

## Tesis de Posgrado

# Dihidropirimidinas aisladas de tejido conectivo de embrión de pollo

Molina y Vedia, Luis Miguel

1984

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Molina y Vedia, Luis Miguel. (1984). Dihidropirimidinas aisladas de tejido conectivo de embrión de pollo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1867\\_MolinayVedia.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1867_MolinayVedia.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Molina y Vedia, Luis Miguel. "Dihidropirimidinas aisladas de tejido conectivo de embrión de pollo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1984.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1867\\_MolinayVedia.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1867_MolinayVedia.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"DIHIDROPIRIMIDINAS AISLADAS DE TEJIDO CONECTIVO  
DE EMBRION DE POLLO"

AUTOR: Luis Miguel Molina y Vedia

DIRECTOR: Prof. Dr. Héctor Norberto Torres

LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Ingeniería Genética y Biología  
Molecular.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas -  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Tesis presentada para optar al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

- 1984 -

*Tesis.*  
*1867*  
*y 3*

I N D I C E

I- ASPECTOS HISTORICOS	1
II- LAS QUINASAS DE PROTEINAS	4
1- MODIFICACIONES COVALENTES EN Ser o Thr	4
a- Quinasas de proteínas dependientes de AMPc	4
a.1- Disociación de la Holoenzima	4
a.2- Efecto de histona en la reasociación de subunidades	5
a.3- Efecto de la subunidad catalítica sobre la hidrólisis de AMPc por la fosfodiesterasa	5
b- Quinasas de proteínas dependientes de GMPc	5
c- El sistema Ca - Calmodulina y las quinasas de proteínas	7
d- Fosforilaciones independientes de nucleótidos cíclicos. La sintetasa de glucógeno	8
e- Una nueva especie de quinasa de proteínas independiente de nucleótidos cíclicos	9
f- La quinasa de la ATP citrato liasa y el efecto insulina	12
g- Otra forma de regulación: los inhibidores proteicos de las quinasas	12
2- MODIFICACIONES COVALENTES DE TIROSINA	13
a- Transformación viral y metabolismo celular normal	13
b- El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF): Una quinasa de tirosina Su relación con el producto del oncogen V-erb-B	17
c- El receptor de insulina	18

d-	El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la proteína transformante p <sup>28</sup> <sub>SIS</sub> del virus de sarco de simio (SSV)	19
e-	Los factores transformantes y el receptor EGF	21
III-	ANTECEDENTES	23
IV-	OBJETIVO DE ESTE TRABAJO	25
V-	MATERIALES Y METODOS	26
1-	QUINASAS DE PROTEINAS DE CELULAS CHO-K <sub>1</sub>	26
a-	Cultivo de células, preparación del homogenato celular y fraccionamiento subcelular	26
b-	Cromatografía de quinasa de proteínas del citosol sobre DEAE celulosa	26
c-	Ensayo de quinasa de proteínas	26
d-	Metodología utilizada para detectar moduladores termoestables de las quinasas de proteínas	27
2-	QUINASA DE PROTEINAS DE CELULAS DE EMBRION DE POLLO-AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL MODULADOR TERMOESTABLE	27
a-	Obtención de carcasas de embrión de pollo, preparación del homogenato celular y fraccionamiento subcelular	27
b-	Cromatografía en DEAE celulosa	28
c-	Ensayo de quinasa de proteínas de embrión de pollo	28

d- Calentamiento a 100°C y precipitación etanólica	28
e- Cromatografía en geles	28
f- Cromatografías en papel y capa delgada de celulosa	29
3- ENSAYOS BIOLÓGICOS	29
a- Quinasa de proteínas de músculo de conejo	29
b- Actividad de adenosina trifosfatasa	29
c- Actividad de fosfodiesterasa	30
d- Ensayo del inhibidor de músculo esquelético de conejo	30
e- Cultivo de células de tumor de mama humano - Curva de crecimiento	30
f- Ensayo de incorporación de <sup>32</sup> P - Gel de poliacrilamida - Autorradiografía	30
4- ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS - METODO DE OBTENCIÓN DE DERIVADOS SILILADOS	32
5- SÍNTESIS ORGÁNICA	33
a- Obtención de 4 mercaptopirimidina, a partir de 4 hidroxipirimidina	33
b- Obtención de 2,4 dimercaptopirimidina, a partir de de 2 mercapto 4 hidroxipirimidina	33
c- Síntesis de 2-4 dimercapto 5-6 dihidropirimidina a partir de 2-4 dihidroxi 5-6 dihidropirimidina	34
d- Preparación del catalizador de níquel-aluminio	34
e- Reducción de 2 mercaptopirimidina y de 4 mercaptopirimidina. Separación cromatográfica	35

VI-	RESULTADOS Y DISCUSION	36
1-	CULTIVO DE CELULAS CHO-K <sub>1</sub> , BUSQUEDA DE MODULADORES	36
2-	QUINASA DE PROTEINAS DE TEJIDO CONECTIVO DE EMBRION DE POLLO	38
3-	AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL FACTOR TERMOESTABLE	40
4-	ALGUNOS SISTEMAS BIOLOGICOS Y SU MODULACION POR EL INHIBIDOR TERMOESTABLE	47
a-	Cinética de la quinasa de proteínas de tipo II, de músculo de conejo	47
b-	Curva de tiempo de la adenosina trifosfatasa de eritrocito de pavo	47
c-	La fosfodiesterasa de cerebro bovino en presencia de la fracción inhibitoria	51
d-	Comparación con el inhibidor de músculo de conejo	52
e-	Efectos moduladores sobre la multiplicación celular y la fosforilación de proteínas "in vivo"	52
f-	Estudios espectroscópicos de los sitios de unión del AMPc y de la fracción inhibitoria a la quinasa de proteínas de tipo I	59
5-	CROMATOGRAFIA GASEOSA-ESPECTROMETRIA DE MASA DE LA FRACCION INHIBITORIA	61
6-	SINTESIS ORGANICA DE COMPUESTOS RELACIONADOS CON LAS ESTRUCTURAS PROPUESTAS	73
VII-	CONCLUSION	77

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	79
ABREVIATURAS	88
FORMULAS	89



## AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a cuantas personas y organismos han contribuído al logro del presente trabajo, y de un modo especial:

Al Dr. Héctor N. Torres, por la libertad y el apoyo que me ha brindado a lo largo de toda la tarea.

