

## Tesis de Posgrado

# Caracterización de la fosfodiesterasa de AMP cíclico del hongo dimórfico *Mucor rouxii* : Regulación de la actividad enzimática por fosforilación-desfosforilación

Galvagno, Miguel Angel

1981

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Galvagno, Miguel Angel. (1981). Caracterización de la fosfodiesterasa de AMP cíclico del hongo dimórfico *Mucor rouxii* : Regulación de la actividad enzimática por fosforilación-desfosforilación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1676\\_Galvagno.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1676_Galvagno.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Galvagno, Miguel Angel. "Caracterización de la fosfodiesterasa de AMP cíclico del hongo dimórfico *Mucor rouxii* : Regulación de la actividad enzimática por fosforilación-desfosforilación". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1981. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1676\\_Galvagno.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1676_Galvagno.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARACTERIZACION DE LA FOSFODIESTERASA DE AMP CICLICO DEL HONGO  
DIMORFICO MUCOR ROUXII  
REGULACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA POR  
FOSFORILACION-DESFOSFORILACION

Autor: Lic. Miguel Angel Galvagno  
Director: Prof. Dra. María Susana Di Bernardo de Passeron  
Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (U.B.A.)

Tesis presentada para optar por el título de:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

-1981-

1676  
E-2

A mis padres

A mi hermano

## AGRADECIMIENTOS

- A Susana Passeron quien me inició en el estudio de un nuevo aspecto de la investigación en biología y me enseñó, con su ejemplo cotidiano, que el trabajo científico es importante en la medida en que se encare con amor, seriedad y sin claudicaciones.
- Al Dr. Jorge Wright por ser mi maestro de micología, por haberme alentado generosamente en todo momento durante la realización de esta tesis y por haber depositado su confianza en mí.
- A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular por haber compartido conmigo estos años de labor y aprendizaje y especialmente a Silvia y a María Leonor quienes estuvieron siempre dispuestas a darme con cariño parte de su tiempo para escuchar y solucionar mis incontables "dudas bioquímicas".
- A María Esther Ranalli por haberme iniciado en la investigación científica.
- Al personal técnico del laboratorio que colaboró eficazmente con mi tarea y en particular a la Sra. Alicia de Alcaraz por su bondad y su responsabilidad en el trabajo.
- Al Departamento de Química Biológica y al P.R.H.O.M. por las posibilidades que me brindaron para poder realizar este trabajo.

- A los miembros del Instituto Campomar, especialmente al Dr. Carlos Cardini y al grupo del Dr. Torres por la colaboración desinteresada prestada en todo momento.
- Al Departamento de Biología, a mis profesores, al personal técnico y de maestranza, al personal de Secretaría y a mis compañeros por quienes guardo un profundo cariño y a los que conocí y me conocieron a lo largo de tantos años de compartir todas mis cosas, tanto las buenas como las malas.
- A mis alumnos de quienes aprendí mucho más de lo que ellos aprendieron de mí.
- A la Sra. Mary Ibáñez por la dedicación puesta en el mecanografiado de esta tesis. A la Sra. Nora Telesca por la ayuda brindada en todo momento.
- Finalmente a la Facultad de Ciencias Exactas donde pasé casi la mitad de mi vida.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

ABF	azul de bromo fenol
5'AMP	5'fosfato de adenosina
AMPc	AMP cíclico
AMP cíclico	3':5'-fosfato de adenosina
Ac-PDE	fosfodiesterasa de AMPc
Ac-QP	quinasa de proteína dependiente de AMPc
ARN	ácido ribonucleico
ATP	5'-trifosfato de adenosina
BSA	seroalbúmina bovina
Bt <sub>2</sub> AMPc	dibutiril AMPc
CoA	coenzima A
cpm	cuentas por minuto
CTP	5'-trifosfato de citidina
DEAE	dietilaminoetil
dibutiril AMPc	3':5'-fosfato.N <sup>6</sup> ,O <sup>2'</sup> -dibutiriladenosina
dimetil POPOP	(1,4-bis [2(4-metil-5-fenil oxazolil)] benceno)
D.O.	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicol-bis-(β -aminoetileter)- N,N' tetraacético
GMPc	GMP cíclico
GMP cíclico	3':5' - fosfato de guanosina

Gc-PDE	fosfodiesterasa de GMPc
GTP	5'-trifosfato de guanosina
5' IMP	5'-fosfato de inosina
IMPc	IMP cíclico
IMP cíclico	3':5'-fosfato de inosina
ITP	5'-trifosfato de inosina
K	kilodalton
$K_m$	constante de Michaelis de la enzima para el sustrato
min	minuto
mmol	milimol
Me <sup>2+</sup>	catión divalente
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
NDP	nucleósido difosfato
NMP	nucleósido monofosfato
NMPc	nucleósido monofosfato cíclico
NTP	nucleósido trifosfato
PDE	fosfodiesterasa
PEA	alcohol fenetílico
Pipes	Piperazina-N,N'-bis [2-ácido etanosulfónico]
pmol	picomol
PPi	pirofosfato
PPO	(2,5-difeniloxazol)
rpm	revoluciones por minuto

Temed	N,N,N',N' tetrametiletilendiamina
Tris	2-amino-2(hidroximetil)-1,3 propanodiol
TTP	5'-trifosfato de timidina
UTP	5'-trifosfato de uridina
V	velocidad máxima de hidrólisis del sustrato por la enzima



## INTRODUCCION

I. <u>DIMORFISMO EN HONGOS</u>	1
II. <u>DIMORFISMO EN MUCOR</u>	2
II.1. Dimorfismo a nivel celular	5
II.2. Dimorfismo y pared celular	8
II.3. Factores ambientales y metabolismo celular	10
II.4. Influencia de los hidratos de carbono	11
II.5. Acción de inhibidores	12
II.6. Cambios respiratorios durante la diferenciación levadura-micelio	13
II.7. Dimorfismo y síntesis de proteínas	16
II.8. Dimorfismo y poliaminas	17
II.9. Dimorfismo y AMPc	17
III. <u>PAPEL BIOLÓGICO DEL AMPc EN OTROS EUKARIOTES</u>	
<u>INFERIORES</u>	19
III.1. Mucorales	19
III.2. <u>Blastocladiella emersonii</u>	21
III.3. <u>Neurospora crassa</u>	22
III.4. <u>Dictyostelium discoideum</u>	23
III.5. Otros hongos	25
III.6. Algas, musgos y protozoarios	26
IV. <u>AMPc EN EUKARIOTES SUPERIORES</u>	26
V. <u>MECANISMO DE ACCIÓN DEL AMPc EN EUKARIOTES</u>	
<u>SUPERIORES</u>	27

VI. <u>FOSFORILACION-DESFOFORILACION DE PROTEINAS</u>	30
VI.1. Modificaciones covalentes de proteínas	30
VI.2. Fosforilación y desfosforilación de enzimas	31
VI.3. Quinasas de proteínas	33
VI.4. Clasificación de las quinasas de proteínas	35
VI.5. Quinasas de proteínas dependientes de AMPc	36
VI.6. Quinasas de proteínas dependientes de AMPc en eucariontes inferiores	40
VI.7. Quinasa de proteína dependiente de AMPc en <u>Mucor rouxii</u>	42
VI.8. Fosfatasa de fosfoproteínas	42
VI.9. Fosfatasa de fosfoproteínas en <u>Mucor rouxii</u>	44
VII. <u>METABOLISMO DEL AMPc</u>	44
VIII. <u>ADENILATO CICLASA</u>	45
VIII.1. Adenilato ciclasa en eucariontes inferiores	46
VIII.2. Adenilato ciclasa en <u>Mucor rouxii</u>	48
IX. <u>FOSFODIESTERASA</u>	49
IX.1. Formas múltiples	51
IX.2. Activadores de la actividad de fosfodiesterasa	59
IX.3. Efecto de hormonas	67
IX.4. Inhibidores de la actividad de fosfodiesterasa	70
IX.5. Fosfodiesterasa en eucariontes inferiores	76
X. <u>OBJETIVOS</u>	80

## MATERIALES Y METODOS

I. <u>PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO</u>	82
I.1. Organismo	82
I.2. Obtención y cosecha de esporas	82
I.3. Medio de cultivo	83
I.4. Obtención de micelio	84
I.5. Obtención de las distintas formas celulares producidas durante la morfogénesis aeróbica	84
II. <u>MEDICION DEL CRECIMIENTO</u>	86
III. <u>DETERMINACION DE LOS NIVELES INTRA Y EXTRACELULARES       <u>DE AMPc</u></u>	86
III.1. Procesamiento de las muestras para el ensayo de AMPc	86
III.2. Valoración del AMPc de las muestras	88
IV. <u>PREPARACION DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS</u>	88
IV.1. Preparación de extractos de los distintos estadios de la morfogénesis aeróbica	88
IV.2. Obtención de las fracciones subcelulares de micelio	89
IV.3. Preparación de los extractos para la purificación, caracterización y regulación de la fosfodiesterasa de AMPc	90
V. <u>DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS</u>	91
V.1. Ensayo de la actividad de la fosfodiesterasa de AMPc	91

V.2. Ensayo de la actividad de la fosfodiesterasa de AMPc en geles de poliacrilamida	95
V.3. Ensayo de la actividad de la fosfodiesterasa de GMPc	95
V.4. Ensayo de la activación de la fosfodiesterasa de AMPc por ATP.Mg y AMPc.	95
V.4.1. Ensayo directo de la activación enzimática	96
V.4.2. Ensayo de la activación enzimática por preincubación	96
V.5. Otros ensayos enzimáticos	97
V.5.1. Quinasa de proteína dependiente de AMPc	97
V.5.2. Glucosa oxidasa	99
V.5.3. Peroxidasa	99
V.5.4. Fosfatasa alcalina	100
VI. <u>TECNICAS CROMATOGRAFICAS</u>	100
VI.1. Cromatografía en DEAE-celulosa	100
VI.2. Cromatografía en papel	101
VI.3. Cromatografía de afinidad	101
VI.4. Filtración en gel de Sephadex G-200	102
VII. <u>GRADIENTES DE SACAROSA</u>	103
VIII. <u>CALCULO DE ALGUNOS PARAMETROS HIDRODINAMICOS Y MOLECULARES DE LA FOSFODIESTERASA DE AMPc</u>	104
VIII.1. Coeficiente de sedimentación y coeficiente de difusión	104

VIII.2. Radio de Stokes	105
VIII.3. Peso molecular	105
VIII.4. Coeficiente friccional	106
VIII.5. Parámetros hidrodinámicos y moleculares de las proteínas marcadoras	106
IX. <u>ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA</u>	107
X. <u>OTRAS TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS ANALITICOS</u>	109
X.1. Identificación de los productos de la reacción de la fosfodiesterasa de AMPc	109
X.2. Determinación de los volúmenes celulares	109
X.3. Valoración de otros marcadores de peso molecular	110
X.4. Valoración de proteínas	110
X.5. Purificación del AMPc [ $^3\text{H}$ ]	111
X.6. Síntesis de ATP [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]	111
X.7. Contaje de radioactividad	112
XI. REACTIVOS UTILIZADOS	113
<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	
I. <u>VALIDEZ DEL ENSAYO DE FOSFODIESTERASA</u>	116
II. <u>ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA DE AMPc Y VARIACIONES DE LOS NIVELES DE AMPc DURANTE LA MORFOGENESIS AEROBICA</u>	118
III. <u>CONCENTRACION CELULAR DE AMPc</u>	125
IV. <u>DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA FOSFODIESTERASA DE AMPc EN EXTRACTOS DE LA FORMA FILAMENTOSA</u>	127

V. <u>ACTIVIDADES DE FOSFODIESTERASA DE AMP<sub>c</sub> Y DE GMP<sub>c</sub> EN</u> <u>EXTRACTOS SOLUBLES DE MICELIO</u>	130
V.1. Perfil de elución de las actividades de fosfo- diesterasa de AMP <sub>c</sub> y de GMP <sub>c</sub> en columna de DEAE-celulosa	132
V.2. Efecto del GMP <sub>c</sub> sobre la actividad de fosfodies- terasa de AMP <sub>c</sub>	134
VI. <u>PURIFICACION PARCIAL DE LA ACTIVIDAD DE FOSFODIES- TERASA DE AMP<sub>c</sub> SOLUBLE</u>	137
VII. <u>ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE LA FOSFODIESTERASA DE AMP<sub>c</sub></u>	145
VIII. <u>PARAMETROS CINETICOS DE LA FOSFODIESTERASA DE AMP<sub>c</sub></u>	148
IX. <u>REQUERIMIENTO DE CATIONES DIVALENTES PARA LA ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA DE AMP<sub>c</sub></u>	151
X. <u>EFFECTO DE ALGUNOS INHIBIDORES Y ACTIVADORES CLASICOS DE LA FOSFODIESTERASA DE AMP<sub>c</sub> SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA DE MUCOR ROUXII</u>	155
XI. <u>EFFECTO DE CALMODULINA SOBRE LA FOSFODIESTERASA DE AMP<sub>c</sub> DE MUCOR ROUXII</u>	158
XII. <u>ALGUNOS PARAMETROS HIDRODINAMICOS Y MOLECULARES DE LA FOSFODIESTERASA DE AMP<sub>c</sub></u>	160
XII.1. Coeficiente de sedimentación y coeficiente de difusión	160
XII.2. Radio de Stokes	162

XII.3. Cálculo del peso molecular y del coeficiente friccional	164
XIII. <u>REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA DE AMPc DE MUCOR ROUXII POR FOSFORILACION-DESFOSFORILACION</u>	167
XIII.1. Activación por ATP de la Ac-PDE de una fracción enzimática poco purificada	167
XIII.2. Conservación de la activación por ATP	167
XIII.3. Dependencia con el tiempo de la activación de la Ac-PDE por ATP.Mg y AMPc	170
XIII.4. Efecto de la concentración de ATP sobre la activación de la Ac-PDE	172
XIII.5. Requerimientos para la activación de la Ac-PDE	175
XIII.6. Dependencia de la activación de la Ac-PDE con la quinasa de proteína dependiente de AMPc	177
XIII.7. Parámetros cinéticos de la Ac-PDE activada	179
XIII.8. Reversibilidad del proceso de activación de la Ac-PDE	181
XIV. <u>ACTIVACION DE LA FOSFODIESTERASA DE AMPc POR ENZIMAS PROTEOLITICAS</u>	184
XIV.1. Relación entre la activación de la fosfodiesterasa de AMPc por fosforilación y por proteólisis	186
XIV.2. Perfil de sedimentación en gradiente de sacarosa de la fosfodiesterasa de AMPc activada por fosforilación o por tripsinización	188

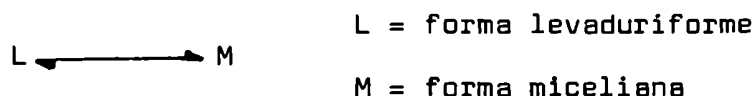
XV. <u>ACTIVACION DE LA FOSFODIESTERASA DE AMP<sub>c</sub> LUEGO DE</u> <u>CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE AFINIDAD</u>	191
<u>CONCLUSIONES</u>	193
<u>NOMENCLATURA DE LAS ENZIMAS</u>	199
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	200



INTRODUCCION

## I. DIMORFISMO EN HONGOS

Existe un cierto número de hongos que presentan una dualidad fenotípica en la forma de sus células. Dependiendo de las condiciones ambientales, pueden crecer bajo la forma de un micelio compuesto de filamentos largos y ramificados, septados o aseptados, o bajo la forma de células levaduriformes, ovoides o esféricas que se reproducen por gemación. El término dimorfismo ha sido frecuentemente utilizado para referirse a un grupo de hongos que causan infecciones sistémicas en el hombre y animales, y ha sido definido por Ainsworth (1) como "la condición en la cual se produce una fase parásita levaduriforme y una fase miceliana saprofitica". Actualmente el término se utiliza en un sentido más amplio y comprende a hongos patógenos y no patógenos sin hacer distinción particular entre las formas de vida saprobitas o parásitas. El dimorfismo, en su sentido más amplio, se define entonces como una interconversión reversible de formas levaduriformes y micelianas controladas por el medio ambiente y puede simplificarse por la notación:



Diferentes factores ambientales controlan el dimorfismo en estos hongos. Así en el caso de Blastomyces dermatitidis y

curiformes, la temperatura es el único factor determinante de la morfología in vitro (2,3), por lo tanto la notación anterior puede

de escribirse:



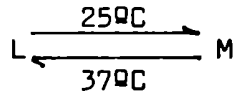
Por otra parte existe un grupo de hongos en los cuales incubación a 37° C no es condición suficiente para mantener forma levaduriforme o producirla a partir de la filame en el caso de Sporotrichum schenkii e Histoplasma farc es necesario, además, que el organismo crezca en atmósfera de  $CO_2$  (5 y 10-20% respectivamente) (4,5). Mientras que en el caso de Histoplasma capsulatum la incubación a temperatura ambiente (37° C) debe estar acompañada por la presencia de aminoácidos con grupos sulfhidrilo (v.g. cisteína) y agentes quelantes en el medio de cultivo (v.g. citrato); además el inóculo empleado debe ser superior a  $5 \cdot 10^5$  células/ml (6-9).

En el caso de Candida albicans el dimorfismo depende solamente de las condiciones nutricionales (10).

## II. DIMORFISMO EN MUCOR

Desde hace más de un siglo este género de hongos (clase: Zygomycetes, orden: Mucorales) ha atraído la atención de los

Paracoccidioides brasiliensis, cuyas formas patógenas son levaduriformes, la temperatura es el único factor determinante de la morfología in vitro (2,3), por lo tanto la notación anterior puede escribirse:



Por otra parte existe un grupo de hongos en los cuales la incubación a 37° C no es condición suficiente para mantener la forma levaduriforme o producirla a partir de la filamentosa. Así en el caso de Sporotrichum schenkii e Histoplasma farciminosum es necesario, además, que el organismo crezca en atmósfera de CO<sub>2</sub> (5 y 10-20% respectivamente) (4,5). Mientras que en el caso de Histoplasma capsulatum la incubación a temperaturas elevadas (37° C) debe estar acompañada por la presencia de aminoácidos con grupos sulfhidrilo (v.g. cisteína) y agentes quelantes en el medio de cultivo (v.g. citrato); además el inóculo empleado debe ser superior a 5.10<sup>5</sup> células/ml (6-9).

En el caso de Candida albicans el dimorfismo depende solamente de las condiciones nutricionales (10).

## II. DIMORFISMO EN MUCOR

Desde hace más de un siglo este género de hongos (clase: Zygomycetes, orden: Mucorales) ha atraído la atención de los

investigadores debido a su habilidad de crecer bajo dos formas según el medio en que se hallen. En presencia de aire, y en medio sólido o líquido, desarrollan un micelio cenocítico típico. El micelio produce frecuentemente estructuras de reproducción vegetativa llamadas clamidosporas. En el extremo de las hifas aéreas, y en ciertas condiciones, se producen esporangios que llevan numerosas esporas asexuales o esporangiosporas. En el género Mucor existen especies homotálicas y heterotálicas, siendo estas últimas mayoría, las que se reproducen sexualmente por copulación gametangial produciendo una cigospora típica. El ciclo de vida aeróbico del hongo se esquematiza en la Figura 1.

En 1857 el botánico alemán Bail (12) observó que en las partes más profundas de cultivos líquidos aeróbicos de M. racemosus, hongo típicamente filamentoso, aparecían células esféricas o hifas cortas muy engrosadas que se reproducían por gemación.

Posteriormente, Pasteur (13) demostró que las células levaduriformes se producían simplemente como una respuesta adaptativa de Mucor a una atmósfera pobre en oxígeno y observó que la fase levaduriforme desaparecía con aereación suficiente.

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

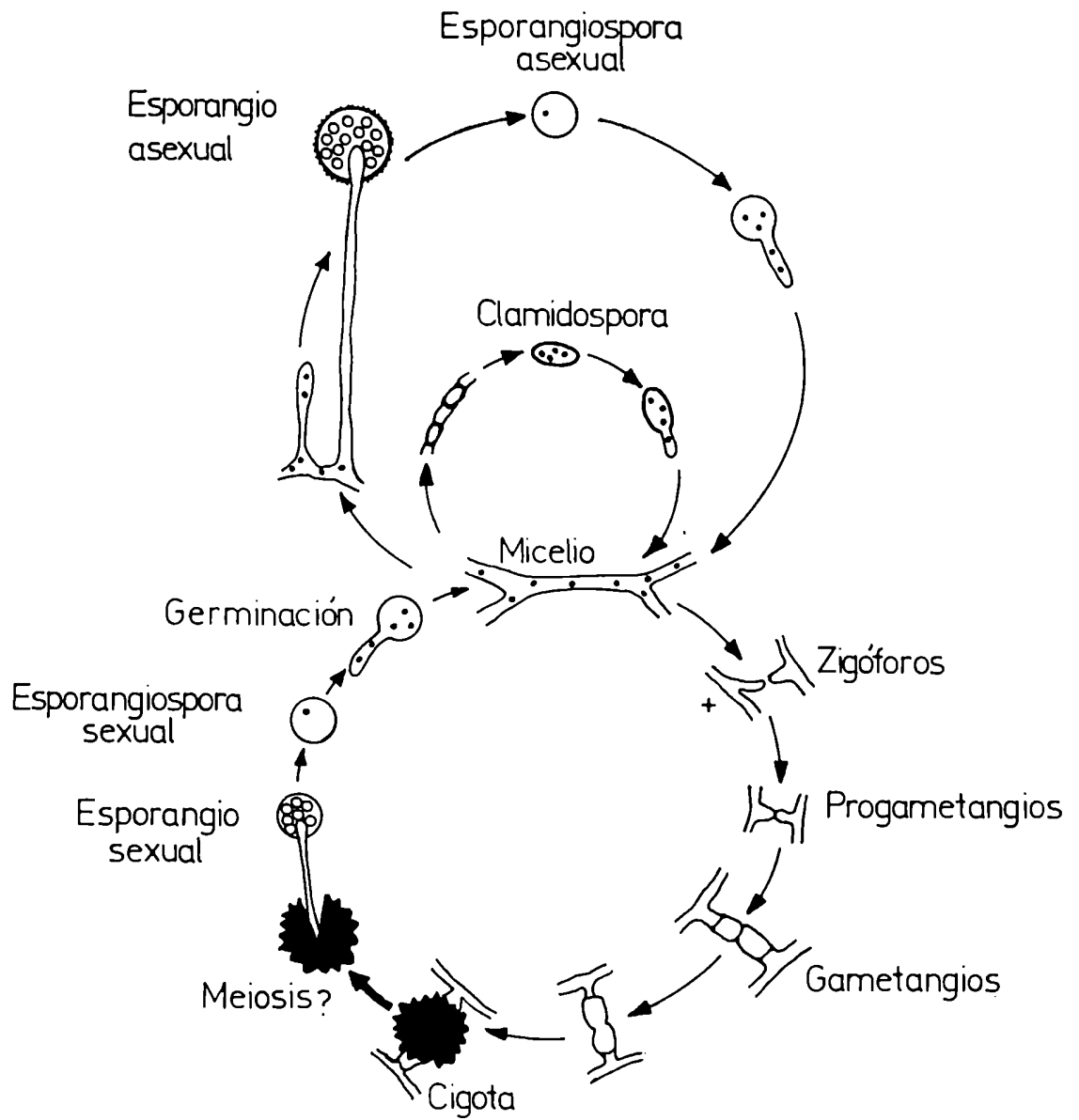


Figura 1: Ciclo de vida de Mucor sp. Tomado de Burnett (11).

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

## II. 1. Dimorfismo a nivel celular

El ciclo de vida asexual de las especies dimórficas de Mucor, puede dividirse en tres estadios (14): a) germinación de la espo rangiospora, b) crecimiento vegetativo y c) esporogénesis. Es en los estadios a y b, donde se observan las transiciones dimórficas.

a) Germinación de la esporangiospora. Las esporangiosporas de Mucor spp. son de forma elipsoidal y su dimensión aproximada es de  $6 \times 5 \mu\text{m}$ . Hay discrepancias en cuanto al número de núcleos por espora, según Robinow (15) el número de núcleos sería superior a uno, en cambio Storck y Morrill (16) observaron en la mayoría de las especies estudiadas un núcleo por espora. La germinación de las esporangiosporas da origen a células vegetativas levaduriformes o a células hifales, dependiendo de las condiciones ambientales durante la germinación.

Independientemente de la morfología final, la germinación de las esporangiosporas puede dividirse en dos fases (17): crecimiento de la espora en una gran célula esférica de aproximadamente  $10-18 \mu\text{m}$  de diámetro y emergencia del tubo germinativo, en el caso de desarrollo hifal; o producción de una yema esférica, en el

caso de desarrollo levaduriforme. La formación de la célula esférica es una fase de crecimiento verdadero, ya que hay un incremento importante de peso seco y de la cantidad de proteína (17). Durante esta fase se sintetiza de novo una pared celular, física y químicamente diferente de la de la espora.

Los eventos posteriores difieren según la morfología final de la célula. En el caso del desarrollo filamentosos se produce un aumento en la polarización de la síntesis de la pared celular que resulta de la ruptura de la pared de la célula esférica y en la emisión de un tubo germinativo (17). Si la célula esférica va a dar origen a una célula levaduriforme, la síntesis de la pared celular no es polarizada y la ruptura de la pared de la célula esférica está seguida por la emergencia de una yema esférica.

b) Crecimiento vegetativo. En aerobiosis, con una variedad de fuentes carbonadas y en medio sólido o líquido, el crecimiento vegetativo de Mucor spp. al igual que el de todos los hongos filamentosos, está caracterizado por un crecimiento apical de la pared celular (18). La longitud, ancho y grado de ramificación de las hifas de este hongo, varía con las condiciones de cultivo.

En anaerobiosis y en presencia de concentraciones altas de azúcares fermentables, el crecimiento vegetativo de Mucor spp. es del tipo levaduriforme y está caracterizado por la presencia



de células esféricas con gemación multipolar y con la síntesis de la pared celular uniformemente distribuida sobre la superficie celular (18).

Como el dimorfismo en este hongo es reversible, pueden lograrse cambios morfológicos en ambas direcciones. Cuando se induce a las células levaduriformes a formar hifas, las yemas se transforman para formar uno o más tubos germinativos por polarización de la síntesis de la pared celular. Cuando las hifas son estimuladas para formar células levaduriformes se originan yemas esféricas de los extremos hifales. En esta última transformación quedan algunos elementos hifales en el cultivo, aún luego de períodos largos.

c) Esporangénesis. En ciertas condiciones el micelio produce esporangióforos cuyo extremo se dilata y comienza a formarse el esporangio hacia el cual fluye una gran cantidad de citoplasma que lleva numerosos núcleos y que se concentra en la periferia de éste, dejando una parte central estéril (columela). El protoplasma de la zona periférica se divide en una gran cantidad de porciones uni o multinucleadas que luego se redondean, se rodean de pared y maduran para dar las esporangiosporas. Las esporas se liberan por ruptura de la pared esporangial.

• II. 2. Dimorfismo y pared celular

La morfología de los hongos depende de manera fundamental de la forma de la pared celular, estructura rígida que está determinada por la disposición espacial y la estructura molecular de sus diversos componentes. Por lo tanto, la dilucidación del mecanismo de síntesis de la pared celular es de importancia fundamental en cualquier estudio del dimorfismo en hongos.

Bartnicki-García (19) estudió la composición química de la pared celular de Mucor rouxii en dos estadios vegetativos, células levaduriformes y micelio. Observó que la composición cuantitativa y cualitativa de la pared celular de las células levaduriformes y de micelio es semejante, siendo los polisacáridos dominantes quitina, quitosano y ácidos poliurónicos; en cambio existen diferencias cuantitativas en el contenido de manosa y proteína. No se conoce bien el significado de estas diferencias en relación al dimorfismo, aunque se han encontrado diferencias en la actividad de manosil transferasa en las formas levaduriformes y filamentosa de esta especie (20).

La quitina forma un esqueleto microfibrilar en la pared celular (21). Bartnicki-García y colaboradores estudiaron los caminos metabólicos, localización y posible regulación de la síntesis de quitina en M. rouxii; encontraron que la actividad de

quitina sintetasa está localizada principalmente en la fracción correspondiente a la pared celular y propusieron un mecanismo de regulación para la enzima que involucra activación e inactivación proteolítica (22). Según dicho mecanismo una proteasa activaría a la enzima presente como zimógeno en la fracción microsomal, esta activación puede ser bloqueada por un inhibidor, termoestable y dializable, presente en la fracción soluble. El inhibidor mantendría a la enzima como zimógeno. La cantidad relativa de la proteasa activadora y del inhibidor difieren en las células hifales y levaduriformes. En las hifas los niveles de proteasa son altos y los del inhibidor bajos, presentándose la situación inversa en las células levaduriformes. El resultado neto sería la producción de una enzima de vida media relativamente corta en las hifas y larga en las células levaduriformes (22). Este hecho tendría implicancia morfogénica ya que en células levaduriformes la inactivación de la enzima sería más lenta, lo que daría cuenta del mayor grosor de la pared celular en estas células (23).

Existen diferencias sustanciales en la cantidad de quitina por unidad de peso seco entre las células levaduriformes y micelianas. Es posible que las enzimas de vida media corta y larga puedan ser el reflejo de controles impuestos por el tiempo de generación largo de las células levaduriformes creciendo anaer-

robicamente comparado con el tiempo de generación más corto de las hifas en aerobiosis (14).

## II. 3. Factores ambientales y metabolismo celular

Tal como se señaló, la morfología levaduriforme de algunas especies de Mucor aparecía cuando la atmósfera del cultivo se hacía anaeróbica.

Bartnicki-García y Nickerson (24) estudiaron el papel que podían tener los distintos factores ambientales asociados al crecimiento anaeróbico como eventuales agentes morfogenéticos en M. rouxii. Demostraron que la presencia de anhídrido carbónico era necesaria para el desarrollo de la fase levaduriforme. A bajas presiones del gas o en su ausencia (atmósfera de nitrógeno puro) obtenían crecimiento totalmente filamentoso. De estos estudios concluyeron que el anhídrido carbónico participa directamente en el mantenimiento de la fase levaduriforme.

Haidle y Storck (25) trabajando con la misma especie de Mucor, obtuvieron crecimiento levaduriforme en atmósfera de nitrógeno puro a condición de que este gas estuviera libre de trazas de oxígeno y concluyeron que otros factores distintos del anhídrido carbónico estaban involucrados en el control del dimorfismo en esta especie.

Sin embargo, recientemente, Mooney y Sypherd (26) demostraron que en M. racemosus es posible obtener crecimiento levaduriforme o filamentoso en atmósfera de nitrógeno puro o cualquier otro gas inerte, dependiendo la morfología del cultivo de la velocidad de flujo del gas. Así, a flujo alto de nitrógeno obtuvieron crecimiento levaduriforme, mientras que a bajo flujo del gas el crecimiento era puramente filamentoso. Para explicar estos resultados los autores postularon la existencia de una sustancia volátil: "factor filamentoso", aún no identificada, la cual sería la desencadenante del crecimiento apical. Con un alto flujo de gas, dicha sustancia hipotética sería removida de los cultivos permitiendo entonces el crecimiento levaduriforme. En atmósfera de anhídrido carbónico, a alto o bajo flujo de gas, el crecimiento era siempre del tipo levaduriforme. Surge inmediatamente de estos resultados que la acción morfogenética de la sustancia volátil sería anulada por el anhídrido carbónico.

#### II. 4. Influencia de los hidratos de carbono

Bartnicki-García (27) y Passeron y colaboradores (28) estudiaron la influencia de la concentración de hexosas sobre la morfología de Mucor rouxii en condiciones anaeróbicas. Demostraron que se requiere una concentración mínima de glucosa para

obtener una población netamente levaduriforme; a medida que la concentración de glucosa disminuye los cultivos tienden a hacerse más filamentosos. Este efecto de la concentración de glucosa no puede ser atribuido al incremento de la producción de anhídrido carbónico, ya que la máxima liberación de este gas se logra con solo 0,1% de glucosa (27). Bartnicki-García interpreta la acción de la glucosa como el resultado de la represión catabólica ejercida por metabolitos de este azúcar sobre los procesos de morfogénesis de la hifa.

## II. 5. Acción de inhibidores

Algunas sustancias químicas alteran los cambios morfogenéticos normales, y del estudio de su modo de acción han surgido nuevas hipótesis sobre las causas del dimorfismo. Terenzi y Storck (29) encontraron que el alcohol fenético, inhibidor del crecimiento celular en bacterias, hongos y animales, induce la formación de células levaduriformes en cultivos aeróbicos de Mucor rouxii, siempre y cuando la fuente carbonada sea un azúcar fermentable en concentración superior a 2%. El alcohol fenético estimula la producción de anhídrido carbónico y etanol e inhibe la fosforilación oxidativa. Posteriormente, Passeron y colaboradores (28) encontraron que el cianuro de potasio, inhibidor clásico de la respiración, agregado a cultivos aeróbicos

produce efectos similares al alcohol fenético, o sea, induce el crecimiento levaduriforme. En presencia de diferentes concentraciones de cianuro de potasio, es posible observar la transición entre la morfología filamentosa y levaduriforme pasando por formas intermedias, es decir que a concentraciones intermedias del inhibidor se pueden encontrar hifas cortas y engrosadas.

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

## II. 6. Cambios respiratorios durante la diferenciación levadura-micelio

Pese a las conclusiones enunciadas en el párrafo anterior, trabajos posteriores de Rogers, Clark-Walker y Stewart (30) y de Paznokas y Sypherd (31) demostraron que el metabolismo respiratorio de Mucor no estaba correlacionado con la morfología.

Rogers y colaboradores cultivaron M. genevensis en condiciones de exceso de glucosa o con glucosa limitante a distintas concentraciones de oxígeno disuelto. Encontraron que el desarrollo filamentoso y el metabolismo oxidativo son inhibidos por exceso de glucosa, sin mayores efectos sobre el desarrollo mitocondrial. Por el contrario, la adición de cloranfenicol a cultivos filamentosos

aeróbicos, en condiciones de glucosa limitante, inhibe el desarrollo mitocondrial sin inducir la transformación a células levaduriformes. Los autores concluyen que el metabolismo oxidativo no es esencial para el desarrollo filamentoso.

Paznokas y Sypherd estudiaron algunos aspectos del metabolismo respiratorio de M.racemosus. Lograron obtener cultivos filamentosos en condiciones estrictamente anaeróbicas, en atmósfera de nitrógeno o argón y a bajo flujo de gas. Por otra parte, obtuvieron cultivos levaduriformes en condiciones aeróbicas por el agregado de  $Bt_2$  AMPc al medio de cultivo. Midiéron el metabolismo respiratorio de estas células y lo compararon con el de cultivos levaduriformes y filamentosos obtenidos en las condiciones habituales. Hallaron que el micelio obtenido en atmósfera de nitrógeno posee un metabolismo netamente fermentativo, análogo al de las células levaduriformes obtenidas en atmósfera de anhídrido carbónico. Este micelio carece de mitocondrias y el sistema de citocromos no se ha desarrollado. Por el contrario las células levaduriformes obtenidas en atmósfera de oxígeno con  $Bt_2$  AMPc, poseen un metabolismo oxidativo enteramente similar al del micelio que se obtiene normalmente.

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



Inderlied y Sypherd (32) encontraron una correlación positiva entre el desarrollo levaduriforme y una alta capacidad fermentativa. Observaron que la transferencia de células levaduriformes de Mucor de una atmósfera de anhídrido carbónico a aire, con concentraciones progresivamente más altas de glucosa en el medio de cultivo retardan la aparición de los tubos germinativos. Además cuando el organismo se desarrolla aeróbicamente, concentraciones crecientes de glucosa en el medio de cultivo provocan la acumulación de etanol en el medio y se induce un aumento de las concentraciones intracelulares de intermediarios glucolíticos como la fructosa 1-6 difosfato. Se concluyó que el estudio de las enzimas claves del camino glucolítico sería de gran utilidad para dilucidar las bases bioquímicas del dimorfismo en este hongo (14).

Passeron y colaboradores (33-35) y Paznokas y Sypherd (36) estudiaron una de las enzimas claves de la glucólisis, la piruvato quinasa en M. rouxii y M. racemosus respectivamente. Demostraron la existencia de isoenzimas y estudiaron su regulación por intermediarios de la glucólisis. No se halló una correlación entre la morfogénesis y el tipo de piruvato quinasa presente (36), aparentemente esta enzima, no estaría involucrada en el proceso morfogenético.

## II. 7. Dimorfismo y síntesis de proteínas

Orlowski y Sypherd, (37) estudiaron en M. racemosus la velocidad de síntesis proteica durante la germinación aeróbica de las esporas y en el proceso de transformación de células levaduriformes a micelio. Encontraron un aumento en la velocidad de síntesis de proteínas durante el período de emergencia de los tubos germinativos, tanto de las células levaduriformes como de las esporas (37,38). Este aumento en la velocidad de síntesis de proteínas está acompañado por un aumento en el porcentaje de ribosomas activos y en la síntesis de ARN total (ARN ribosomal y ARN mensajero), la capacidad sintética disminuye a medida que los tubos germinativos se alargan (39,40).

A pesar del incremento de la velocidad de síntesis de ARN mensajero durante la transición de la forma levaduriforme a la miceliana (40), no se pudieron encontrar cambios importantes en la síntesis de nuevas especies de ARN mensajero y por consiguiente en la calidad de las proteínas sintetizadas durante la transición morfogénica. El cambio más importante observado durante la emergencia de los tubos germinativos, a partir de esporas o de células levaduriformes, fue la fosforilación de la proteína S 6 de la subunidad ribosomal 40 S; coincidiendo el grado máximo de fosforilación de esta proteína con el máximo de incremento de la síntesis proteica (41). Aunque el significado de esta

fosforilación en el proceso de morfogénesis no está aclarado, demostraría que durante este proceso se producen cambios por lo menos de un componente del sistema de traducción.

## II. 8. Dimorfismo y poliaminas

Sypherd y colaboradores (14, 42) estudiaron la variación en los niveles de poliaminas durante la transición morfogenética que se produce al aerear células levaduriformes de M. racemosus. Encontraron que se produce un aumento transiente en los niveles de cadaverina durante los primeros momentos de la aereación, para luego decaer a los niveles encontrados en las células levaduriformes; con posterioridad a la disminución en los niveles de esta poliamina, se produce un gran aumento en los niveles de putrescina y espermidina, muy por encima de los valores encontrados en las células levaduriformes. Aunque estos resultados solamente reflejan una correlación entre la transición dimórfica y la aparición de tres poliaminas, los autores sugieren que estos compuestos podrían tener una función regulatoria en los procesos metabólicos que conducen a los cambios morfogenéticos.

## II. 9. Dimorfismo y AMPC

Tal vez el avance más importante en cuanto al esclarecimiento de las bases bioquímicas del dimorfismo en Mucor se deba a

los experimentos de Larsen y Sypherd (43) sobre la acción del AMPc en Mucor racemosus. Estos autores encontraron que la adición de  $8t_2$  AMPc a cultivos aeróbicos del hongo, produce la represión del crecimiento apical y promueve el crecimiento levaduriforme. Para que estos cambios ocurran es necesaria la presencia en el medio de cultivo de un azúcar fermentable; en su ausencia, o si la fuente carbonada es glicerol, succinato o maltosa el cambio no se produce. También pudieron establecer que existe una buena correlación entre los niveles intracelulares de AMPc y la morfología. Las células levaduriformes contienen mayores niveles del nucleótido cíclico que el micelio. Los mismos autores demostraron que la aereación de un cultivo de células levaduriformes está acompañada por una disminución en los niveles intracelulares del nucleótido cíclico, disminución que precede a la aparición de los tubos germinativos.

Posteriormente Passeron y colaboradores (44), encontraron resultados similares en M. rouxii.

Así, aunque el AMPc es capaz de inducir la morfología levaduriforme en aerobiosis y se lo encuentra en concentraciones altas en este tipo de células, el nucleótido cíclico perse no sería determinante de la morfología, ya que su acción está condicionada a la presencia de un azúcar fermentable a concentraciones adecuadas en el medio de cultivo.

De acuerdo a lo expuesto en las secciones precedentes, surge que la regulación del dimorfismo en Mucor es el resultado de una interacción compleja de numerosos factores ambientales y nutricionales, en donde el AMPc, sin duda, desempeña un papel muy importante. Por consiguiente, el estudio de su mecanismo de acción debe tenerse en cuenta en cualquier modelo de regulación del dimorfismo que se proponga para el género Mucor.

En la Figura 2 se resume el efecto de los principales factores ambientales y nutricionales que participan en las transiciones dimórficas en Mucor rouxii.

### III. PAPEL BIOLÓGICO DEL AMPc EN OTROS EUKARIOTES INFERIORES

#### III. 1 Mucorales

Jones y Bu'lock (45) demostraron que la adición de AMPc al medio de cultivo influencia la morfología de Mucor hiemalis y M. mucedo, dos especies de Mucor no dimórficas, produciendo la pérdida de la dominancia apical y un aumento de la septación de las células del micelio que recuerda a la morfología levaduriforme de las Mucorales dimórficas. En estas especies y en Blakeslea trispora (45, 46) se encontró que el AMPc puede mimetizar los cambios morfológicos que se producen normalmente durante la reproducción sexual, formación de gametangios y suspensión

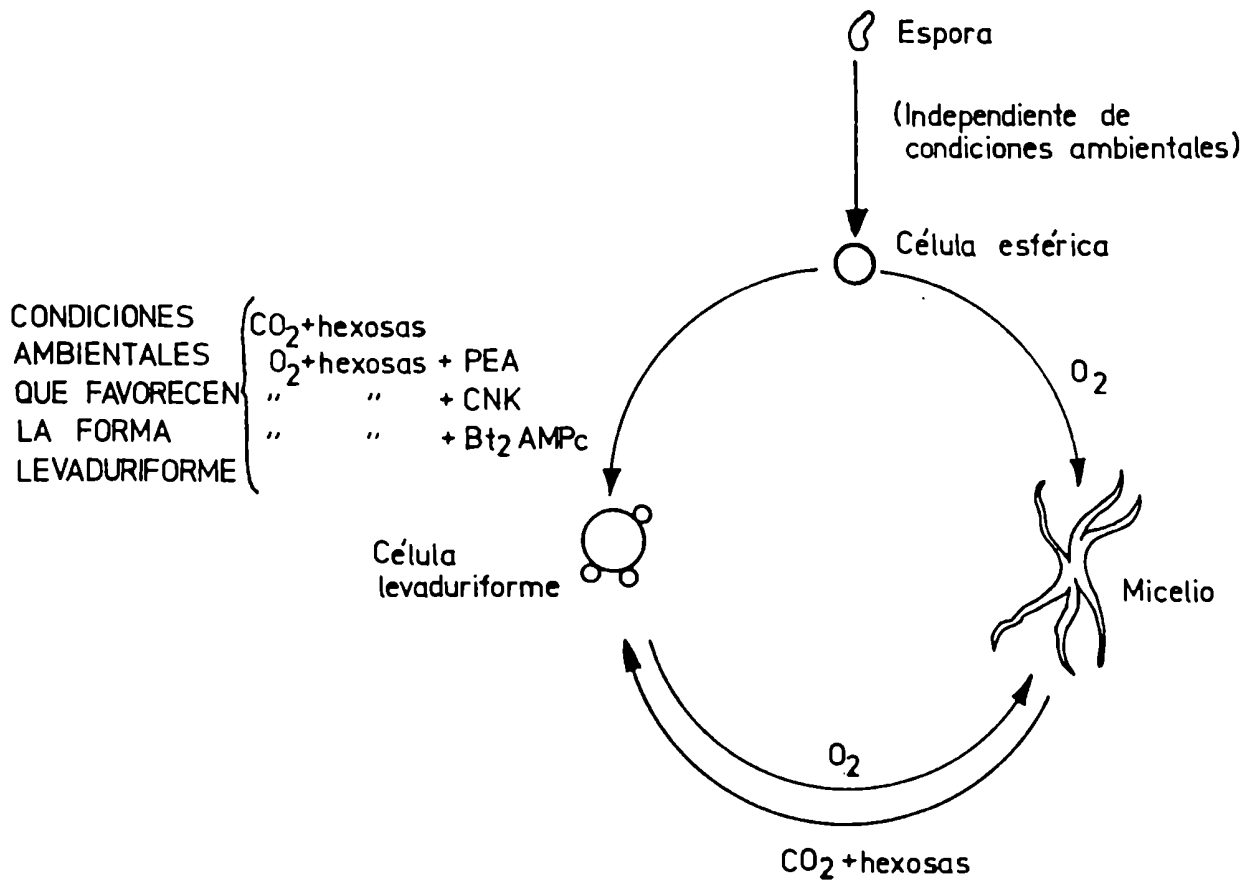


Figura 2: Ciclo de vida asexual, aeróbico y anaeróbico, de Mucor rouxii. Condiciones ambientales y nutricio  
nales que influyen sobre el dimorfismo.

res (ver Fig. 1) y aumento en la producción de carotenoides, que estarían normalmente inducidos por el ácido trispórico. Los autores (46) postulan que el AMPc junto con el ácido trispórico serían los responsables de la formación de cigóforos en B. trispora. En Phycomyces blakesleeanus, se encontraron resultados similares a los hallados para las especies de Mucor mencionadas arriba (47). También se encontró en esta especie que son necesarios niveles bajos de AMPc para el desarrollo y la respuesta fototrópica del esporangióforo (48).

### III. 2. Blastocladiella emersonii

En el hongo acuático Blastocladiella emersonii, se han relacionado los cambios en las concentraciones intracelulares de nucleótidos cíclicos con la citodiferenciación. Se observó que los niveles de AMPc y GMPc cambian marcadamente durante el ciclo de vida (49- 51). Los niveles de AMPc aumentan en forma transiente durante la germinación de las zoosporas y alcanzan su máximo valor en el estadio de zoospora hinchada (51); los niveles altos de AMPc luego declinan y son mínimos cuando las células emiten los tubos germinativos. El tratamiento de las zoosporas con cicloheximida mantiene el AMPc en sus niveles más altos y a la población celular como células hinchadas (49, 51, 52). Esto indicaría que los primeros estadios de la germinación, son independientes de síntesis protéica contrariamente a lo que ocurre

en Mucor. Recientemente Maia y col. (53) y Silverman (54) encontraron que la germinación de las zoosporas de esta especie puede ser inducida rápidamente por AMPc y postularon que el nucleótido cíclico actuaría como una señal para la iniciación de los procesos que conducen a la germinación de las zoosporas. Los primeros autores señalan que, dado que este proceso está acompañado por un eflujo de calcio celular, la germinación dependería de la correlación entre la movilización intracelular de calcio y los niveles de AMPc ya que un ionóforo de calcio (A23187) per se no induce la germinación, pero el proceso puede desencadenarse cuando se añade a las zoosporas el ionóforo y concentraciones subóptimas de AMPc.

### III. 3. Neurospora crassa

Los trabajos más importantes en cuanto a la participación del AMPc en la morfogénesis de Neurospora crassa corresponden a los grupos de Scott (55, 56) y de Torres (57, 58). El primer grupo de trabajo, utilizando la mutante colonial (fr) de N. crassa, que tiene disminuidos los niveles intracelulares de AMPc, logró restaurar la morfología salvaje bajo condiciones de cultivo que hacían aumentar los niveles intracelulares de AMPc (56). Estos mismos autores (55), utilizando la cepa salvaje fueron capaces de producir fenocopias de mutantes morfológicas coloniales adi-



cionando al medio de cultivo sustancias que hacían disminuir la concentración intracelular del nucleótido cíclico.

Para dilucidar el papel desempeñado por el AMPc en la morfogénesis de N. crassa Torres y colaboradores, también trabajaron con cepas mutantes del hongo. La mutante crisp (cr-1) tiene un fenotipo colonial ya que no produce hifas aéreas y presenta abundante producción de conidios. Estos autores demostraron que los niveles de AMPc en esta mutante son 10-20 veces menores que los de la cepa salvaje (57), y encontraron que la adición de AMPc o de su Bt<sub>2</sub> derivado al medio de cultivo de la mutante cr-1 revierte la morfología produciendo una fenocopia de la cepa salvaje (58). De estos resultados surge la importancia del AMPc como determinante de la morfología de Neurospora, aunque aún no se conoce el modo preciso de acción por el cual el AMPc ejerce su acción morfogenética.

