de la preparación de inhibidor fue de 0,12 mg/ml y la de preparaciones enzimáticas 0,70 mg/ml (PK I) y 0,80 mg/ml (PK II).

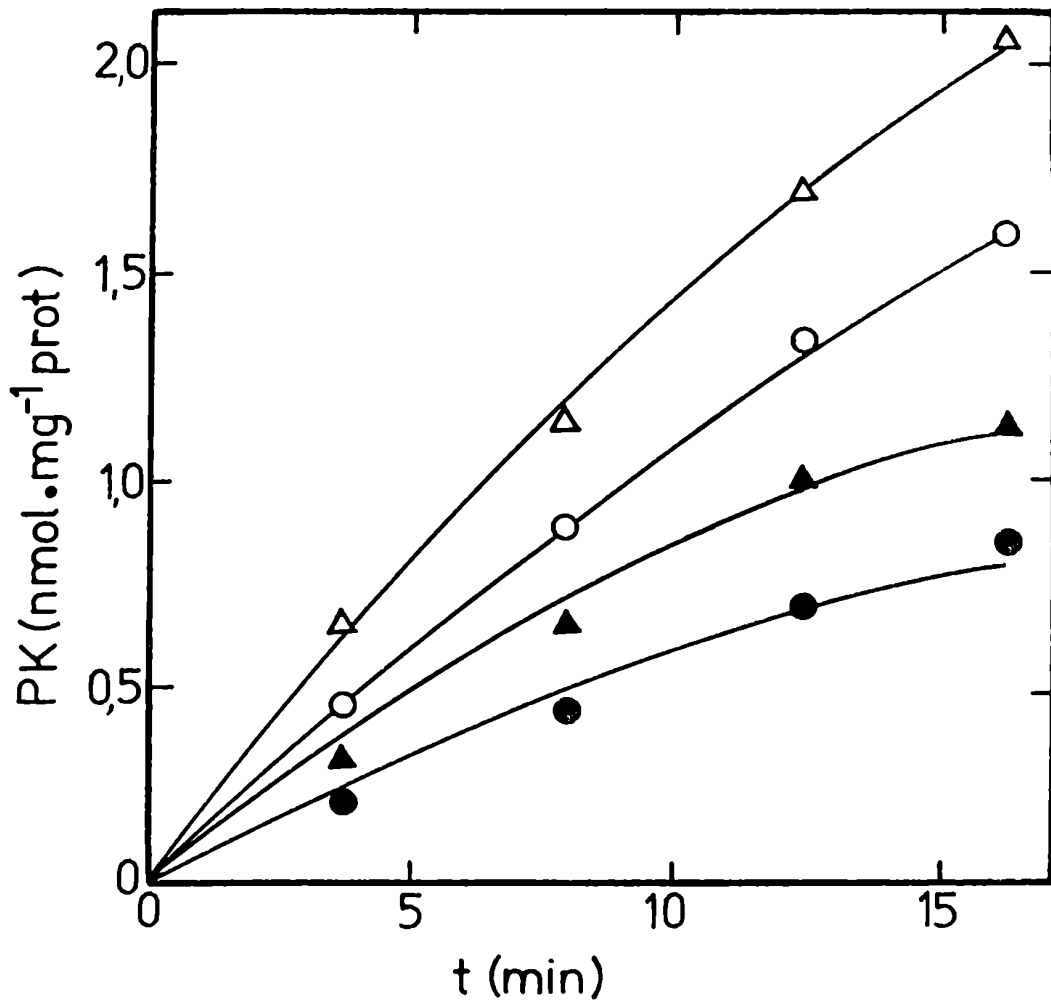


Figura 29. Curva de tiempo de ensayo para la actividad PK I. Los ensayos se efectuaron con histona H2A 5 mg/ml, en ausencia (○, ●) o presencia (△, ▲) de AMP cíclico 10 μ M. Las preparaciones no contenían (○, △) o contenían (●, ▲) 0,020 ml de inhibidor termoestable. Las concentraciones de proteínas de las preparaciones de enzima y de inhibidor fueron las señaladas en la Fig. 28.

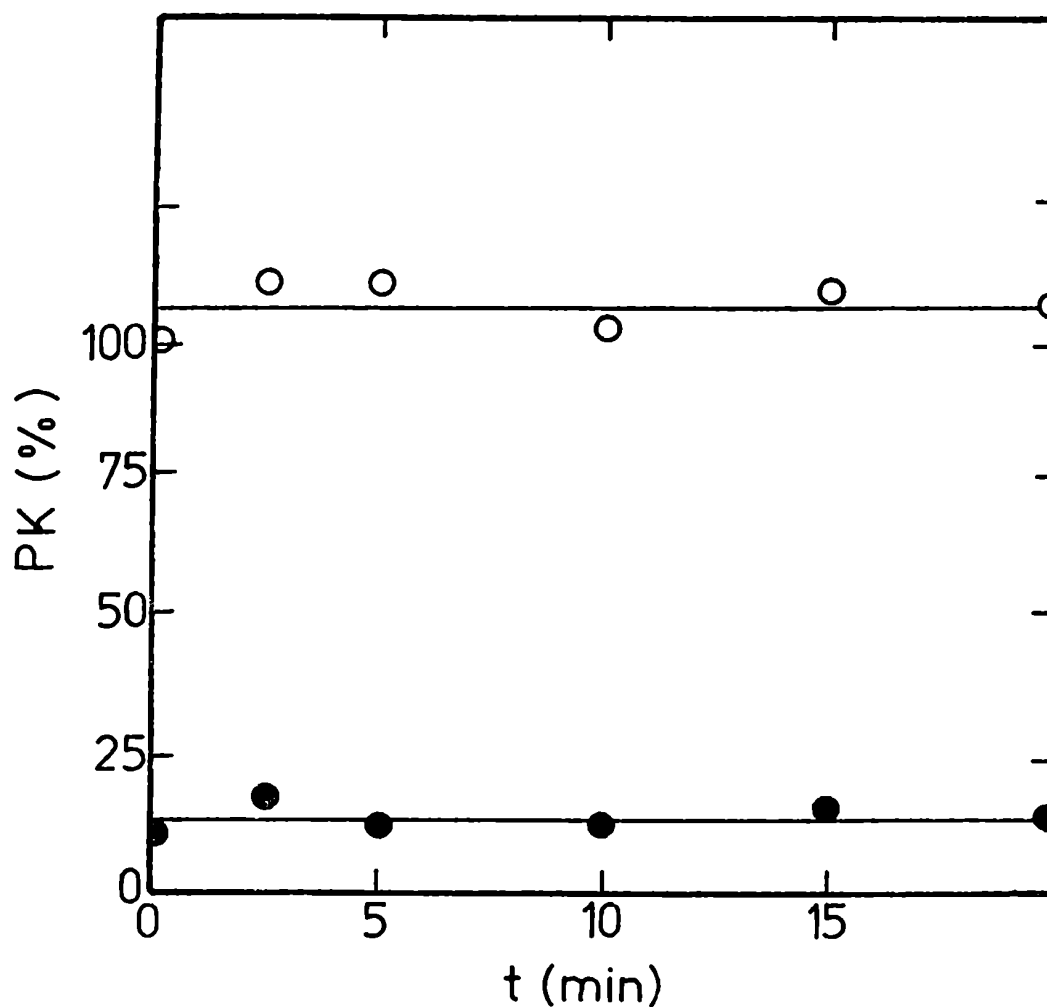


Figura 30. Curvas de tiempo de preincubación de la actividad PK II en ausencia (○) o presencia (●) de 0,050 ml de inhibidor termoestable (0,12 mg de proteínas/ml). El ensayo se inició con el agregado de mezcla de incubación siendo las concentraciones finales de Mg^{2+} e histona H2A 10 mM y 1 mg/ml respectivamente. La concentración de proteínas de la preparación enzimática fue de 0,80 mg/ml y la actividad específica sin inhibidor (100%) fue de 0,62 nmol/min ml.

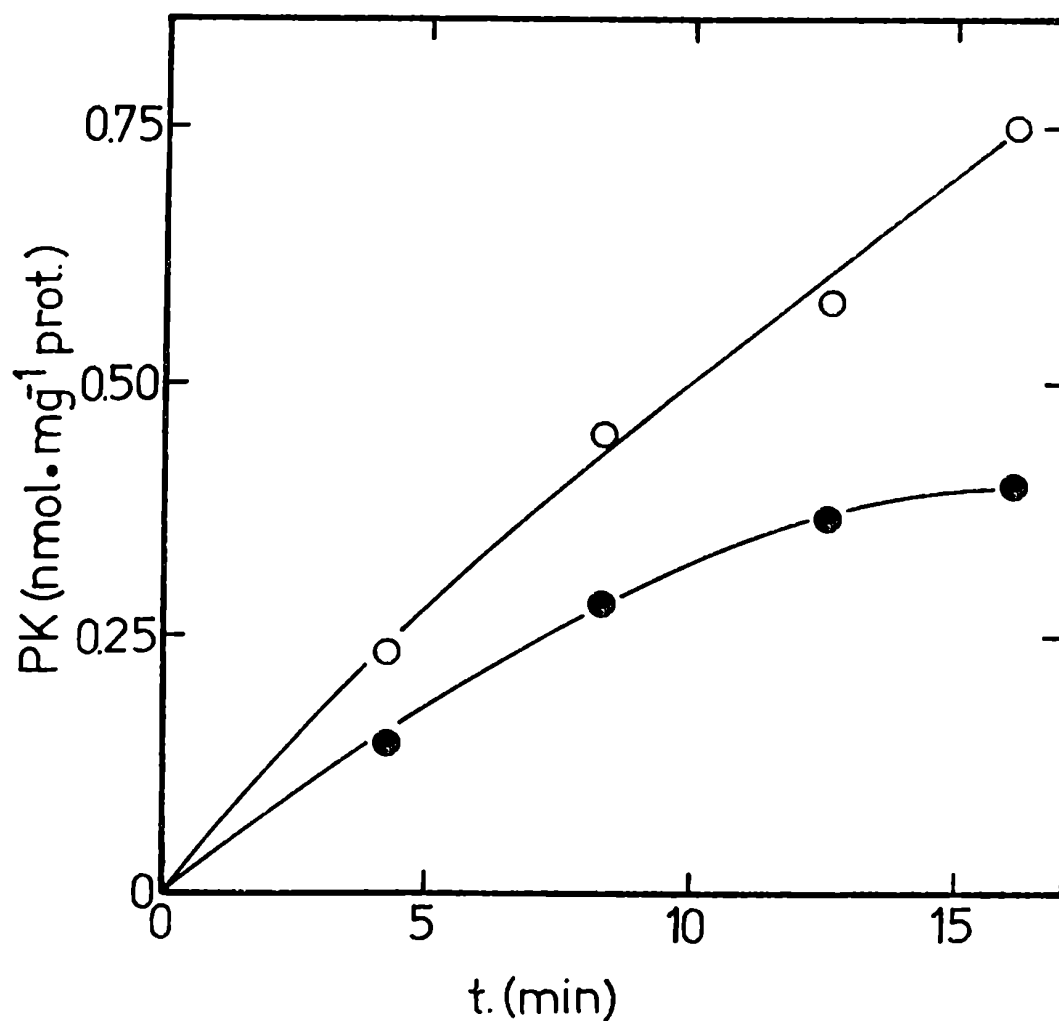


Figura 31. Curva de tiempo de ensayo para la actividad PK II. Los ensayos de quinasa se efectuaron con histona H2A 5 mg/ml sin (○) o con (●) el agregado de 0,020 ml del inhibidor termoestable. Las concentraciones de proteínas de las preparaciones de enzima y de inhibidor fueron las señaladas en la Fig. 30.

respecto de las escalas de tiempo usadas (Fig. 30)

Dos hechos apoyarían la idea de que el inhibidor actúa sobre la porción catalítica de las quinasas. El primero es que tuvo efecto sobre PK I aún en presencia de AMP cíclico (Fig. 29) y el segundo es que afectó la actividad de PK II (Figs. 28, 30 y 31).

II. PARAMETROS MOLECULARES DE LAS QUINASAS

A. Quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico y actividad de unión de AMP cíclico

-Centrifugación en gradientes de sacarosa

La actividad PK I dializada y concentrada fue sembrada sobre un gradiente de sacarosa que contenía NaCl 0,1 M. El resultado de la centrifugación fue la aparición de un pico de actividad con coeficiente de sedimentación de 5,8 S y un hombro con coeficiente de sedimentación de 3,8 S. Tanto el pico como el hombro resultaron activables por AMP cíclico 10 μ M y además coincidieron con picos de actividad de unión de dicho nucleótido (Fig. 32 A). Estos datos pueden explicarse sobre la base de dos suposiciones: 1) La holoenzima PK I (5,8 S) se disoció parcialmente por efecto de la fuerza iónica y la presión hidrostática durante la centrifugación, generando subunidades catalíticas libres (3,8 S) (C) y subunidades regulatorias libres (3,4 S) (R); y 2) La constante de sedimentación de R libre sería bastante similar a la de C libre.

Por otro lado, la existencia de un estímulo provocado por AMP cíclico en un amplio intervalo del gradiente puede explicarse por el equilibrio:

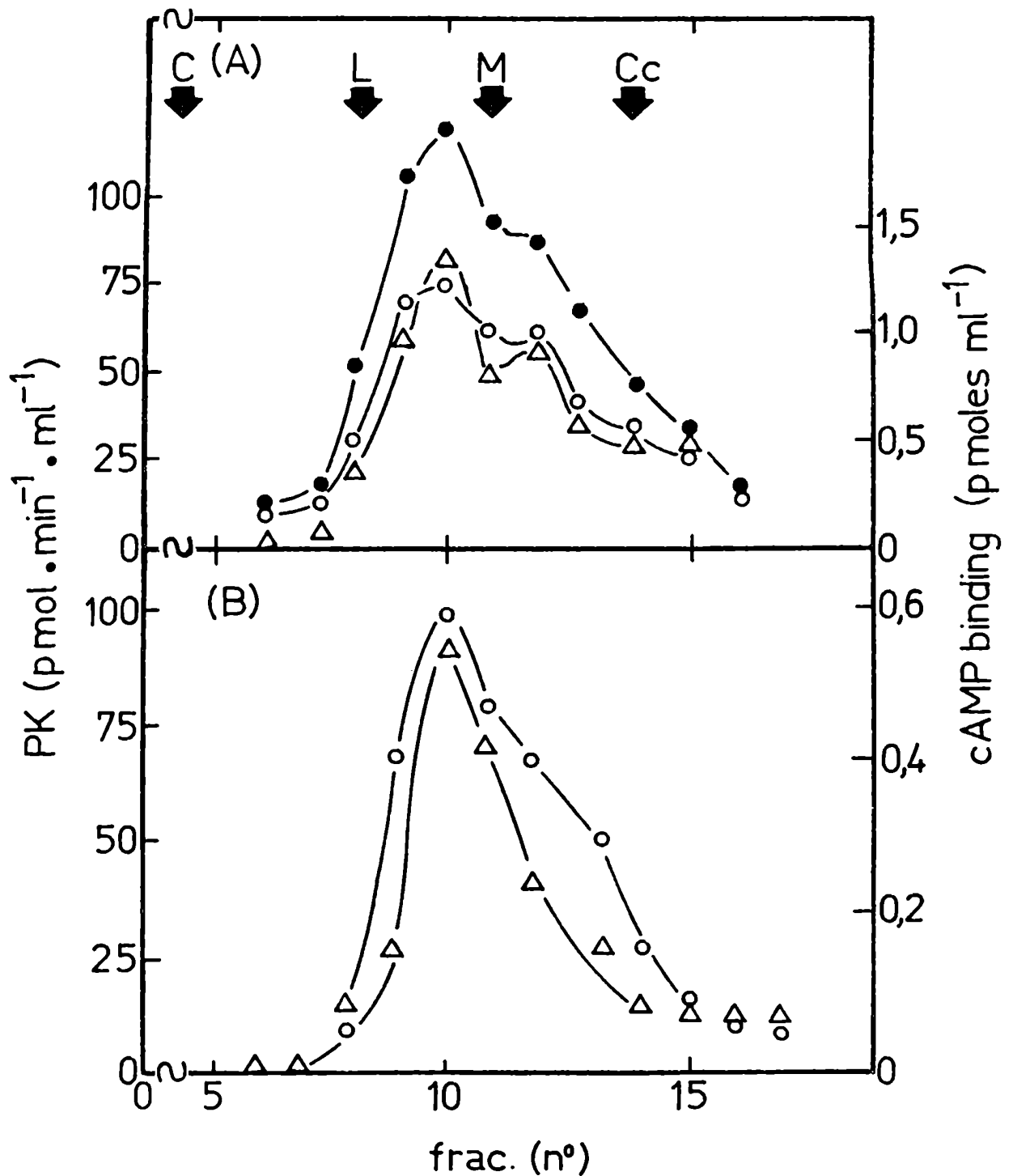
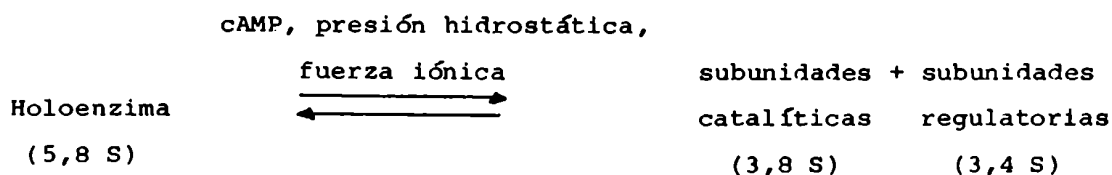


Figura 32. Centrifugación en gradiente de sacarosa de 5 a 20% (p/v) de la actividad PK I en presencia (A) o ausencia (B) de NaCl 0,1 M. Los ensayos de quinasas se realizaron con histona H2A 1 mg/ml en ausencia (○) o presencia (●) de AMP cíclico 10 μM. Se midió también la actividad "binding" de AMP cíclico (Δ). Las flechas indican las proteínas marcadoras: C (catalasa), L (Lactato deshidrogenasa), M (Malato deshidrogenasa) y Cc (citocromo c). Las condiciones experimentales fueron descritas en MATERIALES Y METODOS (VI.A y B) .



Confirmando estas suposiciones se tienen los siguientes experimentos:

1) Cuando PK I se sembró sobre un gradiente sin NaCl se obtuvo un sólo pico de 5.8 S con actividad fosforilante y de "binding" de AMP cíclico (Fig. 32 B). 2) La preincubación y centrifugación de PK I en un medio conteniendo 0,3 M de NaCl dio lugar a la aparición de dos picos superpuestos de actividad catalítica y "binding". La actividad quinasa tuvo su máximo a 3,8 S y el "binding" de AMP cíclico lo tuvo a 3,4 S (Fig. 33 A). Es importante destacar que la diferencia en actividades entre las muestras conteniendo o no NaCl se debe a que la sal ha inhibido la incorporación de fosfato en forma proporcional a su concentración. Este hecho se comprobó no sólo en el caso de PK I sino también en el de PK II y PK III. 3) La preincubación y centrifugación de PK I en presencia de AMP cíclico 25 μ M dio como resultado un pico de actividad fosforilante de 3,8 S (Fig. 33 B), siendo este resultado muy similar al obtenido con NaCl 0,3 M. 4) Por otro lado y en la misma línea de argumentos está el experimento de la Fig. 34 A. En este caso la actividad de "binding" de AMP cíclico (Pico R de la Fig. 13) dializada y concentrada fue centrifugada en un gradiente de sacarosa que contenía NaCl 0,1 M. El resultado fue la aparición de un pico de "binding" a 3,4 S que coincidió exactamente con el pico obtenido en la corrida de PK I con NaCl 0,3 M (Fig. 33 A).

-Filtración en geles de agarosa

La actividad PK I, dializada y concentrada, fue cromatografiada en una columna de Bio-Gel A-1,5 m equilibrada con buffer conteniendo 0,1 M de

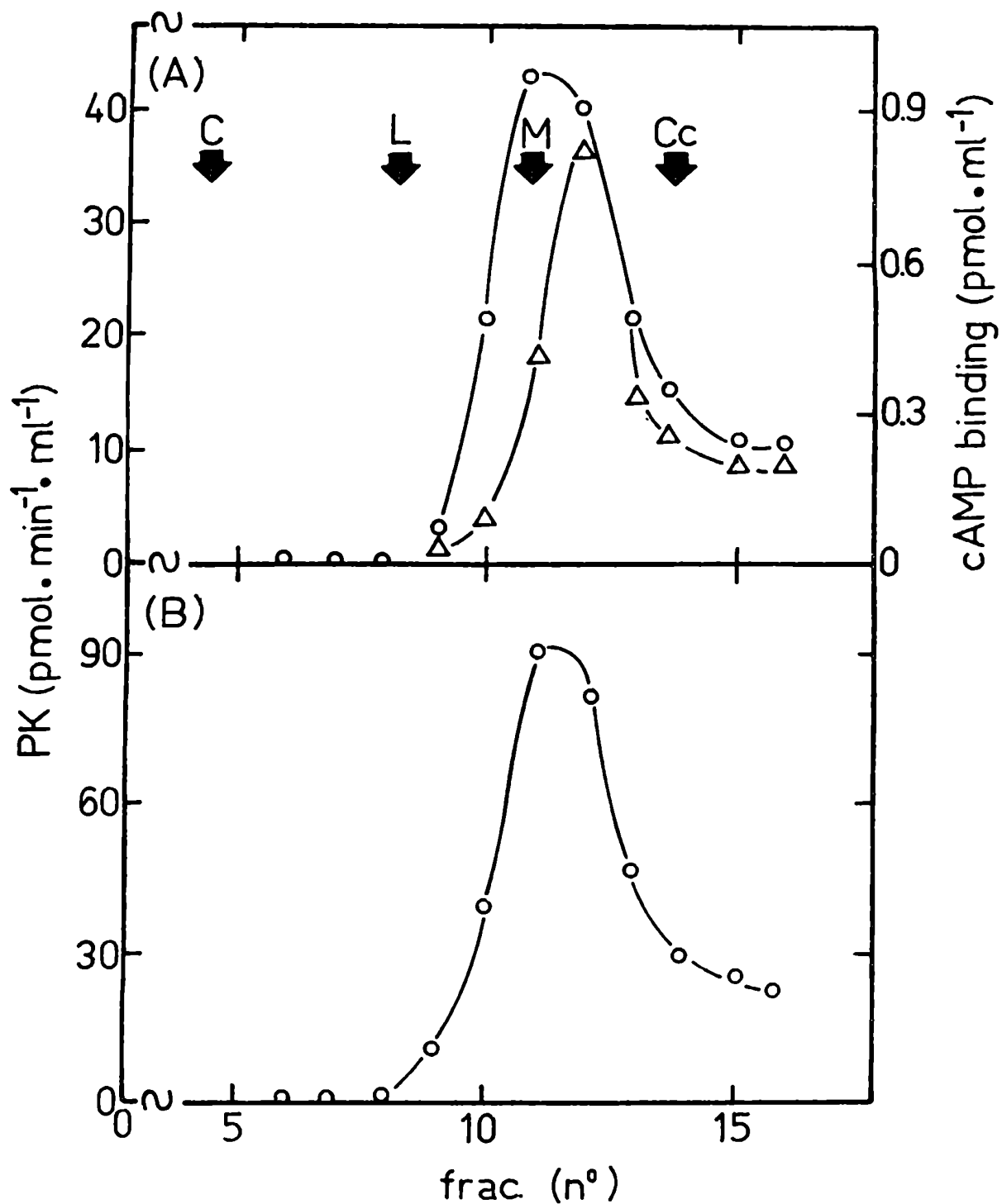


Figura 33. Centrifugación en gradientes de sacarosa de 5 a 20% (p/v) de la actividad PK I en presencia de NaCl 0,3 M (A) ó AMP cíclico 25 μ M (B). Los símbolos y condiciones experimentales fueron los descriptos en la Fig. 32.