A la Dra. Mirtha M. Flawiá, por el estímulo y la confianza que me dispensó.

Al Dr. Luis F. Leloir y a todos los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", pues buena parte de este trabajo se realizó en ese Instituto.

A los Dres. Osvaldo Cascone y Mirta Biscoglio del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por sus importantes sugerencias, por el productivo intercambio de ideas, y por la colaboración prestada para la realización de este trabajo.

Al Dr. Eduardo G. Gros, Director de UMYMFOR-CONICET, por supervisar las tareas de química orgánica que se presentan en esta tesis, y por su generoso aporte personal en la discusión de los resultados.

Al Dr. Alejandro A. Paladini, por su compañerismo y sus valiosos consejos.

A los Dres. Norberto Judewicz y María T. Téllez, por sus buenas ideas.

Al Bioquímico Ricardo M. Attar, a la Licenciada Alejandra Mandel, y al Sr. Eduardo Cafferata, por su ayuda y estímulo.

Al grupo del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, integrado por los Licenciados Hugo Garrafo, Gustavo Dartayet, Alicia Baldessari y Darío Doller, por la buena voluntad y el interés que pusieron durante el desarrollo de mi trabajo de química, y espe-

cialmente al Sr. Jorge Aznárez, por la realización cuidadosa de los espectros de masa.,

A Soledad de Gimenez, Francisco Irusta, Norberto Contreras y María J. Alvarez, por el apoyo técnico.

A Liliana Botana, Lidia Parodi y Beile Wolf, por la ayuda desde el área administrativa.

A Norberto Malarini, por su dedicación en la confección de los gráficos.

## I- ASPECTOS HISTORICOS

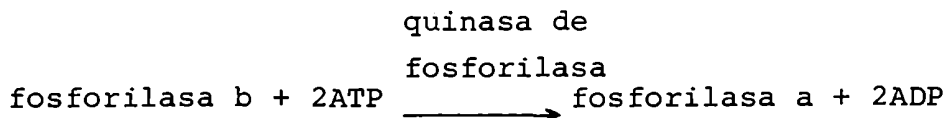
Antes de 1950 las únicas fosfoproteínas conocidas eran la caseína, la fosvitina y la pepsina. De esta última se conoció a el contenido de fosfato, pero no el significado de la fosforilación. El caso de la pepsina es un ejemplo de "fosforilación silenciosa", un término usado por Cohen (1) para describir la fosforilación de enzimas en sitios que no afectan la actividad enzimática. Los primeros desarrollos que arrojaron luz sobre la fosforilación de proteínas, como procesos dinámicos involucrados en la regulación metabólica, surgieron del metabolismo del glucógeno.

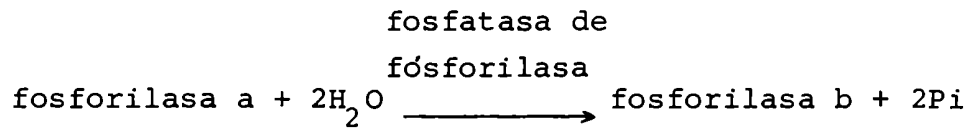
En los años 40 Cori et al. (2) (3) demostraron que la fosforilasa de músculo, enzima que cataliza la ruptura fosforolítica del glucógeno, existe en dos formas. Una activa llamada fosforilasa a y otra inactiva llamada fosforilasa b, y además que la forma a puede pasar a la forma b "in vitro".

Sin embargo, por aquel entonces la naturaleza química de las reacciones de interconversión no fue apreciada cabalmente.

En los años 50 Sutherland y sus colaboradores (4) (5), trabajando con fosforilasa de hígado, y Fisher y Krebs (6), trabajando con la enzima de músculo, descubrieron que la forma activa es una fosfoenzima y que la interconversión involucra de fosforilación enzimática.

La enzima que catalizaba la fosforilación de la fosforilasa por ATP se llamó quinasa de fosforilasa y la enzima que catalizaba la defosforilación hidrolítica fue llamada fosfatasa de la fosforilasa. Estas reacciones, incorporando el conocimiento de su estequiometría, pueden escribirse:





Poco después se encontró que la quinasa de fosforilasa es a su vez activada por fosforilación, en un proceso que resultó ser estimulado por AMPc (8)

Luego, en 1963, se comunicó que la sintetasa de glucógeno existe también en dos formas que son interconvertidas por fosforilación - defosforilación (9).

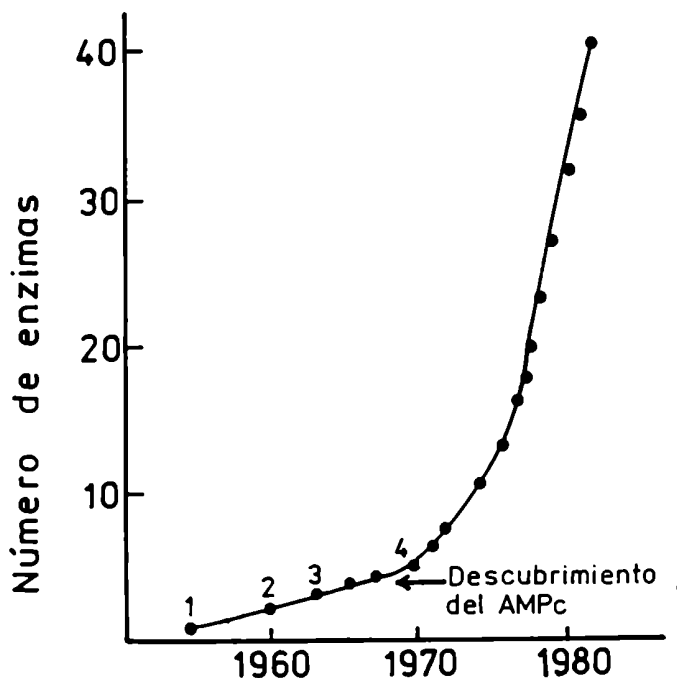
La fosforilación de la sintetasa del glucógeno, como la de la quinasa de fosforilasa eran estimulados por AMPc (10) (11). Lo que resultó de particular interés es que la fosforilación aumenta la actividad de la fosforilasa y de la quinasa de la fosforilasa (ambas involucradas en la ruptura del glucógeno), y la fosforilación disminuye la actividad de la enzima biosintética sintetasa del glucógeno. Este tipo de relación recíproca dirige las enzimas reguladas por fosforilación-defosforilación.