### III. 4. Dictyostelium discoideum

Dictyostelium discoideum posee un ciclo de vida con una fase vegetativa unicelular ameboide y un cuerpo fructífero multicelular. Cuando se agotan los nutrientes del medio, las amebas forman agregados que luego se diferencian en una masa de esporas sobre un pie celulósico (sorocarpo) (59). La agregación se produce por quimiotaxis y la señal quimiotáctica natural es el AMPc

(acrasina) (60). En las primeras horas de ayuno, en medio sólido o líquido, una secuencia de eventos característicos conduce a la agregación de las amebas; primero desarrollan la habilidad de responder a pulsos de señales de AMPc y luego son capaces de emitir la señal por síntesis y liberación oscilatoria de AMPc (61). Por medio de una serie compleja de movimientos morfogénicos el agregado celular forma un pseudoplasmodio, conocido como estadio "babosa", que puede desplazarse por el medio y que luego desarrolla el sorocarpo culminante. En este último estadio las futuras células del pié son apicales y las futuras esporas, basales. Las células del pié migran hacia abajo a través de las esporas dejando a estas en posición apical en el sorocarpo maduro. En las etapas de formación del cuerpo fructífero también interviene el AMPc. Así cuando las amebas se incuban en altas concentraciones de AMPc forman células del tipo de las del pié (62). También las porciones anteriores de un pseudoplasmodio en movimiento, que darán origen al pié, completan su desarrollo en presencia de altas concentraciones de AMPc extracelular, mientras que las que darán origen a las esporas, degeneran (63). Además se vió que una fuente de AMPc implantada en el pseudoplasmodio induce en su adyacencia grupos de "células pié" (64). Estos hallazgos dan cuenta de la importancia del AMPc en la diferenciación celular de Dictyostelium.

### III. 5. Otros hongos

Se ha estudiado el efecto del AMPc en el proceso de diferenciación en otros hongos. En Basidiomycetes como Coprinus macrorhizus el AMPc induce la formación de basidiocarpos (65). En Schizophyllum commune se encontró que el AMPc adicionado al medio de cultivo de la cepa salvaje produce una fenocopia del fenotipo mutante "bse" (bug's ear) que carece de laminillas (66). Se observó, además, que esta cepa mutante poseía altos niveles endógenos de AMPc durante todo el ciclo de vida, mientras que en la cepa salvaje solo se producen durante la formación de los cuerpos fructíferos (67). Aparentemente de estos resultados podría concluirse que en Basidiomycetes los niveles de AMPc son determinantes en la formación del basidiocarpo.

En el hongo imperfecto Aspergillus niger el AMPc estimula la velocidad de crecimiento cuando se agrega el nucleótido cíclico a un cultivo del hongo creciendo en bajas concentraciones de cinc y en los primeros estadios del proceso de fermentación más tarde en el ciclo celular la respuesta del micelio al AMPc cambia y el nucleótido inhibe el crecimiento (respuesta bipolar), por lo tanto el AMPc estimula la talogénesis en la fase de crecimiento (donde no se observa producción de citrato) y la acidogénesis en la fase estacionaria (68).

### III. 6. Algas, musgos y protozoarios

Se ha visto que el AMPc afecta la morfogénesis en algas; así en Acetabularia mediterranea se observó que el AMPc endógeno es alto en los talos pequeños y decrece durante el crecimiento de los mismos, permaneciendo a bajos niveles hasta la diferenciación del sombrero y aumentando durante la diferenciación de éste (69). En Chlamydomonas reinhardtii el AMPc estaría involucrado en el funcionamiento y regeneración de los flagelos (70).

En el musgo Funaria hygrometrica el AMPc acelera el desarrollo del cloronema pero no del caulonema (71). En el protozoario Trypanosoma lewisi, parásito de la sangre de ratas, la ablastina, que es un anticuerpo producido por el hospedante, produce el pasaje de la forma reproductiva del parásito a la forma no reproductiva; se ha observado que la ablastina produce un aumento en los niveles intracelulares del AMPc en las células del parásito (72).

### IV. AMPc EN EUKARIONTES SUPERIORES

En 1957, Rall, Berthet y Sutherland (73) descubrieron que la acción activadora de la epinefrina y del glucagón sobre la fosforilasa de hígado, una de las enzimas responsables de la degradación del glucógeno, podía ser mimificada por un compuesto termoes table que resultó ser el AMPc.

La estructura de este compuesto fue determinada por el grupo de Markham (74). A partir de entonces se han ido describiendo numerosos efectos de este nucleótido cíclico sobre todos los niveles de organización celular, desde un órgano aislado hasta una enzima purificada.

El grupo de Sutherland (75) le asignó al AMPc el papel de segundo mensajero. El primer mensajero serían las diferentes hormonas encargadas de llevar la información desde el tejido donde se producen hasta la célula receptora y el segundo mensajero transferiría esa información a la maquinaria celular. La mayoría de las hormonas peptídicas, las catecolaminas y las prostaglandinas producen una modificación de los niveles intracelulares de AMPc en las células receptoras. El primer paso en este proceso es la unión de la hormona a un receptor específico en la superficie externa de la membrana plasmática; como consecuencia de esta unión, se produce la activación de la enzima adenilato ciclasa que cataliza la síntesis de AMPc a partir de ATP y por consiguiente un aumento en los niveles intracelulares de AMPc en respuesta a la hormona específica.

#### V. MECANISMO DE ACCION DEL AMPc EN EUKARIOTES SUPERIORES

¿Cuál es el mecanismo por el cual el AMPc produce efectos tan diversos en los diferentes tejidos en respuesta a los estímulos hormonales?.

En 1968 y 1969 se describió (76-80) un grupo de enzimas llamadas quinasas de proteínas, que catalizan la fosforilación de diversos sustratos proteicos tales como protamina, caseína, histona, etc. y cuya actividad es dependiente de la presencia de AMPc. Pronto se vio que estas enzimas estaban ampliamente distribuidas en los organismos eucariontes.

Precisamente la universalidad de su distribución llevó a Kuo y Greengard en 1969 (81) a proponer que ellas serían las mediadoras de las diversas acciones del AMPc en los distintos tejidos. Esta hipótesis lleva implícita la idea de que las quinasas de proteínas de todos los sistemas pueden actuar sobre múltiples sustratos.

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

Krebs propuso en 1973 (82) un conjunto de criterios que debían ser satisfechos para poder decidir si un efecto particular del AMPc era mediado por fosforilación proteica o no. Estos criterios son en cierto modo análogos a los propuestos por Robison, Butcher y Sutherland (75) para decidir si un cierto efecto hormo

nal está mediado por el AMPc. Los criterios de Krebs son los si guientes:

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

El primer criterio parece ser universalmente satisfecho en células animales. Hay tres efectos del AMPc que hoy ya son clásicos, para los cuales se cumplen todos estos criterios: 1) aceleración de la glucogenolisis, proceso en el cual ya se ha demostrado la cadena de fosforilaciones que llevan a la activación de la glucógeno fosforilasa (83, 84); 2) reducción de la síntesis de glucógeno, por inactivación de la glucógeno sintetasa (85-87); 3) aumento de la lipólisis en tejido adiposo por activación de la lipasa (88-90).

Se ha demostrado que estos efectos primarios del AMPc son más complejos. Por ejemplo, el aumento de la lipólisis en tejido adi-

poso no está mediado únicamente por fosforilación de la lipasa, sino que también son capaces de ser reguladas de la misma manera otras enzimas que intervienen en este proceso, tales como la acetil CoA-carboxilasa (91), la glicerofosfato acil transferasa (92), colesterol éster hidrolasa e hidrolasas de di y mono glicéridos (93).

## VI. FOSFORILACION - DESFOSFORILACION DE PROTEINAS

### VI. 1. Modificaciones covalentes de proteínas

El reconocimiento de la modificación covalente y reversible de proteínas, como un proceso regulatorio muy importante, fue el resultado de varios trabajos sobre el metabolismo del glucógeno realizados hace un cuarto de siglo (94,95). Así se demostró que la enzima glucógeno fosforilasa puede existir en dos formas interconvertibles y de distinta actividad, una forma fosforilada y otra desfosforilada. A partir de este primer ejemplo se han ido describiendo otras muchas modificaciones covalentes reversibles de proteínas. Se ha estimado que las proteínas sufren al menos 125 modificaciones covalentes post-traduccionales que involucran reacciones que originan derivados de los residuos aminoácidos individuales por formación de enlaces covalentes (96). No obstante, dentro de este amplio espectro de reacciones de



modificación, sólo se pueden identificar cinco o seis tipos de modificaciones covalentes y reversibles de proteínas en condiciones fisiológicas: 1. fosforilación-desfosforilación; 2. acetilación-desacetilación (97); 3. adenililación-desadenililación (98); 4. uridililación-desuridililación (99); 5. metilación-desmetilación (100) y 6. interconversiones S-S - SH. (101).

Las modificaciones covalentes reversibles se consideran de naturaleza regulatoria. Nos referiremos específicamente a las reacciones de fosforilación-desfosforilación.

#### VI. 2. Fosforilación y desfosforilación de enzimas

El mecanismo de fosforilación-desfosforilación de enzimas no difiere de cualquier reacción reversible de fosforilación-desfosforilación de proteínas no enzimáticas en las cuales intervienen quinasa de proteínas y fosfatasas de fosfoproteínas, y puede esquematizarse como se ve en la fig.3.

Para que las reacciones de fosforilación-desfosforilación tengan una función regulatoria, es evidente que señales apropiadas deben producir cambios en las concentraciones relativas de las formas fosforiladas y no fosforiladas del sustrato proteico. Del esquema anterior surge que esto puede ocurrir a través del control del paso en donde intervienen las quinasas de proteínas o aquel en el que intervienen las fosfatasas de fosfo

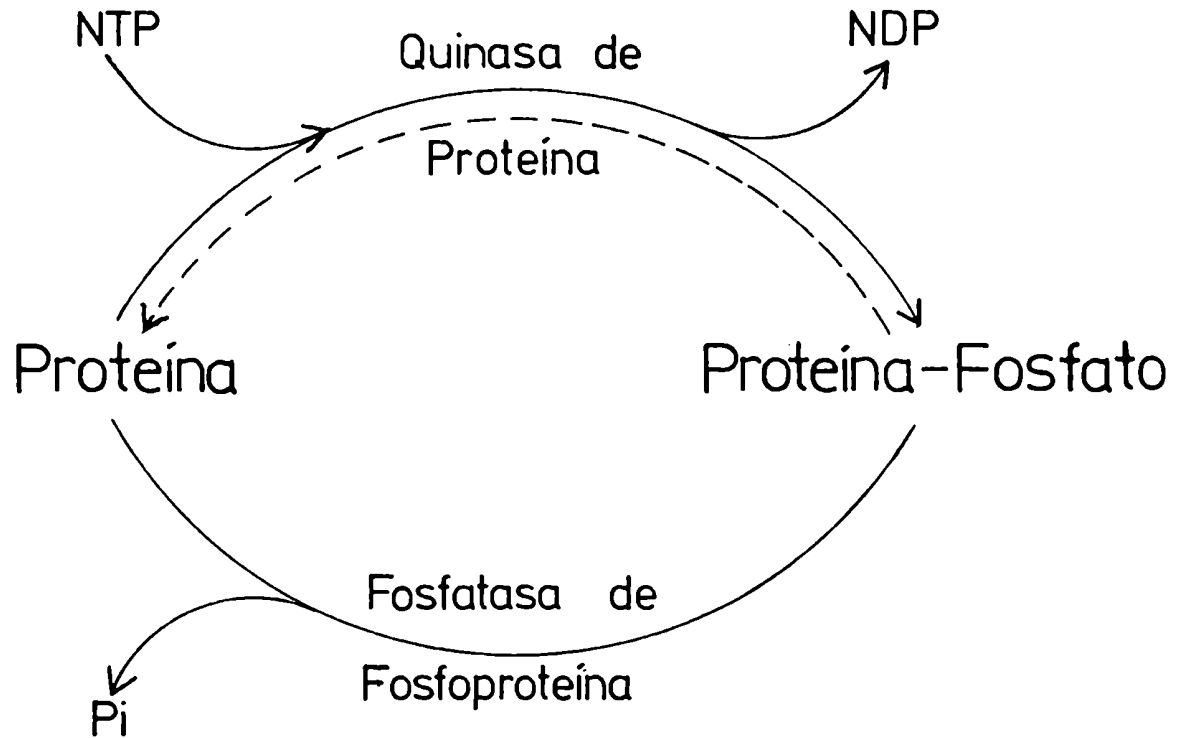


Figura 3: Mecanismo de fosforilación-desfosforilación de proteínas.  
En general NTP es ATP.

proteínas o a través de la regulación simultánea de ambas reacciones. Estos controles pueden involucrar respuestas rápidas e inmediatas, como puede ocurrir debido a fluctuaciones en los niveles de las moléculas efectoras; o puede estar mediada por cambios adaptativos que alteren la relación quinasa de proteína/fosfatasa de fosfoproteína dentro de la célula.

Krebs y Beavo (101) proponen los criterios que deben satisfacerse para establecer si el proceso de fosforilación-desfosforilación de una enzima es fisiológicamente relevante:

- 1.- Demostración in vitro que la enzima puede ser fosforilada estequiométricamente a velocidades significativas, en una reacción catalizada por una quinasa de proteína apropiada y desfosforilada por una fosfatasa de fosfoproteína.
- 2.- Demostración de que las propiedades funcionales de la enzima sufren cambios significativos que se correlacionan con el grado de fosforilación.
- 3.- Demostración de que la enzima puede ser fosforilada y desfosforilada in vivo o en un sistema de células intactas con los cambios funcionales acompañantes.
- 4.- Correlación entre los niveles celulares de los efectores de la quinasa de proteína y/o fosfatasa de fosfoproteína y el grado de fosforilación de la enzima.

En la Tabla 1 se encuentra una lista de enzimas cuya actividad está regulada por fosforilación-desfosforilación.

#### VI. 3. Quinasas de proteínas

Las quinasas de proteínas catalizan la siguiente reacción:



La reacción de fosforilación requiere la presencia de un metal divalente, generalmente  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ .

TABLA 1

Enzimas cuya actividad está regulada por fosforilación-desfosforilación (101).

	Año en el que se informó
Fosforilasa de glucógeno	1955
Fosforilasa quinasa	1959
Sintetasa de glucógeno	1963
Lipasa sensible a hormonas	1964
Fructosa 1,6 difosfatasa	1966
Piruvato deshidrogenasa	1969
Hidroximetilglutaril CoA reductasa	1973
Acetil CoA carboxilasa	1973
ARN polimerasa dependiente de ADN	1973
Piruvato quinasa (hígado)	1974
Colesterol éster hidrolasa	1974
Subunidad R de la quinasa de proteína dependiente de AMPc del tipo II	1974
Transcriptasa reversa	1975
Fosfofructoquinasa (hígado)	1975
Tirosina hidroxilasa	1975
Inhibidor 1 de la fosforilasa fosfatasa	1975
Fenilalanina hidroxilasa	1976
Quinasa del factor de iniciación F2	1977
Triptofano hidroxilasa	1977
Quinasa de proteína dependiente de GMPc	1977
Glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (levaduras)	1978
Glicerolfosfato aciltransferasa	1978

La mayoría de las quinasas de proteínas funcionan con ATP, aunque algunas pueden utilizar GTP (102,103). La fosforilación ocurre principalmente sobre el grupo hidroxilo de la serina de la proteína sustrato y en mucho menor grado sobre el hidroxilo de la treonina, aunque algunas quinasas específicas pueden transferir el fosfato a histidina, lisina o tirosina (104,105).

#### VI. 4. Clasificación de las quinasas de proteínas

Se puede tener un esquema de clasificación de las quinasas de proteínas basada en los agentes que interactúan directamente y regulan la actividad de estas enzimas, y que también sirven como mensajeros en la transmisión de señales desde el exterior de la célula. Dicha clasificación tomada de Krebs y Beavo (101) se encuentra en la Tabla 2.

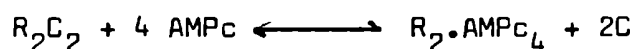
TABLA 2

#### Clasificación de las quinasas de proteínas basada en su regulación por agentes específicos.

<u>Categoría</u>	<u>Nombre</u>	<u>Entidades reconocidas</u>
1	Quinasas de proteínas dependientes de AMPc	Tipo I y Tipo II <sup>(a)</sup>
2	Quinasas de proteínas dependientes de GMPc	una entidad conocida
3	Quinasas de proteínas dependientes de Ca <sup>2+</sup>	quinasas de fosforilasa y quinasa de la cadena liviana de la miosina
4	Quinasas de proteínas dependientes de ARN de doble cadena	una entidad conocida
5	Quinasas de proteínas sin modulador conocido	numerosos ejemplos conocidos
(a)	Los dos tipos de quinasas de proteínas dependientes de AMPc difieren en la naturaleza de sus subunidades regulatorias pero tienen subunidades catalíticas idénticas (106-107).	

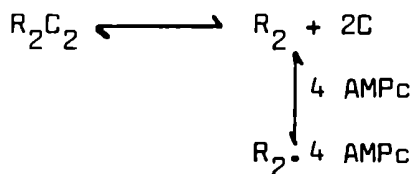
## VI. 5. Quinasas de proteínas dependientes de AMPc

En 1970 se dilucidó en varios laboratorios, en forma independiente, el mecanismo de activación de las quinasas dependientes de AMPc (108-111), luego de descubrir que este tipo de enzimas estaban formadas por dos tipos de subunidades: catalíticas (C), que catalizan la transferencia del fosfato  $\gamma$  del ATP a ciertas proteínas, y subunidades regulatorias (R), que en ausencia de AMPc inhiben la actividad de la subunidad C. El AMPc activa a estas proteínas provocando la disociación de la holoenzima inactiva ( $R_2C_2$ ) en un dímero de la subunidad regulatoria ( $R_2$ ) y dos subunidades catalíticas libres activas ( $2C$ ) (112,113). Estudios recientes (114,115) indican que se unen 2 moles de AMPc por número de subunidad R, según la ecuación:

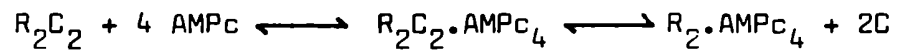


La activación pudo proceder por dos rutas mecanísticamente diferentes (116):

1. El AMPc puede ejercer su efecto por unión al dímero  $R_2$  y desplazar un equilibrio preexistente entre la holoenzima y sus subunidades hacia la formación de C activa, según la ecuación:



2. El AMPc puede unirse a la holoenzima formando un complejo ternario que luego se disociaría en sus subunidades componentes según la reacción:



Las evidencias cinéticas de la existencia de un complejo ternario en eucariontes superiores, como un paso obligatorio en el proceso de disociación (117,119) favorecen la segunda hipótesis. Este complejo ternario ha sido aislado recientemente en nuestro laboratorio (120).

Las numerosas quinasas de proteínas dependientes de AMPc que han sido caracterizadas, independientemente de su origen, muestran gran similitud con respecto a propiedades que se relacionan aparentemente con la función biológica, tales como afinidad por el AMPc y especificidad de sustrato. Hay numerosos ejemplos en la literatura que muestran la semejanza de diferentes quinasas de proteínas (121,122). En apoyo de esta analogía están los experimentos en los que se demuestra la actividad de la enzima de un tejido sobre sustratos de otros tejidos y otros en los que se reconstituyen quinasas de proteínas dependientes de AMPc utilizando subunidades catalíticas y regulatorias de distinto origen (88,89,122). Estas analogías se hacen extensivas aún a las quinasas de proteínas dependientes de AMPc firmemente unidas a componentes subcelulares (123,125).

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

La mayoría de las quinasas de proteínas estudiadas tienen un peso molecular que oscila entre 140 y 190 K y un coeficiente de sedimentación entre 6,8 y 7 s (126-129). Los pesos moleculares de la subunidad catalítica (C) y del dímero de la subunidad regulatoria ( $R_2$ ) son aproximadamente 40 y 110 K respectivamente (130).

Las diversas quinasas de proteínas dependientes de AMPc se distinguen por cromatografía de intercambio aniónico y cada tejido tiene una distribución característica de las mismas (106,107). Algunos tejidos, como el corazón bovino, poseen una forma predominante de la enzima mientras que en otros, como músculo esquelético porcino y cerebro bovino, aparecen dos formas enzimáticas (131).

Se puede agrupar a casi todas las quinasas de proteínas dependientes de AMPc en dos categorías principales; tipos I y II según el orden de elución de estas enzimas de una columna de in-



tercambio aniónico (106,107).

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

Las diferentes propiedades de los dos tipos de isoenzimas son atribuibles a diferencias en el componente receptor de AMPc ya que la subunidad catalítica de ambas parece ser idéntica (107,129).

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

- a) Las quinasas de proteínas de tipo II sólo se disocian por AMPc, mientras que las de tipo I lo hacen por AMPc, histona o alta concentración salina (132).
- b) Las quinasas de proteínas tipo II son de muy fácil reasociación. Al disminuir la concentración del agente disociante (AMPc) se produce la recombinación inmediata de las subunidades, a no ser que haya en el medio ClNa 0,5 M. Las subunidades de las quinasas de proteína de tipo I pueden mantenerse disociadas aún en ausencia de AMPc y ClNa (132).
- c) Las quinasas de proteína de tipo I y II se diferencian por las propiedades de sus subunidades regulatorias, las

cuales pueden ser distinguidas inmunologicamente (133). Las quinasas de proteínas de corazón bovino y porcino, prototipo de las enzimas de tipo II, se autofosforilan (134). Se ha demostrado que la fosforilación ocurre en la subunidad regulatoria. Esta fosforilación aumenta la sensibilidad de la holoenzima a la disociación por AMPc. Las quinasas de proteína de tipo I si bien no se autofosforilan por una reacción comparable a la de autofosforilación de la enzima de tipo II (135), pueden unir 2 moléculas de ATP por molécula de enzima con muy alta afinidad, esta unión de ATP reduce la afinidad de la enzima por el AMPc, siendo entonces necesaria una concentración mayor del nucleótido cíclico para su disociación y activación.

#### VI. 6. Quinasas de proteínas dependientes de AMPc en eucariontes inferiores.

A diferencia de lo que ocurre en organismos eucariontes superiores, es muy poca la información que se tiene sobre la estructura y función de las quinasas de proteínas dependientes de AMPc en eucariontes inferiores. Takai y colaboradores (136) aislaron y caracterizaron una quinasa de proteínas de Saccharomyces cerevisiae. La enzima posee una estructura polimérica similar a la de las enzi

mas de organismos superiores, aunque es de menor peso molecular. La subunidad catalítica es capaz de interactuar con la subunidad regulatoria purificada de hígado de rata para formar una holoenzima híbrida.

En Coprinus macrorhizus se encontró una actividad de quinasas de proteína dependiente de AMPc estimulable por iones  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ . La actividad quinásica total aumenta durante la formación de basidiocarpos (137). En Dictyostelium discoideum se encontraron dos tipos de quinasas de proteínas dependientes de AMPc con propiedades cromatográficas similares a las enzimas de tipo I y II de mamíferos (138).

En Blastocladiella emersonii Maia y colaboradores (139,140) describieron una quinasas de proteína dependiente de AMPc soluble que se separa de las otras actividades quinásicas en columnas de DEAE-celulosa.

En Neurospora crassa Powers y Pall (141) y Torres y colaboradores (142) encontraron formas múltiples de quinasas de proteínas que se resuelven en columna de DEAE-celulosa. La enzima que eluye a menor fuerza iónica resultó ser la única con actividad dependiente de AMPc. Este último grupo determinó los parámetros moleculares de esta enzima y encontró que es una proteína de bajo peso molecular (118 K), cuya estructura sería dimérica y no tetramérica (143).

#### VI. 7. Quinasa de proteína dependiente de AMPc en *Mucor rouxii*

Passeron y colaboradores demostraron la existencia de una quinasa de proteína dependiente de AMPc en extractos solubles de ambas morfologías del hongo (144). Estudiaron la estructura polimérica de la enzima y las condiciones necesarias para su disociación y reasociación in vitro (145,146). La holoenzima parcialmente purificada sería un tetrámero y tendría un peso molecular aproximado de 210 K y se disocia por la acción conjunta de AMPc e histona o ClNa (146). Recientemente demostraron que como paso obligatorio en el mecanismo de activación de la holoenzima se forma un complejo ternario holoenzima-AMPc (120).

#### VI. 8. Fosfatasa de fosfoproteínas

Las reacciones de fosforilación de enzimas deben ser reversibles para que cumplan un papel regulatorio en los eventos metabólicos. La desfosforilación de las enzimas fosforiladas se lleva a cabo por la acción de fosfatasa de fosfoproteínas. Desde esta perspectiva, estas enzimas son una parte integral del mecanismo de regulación por fosforilación.

La actividad fosfatásica de fosfoproteínas cataliza la desfosforilación de una variedad de sustratos proteicos en forma inespecífica (101,147). Se han podido aislar fosfatasa de fosfoproteínas a partir de varios tejidos superiores; las enzimas de

hígado y corazón, llevadas a homogeneidad con etapas que incluyen tratamiento con etanol, presentaron un peso molecular de 35 K (148-151).

Lee y colaboradores (152) aislaron de varios tejidos de mamíferos un complejo "nativo" u holoenzima de la fosfatasa de alto peso molecular (260 K) al que llamaron fosfatasa de fosfoproteína H. Por acción de etanol, urea o mercaptoetanol, esta holoenzima se disociaría y activaría para dar lugar a la forma de bajo peso molecular (35 K) y a la que los autores llamaron fosfoproteína fosfatasa C. Los mismos autores postulan que podrían existir formas de peso molecular intermedio entre la holoenzima, de alto peso molecular y la forma catalítica, de bajo peso molecular. Se han aislado de distintos tejidos de mamíferos fosfatasas de peso molecular intermedio (v.g. 300, 170, 75, 45 K) (153). No se sabe si estas formas representan derivados proteolíticos de la fosfatasa H descrita por el grupo de Lee o son otras formas nativas de fosfatasa de fosfoproteínas (151,154).

#### Inhibidores de la actividad fosfatásica

Cohen y colaboradores (155,156) y Huang y Glinmann (157-159) describieron en distintos tejidos, dos proteínas termoestables y de bajo peso molecular que son inhibidoras de la actividad fosfatásica y a las que llamaron inhibidor 1 y 2. El inhibidor 1 sólo presenta actividad inhibitoria cuando está fosforilado (157).

La capacidad inhibitoria de ambas proteínas es diferente so  
bre las distintas formas de fosfatasa de fosfoproteínas  
(156,160,161).

#### VI. 9. Fosfatasa de fosfoproteínas en *Mucor rouxii*

Prácticamente no se ha realizado ningún estudio de estas en  
zimas en eucariontes inferiores. En nuestro laboratorio, se ini-  
ció recientemente el estudio de estas actividades enzimáticas en  
la forma filamentosa del hongo. Experimentos preliminares indica-  
rían que existen al menos dos formas de fosfatasa, ambas de bajo  
peso molecular, aproximadamente 30 K, con distintos requerimien-  
tos de iones  $Mn^{2+}$  (M. Seigelchiefer, comunicación personal).

#### VII. METABOLISMO DEL AMPc

En todos los sistemas biológicos estudiados hasta el momento  
el AMPc es sintetizado por la enzima adenilato ciclasa y de  
gradado por la enzima fosfodiesterasa. Los niveles intracelula-  
res del nucleótido cíclico están regulados por las actividades  
relativas de las enzimas que lo sintetizan y degradan y por la  
expulsión del nucleótido cíclico al medio extracelular.

### VIII. ADENILATO CICLASA

La adenilato ciclasa es la enzima que cataliza la síntesis de AMPc según la ecuación general:



Donde  $\text{Me}^{2+}$  puede ser  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ . El sustrato de esta reacción parece ser el complejo  $\text{ATP} \cdot \text{Me}^{2+}$  y los cationes divalentes libres serían activadores de la reacción. En casi todas las células animales estudiadas la adenilato ciclasa es sensible a la acción de hormonas. Esta enzima parece formar un complejo compuesto exclusivamente por proteínas intrínsecas de la membrana celular. Las proteínas que constituyen la adenilato ciclasa son un pequeño porcentaje de las proteínas de membrana y probablemente no existan en una concentración superior a 10 pmoles/mg de proteína de membrana y algunas veces son 100 veces menos abundantes (162).

Se sabe que la adenilato ciclasa sensible a hormonas está compuesta por al menos tres proteínas interactuantes (162): 1) una proteína catalítica (C) que es relativamente inactiva y que no es regulable, 2) una proteína ligadora de nucleótidos de guanina (G/F) que media la acción activadora de los nucleótidos de guanina (163) y del ión  $\text{F}^-$  (164) y 3) uno o más receptores hormonales (R) (165). Estas tres proteínas han podido ser aisladas físicamente (166-169) y se han estudiado sus propiedades. La proteína

catalítica C presenta baja actividad con ATP.  $Mg^{2-}$  y no es estimulable por hormonas, nucleótidos de guanina o  $F^{-}$ . La proteína G/F permite que la proteína C utilice el complejo ATP.  $Mg^{2-}$  como sustrato y puede unir nucleótidos de guanina y  $F^{-}$  permitiendo que modulen la actividad de la subunidad catalítica.

Los receptores hormonales (R) presentan el sitio de unión para la hormona en la cara externa de la membrana. En la misma célula pueden existir receptores con distinta especificidad de hormona. Aún no hay evidencias de la interacción directa del receptor hormonal con la proteína catalítica (162), aunque se ha postulado (170) que el receptor, que es una entidad independiente de la subunidad C, podría moverse dentro de la membrana y cuando la hormona activante se une al receptor aumenta la afinidad de éste por la enzima, modificando la actividad catalítica de la adenilato ciclase. Este modelo se basa en el concepto de la naturaleza dinámica y fluida de las membranas celulares (171), ya que el contacto entre el receptor y la subunidad catalítica se produciría por movimiento lateral de estas proteínas de la membrana.

#### VIII. 1. Adenilato ciclase en eucariontes inferiores

Esta enzima ha sido estudiada en numerosas especies de hongos y protozoarios (52,172-189).



Las características generales de las adenilato ciclasas de eucariontes inferiores son: baja actividad con iones  $Mg^{2+}$  y alta actividad con  $Mn^{2+}$ ; no son estimulables por iones  $F^{-}$  o nucleótidos de guanina y son insensibles a la estimulación por hormonas. Las enzimas de Neurospora crassa (181,182), Phycomyces blakesleeanus (176) y Tetrahymena pyriformis (179) constituyen excepciones, ya que se encontró que son estimuladas por hormonas.

La mayoría de las adenilato ciclasas de eucariontes inferiores están debilmente unidas a la membrana plasmática, de la cual pueden ser extraídas por detergentes o sales (179,183).

También se ha observado que la actividad de adenilato ciclase de algunos eucariontes inferiores varía durante el ciclo de vida (52,180,184,185).

En Dictyostelium discoideum se ha descrito una actividad de adenilato ciclase activa con iones  $Mg^{2+}$  (186) y estimable por AMPc (187). Recientemente se ha demostrado que esta enzima está asociada a pequeñas vesículas membranosas no relacionadas con las membranas plasmáticas (188).

En esporangióforos de Phycomyces blakesleeanus (176) se describió una actividad de adenilato ciclase con propiedades similares a la enzima de mamíferos: activa con iones  $Mg^{2+}$ , activable por GTP, inhibible por altas concentraciones de nucleósidos tri-

fosfatos y activable por catecolaminas.

En Neurospora crassa Torres y colaboradores estudiaron exhaustivamente esta enzima tanto en la cepa salvaje como en una cepa mutante carente de pared celular (57,181,182,189). Esta enzima particulada pudo solubilizarse mediante el empleo de sales. La enzima soluble fue purificada por métodos clásicos y se determinaron sus parámetros moleculares y propiedades catalíticas, siendo éstas semejantes a las de la enzima de membrana; en cuanto a los parámetros moleculares éstos son similares a los descritos para la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa de tejidos sensibles a hormonas (183).

#### VIII. 2. Adenilato ciclasa en *Mucor rouxii*

En nuestro laboratorio se aisló y caracterizó una adenilato ciclasa de fracciones particuladas de la forma filamentosa y levaduriforme del hongo (44). Por acción de detergentes esta actividad se separa de los fragmentos de pared celular y se la encuentra en una fracción membranosa que sedimenta a 105.000 x g (184). Las propiedades cinéticas de la enzima unida a membrana son semejantes a las de las enzimas de otros eucariontes inferiores en cuanto a requerimiento de iones  $Mn^{2+}$  y la insensibilidad a iones  $F^{-}$  y a nucleótidos de guanina (190). Parte de la actividad particulada pudo ser solubilizada por la acción de ClK 0,5 M

(190). La enzima soluble tiene un peso molecular significativamente más alto (500 K) que el encontrado para la enzima soluble de N. crassa (202 K) (183), pero muy semejante a la enzima de levadura de panadería (173).

#### IX. FOSFODIESTERASA

Hace aproximadamente un cuarto de siglo Sutherland y Rall (191), describieron brevemente una enzima, presente en varios tejidos de mamíferos, posiblemente una diesterasa, que era capaz de catalizar la hidrólisis de AMPc a 5' AMP. Casi contemporáneamente Drummond y Perrott-Yee (192) encontraron en cerebro de conejo que la conversión de AMPc a 5' AMP estaba catalizada por una actividad diesterásica presente en ese tejido. En 1962, Butcher y Sutherland (193) purificaron parcialmente la enzima de corazón bovino y describieron sus propiedades y distribución subcelular.

La reacción general que cataliza esta actividad enzimática puede verse en la Figura 4.

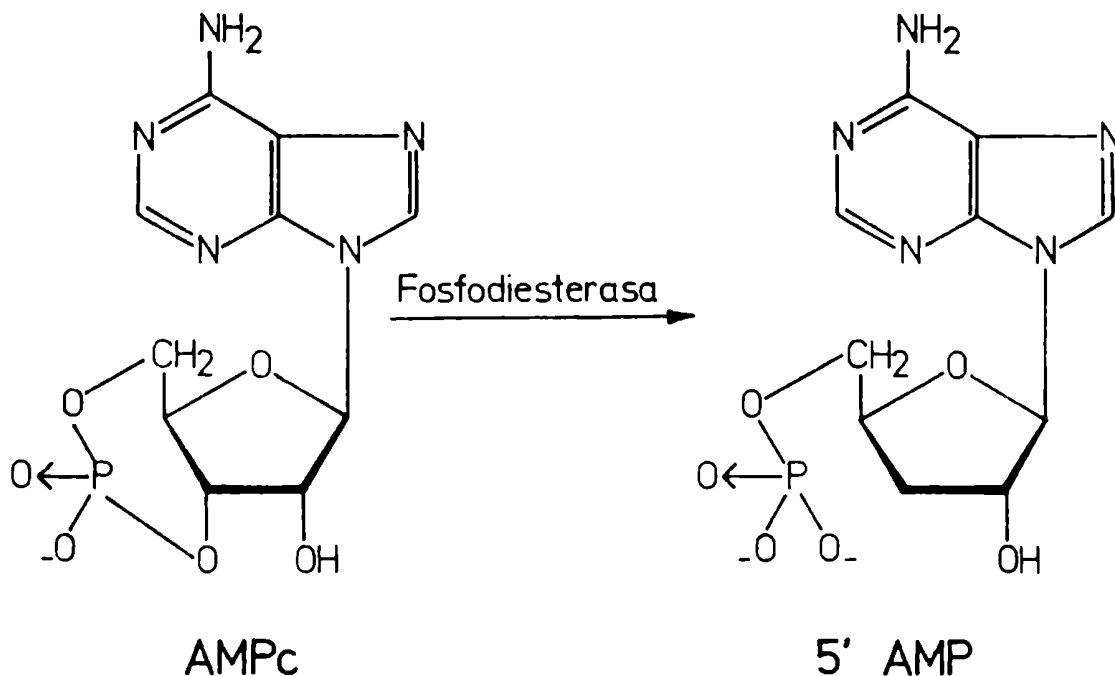
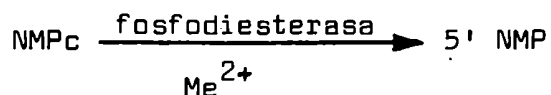


Figura 4: Hidrólisis del AMPc por la fosfodiesterasa de AMPc.

O en forma general, para la actividad de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos:



Donde NMPc indica generalmente: AMPc o GMPc.

En general esta enzima es activada por cationes divalentes  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ .

El gran cambio de energía libre ( $\Delta F = - 8.000 \text{ cal/mol}$ ) que está asociado a la hidrólisis del AMPc, en condiciones fisiológicas, sugiere que la hidrólisis del AMPc está muy favorecida (194).

### IX. 1. Formas múltiples

Los primeros trabajos sobre actividad de fosfodiesterasa (PDE) en diversos tejidos de mamíferos (192,193,195,196), mostraron que aparecía una actividad soluble de PDE con una  $K_m$  de aproximadamente  $10^{-4}$  para el AMPc. En base a estos resultados se cuestionó el significado fisiológico de esta enzima con tan baja afinidad para el sustrato, ya que la constante de afinidad es dos órdenes de magnitud superiores a los niveles intracelulares de AMPc en esos tejidos (197). Con el desarrollo de métodos de ensayo más sensibles, varios autores (198,199) lograron detectar una actividad de PDE más afín por el sustrato. Actualmente se sabe que la mayoría de los tejidos de mamíferos contienen al menos dos formas de PDE de AMPc (Ac-PDE) con distinta afinidad para el nucleótido cíclico. Las primeras evidencias de la existencia de más de una forma de PDE fueron de orden cinético (198-201).

Thompson y Appleman (202) lograron por primera vez, a partir de tejido de cerebro, la separación física de dos formas de peso molecular y características cinéticas diferentes. La forma de alto peso molecular (400 K) era capaz de hidrolizar AMPc y GMPc y tenía baja afinidad relativa para ambos sustratos. La forma de bajo peso molecular (200 K) tenía alta afinidad para el AMPc y no hidrolizaba GMPc, presentó una cinética indicativa de cooperatividad negativa y se postuló que representaría la forma fisiológica de la enzima.

A partir del trabajo ya clásico de Thompson y Appleman, se han ido encontrando más de una forma de PDE en casi todos los tejidos de mamíferos estudiados, habiéndose detectado hasta siete isoenzimas en tejidos de ratón y conejo, con no más de cuatro formas distintas por tejido (203). Muchas de las formas de PDE de mamíferos son interconvertibles (204,205).

En los trabajos de revisión de Appleman y colaboradores (197), Appleman y Terasaki (206), Wells y Hardman (207) y Strada y Thompson (208) se pueden encontrar excelentes recopilaciones de las distintas formas de PDE encontradas en diferentes organismos. Las distintas formas de PDE difieren en: comportamiento cinético, especificidad y afinidad por el sustrato, peso y forma molecular, sensibilidad diferencial a la temperatura y cationes, localización tisular y distribución subcelular, punto isoeléctrico, sensibilidad a agentes farmacológicos, modulación por distintos efectores (v.g. calmodulina), sensibilidad a enzimas proteolíticas. Pocas de estas formas múltiples han sido purificadas a homogeneidad, siendo posible que una o más de estas formas representen una composición de actividades (207).

Los métodos más utilizados para separar físicamente las distintas formas de PDE incluyen: filtración por gel (199,202,209,210), cromatografía de intercambio aniónico (143,211-215), electroforesis en gel de almidón (203,216), electroforesis en gel de poliacri

lamida (217-219), centrifugación en gradientes de densidad (143,204,220), isoelectroenfocado (221-223) y cromatografía de afinidad (213).

Las principales formas de PDE encontradas en los distintos tejidos estudiados y sus características, pueden resumirse de la siguiente manera:

(I) Fosfodiesterasa de GMPc o fosfodiesterasa de alta Km para AMPc. Corresponde a la descrita originalmente por Butcher y Sutherland (193) en corazón bovino y que fuera posteriormente purificada en otros laboratorios (224,225) y en otros tejidos (226,227). Sería representativa de una de las formas principales de PDE; hidroliza el GMPc en el rango  $\mu\text{M}$  y el AMPc al menos en un orden de magnitud mayor. Esta enzima es generalmente soluble y activable por calmodulina (228). La enzima parcialmente purificada presenta una cinética clásica para la hidrólisis de ambos nucleótidos cíclicos en un rango amplio de concentración de sustrato y en presencia o ausencia de calmodulina. Esta forma enzimática se ha encontrado en la mayoría de los tejidos de mamíferos estudiados; a veces en ciertos tejidos en donde se informó su ausencia se encontró que en realidad estaba en muy bajas concentraciones, como por ejemplo en médula adrenal de vaca y de rata (229).

Se piensa que es una sola enzima la que cataliza la hidrólisis de ambos nucleótidos, ya que la hidrólisis de cada uno de

ellos es inhibida competitivamente por el otro con una  $K_i$  semejante a sus valores respectivos de  $K_m$ , lo que indicaría que está involucrado un solo sitio catalítico; además, las actividades diesterásicas de AMPc y GMPc (Ac-PDE y Gc-PDE) permanecen en relación constante durante la purificación de la enzima y la inactivación térmica de ambas actividades se produce a velocidades similares (227,230).

(II) Fosfodiesterasa específica de AMPc de alta afinidad. Esta forma ha sido encontrada en casi todos los tejidos de mamíferos estudiados (207) y en otros vertebrados (231) y aparece asociada a fracciones particuladas (211,232,233). Puede ser liberada parcialmente a la fracción soluble por tratamiento con detergentes y shock osmótico (197) o por sonicación (202,234). Aparentemente esta enzima particulada es una proteína integral de las membranas y algunas de sus propiedades enzimáticas (v.g. sensibilidad a la calmodulina) dependen de la integridad estructural de las membranas. También se han descrito fosfodiesterasas específicas para AMPc solubles (215,235,236).

La actividad enzimática particulada es insensible a calmodulina pero sensible a hormonas y aumenta en respuesta a niveles elevados de AMPc en células intactas (234,237,238).

Tanto la forma particulada como la soluble se caracterizan por una alta afinidad para el AMPc, siendo inhibida la hidrólisis



de este nucleótido por concentraciones crecientes de GMPc en el rango  $\mu\text{M}$  (211). En muchos casos la hidrólisis del AMPc presenta una cinética no michaeliana (197,201). Este comportamiento cinético puede explicarse de varias maneras: 1) presencia de formas múltiples con distinta afinidad por el sustrato (239), 2) una enzima alostérica que presenta cooperatividad negativa (240), en la cual la enzima tendría dos sitios catalíticos. Inicialmente ambos sitios son idénticos en cuanto a sus constantes de ligando; luego de la unión de la primer molécula de AMPc la interacción sitio-sitio o subunidad-subunidad puede provocar una modificación conformacional del segundo sitio, haciendo que este último una en forma más dificultosa otra molécula de AMPc. Este modelo fue propuesto por Russell y colaboradores (241) y puede esquematizarse como se ve en la Figura 5, y es el resultado del análisis por computadora de los datos cinéticos de una enzima parcialmente purificada de riñón de rata, 3) una enzima con más de un sitio de unión, cuyas respectivas constantes de afinidad son diferentes e independientes del grado de saturación con el sustrato (sitios no interactuantes); este modelo, aunque termodinámicamente es equivalente al anterior, no lo es físicamente (241), 4) una enzima que se agrega en formas que tienen distinta afinidad por el sustrato (204).

También se han encontrado en distintos tejidos actividades de PDE altamente específicas para AMPc que presentan una cinética michaeliana (235,242, 243).

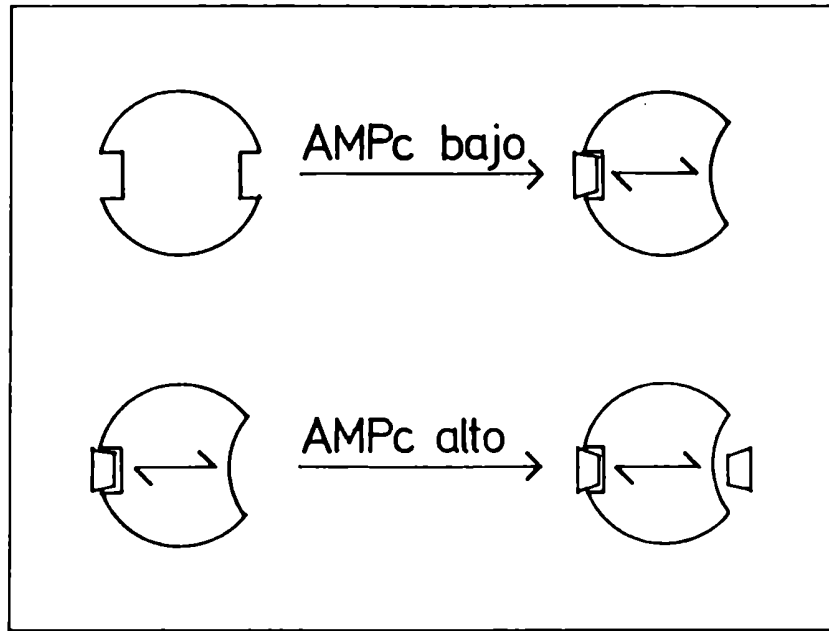


Figura 5: Representación hipotética de un modelo de Ac-PDE con 2 sitios de unión al sustrato que exhiben cooperatividad negativa (241).

Pichard y Cheung (205) encuentran que en la fracción soluble de cerebro bovino e hígado de rata y en homogenados de plaquetas humanas, se obtiene una representación lineal de las dobles recíprocas para la hidrólisis del AMPc solamente cuando la concentración enzimática es muy baja.

(III) Fosfodiesterasa mixta o fosfodiesterasa de AMPc estimulable por GMPc. Otra forma de PDE soluble, tal vez menos distribuida que las anteriores, se caracteriza porque cataliza la hidrólisis tanto de AMPc como de GMPc presentando baja afinidad para ambos. Además bajas concentraciones de GMPc estimulan la hidrólisis del AMPc (también a bajas concentraciones) pero no a la inversa (211,212,244-247). La cinética de esta forma enzimática no es

y por isoelectroenfocado (221), seis fracciones de PDE en preparaciones sonicadas de cerebelo de rata, una sola de estas fracciones podría ser similar a la forma I anteriormente descrita, únicamente por su sensibilidad a la calmodulina, las otras formas pueden representar enzimas distintas o ser formas originadas por proteólisis o por agregación de una o más formas de las presentes originalmente. La existencia de distintos tipos celulares en los tejidos estudiados hace difícil discernir si las diferentes formas enzimáticas derivan del mismo o de diferentes tipos celulares (207). En algunos casos es posible asimilar, por alguna característica, una forma enzimática aislada a alguno de los tres tipos principales mencionados; pero se encuentran características diferenciales. Por ejemplo la PDE aislada y purificada extensivamente de retina de sapo (254) por su afinidad para ambos nucleótidos cíclicos se podría asimilar a la forma I, pero difiere de esta última por su insensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , EGTA o calmodulina (254,255).

Se han señalado formas múltiples de PDE en larva de gusano de seda, una de las cuales fue purificada extensivamente (256-257). La enzima purificada degrada ambos nucleótidos cíclicos y comparte con algunas de las formas múltiples de plantas superiores (210,258) la capacidad de hidrolizar nucleótidos cíclicos de purinas 2'-3' y 3'-5' monofosfatos (210,259). El producto de hidrólisis de los monofosfatos 3'-5' por la enzima de gusano de seda es exclusivamente el 5' monofosfato (256), mientras que en

plantas se producen tanto 3' como 5' monofosfatos (210).

Muchas formas de PDE que aparecen en homogenados celulares son producto del método de aislamiento (223) y a veces no están presentes en las células intactas (224). Los métodos preparativos a la proteólisis limitada durante la extracción pueden contribuir a la multiplicidad aparente de las formas enzimáticas (211); además la agregación de distintas formas enzimáticas puede explicar la aparición de múltiples formas luego de filtración en geles (260).

Se puede concluir que hay que tener muy en cuenta las condiciones experimentales utilizadas al informar la separación y caracterización de formas múltiples de PDE de nucleótidos cíclicos, sobre todo al comparar los resultados con los encontrados por otros autores. Además de la posibilidad de error que puede existir al tratar de extrapolar los resultados obtenidos in vitro con lo que sucede in vivo.

## IX. 2. Activadores de la actividad de fosfodiesterasa

### Imidazol

El primer informe del efecto estimulatorio del imidazol sobre una actividad de PDE in vitro fue el de Butcher y Sutherland (193), quienes encontraron que la actividad de PDE aislada de corazón bo

vino, ensayada a alta concentración de AMPc en buffer conteniendo imidazol presentaba una actividad mayor comparada a la actividad en buffer Tris. Más tarde otros laboratorios encontraron efecto estimulador del imidazol sobre la PDE aislada de otros tejidos superiores, tanto sobre la enzima de alta Km (196,226) como sobre la de baja Km (201).

Utilizando altas concentraciones de AMPc en el ensayo, Roberts y Simonsen (261) demostraron que tanto el imidazol como el imidazol-4-ácido acético a concentraciones altas estimulaban la PDE aislada de cerebro de ratón aumentando la velocidad de disociación de la enzima del producto de la reacción (5' AMP).