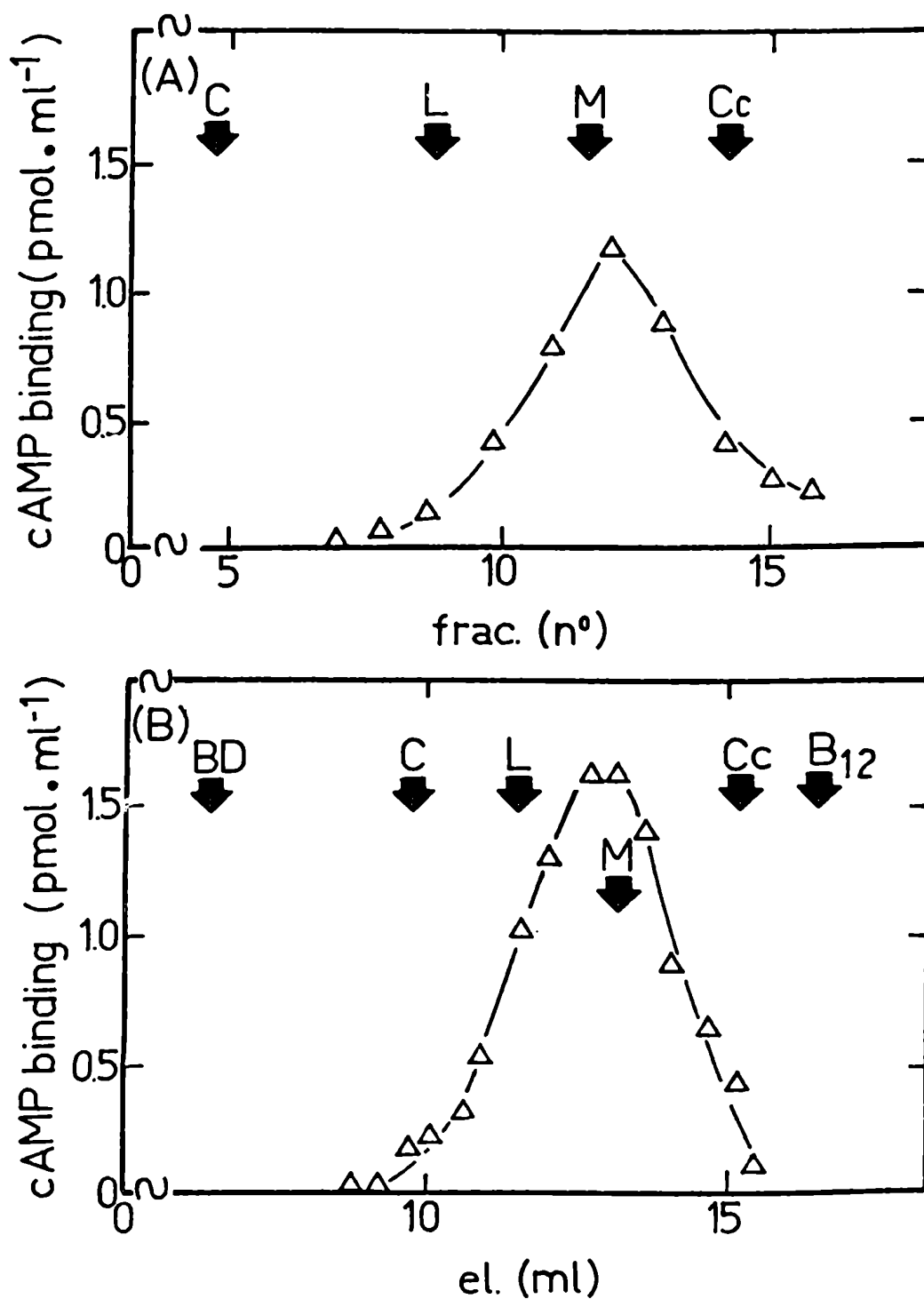


Figura 34. (A) Centrifugación en gradientes de sacarosa de 5 a 20% (p/v) de la actividad R en presencia de NaCl 0,1 M. Los símbolos y condiciones experimentales fueron los descriptos en la Fig. 32.

(B) Cromatografía en Bio-Gel A-1,5 m de la actividad R en presencia de NaCl 0,1 M. Los símbolos y condiciones experimentales fueron los descriptos en la Fig. 35.

NaCl. Esto dio lugar a la aparición de un sólo pico con actividad quinasa coincidente con el de "binding" de AMP cíclico correspondiente a un radio de Stokes de 4,4 nm (Fig. 35 A). Este resultado es algo diferente al obtenido en gradientes de sacarosa corridos en presencia de NaCl 0,1 M que dieron origen a un pico y un hombro (Fig. 32 A). Esto podría ser debido al efecto de la presión hidrostática (provocada por la fuerza centrífuga) que obviamente no existe en las columnas. Esta clase de fenómenos ya ha sido descrita para varias proteínas (301). Por otro lado cuando PK I fue preincubada, sembrada y eluída de la columna en presencia de NaCl 0,3 M aparecieron un pico y un hombro tanto de actividad quinasa como de "binding" con radios de Stokes 4,4 y 3,0 nm respectivamente para la quinasa y de 4,4 y 3,5 nm respectivamente para la actividad de "binding" de AMP cíclico (Fig. 35 B). Además, la preincubación y elución de PK I en presencia de AMP cíclico 50 μ M dio como resultado un pico de actividad fosforilante con un radio de Stokes de 3,0 nm (Fig. 36). En cuanto a la actividad "binding" de AMP cíclico (Pico R de la Fig. 2), dializada, concentrada y cromatografiada en columna de Bio-Gel A-1,5 m equilibrada con buffer conteniendo 0,1 M de NaCl, dio un pico de "binding" con un radio de Stokes de 3,5 nm (Fig. 34 B). Este valor correspondió casi exactamente con el hombro de actividad "binding" de la corrida de PK I en buffer con NaCl 0,3 M (Fig. 35 B).

-Cálculo de los parámetros

Las centrifugaciones en gradiente de sacarosa y las filtraciones en geles han dado perfiles suficientemente concordantes como para identificar y relacionar las distintas actividades en estudio. De estos resultados se podría concluir que PK I es una quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico. El NaCl tendría la propiedad de disociar la holoenzima en subunidades regulatoria y catalítica. En presencia de AMP cíclico dicha disociación resultaría total. Por otro lado los parámetros de R indicarían que

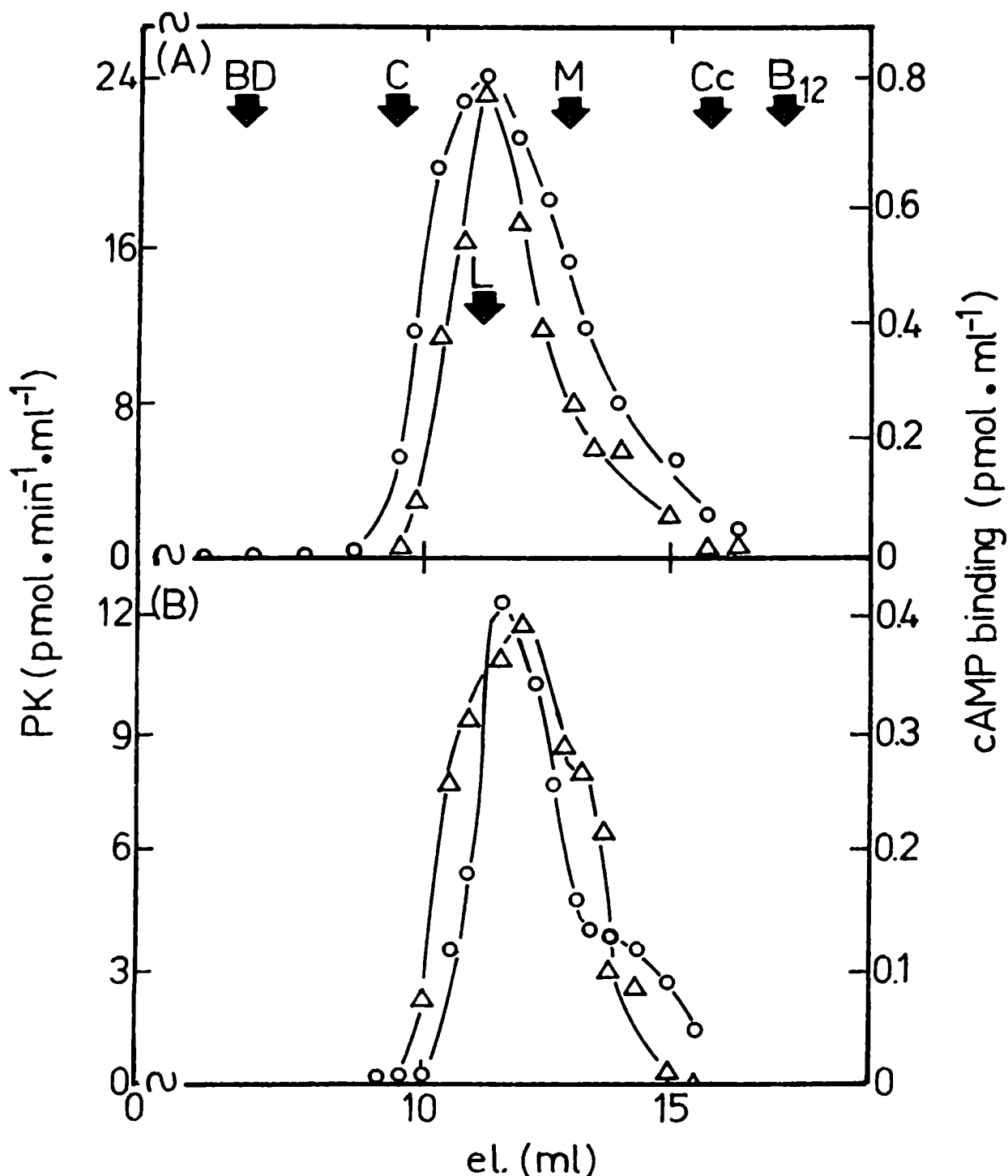


Figura 35. Cromatografía en Bio-Gel A-1,5 m de la actividad PK I en columna equilibrada con (A) NaCl 0,1 M y (B) NaCl 0,3 M. Los ensayos de quinasa se realizaron con histona H2A 1 mg/ml en presencia de AMP cíclico 10 μ M (○). Se midió también la actividad binding de AMP cíclico (△). Las flechas indican los marcadores usados: BD (dextrano azul), C (catalasa), L, (lactato deshidrogenasa), M, (malato deshidrogenasa), Cc (citocromo c) y B₁₂ (vitamina B₁₂). Las condiciones experimentales fueron descritas en MATERIALES Y METODOS (VI. A y C).

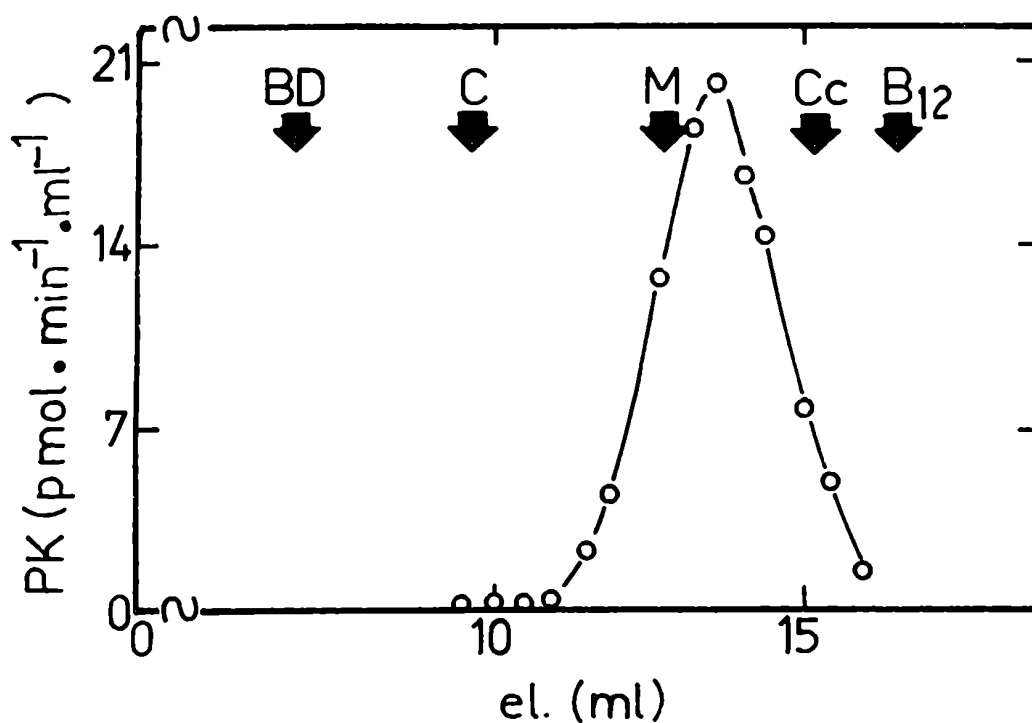


Figura 36. Cromatografía en Bio-Gel A-1,5 m de la actividad PK I en columna equilibrada con AMP cíclico 50 μ M. Los símbolos y condiciones experimentales fueron descritos en la Fig. 35.

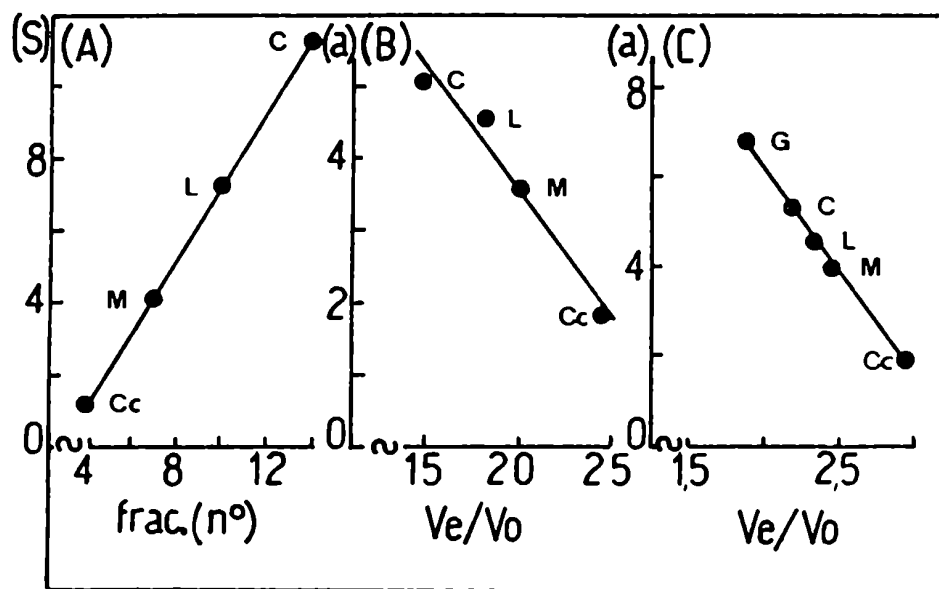


Figura 37. Curvas de calibración de gradientes de sacarosa (A), columnas de Bio-Gel A-1,5 m (B) y A-5 m (C). Los marcadores utilizados fueron los descritos en las Fig. 32, 35 y 39.

se trata de la subunidad regulatoria libre.

La interpolación sobre las curvas de calibración de gradientes de sacarosa y columna de Bio-Gel permitió la obtención de los coeficientes de sedimentación (S) y radios de Stokes (a) para el cálculo de los pesos moleculares relativos (Fig. 37). En todos los casos se supuso para estas actividades enzimáticas un volumen parcial específico de $0,74 \text{ ml g}^{-1}$, que corresponde a una proteína soluble en soluciones salinas neutras.

La holoenzima tendría un peso molecular de 118 000, la subunidad catalítica uno de 55 000 y la subunidad regulatoria uno de 57 000 (Tabla IV). La suma de los pesos moleculares de las subunidades sería 112 000 que no difiere significativamente del calculado para la holoenzima. Esto último indicaría que la holoenzima es un dímero.

Los cocientes friccionales calculados han mostrado que tanto la holoenzima como subunidades catalítica y regulatoria serían ligeramente asimétricas (Tabla IV).

B. Quinasas de proteínas independientes de nucleótidos cíclicos

-Centrifugación en gradientes de sacarosa

La actividad PK II dializada y concentrada fue centrifugada en gradientes de sacarosa conteniendo NaCl 0,1 M. Se obtuvo un pico con coeficiente de sedimentación de 3,0 S (fig. 38 A).

La actividad PK III por su lado, dializada, concentrada y centrifugada en un gradiente de sacarosa dio lugar a la aparición de un pico con coeficiente de sedimentación de 9,1 S (Fig. 39 A).

-Filtración en geles de agarosa

Cromatografiada en columna de Bio-Gel A-1,5 m equilibrada con buffer conteniendo NaCl 0,1 M, la actividad PK II dializada y concentrada dio

TABLA IV

PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LAS QUINASAS DE PROTEINAS DE
NEUROSPORA CRASSA

ACTIVIDAD	$S_{20,w}$ (S)	a (nm)	MW	f/f _o
PK I (holoenzima)	5,8	4,4	118 000	1,4
PK I (subunidad catalítica)	3,8	3,0	55 000	1,2
PK I (subunidad regulatoria)	3,4	3,5	57 000	1,4
R (actividad de unión de cAMP)	3,4	3,5	57 000	1,4
PK II	3,0	3,9	56 000	1,5
PK III	9,1	4,8	209 000	1,2

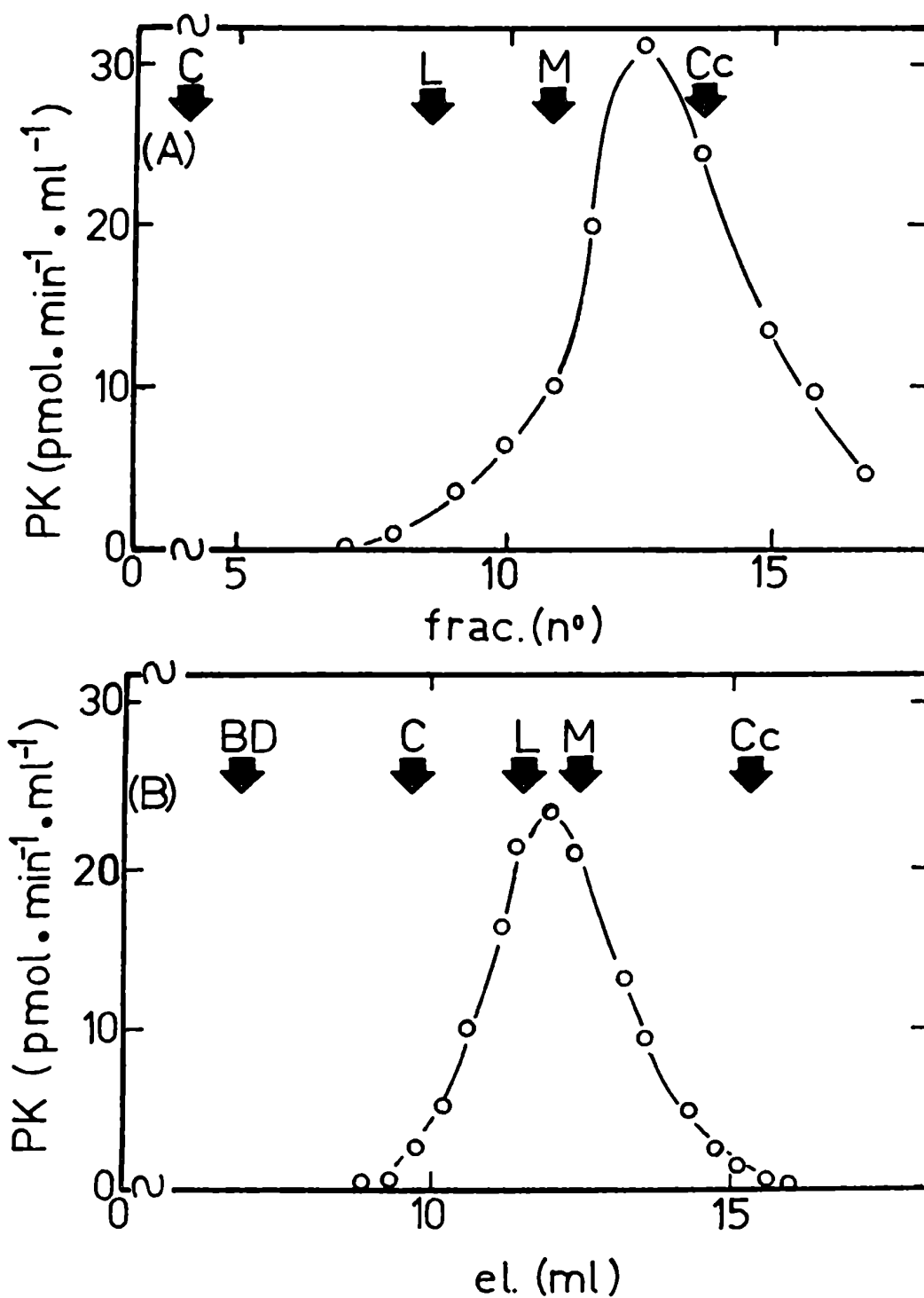


Figura 38. (A) Centrifugación en gradientes de sacarosa 5 a 20% (p/v) de la actividad PK II en presencia de NaCl 0,1 M. Los símbolos y condiciones experimentales fueron los descriptos en la Fig. 32.

(B) Cromatografía en Bio-Gel A-1,5 m de la actividad PK II en columna equilibrada con NaCl 0,1 M. Los símbolos y condiciones experimentales fueron los descriptos en la Fig. 35.

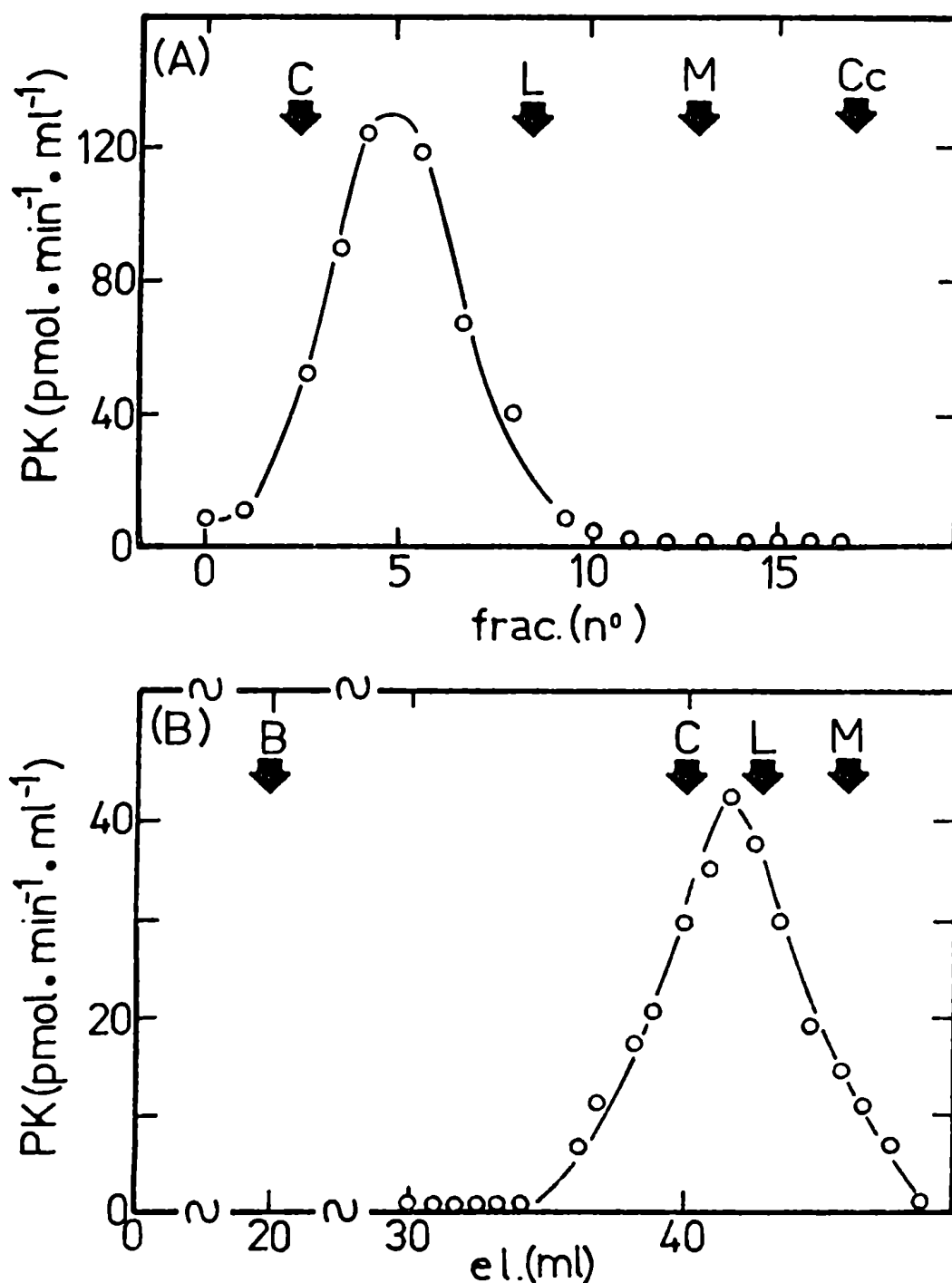


Figura 39. (A) Centrifugación en gradientes de sacarosa 5 a 20% (p/v) de la actividad PK III en presencia de NaCl 0,1 M. Los símbolos y condiciones experimentales fueron los descriptos en la Fig. 32 exceptuando que se usó fosvitina 1 mg/ml y Mg^{2+} 1 mM en los ensayos.