El mecanismo de acción del AMPc en la activación de la fosforilasa quinasa y en la inactivación de la glucógeno sintetasa no era por entonces conocido. Esta incertidumbre se resolvió cuando se determinó que existía una quinasa dependiente de AMPc que fosforilaba a la quinasa de la fosforilasa (12) y que dicha enzima dependiente de AMPc y la quinasa de glucógeno sintetasa eran la misma entidad (13) (14).

Otro hecho importante fue el descubrimiento, por Linn et al. (15), de que la piruvato deshidrogenasa es también regulada por un proceso de fosforilación-defosforilación, estando este sistema enzimático muy alejado de los confines del metabolismo del glucógeno. A partir de ese momento el trabajo en fosforilación de enzimas se expandió rápidamente.

Esto se ilustra en la figura 1, en la cual se muestra el número total de enzimas reguladas por fosforilación-defosforilación, o con fosfato covalentemente unido, descritas a lo largo del tiempo. Hasta principios de 1982, más de 40 enzimas pertenecían a esta categoría.

FIGURA 1



- 1- fosforilasa de glucógeno
- 2- fosforilasa quinasa
- 3- glucógeno sintetasa
- 4- piruvato deshidrogenasa

Por otra parte durante los años 70 el número de comunicaciones sobre proteínas no enzimáticas fosforilables creció en forma aún más impresionante que el número de enzimas. Se cuentan entre aquellas proteínas citosólicas, de membrana, nucleares, ribosomales, contráctiles y receptores.

## II- LAS QUINASAS DE PROTEINAS

### 1- MODIFICACIONES COVALENTES EN Ser o Thr

#### a- Quinasas de proteínas dependientes de AMPc

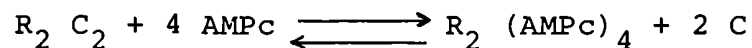
En los sistemas eucarióticos, los efectos de los nucleótidos cíclicos, producidos luego de la estimulación de las correspondientes adenilato ciclasas están mediados por la activación de quinasas de proteínas que catalizan la fosforilación de serina y treonina.

Las quinasas de proteínas dependientes de AMPc (ATP:protein phosphotransferase E.C.2.7.1.3.7) están ampliamente distribuidas y desempeñan un papel central en la regulación del metabolismo y otras funciones celulares (16) (17) (18) (19) (20).

Se han aislado dos formas de la enzima: el tipo I, que predomina en músculo esquelético, y el tipo II, mayoritario en músculo cardíaco. Estas enzimas, como se verá más adelante, están constituidas por dos tipos de subunidades: regulatoria (R) y catalítica (C). Las diferencias entre ambos tipos radica a nivel de las subunidades R, ya que las subunidades C son comunes a ambos tipos (21).

#### a.1- Disociación de la Holoenzima

La elucidación de la estructura cuaternaria de las quinasas de proteínas (22) (23) y la estequiometría de la unión del AMPc a la enzima (24) (25) permiten definir la reacción de activación según la siguiente ecuación:



que identifica las especies moleculares iniciales y finales.

El mecanismo por el cual este proceso ocurre involucra inicialmente a un complejo ternario del tipo RCAMPc (26) (27) (28).

a.2- Efecto de histona en la reasociación de subunidades

El mecanismo por el cual polimerizaciones del tipo histona activan la quinasa de proteínas del tipo I, cursa con inhibición de la recombinación en vez de la disociación de los complejos RC (29) (30).

a.3- Efecto de la subunidad catalítica sobre la hidrólisis de AMPc por la fosfodiesterasa

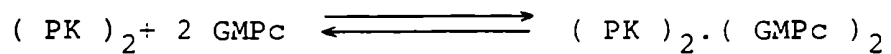
Cuando el AMPc se une a R, queda protegido de la acción de su fosfodiesterasa específica dependiente de calmodulina(31). Por otro lado en presencia de la subunidad C se observa un marcado incremento de la actividad fosfodiesterasa, lo que implica que sólo el AMPc libre es el sustrato de la fosfodiesterasa. Por lo tanto las concentraciones de quinasa de proteínas y de fosfodiesterasa podrían ser importantes en el control de las velocidades de activación e inactivación de la quinasa.

b.- Quinasas de proteínas dependientes de GMPc

Existen también quinasas de proteínas que son específicamente activables por GMPc. de la comparación de ambas quinasas surge una gran variedad de características comunes: similar origen evolutivo (32) (33); ambas tienen actividad de fosfotransferasa usando ATP como dador de fosfato; ambas se autofosforilan y po

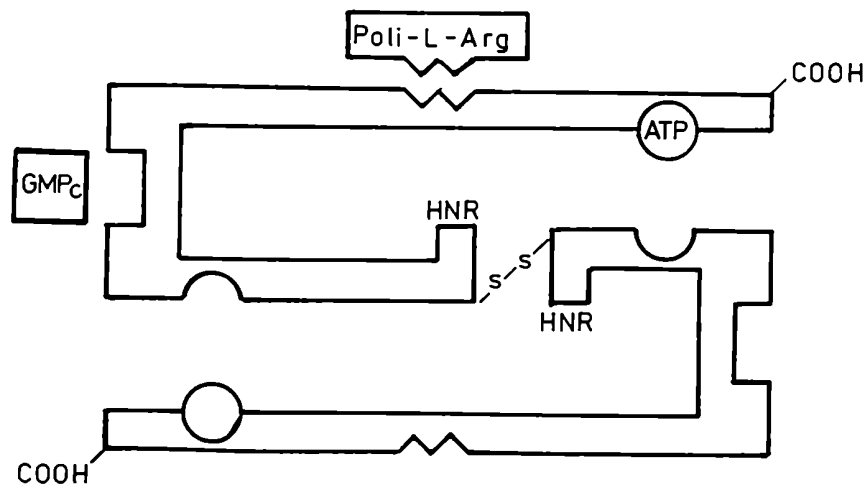
seen un sitio de alta afinidad para la poli L- arginina; la especificidad es para sérinas rodeadas de similar secuencia.