Otros investigadores demostraron que el imidazol antagoniza un número de efectos hormonales, que son, o se piensa que son, mediados por AMPc. Así la lipólisis in vivo puede ser contrarrestada por el imidazol, el cual por activación de la PDE, haría disminuir los niveles de AMPc (262). Un mecanismo similar fue propuesto para la acción de la histamina en corazón bovino (263,264). En músculo liso el imidazol antagoniza los efectos de la teofilina (265). Como los niveles de AMPc en los tejidos son generalmente bajos, 1 a 3  $\mu$ M o menos (75,266) se supone que los agentes que afectan la actividad de PDE actúan sobre la forma de baja Km; no obstante la mayoría de los estudios del efecto del imidazol sobre la actividad de PDE descritos anteriormente se realiza-

ron a altas concentraciones de AMPc. Chasin y Harris (267) trabajando con dos PDE de la misma fuente, una de alta Km ( $1 \times 10^{-4}$  M) y otra de baja Km ( $4 \times 10^{-6}$  M), demostraron que la enzima de baja Km es inhibida por el imidazol en el mismo rango de concentración en que la enzima de alta Km es estimulada de 30 a 60 %.

Estos resultados sugieren que los efectos "anti-AMPc" del imidazol en los tejidos, son mediados por un efecto sobre la PDE de alta Km o bien que los efectos del imidazol no están relacionados a alteraciones en la actividad de PDE.

#### Nucleótidos cíclicos

En cultivos de varias líneas celulares se vió que los mecanismos responsables de los cambios en la actividad de PDE están relacionados, a veces, con los niveles intracelulares de AMPc. Por ejemplo, se observó que los niveles altos de AMPc inducen la síntesis de novo de la Ac-PDE, principalmente la forma de alta afinidad, en fibroblastos de distintos orígenes (234,245,268,269), células de glioma (270), linfoma (271) y hepatoma (272). Estos trabajos demostraron que en presencia de agentes capaces de aumentar los niveles intracelulares de AMPc, como  $Bt_2AMPc$  y/o metilxantinas, se logra un aumento en la actividad de Ac-PDE. Este aumento de actividad puede ser bloqueado por tratamiento de las células con inhibidores de la síntesis proteica, como cicloheximida y de la síntesis de ARN, como actinomicina D. Ciertas hormonas como la

nor-epinefrina y el isoproterenol, que aumentan los niveles de AMPc en las células de glioma, inducen la actividad de PDE tanto de alta como de baja afinidad, requiriendo esta inducción síntesis de proteína y de ARN, y se propone una regulación hormonal del AMPc a largo plazo mediado por síntesis proteica (270,273).

#### Calmodulina

Varios investigadores, al tratar de purificar la actividad de PDE de distintos orígenes, encontraron que se producía una gran pérdida de la actividad enzimática durante la purificación (192,193,274). Contemporáneamente dos laboratorios trabajando con cerebro bovino (275) y de rata (276), demostraron que la separación de un factor proteico durante la purificación, determinaba la pérdida de actividad enzimática. Más tarde este último grupo (277) demostró que este factor proteico de cerebro de rata activaba solamente a la PDE en presencia de calcio. Actualmente se conoce a esta proteína activadora con el nombre de calmodulina (228). Aparece ampliamente distribuída, tal vez en forma ubicua, en el reino animal. Se la halló en todas las especies de vertebrados estudiadas en concentraciones generalmente mayores que la PDE a la cual activa y aparece en tejidos con actividad de PDE independiente de calcio (197,207,278). Constituye el 0,5% de la proteína total de corteza de cerebro de rata (279) y el 2% de la proteína total del órgano eléctrico de la anguila (280).

Se la ha purificado a homogeneidad a partir de varios tejidos superiores (281-284). Se han estudiado detalladamente sus propiedades fisico-químicas, éstas pueden resumirse diciendo que es una proteína acídica termoestable, de estructura flexible, que presenta una composición particular de aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 19 K (228,278).

La relación entre la calmodulina y la actividad de PDE varía mucho de tejido en tejido (285), lo mismo que durante el desarrollo ontogénico del tejido u organismo, sugiriendo que ambas proteínas estarían bajo controles genéticos separados (279). Esta variabilidad puede explicarse también en base a la heterogeneidad celular de cada tejido, a las distintas formas de PDE, algunas de las cuales no son activables, o porque el activador tenga otra función no relacionada con el metabolismo de los nucleótidos cíclicos.

Aunque la mayoría de los trabajos sobre calmodulina se refieren a la forma soluble de esta proteína, varios autores (279,282, 286) han señalado la presencia de calmodulina en fracciones particuladas de diversos tejidos. La partición de la proteína entre la fracción soluble y la particulada en cerebro de rata depende de la presencia de  $Ca^{2+}$  o EGTA en el medio de homogenización (279-282). Gnegy y col. (286), trabajando con cerebro y médula adrenal de rata, mostraron que en un sistema libre de células el activador es liberado a la fracción soluble en respuesta a la adición de quina



sa de proteína dependiente de AMPc, ATP y AMPc. En varios tejidos de rata la actividad de PDE de nucleótidos cíclicos estimulable por calmodulina y la calmodulina quedan asociadas a la fracción microsomal luego de someter a esta fracción a tratamiento hiposmótico y centrifugación (279). El tratamiento con detergentes desenmascara la actividad latente de calmodulina unida a membrana.

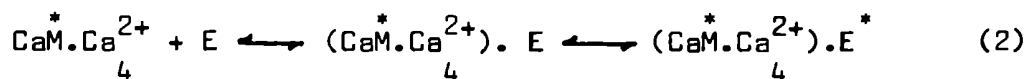
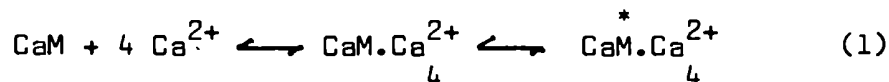
Se ha aislado una proteína similar a la calmodulina en protozoos (287-288), hongos (288-291), invertebrados (292-295) y plantas superiores (296-298), capaz de activar la PDE dependiente de calcio de tejidos superiores.

La función que desempeña esta proteína en organismos inferiores no se conoce ya que es incapaz de activar a la PDE homóloga. La activación de la PDE de mamíferos por extractos de eucariontes inferiores sugeriría que la estructura del activador protéico se conservó durante la evolución (292). En procariontes, aunque no se ha demostrado definitivamente su presencia, se vió que la adenilato ciclasa de Bordetella pertusis es activada por calmodulina de cerebro de ternero (299).

Teo y Wang (300) fueron los primeros en demostrar que la calmodulina purificada de corazón bovino, es una proteína ligante de calcio y que la PDE no es activada a menos que estén presentes iones  $Ca^{2+}$ . La calmodulina purificada contiene un mol de  $Ca^{2+}$

asociado (283), esto explicaría la presencia de calcio en fosfo-  
diesterasas parcialmente purificadas que conservan su máxima ac-  
tividad hidrolítica (301,302). Estudios de ligado de  $\text{Ca}^{2+}$  muestra-  
ron que la calmodulina une 4 moles de  $\text{Ca}^{2+}$  con alta afinidad  
(303-305). La PDE activable por calmodulina requiere, aparte de  
 $\text{Ca}^{2+}$ , un catión divalente para su actividad, en general  $\text{Mg}^{2+}$ ;  
ambos cationes no pueden reemplazarse en sus respectivas funcio-  
nes (283,300); no obstante el  $\text{Mn}^{2+}$ , pero no el  $\text{Mg}^{2+}$ , puede sus-  
tituir al  $\text{Ca}^{2+}$  en los ensayos in vitro (304). Como la concentra-  
ción de calcio necesaria para lograr el 50% de la activación má-  
xima es del orden de su concentración celular (1-5  $\mu\text{M}$ )  
(283,300,306) y como la concentración intracelular total de  $\text{Ca}^{2+}$   
es 100 veces superior a la del  $\text{Mn}^{2+}$ , el  $\text{Ca}^{2+}$  sería el metal uti-  
lizado fisiológicamente (304).

El mecanismo de acción de la calmodulina sobre la PDE, fue  
establecido por primera vez por Teo y Wang en 1973 (300). Dicho  
mecanismo puede resumirse de la siguiente manera (278).



Donde: CaM =calmodulina, E=apoenzima inactiva o parcialmente  
activa y (\*) indica una nueva conformación.

En la primera etapa la CaM liga 4 moles de  $\text{Ca}^{2+}$  por mol de CaM de acuerdo a la ecuación (1), y la CaM adopta una conformación más helicoidal transformándose en la especie activa, la que se une reversiblemente a la apoenzima en la segunda etapa de acuerdo a la ecuación (2) y da como resultado la formación de una holoenzima activa. De acuerdo a este esquema, el flujo celular de calcio tiene un papel fundamental en la regulación de la actividad de la enzima. Sólo una de las formas múltiples de PDE es activada por CaM, la que ha sido identificada como la enzima soluble de alta  $K_m$  (ver sección IX. 1) aunque recientemente se ha informado que la PDE de baja  $K_m$  de membrana de hígado es dependiente de CaM para su actividad (307).

El efecto activador de la calmodulina sobre la actividad de PDE de nucleótidos cíclicos, se debe a cambios en la  $V$  (308,309), cambios en la  $K_m$  aparente (227,310) o cambios de ambos parámetros (215,281).

Aparte de activar a la PDE de nucleótidos cíclicos, la calmodulina es capaz de regular diversas actividades enzimáticas: adenilato ciclasa de cerebro, ATPasa y bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana plasmática de eritrocitos, quinasa de la cadena liviana de la mioesina, quinasas de membrana de cerebro, fosforilasa b quinasa de músculo esquelético, quinasa dependiente de NAD de plantas y fosfolipasa A2 de plaquetas humanas. La calmodulina interviene

además en la regulación de otros procesos celulares tales como: armado y desarmado de microtúbulos y estimulación de funciones postsinápticas. A través del control de las quinasas de proteínas ejerce una influencia indirecta sobre una variedad de procesos celulares (278,311).

### IX. 3. Efecto de hormonas

Se conoce desde hace mucho tiempo que la insulina tiene numerosos efectos sobre tejido adiposo y hepático, que son antagónicos a los producidos por la epinefrina y el glucagón. Los efectos de estas últimas hormonas están relacionados con el aumento de los niveles de AMPc como consecuencia de la estimulación de la adenilato ciclase (197). Butcher y colaboradores (312,313) encontraron que la insulina puede reducir los niveles de AMPc en tejido adiposo. El efecto antagónico de la insulina con el glucagón y las catecolaminas sobre los niveles de AMPc fue demostrado en hígado por Exton y colaboradores (314).

Los estudios del efecto de la insulina sobre la PDE arrojaron resultados contradictorios que a veces no guardaban una correlación aparente con el tipo de tejido elegido u otra variable identificable. Así, la actividad de PDE de tejido adiposo no mostró una respuesta evidente en relación al estado diabético del animal

o al tratamiento con insulina (315,316). La mayoría de las investigaciones en las que no se encontró una relación clara entre el efecto de la insulina y la actividad de PDE, se llevaron a cabo ensayando la actividad enzimática a altas concentraciones de AMPc, capaces de enmascarar cambios sutiles de la actividad enzimática; Loten y Sneyd (317) señalaron este hecho e informaron por primera vez, en forma concluyente, un aumento de la actividad de la PDE de alta afinidad para AMPc cuando incubaron in vitro células grasas con insulina. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por otros investigadores (318-320). Este aumento de actividad implica un aumento en la V de la enzima de alta afinidad particulada. En adipocitos de rata el efecto de la insulina, lo mismo que el de la epinefrina y del glucagón, se observa en la fracción particulada, mientras que en hepatocitos se demuestra más fácilmente sobre la enzima solubilizada por shock osmótico (237,238,320). En células grasas y hepatocitos de rata la enzima activable por insulina parece estar asociada con el retículo endoplasmático más que con la membrana plasmática (207,320).

En la Tabla 3 extraída del trabajo de Strada y Thompson (208) se resume el efecto de varias hormonas sobre la actividad de PDE, el tejido en el cual se estudió, el sustrato de la enzima y el efecto sobre ésta.

TABLA 3

Hormonas que afectan la actividad de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos.

<u>Hormona</u>	<u>Tejido</u>	<u>Preparación</u>	<u>Sustrato</u>	<u>Efecto</u>
Insulina	Célula grasa	Particulada	AMPc	Aumenta
	Hígado	Particulada	AMPc	Aumenta
	Músculo	Tejido entero	AMPc	Aumenta
	Cultivo celular	Homogenado	AMPc, GMPc	Aumenta
	Hepatocito	Particulada	AMPc	Aumenta
Glucagón	Hepatocito	Particulada	AMPc	Aumenta
Hormona del crecimiento	Hígado	Particulada	AMPc	Aumenta
Catecolaminas	Célula grasa	Particulada	AMPc	Aumenta
	Pineal	Homogenado	AMPc	Aumenta
	Cultivo celular	Soluble	AMPc	Aumenta
ACTH	Célula grasa	Particulada	AMPc	Aumenta
Prostaglandinas	Cultivo celular	Homogenado	AMPc	Aumenta
Colecistocquina	Vesícula biliar	Homogenado	AMPc	Aumenta
Tiroxina	Célula grasa	Particulada	AMPc	Disminuye
	Tiroide	Soluble	AMPc, GMPc	Disminuye
	Tiroide	Particulada	AMPc	Redistribuye
Glucocorticoides	Hígado	Homogenado	AMPc, GMPc	Disminuye
	Músculo	Homogenado	AMPc, GMPc	Disminuye
	Corazón	Homogenado	AMPc	Disminuye
	Pulmón	Homogenado	AMPc	Disminuye
	Hepatoma	Homogenado	AMPc	Disminuye
	Linfocito	Sonicado	AMPc	Disminuye
Aldosterona	Vejiga	Homogenado	AMPc	Disminuye
Estrógeno	Utero	Soluble	AMPc	Disminuye
Gonadotropinas	Testículos	Soluble	GMPc	Disminuye

#### IX. 4. Inhibidores de la actividad de fosfodiesterasa

##### Metilxantinas y papaverina

Con el objeto de estudiar los posibles tratamientos de distintos trastornos metabólicos y/o endocrinológicos, se comenzó a estudiar la incidencia de ciertos compuestos farmacológicamente activos sobre la actividad de fosfodiesterasa. Este tipo de estudio sirvió, al mismo tiempo, para una mejor caracterización del sitio activo de la enzima.

Los compuestos más estudiados, en cuanto al efecto inhibitorio de la actividad de PDE son las metilxantinas, análogos estructurales del núcleo de adenina. Ya en los primeros trabajos de caracterización de la actividad de Ac-PDE de mamíferos se describe el efecto inhibitorio de estos compuestos (191,193). Las metilxantinas más utilizadas como inhibidores de la actividad enzimática son: cafeína, teobromina, teofilina y 1-metil, 3-isobutil xantina (MIX). La estructura de estos compuestos se observa en la Fig. 6. Como puede verse, estos compuestos son derivados alquilados del núcleo xantina en las posiciones 1,3 y 7.

Estos compuestos se utilizaron con frecuencia para evitar la degradación "no deseada" de los nucleótidos cíclicos en ensayos de la actividad ciclásica o como agentes sinérgicos para estudiar tanto in vitro como in vivo el efecto de los nucleótidos

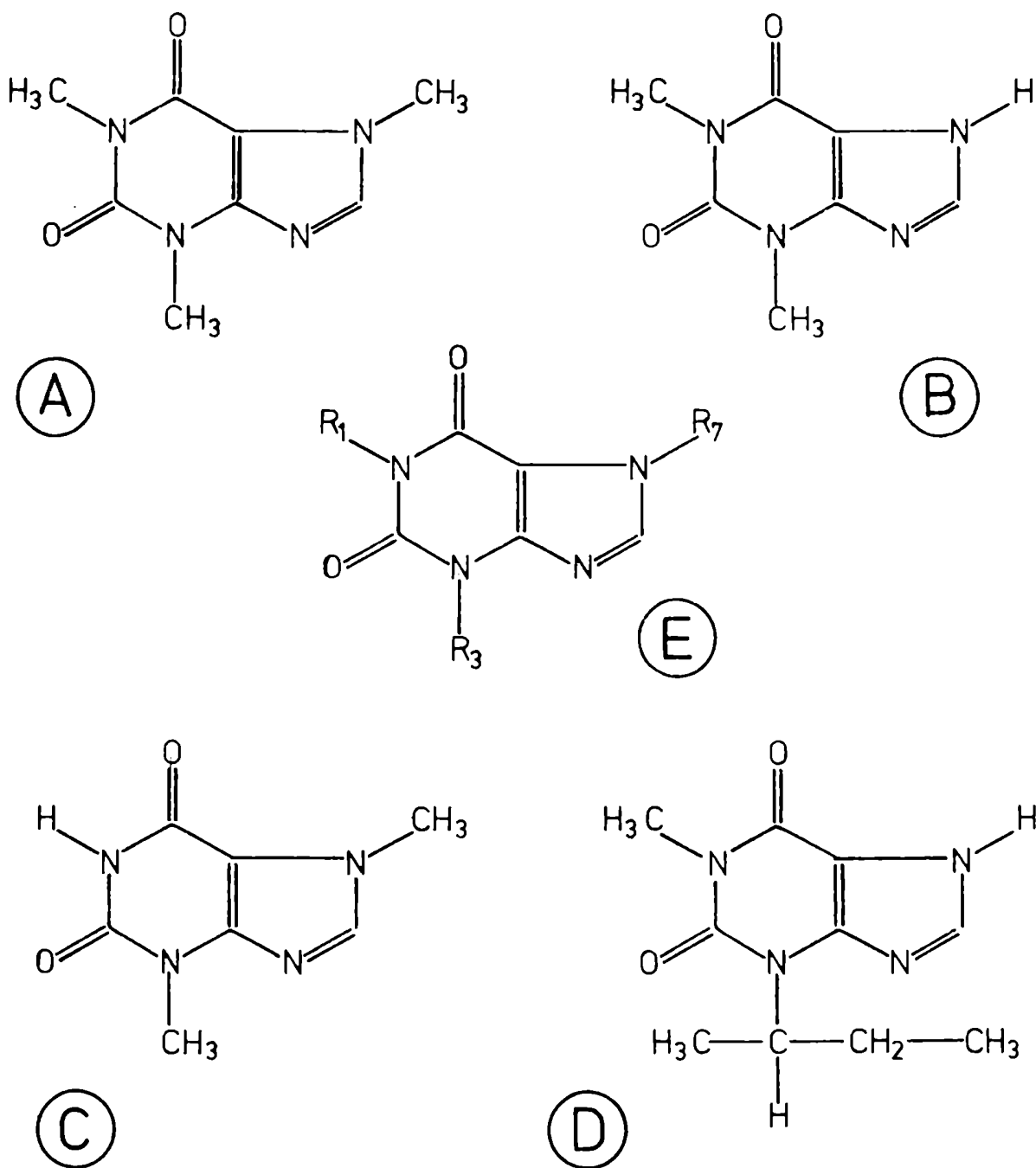


Figura 6: Estructura de las metilxantinas. Caf eina (A), teofilina (B), teobromina (C), 1-metil,3-isobutil xantina (D), nucleo xanti na indicando la posición de los sustituyentes alquilo (E).



cíclicos agregados en forma exógena. Además se han utilizado para estudiar el papel de estos nucleótidos en la acción hormonal (197,267).

Los estudios in vitro de la inhibición de la actividad de PDE por teofilina, indicaron que este compuesto es un inhibidor competitivo de la actividad fosfodiesterásica de alta y baja afinidad aislada de distintas fuentes (193,196,201,321).

Se ha informado (321) que la teofilina y el MIX, en el rango mM de concentración, estimulan la actividad fosfodiesterásica de nucleótidos cíclicos de varios tejidos de rata, cuando estas enzimas se ensayan a una concentración 1 mM de sustrato. El MIX resultó un inhibidor muy potente de la PDE aislada de adrenales y adipocitos de rata; se encontró que este compuesto es 10 a 15 veces más efectivo que la teofilina como inhibidor de la actividad de PDE.

Goodsell y colaboradores (322) ensayaron distintos derivados  $\beta$  sustituidos de la teofilina como inhibidores de la actividad de PDE total de corazón bovino, los derivados no ramificados metil a n-hexil, ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, isopropil e isobutil resultaron inhibidores más potentes que la teofilina.

La papaverina, un alcaloide derivado del opio, relajante de la musculatura lisa, resultó ser un potente inhibidor de la PDE de nucleótidos cíclicos aislada de varios tejidos (323,324).

Su acción inhibitoria es de 10 a 100 veces superior a la de la teofilina (321,325). El tipo de inhibición por papaverina es de tipo competitivo o no competitivo dependiendo del grado de pureza de la enzima (326). Derivados de la papaverina (v.g. quinoparina, isoquinoleína, 6-Br papaverina) son inhibidores potentes de la PDE de distintas fuentes, siendo los 6,7 metoxi sustituyentes importantes para el efecto inhibitorio (267).

Chasin y Harris (267) dan una excelente recopilación de compuestos farmacologicamente activos inhibidores de la actividad fosfodiesterásica.

#### Bases purínicas y pirimidínicas, nucleósidos y nucleótidos

Estos compuestos resultaron en muchos casos inhibidores de la actividad de PDE. Cheung (327) fue el primero en informar que concentraciones altas de ATP y pirofosfato inhiben a la Ac-PDE de cerebro, siendo la inhibición del tipo mixto. Este mismo autor (196) encontró que el GTP, UTP, TTP, ITP y CTP inhiben a la PDE de cerebro de rata, actuando probablemente por el mismo mecanismo que el ATP. Esto se debería al quelato del metal divalente en la mezcla de reacción por concentraciones altas de este nucleótido. Huang y Kemp 1971 (201) encontraron que la adenina y la adenosina son inhibidores de la PDE de músculo esquelético de conejo aun a bajas concentraciones.

Se encontró que varios nucleósidos y bases libres (adenosina, inosina, guanosina y deoxiadenosina) inhiben la PDE de células grasas (328,329) y de plaquetas humanas (330).

#### Inhibidores proteicos

Además de los inhibidores ya mencionados, se ha demostrado la presencia de numerosos factores endógenos, en general proteínas, capaces de inhibir la actividad de PDE. Miki y Yoshida (226) fueron los primeros en describir, en preparaciones de cerebro de rata, la presencia de un inhibidor protéico cuya acción estaba regulada por iones calcio.

Dumler y Etingof (331) aislaron y purificaron de retina de buey una proteína inhibidora de la PDE de nucleótidos cíclicos, principalmente de la actividad de Ac-PDE. Esta proteína es termoestable a pH ácido y posee un peso molecular de 38 K. El efecto sobre la actividad enzimática se traduce en una disminución de la V. Aparentemente este inhibidor sería un complejo protéico y tendría asociada una subunidad termoestable de peso molecular 15 K activadora de la PDE. Más tarde Liu y Wong (332) detectaron, en retina bovina, la presencia de una proteína termoestable inhibidora de la actividad de PDE de nucleótidos cíclicos homóloga y de otros tejidos; esta proteína al igual que la de Dumler y Etingof inhibe la actividad de PDE no activable por  $Ca^{2+}$ ,

pero su peso molecular es de 540 K.

Wang y Desai (333) y Sharma y colaboradores (334) describieron en tejido cerebral dos proteínas inhibidoras de la actividad de PDE activable por  $\text{Ca}^{2+}$ . Ambas proteínas inhiben la actividad enzimática ligando la calmodulina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Una de estas proteínas es termolábil, de peso molecular 80 K y se la conoce como calcineurina (335). Se demostró que esta proteína inhibidora forma un complejo ternario con el calcio y la calmodulina (336). Klee y colaboradores (335) purificaron esta proteína a homogeneidad a partir de cerebro bovino y encontraron que poseía una estructura dimérica formada por dos subunidades A y B de pesos moleculares 61 y 16 K respectivamente. La calcineurina sería el principal componente ligante de calmodulina en cerebro bovino, y su cantidad en este tejido sería 52 mg/Kg de peso húmedo (337). Wolf y Hofmann (338) aislaron y purificaron de corazón bovino una proteína estructuralmente similar a la calcineurina.

La segunda proteína ligante de calmodulina aislada de cerebro bovino, es termoestable. El peso molecular de la proteína homogénea fué determinado por Sharma y colaboradores (334) quienes obtuvieron un valor de 70 K. Estos mismos autores demostraron que se trata de una proteína monomérica.

Beale y colaboradores (339) purificaron de testículo de rata un inhibidor de la PDE dependiente de calcio de peso molecular 20 K,

que sería análogo al inhibidor termoestable de la quinasa de proteína caracterizado por Walsh y colaboradores (340) en músculo esqueletal de conejo.

En plantas superiores también se han aislado factores proteicos endógenos inhibidores de la actividad diesterásica (210).

#### IX. 5. Fosfodiesterasa en eucariontes inferiores

En algunos eucariontes inferiores, principalmente hongos, se ha informado de la presencia de más de una forma de PDE, pero en muchos casos no se han podido asimilar a las tres formas principales descritas para tejidos superiores (ver sec. IX. 1.)

Así, se ha descrito en distintas especies del orden Acrasiales, principalmente en Dictyostelium discoideum, la existencia de al menos dos y posiblemente más, formas de Ac-PDE (341-343). Una de las formas es extracelular (ePDE) y se excretaría al medio como una forma de alta afinidad ( $K_m$ , 15  $\mu$ M) y coeficiente de sedimentación 6 S; en ausencia de DTT esta forma pasaría espontáneamente a otra forma de baja afinidad ( $K_m$ , 2 mM) y coeficiente de sedimentación 6,7 S (344,345). El aumento del coeficiente de sedimentación y la disminución de la afinidad por el sustrato, se deberían aparentemente a la asociación de la enzima con un inhibidor extracelular, el cual sería inactivado por DTT (345-347). Este inhibidor de naturaleza proteica y de bajo peso molecular fue descrito

por primera vez por Riedel y Gerish (348) y se excretaría al medio cuando se detiene el crecimiento por agotamiento de nutrientes (347).

Malchow y colaboradores (349) describieron otra forma de Ac-PDE asociada a membranas (mPDE) y cuyo nivel aumenta en los estadios previos a la agregación; Pannbacker y Bravard (343) encontraron que esta actividad es de alta afinidad para el AMPc (Km.  $10 \mu\text{M}$ ).

La ePDE fue considerada parte del sistema de señalización que determina la agregación de las amebas en respuesta a gradientes de AMPc. Posteriormente Yeh y colaboradores (350) cuestionaron esta hipótesis, ya que encontraron que el AMPc exógeno induce no solo la PDE extracelular sino también la enzima unida a membrana.

Otros hongos en los cuales se ha informado la presencia de formas múltiples de PDE son Physarum polycephalum y Aspergillus niger (351-353). En el caso de la primera especie una de las formas es particulada y la otra es soluble y se excreta al medio. Ambas formas requieren  $\text{Mg}^{2+}$ , son de baja afinidad para el AMPc (Km en el rango mM) y son inhibibles por metilxantinas y por ATP (351). Kincaid y Mansour (352) encuentran que las actividades de PDE en este organismo difieren en sus características cinéticas, presentando la forma particulada una cinética no michaelis

liana para la hidrólisis del AMPc; las dos formas difieren en su respuesta a distintos inhibidores (v.g. metilxantinas, quazodina) que al igual que el AMPc son agentes quimiotácticos para el movimiento de las mixamebas. En el caso de A.niger, también se ha detectado la presencia de dos actividades de Ac-PDE, una extracelular (E-PDE) y otra intracelular (I-PDE). La enzima intracelular es soluble siendo la Km para el AMPc del orden mM, mientras que la Km de la E-PDE para este nucleótido cíclico es de 18  $\mu$ M; además, la enzima extracelular sensible a un inhibidor dializable endógeno (353).

En Saccharomyces cerevisiae, Fujimoto y colaboradores (354) describieron y purificaron una actividad de Ac-PDE soluble, inhibible por GMPc y por metilxantinas. El peso molecular calculado para esta enzima es de 64 K. En S. carlbergensis se describió una actividad de Ac-PDE soluble de baja afinidad para el sustrato (Km 0,2 mM), estimulable por iones  $Mn^{2+}$  e inhibible por ATP, PPI y polifosfato inorgánico (355).

En Blastocladiella emersonii, Maia y Camargo (49) demostraron la existencia de una actividad de Ac-PDE en la fracción soluble de extractos de zoosporas. Dicha actividad es estimulable por iones  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $K^{+}$ ; las metilxantinas ensayadas y ciertos cationes ( $Ca^{2+}$  y  $Li^{+}$ ) resultaron inhibitorios de la actividad enzimática. En este organismo la adenina es un inhibidor más potente que las metilxantinas. Vale y colaboradores (220) describieron

una actividad de Gc-PDE soluble, ligeramente estimulable por iones  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  e inhibible por metilxantinas. Estos mismos autores lograron separar en gradientes de glicerol tres picos de actividad de PDE, dos de los cuales hidrolizan específicamente GMPc presentando una cinética no michaeliana con  $K_m(s)$  4 y  $40 \mu M$  y que posiblemente representen un equilibrio de asociación entre subunidades. El tercer pico de actividad, que aparece en la zona de menor coeficiente de sedimentación, es específico para la hidrólisis de AMPc, presentando una cinética michaeliana con una  $K_m$  2 -  $4 \mu M$ .

En Neurospora crassa, Scott y Solomon (356) describieron una actividad de Ac-PDE asociada a la fracción particulada que sedimenta a  $100.000 \times g$ , inhibible por metilxantinas, ADP, ATP y estimulable por imidazol. Recientemente Torres y colaboradores (143,357) señalaron la existencia de formas múltiples de PDE en esta especie. Estos autores encuentran que por cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción soluble de extractos de micelio se separan dos picos de actividad de PDE. La actividad que eluye a menor fuerza iónica presenta alta afinidad para GMPc y AMPc. Esta actividad pudo ser resuelta en gradientes de sacarosa y filtración por gel en tres formas de distinto peso molecular (225, 126 y 57 K). La actividad que eluye de la columna de DEAE-celulosa a mayor fuerza iónica, resultó específica para la hidrólisis de GMPc. Esta actividad también se presenta bajo formas múltiples de diferente peso molecular (320 y 170 K).



En Coprinus macrorhizus se describió una actividad de Ac-PDE que aparece durante la formación de los basidiomas y disminuye durante la maduración de éstos. Esta enzima es inducida por pasaje de la oscuridad a la luz, es activada por cationes divalentes,  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ , e inhibida por 3' AMP, teofilina y cafeína (358).

Finalmente Cohen y Atkinson (359) trabajando con esporangióforos de Phycomyces blakesleeanus, describieron una actividad de Ac-PDE activable por luz azul en presencia de GTP. Los autores postulan que la enzima puede formar parte de un agregado proteico heterogeneo fotoreceptor, explicando así la relación entre la respuesta fototrópica de los esporangióforos y los bajos niveles de AMPc (48). Cohen (360) demostró que esta actividad fosfodiesterásica es soluble, estimulable por  $Mg^{2+}$  y de alta afinidad ( $K_m$  3 y  $12,5 \mu M$ ). El GMPc que no es sustrato de la enzima resultó un inhibidor de la misma a pH neutro. La enzima es ligeramente inhibible por imidazol y por metilxantinas.

#### X. OBJETIVOS

Dada la importancia del AMPc en la morfogénesis de Mucor, el presente estudio está orientado a esclarecer la regulación del metabolismo del nucleótido cíclico en una especie de este hongo: Mucor rouxii.

La hipótesis de trabajo toma como base el hecho experimental conocido de que en todos los organismos en donde se ha estudiado el metabolismo del AMPc, los niveles intracelulares de este metabolito están regulados principalmente por las actividades de las enzimas que lo sintetizan y degradan: adenilato ciclasa y fosfodiesterasa de AMPc respectivamente. La existencia de ambas actividades enzimáticas ya había sido detectada en nuestro laboratorio (44).

La primera parte de este trabajo, se dedicó al estudio de la variación de la actividad de fosfodiesterasa de AMPc durante la morfogénesis aeróbica del hongo. La segunda parte, se centró en el aislamiento y caracterización de la forma soluble de esta enzima, poniendo especial énfasis en la búsqueda de posibles mecanismos de regulación de esta actividad enzimática.

MATERIALES Y METODOS

## I. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO

### I. 1. Organismo

Mucor rouxii (Calmette) Wehmer cepa NRRL 1894, original del Dr. C.W. Hesseltine (Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, 111), fue cedida gentilmente por el Dr. Roger Storck (Rice University, Houston, Texas).

### I. 2. Obtención y cosechas de esporas

Todas las operaciones se realizaron en condiciones de esterilidad. Para obtener las esporas del hongo, el organismo se cultivó en un medio conteniendo agar en polvo al 5% y jugo de tomate comercial (Valle de Oro, Noel, etc.) en partes iguales. El agar y el jugo de tomate se autoclavaron por separado para evitar que la acidez del jugo de tomate hidrolizara el agar en caliente, impidiendo su posterior gelificación. El medio fundido se trasvasó en alícuotas de 50 ml a botellas de Roux que se dejaron 24 horas a temperatura ambiente como prueba de esterilidad, al cabo de ese tiempo se sembró en cada botella 2 ml de una suspensión de esporas (100 esporas/ml). Las esporas se cosecharon cuando se observó la aparición

de esporangios maduros, los cuales se producen al cabo de 5 a 7 días de cultivo a la luz a 28-30°C. La cosecha de esporas se realizó de la siguiente manera: se agregaron a cada botella 20 ml de agua destilada estéril, se rasparon suavemente los esporangios con un ansa de vidrio y se filtró la suspensión de esporas a través de una malla de nylon para separar las hifas y pequeños trozos de agar. Las esporas filtradas se lavaron varias veces por resuspensión con agua destilada estéril y centrifugación a 3.000 x g durante 15 min a 4°C. Finalmente las esporas se suspendieron en agua destilada estéril, se contó una dilución de las mismas en una cámara cuentaglóbulos de Neubauer y se trasvasaron a viales de vidrio estériles los cuales se sellaron y mantuvieron en heladera hasta el momento de ser utilizados. Bajo estas condiciones las esporas permanecen viables aproximadamente 2 meses. La concentración de las esporas osciló generalmente entre  $3 \cdot 10^8$  -  $3 \cdot 10^9$  esporas/ml.

Para el mantenimiento de la cepa se inocularon paralelamente dos tubos en pico de flauta con medio agar-jugo de tomate, los que se mantuvieron en heladera luego de producida la esporulación.

### I. 3. Medio de cultivo

Se utilizó medio de cultivo YPG (24) compuesto por: extracto

de levadura (Difco) 0,3%, peptona (Inorp Tipo MC 3) 1%, glucosa (Roux-Ocefa) 3%. El pH del medio se ajustó a 4,5 con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  5 N. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min. La glucosa se esterilizó separadamente del resto del medio para evitar su caramelización (361) y se mezcló esterilmente con el resto del medio de cultivo.

#### I. 4. Obtención de micelio

Los cultivos se realizaron en frascos Erlenmeyer de dos litros conteniendo 600 ml de medio YPG, estas condiciones favorecen una buena aereación del cultivo (362). Cada frasco se inoculó con  $5 \cdot 10^5$  esporas/ml y se incubó a 28°C durante 15 horas con agitación constante provista por un agitador rotatorio New Brunswick.

El micelio obtenido se cosechó por filtración al vacío sobre papel Whatman nº 1, se lavó con abundante agua fría hasta que el filtrado fuese incoloro y se escurrió entre dos hojas de papel de filtro. Se obtuvieron de 7 a 10 g de micelio (peso húmedo) a partir de 600 ml de medio. El micelio, cortado en trozos, se molió en mortero de porcelana con nitrógeno líquido y el polvo obtenido se guardó a - 70°C.

#### I. 5. Obtención de las distintas formas celulares producidas durante la morfogénesis aeróbica.

Los cultivos para la medición de las actividades enzimáticas se realizaron de la siguiente manera: se inocularon 3-4 l de medio YPG con  $10^6$  esporas/ml y luego de obtener una suspensión homogénea se la fraccionó en tantos Erlenmeyers como muestras se quisieran obtener. Los frascos se incubaron a 28°C con agitación constante durante los tiempos requeridos. Los volúmenes de medio se variaron según las horas de cultivo de manera de obtener en cada caso una cantidad apreciable de material: 600 ml para las muestras que se incubaron durante un período de 7 horas, 400 ml para las que se incubaron entre 7 y 10 horas y 100 ml para las que se incubaron períodos de tiempo mayores. En todos los casos se controló la morfología del cultivo por observación microscópica. Los cultivos de hasta 7 horas se cosecharon por filtración al vacío a través de filtros de membrana y los restantes sobre papel Whatman nº 1. Todas las muestras se guardaron a - 70°C hasta el momento de ser utilizadas.

Los cultivos para medir el crecimiento y aquellos utilizados para valorar los niveles intra y extracelulares de AMPc durante la morfogénesis aeróbica se obtuvieron con el mismo procedimiento anterior, excepto que los volúmenes de los medios de cultivo fueron diferentes; así para los cultivos de hasta 4 horas se utilizaron 100 ml de medio, para los cultivos entre 4 y 7 horas 50 ml y para los períodos de tiempo mayores 10 ml. Al cabo de los tiempos establecidos los cultivos se filtraron a través de filtros de mem

brana. Las células utilizadas para medir el crecimiento, aquellas destinadas a valorar el AMPc intracelular y los filtrados empleados para la valoración del nucleótido cíclico extracelular se procesaron como se indica en las secciones II y III. 1.

## II. MEDICION DEL CRECIMIENTO

El crecimiento se expresó como proteína total por mililitro de medio de cultivo. Las células obtenidas en los distintos estadios durante la morfogénesis aeróbica se cosecharon como se indicó en la sección anterior. Las células se rasparon de los filtros y se sometieron a hidrólisis alcalina para determinación de proteína en el sobrenadante (ver sección X. 4.).

## III. DETERMINACION DE LOS NIVELES INTRA Y EXTRACELULARES DE AMPc.

### III. 1. Procesamiento de las muestras para el ensayo de AMPc.

Para la medición de los niveles de AMPc intra y extracelular, se obtuvo el material como se indicó en la sección I. 5). A los diferentes tiempos indicados las muestras, por duplicado, se filtraron rápidamente a través de filtros de membrana. Los filtros con las células retenidas se sumergieron inmediatamente en 2,5 ml de ClH O,1 N y se congelaron y descongelaron 3 veces por inmersión



en un baño de hielo seco - etanol; las células se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 min y el precipitado celular obtenido se utilizó para la determinación de proteínas. El sobrenadante se llevó a sequedad a presión reducida y el residuo, disuelto en 0,2 ml de buffer acetato de sodio 0,05 M, pH 6,2; se utilizó para la medición del AMPc intracelular.

Los filtrados obtenidos de los mismos frascos de cultivo se utilizaron para la determinación de los niveles extracelulares del nucleótido cíclico. Para ello se tomaron alícuotas de 4 ml de cada muestra, se calentaron 2 min a 100°C y se centrifugaron a 2.000 x g durante 10 min. El sobrenadante obtenido se pasó por una columna de 0,52 x 12 cm de resina AG50W-X8 (100 - 200 mesh) en la forma H<sup>+</sup> (363), previamente calibrada con AMPc [<sup>3</sup>H]. El nucleótido cíclico se eluyó con agua y el eluido se evaporó a sequedad. El residuo, resuspendido en 0,2 ml de buffer acetato de sodio 0,05 M, pH 6,2; se utilizó para la valoración del AMPc extracelular.

La recuperación del nucleótido cíclico, al final de los procesos de extracción descritos, se determinó agregando al comienzo de cada proceso una cantidad conocida de AMPc [<sup>3</sup>H] (15.000 cpm). La recuperación osciló siempre entre el 70 y el 85%.

### III. 2. Valoración del AMPc de las muestras

El contenido de AMPc de las diferentes muestras se determinó empleando el método del radioinmunoensayo (RIA) (364,365) utilizando los reactivos provistos por New England Nuclear. Las muestras fueron previamente acetiladas con el objeto de sensibilizar el ensayo (366).

Para confirmar que la sustancia medida por el método del radioinmunoensayo era efectivamente AMPc, algunas muestras tomadas al azar se preincubaron a 30°C durante 20 min con un exceso de Ac-PDE de corazón bovino. La reacción se detuvo por calentamiento a 100°C durante 2 min. Los tubos se centrifugaron y los sobrenadantes se acetilaron y sometieron al radioinmunoensayo.

## IV. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS

Todas las operaciones se realizaron entre 0 y 4°C.

### IV. 1. Preparación de extractos de los distintos estadios de la morfogénesis aeróbica

El material biológico proveniente de los distintos estadios se molió en un mortero preenfriado con 0,5 volúmenes de buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5; DTT 1 mM, (buffer A) y 2 volúmenes de arena

de mar hasta que por lo menos el 90% de las células estuviesen rotas. La ruptura celular se controló con el microscopio óptico, considerando como célula rota aquella que había perdido el contenido celular. Se añadieron 2 volúmenes de buffer A y la suspensión se filtró a través de una malla de acero inoxidable de 50  $\mu$ m de malla apoyada sobre un embudo Büchner aplicando una leve succión; la arena retenida se lavó con buffer A hasta que el filtrado fuese límpido. El filtrado se utilizó directamente como fuente de PDE.

Para medir la actividad enzimática extracelular se siguieron los lineamientos generales de Chang (341). Se tomaron alícuotas de 20 ml de medio de cultivo filtrado proveniente de los distintos estadios del desarrollo y a cada una se le agregó 2 ml de buffer Tris-ClH 1 M, pH 7,5 y 10 mg de BSA. La proteína se precipitó hasta 80% de saturación con sulfato de amonio sólido. La suspensión obtenida se centrifugó a 8.000 x g durante 20 min en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-2, el precipitado se resuspendió en un volumen mínimo de buffer A y se dializó contra 200 volúmenes del mismo buffer. El dializado se utilizó como fuente de enzima.

#### IV. 2. Obtención de las fracciones subcelulares de micelio

El polvo de micelio proveniente de un cultivo de 16 horas se homogenizó en un homogenizador de vidrio tipo Ten-Broeck con 2

volúmenes de buffer A. A partir de este extracto total se prepararon distintas fracciones subcelulares de la siguiente manera: el homogenizado se centrifugó a 8.000 x g durante 30 min y se separaron el precipitado y el sobrenadante. La fracción precipitada ( $P_8$ ) se lavó con el volumen original de buffer A y se volvió a centrifugar a 8.000 x g. Se juntaron ambos sobrenadantes y se centrifugaron a 100.000 x g durante 60 min en una ultracentrífuga Spinco L. El sobrenadante obtenido constituyó la fracción  $S_{100}$  y el precipitado la fracción  $P_{100}$ . Los precipitados obtenidos a baja y a alta velocidad de centrifugación ( $P_8$  y  $P_{100}$  respectivamente) se resuspendieron por separado en el volumen original con buffer A y se lavaron dos veces antes de su resuspensión final en el mismo buffer.

#### IV. 3. Preparación de los extractos para la purificación, caracterización y regulación de la fosfodiesterasa de AMPc

La homogenización del micelio se llevó a cabo en buffer Tris-ClH 10 mM, pH 7,5; EDTA 4 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, benzamida 20 mM (buffer B). Cuando se trabajó con pequeñas cantidades de polvo de micelio, hasta 10 g, se utilizó un homogenizador de vidrio tipo Ten-Broeck y dos volúmenes de buffer B; para cantidades mayores se utilizó un homogenizador tipo Omni-Mixer, un volumen de buffer B y dos volúmenes de perlas de vidrio de 75-150  $\mu$ m.

La homogenización se realizó en ambos casos hasta que por lo menos el 90% de las hifas estuvieran reducidas a pequeños trozos y vacías de citoplasma. El extracto obtenido se centrifugó a 8.000 x g durante 20 min, se guardó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en el volumen original de buffer B y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones; se juntaron los sobrenadantes y se centrifugaron 60 min a 100.000 x g. El sobrenadante final recuperado constituyó la fracción S<sub>100</sub>.

## V. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

### V. 1. Ensayo de la actividad de la fosfodiesterasa de AMPc

Para la valoración de esta actividad enzimática se utilizaron principalmente dos métodos, A y B, que difieren en la forma de separar los productos de la hidrólisis del AMPc [<sup>3</sup>H] empleado como sustrato. Ocasionalmente se ensayó la actividad enzimática con un tercer método C en el cual no se utiliza sustrato radioactivo.

Método A. Este método, utilizado de rutina, está basado en la técnica en dos etapas de Thompson y Appleman (199); el 5' AMP [<sup>3</sup>H] formado por la acción de la Ac-PDE en la primera etapa de la reacción es convertido en una segunda etapa a adenosina [<sup>3</sup>H] por acción de un exceso de fosfatasa alcalina o de veneno de serpiente. La valoración

ción de la adenosina [ $^3\text{H}$ ] constituye una medida de la actividad de Ac-PDE. La actividad de Ac-PDE se ensayó en una mezcla que contenía, en un volumen final de 0,1 ml, buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5;  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  (o  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  cuando se indique) 10 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, BSA 50  $\mu\text{g}$ , AMPC [ $^3\text{H}$ ]  $6-8 \cdot 10^4$  cpm, AMPC no radiactivo a una concentración que, a menos que se indique, fue de 5  $\mu\text{M}$  y una dilución apropiada de la preparación enzimática. Las incubaciones se realizaron a 30°C durante 20 min.

La reacción se inició por el agregado de la fracción enzimática y se detuvo por inmersión de los tubos en un baño de agua a 100°C durante 45 segundos. Luego que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente, se agregó a cada tubo 1,5 - 6,5 unidades de fosfatasa alcalina o 15-30  $\mu\text{g}$  de veneno de serpiente y la mezcla se incubó a 30°C durante 10 min. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de una suspensión 1:3 (v/v) de resina AG1 - X2 (200-400 mesh) en etanol 50% conteniendo adenosina 0,25 mM, para disminuir la adsorción inespecífica del nucleósido a la resina de intercambio (367,368). Los tubos se mantuvieron en un baño de agua-hielo durante 15 min con agitación periódica; al cabo de este tiempo la suspensión se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 min. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 0,5 ml y se contó la radioactividad en solución centelleadora en contador de centelleo líquido (ver sección X.7.).

Método B. Este ensayo se utilizó para las medidas de actividad enzimática durante la morfogénesis aeróbica y para estudiar la distribución subcelular de la actividad de Ac-PDE. Se siguieron los lineamientos generales del método A hasta la segunda etapa de incubación. La adenosina [ $^3\text{H}$ ] se aisló de acuerdo al procedimiento de Hidaka y Asano (212); para ello se detuvo la reacción por el agregado de 1 ml de agua destilada y la mezcla se aplicó a una columna de 0,8 x 2 cm de resina AG50W-X4 (200-400 mesh). Luego de la entrada de la muestra, la resina se lavó con 15 ml de agua destilada y la adenosina [ $^3\text{H}$ ] se eluyó con 3 ml de  $\text{HONH}_4$  4 M. El eluido se recogió sobre 10 ml de solución centelleadora y se contó en contador de centelleo líquido (ver sección X.7.).

La recuperación de la adenosina [ $^3\text{H}$ ] de la columna de intercambio catiónico osciló siempre entre el 80-85% y se la calculó pasando por las columnas una mezcla incubada en las mismas condiciones pero conteniendo 0,1-0,3 nanomoles de adenosina [ $^{14}\text{C}$ ] en lugar de AMPc [ $^3\text{H}$ ].

Independientemente del método utilizado, todos los ensayos se llevaron a cabo en condiciones en las cuales la velocidad fue lineal con el tiempo de incubación y respecto a la cantidad de extracto enzimático. En los ensayos de rutina la cantidad de extracto se ajustó de tal manera que menos del 20% del sustrato fuese convertido en producto. Los ensayos enzimáticos se llevaron a ca-

bo por triplicado, representando los valores obtenidos el promedio de los mismos.

En todos los casos, los blancos se prepararon añadiendo la preparación enzimática al final de la primera etapa de incubación. Los valores de los blancos nunca superaron el 2% de la radioactividad total aportada por el sustrato radioactivo y las incorporaciones mínimas superaron en por lo menos tres veces el valor de los blancos.

Los resultados se expresaron como picomoles de AMPc [ $^3\text{H}$ ] hidrolizados en 20 min y la actividad específica como picomoles de AMPc [ $^3\text{H}$ ] hidrolizados/min/mg de proteína, a 30°C.