(B) Filtración en Bio-Gel A-5 m de la actividad PK III en presencia de NaCl 0,1 M. Las condiciones experimentales fueron las descriptas en MATERIALES Y METODOS (VI. A y C) y los ensayos se realizaron del modo señalado en la Fig. 39 A. Los marcadores utilizados fueron enumerados en la Fig. 35, con excepción de Bact.: bacterias (Rhizobium meliloti).

como resultado un pico correspondiente a un radio de Stokes de 3,9 nm (Fig.38 B); mientras que la actividad PK III dializada y concentrada, se cromatografió en columna de Bio-Gel A-5 m, eluyendo en un pico correspondiente a un radio de Stokes de 4,8 nm (Fig. 39 B).

-Cálculo de los parámetros

La calibración de gradientes y Bio-Gel A-1,5 m ya fue descrita en MATERIALES Y METODOS (VI.D). La obtención del radio de Stokes por Bio-Gel A-5 m fue análogo al A 1,5 M (Fig. 37). Tal como se explicó en RESULTADOS Y DISCUSION (II.A), se supuso un volumen parcial específico de $0,74 \text{ ml g}^{-1}$ para las enzimas analizadas.

El peso molecular de PK II calculado sería 56 000. Si bien resulta idéntico al peso molecular de la subunidad catalítica de PK I, los otros parámetros difieren en forma significativa. El cociente friccional de 1,6 indicaría que es una molécula bastante asimétrica (Tabla IV).

La actividad PK III tendría un peso molecular de 209 000 y el cociente friccional de 1,2 correspondería a una simetría casi esférica (Tabla IV).

III. ACTIVADOR TERMOESTABLE DE LA QUINASA PK III

A. Obtención por cromatografía en DEAE-celulosa

Ya se vio que el inhibidor descrito en RESULTADOS Y DISCUSION (I.G.) tiene poco efecto sobre PK III. Sin embargo si las fracciones provenientes de una columna de DEAE-celulosa de un sobrenadante no calentado son calentadas 3 minutos a 100°C y luego adicionadas a mezclas de ensayo de esta quinasa conteniendo fosvitina como sustrato proteico, se observa la existencia de un activador que eluyó a $0,29 \pm 0,02 \text{ M}$ de NaCl (5 preparaciones) (Fig. 40 A). Similar resultado se obtuvo en columnas de sobrenadantes

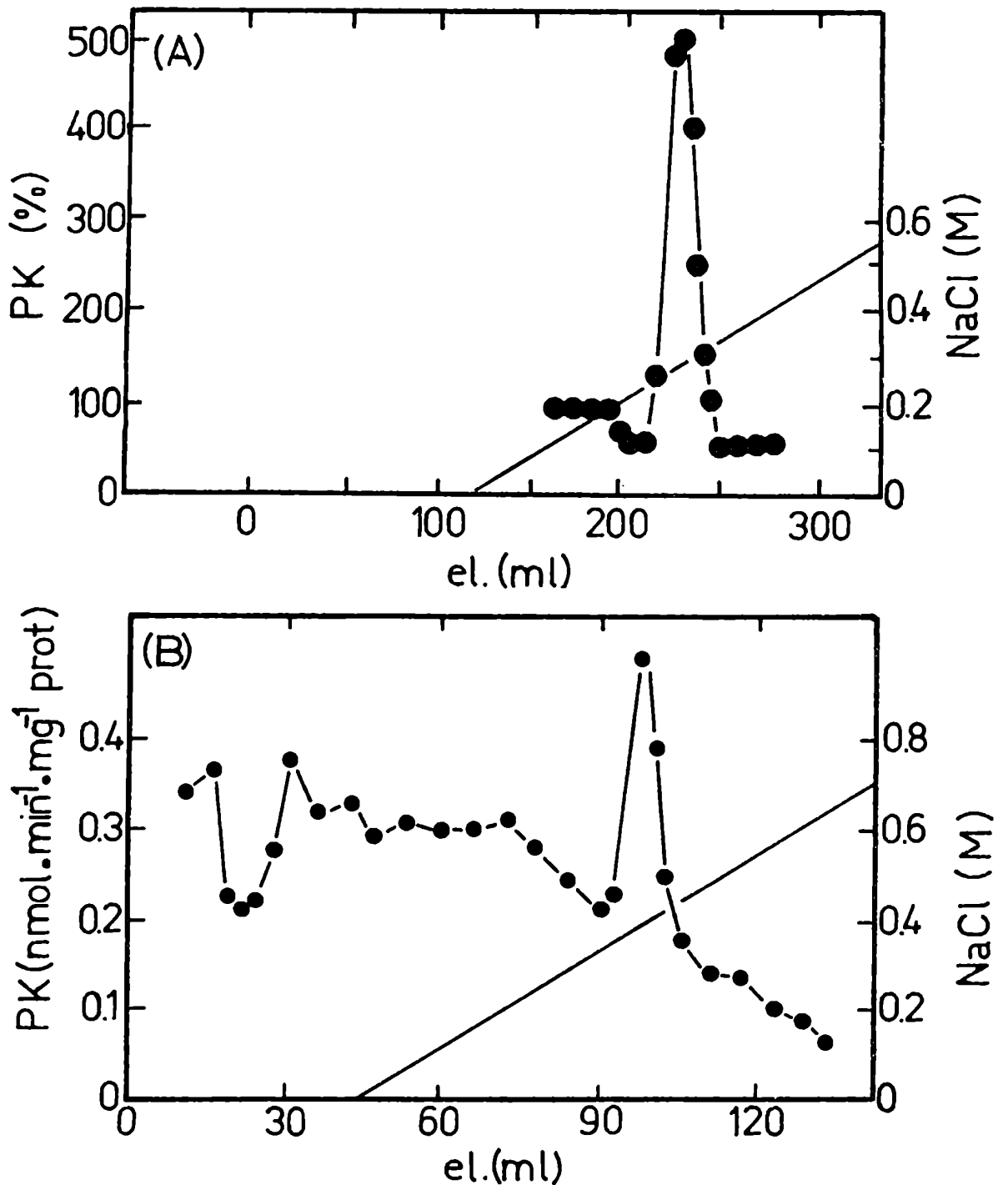


Figura 40. Cromatografía en DEAE-celulosa del activador termoestable. Las condiciones fueron las descritas en la Fig. 13 para (A) y en MATERIALES Y METODOS (IV.A) para (A) y (B). Las incubaciones se realizaron en presencia de fosvitina 1 mg/ml y Mg^{2+} 5 mM, con el agregado de 0,050 ml de cada fracción y 0,030 ml de una preparación conteniendo PK III (0,81 mg/ml de proteínas). Las actividades específicas en ausencia de activador fueron de 0,12 y 0,25 nmol/min mg proteína para (A) y (B) respectivamente.

(A) Activador obtenido a partir de sobrenadante de 105 000 x g no calentado. Antes del ensayo las fracciones obtenidas fueron tratadas a 100°C por 3 minutos.

(B) Activador obtenido a partir de un sobrenadante de 105 000 x g tratado a 100°C por 5 minutos.

calentados donde se estableció la existencia del activador en la misma posición del gradiente: $0,29 \pm 0,01$ M de NaCl (5 preparaciones)(Fig.40 B).

De modo análogo al inhibidor de PK I y PK II, el factor activador de PK III no conservó su actividad al ser dializado después del tratamiento térmico. Podría postularse nuevamente que el factor termoestable, que en su forma libre es de pequeño tamaño o fácilmente dissociable en subunidades menores, se encuentra asociado a alguna macromolécula específica probablemente proteica.

El factor preparado por ambos métodos ha mostrado poseer las mismas propiedades y ha sido usado indistintamente para su caracterización posterior.

B. Recromatografía en hidroxilapatita

El factor activador obtenido por el método 2 (MATERIALES Y METODOS IV A) fue sembrado en una columna de hidroxilapatita. El pico de activador eluyó a $0,16 \pm 0,01$ M de fosfato de sodio (pH 6.8)(3 preparaciones)(Fig. 41 A). En el percolado y fracciones de lavado apareció un pico de actividad inhibitoria que probablemente corresponda a una contaminación con el inhibidor termoestable ya descrito. Por otra parte, el activador eluyó de la columna de DEAE-celulosa muy próximo al inhibidor (Fig. 40 A y 27 A).

Para descartar la posibilidad de que el activador fuera un producto del tratamiento térmico se ha efectuado su preparación obviando dicho paso. Se sembraron en una columna de hidroxilapatita las fracciones sin calentar de la columna de DEAE-celulosa indicada en la Fig. 40 A, que contenían al factor. El activador eluyó con $0,15$ M de fosfato de sodio (pH 6.8) en un pico que resultó menos agudo que en la preparación anterior, probablemente debido a la interacción con proteínas que de otro modo resultaban desnaturalizadas por el calor y eliminadas (Fig. 41 B).

Aún teniendo en cuenta que la actividad PK III eluyó de DEAE-celulosa con $0,44 \pm 0,01$ M de NaCl podría pensarse que en las fracciones que con-

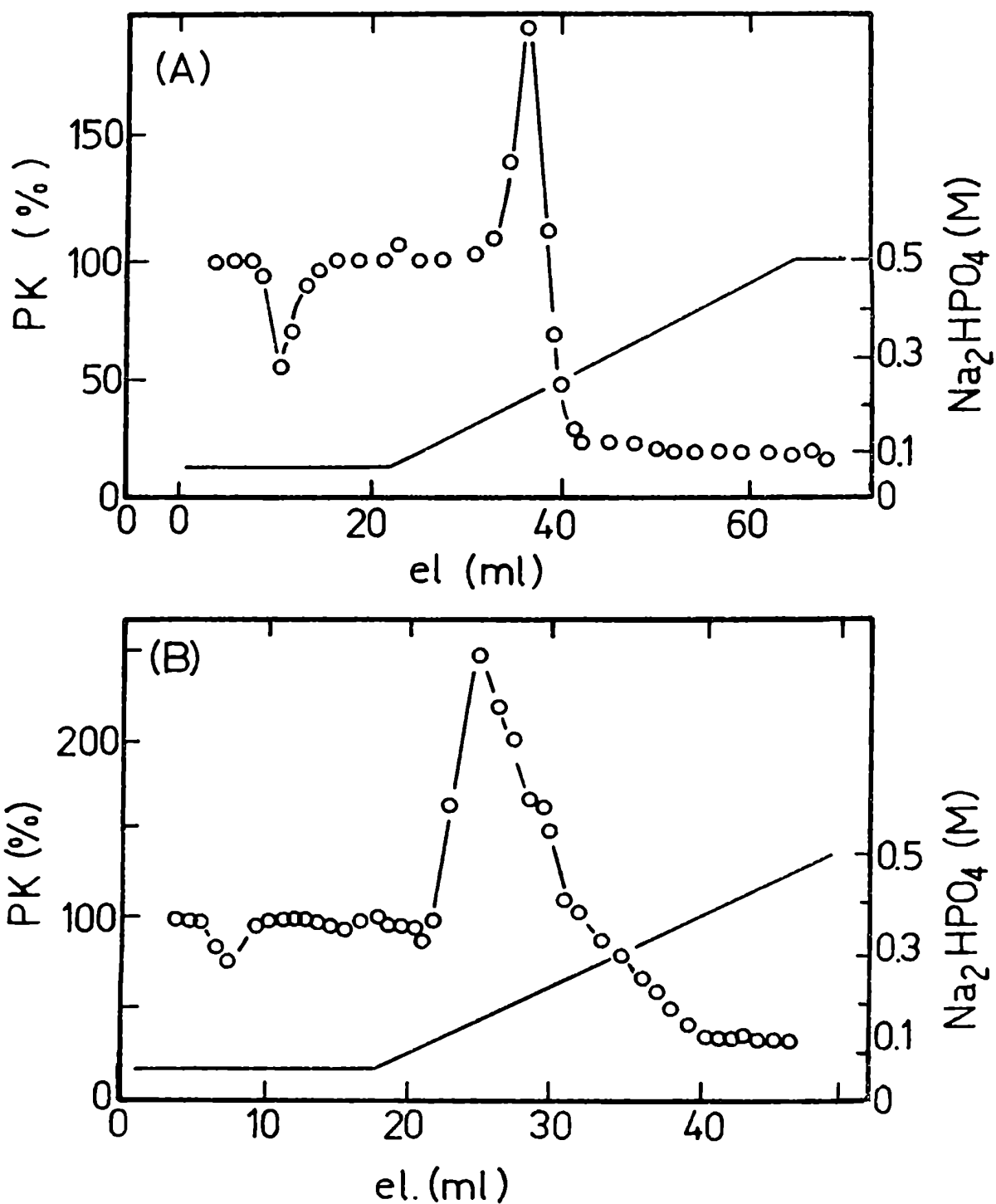


Figura 41. Columnas de hidroxilapatita del activador termoestable. Las condiciones fueron descriptos en MATERIALES Y METODOS (IV. B). Las incubaciones se realizaron según fue descripto en la Fig. 40.

(A) Cromatografía del factor obtenido a partir de la columna señalada en la Fig. 40 B.

(B) Cromatografía del factor contenido en las fracciones de la columna presentada en la Fig. 13 sembrado sin tratamiento térmico previo.

tienen activador ($0,29 \pm 0,01$ M de NaCl) existiría cierta actividad remanente de PK III. Dicha actividad sembrada y luego eluída de la columna de hidroxilapatita, podría dar lugar a un falso pico de activador que eventualmente eluyera a la misma fuerza iónica que el compuesto en cuestión. Esta posibilidad fue descartada por el hecho de que PK III sembrada en columna de hidroxilapatita eluyó en un sólo pico a 0,33 M de fosfato de sodio (pH 6.8).

La actividad del factor apareció asociada a concentraciones máximas de proteínas en el eluído de hidroxilapatita. Esto hace suponer que se trata de un activador de naturaleza polipeptídica. Aún en ese caso dicho activador no estaría homogéneo dado que corrido en electroforesis en poliacrilamida aparecen bandas de diversos pesos moleculares.

Se han presentado dificultades en la caracterización del factor. si bien eluyó con el volumen de exclusión en columnas de Sephadex G-50, su actividad no pudo ser detectada luego de cromatografiarlo por columnas de Sephadex G-75 ó G-100. Esto podría deberse a su disociación o interacción con la matriz del gel. Contrariamente a lo esperado, experimentos de recombinación de fracciones o la elución de las columnas con alta fuerza iónica tampoco dieron un resultado positivo.

C. Especificidad de acción

Dado que el ensayo de PK III se realizó en concentraciones subóptimas de fosvitina (Fig. 16), si el factor fuera aceptor de fosfatos provocaría un estímulo aparente en la fosforilación. Sin embargo, cuando se incubó PK III en ausencia de fosvitina hubo muy baja incorporación de fosfato aún en presencia de activador. Como puede verse en la Fig. 42, en presencia de fosvitina como sustrato, el estímulo por el factor acrecentó en cuatro veces la actividad de PK III.

El efecto activador no dependió de AMP cíclico y aumentó con el tiempo probablemente por un efecto estabilizador del factor sobre PK III que

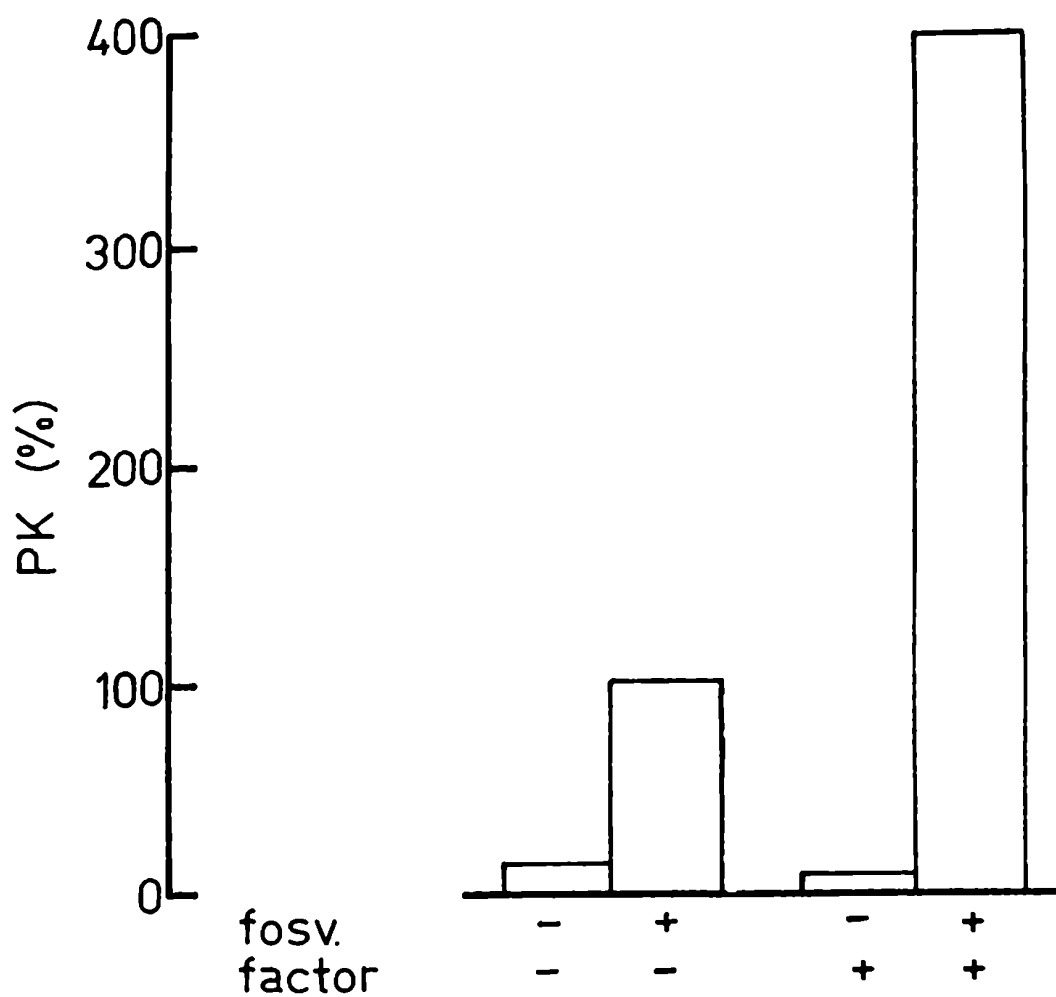


Figura 42. Actividad PK III ensayada en ausencia o presencia de fosvitina (1 mg/ml) con o sin el agregado de 0,080 ml del activador termoestable (0,12 mg/ml de proteína). Los ensayos se realizaron según fue descrito en la Fig. 40.

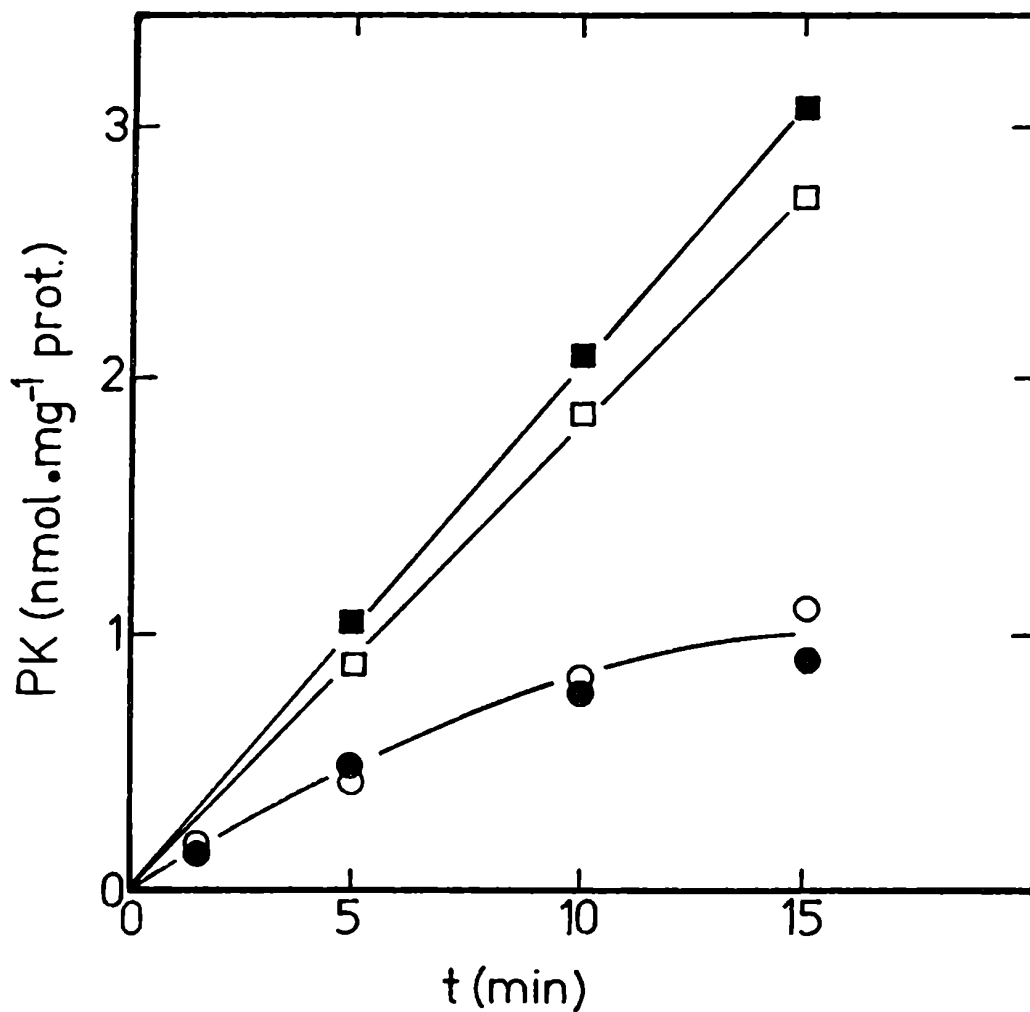


Figura 43. Curvas de tiempo de ensayo para la actividad PK III. Los ensayos se realizaron según fue descrito en la Fig. 40 en ausencia (○, ●) o presencia (□, ■) de 0,030 ml (0,12 mg/ml de proteínas) del activador termoestable, sin (○, □) o con (●, ■) AMP cíclico 10 μM.

determinó una mayor linealidad de las curvas de tiempo (Fig. 43).