Las mayores diferencias residen en el nucleótido cíclico que se une a la enzima para activarla y en la estructura de las subunidades. Mientras, como se vio, las quinazas de proteínas dependientes de AMPc son tetraméricas, la dependiente de GMPc es un dímero que es activado sin que se produzca di- sociación de subunidades (34), según la siguiente reacción:



Un modelo esquemático se presenta en la figura 2 en el cual se describen dos cadenas idénticas dispuestas en forma antiparalela.

FIGURA 2





Un sector de la proteína localizado en la región amino terminal contiene las cisteínas que participan en el enlace disulfuro, enlace éste que asocia ambas subunidades.

La región amino terminal contiene uno de los sitios de autofosforilación y si bien el sitio de unión de nucleótido no se encuentra en esta zona, es necesaria para la correspondiente dependencia de nucleótido.

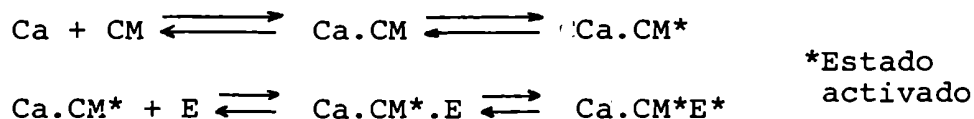
El sitio de unión de nucleótido y el de unión de poli L arginina están localizados hacia el extremo amino terminal con respecto al sitio catalítico y éste, localizado hacia el extremo carboxi terminal, cataliza la auto fosforilación y la transferencia de fosfato al sustrato.

c.- El sistema Ca - Calmodulina y las quinasas de proteínas

La Calmodulina (CM), se descubrió como un factor activador dependiente de Calcio de una de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (35).

Existen unas pocas quinasas de proteínas reguladas por CM: la quinasa de la cadena liviana de la miosina (36), la quinasa de la fosforilasa (37), y las quinasas de proteínas de membranas descritas por Schulman y Greengard (38).

La activación de la quinasa de la cadena liviana de miosina responde a un mecanismo similar al descrito para la fosfodiesterasa:



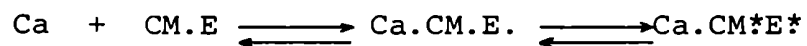
La etapa principal de este mecanismo es la unión de la CM al Ca, requerimiento fundamental para la activación de la enzima.

Existen cuatro sitios para el Ca y estudios recientes sugieren que para la activación de la fosfodiesterasa (39), y de la quinasa de cadena liviana (40), es necesaria la unión de los cuatro Ca. La unión del Ca a la CM es cooperativa, y se lleva a cabo dentro de un rango muy preciso de concentraciones del catión.

Por otra parte, el rango efectivo de Ca para la activación dependerá de la concentración de CM libre: si la CM libre es alta, la activación de la enzima se logrará cuando sólo una fracción del total de CM esté unida a Ca.

En cuanto a la regulación de la isoenzima de músculo esquelético quinasa de fosforilasa por Ca, la misma es mediada por la subunidad  $\delta$  (CM). La activación enzimática no depende entonces de la CM libre.

El esquema que representa este tipo de asociación es el siguiente:



La regulación de la isoenzima de músculo blanco (cardíaco) es una combinación de los dos mecanismos anteriores. La adición de CM extra provoca una activación adicional similar a la que se produce con la quinasa de cadena liviana.

En cuanto a las quinasas de membrana se han descrito fosforilaciones sobre sustrato endógeno, en membranas libres de CM, obtenidas de pulmón, bazo, vas deferens, corazón y adrenal de rata, estimuladas por agregado de CM exógena.

#### d.- Fosforilaciones independientes de nucleótidos cíclicos La sintetasa de glucógeno

La sintetasa de glucógeno existe en formas múltiples que se interconvierten por fosforilación y defosforilación de residuos de serina (41). Las formas fosforiladas son enzimáti-

camente menos activas que las no fosforiladas cuando se ensayan en ausencia de glu- $\beta$ -P.

La glucógeno sintasa de músculo esquelético de conejo es fosforilada por quinasas de proteínas dependientes de AMPc, por quinasas independientes (42) y por fosforilasa quinasa. La identificación de sitios múltiples de fosforilación (entre 3 y 6) y el hecho de ser fosforiladas por múltiples quinasas en sitios específicos, ofrece a esta enzima la posibilidad de regularse por distintas señales fisiológicas.

Por otra parte se ha estudiado la relación del glucógeno con la enzima, puesto que la glucógeno sintasa forma un fuerte complejo con el polisacárido.

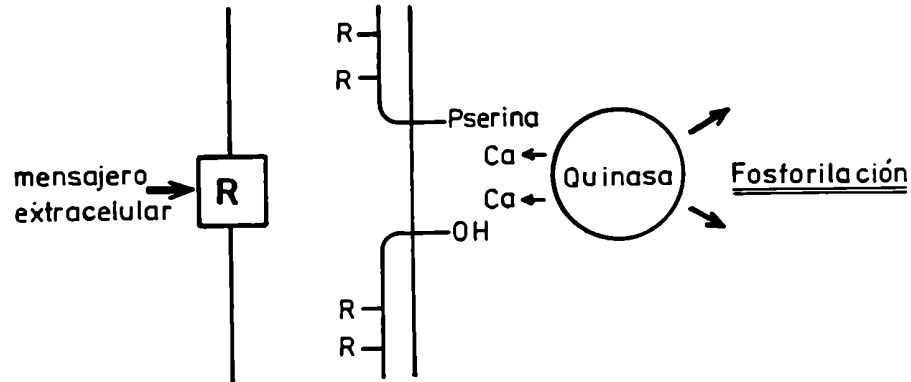
Se ha establecido que el estado de oxidación de los sulfhidrilos de la enzima hepática afecta la unión al glucógeno (43) En experimentos realizados en músculo esquelético (44) y en corazón (45), se demostró que el estado de fosforilación de la enzima estaba directamente relacionado al contenido de glucógeno (46), y se relacionó este fenómeno con inhibición, por el glucógeno, de la defosforilación de la glucógeno sintasa.