Método C. Este método se utilizó en algunos experimentos con el objeto de detectar la posible existencia de Ac-PDE de baja afinidad por el sustrato. Las condiciones de incubación fueron las mismas que las del método A, con la diferencia que se utilizó como sustrato, AMPc no radioactivo a una concentración 1 mM, y el volumen final de incubación fue 0,5 ml. En la segunda etapa del ensayo se agregaron 6,5 unidades de fosfatasa alcalina. La reacción se detuvo por el agregado de 0,05 ml de una solución de ácido tricloroacético 55%, seguido por 0,75 ml de agua y 0,15 ml de una solución de molibdato de amonio al 2,5% en  $\text{SO}_4\text{H}_2$  5 N. El precipitado obtenido se descartó por centrifugación, el sobrenadante se



decantó a tubos de ensayo limpios y en alícuotas apropiadas del mismo se valoró el fosfato inorgánico producido por el método Fiske y SubbaRow (369).

V. 2. Ensayo de la actividad de la fosfodiesterasa de AMPc en geles de poliacrilamida

Para determinar la actividad enzimática en los geles, cada rodaja del gel (ver sección IX ) se incubó durante 2 horas a 30°C con agitación constante en una mezcla de reacción que contenía, en un volumen final de 0,25 ml: buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 2 mM, BSA 150 µg, Cl<sub>2</sub>Mn 10 mM, AMPc 1 µM y AMPc [<sup>3</sup>H] 1,2.10<sup>5</sup> cpm. Al final del tiempo de incubación se tomaron alícuotas de 0,1 ml de cada tubo y se prosiguió el ensayo de Ac-PDE según los lineamientos del método A.

V. 3. Ensayo de la actividad de la fosfodiesterasa de GMPc.

Se utilizó el método A descripto anteriormente reemplazando el AMPc [<sup>3</sup>H] por GMPc [<sup>3</sup>H] (1.10<sup>5</sup> cpm) y a una concentración de este nucleótido cíclico de 1 µM. La suspensión de resina aniónica utilizada contenía 0,5 mM de guanosina en lugar de 0,25 mM de adenosina.

V. 4. Ensayo de la activación de la fosfodiesterasa de AMPc por ATP. Mg y AMPc

El efecto activador del ATP.Mg y AMPc se estudió incubando los extractos con actividad de Ac-PDE en distintas condiciones.

#### V.4.1. Ensayo directo de la activación enzimática

La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 0,1 ml: buffer fosfato de potasio 20 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 2 mM,  $Cl_2Mg$  10 mM, BSA 50  $\mu g$ , ATP 0,1 mM, AMPc 5  $\mu M$  y AMPc [ $^3H$ ] ( $6-8 \cdot 10^4$  cpm) y una dilución apropiada del extracto enzimático. En algunos ensayos se agregó quinasa de proteína exógena a las concentraciones indicadas en cada experimento. Esta mezcla se incubó y procesó siguiendo los lineamientos del método A. Los controles, no activados, fueron incubados en las mismas condiciones pero omitiendo el ATP de la mezcla de incubación.

#### V.4.2. Ensayo de la activación enzimática por preincubación

Se preincubaron los extractos en una mezcla igual a la del ensayo de activación directo pero omitiendo el sustrato radioactivo. En algunos casos el volumen final de la mezcla de preincubación se varió de acuerdo a la cantidad de extracto enzimático utilizado. La preincubación se realizó a 30°C por períodos de tiempo que variaron de 6 a 10 min, al cabo de los cuales la mezcla se procesó por dos métodos diferentes, a los que se llamó arbitrariamente:

Dilución: Luego de preincubados, los tubos conteniendo la mezcla de reacción se colocaron en baño de hielo y se les agregó

10  $\mu$ l de EDTA 0,1 M; se tomaron alícuotas convenientes de la mezcla en las cuales se ensayó actividad de Ac-PDE por el método A utilizando  $Mn^{2+}$  como catión divalente. La alícuota de la mezcla de preincubación se eligió de tal manera que la concentración de los agentes activantes quedara diluída por lo menos veinte veces en el ensayo de PDE.

Sulfato de amonio. Los tubos conteniendo la mezcla de preincubación se colocaron en baño de hielo y se les agregó, cuando fue necesario, BSA hasta una concentración final de 10 mg/ml y 4 volúmenes de una solución saturada y neutralizada de sulfato de amonio preparado en buffer fosfato de potasio 20 mM, pH 7,5. Se dejó la suspensión en baño de hielo 10 min con agitación periódica y luego se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min en centrífuga refrigerada. El precipitado se resuspendió en el volumen original de la mezcla de preincubación (a menos que se indique lo contrario) con buffer fosfato de potasio 20 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 2 mM y se tomó una alícuota para ensayar actividad de Ac-PDE con el método A.

#### V. 5. Otros ensayos enzimáticos

##### V.5.1. Quinasa de proteína dependiente de AMPc.

Para la medida de la actividad de quinasa de proteína dependiente de AMPc (Ac-QP) se utilizó una mezcla de incubación que

contenía en un volumen final de 0,1 ml: buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5; Cl<sub>2</sub>Mg 10 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, AMPc 5 μM, ATP[γ -<sup>32</sup>P] 0,1 mM (200 - 1000 cpm/pmol) e histona 1,5 mg/ml. Cuando se midió la capacidad del extracto de fosforilar sustrato endógeno, se omitió la histona de la mezcla de incubación. Las incubaciones se realizaron a 30°C durante 10 min, al cabo de los cuales se detuvo la reacción por el agregado de 20 μl de BSA de 50 mg/ml, seguidos de 1 ml de ácido tricloroacético 10%. La suspensión se centrifugó 5 min a 3.000 rpm en centrífuga clínica y se decantó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 0,2 ml de PO<sub>4</sub>HNaNH<sub>4</sub> 1 M y la proteína se reprecipitó con 1 ml de ácido tricloroacético 10 %. El procedimiento de centrifugación, resuspensión y reprecipitación se repitió dos veces más. La resuspensión final se realizó en 0,1 ml de HOK 1 N. Se sembró la totalidad de cada muestra en un cuadrado de papel Whatman nº 3 de 2 x 2 cm., que se secó bajo lámpara infraroja. Los papeles secos se contaron en solución centelleadora en un contador de centelleo líquido (ver sección X.7.).

La técnica de aislamiento de la proteína fosforilada por centrifugación, detallada anteriormente, es una modificación de la descrita por Kuo y Greengard (79).

Los blancos de los ensayos se realizaron agregando la fracción enzimática después del ácido tricloroacético. Los valores de los blancos oscilaron entre 400 - 2000 cpm dependiendo de la activi-

dad específica del ATP [ $\gamma$ - $^{32}$ P] utilizado. Las incorporaciones mínimas superaron por lo menos cuatro veces el valor del blanco.

Los resultados se expresaron como unidades de quinasa de proteína. Una unidad se definió como la cantidad de enzima capaz de transferir un picomol de fosfato [ $^{32}$ P] a la histona en 10 min en las condiciones del ensayo standard.

#### V. 5.2. Glucosa oxidasa

Para dosar esta actividad enzimática se utilizó la técnica de Hugget y Nixon (370) modificada. La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 1,2 ml: 150  $\mu$ l de glucosa de 16 mg/ml, 900  $\mu$ l de reactivo de o-dianisidina preparado en el momento con 1 ml de o-dianisidina al 1% en metanol y 50  $\mu$ l de buffer acetato de Na 1 M, pH 5; 30  $\mu$ l de solución de peroxidasa de 10 mg/ml y una alícuota de la fracción a ensayar. Se incubó la mezcla de reacción a 37°C durante 30-60 mins, hasta la aparición del color, y se midió la absorbancia a 420 nm. Los blancos, preparados e incubados en las mismas condiciones, carecían de la alícuota a ensayar.

#### V. 5.3. Peroxidasa

Esta actividad enzimática se ensayó de acuerdo a las directivas del Manual de Worthington (371).

Para la reacción se mezclaron 3 ml de  $H_2O_2$  al 0,003% (preparada fresca a partir de una solución madre de  $H_2O_2$  0,3%) con 20  $\mu$ l de o-dianisidina 1% en metanol (preparada fresca) y una alícuota de la preparación a ensayar. Luego de incubar a 30°C durante 15 min, se leyó la absorbancia a 460 nm. Para los blancos se preparó la misma mezcla de incubación sin el agregado de la alícuota a ensayar, y se incubó en las mismas condiciones.

#### V. 5.4. Fosfatasa alcalina

Para dosar esta actividad enzimática se utilizó la técnica de Garen y Levinthal (372). La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 2 ml: 1 ml de una solución 0,01% de p-nitrofenilfosfato en buffer Tris-ClH 0,1 M, pH 8 y una alícuota de la fracción a ensayar. Luego de incubar a 30°C durante 15 min, se midió la absorbancia a 410 nm. Los blancos, preparados e incubados en las mismas condiciones, carecían de la alícuota a ensayar.

### VI. TECNICAS CROMATOGRAFICAS

#### VI. 1. Cromatografía en DEAE - celulosa

La DEAE-celulosa a utilizar se trató previamente como lo indican Peterson y Sorber (373). La resina regenerada por este método se guardó a 4°C en agua destilada o en el buffer de equilibrio utilizado en cada caso.

Las columnas se sembraron manteniendo una relación de 7 - 10 mg de proteína/ml de resina empaquetada y se lavaron con 1-2 volúmenes de buffer de equilibrio.

La elución de la proteína se realizó utilizando gradientes salinos lineales continuos. El volumen total del buffer con el cual se eluyó la proteína fue de 10 veces el volumen de resina empaquetada. Generalmente se recogieron fracciones de 1/10 del volumen de la resina a una velocidad de flujo de 0,5-1 ml/min utilizando un colector de fracciones automático marca Gilson, modelo VFC.

#### VI. 2. Cromatografía en papel

Se utilizó la técnica de cromatografía descendente en papel Whatman nº 1. Se utilizaron dos sistemas de solventes: (1) 2-propanol: acetato de etilo: amoníaco 13 M (59:29:16) (374) y (2) etanol:ácido acético 1 M: acetato de amonio 1 M (75:26:4), pH 3,8 (375).

#### VI. 3. Cromatografía de afinidad

Se emplearon columnas de Azul 2-Agarosa equilibradas en buffer Pipes 10 mM, pH 6,3; 2-mercaptoetanol 2 mM, glicerol 10% (buffer C). La muestra se sembró diluida en buffer C conteniendo

$\text{Cl}_2\text{Mg}$  2 mM. El sembrado se realizó a una velocidad de flujo no superior a 0,1 ml/min y la velocidad se mantuvo durante todo el desarrollo del cromatograma. El gel se lavó con 4 volúmenes de buffer C que contenía  $\text{ClNa}$  0,2 M y la actividad de Ac-PDE se eluyó con 4 volúmenes de buffer C con el agregado de  $\text{ClNa}$  0,2 M y AMPc 2 mM. Finalmente se pasó por la columna 3 volúmenes de una solución de  $\text{ClNa}$  1 M en buffer C.

El volumen de las fracciones recogidas fue de aproximadamente 1/20 volumen del gel. Luego de ser utilizado, el gel se regeneró según el método de Morrill y colaboradores (376) que consiste en lavados sucesivos con soluciones acuosas de urea 6 M y  $\text{ClNa}$  2 M (4 volúmenes cada vez). El gel se conservó a 4°C en  $\text{ClNa}$  2 M y antes de ser utilizado nuevamente se equilibró con el buffer correspondiente.

#### VI. 4. Filtración en gel de Sephadex G-200

Esta técnica se utilizó para la determinación de algunos parámetros hidrodinámicos y moleculares de la Ac-PDE.

Se utilizó una columna de Sephadex G-200 de 1,7 x 60 cm equilibrada con buffer B. El volumen de la muestra sembrada fue de 1 ml y la columna se eluyó con buffer de equilibrio a una velocidad de flujo de 0,25 ml/min a 4°C. Se recogieron fracciones de 1,4 ml.



El volumen de exclusión de la columna se determinó utilizando dextrano azul. Para calibrar el gel se utilizaron las siguientes proteínas marcadoras: glucosa oxidasa (300  $\mu$ g), BSA (1 mg), peroxidasa (30  $\mu$ g) y citocromo C (3 mg). Se utilizó la vitamina B<sub>12</sub> como indicador de inclusión total en este gel. Los marcadores se valoraron como se indica en las secciones V.5, X.3 y X.4.

A partir de los volúmenes de elución de cada proteína se determinó el  $K_{av}$  de cada una de ellas. Este parámetro se define como la fracción del volumen del gel que es accesible al soluto (377) y se puede calcular por la relación:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (377)$$

donde:  $V_e$  es el volumen de elución de la proteína en cuestión,  $V_0$  es el "volumen muerto" de la columna o el volumen de elución de una sustancia que no penetra la fase solvente interior a las partículas del gel y  $V_t$  es el volumen total del gel.

## VII. GRADIENTES DE SACAROSA

Esta técnica se utilizó en la purificación, estudios de regulación y determinación del coeficiente de sedimentación y del coeficiente de difusión de la Ac-PDE. Se prepararon gradientes de 5 a 20% (p/v) de sacarosa en el buffer que se indica en cada caso.

Los gradientes se formaron, a temperatura ambiente 2 horas antes de ser utilizados, con 7 capas de 0,65 ml cada una de soluciones de concentración decreciente de sacarosa en tubos de nitrocelulosa de 1,2 x 5 cm. Las muestras se sembraron en volúmenes de 50 a 200  $\mu$ l y se incluyó en algunos casos una mezcla de las siguientes proteínas marcadoras: citocromo c (1 mg), peroxidasa (20  $\mu$ g), fosfatasa alcalina (30  $\mu$ g) y glucosa oxidasa (100  $\mu$ g).

La centrifugación de los gradientes se llevó a cabo en un rotor Beckman SW 50.1 a 38.000 rpm durante 15 horas a 4°C. Se recogieron fracciones de 0,2 ml cada una, haciendo sifón con un catéter desde el fondo del tubo.

#### VIII. CALCULO DE ALGUNOS PARAMETROS HIDRODINAMICOS Y MOLECULARES DE LA FOSFODIESTERASA DE AMPc

##### VIII. 1. Coeficiente de sedimentación ( $S_{20,w}$ ) y coeficiente de difusión ( $D_{20,w}$ ).

Estos parámetros se calcularon a partir de los datos de centrifugación en gradiente de sacarosa de acuerdo a los métodos de Martin y Ames (378) y Thompson y colaboradores (236) respectivamente. Para ello se graficaron las distancias recorridas por cada proteína marcadora desde el borde superior del gradiente en función del  $S_{20,w}$  o del logaritmo de  $D_{20,w}$  de estas proteínas

(ver Tabla 4). De la relación lineal obtenida en cada caso se obtuvo el valor de dichos parámetros para la Ac-PDE por interpolación en las rectas respectivas conociendo la posición de la enzima en el gradiente.

### VIII. 2. Radio de Stokes (a)

El valor de a fue calculado de los datos de elución de la columna de Sephadex G-200. De la relación lineal obtenida al graficar el logaritmo negativo de los valores de  $K_{av}$  elevados a la 1/2 versus los radios de Stokes de las proteínas marcadoras (Tabla 4), se obtuvo el valor de a para la PDE a partir del valor de  $K_{av}$  de esta enzima (379).

### VIII. 3. Peso molecular (PM)

Se calculó con los valores  $S_{20,w}$  y a según la ecuación:

$$PM = 6 \pi \eta_{20,w} N a S_{20,w} / (1 - \bar{v} \rho_{20,w}) \quad (379)$$

Donde:  $\eta_{20,w}$  es la viscosidad del agua a 20°C ( $1,1 \cdot 10^{-2}$  g/cm.seg),  $\bar{v}$  es el volumen específico parcial (que se supone igual a 0,725 cm<sup>3</sup>/g, por tratarse de una proteína soluble),  $\rho_{20,w}$  es la densidad del agua a 20°C (0,98 g/cm<sup>3</sup>) y N es el número de Avogadro ( $6,02 \cdot 10^{23}$ ).

#### VIII. 4. Coefficiente friccional ( $f/f_0$ )

El coeficiente friccional de la Ac-PDE se calculó utilizando los valores de PM y  $a$  de acuerdo a la ecuación

$$f/f_0 = a / \left( \frac{3 \bar{v} PM}{4 \eta N} \right)^{1/3} \quad (379)$$

#### VIII. 5. Parámetros hidrodinámicos y moleculares de las proteínas marcadoras

En la Tabla 4 se resumen los coeficientes de sedimentación, radios de Stokes, coeficientes de difusión y pesos moleculares de las proteínas marcadoras utilizadas en la centrifugación en gradientes de sacarosa y en la filtración por Sephadex G-200. En cada caso se indica la fuente bibliográfica de donde fueron obtenidos dichos parámetros.

TABLA 4

Parámetros hidrodinámicos y moleculares de las proteínas marcadas utilizadas

PROTEINA	COEFICIENTE DE SEDIMENTACION, $S_{20,w}$ (S)	COEFICIENTE DE DIFUSION $D_{20,w}$ ( $10^7$ cm <sup>2</sup> /seg)	RADIO DE STOKES $a$ ( $^{\circ}$ A)	PESO MOLECULAR (K)
Glucosa oxidasa	8,3 (380)	5.13 (380)	41,8 (*)	152 (380)
Fosfatasa alcalina	6,3 (372)	7.3 (377)	29,3 (*)	80 (372)
BSA (379)	4,3	—	35,0	65
Peroxidasa	3,5 (381)	7.05 (381)	30,4 (*)	39,8 (381)
Citocromo c(382)	1,7	11.4	18,7	12,4

(\*) Los valores del radio de Stokes (a) se obtuvieron de la fórmula  $a = k T / 6 \pi \eta_{20,w} \cdot D_{20,w}$  tomada de Haga y colaboradores (382) utilizando los valores de los coeficientes de difusión corregidos ( $D_{20,w}$ ) tabulados (377,380,381), donde  $k$  es la constante de Boltzmann  $\eta_{20,w}$  es la viscosidad del agua a 20°C y  $T$  es 293 °K.

IX. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Las electroforesis se realizaron a 4°C.

Se utilizó la técnica descrita por Davis (383). Se preparó un gel de separación (0,7 x 12 cm) de una composición de acrilamida de 7%. Se omitió el gel de concentración.

Los geles se precorrieron 6 horas a 2 mA/tubo utilizando como buffer catódico Tris-ClH, 0,37 M pH 8,9, para eliminar el persulfato de amonio utilizado en la polimerización.

Se sembraron muestras de 0,2 ml que contenían, como máximo, 0,1 mg de proteína y 30% de glicerol (v/v) más 5 µl de azul de bromofenol al 0,06 % (p/v).

Se hizo circular una corriente de 2 mA/tubo hasta que el colorante indicador del frente penetrara 1 cm en el gel y luego se elevó la corriente a 4 mA/tubo durante aproximadamente 4 horas, tiempo en el cual el colorante recorrió aproximadamente 10 cm.

Para visualizar las proteínas, los geles se tifieron durante una hora con una solución de azul de comasina al 0,25% (p/v) en metanol:ácido acético (90:10). El exceso de colorante se eliminó por lavados con ácido acético:metanol:agua (75: 50:875). La densitometría del gel se realizó con un espectro densitómetro integrador Crudo Caamaño.

La actividad de Ac-PDE se localizó, en geles no teñidos, cortando el gel en rodajas de 3 mm. En cada rodaja se determinó la actividad enzimática como se indica en la sección V. 2.

## X. OTRAS TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS ANALITICOS

### X. 1. Identificación de los productos de la reacción de la fosfodiesterasa de AMPc.

Se utilizó la técnica de cromatografía en papel descrita en la sección X.2. Los sobrenadantes de las distintas mezclas de incubación de los ensayos de Ac-PDE de extractos provenientes de algunos estadios de la morfogénesis aeróbica y los blancos correspondientes, se evaporaron a sequedad a temperatura ambiente utilizando un evaporador rotatorio. Los residuos se tomaron en 25  $\mu$ l. de agua destilada y se sembraron en forma puntual en el origen del cromatograma. Se utilizaron como patrones internos 0,1  $\mu$ mol de los siguientes compuestos: AMPc, 5' AMP y adenosina para el sistema 2. A esta mezcla se añadió inosina e hipoxantina cuando se utilizó el sistema 1.

Los cromatogramas se dejaron desarrollar durante una noche y luego se visualizaron los marcadores bajo lámpara ultravioleta a 254 nm. La zona correspondiente a las distintas manchas se cortaron, se colocaron en viales con solución centelleadora y se contaron en contador de centelleo líquido (ver sección X.7.).

### X. 2. Determinación de los volúmenes celulares .

La determinación de los volúmenes celulares se realizó en

las esporas y en los estadios posteriores del desarrollo aeróbico anteriores a la emisión de los tubos germinativos. Para ello se midieron los diámetros de las células en cada estadio. Se realizaron mediciones de 30 células de cada estadio bajo microscopio óptico con 1.000 aumentos y con la ayuda de un ocular micrométrico. Los valores obtenidos para cada estadio se promediaron.

#### X. 3. Valoración de otros marcadores de peso molecular

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

Dextrano azul	630 nm
Citocromo c	410 nm
Vitamina B <sub>12</sub>	400 nm

#### X. 4. Valoración de proteínas

Para la valoración de proteínas se utilizaron alternativamente dos métodos:

El método de Lowry y colaboradores (384) se utilizó de rutina. La proteína de las muestras solubles fue precipitada con ácido tricloroacético en una concentración final de 10% y luego resuspendida en HONa 1 N. Las proteínas totales de células enteras, de los extractos crudos, y de las fracciones subcelulares particuladas, se determinaron en los sobrenadantes obtenidos luego de hidrolisi-



zar las muestras en HONa 1 N a 100°C durante 30 min.

El método de Bradford (385) se utilizó como un método rápido para estudiar el perfil de las proteínas en las cromatografías, filtraciones moleculares y gradientes de sacarosa. Par ambos métodos se empleó BSA como patrón.

#### X. 5. Purificación del AMPc [<sup>3</sup>H]

Este nucleótido radioactivo se purificó por pasaje a través de una columna de 0,6 x 4 cm de resina AG50W-X8 (100-200 mesh). Se sembraron 0,2 ml del nucleótido cíclico y la columna se eluyó con agua en porciones de 80 µl. Una alícuota de las fracciones obtenidas se contó para radioactividad en mezcla centelleadora (ver sección X. 7.). Se descartaron las tres primeras fracciones con radioactividad y las siete restantes se juntaron y evaporaron a sequedad en un evaporador rotatorio. El residuo se resuspendió en el volumen original con etanol 50% y se guardó a - 20°C fraccionado en alícuotas de 50 µl hasta el momento de ser utilizado.

Se constató la pureza del nucleótido por cromatografía en papel utilizando el sistema 2 como solvente (ver sección VI. 2.).

#### X. 6. Síntesis de ATP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]

Para la síntesis de este nucleótido radioactivo se siguió,

en líneas generales, la técnica de Glynn y Chappell (386) con las modificaciones introducidas por Chang y colaboradores (387). Luego de la etapa de elución del ATP [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] del carbón, la solución se llevó a sequedad a presión reducida a temperatura ambiente. El residuo se disolvió en etanol: 0,2 mM EDTA (1:1, v/v), se dividió en alícuotas y se guardó a - 20°C.

#### X. 7. Contaje de radioactividad

Para el contaje de las muestras radioactivas se utilizó un contador de centelleo líquido marca Packard.

Las muestras resultantes de los ensayos de Ac-PDE se contaron utilizando dos métodos alternativos: (1) se utilizó solución centelleadora de Bray. Las muestras se contaron en viales de vidrio, con 10 ml de solución centelleadora. Los viales se dejaron 20 min en frío para disminuir la autoabsorción antes de colocarlos en el contador. Este método se utilizó cuando la actividad enzimática se determinó por el método B (ver sección V.1.). (2) se utilizó solución centelleadora de tritón X-100-tolueno (1:3 v/v). Las muestras se contaron en viales de plástico chicos con 3 ml de solución centelleadora, apoyados sobre viales de vidrio. Esta técnica se empleó cuando se ensayó la actividad de Ac-PDE con el método A (ver sección V.1.).

Los cuadrados de papel conteniendo las muestras de los ensayos de quinasas de proteína, y los que se obtuvieron luego del desarrollo de las cromatografías en papel, se contaron en 3 ml de solución centelleadora de tolueno, utilizando también viales de plástico chicos.

La radioactividad del [ $^3\text{H}$ ] se midió a 60% de ganancia y con una ventana de 50-1.000 durante un minuto. La radioactividad del [ $^{32}\text{P}$ ] y del [ $^{14}\text{C}$ ] se midió con 25% de ganancia y con una ventana de 50- $\infty$  durante un minuto.

#### XI. REACTIVOS UTILIZADOS

Los siguientes reactivos fueron adquiridos en Sigma Chemical Company: fosfodiesterasa de AMPc de corazón bovino activable por calmodulina, fosfatasa alcalina de E.coli tipo III-S, p-nitrofenil fosfato disódico (sustrato de la fosfatasa alcalina), peroxidasa de rábano picante tipo I, citocromo c de corazón de caballo tipo III, venenos de serpiente (Ophiophagus hannah y Crotalus atrox), tripsina de pancreas bovino tipo III, inhibidor de tripsina de clara de huevo tipo III, inhibidor de quinasas de proteína dependiente de AMPc de músculo de conejo, calmodulina de corazón bovino, seroalbúmina bovina cristalina fracción V, histona tipo II-S de timo de ternera., benzamidina. Dextrano azul (PM 2.000 K), reactivo de Azul 2-agarosa (1-4  $\mu\text{mol}$  de reactivo Azul 2/ml de gel).

AMPc, GMPc, 5' AMP, ATP, adenosina, hipoxantina, inosina. Imidazol (grado I), cafeína, teofilina y teobromina. Trizma base, Pipes, EDTA, EGTA, DTT. Sacarosa (grado I), sulfato de amonio (grado III). PPO, dimetil POPOP y Tritón X-100.

La glucosa oxidasa de Penicillium notatum fue de Merck.

El AMPc [ $^3\text{H}$ ] (actividad específica 38 Ci/nmol), el GMPc [ $^3\text{H}$ ] (actividad específica 30 Ci/nmol) y el fosfato inorgánico [ $^{32}\text{P}$ ] para la preparación del ATP [ $^{32}\text{P}$ ] fueron adquiridos en The Radiochemical Centre, Amersham. La adenosina [ $^{14}\text{C}$ ] (actividad específica 50 mCi/nmol) y los reactivos para el radioinmunoensayo fueron provistos por New England Nuclear.

La o-dianisidina y la arena de mar purificada con ácido y la acrilamida fueron BDH:

Bio Rad proveyó las resinas de intercambio AG1-X2 (200-400 mesh), AG50W-X4 (200-400 mesh), AG50W-X8 (100-200 mesh).

Las resinas de filtración molecular Sephadex G-25 y G-200, fueron de Pharmacia Fine Chemicals.

La DEAE-celulosa fue de Serva (Serva DEAE-SS, capacidad 0,71 mEq/mg).

El papel de filtro utilizado fue Whatman. Los filtros de membrana BA 85, poro 0,45  $\mu\text{m}$  fueron de Schleicher y Schüll.

El TEMED y la Bis-acrilamida fueron de Eastman-Kodak Co.

El Azul de Comasina R 250 fue obtenido en Fluka.

Las membranas de ultrafiltración Minicon- B 15 fueron de Amicon Corporation.

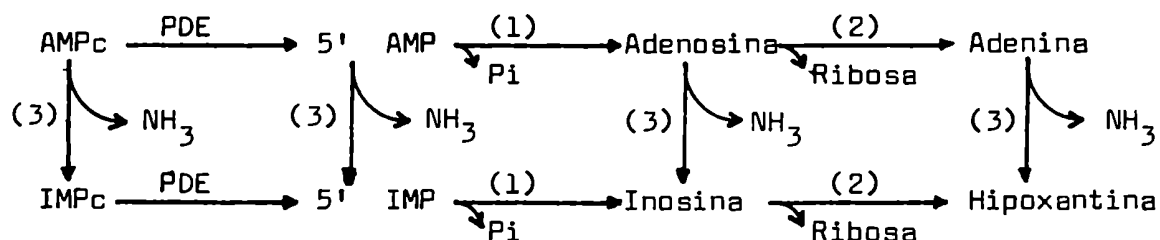
El resto de los reactivos fue de grado analítico.

RESULTADOS Y DISCUSION

## I. VALIDEZ DEL ENSAYO DE FOSFODIESTERASA

A lo largo de todo el trabajo se utilizaron dos métodos para medir la actividad de Ac-PDE, en el método A se emplea una resina de intercambio aniónico para separar la adenosina [ $^3\text{H}$ ] del sustrato sin reaccionar el cual queda retenido en la resina; mientras que en el método B se utiliza una columna de intercambio catiónico que retiene la adenosina [ $^3\text{H}$ ] formada y pasa de largo el AMPc [ $^3\text{H}$ ] sin reaccionar, posteriormente la adenosina se eluye con una solución acuosa de amoníaco.

Cuando se utiliza el método B para el dosaje de la actividad enzimática es muy importante valorar en los extractos, sobre todo si son poco purificados, la presencia de enzimas desaminantes pues la eliminación de la carga positiva de la molécula de adenosina hace que esta no se retenga en la resina de intercambio catiónico, a consecuencia de lo cual hay una subestimación de la actividad enzimática. El camino metabólico de la hidrólisis del AMPc en homogenizados de tejidos se resume en la Figura 7.



(1): 5' nucleotidasa; (2) nucleosidasa; (3) desaminasa

Figura 7. Camino metabólico de la hidrólisis del AMPc en homogenizados totales de tejidos, resumido de Dedman y Means (38g).

Se investigó la posible existencia de actividades de 5' nucleotidasa y desaminasas en extractos crudos de tres estadios de la morfogénesis aeróbica (cultivos de 4, 7 y 14 horas), ya que, la presencia de dichas actividades en cantidades significativas en los extractos, podría invalidar el método B del ensayo enzimático.

Se ensayó actividad de Ac-PDE en alícuotas de los extractos en la mezcla de incubación standard a una concentración de AMPc [ $^3\text{H}$ ] de 10  $\mu\text{M}$  y se omitió el segundo paso de la incubación. La reacción se detuvo por calentamiento como se indicó en la sección V.1. de Materiales y Métodos. Los tubos conteniendo la mezcla de reacción se centrifugaron durante 10 min a 3.000 x g y los sobrenadantes, decantados a tubos limpios, se evaporaron a sequedad y se procesaron como se indicó en la sección X.1. de Materiales y Métodos. Los productos de la reacción se resolvieron por cromatografía en papel con el sistema 2 (ver Materiales y Métodos, secciones VI.2 y X.1). Este sistema separa el AMPc del 5'AMP y a ambos de los nucleósidos y bases (adenosina, inosina, e hipoxantina), los cuales corren todos con el mismo Rf. Se determinó que en los extractos existe actividad de nucleotidasa de 5'AMP ya que del 20% del AMPc [ $^3\text{H}$ ] hidrolizado solo el 30-35% apareció en la zona del 5'AMP patrón mientras que el 60-65% restante apareció en la zona del cromatograma correspondiente a los nucleósidos.



En ensayos paralelos se tomaron alícuotas similares de los extractos, las que se incubaron y procesaron como se indicó arriba, excepto que se incluyó la segunda etapa de incubación con exceso de fosfatasa alcalina. Los productos de la reacción se resolvieron por cromatografía en papel utilizando el sistema 1 (ver Materiales y Métodos secciones VI.2 y X.1). Este sistema no resuelve bien el AMPc del 5'AMP pero separa bien entre sí adenosina, hipoxantina e inosina. En ningún caso la cantidad de inosina más hipoxantina resultó mayor del 10% de la adenosina formada.

De acuerdo a estos resultados, se concluyó que la desaminación no es significativa en estos extractos, similarmente a lo que ocurre en extractos poco purificados de micelio de Neurospora crassa (356) y de Phycomyces blakesleeanus (360). De esta manera se confirmó la validez del ensayo de Ac-PDE cuando se utilizó el método B para valorar la actividad enzimática.

## II. ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA DE AMPc Y VARIACIONES DE LOS NIVELES DE AMPc DÚRANTE LA MORFOGENESIS AEROBICA

Dado que en todos los sistemas biológicos estudiados las actividades enzimáticas que regulan los niveles intracelulares de AMPc son la adenilato ciclasa y la fosfodiesterasa de AMPc, se estudiaron las variaciones de la actividad específica de la Ac-PDE y su rela-

ción con los niveles intra y extracelulares de AMPc durante el crecimiento aeróbico de M.rouxii. Al mismo tiempo se compararon con las variaciones de actividad específica de adenilato ciclasa; dichos valores se incluyen en este trabajo con el objeto de compararlos con la actividad de Ac-PDE y se reproducen de un trabajo realizado en este laboratorio (184).

El cultivo del organismo para estos ensayos se realizó como se indicó en Materiales y Métodos (sección I.5). Las muestras se cosecharon a distintos intervalos de tiempo, siendo el tiempo total de crecimiento de 24 horas. Los tiempos de cosecha de los distintos estadios se fijaron teniendo en cuenta por observación microscópica de muestras tomadas esterilmente, el momento en que el 80% de la población de células tuviera la morfología requerida. Las morfologías que corresponden a los distintos estadios del crecimiento elegido se pueden observar en las abscisas de las Figuras 8 y 9. El tiempo de aparición de las distintas formas es variable y dependiente de la cantidad de inóculo, por lo que en cada experimento se inoculó siempre la misma cantidad de esporas en cada frasco ( $10^6$  esporas/ml). Al cabo de los tiempos indicados las muestras se procesaron como se indicó en Materiales y Métodos (sección IV.1).

En el gráfico de barras de la Figura 8 se comparan las variaciones de las actividades específicas de Ac-PDE y de adenilato ciclasa en función del tiempo de crecimiento aeróbico. Se observó que

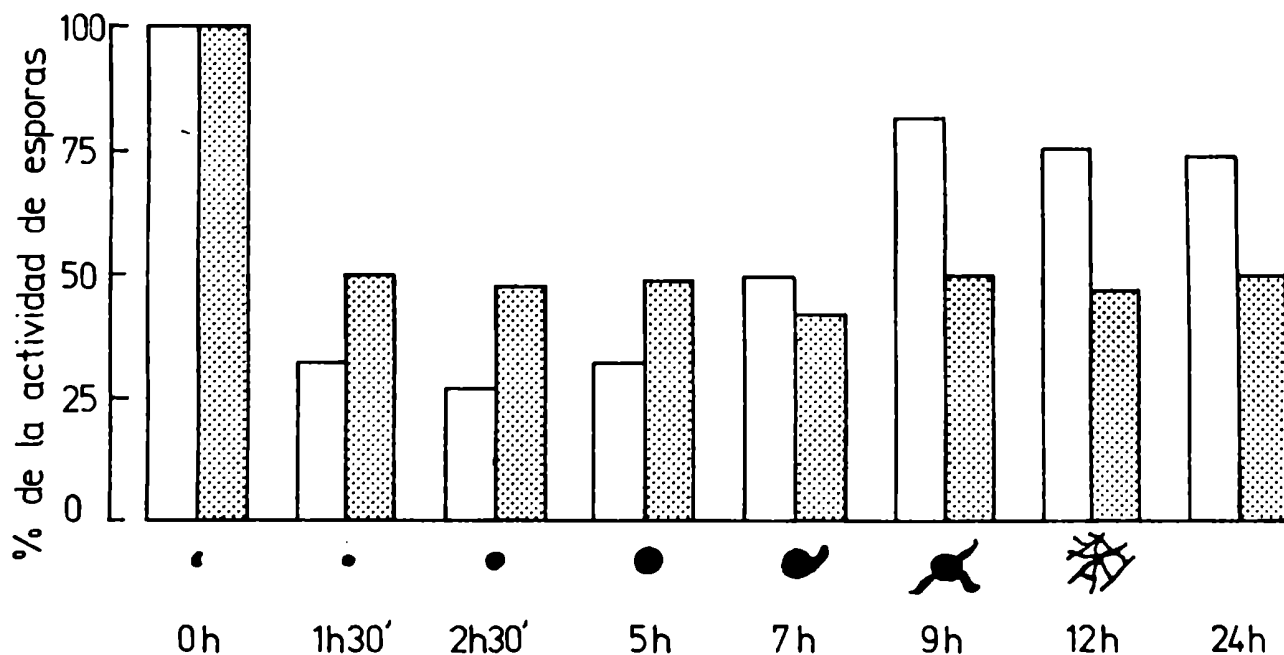


Figura 8: Morfología, actividades de adenilato ciclasa y Ac-PDE durante el crecimiento aeróbico

Los ensayos de Ac-PDE se llevaron a cabo por el método B según se indicó en Materiales y Métodos (sección V.1.) utilizando extractos crudos como fuente de enzima (sección IV.1.). La medida de actividad de adenilato ciclasa de los mismos extractos fué realizada por Ma. Leonor Cantore (184). Los resultados se expresan como el porcentaje de la actividad específica respectiva de los extractos de esporas, que resultaron ser para la adenilato ciclasa 40 pmoles/mn/mg y para la Ac-PDE 30 pmoles/min/mg. Todas las determinaciones se llevaron a cabo en condiciones de linealidad respecto de la concentración enzimática. Los valores graficados representan el promedio de cuatro experimentos por separado.

Ac-PDE: barras llenas; Adenilato ciclasa: barras vacías.

las esporas sin germinar poseen los niveles más altos de actividades específicas de adenilato ciclasa y de Ac-PDE: 40 y 30 pmoles de AMPc sintetizados e hidrolizados por mg de proteína y por minuto, respectivamente. A estas actividades específicas se les asignó arbitrariamente el valor 100. Las actividades específicas en los distintos estadios se expresaron como porcentaje de dichos valores. Se vio que durante la germinación y hasta el estadio de células esféricas disminuyeron ambas actividades siendo más pronunciada la caída de la actividad específica de la adenilato ciclasa que la de la Ac-PDE, así a las 2,5 horas de crecimiento las actividades específicas remanentes fueron el 25 y el 50% respectivamente. A partir de ese momento la actividad específica de la adenilato ciclasa comenzó a aumentar gradualmente y alcanzó valores del 75% en el estadio de micelio joven, manteniéndose en este nivel hasta el final del crecimiento. La actividad específica de Ac-PDE no cambió significativamente luego de la caída inicial, manteniendo el valor alcanzado durante la fase del crecimiento exponencial y hasta el final del desarrollo.

Los niveles de AMPc intra y extracelular se midieron a diferentes intervalos de tiempo durante el desarrollo aeróbico. En la Figura 9 se ve que la concentración de AMPc intracelular permaneció casi constante, en un valor de aproximadamente 20 pmoles/mg de proteína durante las primeras tres horas de germinación, excepto por un

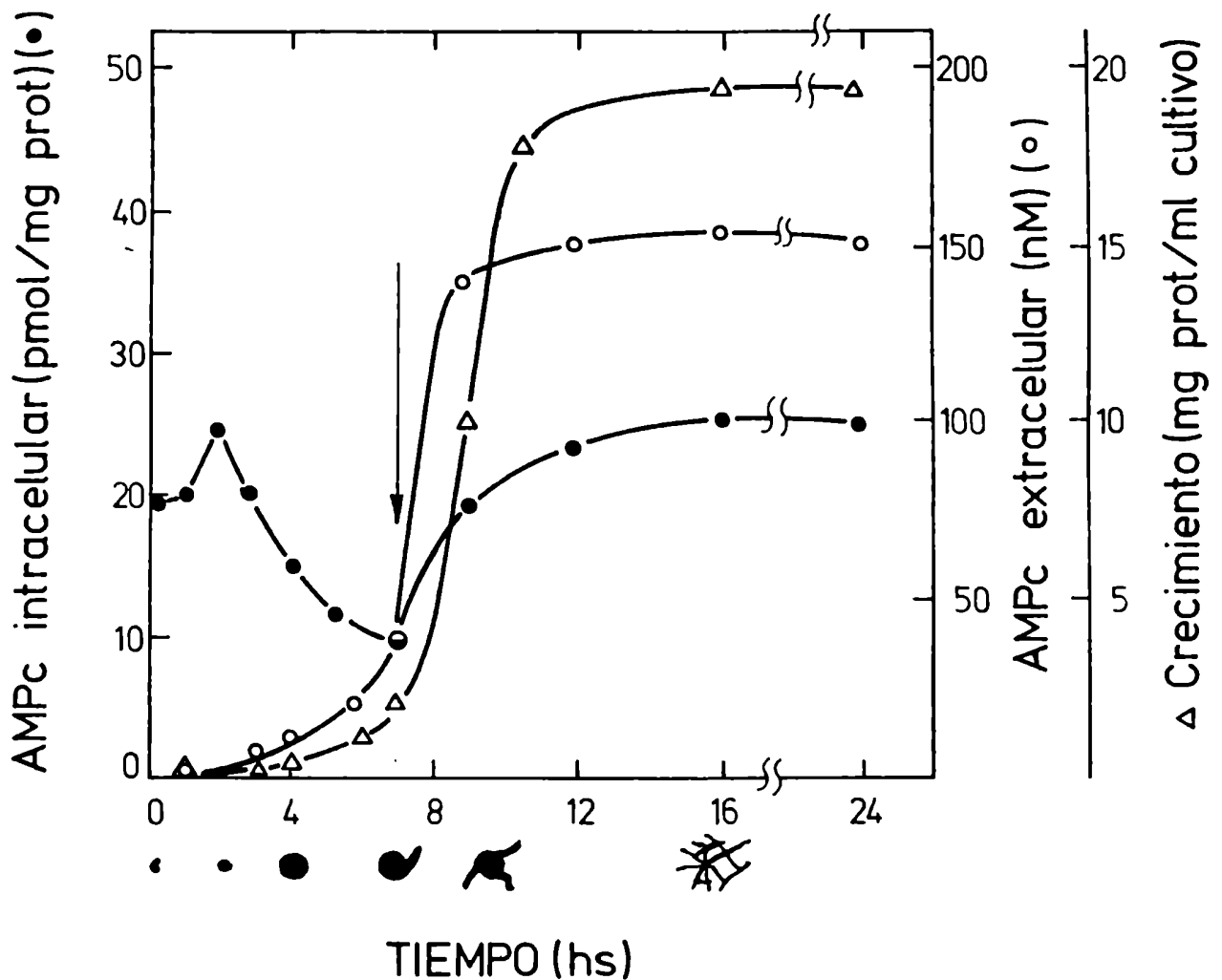


Figura 9: Niveles intra y extracelulares de AMPc durante la morfogénesis aeróbica

Se inocularon esporangiosporas cosechadas en el día, en frascos de cultivo individuales ( $10^6$  esporas/ml). A los tiempos indicados, las muestras se procesaron por duplicado como se describió en la sección III.1. de Materiales y Métodos. Los niveles intra (●) y extracelulares (○) de AMPc se midieron como se indicó en la sección III.2. El crecimiento (Δ) se expresó como mg de proteínas/ml de cultivo. La flecha indica el momento en el cual el 80% de la población había comenzado a emitir los tubos germinativos.

pequeño aumento observado a las 2 horas de crecimiento, para luego decaer gradualmente alcanzando un mínimo (10 pmoles/mg) a las 5-7 horas de desarrollo. Es en este momento cuando el 80% de la población celular completó su transformación de esporas a células esféricas y comenzó la aparición de los tubos germinativos. Luego, y a medida que estos se elongan, los niveles intracelulares de AMPc aumentaron continuamente con respecto a la proteína total indicando síntesis neta de AMPc. La caída en los niveles intracelulares de AMPc, que coinciden con una transición diferenciativa durante el crecimiento, fueron observados en otros hongos afines a M. rouxii: M. racemosus (31), M. genevensis y M. mucedo (389) y Blastocladiella emersonii (51). En estos casos la aparición de los tubos germinativos está precedida por una caída dramática del AMPc intracelular, manteniéndose estos niveles bajos durante el crecimiento vegetativo. Por otro lado, en estas especies hay un aumento muy significativo de los niveles intracelulares de este nucleótido durante las primeras horas de germinación, aumento que no se observó en M. rouxii.

La figura 9 muestra además que el AMPc extracelular se acumuló en el medio de cultivo desde los primeros estadios de la germinación siguiendo un perfil similar al de la curva de crecimiento. Estos valores del nucleótido cíclico probablemente representen el AMPc real expulsado de las células ya que no pudo detectarse acti-

vidad extracelular de Ac-PDE en ningún estadio del crecimiento, a pesar de ensayar cantidades de medio filtrado que cubrían una amplia gama de concentración proteica (datos que no se muestran).

De los datos de las Figuras 8 y 9 se concluye que existe una correlación bastante estrecha entre los niveles intracelulares del nucleótido cíclico y los cambios de las actividades específicas de ambas enzimas. Estos datos sugieren que durante la transición de esporas a células esféricas existe una predominancia de la degradación sobre la síntesis del AMPc. A partir de la emisión de los tubos germinativos la situación se invierte; a lo largo de este período la síntesis del nucleótido cíclico predomina sobre su degradación, los niveles de AMPc aumentan gradualmente a medida que los tubos germinativos se alargan, alcanzando una meseta al final de la fase logarítmica del crecimiento. La acumulación total del AMPc intra más extracelular durante la fase logarítmica no puede explicarse exclusivamente por cambios en las actividades específicas de la fosfodiesterasa y de la adenilato ciclasa. Tal vez la síntesis a degradación de algún otro componente del metabolismo del AMPc (inhibidores y/o activadores de ambas actividades) o la capacidad de las enzimas para responder a tales factores estén alterados durante la morfogénesis.

Recientemente Orlowski (389) trabajando con otras dos especies dimórficas de Mucor, encontró que a lo largo de la germina-

ción aeróbica de las esporangiosporas no se producen cambios significativos en las actividades de Ac-PDE, pero sí en las adenilato ciclasa y concluye que la concentración intracelular de AMPc en estas especies es función directa de la actividad de adenilato ciclasa.

### III. CONCENTRACION CELULAR DE AMPc

Se calculó la concentración de AMPc por célula para aquellos estadios del crecimiento aeróbico en donde fue posible medir los diámetros celulares, asimilando groseramente el volumen de las células al de una esfera, excepto en el caso de las esporangiosporas en donde el volumen celular se asimiló al de un elipsoide. Los estadios del crecimiento considerados fueron desde esporangiosporas ( $t= 0$  horas) hasta células esféricas ( $t= 5$  horas) que es un estadio anterior al de aparición de los tubos germinativos ( $t= 7$  horas).

Se calculó la concentración de AMPc por célula en cada estadio. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.



Tabla 5

Concentración celular de AMPc \*

Estadio (horas)	Volumen celular ( $\mu^3$ )	Proteína/célula <sup>(a)</sup> (mg. $10^8$ )	Concentración de AMPc <sup>(b)</sup>	
			(pmoles/mg proteína)	por célula ( $\mu M$ )
0	36,8	0,44	19,3	2,3
1	87	0,63	19,8	1,4
2	143	1,06	23,5	1,7
3	321	2,02	20,1	1,3
4	641	4,00	14,8	0,9
5	1317	10,00	14,2	1,0

\* Las células de los distintos estadios se obtuvieron de los cultivos realizados para la morfogénesis aeróbica. (a) y (b) los valores se obtuvieron de los datos de la Figura 9.

De los valores de la tabla se deduce que durante la morfogénesis aeróbica, al menos en los estadios considerados, las variaciones del AMPc son significativas, ya que desde el estadio de espora hasta el estadio de célula esférica ( $t = 5$  horas) las concentraciones de AMPc disminuyen en más de un 100%, considerando al nucleótido uniformemente distribuido en una solución acuosa; posiblemente los niveles de AMPc libres sean menores. Los valores obtenidos son semejantes a los hallados como valor promedio para células

las de eucariontes superiores (75,266) y para células de algunos hongos (50,51).

#### IV. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA FOSFODIESTERASA DE AMPc EN EXTRACTOS DE LA FORMA FILAMENTOSA

Se comenzó el estudio de la caracterización de la Ac-PDE de Mucor rouxii analizando su distribución en las distintas fracciones subcelulares del micelio.

En cada fracción subcelular obtenida se midió la actividad específica y total de la enzima. Para los cálculos de la actividad enzimática se utilizó la zona lineal del gráfico de actividad versus la concentración de extracto, observándose para todas las fracciones, linealidad hasta una concentración de 100 ug de proteína.

La Tabla 6 resume los valores de las actividades específicas y totales encontrados cuando se sometió 1 g de polvo de micelio al fraccionamiento subcelular descrito. Los resultados son el promedio de tres experimentos por separado. Se observó que más del 65% de la actividad de AMPc-PDE se encuentra en el sobrenadante postmicrosomal ( $S_{100}$ ), además dicha fracción fue la única que exhibió una actividad específica mayor que la del extracto crudo.