La activación resultó ser función de la concentración del factor (Fig. 44) y no mostró dependencia apreciable respecto de la concentración de fosvitina en presencia de cantidades fijas de Mg^{2+} (Fig. 45).

La actividad de PK I no fue afectada por este factor. En el caso de PK II fue ligeramente inhibida en ensayos que contenían histona H2A como sustrato (Fig. 46).

Por otro lado, la actividad PK III sólo se incrementó en presencia del factor cuando se agregó fosvitina como sustrato, no se obtuvo efecto cuando el sustrato fue histona H2A (Fig. 44). Como consecuencia de lo descrito quedaría definida una importante propiedad del factor: sólo actuaría sobre la actividad PK III medida con fosvitina o, en teoría, con algún otro sustrato distinto de las histonas presente en las células de Neurospora.

El ditioneitol (DTT), protector de grupos sulfhidrilos, activó alrededor de tres veces a PK III. En presencia de este compuesto la magnitud relativa del efecto del factor resultó algo menor. Estos resultados podrían indicar cierto papel del factor activador en la preservación de grupos sulfhidrilos (Fig. 47).

Cuando PK III se preincubó a 30°C su actividad disminuyó con el tiempo (Fig. 48). La presencia de los sustratos fosvitina o ATP en esta preincubación evitó que la actividad decayera. Preincubada sola o con ATP, PK III perdió un 30 % de su capacidad de ser estimulada por el activador antes de los 5 minutos. El mismo ensayo con agregado de factor o fosvitina no modificó dicha capacidad. Si bien la preincubación de PK III con activador y ATP provocó un ligero aumento de la actividad con el tiempo, solamente se puede considerar significativo el efecto producido por el sistema casi completo. La preincubación de PK III en presencia de fosvitina y factor llevó el grado de activación de 2,5 a tiempo cero hasta 4,0 a los 15 minutos. Estos últimos resultados permiten concluir que el factor activador favorecería la interacción entre enzima y sustrato proteico por un

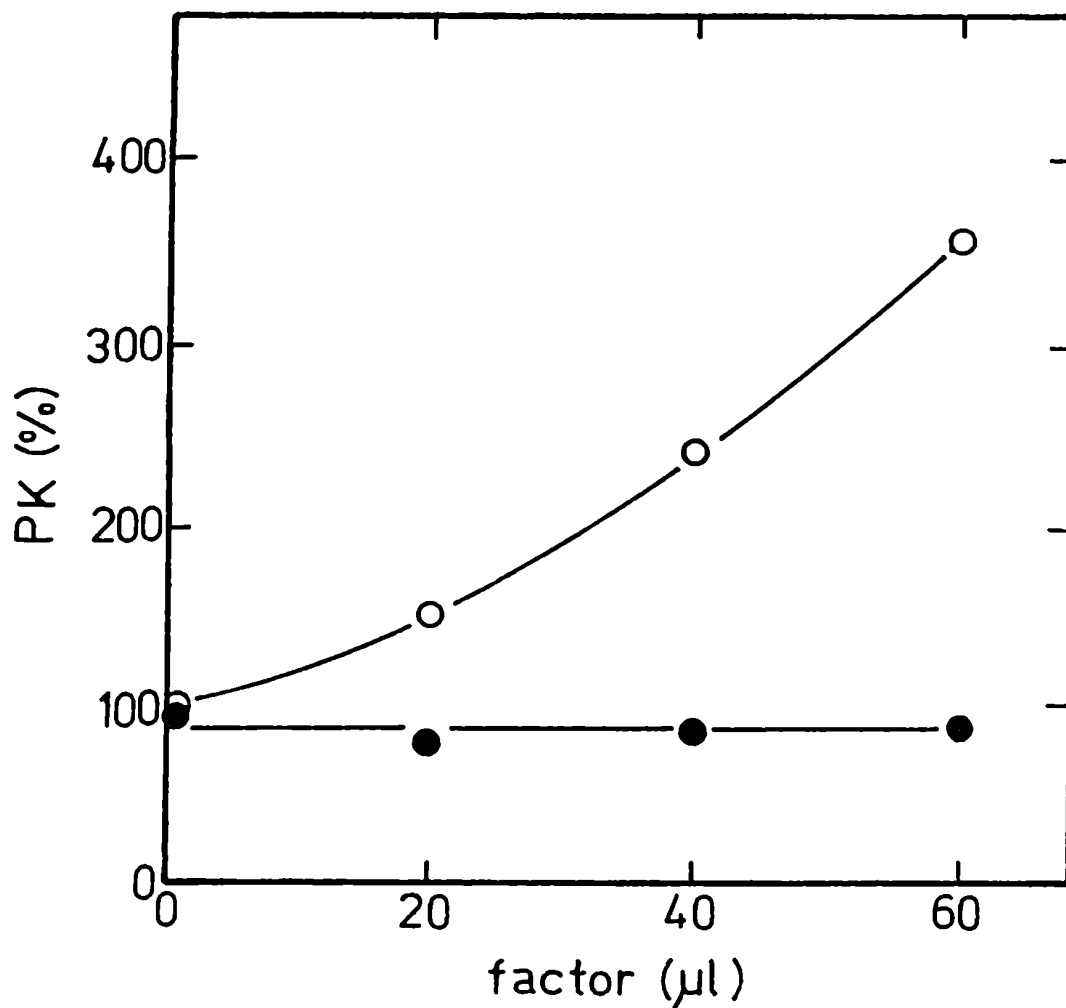


Figura 44. Curvas de dosis-respuesta del activador termoestable para la actividad PK III. Los ensayos se realizaron según fue descrito en la Fig. 40 con fosvitina 1 mg/ml (○) o histona H2A 1 mg/ml (●). La concentración de proteínas de la preparación de factor fue de 0,12 mg/ml.

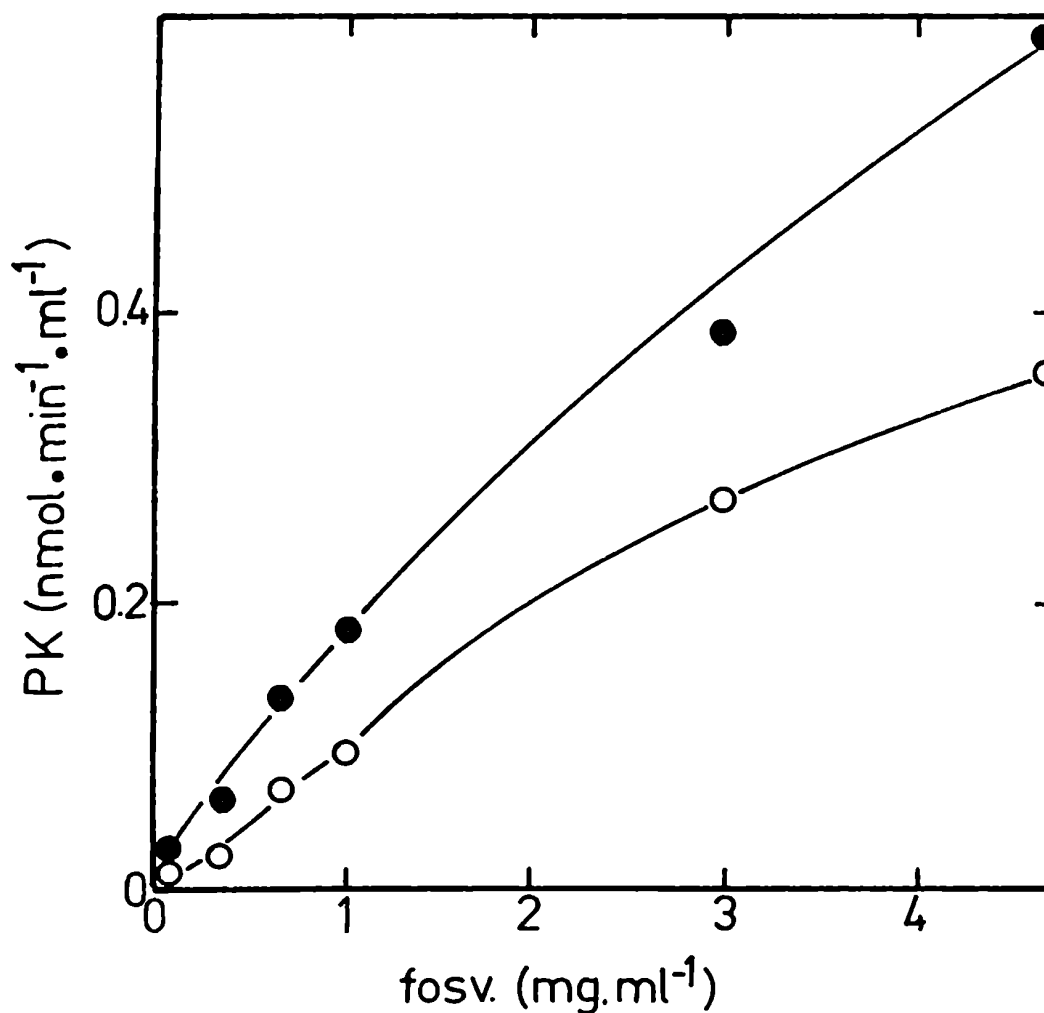


Figura 45. Curvas de concentración de fosvitina en ausencia (○) o presencia (●) de 0,030 ml de factor activador. Los ensayos se realizaron según fue descrito en la Fig. 40 con una concentración de Mg²⁺ de 3 mM. La concentración de proteínas de la preparación de factor fue 0,09 mg/ml.

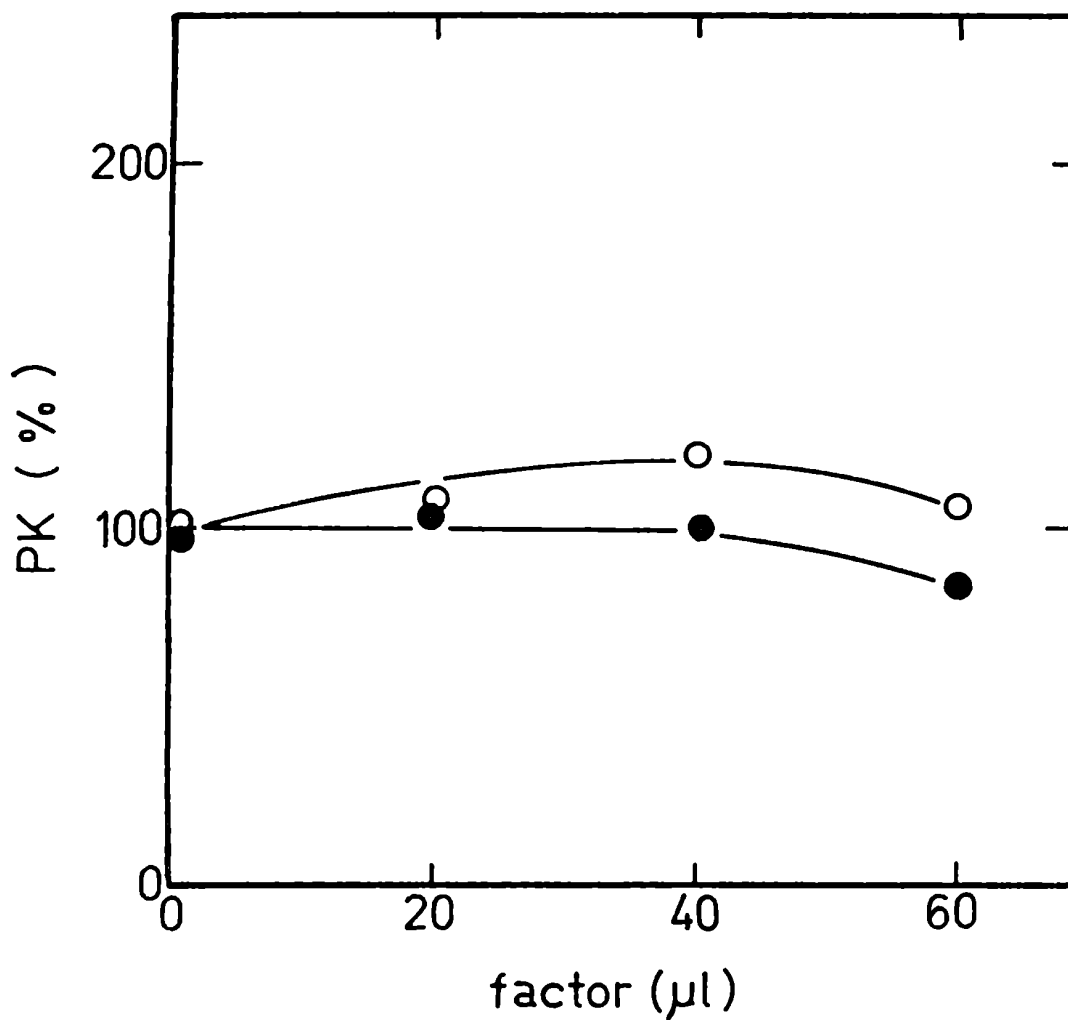


Figura 46. Curvas de dosis-respuesta del activador termoestable para la actividad PK II en ausencia (○) o presencia (●) de 0,030 ml de factor. Los ensayos fueron realizados según fue señalado en la Fig. 44.

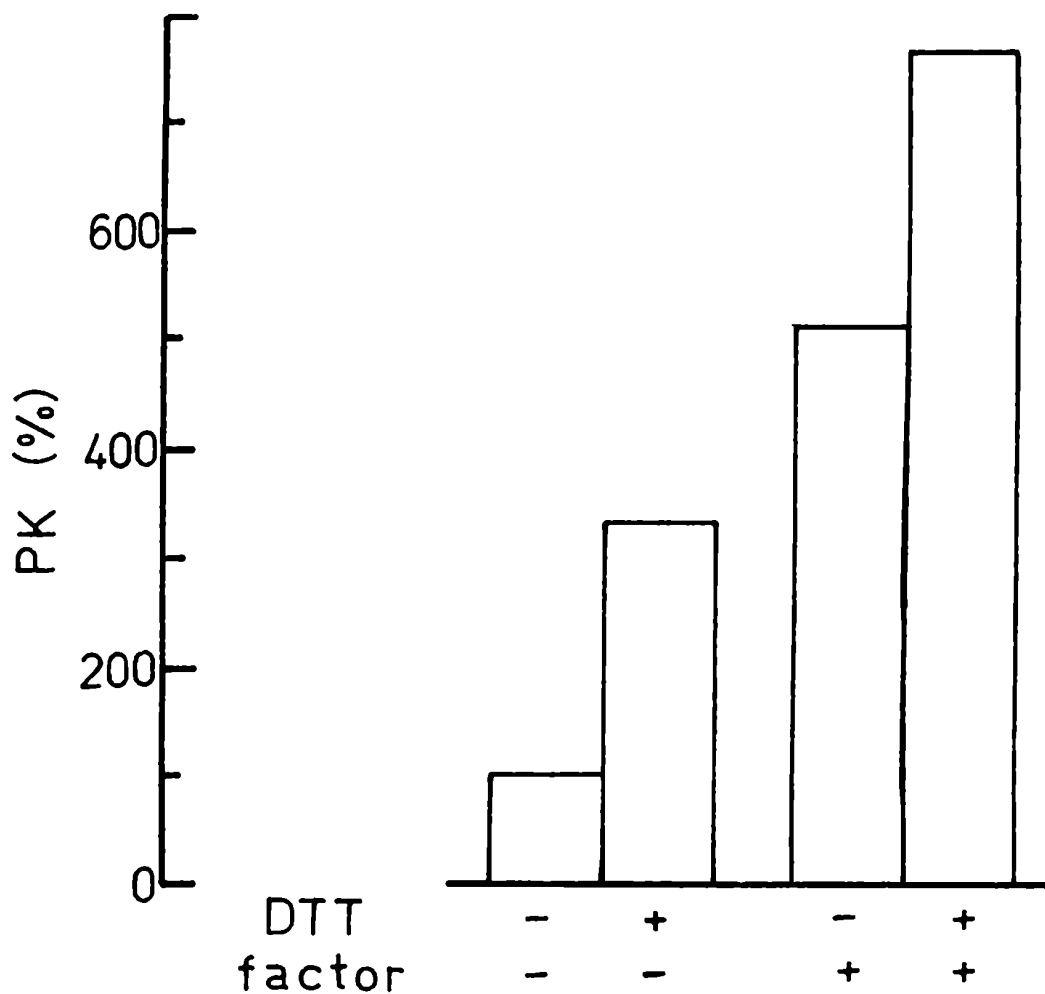


Figura 47. Efecto del ditionitrosito sobre la actividad PK III. Los ensayos se realizaron tal como fue descrito en la Fig. 40, en ausencia o presencia de DTT 20 mM con o sin 0,040 ml del factor termoestable (0,09 mg/ml) de proteínas.

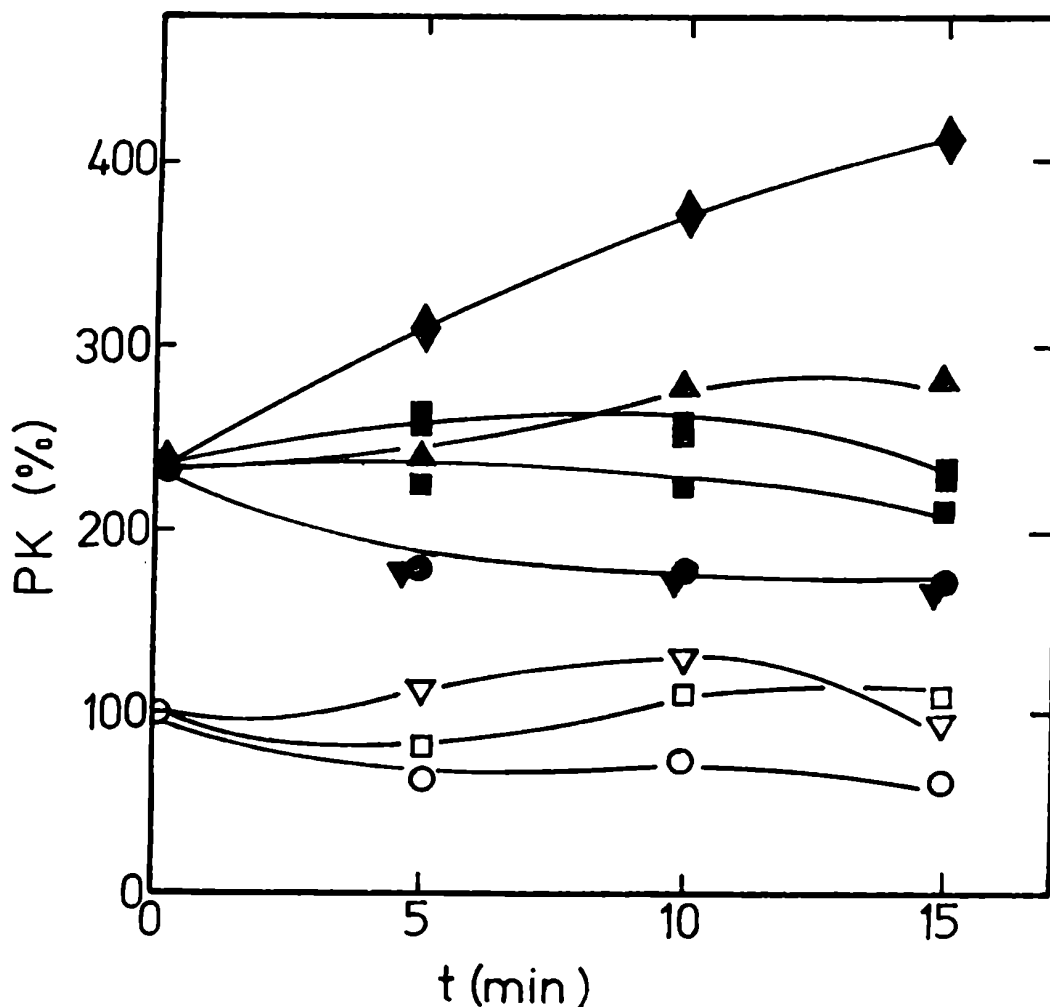


Figura 48. Curvas de tiempo de preincubación de la actividad PK III. Los símbolos vacíos indican la ausencia de 0,040 ml de factor termestable (0,09 mg/ml de proteínas) en la preincubación y la incubación, y los llenos la presencia del mismo en la incubación. Las distintas preincubaciones contuvieron: PK III (○, ●), PK III + fosvitina (□, ■), PK III + ATP (▽, ▼), PK III + factor (■), PK III + ATP + factor (▲), PK III + fosvitina + factor (◆). El ensayo se inició con el agregado de los ingredientes faltantes de la mezcla de incubación que contuvo Mg^{2+} 5 mM, ATP 60 μ M y fosvitina 1 mg/ml, y se desarrolló durante 5 minutos. Las otras condiciones fueron las descritas en la Fig. 40.

mecanismo que podría implicar a numerosos cambios conformacionales sucesivos que, por tratarse de macromoléculas, necesitan tiempos relativamente largos para manifestarse en forma detectable.

La posibilidad de que el modulador necesite estar fosforilado para actuar no puede ser completamente descartada. Si bien no se ha podido demostrar incorporación de fosfato al activador (Fig. 42), este podría haber sido aislado ya en su estado fosforilado y, el leve efecto observado por causa del ATP sobre el mismo (Fig. 48), sería producto de haber llevado la fosforilación al máximo valor posible.

D. Efectos de metales divalentes

El agregado de cantidades crecientes de factor activó en forma proporcional a PK III y desplazó los óptimos de concentración de Mg^{2+} (Fig. 49). Este desplazamiento sería debido a una probable sustancia complejante de Mg^{2+} asociada al factor activador. Dado que el óptimo para la incorporación de fosfato a fosvitina resultó ser de 1 mM de Mg^{2+} , si la concentración total del mismo superara dicho valor, un agente complejante que llevase la concentración de metal al óptimo actuaría como un pseudo activador. Por otro lado, si el activador estuviese compuesto solamente por el agente complejante los óptimos para Mg^{2+} sólo se desplazarían hacia concentraciones mayores sin cambio en el valor máximo. El hecho de que los máximos aumentaron con la concentración del factor avalaría la realidad de su existencia. Además, un exceso de fosvitina no suprimió la activación para una concentración fija de metal (Fig. 45), lo cual indicaría que el comportamiento complejante sobre el Mg^{2+} no es la única propiedad del factor. En ese caso altas concentraciones del sustrato deberían haber anulado el efecto.