En los tejidos intactos es probable que la actividad de glucógeno sintasa esté bajo el control dual de varias quinasas de proteínas y fosfatasas.

e.- Una nueva especie de quinasa de proteínas independiente de nucleótidos cíclicos

La nueva especie de quinasa de proteínas se encontró en cerebro de rata (47). Este sistema se muestra esquemáticamente en la figura 3:

FIGURA 3



La quinasa se encuentra en su forma inactiva en la fracción soluble. En presencia del Ca normalmente unido a la membrana celular, la quinasa se une a la fosfatidilserina para activarse. La activación requiere diacilglicerol no saturado proveniente de la hidrólisis de fosfatidilinositol. El diacilglicerol incrementaría la afinidad de la enzima por los fosfolípidos y por el Ca.

Si bien este tipo de quinasa se encontró originalmente en cerebro de rata, se presenta también en gran variedad de tejidos y de órganos de varias especies.

La tabla 1 muestra las actividades relativas de tres de quinatas de proteínas ensayadas con histona H<sub>1</sub> bajo condiciones comparables.

Estas quinatas son: la quinasa C, la quinasa dependiente de AMPc y la quinasa dependiente de GMPc.

Tabla 1\*

Distribución por tejidos de quinasas de proteínas C, dependiente de AMPc y dependiente de GMPc

<u>Tejido</u>	<u>quinasa C</u>	<u>AMPc</u> <u>dependiente</u>	<u>GMPc</u> <u>dependiente</u>
Plaquetas	6300	340	--
Cerebro	3270	250	6
Linfocitos	1060	320	<1
Pulmón	360	290	13
Riñón	280	150	--
Hígado	180	130	2
Adipocitos	170	270	2
Corazón	110	230	7
Músculo esquelético	80	110	--

Se utilizaron tejidos de rata, menos en el caso de plaquetas y linfocitos que son de origen humano. Cada tejido se homogeneizó con 10 volúmenes de Tris-ClH (PH=7.5) 20mM, conteniendo sacarosa 0.25 M, EDTA 2 mM, EGTA 10 mM. El homogenato se centrifugó a 100.000 g por 60 minutos, y las actividades de quinasa C, quinasa dependiente de AMPc y quinasa dependiente de GMPc se determinaron en el sobrenadante. Una unidad de quinasa de proteínas se define como la cantidad de enzima que incorpora 1 pmol de fosfato del ATP en histona H<sub>1</sub> por minuto. Los valores son unidades/mg proteína.

\* Tomado de "Calcium and phospholipid turn over in a new receptor function for protein phosphorylation", en Rosen y Krebs, Protein phosphorylation, pag. 246, New York Academic, press 1982.

f.- La quinasa de la ATP citrato liasa y el efecto insulina

La fosforilación de la ATP citrato liasa es muy compleja e involucra fosforilaciones múltiples reguladas por factores hormonales y nutricionales (48) (49) (50).

La insulina y el glucagón afectan la fosforilación de la enzima en células adiposas y hepatocitos. Por otra parte la insulina aumenta la actividad enzimática incrementando la síntesis de enzima, mientras el glucagón disminuye la actividad sin modificar la síntesis o la degradación (51).

Estos datos sugieren que las hormonas actúan diferencialmente sobre la liasa y esto es consistente con mecanismos de fosforilación mediados por quinasas dependientes e independientes de nucleótidos.

La fosforilación de la liasa, por subunidad catalítica de la quinasa dependiente de AMPc, se demostró en glándula mamaria de rata (52).

Por otra parte en hígado se describió una quinasa independiente de nucleótidos, específica para la liasa, y con un sitio de fosforilación característico (50).

Como la insulina aumenta la fosforilación "in vivo" (53) (50), la ATP citrato liasa pasa a ocupar un lugar de privilegio dentro del conjunto de sustratos que se fosforilan por acción hormonal.

g.- Otra forma de regulación: los inhibidores proteicos de las quinasas .

El inhibidor de quinasas de proteínas más conocido fue descrito por Appleman et al (54) y por Walsh et al (55), a partir de músculo esquelético de conejo, habiéndose purificado a homogeneidad (56), siendo su peso molecular de 11.300.

El inhibidor se une a la subunidad catalítica de la quina nasa dependiente de AMPc, y es competitivo respecto a los sus tratos proteicos (56).

Si bien la función del inhibidor no ha sido aclarada aún, se han comunicado resultados que indican que su concentración varía en distintas condiciones fisiológicas. Por ejemplo, en la estimulación por suero de células CHO ayunadas, la activi dad específica de las quinasas cae en las 2 primeras horas a un valor que es la mitad del inicial, mientras que la concen tración de inhibidor aumenta al doble (Costa, 1977).

Como se ha expresado anteriormente, la inhibición sólo se verifica en enzimas dependientes de AMPc, a diferencia del mo dulador descrito por Szmigielski et al. (57). Estos autores, trabajando con preparaciones de cerebro, descubrieron la presencia de otro inhibidor capaz de abolir la actividad, no sólo de quinasas dependientes de nucleótidos (AMPc y GMPc), sino también de las independientes.

Finalmente en testículo de rata, Beale et al. (58) describieron una familia de inhibidores de fosforilación, conteniendo cuatro formas proteicas principales, con la más abundante ubicada en células de Sertoli con peso molecular de 19.000.

Por otro lado esta proteína probó ser inhibidora de la fos fodiesterasa dependiente de calmodulina presente en las mismas células. La síntesis del inhibidor está sujeta a control hormonal por FSH y la relación quinasa/inhibidor varía dramá ticamente durante el desarrollo testicular.

## 2- MODIFICACIONES COVALENTES DE TIROSINA

### a- Transformación viral y metabolismo celular normal

El virus de Rous (RSV) contiene un gen, Src, el cual es res ponsable de la capacidad transformante (59).

La expresión del gen se requiere para la iniciación y el mantenimiento de la transformación. El producto del gen src es una fosfoproteína de peso molecular 60.000 (pp60<sup>src</sup>) (60). (61) (62) (63), que contiene una fosfoserina y una fosfotirosina (64) (65).

Existen muchas evidencias que indican que la pp60<sup>src</sup> funciona como una quinasa: luego de extensiva purificación conserva la actividad quinasa de proteínas (66); esta actividad es termolábil cuando la pp60<sup>src</sup> se obtiene de mutantes de RSV que son sensibles a la temperatura; finalmente la pp60<sup>src</sup> sintetizada "in vitro", a partir de un ARNm viral también posee la actividad quinasa (67) (68).