Tabla 6

Distribución subcelular de la Ac-PDE de la forma miceliana de Mucor Rouxii \*

Fracción	Proteína (mg)	Actividad específica (pmoles/min/mg)	Actividad total (pmoles/min)	Distribución (%)
Homogenizado	121,6	13,1	1593	-
P <sub>8</sub>	60,8	6,9	420	28
P <sub>100</sub>	8,5	8,9	76	5
S <sub>100</sub>	32,2	31,2	1005	67

\* Se homogenizó 1 g (peso húmedo) de polvo de micelio como se describió en la sección IV.2. de Materiales y Métodos. El extracto crudo obtenido se sometió a centrifugación diferencial como se indicó en la misma sección. En cada fracción se ensayó actividad de Ac-PDE con el método B. La suma de las actividades totales de las fracciones P<sub>8</sub>, P<sub>100</sub> y S<sub>100</sub> se tomó como el 100%.

La actividad asociada a la fracción  $P_8$ , probablemente constituida por fragmentos de pared celular con membranas asociadas, membranas provenientes de organelas tales como núcleos y mitocondrias y tal vez por células no totalmente rotas, permaneció dentro de los valores observados luego de rehomogenización y sucesivos lavados con buffer A, indicando que cerca del 30% de la actividad total de la Ac-PDE está asociada a esta fracción y no se debe a contaminación por el sobrenadante. La baja actividad enzimática de la fracción microsomal ( $P_{100}$ ) puede ser intrínseca de esa fracción o deberse a contaminación con el sobrenadante postmicrosomal, ya que el lavado del  $P_{100}$  resultó dificultoso debido al pequeño volumen obtenido de esta fracción.

Cuando se estudió la distribución subcelular de la enzima en esporas del hongo, se encontró que el 65% de la actividad de PDE esta asociada a la fracción  $P_8$ , mientras que solo un 28% es soluble. Esta distribución puede explicarse por el gran porcentaje de pared y membranas celulares que existen en esporas respecto de la fracción citoplasmática.

Al comparar la distribución subcelular de la Ac-PDE de M.rouxii con la descrita por otros autores para otros hongos, se encuentra que hongos afines a Mucor poseen una distribución subcelular similar de la fosfodiesterasa. Así en Blastocladiella emersonii la mayoría de la actividad de Ac-PDE es soluble (49) y en Phycomyces blakesleeanus lo es el 95% (360). En otros hongos no taxonómicamente

mente relacionados a M.rouxii se encontraron variaciones en cuanto a la distribución subcelular de la Ac-PDE. Así en Neurospora crassa la mayor parte de la actividad enzimática es soluble (143), en Saccharomyces cerevisiae el 80% de la actividad es soluble (354), en Physarum polycephalum el 90% de la actividad total de Ac-PDE es extracelular y el 10% intracelular está particulada en más de un 80% (351) y en Dictyostelium discoideum en el estado de culminación la mayoría de la actividad es soluble (390).

En tejidos de mamíferos la situación es más compleja debido a la existencia de formas múltiples de la enzima (ver Introducción sección IX.1.). En términos generales las formas de la Ac-PDE con baja afinidad por el sustrato son solubles, mientras que la de alta afinidad es particulada (197,206-208).

#### V. ACTIVIDADES DE FOSFODIESTERASA DE AMPc y de GMPc EN EXTRACTOS SOLUBLES DE MICELIO

Se determinó la actividad de Ac-PDE y de Gc-PDE en la fracción  $S_{100}$  de micelio de Mucor rouxii. Para la determinación de ambas actividades enzimáticas se utilizaron tres concentraciones diferentes de cada nucleótido cíclico. Los resultados obtenidos se pueden ver en la Tabla 7.

Tabla 7

Actividades de Ac-PDE y de Gc-PDE en la fracción S<sub>100</sub>

Sustrato ( $\mu$ M)	Actividad específica (pmoles/min/mg)			
	Ac-PDE		Gc-PDE	
	<u>Mn<sup>2+</sup></u>	<u>Mg<sup>2+</sup></u>	<u>Mn<sup>2+</sup></u>	<u>Mg<sup>2+</sup></u>
0,2	4,2	1,7	0,4	0,4
1	12,7	5,0	1,4	1,5
10	31,8	11,7	4,0	3,6

\* Se ensayó actividad de Ac-PDE y de Gc-PDE en alícuotas apropiadas de la fracción S<sub>100</sub> obtenida como se indicó en la sección IV.3 de Materiales y Métodos. Ambas actividades enzimáticas se ensayaron con el método A (secciones V.1. y V.3. de Materiales y Métodos) a las concentraciones indicadas de cada nucleótido cíclico y con Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> como catión divalente a una concentración de 10 mM.

Como se vé, la actividad específica de Ac-PDE es de 3 a 10 veces mayor que la de Gc-PDE, siempre que los valores de actividades se comparen a la misma concentración de cada nucleótido cíclico. La magnitud de estas diferencias dependió de la concentración del nucleótido cíclico y del catión utilizado.

V.1. Perfil de elución de las actividades de fosfodiesterasa de AMPc y de GMPc en columna de DEAE-celulosa

Se investigó la existencia de formas múltiples de la PDE en la fracción  $S_{100}$  de micelio con el objeto de caracterizar mejor la(s) actividad(es) de PDE de este organismo. Para ello se utilizó la técnica de cromatografía en DEAE-celulosa a pH 6 desarrollada por Russell y colaboradores (211) para separar las formas múltiples de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos presentes en hígado de rata. Esta técnica es una de las más utilizadas para la separación física de las distintas formas de PDE en tejidos superiores. Además de ser una técnica sencilla provee un buen método de comparación con los resultados obtenidos por otros autores utilizando el mismo procedimiento (212,233,234,391).

La cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción  $S_{100}$  dializada dió como resultado el perfil de elución de las actividades de fosfodiesterasa que se muestran en la Figura 10.

Se observa que la actividad de Gc-PDE eluyó como un pico simétrico a una concentración de 0,15 M de acetato de Na, acompañado por un pico de proteína. La recuperación de la actividad de Gc-PDE fue solamente de 15% con respecto a la actividad sembrada en la columna. La actividad de Ac-PDE también eluyó como un único pico simétrico a una concentración salina mayor (0,4 M de acetato de

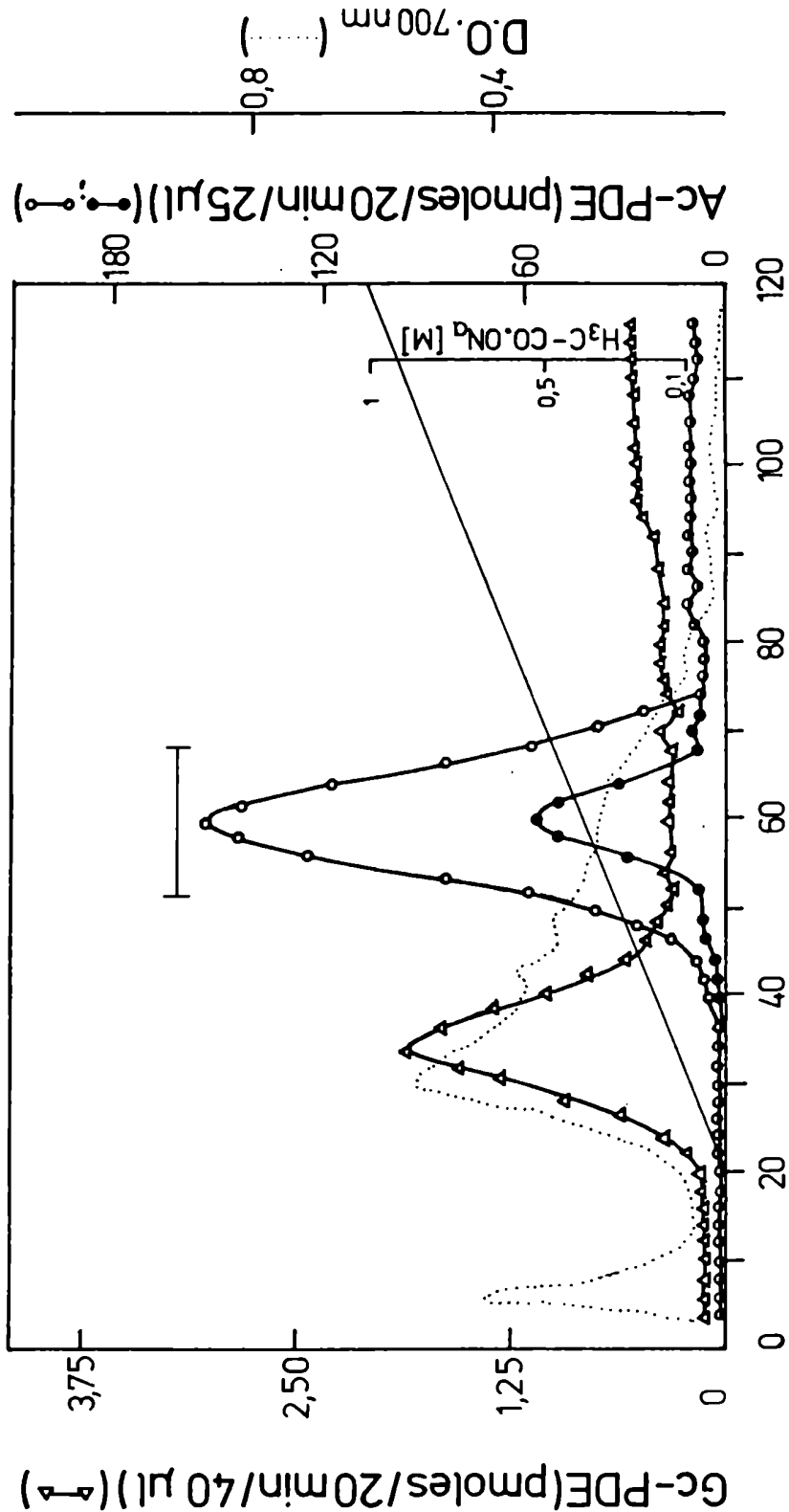


Figura 10: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de la fracción S<sub>100</sub> de micelio

Se sembró 100 mg de proteína de la fracción S<sub>100</sub> dializada contra buffer Tris-acetato 30 mM, pH 6; 2-mercaptoetanol 4 mM en una columna de DEAE celulosa de 10 ml equilibrada en el mismo buffer. La columna se lavó con 20 ml de buffer y la proteína se eluyó con 100 ml de un gradiente lineal de acetato de Na 0-1M preparada en el buffer de equilibrio. Las demás condiciones fueron descritas en Mat. y Mét. (secc. VI.1.). La actividad de Ac-PDE se ensayó en alícuotas de 25  $\mu$ l a 1 (●) y 10 (○)  $\mu$ M de AMPc [<sup>3</sup>H]. La actividad de Gc-PDE se ensayó en alícuotas de 40  $\mu$ l a 0,2  $\mu$ M de GMPC [<sup>3</sup>H] (▲). La línea punteada indica el perfil de elución de la proteína.



Na) independientemente que la actividad enzimática se ensayara a 1 o 10  $\mu$ M de sustrato. No se pudo detectar actividad de Ac-PDE en ninguna fracción de la columna cuando se ensayó la actividad enzimática por la liberación de fosfato inorgánico a una concentración de sustrato no radioactivo de 1 mM. La recuperación de la actividad de la Ac-PDE fue del 75-80% respecto de la actividad sembrada. El pico de actividad de Ac-PDE recromatografiado en las mismas condiciones anteriores volvió a eluir en la misma posición (datos que no se muestran). No se detectó actividad fosfodiesterásica en las fracciones correspondientes al lavado de la columna.

#### V.2. Efecto del GMPc sobre la actividad de fosfodiesterasa de AMPc

En principio, de la observación del perfil de elución de la Figura 10, resulta obvio que la actividad de PDE que eluyó a una concentración salina de 0,4 M de acetato de Na es específica para la hidrólisis del AMPc, al menos a la concentración de GMPc utilizada (0,2  $\mu$ M). Sin embargo para confirmar los resultados se ensayó el efecto de concentraciones crecientes de GMPc no radiactivo sobre la actividad de Ac-PDE del pico obtenido de la columna. Los resultados obtenidos se grafican en la Figura 11. Se observa que para lograr una inhibición del 32% de la

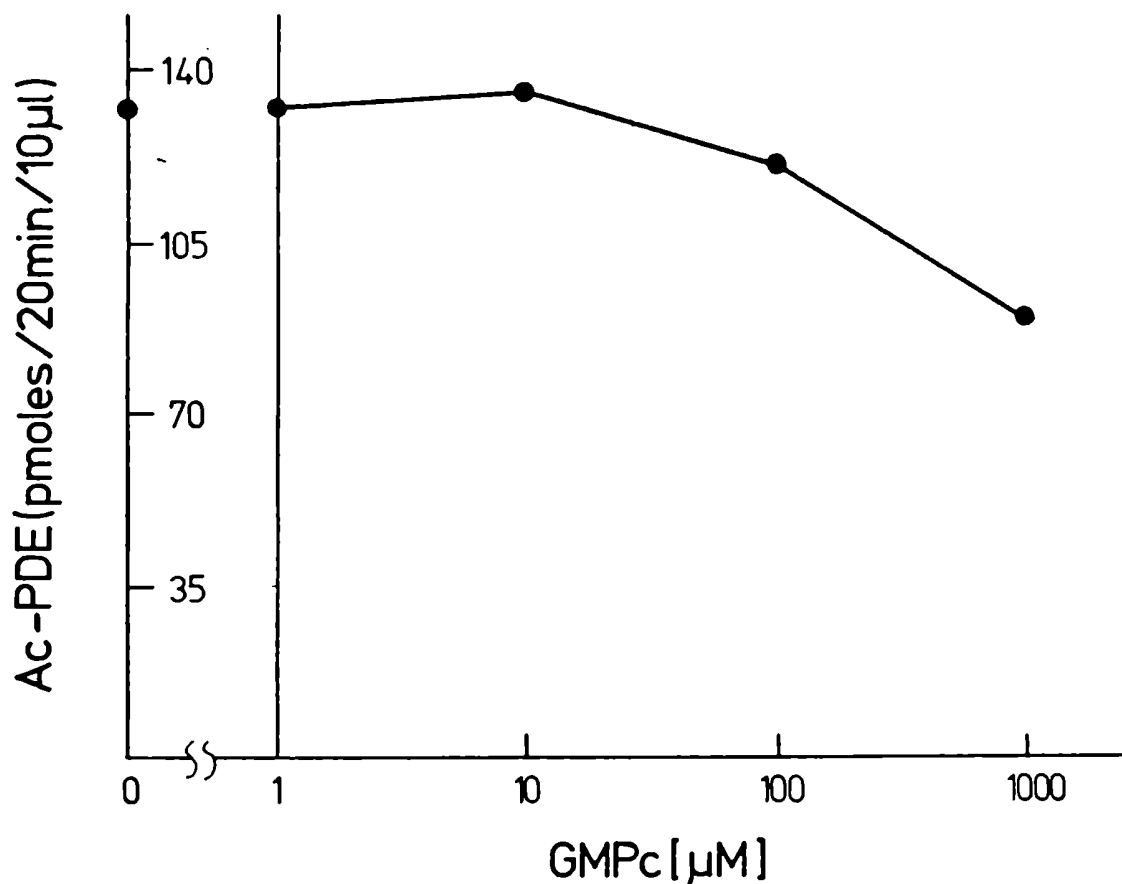


Figura 11: Efecto del GMPc sobre la actividad de Ac-PDE

Las fracciones limitadas por la barra en la figura 10 (18 ml) se juntaron y dializaron contra buffer Tris-acetato 30 mM, pH6; 2-mercaptoetanol 4 mM. Para concentrar la actividad enzimática el dializado se sembró en una columna de DEAE-celulosa de 1 ml equilibrada con el buffer de diálisis. La columna se lavó con 2 volúmenes de buffer de equilibrio y la proteína se eluyó con el mismo buffer conteniendo 0,8 M de acetato de Na. Se recogieron fracciones de 0,1 ml y se ensayó actividad de Ac-PDE a 1 µM de AMPc [<sup>3</sup>H] en alícuotas de cada fracción. Se juntaron las fracciones con actividad enzimática (1 ml) y se dializaron contra buffer A. La recuperación de la actividad de esta segunda DEAE-celulosa fue del 100%.

De la fracción resultante se ensayó actividad de Ac-PDE en alícuotas de 10 µl a una concentración de AMPc [<sup>3</sup>H] de 10 µM y Mn<sup>2+</sup> 10 mM y en presencia de concentraciones crecientes de GMPc.

hidrólisis del AMPc [ $^3\text{H}$ ] fue necesario alcanzar en el ensayo una concentración de GMPc 100 veces superior a la del AMPc [ $^3\text{H}$ ].

De los resultados de la Tabla 7 y de las Figuras 10 y 11 se puede concluir que:

- a) La actividad específica de Gc-PDE de extractos solubles de M.rouxii es de 3 a 10 veces menor que la actividad específica de Ac-PDE a todas las concentraciones de nucleótido cíclico ensayadas.
- b) Las dos actividades de fosfodiesterasa parecen ser dos entidades diferentes ya que: 1) se separan en columna de DEAE-celulosa, 2) cada actividad es específica para su respectivo nucleótido cíclico, 3) a juzgar por las recuperaciones de ambas actividades luego de la cromatografía en DEAE-celulosa, la actividad de Gc-PDE sería menos estable que la de Ac-PDE, 4) ambas actividades enzimáticas presentan un requerimiento diferencial para los cationes ensayados, así la Gc-PDE funciona igualmente bien con iones  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ , mientras que el  $\text{Mn}^{2+}$  resultó 2 a 3 veces más efectivo que el  $\text{Mg}^{2+}$  para la hidrólisis del AMPc por su enzima.

## VI. PURIFICACION PARCIAL DE LA ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA DE AMPc SOLUBLE

La estrategia de purificación seguida en el presente estudio tuvo como objetivo la separación de la actividad de Ac-PDE soluble de micelio de Mucor rouxii de la mayor cantidad posible de otras proteínas, poniendo especial énfasis en la separación de la actividad de Ac-QP, que como se verá más adelante participa directamente en el proceso de activación de la PDE.

### 1.- Preparación de la fracción S<sub>100</sub>

Se partió de 20 g de polvo de micelio, y se preparó la fracción S<sub>100</sub> como se indicó en Materiales y Métodos (sección IV.3.). Se obtuvieron 46 ml de S<sub>100</sub> la cual se consideró como primera etapa de purificación. Se incluyó benzamidina 20 mM en el buffer de homogenización con el objeto de minimizar el efecto de proteasas celulares. Como se verá más adelante, la proteólisis limitada de la Ac-PDE de este hongo produce una forma enzimática que presenta mayor actividad que la de la forma no proteolizada de la enzima e insensible a la activación por fosforilación.

### 2.- Fraccionamiento con sulfato de amonio

La fracción S<sub>100</sub> obtenida en el paso anterior se llevó a 55% de saturación con una solución de sulfato de amonio saturada y

neutralizada (pH 7). La suspensión obtenida se centrifugó a 8.000 x g durante 20 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se guardó a -20°C. En estas condiciones la enzima se conserva durante varias semanas sin pérdida apreciable de actividad.

Esta etapa de purificación fue buena como tal, ya que se separó el 75% de la proteína del S<sub>100</sub> y la recuperación de la actividad fue del orden del 80%.

### 3.- Cromatografía en DEAE-celulosa

El precipitado obtenido en la etapa anterior se resuspendió en un volumen mínimo de buffer B, obteniéndose 4,3 ml de extracto (fracción de sulfato de amonio), que contenía 174 mg de proteína, y se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa de 1,4 x 16 cm equilibrada en buffer B. Para bajar la fuerza iónica y permitir la adsorción de la muestra a la resina se utilizaron dos métodos alternativos: a) la fracción de sulfato de amonio se desaló por pasaje a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada con buffer B conteniendo glicerol 20% (v/v) o b) la muestra se sembró diluida en buffer B en porciones de 40 ml de modo de obtener una concentración de proteína de 1 mg/ml. Luego del sembrado, la columna se lavó con un volumen de buffer de equilibrio y se desarrolló la cromatografía con un gradiente lineal de ClNa entre 0-0,45 M preparado en buffer de equilibrio.

Los resultados obtenidos se grafican en la Figura 12. Se observó un solo pico de actividad de Ac-PDE que eluyó a una concentración de ClNa de 0,25 M y que co-cromatografió con el pico de actividad de Ac-QP. La Figura 12 muestra un perfil típico de elución de ambas actividades enzimáticas.

Las fracciones limitadas por la barra en la Figura 12, se juntaron y concentraron por precipitación con sulfato de amonio sólido hasta 80% de saturación, cuidando de mantener el pH de la suspensión en el rango 7-7,5 con buffer Tris-ClN 100 mM, pH 7,5. La suspensión se centrifugó a 8.000 x g durante 20 min y el precipitado obtenido, resuspendido en un volumen mínimo de buffer B, se dializó contra 100 volúmenes del mismo buffer durante 2 horas. El dializado se clarificó por centrifugación. El sobrenadante obtenido (fracción de DEAE-celulosa) se utilizó en la etapa siguiente de la purificación.

En la cromatografía en DEAE-celulosa se separó una cantidad apreciable de proteína y la actividad de Ac-PDE se purificó aproximadamente 6 veces respecto del paso anterior.

#### 4.- Gradiente de sacarosa

La fracción de DEAE-celulosa se sembró, dividida en alícuotas iguales, en 6 gradientes de sacarosa 5-20% preparados en buffer B. Se recogieron, unas sobre otras, las 26 fracciones obtenidas de

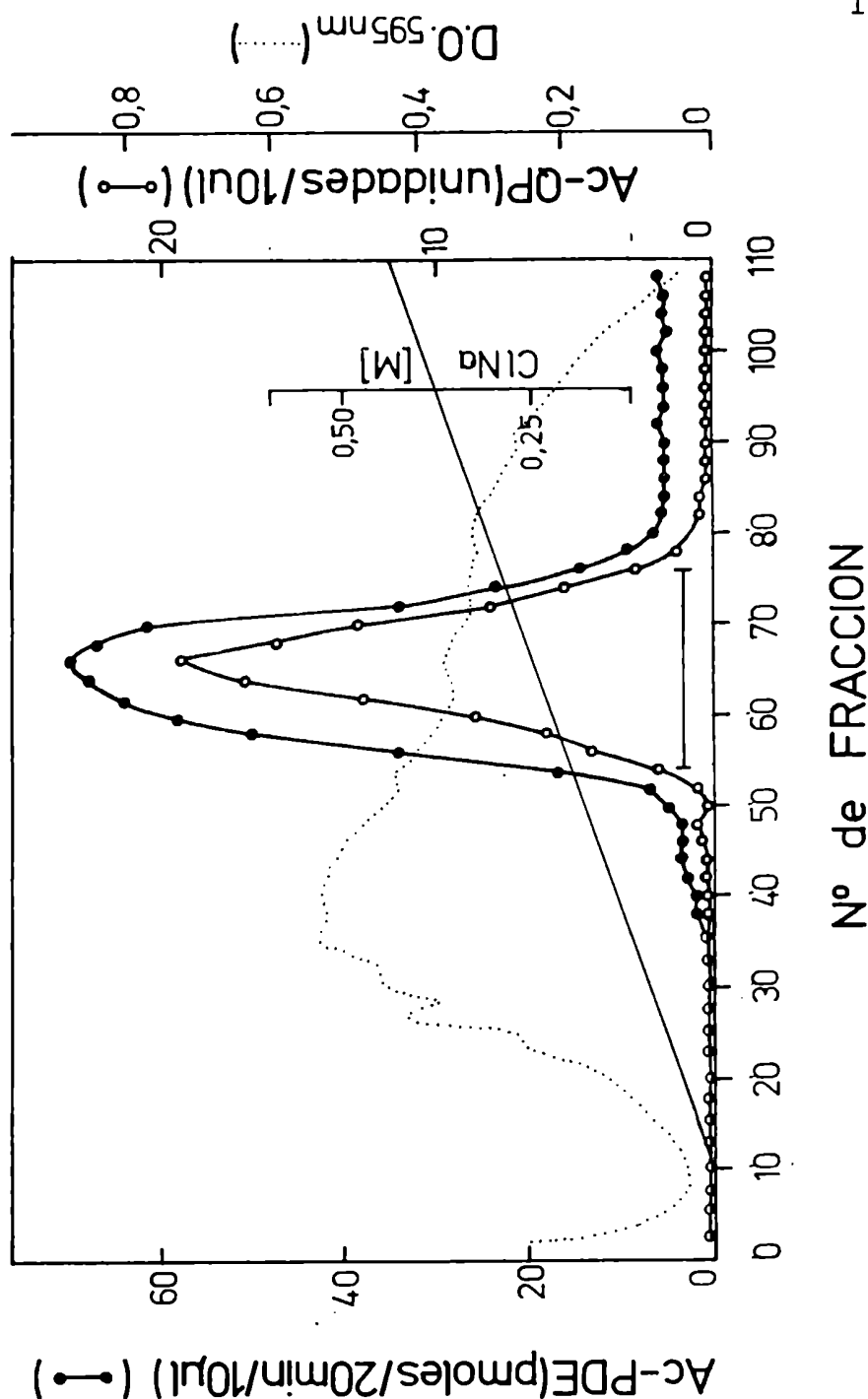


Figura 12: Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de la fracción de sulfato de amonio

Se aplicó la fracción de sulfato de amonio en una columna de 25 ml de DEAE-celulosa equilibrada en buffer B. La columna se lavó con 25 ml de buffer de equilibrio y la proteína se eluyó con un gradiente lineal de ClNa 0-0,45 M preparado en el buffer de equilibrio. Las demás condiciones se indicaron en Mat. y Mét. (sección VI.1.). Las actividades de Ac-PDE y Ac-QP se ensayaron en alícuotas apropiadas según se indicó en las secciones V.1. y V.5.1.. La línea de puntos indica el perfil de elución de la proteína.

cada gradiente, resultando fracciones de aproximadamente 1,1 ml. Se ensayó actividad de Ac-PDE y de Ac-QP en alícuotas de cada una de estas fracciones. Un perfil de sedimentación típico de ambas actividades se muestra en la Figura 13. Las fracciones limitadas por la barra, se juntaron y concentraron a través de una columna de DEAE-celulosa de 1 ml. El concentrado se dializó contra buffer B y se guardó a -20°C (fracción de gradiente de saca-rosa). Las fracciones con actividad de Ac-QP se juntaron y concen-traron a través de un concentrador Minicon - B 15. La fracción obtenida se guardó a -20°C para ser utilizada en algunos ensayos de activación de la Ac-PDE.

Resultó útil incluir esta etapa de purificación, ya que, como se vé en la Figura 13 con este procedimiento se separa completamente la actividad de Ac-PDE de la de Ac-QP.

##### 5.- Cromatografía de afinidad en columna de Azul 2-Agarosa

Se utilizó esta etapa en la purificación de la Ac-PDE, ya que se ha demostrado que la cromatografía de afinidad que utiliza como ligando dextrano azul puede emplearse ventajosamente para la purificación de proteínas que tienen afinidad para los nucleótidos li-neales de adenosina (v.g. ATP, NAD o Coenzima A) (392).

Morrill y colaboradores (376) describieron el uso de esta téc-nica para purificar a homogeneidad la Ac-PDE de cerebro bovino.



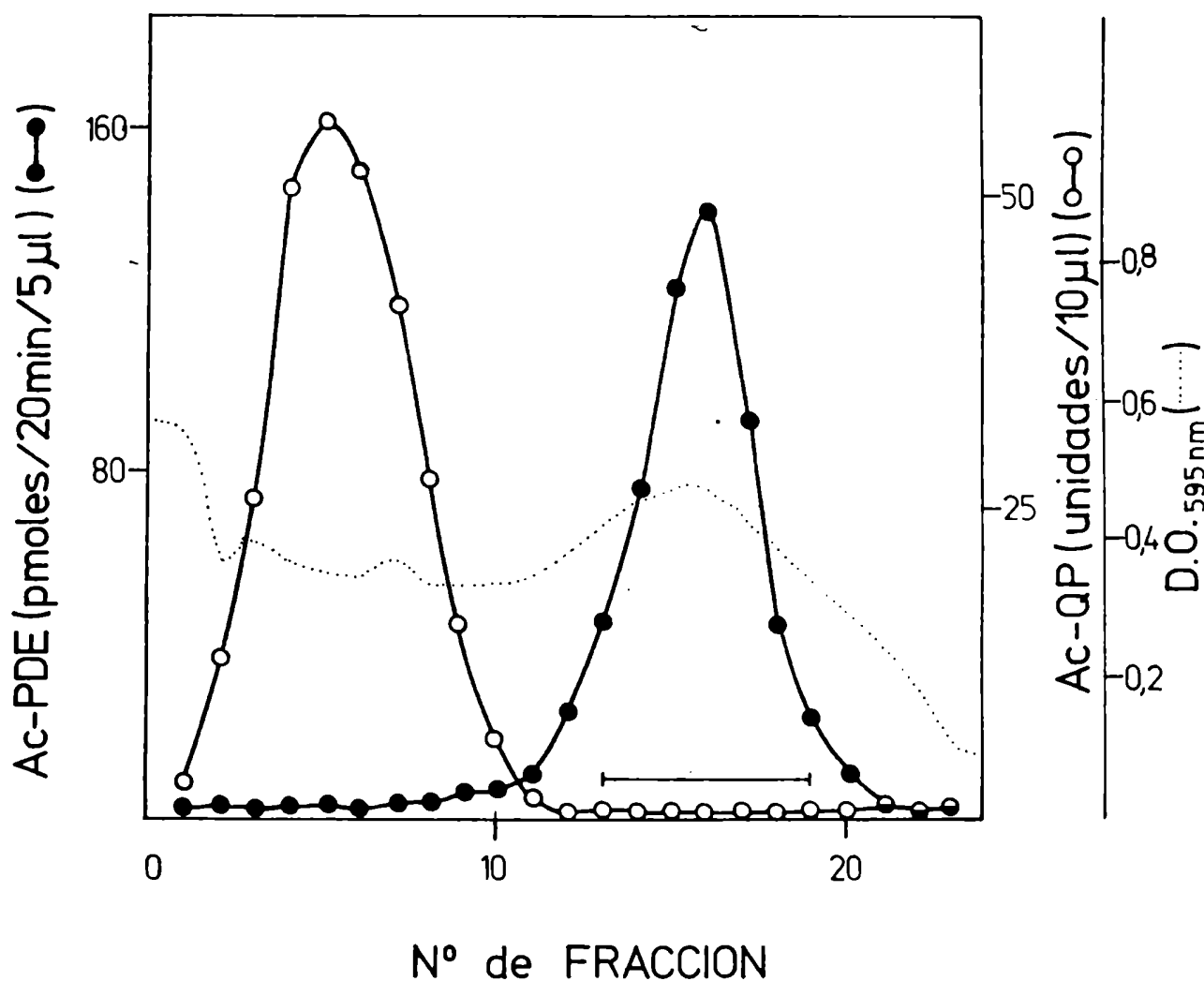


Figura 13: Sedimentación en gradiente de sacarosa de la fracción de DEAE-celulosa

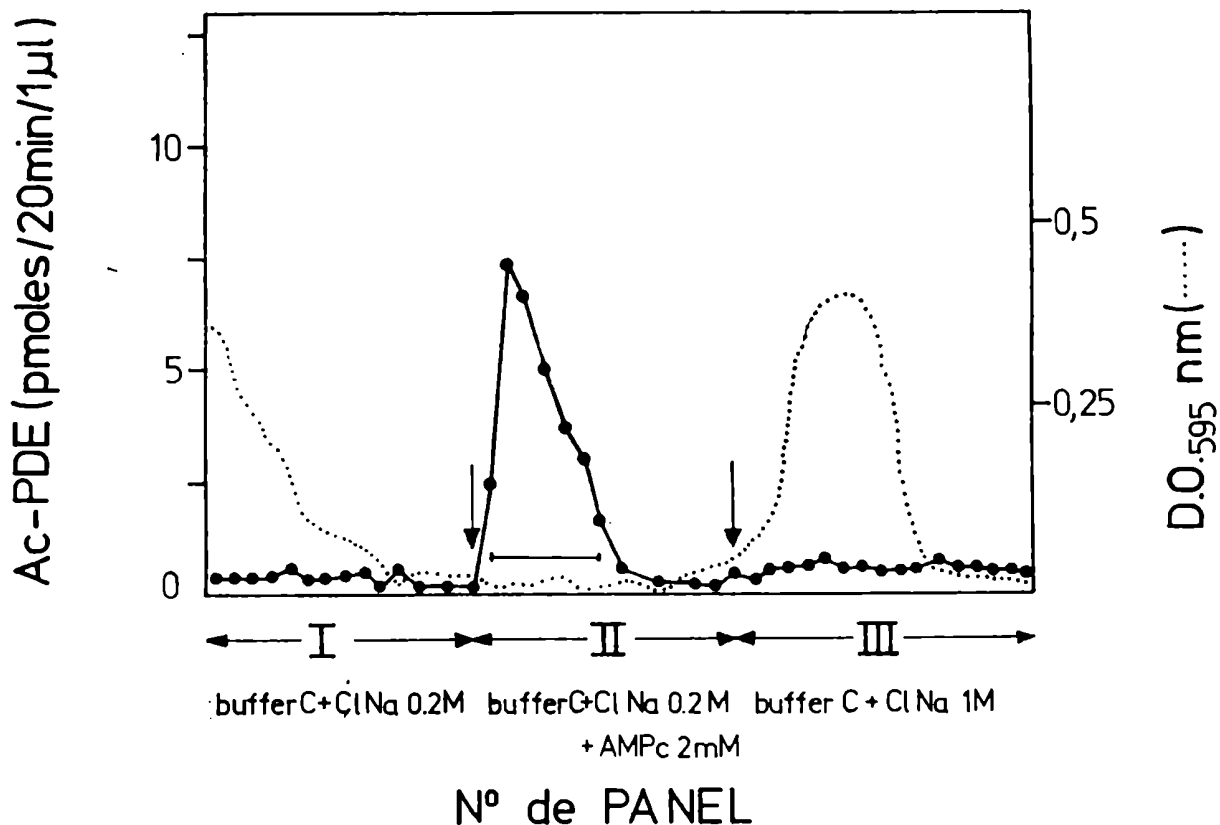
Se sembró la fracción de DEAE-celulosa en 6 gradientes de sacarosa 5-20% preparados en buffer B. Las condiciones de la corrida se indicaron en Mat. y Mét. (secc. VII.). Las actividades de Ac-PDE y de Ac-QP se ensayaron en alícuotas apropiadas según se indicó en las secciones V.1. y V.5.1.. La línea de puntos indica el perfil de elución de la proteína.

Con la Ac-PDE de M.rouxii purificada hasta la etapa 4 se realizaron numerosos ensayos preliminares buscando las mejores condiciones de adsorción de la enzima al gel y su posterior elución. Así, se encontró que a pH 7,5 la mayoría de la actividad de PDE no fue retenida en la columna, mientras que a pH 6,3 más del 90% de la actividad enzimática se adsorbió al gel.

En base a estos ensayos preliminares se adoptó el siguiente protocolo en esta etapa de la purificación: la fracción de gradiente de sacarosa (1 ml) se dializó contra 100 volúmenes de buffer C conteniendo  $Cl_2Mg$  2 mM y se sembró dividida en 2 fracciones de 0,5 ml cada una. Después de sembrar cada alícuota, la columna se cerró durante una hora para permitir la adsorción de la muestra al gel. Todas las operaciones se realizaron a 4°C y la cromatografía se desarrolló como se indicó en Materiales y Métodos (sección VI.3.).

Un perfil típico de elución de la actividad enzimática y de la proteína se muestra en la Figura 14. Se observa que con el lavado salino se separó una cantidad apreciable de proteína no enzimática; la actividad de Ac-PDE eluyó como un pico agudo por acción del AMPc agregado al buffer de elución. Del gráfico también se observa que un lavado posterior del gel con alta concentración salina hace que eluya otra cantidad considerable de proteína sin actividad de Ac-PDE.

Figura 14: Cromatografía en columna de Azul 2-Agarosa de la fracción de gradiente de sacarosa



Se sembró la fracción de gradiente de sacarosa dializada contra buffer C, en una columna de 1,5 ml de Azul 2-Agarosa equilibrada en el mismo buffer. Las condiciones de cromatografía se indicaron en Mat.y Mét. (secc. VI.3.). De cada panel se recogieron 14 fracciones de 0,5 ml. Para determinar la actividad enzimática en las fracciones correspondientes a la elución con buffer conteniendo AMPc, (Panel II) se tomaron alícuotas de 50 µl de cada fracción y se agregó 50 µl de una solución de BSA de 10 mg/ml. La proteína se precipitó con 0,3 ml de una solución saturada de sulfato de amonio; luego de centrifugación, el precipitado se resuspendió en 50 µl de buffer: Tris-ClH 10 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 2 mM, y se ensayó actividad de Ac-PDE en alícuotas de 1 µl. La actividad enzimática de las fracciones correspondientes al lavado (Panel I) y a la elución con ClNa 1 M (Panel III) se ensayó directamente en alícuotas apropiadas. En todos los casos la actividad de Ac-PDE se determinó a 1 µM de AMPc [<sup>3</sup>H]. La línea de puntos indica el perfil de elución de la proteína.

Las fracciones limitadas por la barra se juntaron y concentraron por ultrafiltración a través de un concentrador Minicon-B 15 y el concentrado se dializó contra buffer A conteniendo glicerol. 20% (v/v).

La actividad específica de Ac-PDE en la fracción de este último paso de purificación fue de 8.200 pmoles de AMPc hidrolizado/min/mg de proteína, lo cual representó una purificación de aproximadamente 260 veces respecto de la fracción S<sub>100</sub>. (Ver Tabla 8).

#### VII. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE LA FOSFODIESTE- RASA DE AMPc.

La Figura 15 muestra el perfil de proteínas (15 A) y de actividad enzimática (15 B) de la preparación de Ac-PDE de la última etapa de purificación alcanzada (fracción de Azul 2-Agarosa).

Como se vé en la Figura 15 A la preparación no es homogénea. Por densitometría del gel se pudieron detectar 4 picos principales de proteína; designados I, II, III y IV de acuerdo a su movilidad electroforética, solo el pico III, cuyo R<sub>f</sub> fue 0,62, coincidió con el pico de actividad de Ac-PDE (Figura 15 B). Por el área de los distintos picos de proteína se puede estimar que la Ac-PDE es aproximadamente el 30% de la proteína total.

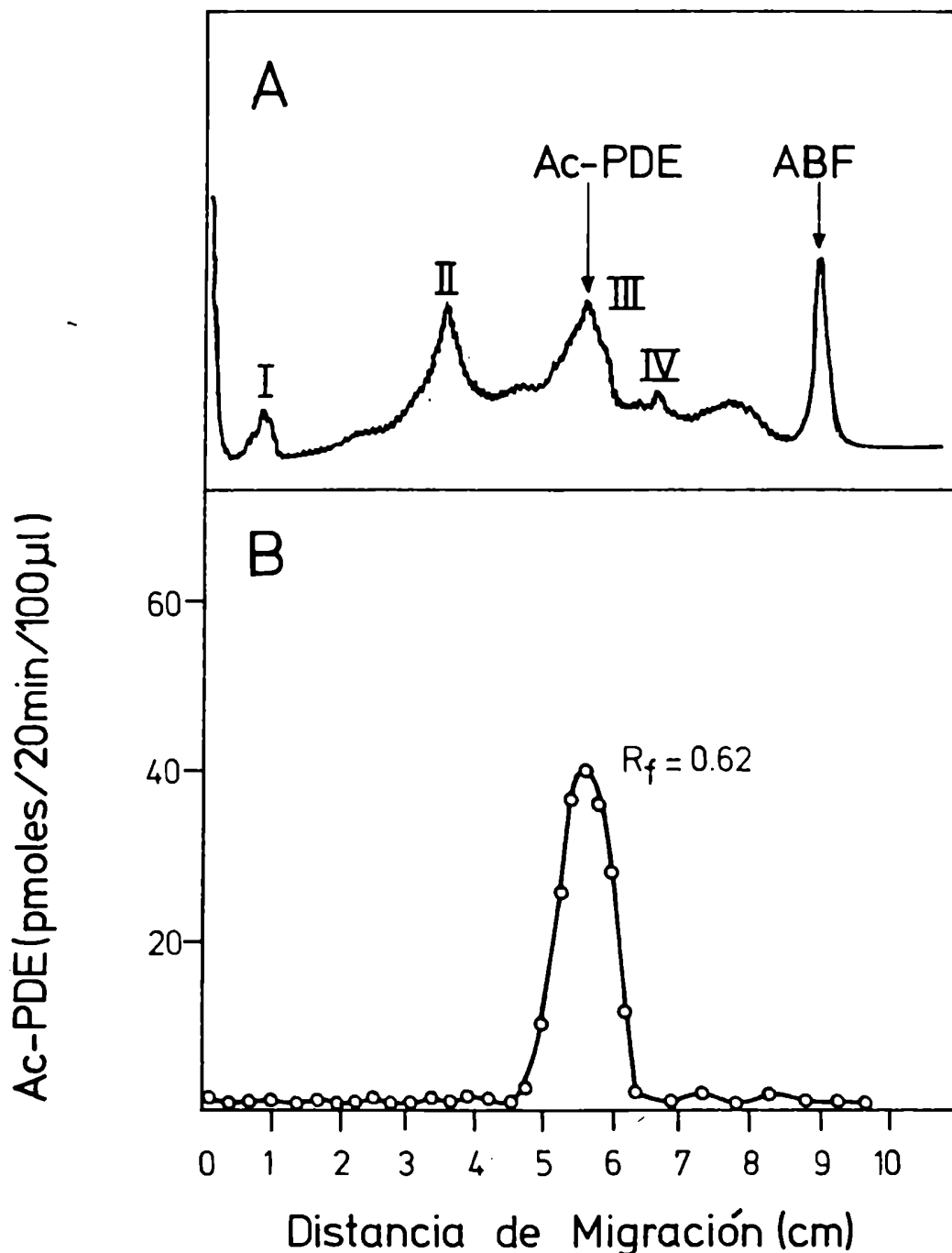
Tabla 8

Purificación parcial de la Ac-PDE soluble de micelio\*

Fracción	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad específica (pmoles/min/mg)	Actividad total (pmoles/min)	Recuperación (%)	Purificación (veces)
1. S <sub>100</sub>	46	645	31.2	20.124	100	1
2. Sulfato de amonio	4,3	174	93.6	16.286	81	3
3. DEAE-ce- lulosa	1,8	20	616	12.320	61	20
4. Gradiente de sacarosa	1	5	1220	6.100	30	39
5. Azul 2- Agarosa	0,2	0,2	8.200	1.640	8	262

\* Se partió de 20 gr de polvo de micelio (peso húmedo) y se preparó la fracción S<sub>100</sub> como se indicó en la sección IV.3. de Materiales y Métodos).

Figura 15: Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fracción de Azul 2-Agarosa



Dos alícuotas de 50 µl de la fracción de Azul 2-Agarosa, conteniendo 50 µg de proteína, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% como se indicó en Mat. y Mét. (secc. IX). Uno de los geles se cortó en rodajas de 3 mm y en cada una de ellas se midió actividad de Ac-PDE como se indicó en la secc. V.2.. El otro gel se tiñó para visualizar las proteínas y se procesó como se indicó en la secc. IX. A) densitometría del gel teñido y B) perfil de actividad de Ac-PDE. ABF indica la distancia recorrida por el colorante indicador de frente.

### VIII. PARAMETROS CINETICOS DE LA FOSFODIESTERASA DE AMPc

Se calculó la constante de afinidad para el sustrato y la velocidad máxima de hidrólisis del AMPc de la Ac-PDE soluble. Para estas medidas cinéticas se utilizó la enzima de la etapa 3 de purificación (Tabla 8).

La representación de Lineweaver-Burk (393) para la actividad de Ac-PDE respecto de la concentración de sustrato puede observarse en la Figura 16.

Se vé que la representación es lineal hasta una concentración de sustrato de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ ; de esta parte del gráfico se calculó una  $K_m$  aparente de 2,5  $\mu\text{M}$  y una  $V$  de 920 picomoles de AMPc hidrolizados/min/mg de proteína. A concentraciones mayores de sustrato (20,50 y 100  $\mu\text{M}$ ) la representación se aparta de la linealidad.

Este tipo de comportamiento bifásico se observó en preparaciones enzimáticas poco purificadas de tejidos de mamíferos (197,207, 211,241) y de algunos eucariontes inferiores (v.g., 343,352,356, 360) y puede explicarse como se vió en la Introducción (sección IX.1.) por: a) un sistema de isoenzimas con diferente afinidad por el sustrato, b) una enzima alostérica con cooperatividad negativa, c) una enzima con dos sitios para el sustrato, no interactuantes y d) una enzima que se agrega en formas que representan distinta afinidad por el sustrato.

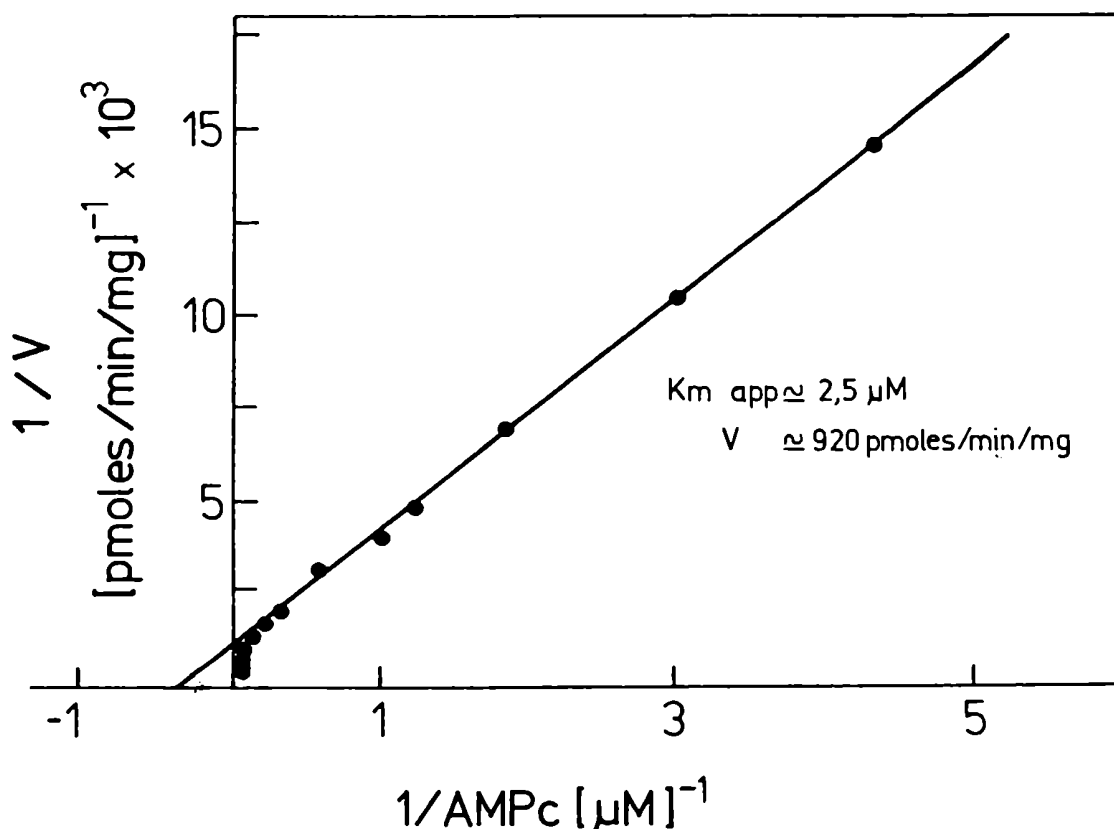


Figura 16: Representación de Lineweaver-Burk para la Ac-PDE soluble

La actividad de Ac-PDE se determinó con el ensayo standard variando la concentración de AMPc no radioactivo desde 0,2 a 100  $\mu M$ , a una concentración constante de AMPc [ $^3H$ ] de 0,035  $\mu M$ . La concentración de extractos enzimático se ajustó de tal manera que para ninguna de las concentraciones de AMPc utilizadas se consumiera más del 20-25% del sustrato. Las velocidades iniciales se obtuvieron de curvas de tiempo obtenidas para cada concentración utilizada de AMPc.



En el caso de la enzima de Mucor rouxii se podrían descartar las posibilidades a) y d) ya que ambas implican la presencia de más de una forma enzimática de Ac-PDE, mientras que los resultados hallados a lo largo del presente trabajo indicarían que al menos los extractos solubles poseen una sola especie enzimática que no forma agregados, ya que la enzima eluye como un pico simétrico por filtración en gel (Figura 19), sedimenta como un solo pico simétrico en un gradiente lineal de sacarosa (Figura 18) y da un solo pico de actividad en columna de DEAE-celulosa a pH 6 o 7,5 (Figuras 10 y 12).