Cuando el Mg^{2+} fue reemplazado por Mn^{2+} o Ca^{2+} , el factor produjo similares desplazamientos de la concentración óptima de metal. Estos dos metales reemplazaron en forma parcial al Mg^{2+} , siendo Mn^{2+} mejor cofactor

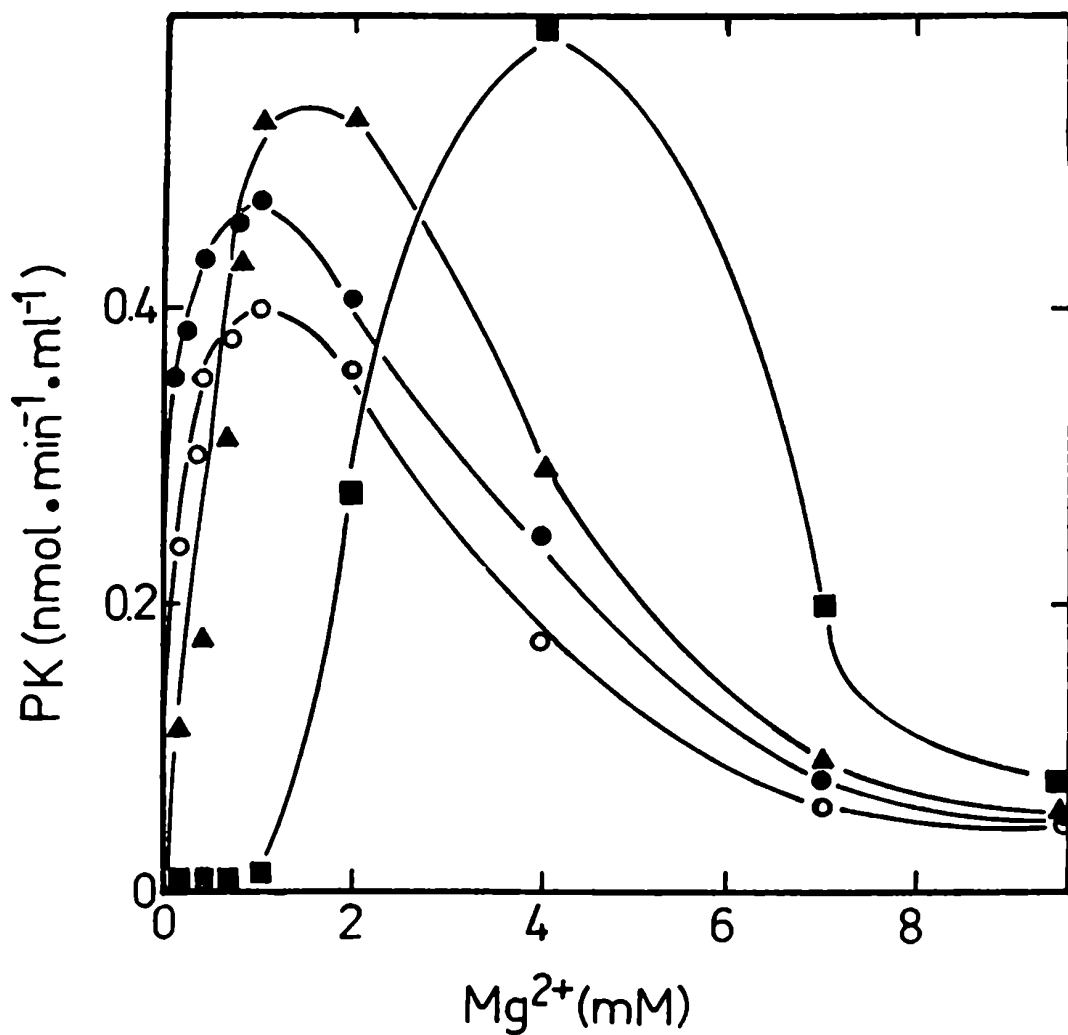


Figura 49. Curvas de concentración de Mg²⁺ para la actividad PK III ensayada en ausencia (○) o presencia de 0,010 ml (●), 0,020 ml (▲) ó 0,050 ml (■) de factor activador (0,09 mg/ml de proteínas). Las condiciones de la incubación fueron las indicadas en la Fig. 40.

de PK III que Ca^{2+} , pero siempre la actividad óptima en presencia de factor fue menor que la correspondiente en su ausencia. La implicancia inmediata de esta propiedad sería el requerimiento de Mg^{2+} para la activación. Por otra parte, se podía extender a otros cationes divalentes la posibilidad de ser secuestrados por el agente complejante asociado.

En presencia de Mg^{2+} , el Ca^{2+} ha inhibido la actividad de PK III en presencia de factor a partir de una concentración de 0,1 mM, y anuló el efecto estimulador del mismo a concentraciones mayores de 1 mM (Fig. 50). Otros cationes tales como Cu^{2+} y Zn^{2+} en concentración 0,1 mM impidieron totalmente la activación (Fig. 51). En las mismas condiciones el Na^+ no tuvo efecto alguno.

IV. FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS EN NEUROSPORA CRASSA

A. Sistemas Crudos

El estudio de la actividad fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos en sistemas crudos permitió establecer que no hay variaciones significativas de la actividad específica en homogeneizados de Neurospora durante el desarrollo del micelio, tal como ya fue demostrado por Terenzi et al. (204). Sin embargo cuando se sometieron dichos homogeneizados a una centrifugación diferencial se encontró que, si bien los precipitados de 105 000 x g no mostraron variaciones con la edad del cultivo, se produjo un incremento mayor del 100% en los sobrenadantes provenientes de micelios cosechados entre 20 y 30 horas después de efectuado el inóculo. Estas actividades que en esas condiciones hidrolizaron en igual medida AMP cíclico y GMP cíclico aparecieron distribuidas en forma similar en distintas preparaciones, estando entre el 80 y el 90% de la actividad en los sobrenadantes y entre el 20 y el 10% en los precipitados. El hecho de que la actividad total no mostró variaciones significativas con la edad del cultivo, pero sí los

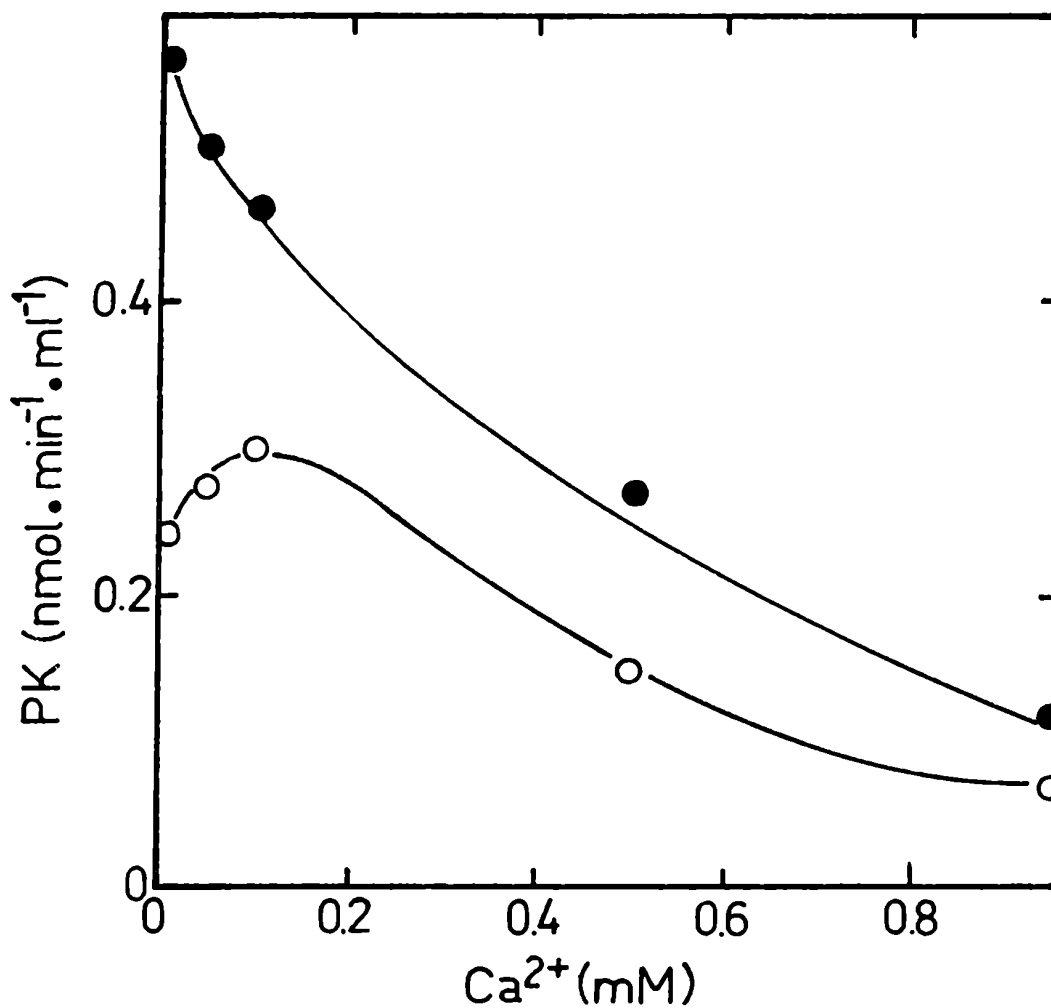


Figura 50. Curvas de concentración de Ca²⁺ para la actividad PK III en ausencia (○) o presencia (●) de 0,030 ml de factor activador (0,09 mg/ml de proteínas). Los ensayos se realizaron en presencia de Mg²⁺ 1 mM y fosvitina 1 mg/ml. Las otras condiciones fueron las descritas en la Fig. 40.

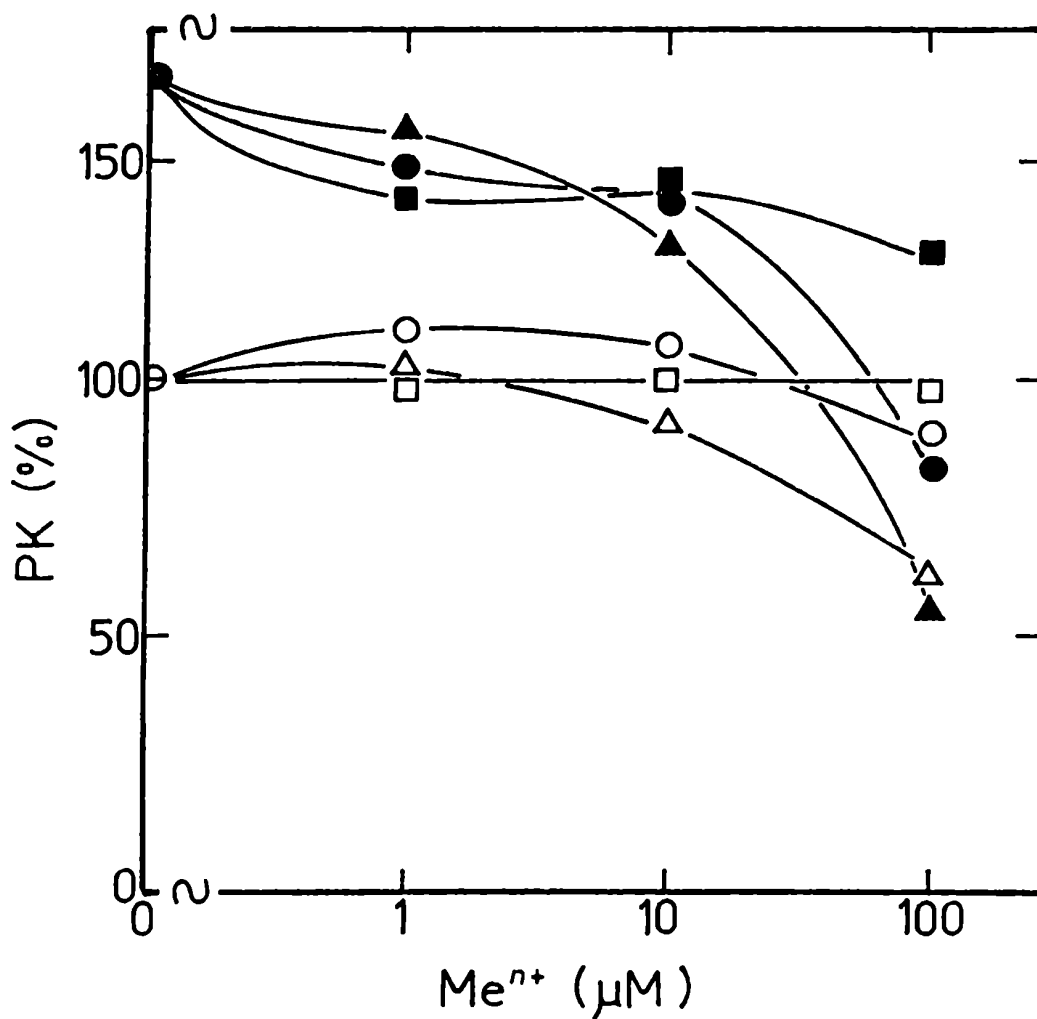


Figura 51. Curvas de concentración de metales divalentes. Los símbolos llenos indican la presencia de 0,030 ml de factor (0,09 mg/ml de proteínas) y los vacíos, la ausencia del mismo. Los ensayos se realizaron en presencia de CuSO₄ (○,●), ZnSO₄ (△,▲), Na₂SO₄ (□,■). Las otras condiciones fueron las descritas en la Fig. 50.

sobrenadantes, podría implicar la presencia de algún inhibidor asociado a las fracciones particuladas. Además este aumento de la actividad hidrolizante de nucleótidos cíclicos podría ser causa, al menos en parte, de un descenso localizado de los niveles de AMP cíclico, lo que permitiría encontrar a la quinasa de proteínas en su forma asociada.

Por otra parte no se detectó actividad fosfodiesterasa en el medio de cultivo en ningún momento desde la germinación hasta la fase estacionaria, y el agregado de tunicamicina durante el crecimiento no tuvo efecto sobre la misma. Esto permitiría descartar la posibilidad de que se trate de una glicoproteína.

Dado que los resultados en sistemas crudos en los cuales pueden coexistir varias isoenzimas son difíciles de interpretar, y que la mayor parte de la actividad fosfodiesterasa se encuentra en los sobrenadantes de 105 000 xg, se decidió purificar el sistema partiendo de los mismos.

B. Separación por cromatografía en DEAE-celulosa

La evidencia obtenida de que los cultivos tienen un máximo de actividad fosfodiesterasa en las fracciones solubles durante las etapas tempranas de crecimiento, hizo suponer que ésta sería la fase más adecuada para obtener una mayor actividad enzimática. En consecuencia el material utilizado en este trabajo corresponde a micelio cosechado en la fase exponencial temprana.

La elución con un gradiente de NaCl de una columna de DEAE-celulosa sembrada con SN 105 dializado dio lugar a la aparición de dos picos de actividad fosfodiesterasa (Fig. 52). El pico I (PDE I) eluyó a una concentración de NaCl de $0,29 \pm 0,04$ M (10 preparaciones) y resultó de actividad comparable en la hidrólisis de AMP cíclico y de GMP cíclico. El pico II (PDE II) eluyó con NaCl $0,43 \pm 0,04$ M (10 preparaciones) e hidrolizó solamente GMP cíclico en cantidades significativas. En todos los casos el pico PDE I resultó más agudo que el pico PDE II lo que podría indicar que este

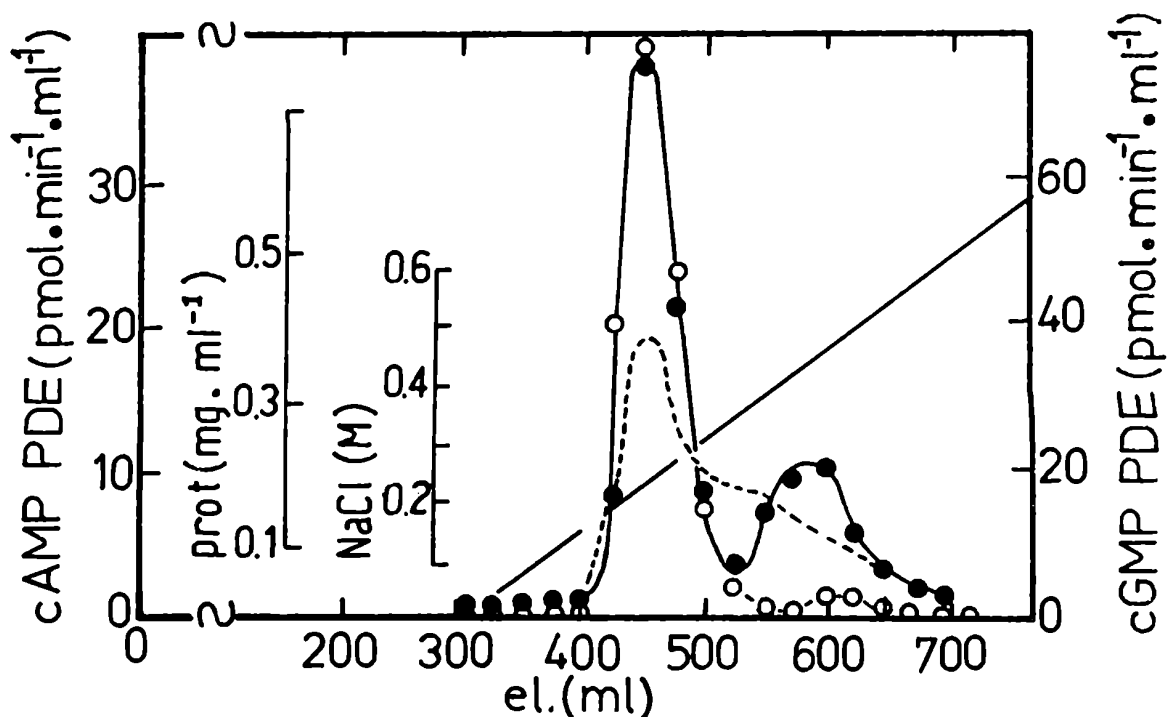


Figura 52. Cromatografía en DEAE-celulosa de un sobrenadante de 105 000 x g. Las dimensiones de la columna y condiciones ya fueron descritas en MATERIALES Y METODOS (III). Las actividades fosfodiesterasas fueron medidas con AMP cíclico (○) ó GMP cíclico (●) según se describió en MATERIALES Y METODOS (VII. D). La línea punteada indica la concentración de proteínas.

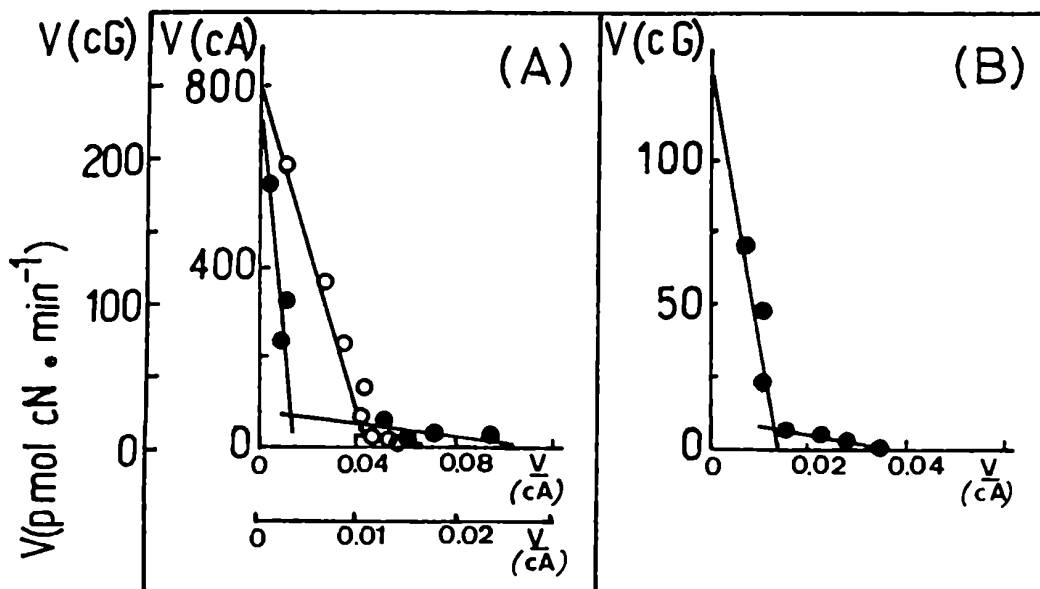


Figura 53. Gráficos de Woolf-Augustinsson-Hofstee para las actividades PDE I y PDE II.

(A) Actividad PDE I ensayada con AMP cíclico (○) o GMP cíclico (●).

(B) Actividad PDE II ensayada con GMP cíclico como sustrato (●). La concentración de proteínas de las preparaciones enzimáticas fue de 0,95 mg/ml en (A), y de 2,5 mg/ml en (B). Las velocidades iniciales se calcularon a partir de curvas de tiempo obtenidas para cada concentración de nucleótido cíclico.

último está compuesto por más de una forma molecular, o que hay cierta heterogeneidad de cargas en la superficie de las moléculas. El agregado de PMSF durante la homogeneización y pasaje por columna de DEAE-celulosa no afectó los perfiles obtenidos, indicando que la presencia de dos picos no se debe al producto de la proteólisis parcial de uno de ellos. Finalmente cabe señalar que, cuando se midieron las fracciones de la columna con altas concentraciones de AMP cíclico, se obtuvo el mismo perfil que el obtenido con bajas concentraciones del sustrato.

C. Especificidades de sustrato y de metal divalente

Los gráficos de Woolf-Augustinsson-Hofstee (129) para la actividad PDE I respecto de ambos nucleótidos cíclicos pueden observarse en la Fig.53 A. Estos gráficos resultaron bimodales, quedando definidos dos valores de K_s para cada nucleótido. Dichos valores fueron de 1,5 y 60 μM cuando el AMP cíclico fue el sustrato y de 1,0 y 35 μM en el caso del GMP cíclico. Tomando como base las velocidades relativas y los valores de K_s , se podría concluir que la actividad PDE I es una fosfodiesterasa no específica que actúa sobre ambos nucleótidos. Por otra parte, el agregado de GMP cíclico no marcado mostró un efecto competitivo cuando PDE I fue medida como actividad hidrolizante de AMP cíclico.

En cuanto a la actividad PDE II, también presentó gráficos de Woolf-Augustinsson-Hofstee bimodales dando como resultado valores de K_s de 3,5 y 95 μM respecto del GMP cíclico (Fig. 53 B). Dado que esta actividad hidrolizó AMP cíclico con muy baja eficiencia, se podría concluir que se trata de una fosfodiesterasa específica para GMP cíclico.

Los cationes Mg^{2+} o Mn^{2+} en concentraciones milimolares estimularon ligeramente a ambas fosfodiesterasas, aunque no fue necesario agregarlos al medio de incubación para detectarlas. Además, el agregado del agente complejante EDTA en concentración 10 mM sólo inhibió entre 20 y 40% estas actividades. Esto podría indicar que si bien los cationes divalentes no

son necesarios para la expresión de la actividad fosfodiesterasa, los mismos podrían actuar como moduladores. Por otro lado no se puede descartar la posibilidad de que existan moléculas de metal unidas con tal afinidad a la enzima que copurifican con la misma y no pueden ser secuestradas por sustancias complejantes en las condiciones del ensayo.

D. Efectos de metilxantinas y reactivos de grupos sulfhidrilos

Se ensayó el efecto de metilxantinas, inhibidores competitivos de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, y el efecto de reactivos que actúan sobre grupos sulfhidrilos. Estos últimos compuestos pueden afectar la interacción y estructura de los polipéptidos modificando su actividad.

En la Fig. 54 se presentan los efectos de las metilxantinas. Para la actividad PDE I, la aminofilina y la metilisobutilxantina (MIX) resultaron mejores inhibidores que la cafeína y la teofilina. Sucede lo contrario con la actividad PDE II. El mercaptoetanol, el ditioneol y el glutatión reducido, que provocan la ruptura de puentes disulfuro, resultan inhibidores más potentes de la fosfodiesterasa PDE II que de la PDE I (Fig. 55). Ambas diferencias de comportamiento avalarían la suposición que se trata de dos especies enzimáticas no relacionadas. Por otro lado, el escaso efecto observado después del agregado de los agentes alquilantes dinitrobenzoato o iodoacetamida, que es similar en ambas actividades, indicaría que no habría grupos sulfhidrilos libres necesarios para la actividad enzimática, o, que si los hubiera, no serían accesibles a dichos reactivos.