La especificidad de sustrato de esta quinasa es muy original pues fosforila el aminoácido tirosina (65), tanto "in vitro" como en células transformadas por RSV, donde el nivel de fosfotirosina es diez veces mayor que en la célula normal (70).

El contenido aumentado de fosfotirosina refleja claramente la presencia de pp60<sup>src</sup>. Sin embargo el aumento de fosfotirosina no es una inevitable consecuencia de la transformación, puesto que si se transforman células con otros virus tumorales, o por agentes químicos, el contenido del aminoácido fosforilado, es el característico de las células normales (70).

En resumen la fosforilación de una o varias proteínas en residuos de tirosina por la pp60<sup>src</sup>, desempeña un papel primario en el proceso de transformación celular por el virus del sarcoma de Rous.

#### Presencia de fosfotirosina en proteínas de la célula normal

La fosfotirosina se encuentra también en la célula normal. La relación fosfotirosina a fosfoserina + fosfotreonina, es aproximadamente 1/3000.



La presencia de fosfotirosina en la célula normal, indica que debe existir alguna enzima capaz de transferir fosfato a tirosinas.

En este sentido, se ha identificado y purificado una quinasa de proteínas llamada pp60<sup>sarc</sup>, cuyo peso molecular es de 60.000, y cuyo origen es un gen celular llamado sarc (71) (72) (73). Este gen celular es homólogo con el src y se presume que el virus RSV proviene del virus de la leucosis aviaría (ALV), que a su vez habría adquirido la región sarc en una célula normal (74).

El gen sarc se ha conservado a través de la evolución (74) y la pp60<sup>sarc</sup> se ha encontrado en una amplia gama de tipos celulares de vertebrados (73).

La proteína viral pp60<sup>src</sup> y la celular pp60<sup>sarc</sup> son similares pero no idénticas en su estructura (70) (71) (72) (75).

Se ha demostrado que la proteína viral se encuentra en las células transformadas en una concentración 50 veces mayor que su correspondiente quinasa endógena normal.

En cuanto a los sustratos de la quinasa viral, se conocen varias proteínas entre las cuales se destaca la vinculina, que es una proteína de peso molecular 130.000, cuya función es el anclaje de los filamentos de actina a la membrana celular.

Esta proteína al igual que la  $\alpha$  actinina se encuentra ubicada en las placas de adhesión focal, por medio de las cuales las células se unen al sustrato (76) (77).

Las placas son adyacentes a la membrana celular y contienen pp60<sup>src</sup> (73).

La vinculina presenta dos sitios de fosforilación para tirosina; uno de ellos no está fosforilado en células normales.

Podría postularse que la fosforilación del segundo sitio, inhibe la conexión de las fibras de actina a las placas de adhesión, lo cual sumado a una disminución en la producción

de fibronectina característica de las células transformadas, lleva a alteraciones en la forma y en la capacidad de fijarse al sustrato.

Otra proteína fosforilable por la quinasa  $pp60^{src}$  tiene un peso molecular de 36.000 (78), y es fosforilada "in vitro" por preparaciones de  $pp60^{src}$  y de  $pp60^{sarc}$ , en el mismo residuo de tirosina que es fosforilado "in vivo" (79).

#### Transformación por otros virus que codifican quinasas de tirosina

Además del RSV se conocen ahora varios virus oncogénicos que también codifican quinasas de proteínas capaces de fosforilar tirosina. Ellos son: el virus de la leucemia murina de Abelson (70) (80); las cepas de Snyder-Theilin (ST) y de Gardner-Arnstein (GA) del virus de sarcoma felino (81); el virus de sarcoma aviario PRCII (82); el virus de sarcoma de Fujinami (FSV) (83) (84) (85).

Todos estos virus al igual que RSV parecen derivarse de virus de leucemia por adquisición de secuencias celulares.

Las putativas proteínas transformantes de estos virus han sido aisladas y se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2

Virus (proteína transformante)	Homólogo celular
RSV	$pp60^{src}$
Ab-MuLV	$pp120$ NCP150*
ST-FeSV	$pp\ 85$ NCP92**
FSV	$pp140$
PRCII	$pp105$

\* (80)

\*\* Sólo el homólogo celular de ST-FeSV ha sido identificado (81).

En resumen puede decirse que  $pp60^{src}$ , y su homólogo celular  $pp60^{sarc}$ , son quinasas independientes de nucleótidos que

fosforilan exclusivamente tirosina al igual que las proteínas transformantes de FSV, PRCII, ST-FeSV y Ab-MuLV.

Las quinasas dependientes de AMPc fosforilan serina en forma predominante, mientras que las independientes pueden mostrar preferencia por serina o treonina.

Además de su independencia de los nucleótidos las quinasas transformantes utilizan Mn en lugar de Mg.

En cuanto a su localización, se ha demostrado que pp60<sup>src</sup> y pp120 están en parte asociadas a la membrana celular (73) (86)

b- El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF): Una quinasa de tirosina - Su relación con el producto del oncogen V-erb-B.

El factor de crecimiento epidérmico, se une específicamente a su receptor de membrana, e inicia y mantiene un complejo programa de respuestas bioquímicas y morfológicas, que llevan, a las células blanco de su acción, al crecimiento y la multiplicación (87), por determinar una transición G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> a S en el ciclo celular.

Luego de la unión del factor a su receptor se produce la internalización del complejo por medio de vesículas endocíticas.

Para comprender el mecanismo de la acción hormonal, se ha estudiado la fosforilación específica de proteínas de membrana celular en una línea de carcinoma de epidermis humana (A-431). Esta línea contiene entre 2 y 3 millones de receptores por célula, y cuando sus receptores son incubados en presencia de ATP y Mg o Mn, se fosforilan una serie de proteínas en forma específica.

La unión de EGF a los receptores estimula en esta línea celular, varias veces la incorporación de fósforo a las proteínas, en especial a dos glicoproteínas de peso molecu-

lar 170.000 y 150.000, que coinciden en peso molecular con el receptor de EGF (88).

Las preparaciones de membranas también fosforilan histonas en forma dependiente de EGF e independiente de AMPc y de GMPC, y la fosforilación se realiza sobre residuos de tirosina.

Además el receptor de EGF purificado a homogeneidad se autofosforila en tirosina.

La capacidad de fosforilar tirosinas en los correspondientes sustratos proteicos, ha sugerido la posibilidad de que el receptor de EGF presente una estructura similar a alguna proteína de transformación oncogénica.