Aunque de los resultados experimentales obtenidos no pueden descartarse las posibilidades b y c es importante señalar que las concentraciones intracelulares de AMPc del hongo oscilaron entre 1 y 2  $\mu\text{M}$ , de tal modo que un segundo sitio de baja afinidad por el sustrato, mayor de 20  $\mu\text{M}$ , no sería actuante en condiciones fisiológicas.

De todas maneras la existencia de una forma cinética de Ac-PDE de  $K_m$  aproximadamente 2,5  $\mu\text{M}$  sería coherente con la concentración intracelular de AMPc en este organismo e indicaría el papel fisiológico que cumple esta actividad enzimática en la regulación de los niveles intracelulares de este nucleótido. Dado que los valores de la  $K_m$  de las fosfodiesterasas de AMPc encontrados en los distintos sistemas oscilan aproximadamente entre

0,8 y 3  $\mu\text{M}$  para las formas de alta afinidad y entre 10 y 100  $\mu\text{M}$  para las formas de baja afinidad (197), la enzima de M.rouxii estaría comprendida en la primera categoría.

IX. REQUERIMIENTO DE CATIONES DIVALENTES PARA LA ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA DE AMPc

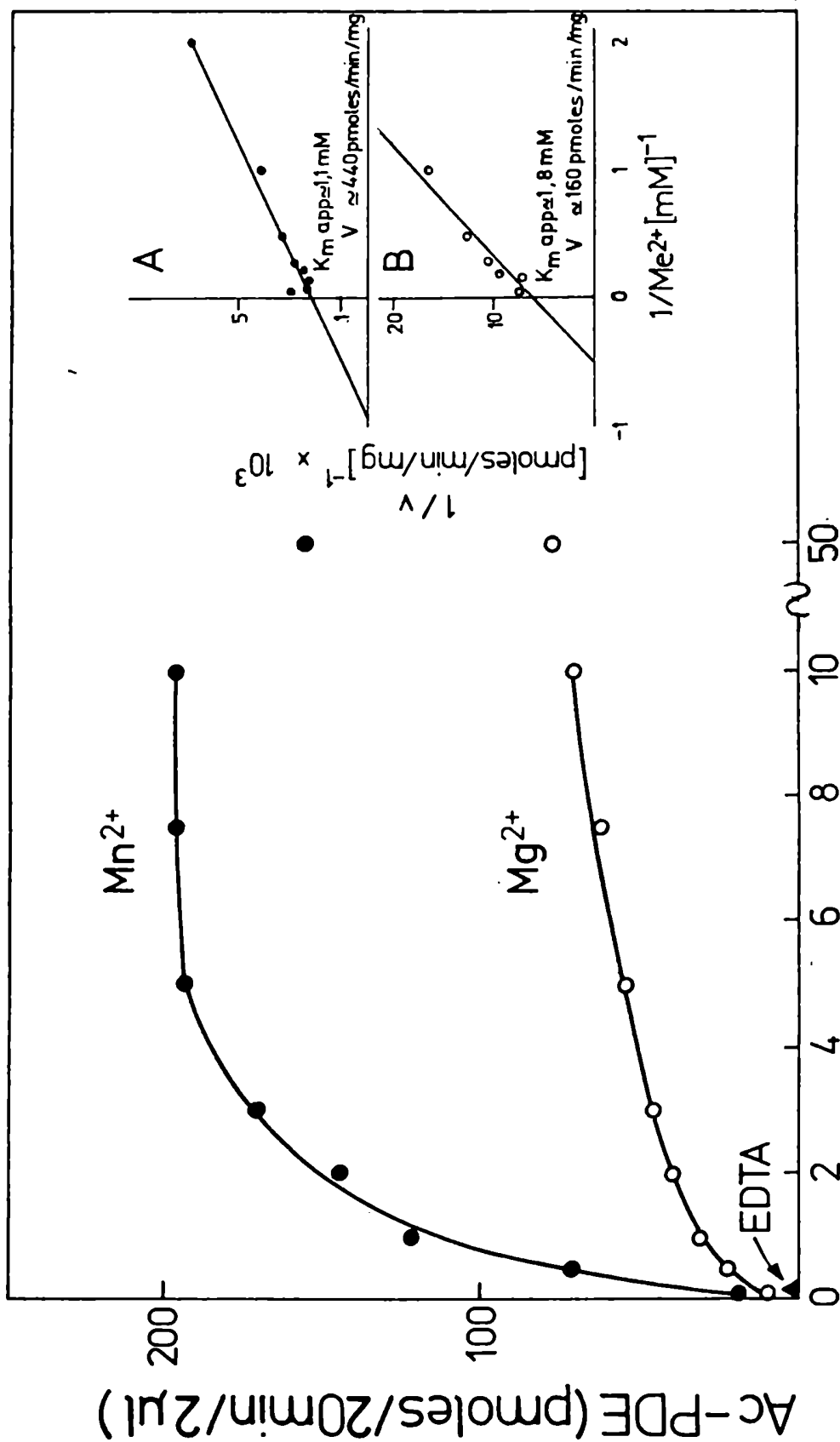
Ya en los trabajos en los cuales describió por primera vez una actividad de fosfodiesterasa (191,192) se señalaba el requerimiento de iones  $\text{Mg}^{2+}$  para la expresión de su actividad máxima. Este requerimiento de catión divalente, generalmente  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ , fue descrito para la mayoría de las actividades de PDE estudiadas, tanto de eucariontes superiores (v.g. 193,196) como de eucariontes inferiores (v.g. 49,180,341,360) y de procariontes (394,395).

En ciertos casos otros cationes divalentes pueden reemplazar parcial o totalmente al  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ . Así el  $\text{Co}^{2+}$  resultó el catión más efectivo para la forma particulada de la Ac-PDE de corteza renal de conejo (250). En general los cationes monovalentes producen solo una ligera estimulación de la actividad enzimática (49,180,394). En ciertos procariontes el  $\text{Fe}^{2+}$  resultó un activador más efectivo que el  $\text{Mg}^{2+}$  de la actividad de PDE (394). En el caso de la Ac-PDE de levadura de panadería los metales divalentes resulta

ron inhibitorios aún utilizados a concentraciones de 1 mM (354). El  $Mg^{2+}$  a concentraciones superiores a 0,8 mM resultó inhibitorio de la enzima de cerebro de conejo (192). También se ha observado que la combinación de dos cationes estimulatorios de la actividad enzimática resultó inhibitoria de la misma (396). En algunos casos el efecto estimulatorio o inhibitorio de un catión depende de la concentración de sustrato utilizada en el ensayo, como se demostró para la forma soluble de la Ac-PDE de corteza renal de conejo (250). Finalmente y para destacar la importancia del estudio del efecto de los cationes sobre la actividad de PDE, podemos decir que el entorno iónico puede influenciar las formas específicas de la PDE de nucleótidos cíclicos al influenciar la estabilidad y actividad de las enzimas y de las proteínas en general.

Con el objeto de caracterizar la actividad de Ac-PDE de Mucor rouxii, se estudió el requerimiento de cationes divalentes tales como  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ . Para determinar este requerimiento se midió la actividad enzimática en presencia de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  a distintas concentraciones en el ensayo. Los resultados obtenidos se ilustran en la Figura 17 donde se grafican curvas dosis-respuesta para los dos cationes empleados. Se hicieron controles para eliminar la posibilidad de algún efecto de estos metales sobre la actividad de fosfatasa alcalina utilizada en la segunda etapa de la reacción.

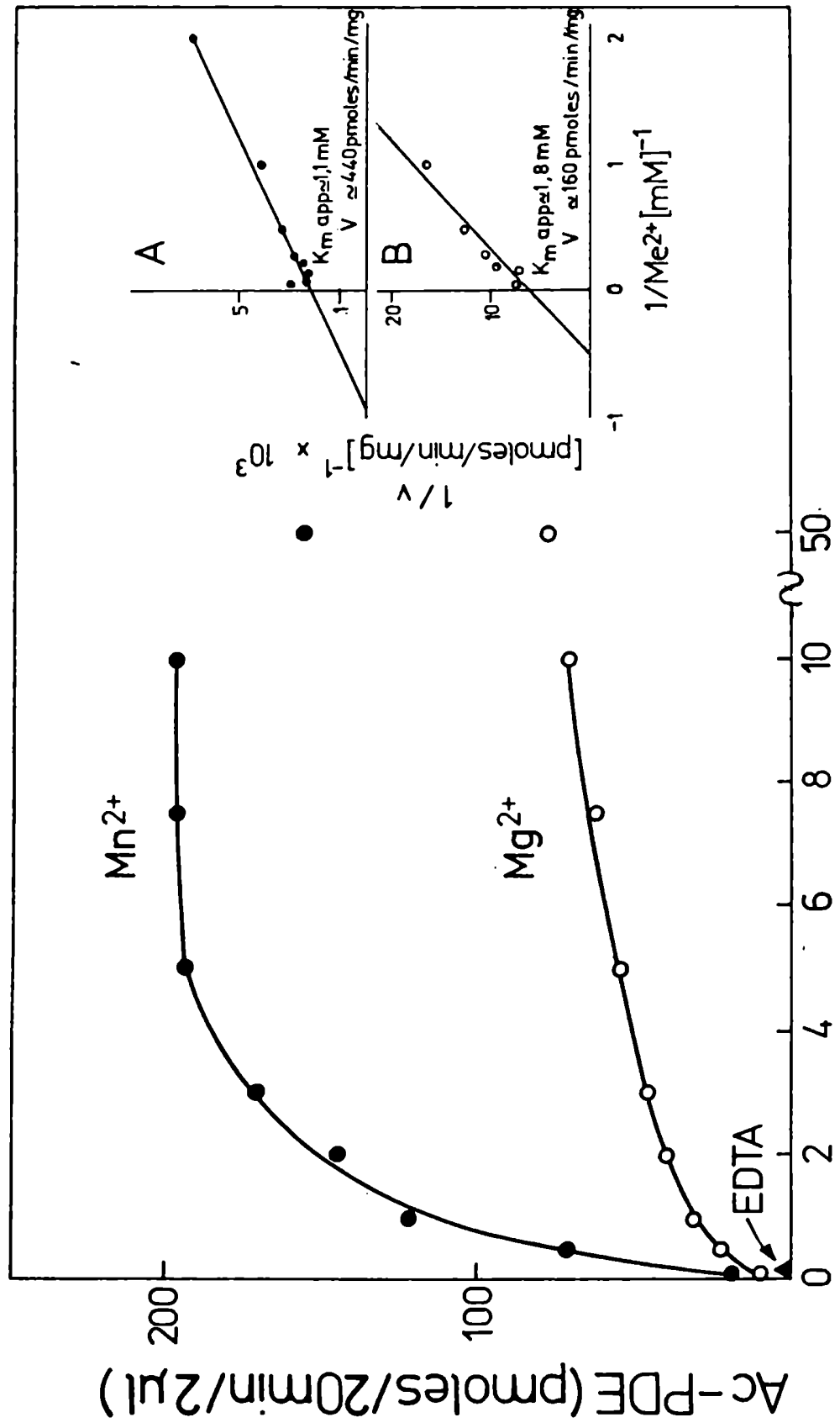
Figura 17: Efecto de los iones  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  sobre la actividad de Ac-PDE



$Me^{2+}$  [mM]

Se ensayó actividad de Ac-PDE a una concentración de AMPc [ $^3H$ ] de  $10 \mu M$  en alícuotas apropiadas de la fracción de DEAE-celulosa y con concentraciones crecientes de  $Cl_2Mg$  (O) o  $Cl_2Mn$  (●). El  $\blacktriangle$  indica la actividad en ausencia de metal y en presencia de EDTA  $0,5 \text{ mM}$ . Los insertados A y B muestran los resultados de Lineweaver-Burk para  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  respectivamente.

Figura 17: Efecto de los iones  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  sobre la actividad de Ac-PDE



Se ensayó actividad de Ac-PDE a una concentración de AMPc [<sup>3</sup>H] de 10 µM en alícuotas apropiadas de la fracción de DEAE-celulosa y con concentraciones crecientes de Cl<sub>2</sub>Mg (○) o Cl<sub>2</sub>Mn (●). El ▲ indica la actividad en ausencia de metal y en presencia de EDTA 0,5 mM. Los insertados A y B muestran las representaciones de Lineweaver-Burk para Mn<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> respectivamente.

En ausencia de catión divalente se observó una actividad enzimática residual que se anuló en presencia de EDTA 0,5 mM posiblemente por quelación de trazas de metales presentes en la preparación. En la Figura 17 se observa que la estimulación máxima se alcanza con 10 mM de  $Mg^{2+}$  o 5 mM de  $Mn^{2+}$ , siendo la estimulación por iones  $Mn^{2+}$  de 2 a 3 veces mayor que por  $Mg^{2+}$ . En aquellos experimentos en donde se midió la actividad enzimática en presencia de ambos cationes, a una concentración de 5 mM para cada uno, se observó que el valor de la velocidad de hidrólisis del AMPc fue intermedio al que se alcanza agregando al ensayo los cationes por separado a una concentración de 10 mM cada uno. Este hecho puede explicarse por la afinidad semejante de la enzima para ambos metales y las distintas velocidades máximas alcanzadas con  $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ . Los valores de  $K_m$  y de  $V$  para ambos metales se dedujeron de la representación de Lineweaver-Burk (insertado de la Figura 17, A y B), obteniéndose valores de 1,1 y 1,8 mM para las constantes de afinidad del  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  respectivamente y de 440 y 160 picomoles de AMPc [ $^3H$ ] hidrolizado/min/mg de proteína para los respectivos valores de  $V$ .

En términos generales la concentración intracelular de  $Mg^{2+}$  en los tejidos es 10 veces superior a la de  $Mn^{2+}$ . Por otra parte el  $Mg^{2+}$  es considerado un macroelemento para el crecimiento de los hongos. Dado que la afinidad de la enzima para ambos me-

tales es semejante, es difícil decidir con que metal actúa la enzima in vivo; no obstante la mayor velocidad de hidrólisis del AMPc alcanzada cuando se ensaya la actividad con  $Mn^{2+}$  debe tenerse en cuenta desde el punto de vista del mecanismo de la reacción in vitro.

X. EFEECTO DE ALGUNOS INHIBIDORES Y ACTIVADORES CLASICOS DE LA FOSFODIESTERASA DE AMPc SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA DE MUCOR ROUXII

A partir de los primeros trabajos en los cuales se describió una actividad de PDE (191,193) se ha encontrado que la mayoría de las fosfodiesterasas de tejidos de mamíferos son inhibidas en forma competitiva por metilxantinas. Al mismo tiempo se ha descrito el efecto activador del imidazol sobre dicha actividad (193,198,199).

El ATP a concentraciones fisiológicas inhibe la actividad de PDE tanto de eucariontes superiores (196,327,397) como de algunos eucariontes inferiores (351,356) mientras que la enzima de otros eucariontes inferiores es relativamente insensible a la inhibición por ATP (360) o no es inhibida en absoluto por este nucleótido (354). Casos singulares los constituyen la Ac-PDE extracelular de Dictyostelium discoideum (398) y la Gc-PDE alta

afinidad para el sustrato de retina de vertebrados (255) las que son estimuladas por ATP.

Como parte de la caracterización de la Ac-PDE de Mucor rouxii se estudió el efecto de las metilxantinas, del imidazol y del ATP sobre la actividad enzimática de la etapa 4 de purificación. La Tabla 9 resume los resultados obtenidos.

Como puede observarse la enzima de M. rouxii no fue inhibida en forma significativa por las metilxantinas ensayadas, aún a concentraciones altas (10 mM), contrariamente a lo que sucede con la enzima de tejidos de mamíferos en donde concentraciones de 1 mM de estos compuestos inhiben en un 50 - 70% la actividad fosfodiesterá sica (193). En este sentido la Ac-PDE de M.rouxii se asemeja a la enzima de otros hongos (341,354,360), de plántulas de arveja (210) y Trypanosoma cruzi (180).

El imidazol tuvo un ligero efecto estimulatorio a la concentración más baja utilizada y un leve efecto inhibitorio a la concentración más alta.

En la Tabla 9 puede verse que el ATP hasta una concentración 1 mM no tuvo un efecto significativamente importante sobre la actividad de Ac-PDE soluble de M.rouxii. De acuerdo con los resultados obtenidos con una enzima parcialmente purificada, el ATP no sería un modulador fisiológico de la actividad de Ac-PDE del hongo.



Tabla 9

Efecto de inhibidores y activadores clásicos sobre la actividad  
de Ac-PDE de *Mucor rouxii* \*

Adiciones a la mezcla de incubación	Concentración	Actividad de Ac-PDE (%)
Ninguna	—	100
Imidazol	5	115
	10	92
Cafeína	5	82
	10	75
Teofilina	5	80
	10	73
Teobromina	5	80
	10	86
ATP	0,05	111
	0,5	114
	1	106

\* Los resultados obtenidos se obtuvieron utilizando 10  $\mu$ g de la enzima de la fracción de gradiente de sacarosa (Tabla 8). La actividad de Ac-PDE se midió a 10  $\mu$ M de AMPc [ $^3$ H] y con Mn<sup>2+</sup> como catión divalente. Las actividades enzimáticas se expresaron como porcentaje de la actividad sin adiciones, la que se tomó como el 100%.

Se estudió el efecto de estos compuestos sobre la segunda etapa de la reacción para descartar cualquier posible acción sobre la actividad de fosfatasa alcalina; los valores de actividad de Ac-PDE encontrados no difirieron de los del control sin adiciones.

XI. EFEECTO DE CALMODULINA SOBRE LA FOSFODIESTERASA DE AMPc  
DE MUCOR ROUXII

Se trató de probar si la Ac-PDE soluble de M.rouxii era activable por  $Ca^{2+}$  lo cual sería una forma indirecta de demostrar la presencia de una proteína activadora similar a la calmodulina, en extractos poco purificados del hongo. Se trabajó con la fracción  $S_{100}$  porque una fracción más purificada podría haber perdido la proteína regulatoria putativa, ya que está demostrado que en tejidos superiores la calmodulina se puede separar de la fosfodiesterasa por pasaje a través de una columna de intercambio aniónico (180,301).

Se sabe que la activación de la PDE por calmodulina requiere concentraciones micromolares de  $Ca^{2+}$  y que este efecto activador es anulado por EGTA. En base a estos datos se diseñó el experimento resumido en la Tabla 10, para ver si la presencia de  $Ca^{2+}$  en el ensayo de la Ac-PDE estimulaba la actividad enzimática. Los resultados de la Tabla indican que la actividad de Ac-PDE no se modificó por el agregado de  $Cl_2Ca$  hasta una concentración 0,5 mM, ni se inhibió por el agregado EGTA.

Los resultados obtenidos sugieren que la Ac-PDE de M.rouxii es insensible a calmodulina  $Ca^{2+}$  o bien que la enzima es sensible al activador proteico pero este no está presente en el extracto. Para

Tabla 10

Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$ , EGTA y calmodulina sobre la Ac-PDE soluble de *Mucor rouxii*\*

Adiciones a la mezcla de incubación	Concentración	Actividad de Ac-PDE (pmoles/min/mg)
1. Ninguna		19,3
2. $\text{Cl}_2\text{Ca}$		
	10 $\mu\text{M}$	18,1
	100 $\mu\text{M}$	20
	500 $\mu\text{M}$	18,6
3. EGTA		
	200 $\mu\text{M}$	19,8
	500 $\mu\text{M}$	19,2
	1000 $\mu\text{M}$	17,4
4. Calmodulina		
	50 $\mu\text{g/ml}$	18,5
	100 $\mu\text{g/ml}$	19,7
5. Calmodulina + $\text{Cl}_2\text{Ca}$		
	50 $\mu\text{g/ml}$ + 100 $\mu\text{M}^{(a)}$	19,4
	100 $\mu\text{g/ml}$ + 100 $\mu\text{M}$	19,7

\* La actividad de Ac-PDE de la fracción  $S_{100}$  se ensayó con  $\text{Mg}^{2+}$  como metal divalente y a una concentración de sustrato de 10  $\mu\text{M}$  con las adiciones indicadas. Las alícuotas de la fracción se tomaron de tal manera que no más del 10% del sustrato fuera hidrolizado en el ensayo en ausencia de calmodulina,  $\text{Ca}^{2+}$ .

(a) En estas condiciones la actividad basal de la Ac-PDE de corazón bovino fue estimulada 3 veces.

descartar la primera posibilidad se estudió el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la Ac-PDE en presencia de calmodulina exógena (de corazón bovino). Los resultados obtenidos se ven en la misma Tabla y sugieren que la actividad de Ac-PDE no es activable al menos por calmodulina heteróloga. La insensibilidad a calmodulina, homóloga o heteróloga, es un hecho general para la mayoría de las fosfodiesterasas de los eucariontes inferiores (180,288,289,291) y para las enzimas específicas para AMPc de tejidos superiores. (Ver Introducción, sección IX.2.).

## XII. ALGUNOS PARAMETROS HIDRODINAMICOS Y MOLECULARES DE LA FOSFODIESTERASA DE AMPc

Para la determinación de los parámetros hidrodinámicos y moleculares de la Ac-PDE soluble de Mucor rouxii se utilizaron los datos obtenidos de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y de filtración molecular en columna de Sephadex G-200.

### XII. 1. Coefficiente de sedimentación y coeficiente de difusión

Estos parámetros se determinaron utilizando los datos de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Para ello se utilizó una preparación de la fracción de sulfato de amonio (etapa 2 de la purificación). La Figura 18 muestra el perfil de sedimentación

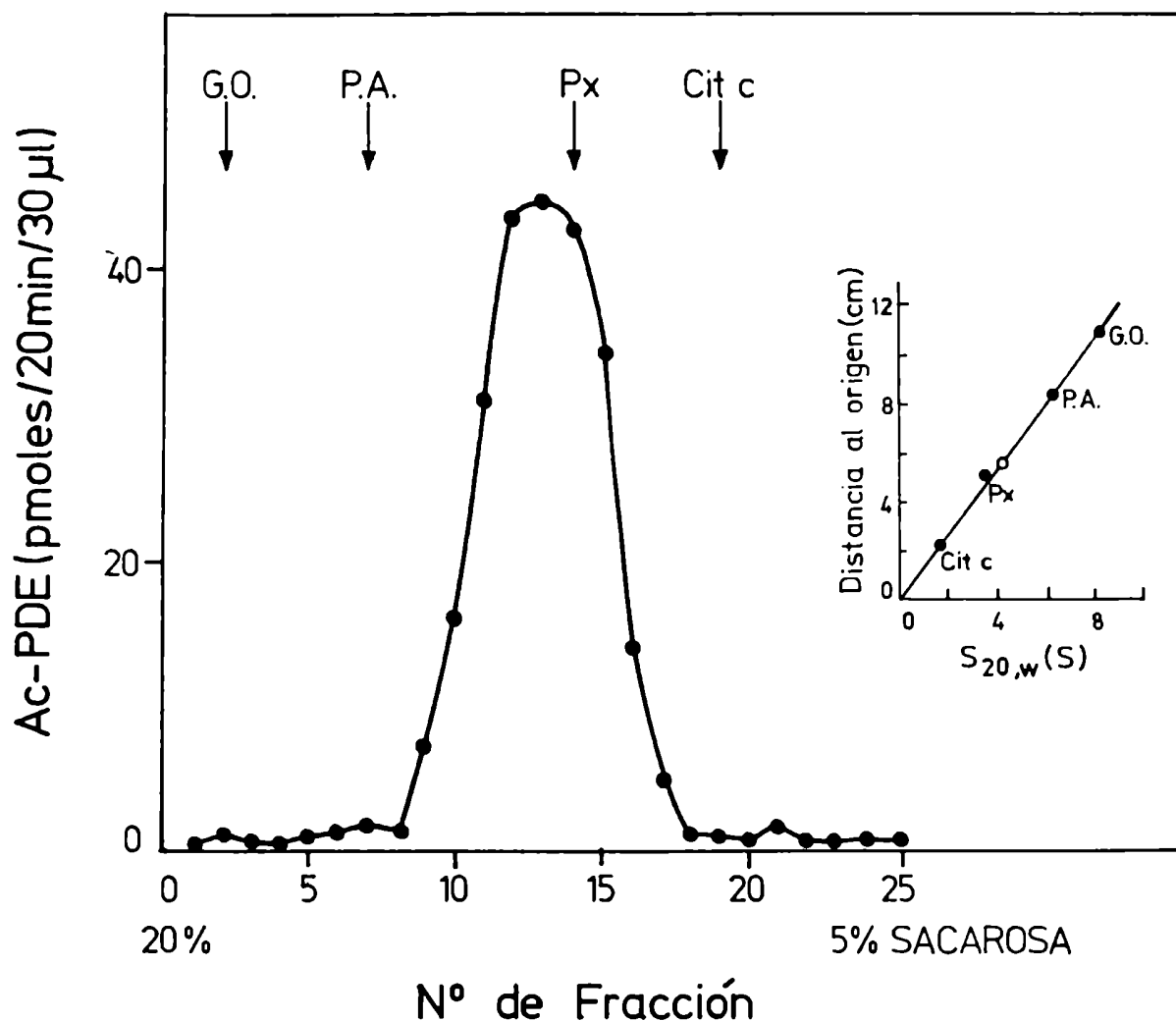


Figura 18: Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de la fracción de sulfato de amonio

Se sembraron en un gradiente de sacarosa 5-20% preparado en buffer B 1,2 mg de la preparación enzimática junto con las proteínas marcadoras, en un volumen final de 0,1 ml. Las condiciones de la centrifugación se indicaron en la sección VII. de Materiales y Métodos.

En cada una de las fracciones del gradiente se ensayó actividad de Ac-PDE en alícuotas apropiadas. Las flechas indican la posición de las proteínas marcadoras: glucosa oxidasa (G.O.), peroxidasa (Px), fosfatasa alcalina (P.A.) y citocromo c (Cit c). En el gráfico insertado se encuentra la relación entre los coeficientes de sedimentación ( $S_{20,w}$ ) y las distancias recorridas desde el borde superior del gradiente por la Ac-PDE (o) y por las proteínas marcadoras (●).

de la actividad de Ac-PDE y la posición de las proteínas marcadas. En el insertado se observa la relación entre las distancias recorridas por las proteínas marcadoras y sus respectivos coeficientes de sedimentación; también se señala la ubicación sobre la recta de la Ac-PDE según su movilidad en el gradiente. Los resultados obtenidos muestran que la PDE de M.rouxii sedimentó bajo la forma de un pico simétrico entre la fosfatasa alcalina y la peroxidasa. El valor del coeficiente de sedimentación obtenido fue de 4,2 S, que corresponde al de una proteína pequeña. Con esta técnica no se detectaron formas de mayor coeficiente de sedimentación.

El valor del coeficiente de difusión de la Ac-PDE fue de  $8.7 \cdot 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/seg y se obtuvo de los datos del gradiente utilizando la relación descrita en la sección VIII. 1. de Materiales y Métodos.

## XII.2. Radio de Stokes

Para la determinación de este parámetro de la enzima se utilizó la técnica de filtración molecular a través de una columna de Sephadex G-200. Se utilizó una preparación de la fracción de sulfato de amonio. En base al Kav hallado para la Ac-PDE de la filtración molecular se determinó su radio de Stokes.

En la Figura 19 se muestra el perfil de elución de la Ac-PDI

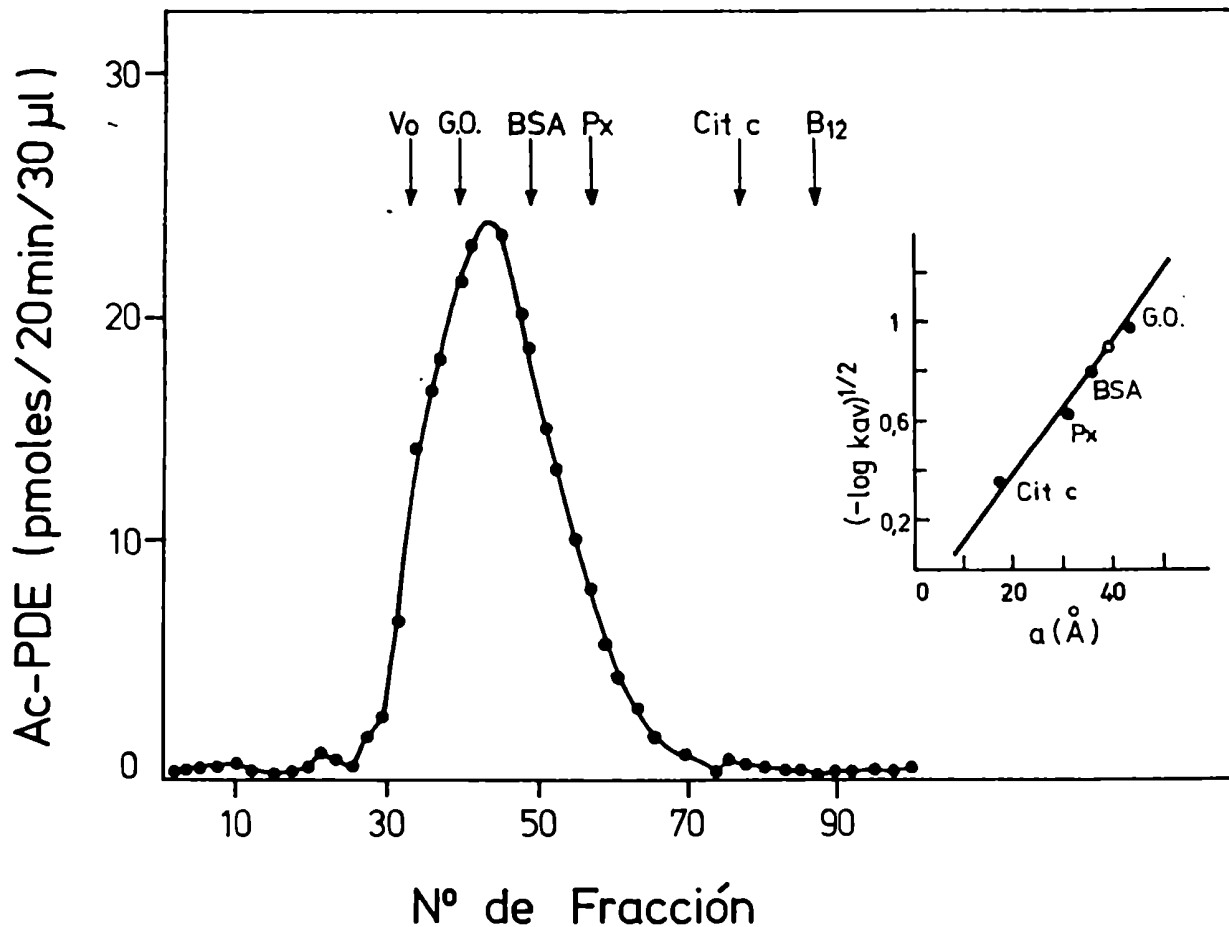


Figura 19: Filtración en una columna de Sephadex G-200 de la fracción de sulfato de amonio

Se sembró 1 ml de muestra conteniendo 30 mg de proteína de la preparación enzimática y los marcadores, a excepción de la BSA que se cromatografió por separado. Las condiciones de la cromatografía se indicaron en la sección VI.4. de Materiales y Métodos. Se ensayó la actividad de Ac-PDE en alícuotas apropiadas de las fracciones a una concentración de AMPc [ $^3\text{H}$ ]  $1 \mu\text{M}$ . Las flechas indican la posición de los marcadores: glucosa oxidasa (G.O.), seroalbúmina bovina (BSA), peroxidasa (Px) citocromo c (Cit c) y vitamina  $\text{B}_{12}$  ( $\text{B}_{12}$ ).  $\text{V}_0$  indica el volumen de elución del azul dextrano. El gráfico insertado muestra la relación entre los radios de Stokes ( $a$ ) y los  $K_{av}$  para la actividad de Ac-PDE (o) y para las proteínas marcadoras (●).

y la posición de las proteínas utilizadas como marcadores.

La actividad de Ac-PDE eluyó como un pico agudo y simétrico entre la actividad de glucosa oxidasa y la BSA. Por esta técnica tampoco se detectaron formas de mayor o menor peso molecular. Por otra parte la enzima eluida del gel, concentrado y recromatografiada en las mismas condiciones, volvió a dar el mismo perfil de elución (no se muestran los datos). En el insertado de la Figura 19 se resumen los datos de la filtración por gel en términos de  $K_{av}$  en función del radio de Stokes de las proteínas marcadoras. De acuerdo a estos datos la Ac-PDE del hongo presentó un radio de Stokes de aproximadamente 39 Å.

### XII. 3. Cálculo del peso molecular y del coeficiente friccional

A partir de los valores obtenidos del coeficiente de sedimentación y del radio de Stokes para la Ac-PDE, se calculó el peso molecular y el coeficiente friccional de la enzima según las ecuaciones indicadas en Materiales y Métodos (secciones VIII.3. y VIII.4.). Los valores obtenidos para estos dos parámetros fueron de 70,6 K y 1,4 respectivamente, indicando este último valor que se trataría de una proteína ligeramente asimétrica.



No existen en la literatura datos de parámetros físicos de fosfodiesterasas de eucariontes inferiores específicas para AMPc y de alta afinidad. Sin embargo pareció interesante la comparación de los valores hallados para los parámetros físicos de la enzima de M.rouxii con los encontrados por Thompson y colaboradores (236) para una Ac-PDE de riñón de perro de alta afinidad purificada a homogeneidad. De la comparación surge que ambas enzimas no solo son muy similares en cuanto a sus parámetros físicos sino en cuanto a sus propiedades cinéticas, regulación por ciertos moduladores y distribución subcelular. En la Tabla 11 se tabulan las principales características de ambas enzimas.

De la observación de los datos tabulados surgen similitudes notables y algunas diferencias. Los valores de los parámetros físicos y cinéticos son muy semejantes. Ambas enzimas son solubles y específicas para la hidrólisis de AMPc e insensibles a la activación por calmodulina. $\text{Ca}^{2+}$  y por bajas concentraciones de GMPc. La diferencia más notable es el distinto comportamiento frente a las de enzimas proteolíticas, así mientras que la enzima de riñón es insensible a la proteólisis limitada de Ac-PDE de Mucor es activada de 2 a 3 veces por tripsinización controlada ver más adelante la sección XIV.

Tabla 11

Características físico-químicas de la Ac-PDE de *Mucor rouxii* y de la Ac-PDE de riñón de perro (236).

<u>Característica</u>	<u>Ac-PDE</u>	
	<u>M.rouxii</u>	<u>riñón de perro</u>
Distribución subcelular	soluble	soluble
Especificidad para hidrólisis de AMPc	total	altamente específica
Km para AMPc ( $\mu\text{M}$ )	2,5	2,2
Coefficiente de sedimentación ( $S_{20,w}, S$ )	4,2	3,6
Coefficiente de difusión ( $D_{20,w} \cdot 10^7 \text{ cm}^2/\text{seg}$ )	8,9	8,6
Peso molecular	70,6	60,6 (a)
Radio de Stokes( $\text{\AA}$ )	39	35
Coefficiente friccional ( $f/f_0$ )	1,4	1,4
Activación por calmodulina	no	no
Activación por bajas concentraciones de GMPc	no	no
Activación por proteólisis	sí	no
Activación por fosforilación	sí	?

(a) valor más probable hallado por análisis de aminoácidos

XIII. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA DE AMP<sub>c</sub> DE MUCOR ROUXII POR FOSFORILACION-DESFOSFORILACION

XIII. 1. Activación por ATP de la Ac-PDE de una fracción enzimática poco purificada

A pesar de la falta de respuesta al ATP de la Ac-PDE de M.rouxii parcialmente purificada (ver Tabla 9), cuando se estudió el efecto de este nucleótido sobre la actividad enzimática de un extracto poco purificado se encontró que el ATP activaba a la enzima. Como se vé en la Tabla 12 la actividad enzimática aumentó por la presencia de ATP en la mezcla de incubación siendo este aumento de actividad proporcional a la cantidad de extracto presente.

Con la mayor cantidad de proteína ensayada se logró una activación de casi dos veces sobre la actividad basal.

XIII. 2. Conservación de la activación por ATP

Se investigó si el efecto activante del ATP requería la presencia constante del nucleótido durante el ensayo enzimático. Para ello se preincubaron alícuotas convenientes del extracto con ATP.Mg y AMP<sub>c</sub> y se hicieron controles preincubados en las mismas condiciones pero omitiendo el ATP. Luego de la preincu-

Tabla 12

Activación por ATP de la Ac-PDE de la fracción de sulfato de amonio \*

<u>µg de preparación enzimática</u>	<u>Actividad de Ac-PDE (pmoles/20 min)</u>		<u>r</u>
	<u>-ATP</u>	<u>+ ATP 0,2 mM</u>	
100	68	82	1,2
200	130	201	1,5
400	240	422	1,8

\* Se utilizó un extracto enzimático de la etapa 2 de purificación (Tabla 8). La actividad enzimática se midió según se indicó en la sección V.4.1. de Materiales y Métodos a 10 µM de AMPc [<sup>3</sup>H].

r se definió como el cociente entre la actividad en presencia de ATP y la actividad en su ausencia.

bación, ambas muestras se pasaron por una columna de Sephadex G-25 para separar los metabolitos presentes en la preincubación. Se ensayó actividad de Ac-PDE en ausencia y en presencia de ATP en los filtrados. Los resultados obtenidos en estos ensayos se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13

Conservación de la activación por ATP luego de filtración por gel \*

<u>Condiciones de preincubación</u>	<u>Actividad de Ac-PDE</u>	
	(pmoles/20 min)	
	<u>- ATP</u>	<u>+ ATP</u>
Cl <sub>2</sub> Mg, AMPc,	63	113
Cl <sub>2</sub> Mg, AMPc, ATP	120	119

\* Se preincubaron alícuotas de 10  $\mu$ l de la fracción de sulfato de amonio (0,33 mg de proteína) en una mezcla de incubación que contenía en un volumen final de 0,1 ml: buffer fosfato de potasio 20 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 2 mM, AMPc 10  $\mu$ M y Cl<sub>2</sub>Mg 10 mM. Una de las mezclas contenía además ATP 0,2 mM. Al cabo de 10 min a 30°C, los tubos se colocaron en un baño de hielo y se agregó a cada uno 10  $\mu$ l de EDTA 0,1 M. Las mezclas se filtraron por una pequeña columna de Sephadex G-25 de 1 ml equilibrada con buffer fosfato de potasio 20 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 2 mM. La proteína se eluyó con buffer de equilibrio y se ensayó actividad de Ac-PDE en alícuotas de 20  $\mu$ l con Mg<sup>2+</sup> como catión divalente en presencia y en ausencia de ATP 0,1 mM.

Como puede observarse en la Tabla el extracto enzimático preincubado en presencia de ATP presentó una actividad basal de Ac-PDE 100% superior a la del control preincubado sin ATP. Además la enzima preincubada en presencia de ATP no respondió al agregado posterior de este nucleótido en el ensayo enzimático, mientras que en el extracto preincubado sin ATP la enzima fue capaz de ser activada casi dos veces sobre el nivel basal por el agregado de ATP.

Estos resultados indican que no es necesaria la presencia constante de ATP para la activación de la enzima y que una vez producida ésta, se mantiene en ausencia del activador.

### XIII. 3. Dependencia con el tiempo de la activación de la Ac-PDE por ATP.Mg y AMPc.

Se estudió como variaba la activación de la PDE por ATP.Mg y AMPc en función del tiempo de preincubación con estos metabolitos. Para ello se preincubaron alícuotas convenientes de la fracción enzimática de la etapa 2 de purificación distintos tiempos a 30°C y cantidades fijas de ATP.Mg y AMPc. Los valores obtenidos se compararon con los de los controles preincubados en las mismas condiciones pero sin el agregado de ATP.. Se observó que a 30°C la activación fue máxima a los 2 minutos de preincubación.

Los resultados que se muestran en la Figura 20 se obtuvieron

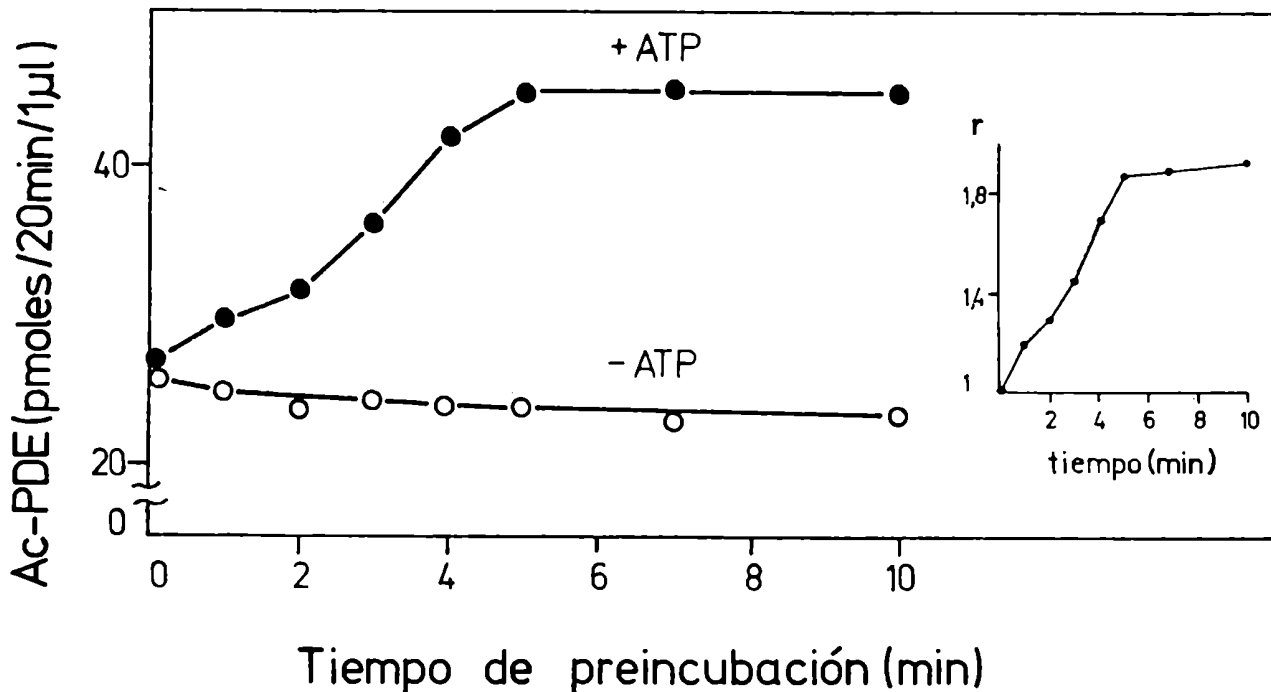


Figura 20: Dependencia de la activación de la Ac-PDE con el tiempo de preincubación

Se preincubaron alícuotas de 40  $\mu$ l de la fracción de sulfato de amonio en buffer fosfato de potasio 20 mM, pH 7,5; en un volumen final de 0,2 ml en presencia de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  10 mM, AMPc 5  $\mu$ M y ATP 0,1 mM (●) o en ausencia de ATP (○). A los distintos tiempos indicados se tomaron alícuotas de 20  $\mu$ l de cada mezcla y se les agregó 2  $\mu$ l de EDTA 0,2 M para detener la reacción. De cada una de estas alícuotas se tomaron 5  $\mu$ l y se ensayó la actividad de  $^2\text{Ac-PDE}$  en presencia de buffer fosfato de potasio 20 mM, pH 7,5; y con  $\text{Mg}^{2+}$  como catión divalente.

En el insertado se grafican los cocientes (r) de las actividades resultantes de las preincubaciones con ATP sobre los valores obtenidos en ausencia de este nucleótido en función del tiempo de preincubación.

disminuyendo la temperatura de preincubación a 21°C con el objeto de poder observar mejor la cinética de activación. En estas condiciones se observó que la activación alcanzó su valor máximo a los 5 min de preincubación.

Paralelamente a la cinética de la activación de la Ac-PDE se estudió la cinética de incorporación de  $PO_4 \left[ -^{32}P \right]$  a proteínas endógenas del extracto, reemplazando el ATP no radioactivo por  $ATP \left[ \gamma - ^{32}P \right]$ . Los resultados se ven en la Figura 21. Puede observarse que ambos procesos: activación de la enzima y fosforilación de proteínas siguieron una cinética similar.

#### XIII. 4. Efecto de la concentración de ATP sobre la activación de la Ac-PDE

Se estudió el efecto de concentraciones variables de ATP en la mezcla de preincubación sobre la activación de la Ac-PDE en un extracto enzimático de la etapa 2 de purificación. Los resultados, graficados en la Figura 22 muestran que la activación de la enzima depende de la concentración de ATP alcanzándose, en las condiciones de ensayo, un máximo de activación con una concentración de ATP 0,1 mM.

Si bien estos resultados muestran que existe una dependencia de la activación de la enzima con la concentración de ATP,



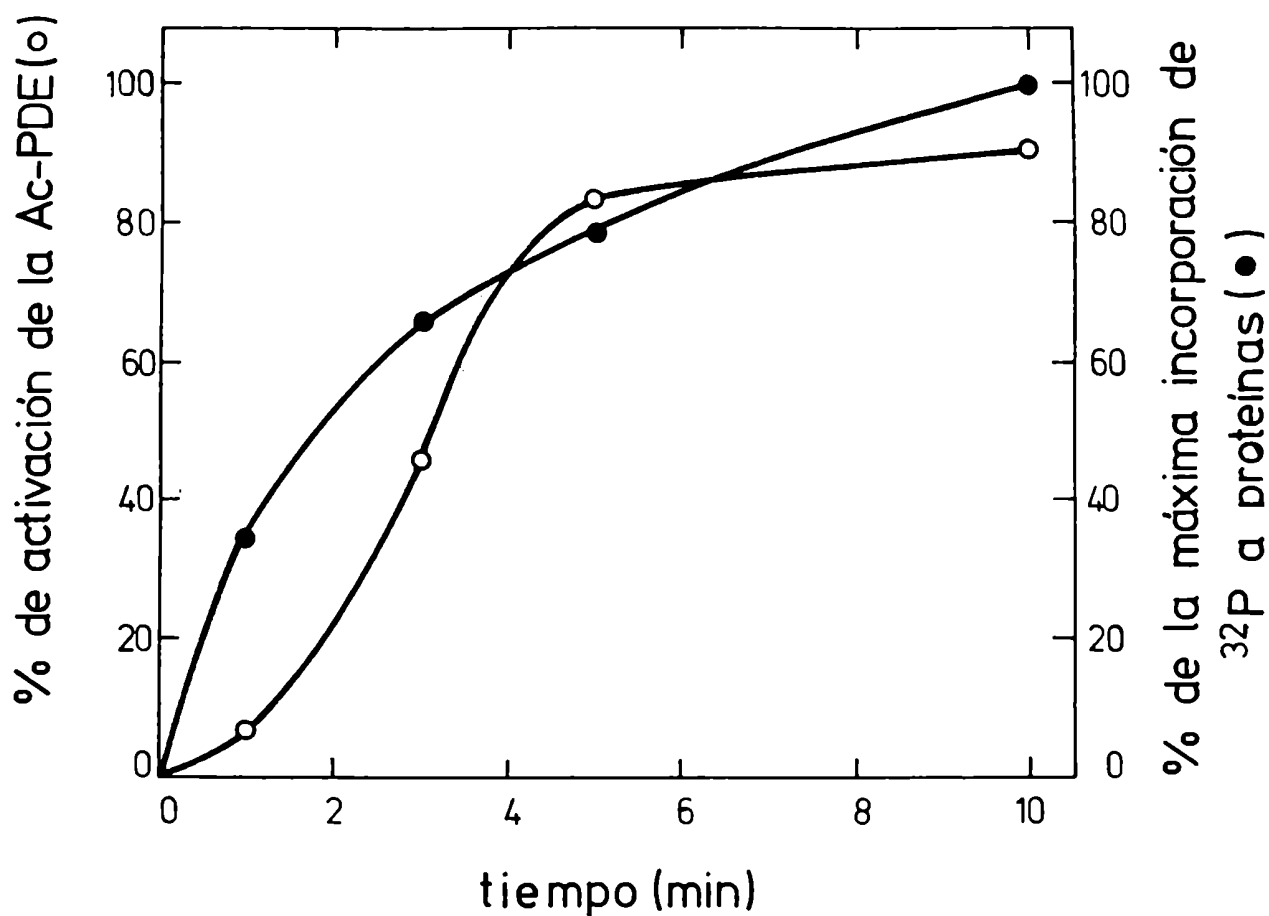


Figura 21: Cinética de la activación de la Ac-PDE y de la fosforilación de proteínas endógenas

Las condiciones de los ensayos fueron similares a las descritas en la leyenda de la Figura 20, a excepción de que para la medición de  $\text{PO}_4^{32}$  incorporado a proteínas endógenas se reemplazó el ATP por  $\text{ATP}[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ( $20 \cdot 10^6$  cpm/min). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de  $10 \mu\text{l}$  y se procesaron como se indicó para el ensayo de Ac-QP en la sección V.5.1. de Materiales y Métodos. La radioactividad máxima de  $^{32}\text{P}$  incorporado a proteína fue de 20.000 cpm/ $10 \mu\text{l}$ .