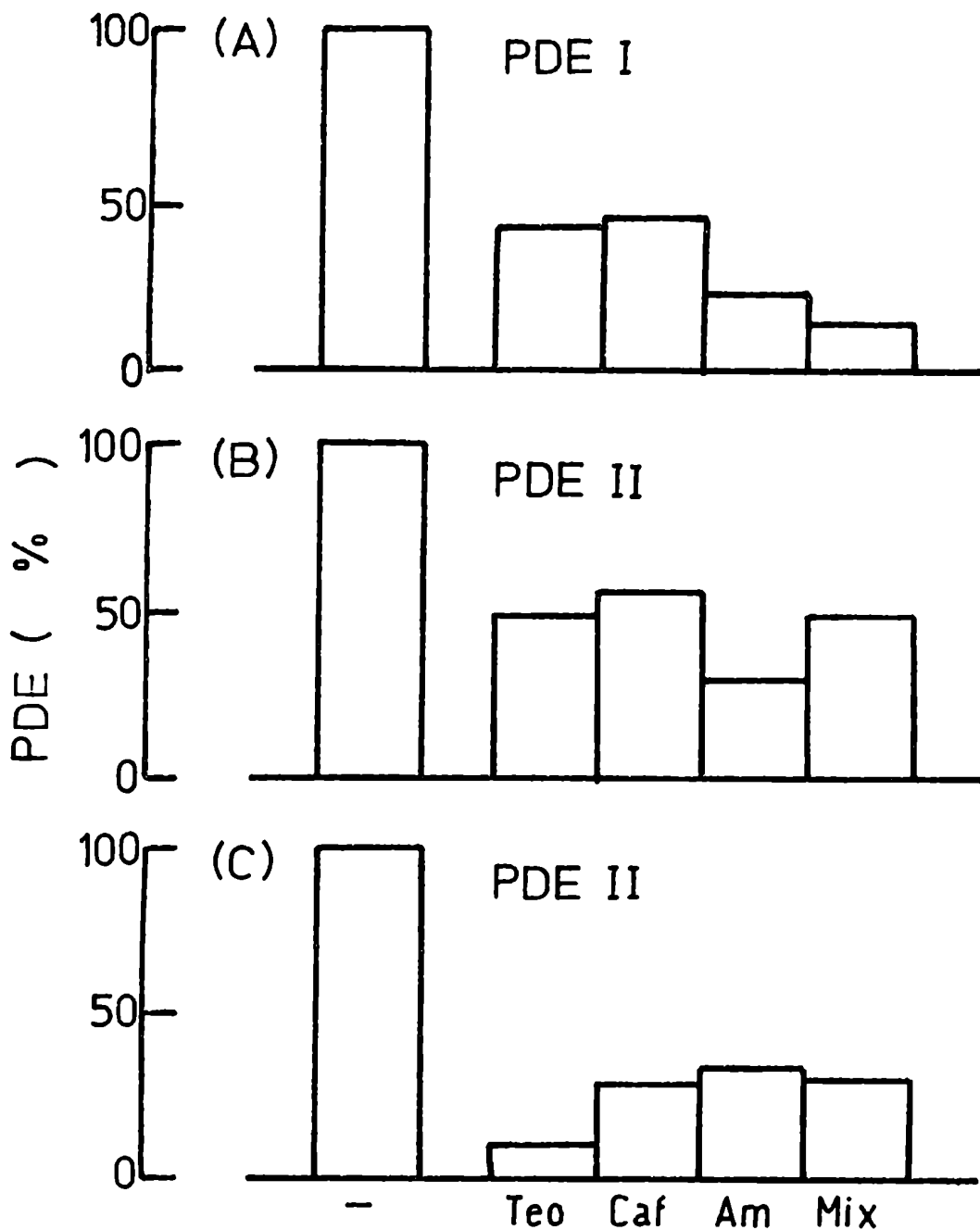


Figura 54. Efecto de las metilxantinas sobre las actividades PDE I (A) y (B) y PDE II (C) medido con AMP cíclico (A) y GMP cíclico (B) y (C). La concentración de metilxantinas en los ensayos fue 1 mM. Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Fig. 52. Las concentraciones de proteínas de las preparaciones enzimáticas fueron de 0,95 mg/ml y 0,25 mg/ml para PDE I y PDE II respectivamente. Los reactivos fueron: Teo (teofilina), Caf (cafeína), Am (aminofilina), Mix (metilisobutilxantina).

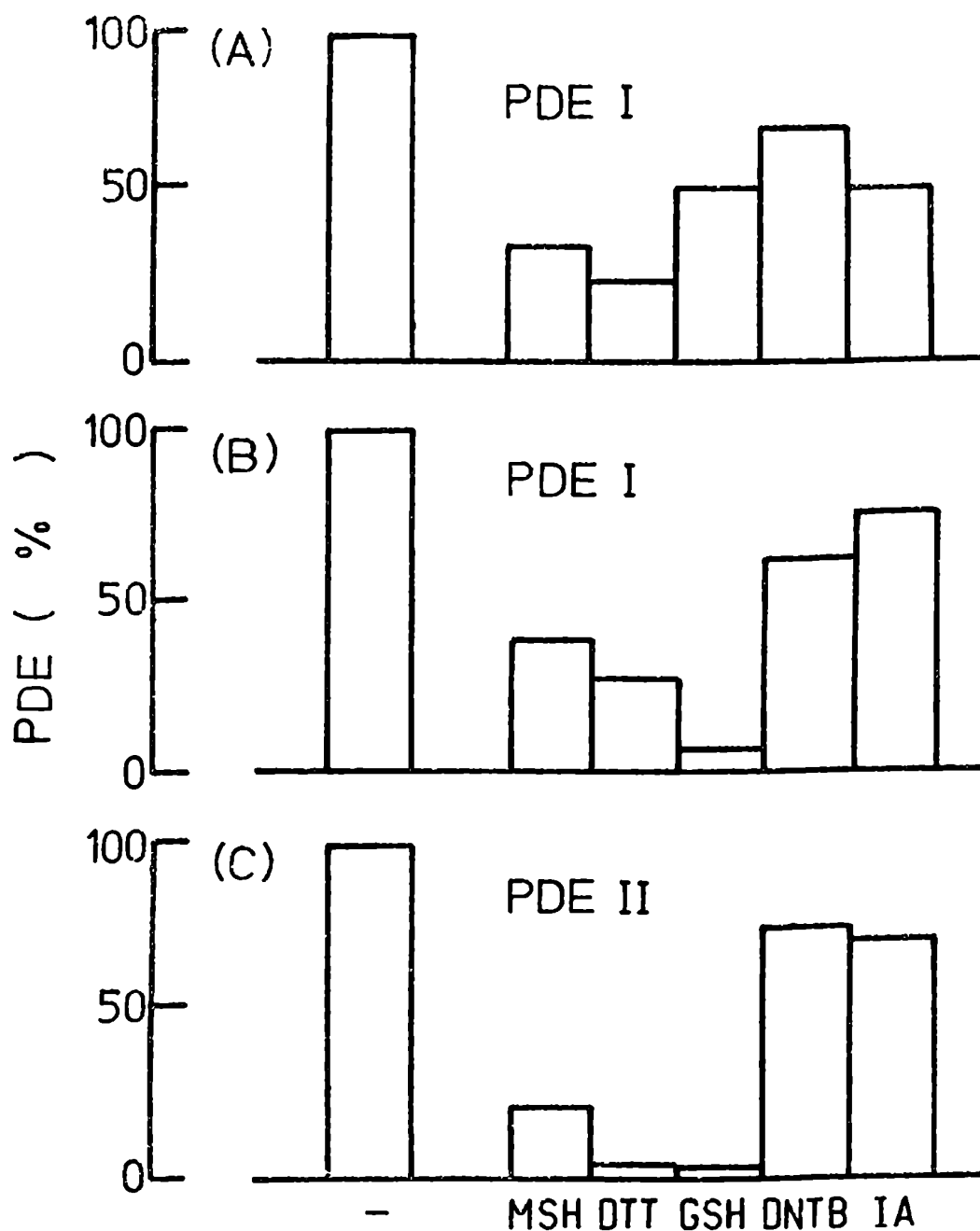


Figura 55. Efecto de los reactivos de grupos sulfhidrilos sobre las actividades PDE I (A)(B) y PDE II (C), medido con AMP cíclico (A) y GMP cíclico (B) y (C).

La concentración de los reactivos fue 1 mM a excepción de la iodoacetamida que fue 1,25 mM. Las condiciones de ensayo fueron las descritas en la Fig. 54. Los reactivos fueron: MSH (mercaptoetanol), DTT (ditiotreitól) GSH (glutati6n), DNTB (dinitrotiobenzoato), IA (iodoacetamida).

V. PARAMETROS MOLECULARES DE LAS FOSFODIESTERASAS

A. Fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos no específica

-Centrifugación en gradientes de sacarosa

La actividad PDE I concentrada por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fue sembrada sobre gradientes de sacarosa que contenían NaCl 0,1 M. El resultado de la centrifugación fue la aparición de tres picos que presentaron actividad hidrolítica de ambos nucleótidos cíclicos con coeficientes de sedimentación de 8,3, 6,5 y 3,6 S. Estos picos fueron llamados PDE Ia, PDE Ib y PDE Ic respectivamente. El pico PDE Ic hidrolizó AMP cíclico con menor velocidad que los picos PDE Ia y PDE Ib, aunque para GMP cíclico las tres actividades resultaron comparables (Fig. 56 A).

-Filtración en geles de agarosa

La actividad PDE I concentrada fue cromatografiada en columnas de Bio-Gel A-1,5 m equilibradas con buffer conteniendo 0,1 M de NaCl. Esto dio lugar a la aparición de tres picos que presentaron actividad hidrolítica de ambos nucleótidos cíclicos con radios de Stokes de 6,1, 4,4 y 3,6 nm. De modo análogo a los picos obtenidos en gradientes de sacarosa fueron nombrados PDE Ia, PDE Ib y PDE Ic respectivamente. La actividad PDE Ic hidrolizó el AMP cíclico con menor velocidad que las actividades PDE Ia y PDE Ib siendo nuevamente similares las actividades respecto del GMP cíclico (Fig. 56 B).

-Cálculo de los parámetros

Las centrifugaciones en gradientes de sacarosa y las filtraciones en geles han dado perfiles similares que han permitido identificar y relacio-

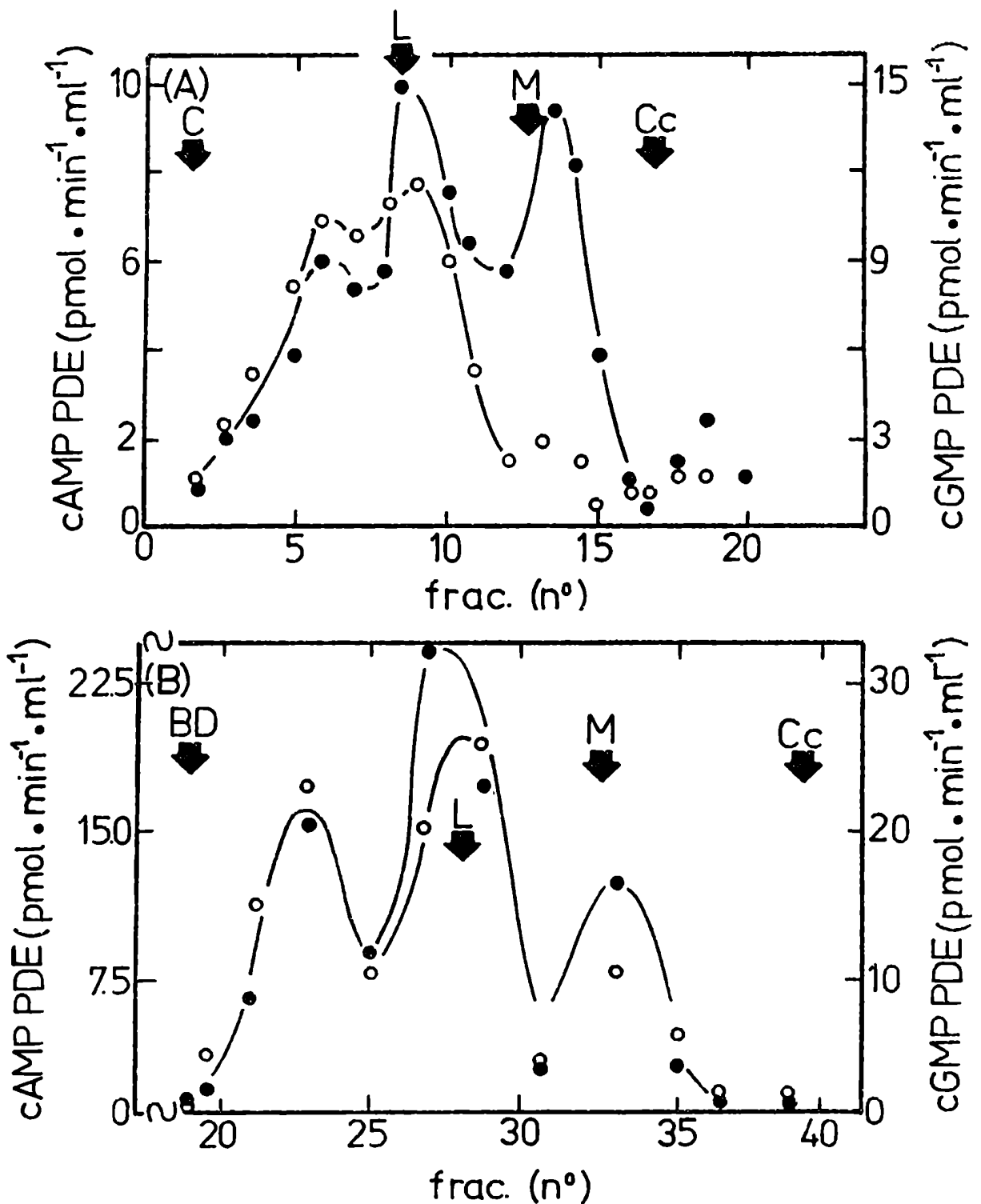


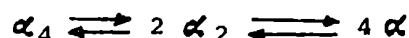
Figura 56. (A) Centrifugación en gradientes de sacarosa 5 a 20% (p/v) de la actividad PDE I en presencia de NaCl 0,1 M.

(B) Cromatografía en Bio-Gel A-1,5 m de la actividad PDE I en columna equilibrada con NaCl 0,1 M. Los ensayos de fosfodiesterasa se realizaron con AMP cíclico (O) o GMP cíclico (●) como sustratos. Las flechas indican los marcadores: BD (dextrano azul), C (catalasa), L (lactato deshidrogenasa), M (malato deshidrogenasa) y Cc (citocromo c).

Las condiciones experimentales fueron descritas en MATERIALES Y MÉTODOS (VI.A, B y C) y en la Fig. 52.

nar las distintas actividades. En todos los casos se supuso para estas actividades enzimáticas un volumen parcial específico de $0,74 \text{ ml.g}^{-1}$, que corresponde a una proteína soluble en soluciones salinas neutras.

La calibración de los gradientes y el Bio-Gel ya fue descrita en MATERIALES Y METODOS (VI.D). Los pesos moleculares calculados fueron: 225 000 para PDE Ia, 126 000 para PDE Ib y 57 000 para PDE Ic (Tabla V). Los coeficientes friccionales resultaron 1,5; 1,3 y 1,4 respectivamente, lo que corresponde a moléculas medianamente asimétricas. La relación que existe entre los pesos moleculares de las tres actividades permitiría suponer la existencia de una enzima con diferentes grados de asociación apareciendo como tetramero (PDE Ia), dímero (PDE Ib) y monómero (PDE Ic). Si bien no se puede excluir que PDE Ic esté también compuesto por subunidades, se puede suponer el siguiente equilibrio dinámico:



Donde α sería el monómero PDE Ic, α_2 el dímero PDE Ib y α_4 el tetramero PDE Ia. El desplazamiento de este equilibrio podría ser provocado por efecto de la concentración de la enzima o por moduladores específicos.

La presencia de estos variados estados de asociación pueden ser la causa de los dos valores de K_s obtenidos para cada sustrato. Por otro lado, la especificidad cambió con el grado de asociación, resultando el supuesto monómero más específico para el GMP cíclico que el dímero o el tetramero.

-Enfoque isoeléctrico en columna

La actividad PDE I concentrada por ultrafiltración fue sembrada en una columna de enfoque isoeléctrico. El resultado de la corrida fue un sólo pico que se centró en la posición de pH 5,0 y que presentó actividades fosfodiesterasa comparables para ambos nucleótidos (Fig. 57 A). El

TABLA V

PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LAS FOSFODIESTERASAS DE
NUCLEOTIDOS CICLICOS DE NEUROSPORA CRASSA

ACTIVIDAD	S _{20,w} (S)	a (nm)	MW	f/f ₀
PDE I (forma a)	8,3	6,1	225 000	1,5
PDE I (forma b)	6,5	4,4	126 000	1,3
PDE I (forma c)	3,6	3,6	57 000	1,4
PDE II (forma a)	10,3	7,0	320 000	1,5
PDE II (forma b)	7,7	5,0	170 000	1,3

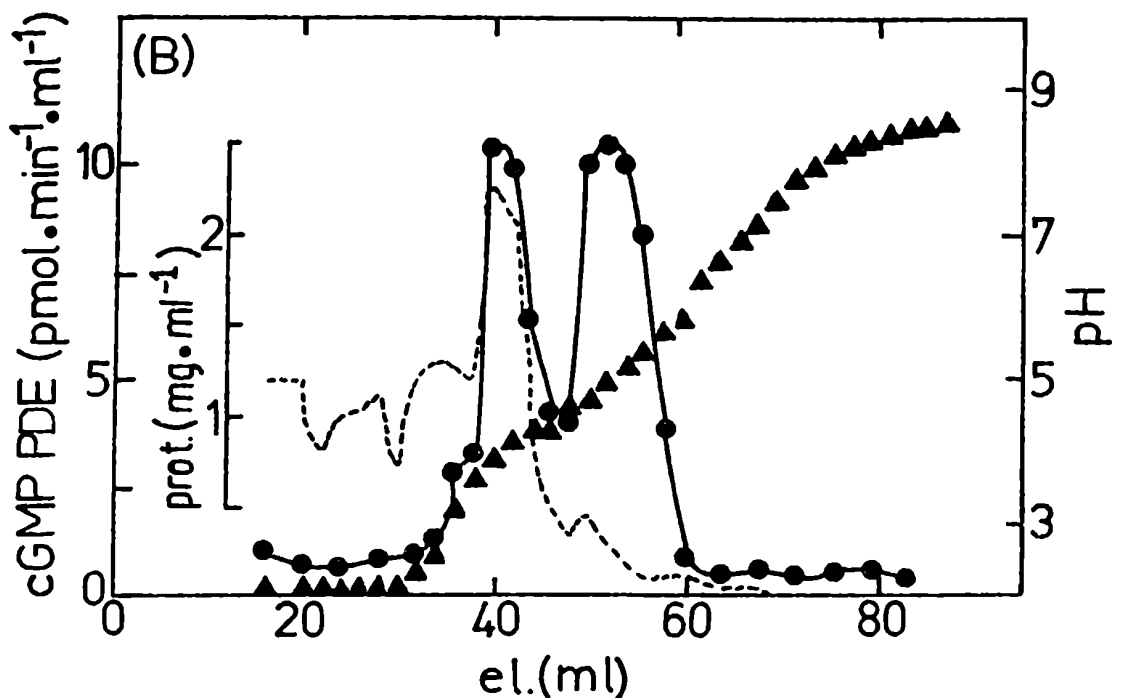
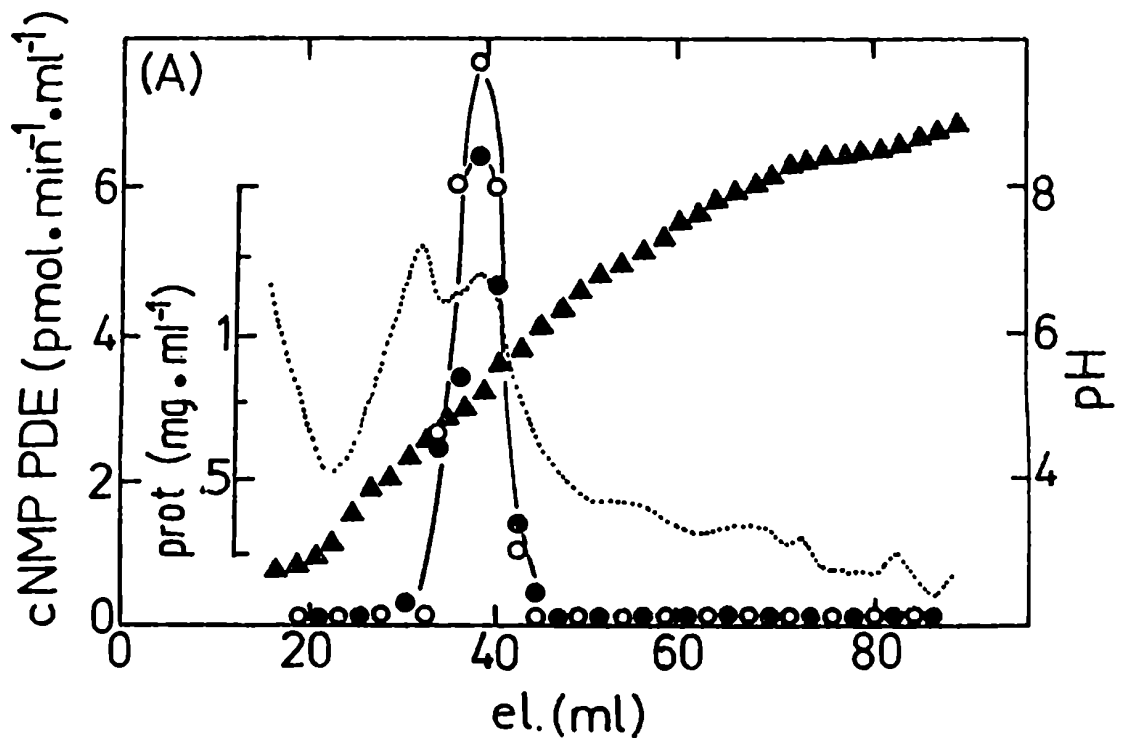


Figura 57. (A) Enfoque isoelectrico de la actividad PDE I. La preparaci3n enzimática fue concentrada 10 veces por ultrafiltraci3n tal como se señaó en MATERIALES Y METODOS (VI.A). Las condiciones experimentales fueron las descritas en MATERIALES Y METODOS (V). Los ensayos de fosfodiesterasa se realizaron con AMP cíclico (O) o GMP cíclico (●) como sustratos en las condiciones señaóadas en la Fig. 52.

(B) Enfoque isoelectrico de la actividad PDE II. La preparaci3n enzimática fue concentrada 20 veces por ultrafiltraci3n tal como se señaó en MATERIALES Y METODOS (VI.A). Las demás condiciones experimentales fueron las descritas en la Fig. 57 A.

punto isoeléctrico de 5,0 indica que se trata de una proteína ácida, lo cual es congruente con su comportamiento previo en la columna de DEAE-celulosa. Por otro lado, el haber obtenido un sólo pico sirve de apoyo para la hipótesis de que las tres actividades, que se obtienen en gradientes de sacarosa y geles de agarosa, son formas de distinto grado de asociación de una única especie molecular.

B. Fosfodiesterasa de GMP cíclico

-Centrifugación en gradientes de sacarosa

La actividad PDE II concentrada por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fue sembrada sobre gradientes de sacarosa. El resultado de las centrifugaciones fue la aparición de dos picos de actividad hidrolítica de GMP cíclico con coeficientes de sedimentación de 10,3 y 7,7 S que fueron llamados PDE IIa y PDE IIb respectivamente (Fig. 58 A).

-Cromatografía en geles de agarosa

La actividad PDE II concentrada fue cromatografiada en columnas de Bio-Gel A-1,5 m equilibradas con buffer conteniendo 0,1 M NaCl. Esto dio lugar a la aparición de dos picos que sólo hidrolizan GMP cíclico con radios de Stokes de 7,0 y 5,0 nm que fueron llamados, por analogía a los obtenidos en los gradientes de sacarosa, PDE IIa y PDE IIb, respectivamente (Fig. 58 B).

-Cálculo de los parámetros

Los perfiles obtenidos por centrifugación en gradientes de sacarosa y filtración en geles resultaron análogos, de este modo fue posible relacionar e identificar las distintas actividades.