En efecto, recientes evidencias indican que el receptor de EGF posee una gran homología con la secuencia deducida de la proteína transformante V-erb-B, del virus de la eritroblastosis aviaria (AEV) (89).

El producto del gen resulta ser una especie de "receptor truncado", cuya actividad biológica no requiere la unión de su ligando (EGF). Se ha sugerido que la proteína predicha en base a la secuencia, es similar a la región de transmembrana del receptor de EGF y a la porción citoplasmática del mismo.

La ausencia del sitio de unión de EGF podría sacar a la célula infectada por el virus, del control que ejerce el factor de crecimiento, teniendo como consecuencia la generación de una señal continua, equivalente a la que produce EGF, haciendo proliferar a las células rápidamente.

#### c- El receptor de insulina

Se ha demostrado que la insulina estimula la fosforilación de su propio receptor (90)(91). En células intactas esta fosforilación se verifica en múltiples sitios, sobre serina y tirosina.

La fosforilación ocurre también cuando el receptor es solubilizado pero sólo, sobre residuos de tirosina (92) (93).

El receptor purificado revela 3 bandas de pesos moleculares 135.000 ( $\alpha$ ), 95.000 ( $\beta$ ) y 52.000, siendo la banda intermedia, la que se fosforila cuando el receptor se incuba con ATP, en presencia de Mn (94).

Las preincubaciones con distintas concentraciones de insulina aumentan la incorporación de fosfato a la subunidad ( $\beta$ ) en forma dependiente de la concentración de hormona (94) y generan una actividad quinasa de proteínas independiente de insulina (95). La máxima activación ocurre entre 6 y 8 nM de hormona.

El receptor fosforilado une insulina en la misma forma que el no fosforilado y se ha postulado que el receptor modificado por fosforilación es la quinasa activada capaz de fosforilar histona.

En síntesis al unirse la insulina al receptor, éste se autofosforila; esta modificación produce un cambio conformacional tal, que el oligómero adquiere la capacidad de fosforilar sustratos exógenos. El tratamiento con fosfatasa alcalina produce nuevamente una actividad quinasa dependiente de insulina.

d- El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la proteína transformante p28<sup>sis</sup> del virus de sarco de simio (SSV).

Este factor es un polipéptido de peso molecular 30.000, que tiene la propiedad de ser el mayor promotor de crecimiento celular de tejido conectivo y de células de la glía.

La adición de PDGF a estas células produce cambios fenotípicos similares a los que induce el EGF (96) y los virus tumorales (97).

Estos cambios incluyen la aparición de zonas con invaginaciones en la superficie celular, cambios en el citoesqueleto, reducción de la adhesión celular y aumentada actividad mitótica.

Cuando se incuban membranas de fibroblastos o de células gliales con PDGF, se induce la fosforilación de residuos de tirosina, en dos proteínas de membrana cuyos pesos moleculares son 175.000 y 130.000 (98), proteínas éstas posiblemente relacionadas al receptor de PDGF.

Muchas células transformadas son capaces de crecer en medios libres de suero o con un porcentaje menor al habitual, demostrando una menor necesidad de factores de crecimiento (99) (100). Esta menor necesidad de factores es consecuencia, en algunas líneas celulares, de la capacidad de producir polipéptidos con actividad similar a la de los factores de crecimiento del tipo insulina (101) (102) o si no, factores de crecimiento tumorales (TGF) (103).

Estos factores no están estructuralmente relacionados con PDGF (104), aunque se ha visto que los  $\alpha$  TGF se unen al receptor de EGF y producen la expresión del fenotipo transformante.

Sin embargo se ha descrito un mitógeno estructural e inmunológicamente relacionado con PDGF, obtenido de células de osteosarcoma humano (U-2OS) (105).

Además el factor de crecimiento liberado por células BHK transformadas por SV-40, también tiene propiedades comunes con PDGF (106).

Finalmente se ha determinado la secuencia de aminoácidos de PDGF y en estudios realizados por computadora, se ha establecido que existe una región de identidad de 104 residuos entre este factor y la proteína transformante p28<sup>sis</sup> del virus de sarcoma de simio (SSV).

Si bien cinco de los aminoácidos de la secuencia de

PDGF no se encuentran en el producto viral, existe la posibilidad de que el virus haya reordenado parte de la secuencia.

Este descubrimiento implica que un gen oncogénico puede contribuir a la transformación celular por la producción de una sustancia que normalmente estimula el crecimiento.

#### e- Los factores transformantes y el receptor de EGF

De Larco y Todaro fueron los primeros en aislar un factor de crecimiento de medio de cultivo, condicionado por células infectadas por virus de sarcoma murino (MSV), e identificarlo como una señal autocrina de expresión neoplásica (103) (108).

Este factor de crecimiento interacciona con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), siendo parcialmente homólogo con él (104).

A partir de entonces, se han hallado factores de crecimiento transformantes en varias células neoplásicas y tejidos tumorales, (109) (110) y recientemente en muchos tejidos no neoplásicos (111).

Estos factores transformantes (TGF) han sido definidos como polipéptidos con actividad hormonal que estimulan: 1) la pérdida de la dependencia al anclaje; 2) la pérdida de la inhibición por contacto, y 3) la habilidad de las células de mamíferos de crecer en agar blando.

Los TGF han sido divididos en tres clases de acuerdo a actividad biológica sobre una gran variedad de células normales y tumorales.

- 1-  $\alpha$ -TGF que compiten con EGF por la unión a su receptor.
- 2-  $\beta$ -TGF que no son competitivos pero requieren la presencia de EGF o de  $\alpha$  TGF para actuar.

3-  $\gamma$  TGF que no compiten con EGF y no requieren otros factores para actuar.

Si bien no ha sido establecida en forma concluyente la relación entre los TGF y la fosforilación, este mecanismo apunta a ser el más indicado para lograr modificaciones fenotípicas como las que se han descrito.



### III- ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio Glickin caracterizó las quinasas de proteínas de *Neurospora crassa* y calculó sus parámetros moleculares e hidrodinámicos (112).

Trabajando con núcleos en fase exponencial temprana, obtuvo homogenatos que fueron centrifugados a 105.000g y dializados. Esa preparación se sometió a cromatografía de intercambio en DEAE celulosa.