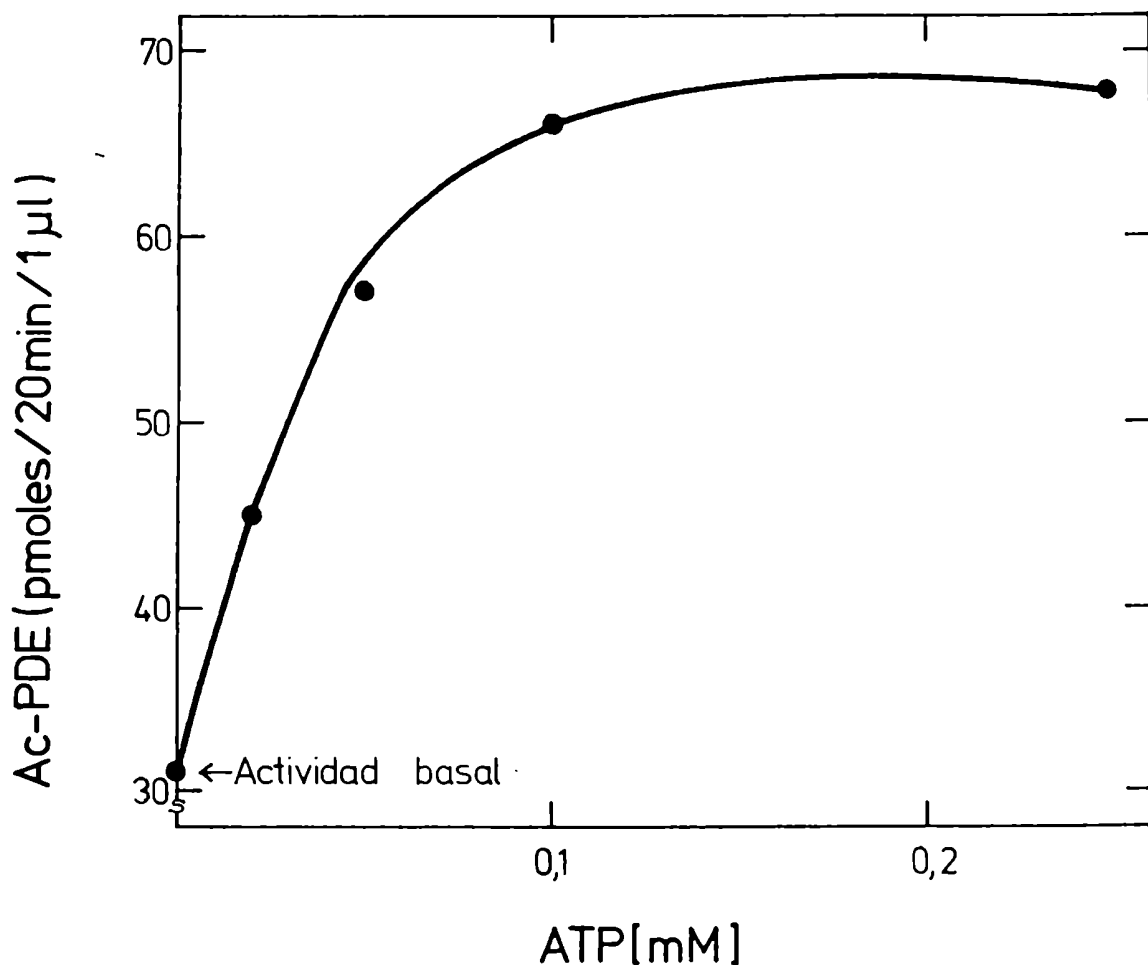


Figura 22: Efecto de la concentración de ATP sobre la activación de la Ac-PDE

Se preincubaron alícuotas de 0,3 mg de proteína de la fracción de sulfato de amonio durante 10 min a 30°C en un volumen final de 0,1 ml en presencia de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  10 mM, AMPc 5  $\mu\text{M}$  y ATP en concentraciones variables. Al cabo de este tiempo los tubos se colocaron en baño de hielo y la reacción se detuvo por el agregado de 5  $\mu\text{l}$  de EDTA 0,2 M. La actividad de Ac-PDE se ensayó en alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  con AMPc [ $^3\text{H}$ ] 10  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato de potasio 20 mM, pH 7,5 y con  $\text{Mg}^{2+}$  como catión divalente

pareció aventurado calcular algún parámetro cinético para este nucleótido ya que su concentración en el ensayo queda indeterminada debido a la presencia de ATPasas en este extracto.

### XIII. 5. Requerimientos para la activación de la Ac-PDE

Dado que los experimentos de activación de la Ac-PDE realizados hasta el momento se hicieron en presencia de ATP.Mg y AMPc, pareció obvio estudiar si todos estos metabolitos eran requeridos para la activación de la enzima.

La Tabla 14 muestra los resultados obtenidos cuando se compararon las actividades de Ac-PDE de un extracto de la etapa 3 de purificación preincubado en presencia de ATP.Mg y AMPc con las actividades obtenidas cuando se omitieron de a uno por vez, o todos ellos, de la mezcla de preincubación. Como puede verse la preincubación en presencia de ATP.Mg y AMPc produjo un aumento de la actividad de Ac-PDE de casi dos veces respecto del control preincubado en ausencia de los metabolitos. La omisión de cualquiera de ellos en la mezcla de preincubación mantuvo la actividad de la enzima en los valores del control. No se observó activación de la Ac-PDE cuando se reemplazó el ATP en la mezcla de preincubación por un derivado  $\beta,\gamma$  imido cuyo fosfato  $\gamma$  no es hidrolizable.

Tabla 14

Requerimientos para la activación de la Ac-PDE \*

Condiciones de preincubación	Actividad de Ac-PDE (pmoles/20 min)	% de la actividad máxima
a. Mezcla completa	82,2	100
b. -ATP, -AMPc, -Mg <sup>2+</sup>	42	51
c. -ATP	43,8	53,2
d. -AMPc	48,6	59,1
e. -Mg <sup>2+</sup> + EDTA 10 mM	41,4	50,3
f. -ATP + $\beta, \gamma$ -imido ATP 0,2 mM	40,8	49,6

\* Se preincubó una alícuota de 0,2 mg de proteína de la fracción de DEAE-celulosa durante 10 min a 30°C en un volumen final de 0,1 ml de la siguiente mezcla: buffer fosfato de potasio 20 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 2 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 10 mM, AMPc 5  $\mu$ M, ATP 0,1 mM (mezcla completa). Alícuotas iguales del extracto enzimático se preincubaron en las mismas condiciones de la mezcla completa con las omisiones y/o adiciones indicadas en la tabla (b. a f.). Al cabo del período de preincubación las mezclas se precipitaron con sulfato de amonio y se procesaron como se indicó en la sección V.4.2. de Materiales y Métodos.

Se ensayó actividad de Ac-PDE en alícuotas de 2  $\mu$ l de los precipitados resuspendidos.

De estos resultados se puede concluir que la activación por ATP de la Ac-PDE de M. rouxii tiene los mismos requerimientos que los de una fosforilación mediada por una quinasa de proteína dependiente de AMPc.

#### XIII. 6. Dependencia de la activación de la Ac-PDE con la quinasa de proteína dependiente de AMPc

Los resultados presentados en las Tablas 13 y 14 sugieren que la activación de la Ac-PDE de M.rouxii podría estar mediada por fosforilación en la que intervendría una quinasa de proteína dependiente de AMPc. Resultados obtenidos en el laboratorio ya habían demostrado que en la fracción de sulfato de amonio (etapa 2 de la purificación) existía actividad de Ac-QP, actividad que acompaña a la fosfodiesterasa en la cromatografía de dicha fracción en una columna de DEAE-celulosa (Figura 12). Coincidente con estos resultados son los de la Tabla 14 que muestran que en esta etapa de la purificación la Ac-PDE pudo ser activada en presencia de ATP.Mg y AMPc y sin agregado de Ac-QP exógena. Sin embargo cuando ambas actividades enzimáticas se separaron en gradiente de sacarosa debido a sus diferentes coeficientes de sedimentación, la activación de la Ac-PDE se hizo dependiente del agregado de Ac-QP. Los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla 15. Como puede observarse el agregado de ATP o Ac-QP por separado no

fueron capaces de elevar la actividad basal de la Ac-PDE, mientras que esta actividad enzimática se duplicó por la presencia conjunta de ATP y quinasa.

Tabla 15

Activación de la Ac-PDE mediada por proteína quinasa dependiente de AMPc \*

Ac-PDE ( $\mu$ g)	Ac-QP (unidades)	ATP (0,1 mM)	Actividad de Ac-PDE (pmoles/20 min)
10	-	-	98
10	-	+	103
10	60	-	96
10	60	+	187

\* Se ensayó actividad de Ac-PDE, con  $Mg^{2+}$  como catión divalente, en alícuotas de 2  $\mu$ l de la fracción de gradiente de sacarosa (etapa 4 de la purificación) con las adiciones indicadas.

Se utilizó como fuente de Ac-QP una preparación proveniente del mismo gradiente de sacarosa y cuya actividad específica era 3.800 unidades/mg de proteína. Esta actividad está libre de quinasas independientes de AMPc (Moreno, S., comunicación personal).

Como puede verse en la Figura 23 la activación de la Ac-PDE resultó dependiente de la cantidad de Ac-QP presente en la mezcla de incubación, alcanzándose un valor máximo de activación (2 veces) con 60 unidades de quinasa. La activación de la PDE fue completamente anulada por el agregado de un exceso de inhibidor termoestable de la quinasa. A ninguna concentración de Ac-QP utilizada se observó activación en ausencia de ATP.

Los resultados de la Tabla 15 y de la Figura 23 confirmaron que la activación de la Ac-PDE de M.rouxii está mediada por la quinasa de proteína dependiente de AMPc.

### XIII. 7. Parámetros cinéticos de la Ac-PDE activada

Se determinó si la activación de la Ac-PDE por fosforilación afectaba la afinidad de la enzima por el sustrato, la velocidad de hidrólisis del AMPc o ambos parámetros a la vez. Para ello se preincubó una alícuota de la fracción de DEAE-celulosa (etapa 3 de la purificación) con ATP.Mg y AMPc, al mismo tiempo se preincubó otra alícuota igual en las mismas condiciones pero en ausencia de ATP. Ambas mezclas se precipitaron con una solución saturada de sulfato de amonio y los precipitados resuspendidos y dializados, se utilizaron para las medidas cinéticas. Los resultados obtenidos se ven en la Figura 24. Como puede observarse la activación de la enzima

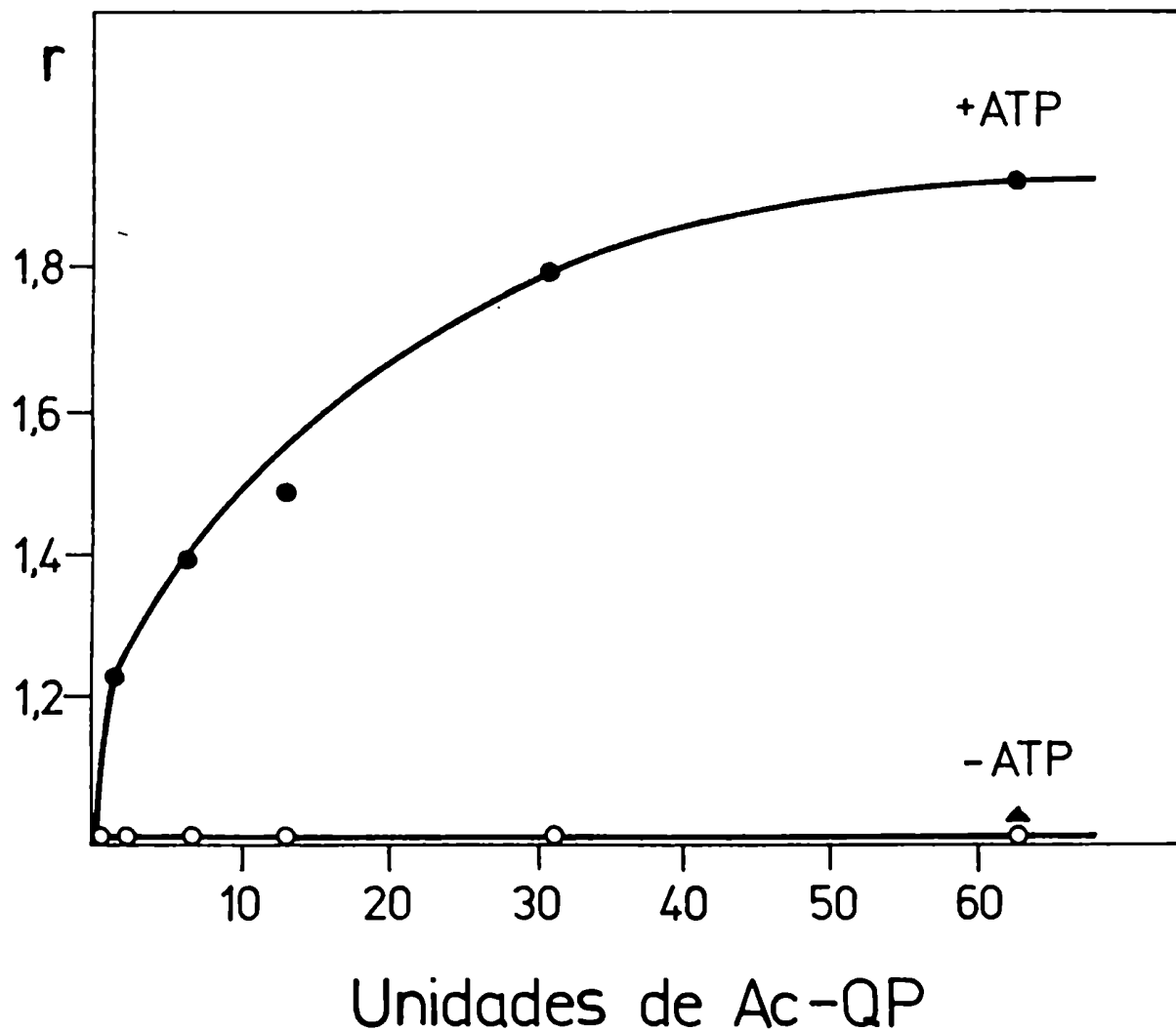


Figura 23: Dependencia de la activación de la Ac-PDE con la cantidad de Ac-QP.

Se ensayó actividad de Ac-PDE en alícuotas de 8  $\mu\text{g}$  de la fracción de gradiente de sacarosa con  $\text{Mg}^{2+}$  como catión divalente en presencia de cantidades crecientes de Ac-QP, en ausencia (o) o en presencia (●) de ATP 0,1 mM. El ▲ indica la actividad de Ac-PDE ensayada en presencia de ATP, Ac-QP y 50  $\mu\text{g}$  del inhibidor proteico de la Ac-QP.

Los valores en ordenadas representan el cociente entre la actividad de Ac-PDE ensayada en presencia de ATP y Ac-QP y la actividad medida en ausencia de ATP.



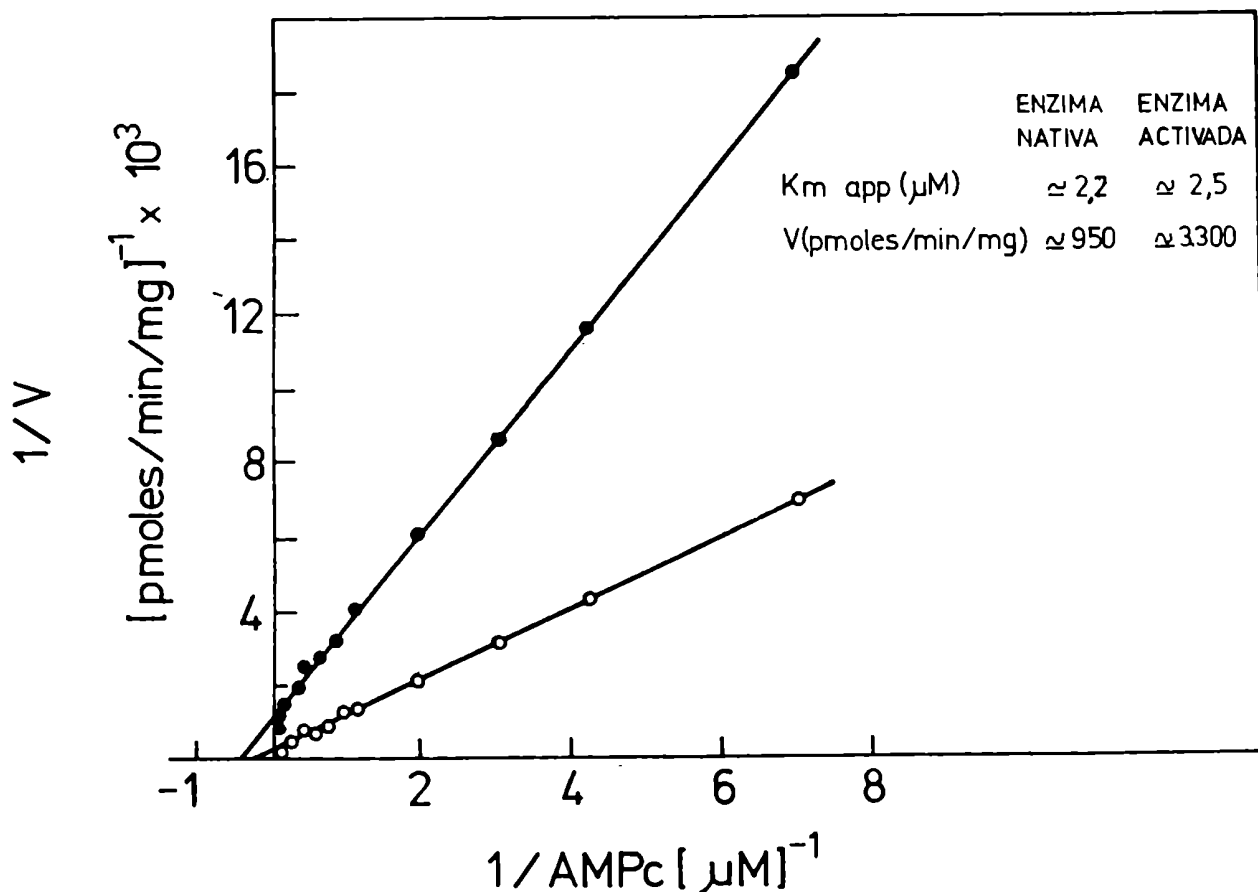


Figura 24: Representación de Lineweaver-Burk de la Ac-PDE "nativa" y activada

Para la activación de la enzima se preincubó una alícuota de 0,85 mg de proteína de la fracción de DEAE-celulosa a 30°C durante 6 min. en un volumen final de 0,4 ml con ATP.Mg y AMPc como se indicó en la secc.V.4.2. de Mat. y Mét. (enzima activada (○)). Otra alícuota igual se preincubó en las mismas condiciones excepto que se omitió el ATP de la mezcla (enzima "nativa" (●)). Las mezclas de reacción se precipitaron con una solución saturada de sulfato de amonio y se procesaron como se indicó en la misma sección. La actividad de Ac-PDE se ensayó en alícuotas apropiadas de los precipitados resuspendidos y dializados, a las concentraciones de AMPc cuyas inversas se indican en la figura.

condujo a un aumento de la  $V$  de aproximadamente 3 veces sin afectar en forma significativa la afinidad de la enzima por el AMPc. Es importante señalar que en el rango de concentraciones fisiológicas de sustrato (1-2  $\mu\text{M}$ ) se observa una activación apreciable de la enzima.

### XIII. 8. Reversibilidad del proceso de activación de la Ac-PDE

En casi todos los casos de activación o inactivación de enzimas por fosforilación se demostró que el proceso puede revertirse por una reacción en la que intervienen fosfatasas de fosfoproteínas (101).

Se estudió la reversibilidad de la activación de la Ac-PDE por ATP.Mg y AMPc utilizando una fracción de sulfato de amonio. Esta fracción además de las actividades de PDE y de quinasa de proteína presentó actividad de fosfatasa de fosfoproteína la que fue inhibida 90% por fosfato de potasio 20 mM (M. Seigelchifer, comunicación personal).

La desactivación de la Ac-PDE de la fracción de sulfato de amonio, previamente activada, se estudió luego de precipitar la proteína con sulfato de amonio para separar el ATP.Mg y AMPc utilizados para la activación inicial. El precipitado obtenido, resuspendido y dializado, se sometió entonces a condiciones que

favorecían la desfosforilación. Se pudo observar que la desactivación de la Ac-PDE fue dependiente del tiempo al cual la enzima estuvo sometida a dichas condiciones. En efecto, como se vé en la Tabla 16 la actividad de Ac-PDE disminuyó en forma notable (50% del valor inicial) luego de un período de incubación de 20 min en condiciones de desfosforilación. Esta desactivación fue completamente bloqueada por la presencia de fosfato de potasio 20 mM (datos que no se muestran), resultados consistentes con el efecto inhibitorio del fosfato sobre la actividad de fosfatasa de fosfoproteína.

Se pudo demostrar que la desactivación fue un proceso reversible y no se debió a inactivación por desnaturalización ya que se logró restaurar casi toda la actividad inicial cuando, luego de 20 min de incubación en ausencia de fosfato de potasio, la actividad de Ac-PDE se ensayó en presencia de ATP.

En un experimento control la fracción de sulfato de amonio se sometió al mismo tratamiento descrito anteriormente, excepto que no se agregó ATP en la etapa de activación. La actividad de Ac-PDE no decayó significativamente cuando se ensayó actividad enzimática luego de los distintos tiempos a los que estuvo sometida a condiciones que favorecían la desfosforilación. Además la enzima fue capaz de ser activada casi dos veces por el agregado de ATP en el ensayo enzimático.

Tabla 16

Reversibilidad de la activación por fosforilación de la Ac-PDE \*

Incubación (min)	Actividad de Ac-PDE (pmoles/20 min)			
	<u>"Nativa"</u>		<u>Activada</u>	
	- ATP	+ ATP	- ATP	+ ATP
0	69	132	160	170
10	63	114	99	148
20	61	112	70	130

\* Para la activación de la enzima se preincubó una alícuota de 50  $\mu$ l (2 mg de proteína) de la fracción de sulfato de amonio durante 10 min a 30°C con ATP, Mg y AMPc en un volumen final de 2 ml como se indicó en la sección V.4.2. de Materiales y Métodos (enzima activada). Otra alícuota igual se preincubó en las mismas condiciones excepto que se omitió el ATP de la mezcla (enzima "nativa"). Al final del período de preincubación las mezclas de reacción se precipitaron con sulfato de amonio como se indicó en la misma sección.

Ambos precipitados se resuspendieron en 0,2 ml de buffer fosfato de potasio 20 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 2 mM, y se ensayó actividad de Ac-PDE en alícuotas de 10  $\mu$ l en ausencia y en presencia de ATP 0,1 mM (0 min).

El resto de las soluciones se diluyó 9 veces con buffer B con el objeto de disminuir la concentración de fosfato. Las mezclas se incubaron a 30°C durante 10 y 20 min y al cabo de estos tiempos se tomaron alícuotas de 90  $\mu$ l en las cuales se ensayó actividad de Ac-PDE en ausencia y en presencia de ATP 0,1 mM.

En todos los ensayos de actividad enzimática se utilizó  $Mg^{2+}$  como catión divalente y se agregó 50 unidades de Ac-QP.

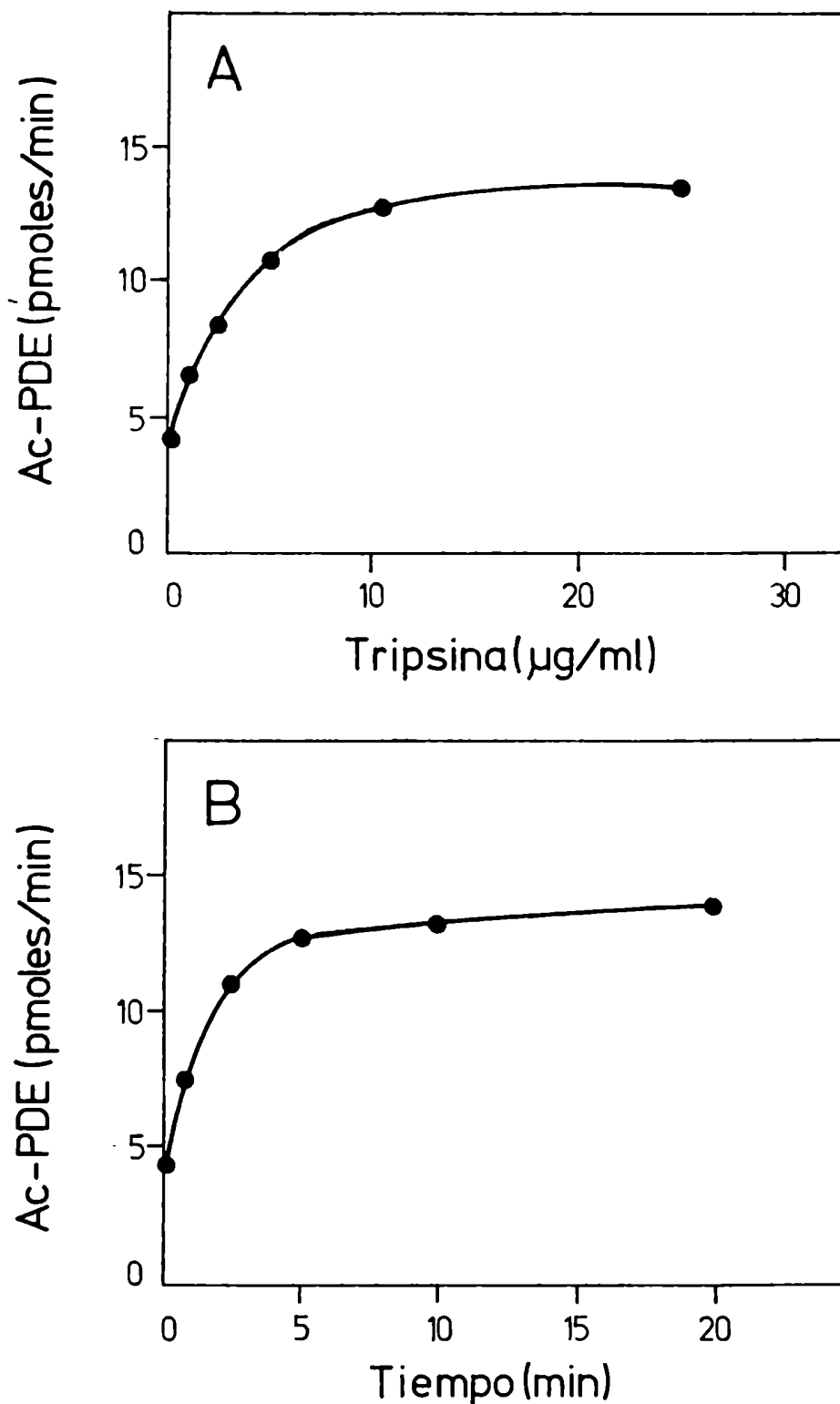
Estos resultados avalan la hipótesis de que la actividad de Ac-PDE de Mucor rouxii puede ser regulada por un mecanismo de fosforilación-desfosforilación y que la (s) fosfatasa (s) de fosfoproteína (s), presentes en la fracción de sulfato de amonio son capaces de desactivar a la enzima.

#### XIV. ACTIVACION DE LA FOSFODIESTERASA DE AMPc POR ENZIMAS PROTEOLITICAS

Existen en la literatura muchos antecedentes sobre el efecto activador de la proteólisis limitada sobre la actividad de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, tanto soluble como particulada, proveniente de distintos tejidos de mamíferos (213,214,238, 254,274,399,400). En general este efecto activador está acompañado por una disminución observable del tamaño molecular.

Para estudiar el efecto de la proteólisis limitada sobre la Ac-PDE soluble de Mucor rouxii, se preincubaron alícuotas de un extracto parcialmente purificado de la enzima (fracción de gradiente de sacarosa) en presencia de tripsina a 0°C durante 20 min. Se observó que la Ac-PDE fue activada de 1,5 a 3 veces por este tratamiento. Además se determinó que el efecto activador de la tripsina fue dependiente de la concentración de la enzima proteolítica y del tiempo a que la Ac-PDE estuvo sometida a dicho tratamiento. Estos resultados se observan en la Figura 25.

Figura 25: Activación de la Ac-PDE por tripsina



Se preincubaron 4 µg de proteína de la fracción de gradiente de sacarosa durante 20 min a 4°C en buffer A y con concentraciones crecientes de tripsina en un volumen final de 0,05 ml (Fig. 25 A). Ali-cuotas iguales se preincubaron en las mismas condiciones con 1 µg de tripsina durante los tiempos indicados (Figura 25 B). En todos los casos se agregó 5 µg de inhibidor de tripsina al final del período de preincubación. La actividad de Ac-PDE se ensayó en la mezcla total completando el volumen final (0,1 ml) con los componentes del ensayo de Ac-PDE.

XIV. 1. Relación entre la activación de la fosfodiesterasa de AMPc por fosforilación y por proteólisis

Se quiso estudiar si la activación de la Ac-PDE por fosforilación y la activación por proteólisis limitada eran fenómenos relacionados o independientes, es decir averiguar si la enzima una vez activada por uno de estos mecanismos era todavía capaz de responder al otro. Para estos experimentos se trabajó con un extracto enzimático de la fracción de gradiente de sacarosa (etapa 4 de la purificación). Los tratamientos a los que fue sometido el extracto y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 17. En un grupo de experimentos se activó a la enzima con ATP.Mg. AMPc y Ac-QP y posteriormente se la sometió, o no, a tratamiento con tripsina (líneas c. y d.); en un segundo experimento se activó a la enzima por preincubación con tripsina y posteriormente se ensayó a la activación por ATP.Mg y Ac-QP durante el ensayo enzimático (línea b). Los resultados obtenidos muestran que tanto el tratamiento con tripsina (línea b.) como la preincubación en condiciones fosforilantes (línea c.) llevaron a la Ac-PDE el mismo grado de actividad, aproximadamente 100% sobre el control. Los resultados de la tabla muestran también que una vez que la enzima fue activada por fosforilación resultó insensible al tratamiento posterior con tripsina (línea d.) y reciprocamente la enzima pretratada con tripsina

Tabla 17

Activación secuencial de la Ac-PDE por fosforilación o por proteólisis limitada\*

	<u>Adiciones</u>		<u>Actividad de Ac-PDE</u> (pmoles/20 min/2 $\mu$ l)	
	<u>1ª preincubación</u> 10 min a 30º C	<u>2ª preincubación</u> 20 min a 4º C	- ATP	+ ATP (0.1 mM)
a.	-	-	150	292
b.	-	tripsina	320	325
c.	Ac-QP, AMPc, ATP	-	-	330
d.	Ac-QP, AMPc, ATP	tripsina	-	305

\* Se preincubaron alícuotas de 2  $\mu$ l (10  $\mu$ g de proteína) de la fracción de gradiente de sacarosa (etapa 4 de la purificación) durante 10 min a 30º C en un volumen final de 90  $\mu$ l, en una mezcla que contenía buffer fosfato de potasio 20 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 2 mM y  $Cl_2Mg$  10 mM con las adiciones indicadas en la Tabla. Las concentraciones de AMPc, ATP y Ac-QP utilizadas fueron: 1  $\mu$ M, 0,1 mM y 500 unidades/ml respectivamente. Las mezclas se sometieron a una segunda preincubación en ausencia o en presencia de tripsina (20  $\mu$ g/ml) durante 20 min a 4º C. Al cabo de este tiempo se agregó a todos los tubos inhibidor de tripsina de clara de huevo (5  $\mu$ g) y a los tubos a. y c tripsina (20  $\mu$ g/ml). Luego de las preincubaciones se ensayó actividad de Ac-PDE en la alícuota total en ausencia o presencia de ATP. La reacción se comenzó por el agregado de AMPc [ $^3H$ ] 10  $\mu$ M. Los experimentos b y d suplementaron durante el ensayo de Ac-PDE con 50 unidades de Ac-QP.



no fue capaz de responder a la activación por ATP.Mg y Ac-QP durante el ensayo enzimático (línea b).

Estos resultados serían consistentes con el modelo del "inhibidor interno" propuesto por Kaufman y Fisher (401) para explicar la activación de la hidroxilasa de la fenilalanina de hígado de rata por lisolecitina y quimiotripsina, modelo que también explica la activación de la enzima por fosforilación (402). Según este modelo la enzima contiene una cadena polipeptídica inhibidora, la que sería desplazada de su sitio inhibitorio, reversiblemente por la acción detergente de ciertos fosfolípidos o irreversiblemente por proteólisis limitada. La introducción de grupos fosfato en la molécula enzimática también desplazaría reversiblemente, por repulsión electrostática, al polipéptido inhibidor, activando de esta manera a la enzima. Así la activación de la enzima por alguno de estos mecanismos no sería aditiva con la activación por cualquiera de los otros.

#### XIV. 2. Perfil de sedimentación en gradiente de sacarosa de la fosfodiesterasa de AMPc activada por fosforilación o por tripsinización

Los experimentos que se describen en esta sección se realizaron con el objeto de ver si los procesos de fosforilación y tripsinización producían cambios en el tamaño aparente de la enzima.

Para ello se preincubaron alícuotas convenientes de la preparación enzimática (fracción de DEAE-celulosa) con ATP.Mg y AMPc o con tripsina; una tercera alícuota se sometió a fosforilación y posterior tripsinización. Luego de estos tratamientos se analizó el estado de la enzima en gradientes de sacarosa entre 5-20% y se los comparó con el de un control preincubado sin adiciones (enzima nativa).

La Figura 26A muestra un perfil típico de sedimentación de la enzima nativa luego de centrifugación en gradiente de sacarosa. Solo se observó un pico de actividad cuyo coeficiente de sedimentación resultó de 4,2 S.. El tratamiento de la Ac-PDE con tripsina produjo una disminución del  $S_{20,w}$  de 4,2 S a 2,6 S (Figura 26B) mientras que la enzima activada por fosforilación mostró el mismo valor de  $S_{20,w}$  que el de la enzima nativa (Figura 26C). La enzima activada por fosforilación y posteriormente sometida a proteólisis mostró una disminución en su coeficiente de sedimentación similar al de la Ac-PDE tratada unicamente con tripsina (Figura 26B). Sin embargo este tratamiento con tripsina luego de la activación por fosforilación, no produjo ninguna activación adicional de la actividad enzimática, tal como se vé en la Tabla 17.

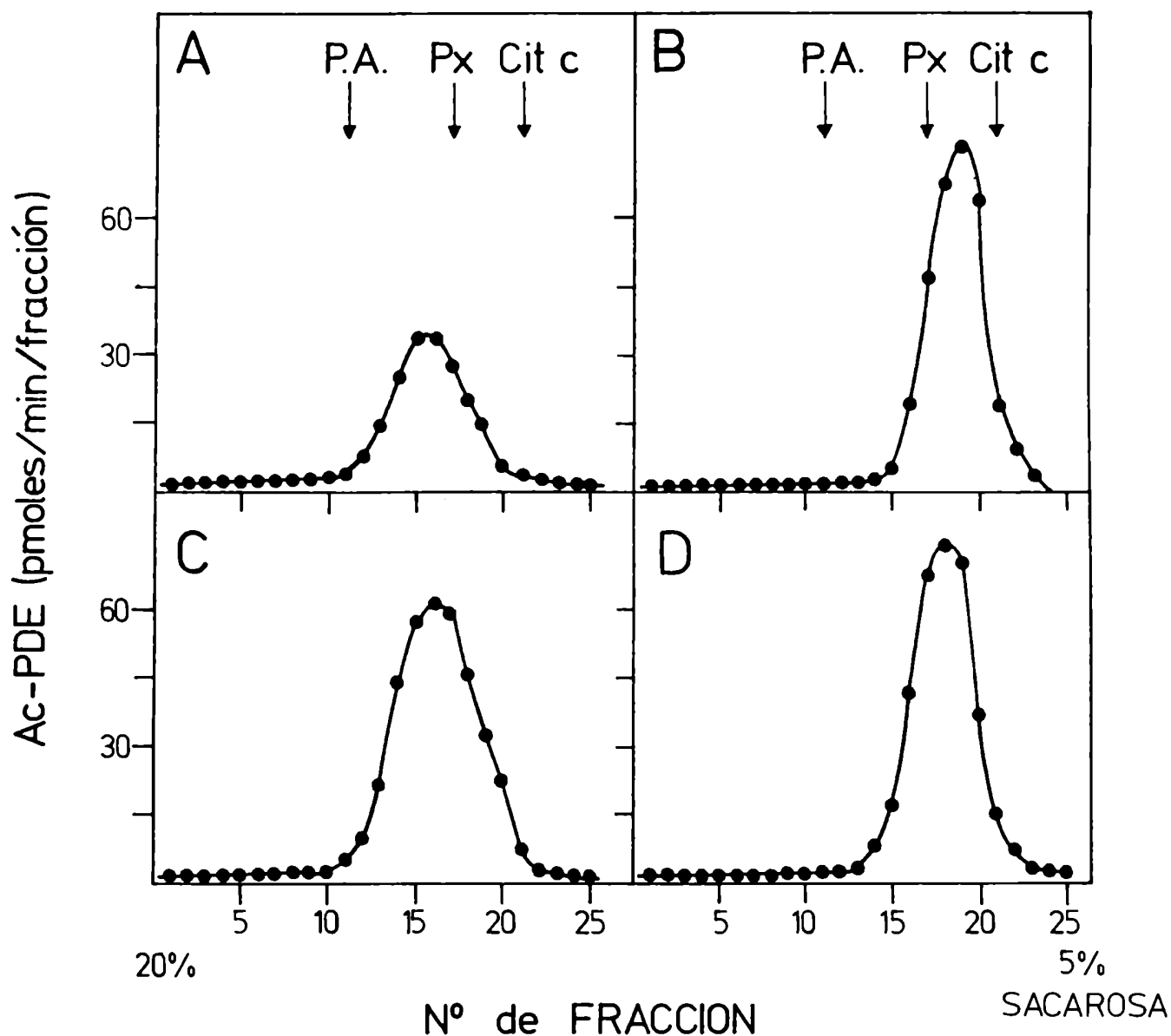


Figura 26: Centrifugación en gradiente de sacarosa de la Ac-PDE "nativa" y activada

Se preincubaron alícuotas de 0,6 mg de proteína de la fracción de DEAE-celulosa en buffer fosfato de potasio 20 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 2 mM, en un volumen final de 0,2 ml; en las siguientes condiciones: A) control preincubado sin adiciones, B) tripsina 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 20 min a 4°C, seguido por 5  $\mu\text{g}$  de inhibidor de tripsina, C) ATP 0,1 mM, AMPc 5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  10 mM durante 10 min a 30°C, D) las mismas condiciones que C más un período adicional de 20 min a 4°C con 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de tripsina, seguido de la adición de 5  $\mu\text{g}$  de inhibidor de tripsina. Al final de los períodos de incubación, las mezclas se centrifugaron en un gradiente lineal de sacarosa 5-20% preparado en buffer fosfato de potasio 20 mM (sección VII. de Materiales y Métodos). La actividad de Ac-PDE se ensayó en alícuotas apropiadas. Las flechas indican la posición de las proteínas marcadoras: fosfatasa alcalina (P.A.), peroxidasa (Px) y citocromo c (Cit c).

XV. ACTIVACION DE LA FOSFODIESTERASA DE AMPc LUEGO DE CROMATOGR-  
FIA EN COLUMNA DE AFINIDAD

Se quiso estudiar si la Ac-PDE luego de la última etapa de pu  
rificación alcanzada en este trabajo seguía siendo sensible a la  
activación por ATP.Mg y quinasa de proteína. Para ello se ensayó  
la actividad de Ac-PDE de la fracción de Azul 2-Agarosa en presen  
cia y en ausencia de los agentes fosforilantes y a concentraciones  
variables de enzima. En todo el rango de proteína ensayada no se  
pudo demostrar activación de la Ac-PDE por fosforilación.

La falta de respuesta de la enzima a la activación por fosfo  
rilación luego de la filtración por la columna de afinidad podría  
interpretarse suponiendo que:

- a) La activación de la Ac-PDE por ATP.Mg y Ac-QP ocurriría a tra  
vés de la fosforilación de un factor proteico que permanecería aso  
ciado a la enzima hasta la etapa de cromatografía en Azul 2-Agaro  
sa. Este factor se separaría de la actividad enzimática durante es  
ta etapa de purificación y por lo tanto la enzima eluida del gel de  
afinidad ya no sería sensible a la acción de los agentes fosforilan  
tes. De acuerdo a esta hipótesis la separación del factor fosforila  
ble en esta etapa mantendría a la Ac-PDE en "estado activado".
- b) Existiría una "población" heterogénea de fosfodiesterasa de AMPc;  
una parte de la población sería activable por fosforilación y no se

recuperaría luego de la cromatografía de afinidad; únicamente la forma de Ac-PDE no activable por fosforilación eluiría de la columna de afinidad en las condiciones experimentales descritas. La baja de recuperación de la actividad enzimática obtenida de la columna de afinidad estaría de acuerdo con esta hipótesis. Por otra parte muy recientemente se ha demostrado que la elución de una columna de afinidad de una Ac-PDE de hígado de cerdo requiere condiciones tan drásticas como altas concentraciones de AMPc y temperatura (403).

Mientras que en el primer modelo propuesto no sería la enzima misma, o al menos la porción catalítica, la que se fosforilaría, sí lo sería en el segundo. La dilucidación final del mecanismo de activación por fosforilación de la Ac-PDE de Mucor rouxii está más allá de los objetivos de esta tesis y requeriría una purificación mayor de la enzima.

Merece sin embargo destacarse que cualquiera sea el mecanismo íntimo de activación por fosforilación de la Ac-PDE en este organismo, al momento en que se postuló este posible mecanismo de regulación de la actividad de Ac-PDE (404) nunca se había señalado en la literatura la modulación de una actividad de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos por fosforilación-desfosforilación y es la primera vez que se describe la activación por proteólisis de la enzima en un organismo eucarionte inferior.

CONCLUSIONES

1. Se encontraron variaciones de la actividad de fosfodiesterasa de AMPc durante la morfogénesis aeróbica de Mucor rouxii que, junto con las variaciones de la actividad de adenilato ciclasa, darían cuenta con bastante aproximación de los cambios de los niveles intracelulares de AMPc que se producen durante ese proceso morfogénético.
2. La actividad de PDE es en su mayor parte soluble y eluyó de una columna de DEAE-celulosa a pH 6 como un solo pico de actividad específica para AMPc a una concentración de acetato de sodio de 0,4 M, bien separada de un pequeño pico de actividad de fosfodiesterasa de GMPc que eluyó a una concentración salina menor (0,15 M).
3. Se logró una purificación parcial de la actividad de Ac-PDE soluble que llevó a la enzima a un estado de pureza de aproximadamente 30%, según el criterio de electroforesis en gel de poliacrilamida. La actividad específica final alcanzada fue de 8.200 picomoles de AMPc hidrolizado/min/mg de proteína, lo que representó aproximadamente 260 veces de purificación respecto del extracto soluble inicial. Durante la purificación y en las condiciones experimentales ensayadas no se encontraron formas múltiples de la enzima.

4. La  $K_m$  aparente para el AMPc de la enzima parcialmente purificada, calculada con concentraciones submicromolares de sustrato, fue  $2,5 \mu\text{M}$  y correspondería al de una enzima de alta afinidad por el AMPc. El valor de la constante de afinidad es coherente con el papel fisiológico que desempeñaría la enzima en esta especie, ya que las concentraciones de AMPc por célula, en los estadios del desarrollo considerados, oscilaron entre  $1-2 \mu\text{M}$ .
5. La Ac-PDE presentó un requerimiento absoluto de catión divalente para expresar su actividad máxima. La velocidad de hidrólisis del AMPc cuando se ensayó actividad enzimática en presencia de  $\text{Mn}^{2+}$ , fue de 2-3 veces superior a la alcanzada con  $\text{Mg}^{2+}$ . La afinidad de la enzima para ambos cationes fue similar.
6. Se calcularon algunos parámetros hidrodinámicos y moleculares de la Ac-PDE por medio de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y filtración molecular en gel. Los resultados indicaron que la enzima posee un coeficiente de sedimentación de  $4,2 \text{ S}$ , un coeficiente de difusión de  $8,9 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg}$ , un radio de Stokes de  $39 \text{ \AA}$  y un peso molecular relativo de  $70.600$ . El valor del coeficiente friccional de la enzima,  $1,4$ , indicaría que se trata de una proteína ligeramente asimétrica.



7. La Ac-PDE parcialmente purificada no fue inhibida por las metilxantinas ensayadas hasta una concentración de 10 mM, ni fue estimulada por imidazol.  
El  $\text{Ca}^{2+}$  no activó a la enzima ni aún en presencia de un exceso de calmodulina exógena.  
El ATP no tuvo ningún efecto sobre la enzima parcialmente purificada.
8. La enzima de un extracto poco purificado fue capaz de ser activada por ATP.Mg y AMPc, siendo la activación dependiente de la concentración del nucleótido, del tiempo de contacto del mismo con la enzima y de la temperatura de incubación.
9. La activación de la enzima se conservó cuando, una vez activada por ATP.Mg y AMPc, se separaron los metabolitos activantes.
10. Los requerimientos para la activación de la Ac-PDE, parcialmente purificada, fueron los mismos que los de una fosforilación mediada por una quinasa de proteína dependiente de AMPc.
11. Cuando la actividad de Ac-PDE se separó de la de Ac-QP, debido a sus diferentes coeficientes de sedimentación, la activación de la fosfodiesterasa se hizo dependiente del agregado de quinasa de proteína y creciente con la cantidad de esta enzima.  
La activación de la enzima pudo ser anulada por la presencia

del inhibidor termoestable de la quinasa de proteína, confirmando que la activación de la Ac-PDE está mediada por una quinasa de proteína dependiente de AMPc.

12. La activación de la Ac-PDE por fosforilación condujo a un aumento de 3 veces en la velocidad máxima de hidrólisis del AMPc sin producir cambios apreciables en la afinidad de la enzima para este nucleótido.
13. La posibilidad de que la activación de la Ac-PDE por fosforilación pueda ocurrir in vivo está basada en los siguientes hechos experimentales: a) la Ac-PDE de extractos crudos fue activada por incubación con ATP.Mg y AMPc sin agregado de Ac-QP y b) la activación de la enzima por fosforilación se observó in vitro a concentraciones fisiológicas de AMPc (1-2  $\mu$ M).
14. Se encontró que la activación de la Ac-PDE pudo ser revertida sometiendo a la enzima a condiciones desfosforilantes. De este modo se pudo demostrar que la actividad de la Ac-PDE está modulada por un mecanismo reversible de fosforilación-desfosforilación.
15. La Ac-PDE pudo ser activada por proteólisis limitada. Mientras que la activación de la enzima por este mecanismo estuvo acompañada por una disminución en el coeficiente de sedimentación

de la enzima, la Ac-PDE activada por fosforilación no presentó cambios aparentes en el tamaño molecular.

16. Se demostró que las activaciones por fosforilación y por proteólisis no son aditivas. Este hecho indicaría que existe un sitio en la molécula de la Ac-PDE que al fosforilarse o separarse por proteólisis permite que la enzima exprese su actividad máxima.
17. En base a los resultados del presente trabajo se propone un posible mecanismo fisiológico de la regulación de los niveles de AMPc en M.rouxii: una elevación de los niveles intracelulares de AMPc conduciría a la activación de la quinasa de proteína dependiente de este nucleótido; la subunidad catalítica libre, en presencia de ATP.Mg, fosforilaría a la fosfodiesterasa de AMPc o a un factor íntimamente asociado a ella, llevándola de una forma menos activa a una forma activada, la cual aceleraría la hidrólisis del AMPc, regulando de esta manera el AMPc sus propios niveles intracelulares. (Este mecanismo se esquematiza en la Figura 27).