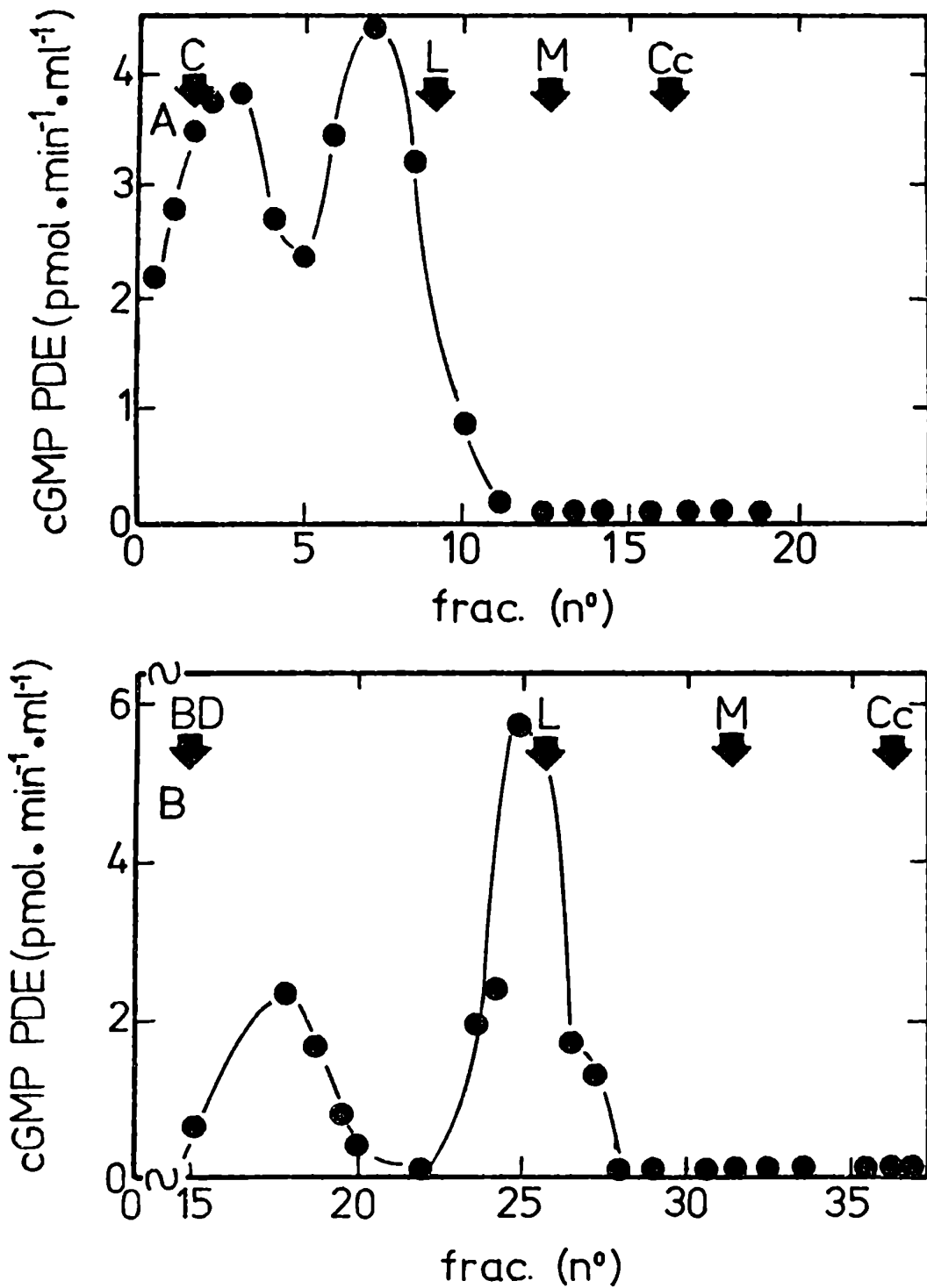


Figura 58. (A) Centrifugación en gradientes de sacarosa 5 a 20% (p/v) de la actividad PDE II en presencia de NaCl 0,1 M.

(B) Cromatografía en Bio-Gel A-1,5 m de la actividad PDE II en columna equilibrada con NaCl 0,1 M. Los símbolos y condiciones experimentales fueron descritos en la Fig. 56.

La calibración de los gradientes y el Bio Gel ya fue descrita en MATERIALES Y METODOS (VI.D).

Aceptando un volumen parcial específico de $0,74 \text{ ml g}^{-1}$, los pesos moleculares calculados fueron 320 000 y 170 000, y los cocientes friccionales 1,5 y 1,3 para PDE IIa y PDE IIb respectivamente (Tabla V). Estos cocientes indicarían que se trata de moléculas medianamente asimétricas.

La relación entre los pesos moleculares de ambas actividades permitiría suponer que se trata de una enzima en dos grados de asociación diferente, siendo la mayor (PDE IIa) formada por dos unidades de la menor (PDE IIb). En este caso no se podía definir, con los datos obtenidos hasta el momento, la existencia de un monómero y un dímero, ya que gradientes en sacarosa corridos en presencia de mercaptoetanol 10 mM han permitido hallar formas de menor coeficiente de sedimentación que PDE IIb, que podrían representar subunidades de la misma.

-Enfoque isoeléctrico en columna

La actividad PDE II concentrada por ultrafiltración fue sembrada en una columna de enfoque isoeléctrico. El resultado de la corrida fue la aparición de dos picos que se ubicaron en las posiciones de pH 4,0 y 4,9 (Fig. 57 B). Ambas son proteínas ácidas, como ya lo indicaba su comportamiento en la DEAE-celulosa.

Por otra parte, la existencia de dos picos serviría de apoyo a la hipótesis de que existe una heterogeneidad de cargas en la superficie de las moléculas que conduciría a distintos grados de asociación de las mismas a la DEAE-celulosa, con la consiguiente pérdida de resolución durante la elución.

C O N C L U S I O N

I. QUINASAS DE PROTEINAS EN NEUROSPORA CRASSA

a. La cromatografía en DEAE-celulosa de sobrenadantes (105 000 x g) de micelio de Neurospora crassa dio lugar a la aparición de tres picos con actividades de quinasa de proteínas y dos con capacidad de unión de AMP cíclico. Nombrados según su orden de elución se denominaron PK I, PK II, PK III y PK I y R respectivamente.

b. La actividad quinasa PK I eluyó con NaCl 0,19 M y presentó "binding" de AMP cíclico. Esta enzima, que fosforila histonas, fue la única quinasa estimulable por AMP cíclico ($A_{0,5} 2 \text{ nM}$). En ausencia de dicho nucleótido resultó inhibida por la actividad R que eluyó con NaCl 0,23 M.

c. Los estudios realizados por centrifugación en gradientes de sacarosa y filtración en geles de agarosa permitieron comprobar que PK I, de peso molecular 118 000, se disocia en presencia de NaCl o de AMP cíclico en una actividad quinasa de MW 55 000 y una de "binding" de AMP cíclico de MW 57 000. Dicha actividad de "binding" resultó totalmente idéntica a la actividad R.

d. Los datos enunciados en b. y c. indujeron a suponer que PK I es la holoenzima (dimérica) de una quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico que, en presencia de NaCl o AMP cíclico, se disocia en sus subunidades catalítica y regulatoria. Además la actividad R representaría a subunidades regulatorias libres.

e. La actividad quinasa PK II eluyó con NaCl 0,32 M y no resultó estimulada por nucleótidos cíclicos ni inhibida por la actividad R. Esta enzima también fosforila histonas pero, al contrario que PK I, resulta inhibida por un exceso de sustrato.

f. Los estudios realizados por centrifugación en gradientes de sacarosa y filtración en geles permitieron calcular un peso molecular de 56 000 para la actividad PK II. Si bien este dato podía indicar cierta relación entre PK II y la subunidad catalítica de PK I, los valores de coeficientes de sedimentación y radios de Stokes difieren de modo significativo.

g. Los datos enunciados en e. y f. permitieron concluir que PK II es una especie no relacionada a PK I.

h. La actividad quinasa PK III eluyó con NaCl 0,44 M y no resultó estimulado por nucleótidos cíclicos ni inhibida por la actividad R. Esta enzima, contrariamente a las dos primeras, fosforila fosvitina y caseína de modo específico.

i. Los estudios realizados por centrifugación en gradientes de sacarosa y filtración en geles de agarosa, permitieron calcular un peso molecular de 209 000 para la actividad PK III.

j. Un inhibidor termoestable de las actividades PK I y PK II fue hallado en las fracciones del eluido de una columna de DEAE-celulosa de los sobrenadantes (105 000 x g) de micelio de Neurospora. Dicho modulador resultó más efectivo sobre PK I que PK II, actuando posiblemente a nivel de la porción catalítica de las quinasas.

k. Un activador termoestable de la actividad PK III fue hallado en las fracciones del eluido de una columna de DEAE-celulosa de los sobrenadantes (105 000 x g) de micelio de Neurospora. Dicho modulador eluye con NaCl 0,29 M de la DEAE-celulosa y con fosfato de sodio 0,16 M cuando es recromatografiado en hidroxilapatita.

l. Sólo se obtuvo activación de la PK III por el factor termoestable cuando se utilizó fosvitina como sustrato, y el efecto se acrecentó por

preincubación de la enzima y el sustrato con dicho factor. Por otra parte se detectó una actividad complejante de metales asociada al mismo y se determinó que el Mg^{2+} es requerido en forma específica para la manifestación del efecto activador.

II. FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS EN NEUROSPORA CRASSA

a. La cromatografía en DEAE-celulosa de sobrenadantes (105 000 x g) de micelio de Neurospora crassa dio lugar a la aparición de dos picos de actividad fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos. Nombrados según su orden de elución se denominaron PDE I y PDE II.

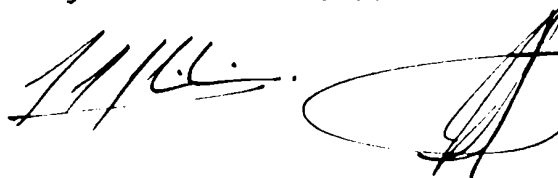
b. La actividad fosfodiesterasa PDE I eluyó con NaCl 0,29 M y tuvo como sustratos tanto AMP cíclico (K_s 1,5 y 60 μM) como GMP cíclico (K_s 1,0 y 35 μM). Esta forma presenta un punto isoeléctrico de 5,0.

c. Los estudios realizados por centrifugación en gradientes de sacarosa y filtración en geles permitieron comprobar que PDE I se presenta en tres formas: PDE Ia, PDE Ib, PDE Ic de pesos moleculares: 225 000, 126 000 y 57 000; respectivamente. La relación entre los pesos moleculares permitiría suponer la existencia de una enzima en diferentes grados de asociación apareciendo como tetrámero, dímero y monómero.

d. La actividad fosfodiesterasa PDE II eluyó con NaCl 0,43 M. Su sustrato específico fue el GMP cíclico (K_s 3,5 y 95 μM) y presentó dos picos en electroenfoque en columna con puntos isoeléctricos de 4,0 y 4,9.

e. Los estudios realizados por centrifugación en gradientes de sacarosa y filtración en geles permitieron comprobar que PDE II se presenta en dos formas: PDE IIa y PDE IIb de pesos moleculares: 320 000 y 170 000, respec-

tivamente. La relación entre los pesos moleculares permitiría suponer la existencia de una enzima en dos grados de asociación.

Handwritten signature and scribble.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

NOMENCLATURA DE LAS ENZIMAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Lipmann, F.; Levene, P.A. (1932) J.Biol.Chem. 98: 109.
2. Lipmann, F. (1933) Biochem.Z. 262: 3.
3. Burnett, G.; Kennedy, E.P. (1954) J.Biol.Chem. 211: 969.
4. Sutherland, E.W.; Rall, T.W. (1957) J.Am.Chem.Soc. 79: 3608.
5. Sutherland, E.W.; Rall, T.W. (1958) J.Biol.Chem. 232: 1077.
6. Butcher, R.W.; Sutherland, E.W. (1962) J.Biol.Chem. 237: 1244.
7. Walsh, D.A.; Perkins, J.P.; Krebs, E.G. (1968) J.Biol.Chem. 243: 3763.
8. Fischer, E.H.; Krebs, E.G. (1955) J.Biol.Chem. 216: 121.
9. Sutherland, E.W.Jr.; Wosilait, W.D. (1955) Nature 175: 169.
10. Gershey, E.L.; Vidali, G.; Allfrey, V.G. (1968) J.Biol.Chem. 243: 5018.
11. Holzer, H.; Mecke, D.; Wulff, K.; Liess, K.; Heilmeyer, L.Jr. (1967) Adv.Enzyme Regul. 5: 211.
12. Kort, E.N.; Goy, M.F.; Larsen, S.H.; Adler, J. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 72: 3939.
13. Rodnight, R.; Lavin, B.E. (1964) Biochem.J. 93: 84.
14. Traugh, J.A.; Mumby, M.; Traut, R.R. (1973) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 70: 373.
15. Smith, D.L.; Chen, C.C.; Bruegger, B.B.; Holtz, S.L.; Halpern, R.M.; Smith, R.A. (1974) Biochemistry 13: 3780.
16. Hunter, T.; Sefton, B.M. (1980) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 77: 1311.
17. Kuo, J.F.; Greengard, P. (1970) J.Biol.Chem. 245: 2493.
18. Shoji, M.; Patrick, J.G.; Tse, J.; Kuo, J.F. (1977) J.Biol.Chem. 252: 4347.
19. Lincoln, T.M.; Flockhart, D.A.; Corbin, J.D. (1978) J.Biol.Chem. 253: 6002.
20. Perrie, W.T.; Smillie, L.B.; Perry, S.V. (1973) Biochem.J. 135: 151.
21. Waisman, D.M.; Singh, T.J.; Wang, J.H. (1978) J.Biol.Chem. 253: 3387.

22. Roberts,W.K.; Hovanessian,A.; Brown,R.E.; Clemens,M.J.; Kerr,I.M. (1976) Nature 264: 477.
23. Sen,G.C.; Taira,H.; Lengyel,P. (1978) J.Biol.Chem. 253: 5915.
24. Beavo,J.A.; Betchel,P.J.; Krebs,E.G. (1975) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 5: 241.
25. Rosen,O.M.; Erlichman,J.; Rubin,C.S. (1975) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 5: 253.
26. Hofman,F.; Beavo,J.A.; Betchel,P.J.; Krebs,E.G. (1975) J.Biol. Chem. 250: 7795.
27. Corbin,J.D.; Keely,S.L. (1977) J.Biol.Chem. 252: 910.
28. Corbin,J.D.; Sudgen,P.H.; Lincoln,T.M.; Keely,S.L. (1977) J.Biol. Chem. 252: 3854.
29. Erlichman,J.; Rosenfeld,R.; Rosen,O.M. (1974) J.Biol.Chem. 249: 5000.
30. Rangel-Aldao,R.; Rosen,O.M. (1976) J.Biol.Chem. 251: 3376.
31. Hoppe,J.; Marutzky,R.; Shaltiel,S. (1975) Eur.J.Biochem. 90: 427.
32. Chiou,C.K.; Alfano,J.; Rosen,O.M. (1977) J.Biol.Chem. 252: 2855.
33. Uno,I.; Ueda,T.; Greengard,P. (1976) J.Biol.Chem. 251: 2192.
34. Demaille,J.G.; Peters,K.A.; Fischer,E.H. (1977) Biochemistry 16: 3080.
35. Walsh,D.A.; Ashby,C.D. (1973) Recent Prog.Horm.Res. 29: 329.
36. Beavo,J.A.; Betchel,P.J.; Krebs,E.G. (1974) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 71: 3580.
37. Kuo,J.F. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun. 65: 1214.
38. Costa,M.; (1977) Biochem.Biophys.Res.Commun. 78: 1311.
39. Beale,E.G.; Dedman,J.R.; Means,A.R. (1977) J.Biol.Chem. 252: 6322.
40. Szmigielsky,A.; Guidotti,A.; Costa,E. (1977) J.Biol.Chem. 252: 3848.
41. Langan,T.A. (1968) Science 162: 579.
42. Miyamoto,E.; Kuo,J.F.; Greengard,P. (1969) Science 163: 63.

43. Cohen, P.; Watson, D.C.; Dixon, G.H. (1975) Eur.J.Biochem. 51: 79.
44. Daile, P.; Carnegie, P.R. (1974) Biochem.Biophys.Res.Commun. 61: 852.
45. Bylund, D.B.; Krebs, E.G. (1975) J.Biol.Chem. 250: 6355.
46. Krebs, E.G.; Beavo, J.A. (1979) Ann.Rev.Biochem. 48: 923.
47. Small, D.; Chou, P.Y.; Fasman, G.D. (1977) Biochem.Biophys.Res. Commun. 79: 341.
48. Kuo, J.F.; Greengard, P. (1970) J.Biol.Chem. 245: 2493.
49. Hofmann, F.; Sold, G. (1972) Biochem.Biophys.Res.Commun. 49: 1100.
50. Nakazawa, K.; Sano, M. (1975) J.Biol.Chem. 250: 7415.
51. Lincoln, T.M.; Dills, W.L.Jr.; Corbin, J.D. (1977) J.Biol.Chem. 252: 4269.
52. Takai, Y.; Nakaya, S.; Inoue, M.; Kishimoto, A.; Nishiyama, K.; Yamamura, H.; Nishizuka, Y. (1976) J.Biol.Chem. 251: 1481.
53. Lincoln, T.M.; Hall, C.L.; Park, C.R.; Corbin, J.D. (1976) Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A. 73: 2559.
54. Kuo, J.F.; Kuo, W.N.; Shoji, M.; Davis, C.W.; Seery, V.L.; Donnelly, T.E.Jr. (1976) J.Biol.Chem. 251: 1759.
55. de Jonge, H.R.; Rosen, O.M. (1977) J.Biol.Chem. 252: 2780.
56. Donnelly, T.E.Jr.; Kuo, J.F.; Reyes, P.L.; Greengard, P. (1973) J. Biol.Chem. 248: 190.
57. Kuo, W.N.; Kuo, J.F. (1976) J.Biol.Chem. 251: 4283.
58. Kuo, W.N.; Shoji, M.; Kuo, J.F. (1976) Biochim.Biophys.Acta 437: 142.
59. Kuo, W.N.; Shoji, M.; Kuo, J.F. (1976) Biochem.Biophys.Res.Commun. 70: 280.
60. Lincoln, T.M.; Corbin, J.D. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 74: 3239.
61. Edlund, B.; Zetterqvist, O.; Ragnarsson, U.; Engstrom, L. (1977) Biochem.Biophys.Res.Commun. 79: 139.
62. Hashimoto, E.; Takeda, M.; Nishikusha, Y.; Hamana, K.; Iwai, K. (1976) J.Biol.Chem. 251: 6287.

63. Casnellie, J.E.; Greengard, P. (1974) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 71: 1891.
64. Meyer, W.L.; Fischer, E.H.; Krebs, E.G. (1964) Biochemistry 3: 1033.
65. Ozawa, E.; Hosoi, K.; Ebashi, S. (1967) J.Biochem. 61: 531.
66. Dabrowska, R.; Sherry, J.M.F.; Aromatorio, D.K.; Hartshorne, D.J. (1978) Biochemistry 17: 253.
67. Pires, E.; Perry, S.V.; Thomas, M.A.W. (1974) FEBS Lett. 41: 292.
68. Cohen, P.; Burchell, A.; Foulkes, J.G.; Cohen, P.T.W.; Vanaman, T.C.; Nairn, A.C. (1978) FEBS Lett 92: 287.
69. Wang, J.H.; Stull, J.T.; Huang, T.S.; Krebs, E.G. (1976) J.Biol.Chem. 251: 4521.
70. Cheung, W.Y. (1970) Biochem.Biophys.Res.Commun. 38: 533.
71. De Lange, R.J.; Kemp, R.G.; Riley, W.D.; Cooper, R.A.; Krebs, E.G. (1968) J.Biol.Chem. 243: 2200.
72. Moir, A.J.G.; Wilkinson, J.M.; Perry, S.V. (1974) FEBS Lett. 42: 253.
73. Nolan, C.; Novoa, W.B.; Krebs, E.G.; Fischer, E.H. (1964) Biochemistry 3: 542.
74. Tessmer, G.W.; Skuster, J.R.; Tabatabai, L.B.; Graves, D.J. (1977) J.Biol.Chem. 252: 5666.
75. Kemp, B.E.; Graves, D.J.; Benjamini, E.; Krebs, E.G. (1977) J.Biol.Chem. 252: 4888.
76. Jakes, R.; Northrop, F.; Kendrick-Jones, J. (1976) FEBS Lett. 70: 229.
77. Inoue, Y.; Yamamura, H.; Nishizuka, Y. (1973) Biochem.Biophys.Res. Commun. 50: 228.
78. Puca, G.A.; Nola, E.; Sica, V.; Bresciani, F. (1972) Biochem.Biophys.Res.Comm. 49: 970.
79. Eipper, B.A. (1974) J.Biol.Chem. 249: 1398.
80. Rodnight, R.; Lavin, B.E. (1964) Biochem.J. 93: 84.
81. Walinder, O. (1973) Biochim.Biophys.Acta 293: 140.
82. Goldstein, J.L.; Hasty, M.A. (1973) J.Biol.Chem. 248: 6300.
83. Kleinsmith, L.J.; Allfrey, V.G. (1969) Biochim.Biophys.Acta 175:

- 123.
84. Takeda, M.; Matsumura, S.; Nakaya, Y. (1974) J. Biochem. 75: 743.
85. Farron-Fursental, F. (1980) J. Biol. Chem. 255: 4589.
86. Yamamoto, M.; Criss, W.E.; Takai, Y.; Yamamura, H.; Nishizuka, Y. (1979) J. Biol. Chem. 254: 5049.
87. England, P.J.; Stull, J.T.; Krebs, E.G. (1972) J. Biol. Chem. 247: 5275.
88. Kato, K.; Bishop, J.S. (1972) J. Biol. Chem. 247: 7420.
89. Kanai, C.; Thomas, J.A. (1974) J. Biol. Chem. 249: 6459.
90. Khandelwal, R.L.; Vandenheede, J.R.; Krebs, E.G. (1976) J. Biol. Chem. 251: 4850.
91. Li, H.C.; Hsiao, K.J.; Chan, W.W.S. (1978) Eur. J. Biochem. 84: 215.
92. Gergely, P.; Dombrádi, V.; Bot, G. (1978) FEBS Lett. 93: 239.
93. Huang, F.L.; Glinsmann, W.H. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3004.
94. Huang, F.L.; Glinsmann, W.H. (1976) Eur. J. Biochem. 70: 419.
95. Khandelwal, R.L.; Zinman, S.M. (1978) J. Biol. Chem. 253: 560.
96. Nimmo, G.A.; Cohen, P. (1978) Eur. J. Biochem. 87: 353.
97. Nimmo, G.A.; Cohen, P. (1978) Eur. J. Biochem. 87: 341.
98. Nakai, C.; Glinsmann, W.H. (1977) Mol. Cell. Biochem. 15: 133.
99. Stalmans, W.; De Wulf, H.; Lederer, B.; Hers, H.G. (1970) Eur. J. Biochem. 15: 9.
100. Stalmans, W.; Laloux, M.; Hers, H.G. (1974) Eur. J. Biochem. 49: 415.
101. Martensen, T.M.; Brotherton, J.E.; Graves, D.J. (1973) J. Biol. Chem. 248: 8329.
102. Kikuchi, K.; Tamura, S.; Hiraga, A.; Tsuiki, S. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 75: 29.
103. Laloux, M.; Stalmans, W.; Hers, H.G. (1978) Eur. J. Biochem. 92: 15.
104. Imaoka, T.; Imazu, M.; Ishida, N.; Takeda, M. (1978) Biochim. Biophys. Acta 523: 109.
105. Greengard, P. (1978) Science 199: 146.