## MECANISMO PROPUESTO

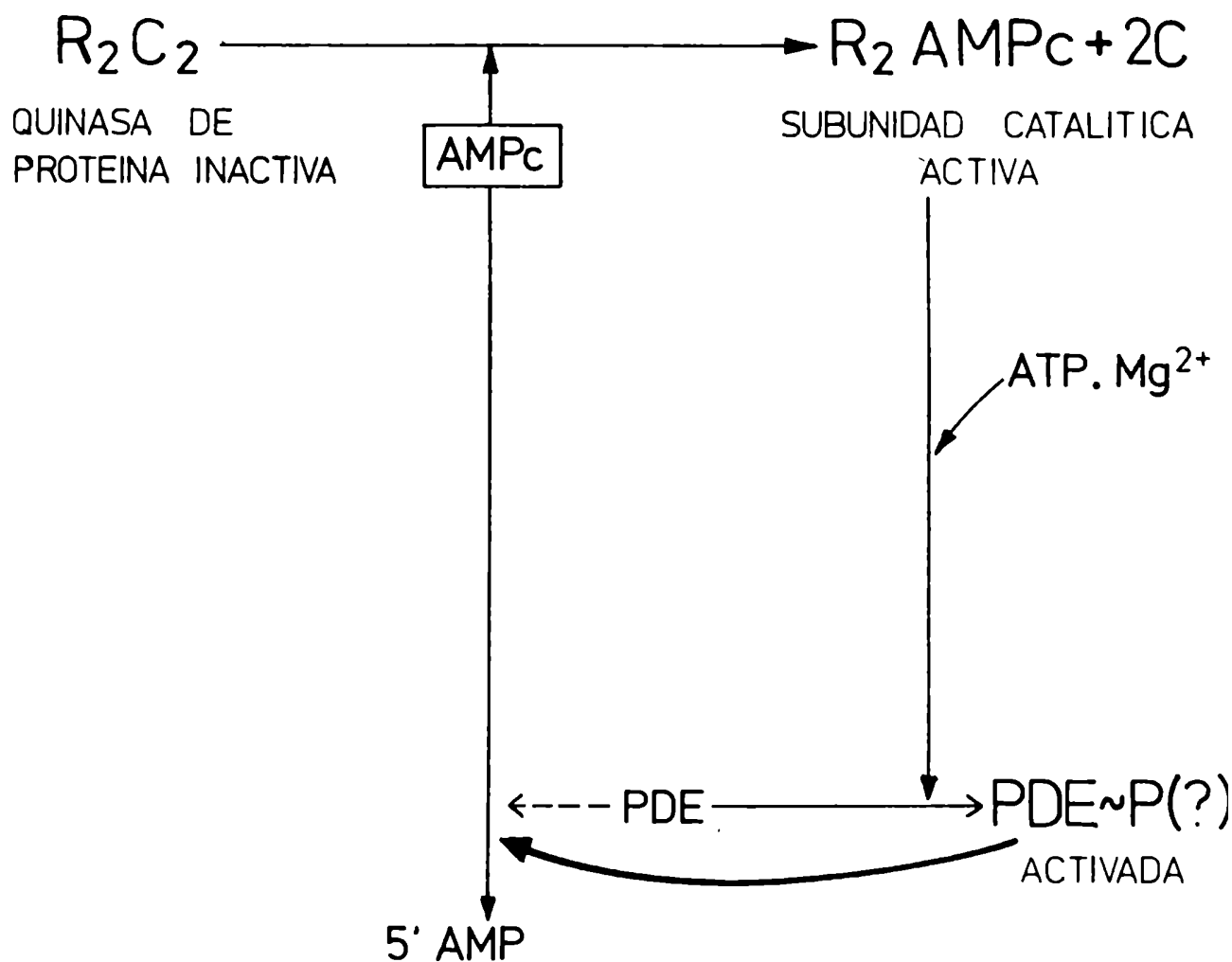
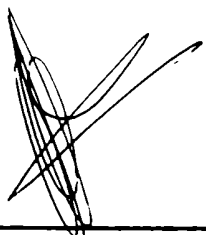


Figura 27: Mecanismo de activación de la Ac-PDE por fosforilación

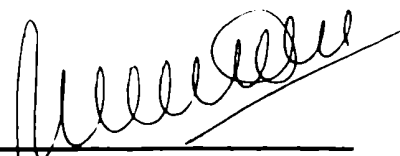
NOMENCLATURA DE LAS ENZIMAS (405)

<u>NOMBRE</u>	<u>NUMERO E.C.</u>	<u>NOMBRE SISTEMATICO</u>
Adenilato ciclasa	4.6.1.1.	ATP pirofosfato-ligasa (ciclante)
Fosfatasa alcalina	3.1.3.1.	Monoester-ortofosfórico fosfohidrolasa
Fosfatasa de fosfoproteína	3.1.3.16	Fosfoproteína fosfohi- drolasa
Fosfodiesterasa de GMP cíclico	3.1.4.35	3':5'-GMP-cíclico 5'-nucleótidohidrolasa
Fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos	3.1.4.17	3':5': nucleótido-cíclico 5'-nucleótidohidrolasa
Glucosa oxidasa	1.1.3.4.	$\beta$ -D.glucosa:oxígeno 1-óxidoreductasa
Peroxidasa	1.11.1.7.	Dador: peróxido de hidró- genooxidoreductasa
Quinasa de proteína	2.7.1.37	ATP: proteína fosfotrans- ferasa
Tripsina	3.4.21.4.	—



---

Licenciado  
Miguel Angel GALVAGNO



---

Director de Tesis:  
Profesora Doctora  
Maria Susana Di Bernardo  
de Passeron

BIBLIOGRAFIA

1. Ainsworth, G.C. (1955). En "Mechanisms of Microbial Pathogenicity" (Howie J.W. y O'Hea, A.J., eds.) pp.242-262. Cambridge Univ.Press.Londres y N.York.
2. Nickerson, W.J.; Edwards, G.A. (1949). J.Gen.Physiol. 33: 41-55.
3. Salvin, S.B. (1949 ) Mycologia 41: 311-319.
4. Drouhet, E.; Mariat, F.(1952). Ann.Inst.Pasteur 83: 506-514.
5. Bullen, J.J. (1949). J. Pathol. Bacteriol. 61: 117-120.
6. Salvin, S.B. (1949 ) J.Infect. Diseases 84: 275-283.
7. Pine, L. (1954) J. Bacteriol. 68: 671-679.
8. Scherr, G. H. (1957) Exptl.Cell Res. 12: 92-107.
9. Pine, L.; Peacock, C.L. (1958) J. Bacteriol. 75: 167-174.
10. Romano, A.H. (1966). En "The Fungi". Vol.II. (Ainsworth, G.C. y Sussman, A.S., eds.). Cap. 7 pp.181-209. Academic Press, Nueva York.
11. Burnett, J. H. (1975). Mycogenetics. (J. Wiley, eds.) pp.375. Nueva York.
12. Bail, T. (1857) Flora (Jena) 40: 417-444.
13. Pasteur, L. (1876) En "Ouvres de Pasteur", vol.V. (Masson et Cie.eds.). Paris, 1928.
14. Sypherd, P. S.; Borgia, P.T.; Paznokas, J. L. (1978) Adv. Microbiol Physiol. 18: 67-104.
15. Robinow, C.F. (1957) Can.J. Microbiol. 3: 771-789.
16. Storck, R.; Morrill, R.C. (1977). Mycologia 69: 1031-1041.
17. Bartnicki-García, S.; Nelson, N.; Cota-Robles, E. (1968) Arch. Mikrobiol. 63: 242-255.



18. Bartnicki-García, S.; Lippman, E. (1969) *Science*, N.Y. 165: 302-304.
19. Bartnicki-García, S. (1968) *Ann. Rev. Microbiol.* 22: 87-108.
20. Gutierrez, F.; Ruiz Herrera, J. (1979). *Experimental Mycology.* 3: 351-362.
21. Bartnicki-García, S.; Nickerson, N.J. (1962 ) *Biochim. Biophys. Acta* 64: 548-551.
22. Ruiz Herrera, J.; Bartnicki-García, S. (1976) *J. General Microbiol.* 97: 241-249.
23. Lara, S.L.; Bartnicki-García, S. (1974) *Arch. Mikrobiol.* 97: 1-16.
24. Bartnicki-García, S.; Nickerson, N.J. (1962 ) *J. Bacteriol.* 84: 829-840.
25. Haidle, C.W.; Storck, R. (1966) *J. Bacteriol.* 92: 1236-1244.
26. Mooney, D.T.; Sypherd, P.S. (1976) *J. Bacteriol.* 126: 1266-1270.
27. Bartnicki-García, S. (1968) *J. Bacteriol.* 96: 1586-1594.
28. Friedenthal, M.; Epstein, A.; Passeron, S. (1974) *J. Gen. Microbiol.* 82: 15-24.
29. Terenzi, H.F.; Storck, R. (1969) *J. Bacteriol.* 97: 1248-1261.
30. Rogers, P.J.; Clark-Walker, G.D.; Stewart, P.R. (1974) *J. Bacteriol.* 119: 282-293.
31. Paznokas, J.L.; Sypherd, P. (1975) *J. Bacteriol.* 124: 134-139.
32. Inderlied, C.; Sypherd, P.S. (1978) *J. Bacteriol.* 133: 1282-1286.
33. Passeron, S.; Terenzi, H.F. (1970) *FEBS Lett* 6: 213-216.
34. Passeron, S.; Rosellino, E. (1971) *FEBS Lett* 18: 9-12.

35. Friedenthal, M.; Rosellino, E.; Passeron, S. (1973). Eur J. Biochem. 35: 148-158.
36. Paznokas, J.L.; Sypherd, P.S. (1977) J. Bacteriol. 130: 661-666.
37. Orłowski, M.; Sypherd, P.S. (1977 ) J. Bacteriol. 132: 209-218.
38. Orłowski, M.; Sypherd, P.S. (1978 ) J. Bacteriol. 134: 76-83.
39. Orłowski, M.; Sypherd, P.S. (1978) Biochemistry 17: 569-574.
40. Orłowski, M.; Sypherd, P.S. (1978) Arch. Microbiol. 119: 145-152.
41. Larsen, A.; Sypherd, P.S. (1980) J. Bacteriol. 141: 20-25.
42. Inderlied, C.B.; Cihlar, R.L.; Sypherd, P.S. (1980) J. Bacteriol. 141: 699-706.
43. Larsen, A.; Sypherd, P.S. (1974) J. Bacteriol. 117: 432-438.
44. Paveto, C.; Epstein, A.; Passeron, S. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 169: 449-457.
45. Jones, B.E.; Bu'lock, J.D. (1977) Gen. Microbiol. 103: 29-36.
46. Dandekar, S.; Modi, V.V. (1980) Biochim. Biophys. Acta 628: 398-406.
47. Tu, J.C.; Malhotra, S.K. (1977) Can. J. Microbiol. 23: 378-388.
48. Cohen, R.J. (1974) Nature. 251: 144-146.
49. Maia, J.C.C; Camargo, E. (1974) Cell Differ. 3: 147-155.
50. Silverman, P.M.; Epstein, P.M. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72: 442-446.
51. Vale, M.R.; Gomes, S.L.; Maia, J.C.C.; Mennucci, L. (1976) FEBS Lett. 67: 189-192.

52. Gomes, S.L.; Mennucci, L.; Maia, J.C.C. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 541: 190-198.
53. Gomes, S.L.; Mennucci, L.; Maia, J.C.C. (1980) *Cell. Differ.* 9: 169-179.
54. Silverman, P.M.; Epstein, P. (1975). En *Microbiology*, ed. D. Schlessinger (Amer. Soc. Microbiol, Washington, D.C.). pp. 484-489.
55. Scott, W.D.; Solomon, B. (1975) *J. Bacteriol.* 128: 454-463.
56. Scott, W. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 2995-2999.
57. Terenzi, H.F.; Flawiá, M.M.; Tellez-Iñon, M.T.; Torres, H.N. (1976) *J. Bacteriol.* 126: 91-99.
58. Terenzi, H.F.; Flawiá, M.M.; Torres, H.N. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58: 990-996.
59. Loomis, W.F. (1972). *Nature, New Biol.* 240: 6-9.
60. Konijn, T.M.; van de Meene, J.G.C.; Bonner, J.T.; Barkley, D.S. (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 58: 1152-1154.
61. Newell, P.C. (1977). Aggregation in the Cellular Slime Molds. En "Microbial Interactions Receptors and Recognition" (Reissig, J.L., eds.) pg.3. Chapman and Hall. Londres.
62. Bonner, J.T. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 65: 110-113.
63. George, R.P. (1977) *Cell Differ.* 5: 293-300.
64. Feit, I.N.; Fournier, G.A.; Needleman, R.L.; Underwood, M.Z. (1978) *Science*: 200: 439-441.
65. Uno, I.; Ishikawa, T. (1973) *J. Bacteriol.* 113: 1240-1248.

66. Schwalb, M.N. (1974) Arch. Microbiol. 96: 17-20.
67. Schwalb, M.N. (1978) FEMS Microbiol. Lett. 3: 107-110.
68. Wold, W.S.; Susuki, I. (1976) Can. J. Microbiol. 22: 1093-1101.
69. Minder, C.; Vanden Driesche, T. (1978) Differentiation 10: 165-170.
70. Amrhein, N.; Filner, P. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70: 1099-1103.
71. Handa, A.K.; Johri, M.M. (1976) Nature 259: 480-482.
72. Strickler, J.E.; Patton, C.L. (1975) Science: 190: 1110-1112.
73. Rall, T.W.; Sutherland, E.W.; Berthet, L. (1957) J. Biol. Chem. 224: 463-475.
74. Cook, W.H.; Lipkin, D.; Markham, R. (1957) J. Am. Chem. Soc. 79: 3607-3608.
75. Robison, A.L.; Butcher, R.W.; Sutherland, E.W. (1971) En "Cyclic AMP". pgs. 531. Acad. Press. N. York y Londres.
76. Walsh, D. Perkins, J.; Krebs, E.G. (1968) J. Biol. Chem. 243: 3763-3765.
77. Langan, T. (1968) Science, 162: 579-581.
78. Miyamoto, E. Kuo, J. Greengard, P. (1969) Science. 165: 63-65.
79. Kuo, J.; Greengard, P. (1969) J. Biol. Chem. 244: 3417-3419.
80. Corbin, J.; Krebs, E.G. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 36: 328-336.
81. Kuo, J.; Greengard, P. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 64: 1349-1355.
82. Krebs, E.G. (1973) Endocrinology. Proceedings of the 4th. International Congress. Excerpta Medica. Amsterdam.

83. Posner, J.; Stern, R.; Krebs, E.G. (1965) *J. Biol. Chem.* 240: 982-985.
84. Walsh, D.; Perkins, J. Brostrom, C.; Ho, E.; Krebs, E.G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 1968-1976.
85. Friedman, D.; Lerner, J. (1963) *Biochemistry* 2: 669-675.
86. Schlender, K.; Wei, S.; Villar-Palasi, C. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 191: 272-278.
87. Soderling, T.; Hickenbottom, J. Reimann, E.; Hunkeler, F.; Walsh, D.; Krebs, E.G. (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 6317-6328.
88. Huttunen, J. Steinberg, D.; Mayer, S. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 67: 290-295.
89. Corbin, J.; Reimann, E.; Walsh, D.; Krebs, E.G. (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 4849-4851.
90. Huttunen, J.; Steinberg, D. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 239: 411-427.
91. Hardie, D.; Cohen, P. (1978) *FEBS Lett.* 91: 1-7.
92. Nimmo, H.; Houston, B. (1978) *Biochem. J.* 176: 607-610.
93. Khoo, J.; Steinberg, D.; Huang, J.; Vagelos, P. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 2882-2890.
94. Fischer, E.M.; Krebs, E.G. (1955) *J. Biol. Chem.* 216: 121-132.
95. Sutherland, E.W.; Wosilait, W.D. (1955) *Nature* 175: 169-171.
96. Uy, R.; Wold, F. (1977) *Science* 198: 890-896.
97. Gershey, E.L.; Vidal, G.; Allfrey, V.G. (1968) *J. Biol. Chem.* 243: 5018-5022.

98. Holzer, H.; Mecke, D.; Wulff, K.; Liess, K.; Heilmeyer, L.;  
(1967) *Adv. Enzym. Regul.* 5: 211-225.
99. Adler, S.P.; Mangum, J.H.; Magni, G.; Stadtman, E.R. (1974) *En*  
*"Metabolic Interconversion of Enzymes"*. (E. Fisher, E.G.  
Krebs eds.) pgs. 221-223. Berlin-Springverlag.
100. Kort, E.N.; Goy, M.F.; Larsen, S.H.; Adler, J. (1975) *Proc.*  
*Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 3939-3943.
101. Krebs, E.G. Beavo, J.A. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* 48: 923-959.
102. Rodnight, R.; Lavin, B.E. (1964) *Biochem. J.* 93: 84-91.
103. Traugh, J.D.; Mumby, M.; Traut, R.R. (1973) *Proc. Nat. Acad.*  
*Sci. U.S.A.* 70: 373-376.
104. Smith, D.L.; Chen, C.C.; Bruegger, B.B.; Holtz, S.L.; Halpern, R.M.;  
Smith, R.A. (1974) *Biochemistry* 13: 3780-3785.
105. Hunter, T.; Sefton, B.M. (1980) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*  
77: 1311-1315.
106. Corbin, J.D.; Keely, S.L.; Park, C. (1975) *J. Biol. Chem.* 250:  
218-225.
107. Hofmann, F.; Beavo, J.A.; Bechtel, P.J.; Krebs, E.G. (1975) *J.*  
*Biol. Chem.* 250: 7795-7801.
108. Brostrom, M. Reimann, E.; Walsh, D.; Krebs, E.G. (1970) *Adv.*  
*Enzyme Regul.* 8: 191-203.
109. Gill, G.N.; Garren, L.D. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 39:  
335-343.
110. Tao, M.; Salas, M.; Lipmann, F. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci.*  
*U.S.A.* 67: 408-414.

111. Kumon, A.; Yamamura, H.; Nishizuka, Y. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41: 1290-1297.
112. Carlson, G.M.; Bechtel, P.J.; Graves, D.J. (1979) *Adv. Enzymol.* 50: 41-115.
113. Beavo, J.A.; Bechtel, P.J.; Krebs, E.G. (1975) *Adv. Cycl. Nucleotide Res.* 5: 241-251.
114. Builder, S.E.; Beavo, J.A.; Krebs, E.G. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 2350-2354.
115. Builder, S.E.; Beavo, J.A.; Krebs, E.G. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 3514-3519.
116. Ogez, J.R.; Segel, I.M. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 4551-4556.
117. Armstrong, R.N.; Kaiser, E.T. (1978) *Biochemistry* 17: 2840-2845.
118. Tsuzuki, J.; Kiger, J.A. (1978) *Biochemistry* 17: 2961-2970.
119. Yücel, M.; Özer, I. (1981) *FEBS Lett.* 125: 120-122.
120. Pastori, R.L.; Kerner, N.; Moreno, S.; Passeron, S. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 663-671.
121. Kuo, J.F.; Krueger, B.K.; Sanes, J.R.; Greengard, P. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 212: 79-91.
122. Yamamura, H.; Inoue, Y.; Shimamura, R.; Nishizuka, Y. (1972) *Biochem Biophys. Res. Commun.* 46: 589-596.
123. Maeno, H.; Johnson, E.M.; Greengard, P. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 134-142.
124. Lemaire, S.; Pelletier, G.; Labrie, F. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 7303-7310.

125. Rubin, C.S.; Erlichman, J.; Rosen, D.M. (1972) *J. Biol. Chem.* 247: 6135-6139.
126. Miyamoto, E.; Petzold, G.L.; Harris, J.S.; Greengard, P. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44: 305-312.
127. Corbin, J.D.; Brostrom, C.; Alexander, R.; Krebs, E.G. (1972) *J. Biol. Chem.* 247: 3736-3743.
128. Gill, G.N.; Garren, L.D. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68: 786-790.
129. Reimann, F.M.; Walsh, D.; Krebs, E.G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 1986-1995.
130. Lincoln, T.M.; Corbin, J.D. (1978) *J. Cyclic. Nucleotide Res.* 4: 3-14.
131. Corbin, J.D.; Keely, S.L. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 910-918.
132. Corbin, J.D.; Keely, S.L.; Soderling, T.R.; Park, C.R. (1975) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5: 265-279.
133. Fleischer, M.; Rosen, D.M.; Reichlin, M. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 54-58.
134. Erlichman, J.; Rosenfeld R.; Rosen, D.M. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 5000-5003.
135. Geahlen, R.L.; Allen, S.N.; Krebs, E.G. (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 4536-4540.
136. Takai, Y.; Yamamura, H.; Nishizuka, Y. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 530-535.
137. Uno, I.; Ishikawa, T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 334: 354-360.



138. Sampson, J. (1977) *Cell* 11: 173-180.
139. Juliani, M.M.; Maia, J.C.C. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 567: 347-356.
140. Juliani, M.M.; Brochetto, M.R.; Maia, J.C.C. (1979) *Cell Differ.* 8: 421-430.
141. Powers, P.A.; Pall, M. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95: 701-706.
142. Judewicz, N.; Glikin, G.; Torres, H.N. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 206: 87-92.
143. Glikin, G. (1981) Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.
144. Moreno, S.; Paveto, C.; Passeron, S. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 180: 225-231.
145. Moreno, S.; Paveto, C.; Passeron, S. (1976) *Acta Physiol. Lat.* 26: 343-348.
146. Moreno, S.; Passeron, S. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 199: 321-330.
147. Lee, E.Y.C.; Silberman, S.R.; Ganapathi, M.K.; Petrovic, S.; Paris, N. (1980) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 13: 95-131.
148. Killilea, S.D.; Brandt, H.; Lee, E.Y.C.; Whelan, W.J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 2363-2368.
149. Khandelwal, R.L.; Vandenheede, J.R.; Krebs, E.G. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 4850-4858.
150. Chou, C.K.; Alfano, J.; Rosen, O.M. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 2855-2859.

151. Li, H.C.; Hsiao, K.J.; Chan, W. (1978) *Eur. J. Biochem.* 84: 215-225.
152. Lee, E.Y.C.; Mellgren, R.L.; Killilea, S.D.; Aylward, J.H.  
(1978) *FEBS Sympos.* 42: 327-346.
153. Antoniow, J.F.; Mimmo, H.G.; Yeaman, S.J.; Cohen, P. (1977)  
*Biochem. J.* 162: 423-433.
154. Killilea, S.D.; Brandt, H.; Lee, E.Y.C. (1976) *Trends Biochem. Sci.* 1: 30-33.
155. Nimmo, G.D.; Cohen, P. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87: 341-351.
156. Cohen, P. (1978) *Curr. Top. Cell. Regul.* 14: 117-196.
157. Huang, F.L.; Glinemann, W. H. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 3004-3008.
158. Huang, F.L.; Glinemann, W. H. (1976) *FEBS Lett.* 62: 326-329.
159. Huang, F.L.; Glinemann, W. H. (1976) *Eur. J. Biochem.* 70:  
419-426.
160. Cohen, P.; Nimmo, G.A.; Burchell, A.; Antoniow, J.F. (1978)  
*Adv. Enzyme Regul.* 16: 97-119.
161. Nimmo, G.A.; Cohen, P. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87: 353-365.
162. Ross, E.M.; Gilman, A.G. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49:  
533-564.
163. Rodbell, M.; Birnbaumer, L., Pohl, S.; Krans, H.M. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 1877-1882.
164. Harwood, J.P., Rodbell, M. (1973) *J. Biol. Chem.* 248:  
4901-4904.

165. Birnbaumer, L., Pohl, S.L., Rodbell, M., Sundby, F. (1972)  
J. Biol. Chem. 247: 2038-2043.
166. Ross, E.M., Gilman, A.G. (1977) J. Biol. Chem. 252: 6966-6970.
167. Ross, E.M., Howlett, A.G., Ferguson, K.M., Gilman, A.G. (1978)  
J. Biol. Chem. 253: 6401-6412.
168. Northup, J.K.; Sternweis, P.C.; Smigel, M.D.; Schleifer, L.S.;  
Ross, E.M.; Gilman, A.G. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.  
77: 6516-6520.
169. Ross, E.M. (1981) J. Biol. Chem. 256: 1949-1953.
170. Cuatrecasas, P.; Hollenberg, M.D. (1976) Adv. Prot. Chem. 30:  
251-451.
171. Singer, S.J.; Nicolson, G.L.; (1972) Science 175: 720-731.
172. Sy, J.; Richter, D. (1972) Biochemistry 11: 2788-2791.
173. Varimo, K.; Londesborough, J. (1976) Biochem. J. 159: 363-370.
174. Gomes, S.L.; Maia, J.C.C. (1979) Biochim. Biophys. Acta 567:  
257-264.
175. Klein, C. (1976) FEBS Lett. 68: 125-128.
176. Cohen, R.J.; Ness, J.L.; Whiddon, S.M. (1980) Phytochemistry  
19: 1913-1918.
177. Zingales, B.; Carniol, C.; Abrahamsohn, P.A.; Colli, W. (1979)  
Biochim. Biophys. Acta 550: 233-244.
178. Franco da Silveira, J.; Zingales, B.; Colli, W. (1977) Biochim.  
Biophys. Acta 481: 722-733.
179. Kassis, S.; Kindler, S.M. (1975) Biochim. Biophys. Acta 391: 513-516.

180. Goncalves, M.F.; Zingales, B.; Colli, W. (1980) *Molec. Biochem. Parasitology* 1: 107-118.
181. Flawiá, M.M.; Torres, H.N. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 2870-2873.
182. Flawiá, M.M.; Torres, H.N. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 4517-4520.
183. Kornblihtt, A.; (1980) Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.
184. Cantore, M.L.; Galvagno, M.A.; Passeron, S. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 199: 312-320.
185. Klein, C. (1977) *FEMS Microbiol. Lett.* 1: 17-20.
186. Pahlic, M.; Rutherford, C.C. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 9703-9705.
187. Klein, C.; Darmon, M. (1979) *FEMS Microbiol. Lett.* 5: 1-4.
188. Hintermann, R.; Parish, R.W. (1979) *Exp. Cell. Res.* 123: 429-434.
189. Flawiá, M.M.; Terenzi, H.F.; Torres, H.N. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 180: 334-342.
190. Cantore, M.L.; Passeron, S. (1981) (enviado a publicar).
191. Sutherland, E.W.; Rall, T.W. (1958) *J. Biol. Chem.* 232: 1077-1091.
192. Drummond, G.I.; Perrott-Yee, S. (1961) *J. Biol. Chem.* 236: 1126-1129.
193. Butcher, R.W.; Sutherland, E.W. (1962) *J. Biol. Chem.* 237: 1244-1250.
194. Cheung, W.Y., Lin, Y.M. (1974) en *Methods in Enzymol.* 38: (Hardman, G.J.; O'Malley, B.W. eds.). Acad. Press. N.Y. p.223.
195. Nairn, K.G. (1966) *Biochemistry* 5: 150-157.
196. Cheung, W.Y. (1967) *Biochemistry* 6: 1079-1081.

197. Appleman, M.M.; Thompson, W.Y.; Russell, T.R. (1973) *Adv. Cyclic Nucleotide. Res.* 3: 65-98.
198. Beavo, J.A.; Hardman, J.G.; Sutherland, E.W. (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 5649-5655.
199. Thompson, W.J.; Appleman, M.M. (1971) *Biochemistry* 10: 311-316.
200. Brooker, G.; Thomas, L.; Appleman, M.M. (1968) *Biochemistry* 7: 4177-4181.
201. Huang, Y.C.; Kemp, R.G. (1971) *Biochemistry* 10: 2278-2283.
202. Thompson, W.J.; Appleman, M.M. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 3145-3150.
203. Monn, E.; Christiansen, R.O. (1971) *Science* 173: 540-542.
204. Pichard, A.L.; Kaplan, Y.C.; Cheung, W.Y. (1975). *Fed. Proc.* 34: 617 (Abstr.).
205. Pichard, A.L.; Cheung, W.Y. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 5726-5737.
206. Appleman, M.M.; Terasaki, W. (1975) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5: 153-162.
207. Wells, J. N. Hardman, J.G. (1977) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 8: 119-143.
208. Strada, S.J., Thompson, W.J. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9: 265-284.
209. Kakiuchi, S.; Yamazaki, R.; Teshina, Y. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42: 968-974.
210. Brown, E.G.; Edwards, M.J.; Newton, R.P.; Smith, C.J. (1979) *Phytochemistry* 18: 1943-1948.

211. Russell, T.R.; Terasaki, W.L.; Appleman, M.M. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 1334-1340.
212. Hidaka, H.; Asano, T. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 429: 485-497.
213. Sakai, T.; Yamanaka, M.; Tanaka, R.; Makino, H. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 483: 121-134.
214. Moss, J.; Manganiello, V.C.; Vaughan, M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 541: 279-287.
215. Murtaugh, T.J.; Bhalla, R.C. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 196: 465-474.
216. Pichard, A.L.; Hanoune, J. Kaplan, J.C. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 315: 370-377.
217. Uzunov, P.; Weiss, B. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 284: 220-226.
218. Campbell, M.Y.; Oliver, I.T. (1972) *Eur. J. Biochem.* 28: 30-37.
219. Hait, W.N.; Weiss, B. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 497: 86-100.
220. Vale, M.R.; Gomes, S.L.; Maia, J.C.C. (1975) *FEBS Lett.* 56: 332-336.
221. Pledger, W.J.; Stancel, G.M.; Thompson, W.J.; Strada, S.J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 370: 242-248.
222. Pledger, W.J.; Thompson, W.J.; Strada, S.J. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 391: 334-340.
223. Van Inwegen, R.G.; Pledger, W.J.; Strada, S.J.; Thompson, W.J. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 175: 700-709.
224. Goren, E.; Rosen, O.M. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 153: 384-397.

225. Ho, H.C.; Wirch, E.; Stevens, F.C.; Wang, J.H. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 43-50.
226. Miki, N.; Yoshida, H. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 268: 166-174.
227. Brostrom, C.O.; Wolff, D.J. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 301-311.
228. Cheung, W.Y.; Lynch, T.J.; Wallace, R.W. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9: 233-251.
229. Uzunov, P.; Gnegy, M.E.; Revuelto, A.V.; Costa, E. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70: 132-138.
230. Ho, H.C. Teo, T.S.; Desai, R.; Wang, J.H. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 429: 461-473.
231. Woo, I.T.; Manery, J.F. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 154: 510-519.
232. Lindl, T.; Chapman, G. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 1273-1282.
233. Adachi, J.; Levine, V.; Halprin, K.M.; Iizuka, H.; Yoshikawa, L. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 429: 498-507.
234. Russell, T.R.; Pastan, I. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 7764-7769.
235. Thompson, W.J.; Ross, C.P.; Pledger, W.J.; Strada, S.J.; Banner, R.L.; Hersh, E.M. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 4922-4929.
236. Thompson, W.J.; Epstein, P.M.; Strada, S.J. (1979) *Biochemistry* 18: 5228-5237.
237. Loten, E.G.; Assimacopoulos, J.F.; Exton, J.H.; Park, C.R. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 746-757.

238. Loten, E.G.; Francis, S.H.; Corbin, J.D. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 7838-7844.
239. Lin, Y.M.; Cheung, W.Y. (1975) *Int. J. Biochem.* 6: 271-280.
240. Conway, A.; Koshland, D.E.Jr. (1968) *Biochemistry* 7: 4011-4022.
241. Russell, T.R.; Thompson, W.J.; Schneider, F.W.; Appleman, M.M. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 1791-1795.
242. Gain, Y.; Appleman, M.M. (1978) *Adv. Cycl. Nucl. Res.* 9: 221-231.
243. Terai, M.; Furihata, C.; Matsushima, T.; Sugimura, T. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 176: 621-629.
244. Beavo, J.A.; Hardman, J.C.; Sutherland, E.W. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 3841-3846.
245. Manganiello, V.; Vaughan, M. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 269-273.
246. Strewler, G.J.; Manganiello, V.; Vaughan, M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 390-394.
247. Ball, E.M.; Narindrasorasak, S.; Sanwal, B.D. (1979) *Can. J. Biochem.* 57: 1220-1228.
248. Terasaki, W.L.; Appleman, M.M. (1975) *Metabolism* 24: 311-319.
249. Bevers, M.M.; Smits, R.A.; Van Rijn, J.; Van Wijk, R. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 341: 120-128.
250. Filburn, C.R.; Sacktor, B. (1976) *Archiv. Biochem. Biophys.* 174: 244-261.
251. Van Inwegen, R.G.; Swafford, R.L.; Strada, S.J.; Thompson, W.J. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 178: 58-68.



252. Guan,W.R.; Cheung,W.Y. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 204: 191-198.
253. Srere,P.P. (1967) Science 158: 936-937.
254. Miki,N.; Baraban,J.M.; Keirns,J.J.; Boyce,J.J.; Bitensky,M.M. (1975) J. Biol. Chem. 250: 6320-6327.
255. Bitensky,M.W.; Miki,N.; Keirns,J.J.; Keirns,M.; Baraban,J.M.; Freeman,J.; Wheeler,M.A.; Lacy,J.; Marcus,F.R. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5: 213-240.
256. Morishima,I. (1974) Biochim. Biophys. Acta 370: 227-241.
257. Morishima,I. (1975) Biochim. Biophys. Acta 391: 75-83.
258. Shimoyama, M. Kawai,M.; Tanigawa,Y.; Veda,I.; Sakamoto,M.; Hagiwara,K.; Yamashita,Y.; Sakaibara E.; (1972 ) Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 59-65.
259. Lin,P.P.; Varner,J.E. (1972) Biochim. Biophys. Acta 276: 454-474.
260. Schröder,J.; Rickenberg,H.V. (1973) Biochim. Biophys. Acta 302: 50-63.
261. Roberts,E.; Simonsen,D.G. (1970) Brain Res. 24: 91-111.
262. Nakano,J.; Oliver,R.; Ishii,T. (1970) Pharmacology 3: 273-281.
263. Goodman,H.M. (1968) Nature 219: 1053.
264. Honeyman,T.; Goodman,H.M. (1971) Fed. Proc. 30: 435 (Abstr.)
265. Kukovetz,W.R.; Püsch,G (1967) Pharmacol. Exp. Ther. 156: 514-521.
266. Otten,J.; Johnson,G.S.; Pastan,I. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44: 1192-1198.

267. Chasin, M.; Harris, D.N. (1976) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*  
7: 225-264.
268. D'armiento, M.; Johnson, G.S.; Pastan, I. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 459-462.
269. Duttagupta, C.; Rifas, L.; Makman, M.H. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 523: 385-394.
270. Uzunov, P.; Shein, M.M.; Weiss, B. (1973) *Science* 180: 304-306.
271. Bourne, H.R.; Tomkins, G.M.; Dion, S. (1973) *Science* 181:  
952-954.
272. Ross, P.S.; Manganiello, V.; Vaughan, M.; (1977) *J. Biol. Chem.*  
252: 1448-1452.
273. Schwartz, J.P.; Passoneau, J.V. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 3844-3848.
274. Cheung, W.Y. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 191: 303-315.
275. Cheung, W.Y. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38: 533-538.
276. Kakiuchi, S.; Yamazaki, R.; Nakajima, H. (1970) *Proc. Jap. Acad.*  
46: 587-592.
277. Kakiuchi, S.; Yamazaki, R. (1970) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*  
41: 1104-1110.
278. Klee, C.B.; Crouch, T.H.; Richman, P.G. (1980) *Ann. Rev. Biochem.*  
49: 489-515.
279. Kakiuchi, S.; Yamazaki, R.; Teshima, Y.; Ueniski, K.; Yasuda, S.;  
Kashiba, A.; Sobue, K.; Ohshima, M.; Nakajima, T. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9: 253-263.

280. Childers, S.R.; Siegel, F.L. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 405: 99-108.
281. Teo, T.S.; Wang, T.H.; Wang, J.H. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 588-595.
282. Watterson, D.M.; Harrelson, W.C.; Keller, P.M.; Sharief, F.; Vanaman, T.C. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 4501-4513.
283. Lin, Y.M.; Liu, Y.P.; Cheung, W.Y. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 4943-4954.
284. Klee, C.B. (1977) *Biochemistry* 16: 1017-1024.
285. Grand, R.J.; Perry, S.V. (1979) *Biochem. J.* 183: 285-295.
286. Gnegy, M.E.; Costa, E.; Uzunov, P. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 352-355.
287. Jamieson, G.A.; Vanaman, T.C.; Blum, J.J. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 6471-6475.
288. Kuźnicki, J.; Kuźnicki, L.; Drabikowski, W. (1979) *Cell. Biol. Int. Rep.* 3: 17-23.
289. Gomes, S.L.; Mennucci, L.; Maia, J.C.C. (1979) *FEBS Lett.* 99: 39-42.
290. Grand, R.J.; Nairn, A.C.; Perry, S.V. (1980) *Biochem. J.* 185: 755-760.
291. Clarke, M.; Bazari, W.L.; Kayman, S.C. (1980) *J. Bacteriol.* 141: 397-400.
292. Waisman, D.; Stevens, F.C.; Wang, J.H. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 975-982.

293. Waisman, D.; Stevens, F.C.; Wang, J.H. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 1106-1113.
294. Jones, H.P.; Mathews, J.C.; Cormier, M.J. (1979) *Biochemistry* 18: 55-60.
295. Seamon, K.B.; Moore, B.W. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 11644-11647.
296. Van Eldik, L.; Grossman, A.R.; Iverson, D.B.; Watterson, D.M. (1980) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 1912-1916.
297. Watterson, D.M.; Iverson, D.B.; Van Eldik, L.J. (1980) *Biochemistry* 19: 5762-5768.
298. Anderson, J.M.; Charbonneau, H.; Jones, H.P.; McCann, R.D.; Cormier, M.J. (1980) *Biochemistry* 19: 3113-3120.
299. Wolff, J.; Hope Cook, G.; Goldhammer, A.R.; Berkowitz, S.A. (1980) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3841-3844.
300. Teo, T.S.; Wang, J.H. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 5950-5955.
301. Cheung, W.Y. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 2859-2869.
302. Cheung, W.Y. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 242: 395-409.
303. Crouch, T.H.; Klee, C.B. (1980) *Biochemistry* 19: 3692-3698.
304. Wolff, D.J.; Poirier, P.G.; Brostrom, C.O.; Brostrom, M. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 4108-4117.
305. Huang, C.Y.; Chau, V. Chock, P.B.; Wang, J.H.; Sharma, R.K. (1981) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 871-874.
306. Wolff, D.J.; Brostrom, C.O. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 163: 349-358.
307. Smoake, J.A.; Johnson, L.S.; Peake, G.T. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 206: 331-335.

308. Wells, J.N.; Baird, C.E.; Wu, Y.J.; Hardman, J.G. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 384: 430-442.
309. Pichard, A.L.; Cheung, W.Y. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 4872-4875.
310. Goren, E.N.; Rosen, D.M. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 142: 720-723.
311. Cheung, W.Y. (1980) *Science* 207: 19-27.
312. Butcher, R.W.; Sneyd, J.G.T.; Park, C.R.; Sutherland, E.W. (1966) *J. Biol. Chem.* 241: 1651-1653.
313. Butcher, R.W.; Baird, C.E.; Sutherland, E.W. (1968) *J. Biol. Chem.* 243: 1705-1712.
314. Exton, J.H.; Lewis, J.B.; Ho, R.J.; Robison, G.A.; Park, C.R. (1971) *Annals of the New York Academy of Sci.* 185: 85-99.
315. Blecher, M.; Merline, N.S.; Ro'ane, J.J. (1968) *J. Biol. Chem.* 243: 3973-3977.
316. Müller-Oerlinghausen, B.; Schawe, U.; Hasselblatt, A.; Schmidt, F.H. (1968) *Life Sci* 7: 593-598.
317. Loten, E.G.; Sneyd, J.G. (1970) *Biochem. J.* 120: 187-193.
318. Manganiello, U.; Vaughan, M. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 7164-7170.
319. Sakai, R.; Thompson, W.J.; Lavis, V.R.; Williams, R.H. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 162: 331-339.
320. Kono, T.; Robison, F.W.; Sarver, J.A. (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 7826-7835.

321. Kuo, J.F.; Shoji, M. Brackett, N.C.; Helfman, D.M. (1978) J. Cyclic Nucleotide Res. 4: 463-474.
322. Goodsell, E.B.; Stein, H.H.; Wenzke, W.J. (1971) J. Med. Chem. 14: 1202-1205.
323. Triner, L.; Vulliemoz, Y.; Schwartz, I.; Nahas, G.G. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40: 64-69.
324. Smith, J.B.; Mills, D.C.B. (1970) Biochem. J. 120: 20p.
325. Davis, C.W.; Kuo, J.F. (1978) Biochem. Pharmacol. 27: 89-95.
326. Pösch, G.; Kukovetz, R. (1971) Life Sci. 10: 133-144.
327. Cheung, W.Y.; (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 23: 214-219.
328. Peers, D.G.; Davies, J.I.; (1971) Biochem. J. 124: 8p.
329. Fain, J.N.; Pointer, R.H.; Ward, W.F. (1972) J. Biol. Chem. 247: 6866-6872.
330. Song, S.Y.; Cheung, W.Y. (1971) Biochim. Biophys. Acta 242: 593-605.
331. Dumler, I.L.; Etingof, R.N. (1976) Biochim. Biophys. Acta 429: 474-484.
332. Liu, Y.P.; Wong, V.G. (1979) Biochim. Biophys. Acta 583: 273-278.
333. Wang, J.H.; Desai, R. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 72: 926-932.
334. Sharma, R.K.; Wirch, E.; Wang, J.H. (1978) J. Biol. Chem. 253: 3575-3580.
335. Klee, C.B.; Crouch, T.H.; Krinks, M.H. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76: 6270-6273.
336. Wang, J.H.; Desai, R. (1977) J. Biol. Chem. 252: 4175-4184.

337. Klee, C.B.; Krinks, M.H. (1978) *Biochemistry* 17: 120-126.
338. Wolf, H.; Hofmann, F. (1980) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*  
77: 5852-5855.
339. Beale, E.G.; Dedman, J.R.; Means, A.R. (1977) *J. Biol. Chem.*  
252: 6322-6327.
340. Walsh, D.A.; Ashby, C.D.; Gonzalez, C.; Calkins, D.; Fisher, E.H.;  
Krebs, E.G.; (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 1977-1985.
341. Chang, Y.Y. (1968) *Science* 161: 57-59.
342. Gerish, G.; Malchow, D.; Riedel, V.; Müller, E.; Every, M.  
(1972) *Nature New Biol.* 235: 90-92.
343. Pannbacker, R.G.; Bravard, L.J. (1972) *Science* 175: 1014-1015.
344. Chassy, B.M. (1972) *Science* 175: 1016-1018.
345. Dicou, E.L.; Brachet, P. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*  
90: 1321-1327.
346. Kessin, R.H.; Orlow, S.J.; Shapiro, R.I.; Franke, J. (1979) *Proc.*  
*Nat. Acad. Sci. USA* 76: 5450-5454.
347. Riedel, V.; Gerish, G.; Müller, E.; Beug, H. (1973) *J. Mol. Biol.*  
74: 573-585.
348. Riedel, V. Gerish, G (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42:  
119-124.
349. Malchow, D.; Nägele, B.; Schwartz, H.; Gerish, G. (1972). *Eur. J.*  
*Biochem.* 28: 136-142.
350. Yeh, R.P.; Chan, F.K.; Coukell, M.B. (1978) *Dev. Biol.* 66:  
361-374.

351. Murray, A.W.; Spizman, M.; Atkinson, D.E. (1971) *Science* 171: 496-498.
352. Kincaid, R.L.; Mansour, T.E. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 588: 342-350.
353. Wold, S.M.; Suzuki, I. (1974) *Can. J. Microbiol.* 20: 1567-1576.
354. Fujimoto, M.; Ichikawa, A.; Tomita, K. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 161: 54-63.
355. Speziali, G.A.G.; Van Wijk, R. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 235: 466-472.
356. Scott, W.A.; Solomon, B. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53: 1024-1030.
357. Tellez-Iñón, M.T.; Glikin, G.C.; Judewicz, N. (1980) *Resúmen XVI. Reunión Nacional S.A.I.B.:171. (Abstr.)*
358. Uno, I.; Yamaguchi, M.; Ishikawa, T. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 479-483.
359. Cohen, R.J.; Atkinson, M.M. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83: 616-621.
360. Cohen, R.J. (1979) *Phytochemistry* 18: 943-948.
361. Englis, D.; Hanahan, D. (1945) *J. Amer. Chem. Soc.* 67: 51-54.
362. Burkholder, P.R.; McVeigh, I. (1940) *Amer. J. Botany* 27: 634-640.
363. Wayne, P.K.; Rosen, D. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 1436-1440.
364. Steiner, A.L.; Parker, C.W.; Kipnis, D.M. (1972) *J. Biol. Chem.* 247: 1106-1113.



365. Steiner, A.L. (1974) en *Methods in Enzymol.* 38: (Hardman, G.J.; O'Malley, B.W. eds.) Acad. Press. N.Y. p.96.
366. Frandsen, E.K.; Krishna, G. (1976). *Life Sci.* 18: 529.
367. Lynch, T.J.; Cheung, W.Y. (1975) *Anal. Biochem.* 67: 130-138.
368. Ong, K.K.; Rennie, P.I.C. (1976) *Anal. Biochem.* 76: 63-62.
369. Fiske, C.H.; Subbarow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.
370. Huggett, A.St.G.; Nixon, D.A. (1957) *Biochem. J.* 66: 12p.
371. *Worthington Enzyme Manual* (1972), Worthington Biochemical Corp. Freehold, N.J.
372. Garen, A.; Levinthal, C. (1960). *Biochim. Biophys. Acta* 38: 470-483.
373. Peterson, E.A.; Sorber, H.A. (1962) en *Methods in Enzymol.* 5: (Sydney, P.; Colowick, S.P.; Kaplan, N. eds.) Acad. Press. N.Y. p.6.
374. Rutten, W.J.; Shoot, B.M.; de Pont, J.J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 315: 378-383.
375. Paladini, A.C.; Leloir, L.F. (1952) *Biochem. J.* 51: 426-430.
376. Morrill, M.E.; Thompson, S.T.; Stellwagen, E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 4371-4374.
377. Laurent, T.C.; Killander, J. (1964) *J. Chromatog.* 14: 317-330.
378. Martin, R.; Ames, B. (1961) *J. Biol. Chem.* 236: 1372-1379.
379. Siegel, L.M.; Monty, K.J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 112: 346-362.
380. Cecil, R.; Ogston, A.G. (1948) *Biochem. J.* 42: 299.
381. Cecil, R.; Ogston, A.G. (1951) *Biochem. J.* 49: 105-106.

382. Haga, T.; Haga, K.; Gilman, A.G. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 5776-5782.
383. Davis, B.J. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.
384. Lowry, O.M.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
385. Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
386. Glynn, Y.; Chappell, J. (1964) *Biochem. J.* 90: 147-149.
387. Chang, K. Marcus, M.; Cuatrecasas, P. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 6854-6865.
388. Dedman, J.R.; Means, A.R. (1977) *J. Cyclic Nucleotide Res.* 3: 139-152.
389. Orłowski, M. (1980) *Arch. Mikrobiol.* 126: 133-140.
390. Brown, S.S.; Rutherford, C.L. (1980) *Differentiation* 16: 173-183.
391. Hidaka, H.; Yamaki, T.; Ochiai, Y.; Asano, T.; Yamabe, H. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 484: 398-407.
392. Stellwagen, E. (1977) *Accts. Chem. Res.* 10: 92-98.
393. Dixon, M.; Webb, E.C. (1962) en *Enzymes*, Longmans, Lond. p.8.
394. Nielsen, L.D.; Monard, D.; Rickenberg, H.V. (1973) *J. Bacteriol.* 116: 857-866.
395. Lee, C.H. (1978) *J. Gen. Microbiol.* 107: 177-181.
396. Davis, C.W.; Kuo, J.F. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 4078-4084.
397. Goren, E.; Erlichman, J.; Rosen, D.M.; Rosen, S.M. (1970) *Fed. Proc.* 29: 602 (Abstr.).

398. Chassy, B.M.; Porter, V. (1974) en *Methods in Enzymol.* 38  
(Hardman, G.J.; O'Malley, B.W. eds.). Acad. Press. N.Y. p. 244.
399. Russell, T.; Pastan, I. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 5835-5840.
400. Epstein, P.M.; Pledger, W.J.; Gardner, E.A.; Stancel, G.M.;  
Thompson, W.J.; Strada, S.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*  
527: 442-455.
401. Kaufman, S.; Fisher, D.B. (1974). en *Molecular Mechanisms of*  
*Oxygen Activation* (Hayaishi, O. ed) Acad. Press. N.Y. p. 323.
402. Abita, J.P.; Milstien, S.; Chang, N.; Kaufman, S. (1976) *J.*  
*Biol. Chem.* 251: 5310-5314.
403. Helfman, D.M.; Shoji, M.; Kuo, J.F. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:  
6327-6334.
404. Galvagno, M.A.; Moreno, S.; Cantore, M.L.; Passeron, S. (1979).  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 779-785.
405. *Enzyme Nomenclature (IUB)* (1978). Publicado por The  
International Union of Biochemistry. Acad. Press. pp. 606.