106. Robinson,G.A.; Butcher,R.W.; Sutherland,E.W. (1971) Cyclic AMP;
Academic Press,New York.
107. Rall,T.W.; Sutherland,E.W.; Berthet,J. (1957) J.Biol.Chem. 224:
463.
108. Nimmo,H.G.; Cohen,P. (1977) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 8: 145.
109. Nimmo,H.G.; Cohen,P. (1974) FEBS Lett. 47: 162.
110. Antoniw,J.F.; Nimmo,H.G.; Yeaman,S.J.; Cohen,P. (1977) Biochem.J.
162: 423.
111. Lee,E.Y.C.; Silberman,S.R.; Ganapathi,M.K.; Petrović,S.; Paris,H.
(1980) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 13: 95.
112. Pohl,S.L.; Birnbaumer,L.; Rodbell,M. (1969) Science 164: 566.
113. Ross,E.M.; Gilman,A.G. (1980) Annu.Rev.Biochem. 49: 533.
114. Rodbell,M.; Birnbaumer,L.; Phol,S.L.; Kraus,H.M.J. (1971) J.Biol.
Chem. 246: 1877.
115. Harwood,J.P.; Rodbell,M. (1973) J.Biol.Chem. 248: 4901.
116. Birnbaumer,L.; Pohl,S.L.; Rodbell,M.; Sundby,F. (1972) J.Biol.
Chem. 247: 2038.
117. Cuatrecasas,P.; Hollenberg,M.D. (1976) Adv.Protein Chem. 30: 251.
118. Singer,S.J.; Nicholson,G.L. (1972) Science 175: 720.
119. Schramm,M.; Orly,J.; Eimerl,S.; Korner,M. (1977) Nature 268: 310.
120. Goldberg,N.D.; Haddox,M.K. (1977) Annu.Rev.Biochem. 46: 823.
121. Murad,F.; Arnold,W.P.; Mittal,C.K.; Braughler,J.M. (1979) Adv.
Cyclic Nucleotide Res. 11: 175.
122. Kimura,H.; Murad,F. (1975) Life Sciences 17: 837.
123. Chrisman,T.D.; Garbers,D.L.; Parks,M.A.; Hardman,J.G. (1975)
J.Biol.Chem. 250: 374.
124. Garbers,D.L. (1976) J.Biol.Chem. 251: 4071.
125. Braughler,J.M.; Mittal,C.K.; Murad,F. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.
U.S.A. 76: 219.
126. Thompson,W.J.; Appleman,M.M. (1971) Biochemistry 10: 311.
127. Ho,H.C.; Wirch,E.; Stevens,F.C.; Wang,J.H. (1977) J.Biol.Chem.

- 252: 43.
128. Brostrom, C.O.; Wolff, D.J. (1976) Arch.Biochem.Biophys. 172: 301.
129. Segel, I.H. (1975) Enzyme kinetics, John Wiley & Sons, Inc., New York.
130. Ho, H.C.; Teo, T.S.; Desai, R.; Wang, J.H. (1976) Biochim.Biophys. Acta 429: 461.
131. Sharma, R.K.; Wang, T.H.; Wirch, E.; Wang, J.H. (1980) J.Biol.Chem. 255: 5916.
132. Morrill, M.E.; Thompson, S.T.; Stellwagen, E. (1979) J.Biol.Chem. 254: 4371.
133. Russel, T.R.; Terasaki, W.L.; Appleman, M.M. (1973) J.Biol.Chem. 248: 1334.
134. Adachi, K.; Levine, V.; Halprin, K.M.; Iizuka, H.; Yoshikawa, K. (1976) Biochim.Biophys.Acta 429: 498.
135. Thompson, W.J.; Appleman, M.M. (1971) J.Biol.Chem. 246: 3145.
136. Appleman, M.M.; Thomson, W.J.; Russell, T.R. (1973) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 3: 65.
137. Lin, Y.M.; Cheung, W.Y. (1975) Int.J.Biochem. 6: 271.
138. Russell, T.R.; Thompson, W.J.; Schneider, F.W.; Appleman, M.M. (1972) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 69: 1791.
139. Pichard, A.L.; Cheung, W.Y. (1976) J.Biol.Chem. 251: 5726.
140. Hidaka, H.; Asano, T. (1976) Biochim.Biophys.Acta 429: 485.
141. Terasaki, W.L.; Appleman, M.M. (1975) Metabolism 24: 311.
142. Filburn, C.R.; Sacktor, B. (1976) Arch.Biochem.Biophys. 174: 249.
143. Van Inwegen, R.G.; Swafford, R.L.; Strada, S.J.; Thompson, W.J. (1977) Arch.Biochem.Biophys. 178: 58.
144. Miki, N.; Barabam, J.M.; Keirns, J.J.; Boyce, J.J.; Bitensky, M.W. (1975) J.Biol.Chem. 250: 6320.
145. Baehr, W.; Devlin, M.J.; Applebury, M.L. (1979) J.Biol.Chem. 254: 11669.
146. Patterson, W.D.; Hardman, J.G.; Sutherland, E.W. (1976) Mol.Cell.

- Endocrinol. 5: 51.
147. Strada, S.J.; Thompson, W.J. (1978) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 9:
265.
148. Chasin, M.; Harris, D.N. (1976) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 7: 225.
149. Amer, M.S.; Kreighbaum, W.E. (1975) J.Pharm.Sci. 64: 1.
150. Ray, T.K.; Forte, J.G. (1972) FEBS Lett. 20: 205.
151. Ho, R.J.; Russell, T.R.; Akasawa, T.; Hucks, M.W. (1975) J.Cyclic
Nucleotide Res 1: 81.
152. Beal, E.G.; Dedman, J.R.; Means, A.R. (1977) J.Biol.Chem. 252: 6322.
153. Sharma, R.K.; Desai, R., Thompson, T.R.; Wang, J.H. (1978) Can.J.
Biochem. 56: 598.
154. Liu, P.L.; Wong, V.G. (1979) Biochim.Biophys.Acta 583: 273.
155. Zinman, B.; Hollemberg, C.H. (1974) J.Biol.Chem. 249: 2182.
156. Wells, J.N.; Hardman, J.G. (1977) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 8: 119.
157. Pledger, W.J.; Thompson, W.J.; Strada, S.J. (1975) Nature 256: 729.
158. Pledger, W.J., Thompson, W.J.; Strada, S.J. (1976) Biochem.Biophys.
Res.Comm. 70: 58.
159. Sakai, R.; Thompson, W.J.; Lavis, W.J.; Williams, R.H. (1974) Arch.
Biochem.Biophys. 162: 331.
160. Manganiello, V.; Vaughan, M. (1972) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 69:
269.
161. Schwartz, J.P.; Passonneau, J.V. (1974) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.
71: 3844.
162. Cheung, W.Y. (1970) Biochem.Biophys.Res.Comm. 38: 533.
163. Kakiuchi, S.; Yamazaki, R. (1970) Biochem.Biophys.Res.Comm. 41:
1104.
164. Cheung, W.Y. (1980) Science 207: 19.
165. Lin, Y.M.; Liu, Y.P.; Cheung, W.Y. (1974) J.Biol.Chem. 249: 4943.
166. Liu, Y.P.; Cheung, W.Y. (1976) J.Biol.Chem. 251: 4193.
167. Dedman, J.R.; Potter, J.D.; Means, A.R. (1977) J.Biol.Chem. 252:
2437.

168. Potter, J.D.; Dedman, J.R.; Means, A.R. (1977) J.Biol.Chem. 252: 5609.
169. Wang, J.H.; Desai, R. (1977) J.Biol.Chem. 252: 4175.
170. Klee, C.B.; Crouch, T.H.; Krinks, M.H. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 76: 6270.
171. Gnegy, M.E.; Nathanson, J.A.; Uzunov, P. (1977) Biochim.Biophys.Acta 497: 75.
172. Brooks, R.R.; Huang, P.C. (1972) Biochem.Genet. 6: 41.
173. Dutta, S.K. (1973) Biochim.Biophys.Acta 324: 482.
174. Noll, M. (1976) Cell 8: 349.
175. Goff, C.G. (1976) J.Biol.Chem. 251: 4131.
176. Hsiang, M.W.; Cole, R.D. (1973) J.Biol.Chem. 248: 2007.
177. Metzzenberg, R.L. (1979) Microbiol.Rev. 43: 361.
178. Schmit, J.C.; Brody, S. (1976) Bacteriol.Rev. 40: 1.
179. Turian, G.; Bianchi, D.E. (1971) Arch.Mikrobiol. 77: 262.
180. Nelson, R.E.; Selintrenikoff, C.P.; Siegel, R.W. (1975) Cell Differ. 7: 291.
181. Grigg, G.W. (1960) J.Gen.Microbiol. 22: 662.
182. Seale, T. (1973) J.Bacteriol. 113: 1015.
183. Mirkes, P.E. (1974) J.Bacteriol. 117: 196.
184. Luck, D.J.L. (1963) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 49: 233.
185. Takahara, H.; Matsuda, K. (1977) J.Biochem. 81: 1587.
186. Fontana, J.D.; Krisman, C.R. (1978) Biochim.Biophys.Acta 540: 183.
187. Cuppoletti, J.; Segel, I.H. (1979) J.Bacteriol. 139: 411.
188. Téllez-Iñón, M.T., Terenzi, H.F.; Torres, H.N. (1969) Biochim.Biophys.Acta 191: 765.
189. Téllez-Iñón, M.T.; Torres, H.N. (1970) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 66: 459.
190. Téllez-Iñón, M.T.; Torres, H.N. (1973) Biochim.Biophys.Acta 297: 399.
191. Flawiá, M.M.; Torres, H.N. (1972) J.Biol.Chem. 247: 6873.

192. Flawiá,M.M.; Téllez-Iñón,M.T.; Torres,H.N. (1972) Biochemistry of the glycosidic linkage, p.541; Piras,R.; Pontis,H.G., Academic Press, New York.
193. Flawiá,M.M.; Torres,H.N. (1972) Biochim.Biophys.Acta 289: 428.
194. Flawiá,M.M.; Kornblihtt,A.R.; Torres,H.N. (1981) En preparación.
195. Scott,W.A.; Solomon,B. (1973) Biochem.Biophys.Res.Commun. 53: 1024.
196. Gold,M.H.; Segel,I.H. (1974) J.Biol.Chem. 249: 2417.
197. Powers,P.A.; Pall,M.L. (1980) Biochem.Biophys.Res.Commun. 95:701.
198. Judewicz,N.D.; Torres,H.N. (1979) FEBS Lett. 107: 160.
199. Perkins,D.D. (1959) Genetics 44: 1185.
200. Garnjobst,L.; Tatum,E.L. (1970) Genetics 66: 281.
201. Terenzi,H.F.; Flawiá,M.M.; Torres,H.N. (1974) Biochem.Biophys. Res.Commun. 58: 990.
202. Flawiá,M.M.; Terenzi,H.F.; Torres,H.N. (1977) Arch.Biochem. Biophys. 180: 334.
203. Torres,H.N.; Flawiá,M.M.; Terenzi,H.F.; Téllez-Iñón,M.T. (1975) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 5: 67.
204. Terenzi,H.F.; Flawiá,M.M.; Téllez-Iñón,M.T.; Torres,H.N. (1976) J.Bacteriol. 126: 91.
205. Rosenberg,G.; Pall,M.L. (1978) Arch.Microbiol. 118: 87.
206. Rosenberg,G.; Pall,M.L. (1979) J.Bacteriol. 137: 1140.
207. Pall,M.L. (1977) J.Biol.Chem. 252: 7146.
208. Trevillyan,J.M.; Pall,M.L. (1979) J.Bacteriol. 138: 397.
209. Scott,W.A.; Solomon,B. (1975) J.Bacteriol. 122: 454.
210. Scott,W.A. (1976) Ann.Rev.Microbiol. 30: 85.
211. Feldman,J.F. (1975) Science 190: 789.
212. Lovett,J.S. (1975) Bacteriol.Rev. 39: 345.
213. Silverman,P.M.; Epstein,P.M. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 72: 442.
214. Silverman,P.M. (1976) Biochem.Biophys.Res.Commun. 70: 381.

215. Vale, V.L.; Gomes, S.L.; Maia, J.C.C.; Menucci, L. (1976) FEBS Lett. 67: 189.
216. Gomes, S.L.; Menucci, L.; Maia, J.C.C. (1980) Cell Differ. 9: 169.
217. Gomes, S.L.; Menucci, L.; Maia, J.C.C. (1978) Biochim.Biophys.Acta 541: 190.
218. Gomes, S.L.; Maia, J.C.C. (1979) Biochim.Biophys.Acta 567: 257.
219. Maia, J.C.C.; Camargo, E.P. (1974) Cell Differ. 3: 147.
220. Vale, M.R.; Gomes, S.L.; Maia, J.C.C. (1975) FEBS Lett. 56: 332.
221. Vale, M.R.; Maia, J.C.C. (1976) FEBS Lett. 70: 205.
222. Juliani, M.H.; Maia, J.C.C. (1979) Biochim.Biophys.Acta 567: 347.
223. Juliani, M.H.; Brochetto, M.R.; Maia, J.C.C. (1979) Cell Differ. 8: 421.
224. Silverman, P.M. (1978) J.Bacteriol. 135: 976.
225. Sypherd, P.S.; Borgia, P.T.; Paznokas, J.L. (1978) Adv.Microbiol. Physiol. 18: 68.
226. Larsen, A.D.; Sypherd, P.S. (1974) J.Bacteriol. 117: 432.
227. Paveto, C.; Epstein, A.; Passeron, S. (1975) Arch.Biochem.Biophys. 169: 449.
228. Orłowski, M.; Sypherd, P.S. (1976) J.Bacteriol. 125: 1226.
229. Paznokas, J.L.; Sypherd, P.S. (1975) J.Bacteriol. 124: 134.
230. Cantore, M.L.; Galvagno, M.A.; Passeron, S. (1980) Arch.Biochem. Biophys. 199: 312.
231. Galvagno, M.A.; Moreno, S.; Cantore, M.L.; Passeron, S. (1979) Biochem.Biophys.Res.Commun. 89: 779.
232. Moreno, S.; Paveto, C.; Passeron, S. (1977) Arch.Biochem.Biophys. 180: 225.
233. Moreno, S.; Passeron, S. (1980) Arch.Biochem.Biophys. 199: 321.
234. Webster, J. (1980) *Introduction to Fungi*, Cambridge University Press, London.
235. Van Wijk, R.; Konijn, T.M. (1971) FEBS Lett. 13: 184.
236. Mahler, H.R.; Lin, C.C. (1978) Biochem.Biophys.Res.Commun. 83: 1039.

237. Sy, J.; Richter, D. (1972) Biochemistry 11: 2788.
238. Varimo, K.; Londesborough, J. (1976) Biochem. J. 159: 363.
239. Speziale, G.A.G.; Van Wijk, R. (1971) Biochim. Biophys. Acta 235: 466.
240. Fujimoto, M.; Ichikawa, A.; Tomita, K. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 161: 54.
241. Sy, J.; Richter, D. (1972) Biochemistry 11: 2784.
242. Takai, Y.; Yamamura, H.; Nishizuka, Y. (1974) J. Biol. Chem. 249: 530.
243. Lerch, K.; Muir, L.W.; Fischer, E.H. (1975) Biochemistry 14: 2015.
244. Bell, G.I.; Valenzuela, P.; Rutter, W.J. (1976) Nature 261: 429.
245. Bell, G.I.; Valenzuela, P.; Rutter, W.J. (1977) J. Biol. Chem. 252: 3082.
246. Uno, I.; Ishikawa, T. (1973) J. Bacteriol. 113: 1240.
247. Uno, I.; Yamaguchi, M.; Ishikawa, T. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 479.
248. Uno, I.; Ishikawa, T. (1973) J. Bacteriol. 113: 1249.
249. Uno, I.; Ishikawa, T. (1974) Biochim. Biophys. Acta 334: 354.
250. Cohen, R.J. (1974) Nature 251: 144.
251. Wold, W.S.M.; Susuki, I. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55: 824.
252. Schwalb, M.N. (1978) FEMS Microbiol. Lett. 3: 107.
253. Handa, A.K.; Johri, M.M. (1976) Nature 259: 480.
254. Amrhein, N.; Filner, P. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 1099.
255. Keirns, J.J.; Carrit, B.; Freeman, J.; Eisenstadt, J.M.; Bitensky, M. W. (1973) Life Sci. 13: 287.
256. Bonner, J.T. (1971) Ann. Rev. Microbiol. 25: 75.
257. Konijn, T.N.; Van de Meene, J.G.C.; Bonner, J.T.; Barkley, D.S. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 58: 1152.
258. Bonner, J.T.; Barkley, D.S.; Hall, E.M.; Konijn, T.M.; Mason, J.W.; O'Keefe, G.; Wolfe, P.B. (1969) Dev. Biol. 20: 72.
259. Klein, C. (1977) FEMS Microbiol. Lett. 1: 17.
260. Klein, C.; Darmon, M. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 67: 440.

261. Malchow,D.; Gericsh,G. (1974) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 71: 2423.
262. Gerisch,G.; Wick,U. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun. 65: 364.
263. Klein,C. (1975) J.Biol.Chem. 250: 7134.
264. Town,C.D.; Gross,J.D.; Kay,R.R. (1976) Nature 262: 717.
265. Klein,C.; Juliani,M.H. (1977) Cell 10: 329.
266. Chang,Y.Y. (1968) Science 161: 57.
267. Gerisch,G.; Malchow,D.; Riedel,V.; Muller,E.; Every,M. (1972) Nature New Biol. 235: 90.
268. Rossomando,E.F.; Sussman,M. (1973) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 70: 1254.
269. Rossomando,E.F.; Hesla,M.A. (1976) J.Biol.Chem. 251: 6568.
270. Pahlic,M.; Rutherford,C.L. (1979) J.Biol.Chem. 254: 9703.
271. Klein,C.; Darmon,M. (1979) FEMS Microbiol. Lett. 5: 1.
272. Riedel,V.; Malchow,D.; Gerisch,G.; Nägel,F. (1972) Biochem.Biophys.Res.Commun. 46: 279.
273. Pannbacker,R.G.; Bravard,L.J. (1972) Science 175: 1014.
274. Chassy,B.M. (1972) Science 175: 1016.
275. Dicou,E.L.; Brachet,Ph. (1979) Biochim.Biophys.Acta 578: 232.
276. Dicou,E.L.; Brachet,Ph. (1979) Biochem.Biophys.Res.Commun. 90: 1321.
277. Kessin,R.H.; Orlow,S.J.; Shapiro,R.I.; Franke,J. (1979) Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A. 76: 5450.
278. Mato,J.M.; Konijn,T.M. (1975) Biochim.Biophys.Acta 385: 173.
279. Cooper,S.; Chambers,D.A.; Scanlon,S. (1980) Biochim.Biophys.Acta 629: 235.
280. Sampson,J. (1977) Cell 11: 173.
281. Rhamsdorf,H.J.; Pai,S.H. (1979) Biochim.Biophys.Acta 567: 339.
282. Lovely,J.R.; Threlfall,G. (1976) Biochem.Biophys.Res.Commun. 71: 789.
283. Kuehn,G.D. (1972) Biochem.Biophys.Res.Commun. 49: 414.
284. Murray,A.W., Spizman,M.; Atkinson,D.E. (1971) Science 171: 496.

285. Kuehn, G.D. (1971) J.Biol.Chem. 246: 6366.
286. Vogel, H.J. (1956) Microbiol.Genet.Bull. 13: 4243.
287. Martin, R.G.; Ames, B.N. (1961) J.Biol.Chem. 236: 1372.
288. Laurent, T.C.; Killander, J. (1964) J.Chromatogr. 14: 317.
289. Tanford, C. (1961) Physical Chemistry of Macromolecules, p. 364, John Wiley & Sons, Inc., New York.
290. Haga, T.; Haga, K.; Gilman, A.G. (1977) J.Biol.Chem. 252: 5776.
291. Glynn, I.M.; Chappell, J.B. (1964) Biochem.J. 90: 147.
292. Wastila, W.B.; Stull, J.T.; Mayer, S.E.; Walsh, D.A. (1971) J.Biol.Chem. 246: 1996.
293. Kuo, J.F.; Wyatt, G.R.; Greengard, P. (1971) J.Biol.Chem. 246: 7159.
294. Bray, C. (1960) Anal.Biochem. 1: 279.
295. Gilman, A.G. (1970) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 67: 305.
296. Londesborough, J. (1976) Anal.Biochem. 71: 623.
297. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193: 265.
298. Worthington Biochemical Corporation (1972) Worthington Enzyme Manual, Freehold, New Jersey.
299. Terenzi, H.F.; Roselino, E.; Passeron, S. (1971) Eur.J.Biochem. 18: 342.
300. Scatchard, G. (1949) Ann.N.Y.Acad.Sci. 51: 660.
301. Harrington, W.F.; Kegeles, G. (1973) Methods in Enzymology, vol. XXVII, Parte D, p.306, Hirs, C.H.W.; Timasheff, S.N., Academic Press, New York.
302. Enzyme Nomenclature 1978 (1979) Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, I.U.B. Academic Press, New York.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A _{0,5}	Concentración que produce 50% de activación
ADP	Adenosina 5'-difosfato
3'-AMP	Adenosina 3'-monofosfato
5'-AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMP cíclico	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
Arg	Arginina
Asp	Asparagina
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BHK	Células de riñón de hamster prepúber
cAMP	Ver AMP cíclico
cGMP	Ver GMP cíclico
cNMP	Nucleósido 3',5'-monofosfato cíclico
cpm	Cuentas por minuto
DEAE	Dietilaminoetil
DNA	Acido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetracético (N,N'-1,2-Etanodiil N-(carboximetil)glicina)
EGTA	Acido etilenglicol-bis-(β aminoetileter)-N,N'tetracético
Gli	Glicina
Glu	Acido glutámico
5'GMP	Guanosina 5'-monofosfato
GMP cíclico	Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
Ileu	Isoleucina
K _d	Constante de disociación
K _s	Constante de Michaelis-Menten para el sustrato s
Leu	Leucina
Lis	Lisina
Me ²⁺	Ión metálico divalente
MIX	Metilisobutixantina
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NDP	Nucleósido 5'-difosfato
NMP	Nucleósido 5'-monofosfato
NTP	Nucleósido 5'-trifosfato
P	Ortofosfato (unido a aminoácido o azúcar)
P _i	Ortofosfato (libre)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP _i	Pirofosfato
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
Ser	Serina
SN105	Sobrenadante de 105 000 x g
TRIS	2-amino-2(hidroximetil)-1,3 propanodiol
Val	Valina

NOMENCLATURA DE LAS ENZIMAS (302)

NOMBRE	NUMERO E.C.	NOMENCLATURA SISTEMATICA
Adenilato ciclasa	4.6.1.1.	ATP pyrophosphate-lyase (cyclizing)
Catalasa	1.11.1.6.	Hydrogen peroxide:hydrogen peroxide oxidoreductase
Fosfodiesterasa de GMP cíclico	3.1.4.35.	3':5'-Cyclic-GMP 5'nucleotidehydrolase
Fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos.	3.1.4.17.	3':5'-Cyclic-nucleotide 5'nucleotide-hydrolase
Fosfoglicerato quinasa	2.7.2.3.	ATP: 3-phospho-D-glycerate 1-phospho-transferase
Fosforilasa	2.4.1.1.	1,4- α -D-Glucan: orthophosphate- α -D-glucosyltransferase
Fosfatasa de fosfo-proteínas	3.1.3.16.	Phosphoprotein phosphohydrolase
Fosfatasa de fosforilasa	3.1.3.17.	Phosphorylase <u>a</u> phosphohydrolase
β -D-galactosidasa	3.2.1.23.	β -D-galactoside galactohydrolase
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	1.2.1.12.	D-glyceraldehyde-3-phosphate: NAD ⁺ oxidoreductase (phosphorilating)
Guanilato ciclasa	4.6.1.2.	GTP pyrophosphate-lyase (cyclizing)
Lactato deshidrogenasa	1.1.1.27.	L-lactate: NAD ⁺ oxidoreductase
Malato deshidrogenasa	1.1.1.38.	L-malate: NAD ⁺ oxidoreductase (oxalacetate-decarboxilating)
Quinasa de la fosforilasa	2.7.1.38.	ATP: Phosphorylase <u>b</u> phosphotransferase
Quinasa de proteínas	2.7.1.37.	ATP: protein phosphotransferase
RNA polimerasa	2.7.7.6.	Nucleoside triphosphate: RNA nucleotidiltransferase
Sintetasa de glucógeno	2.4.1.11.	UDP: glucose: glycogen 4- α -D-glucosyltransferase