La elución con un gradiente de ClNa dio lugar a la aparición de tres picos de quinasas de proteínas. El pico I eluyó a una concentración de sal de 0.19 M. Su actividad fue la única estimulada por AMPc que activó 5 veces.

El pico II eluyó a 0.32 M y tanto este pico como el I presentaron mayor actividad con histona H<sub>2</sub>A que con fosvitina. El pico III eluyó a 0.44 M y sólo resultó evidente en ensayos con fosvitina.

Existe un inhibidor de quinasas de proteínas: Los extractos dializados y calentados de *Neurospora* resultaron inhibidores de la actividad del pico I. El inhibidor fue purificado por cromatografía en DEAE celulosa de sobrenadantes de 100.000g, dializados y calentados a 100°C durante 3 minutos. En estas condiciones el inhibidor apareció en fracciones del percolado y del lavado.

Por otra parte el inhibidor también fue detectado en las fracciones calentadas de la columna de DEAE celulosa, pero de sobrenadantes de 100.000g no calentados. Dichas fracciones eluyeron a una concentración de 0.29 M de ClNa en el gradiente.

Tanto el inhibidor obtenido de la columna de DEAE celulosa del sobrenadante calentado (percolado), como el existente en fracciones calentadas de la cromatografía de un sobre

nadante no calentado, son dializables. Estos hechos se interpretaron asociando la actividad termoestable a alguna macromolécula termolábil de naturaleza probablemente proteica.

El efecto del calor entonces, desnaturalizaría la porción termolábil liberando el inhibidor termoestable que tendría mayor tamaño.

En cuanto a la especificidad de acción el inhibidor resultó más efectivo sobre la actividad del pico I que sobre el II y no tuvo efecto sobre el III. Como el inhibidor actúa aun en presencia de AMPc e inhibe el pico II, que no depende de nucleótidos, se postuló que este compuesto se uniría a la subunidad catalítica de la quinasa.

Activador termoestable de la quinasa del pico III: Si las fracciones provenientes de una columna de DEAE celulosa de un sobrenadante no calentado se trataban a 100°C durante 3 minutos, y luego se adicionaban a mezclas de ensayo de quinasa pico III, con fosvitina como sustrato, se observaba la existencia de un activador.

Similar resultado se obtuvo en columnas de sobrenadante calentado, donde se estableció la existencia del activador en la misma porción del gradiente (0.29 M).

La activación de la quinasa III por el factor termoestable sólo era visible cuando se utilizaba fosvitina como sustrato. El efecto se acrecentaba con la preincubación de la enzima y el sustrato con el factor.

Finalmente se detectó una actividad complejante de metales asociada al activador y se determinó que el Mg es requerido en forma específica para la manifestación del efecto activador.

#### IV- OBJETIVO DE ESTE TRABAJO

Teniendo en cuenta que las reacciones de fosforilación y defosforilación de proteínas, constituyen un proceso dinámico conectado sin duda, a la regulación de muchas funciones celulares como por ejemplo: la iniciación de la síntesis de proteínas, la transformación mediada por ciertos virus, la contracción del músculo y finalmente la actividad hormonal así como la acción de los factores de crecimiento, se planteó la búsqueda en un sistema de células eucariontes, de algún compuesto capaz de jugar un papel de modulador en la regulación del proceso de las modificaciones covalentes de proteínas por reacciones de fosforilación.

## V- MATERIALES Y METODOS

### 1- QUINASAS DE PROTEINAS DE CELULAS CHO-K<sub>1</sub>

#### a- Cultivo de células, preparación del homogenato celular y fraccionamiento subcelular.

Se utilizaron células CHO-K<sub>1</sub> (ATCC CCL 61), provenientes de un subclon tomado de una biopsia de un ovario de hamster chino por Puck (113). Las células se adaptaron al crecimiento en suspensión utilizando medio MEM Suspensión (Gibco) y suero fetal bovino al 10% (dializado e inactivado).

Los extractos celulares (sobrenadantes de 12.000RPM) fueron preparados homogeneizando, según las preparaciones entre  $10^8$  y  $2,5 \cdot 10^9$  células, tomadas en fase logarítmica, utilizando un homogeneizador Dounce. El buffer utilizado contenía Tris-ClH (PH=7.5), en una concentración 10 mM.

#### b- Cromatografía de quinasas de proteínas del citosol sobre DEAE celulosa.

El extracto celular se aplicó a una columna de DE-52 (Whatman), de 15cm x 1,5cm. La misma se eluyó con un gradiente salino de 0 a 0.3M de ClNa en Tris-ClH PH=7,5 10 mM. Se colectaron fracciones de 1 ml.

#### c- Ensayo de quinasas de proteínas

Las mezclas de reacción contenían 50mM Tris-ClH PH=7,5, 8mM ClMg, 10 uM ( $\gamma$ <sup>32</sup>P)ATP (200.000cpm/tubo), 10 uM AMPC e histona IIAS (Sigma) 2mg/ml, y cantidades variables de en

zima en un volumen final de 100 ul. Las mezclas se incuban a 30°C y a diferentes intervalos, 20 ul de dichas mezclas de reacción se pipetearon sobre papel Whatman 3MM (2cm x 2 cm). El papel de filtro se lavó una vez en ácido tricloroacético (TCA) al 10% y luego 2 veces en TCA 5%. Finalmente los papeles se lavaron con etanol y con éter etílico y se secaron. La radioactividad se determinó con una mezcla de tolueno omnifluor en un contador de centelleo líquido.

d- Metodología utilizada para detectar moduladores termoes-  
tales de las quinasas de proteínas.

Alícuotas de las fracciones de la columna de DEAE celulosa se calentaron por 3 minutos a 100°C. Luego de centrifugar a 3000 RPM, las alícuotas de los sobrenadantes se ensayaron en la mezcla de reacción.

2- QUINASA DE PROTEINAS DE CELULAS DE EMBRION DE POLLO-AIS-  
LAMIENTO Y PURIFICACION DEL MODULADOR TERMOESTABLE.

a- Obtención de carcasas de embrión de pollo, prepara-  
ción del homogenato celular y fraccionamiento subce-  
lular.

La preparación de las carcasas, se efectuó de acuerdo al procedimiento de Rubin (114). Los embriones de pollo de 9 días se extrajeron del huevo, se lavaron con solución de ClNa 0,15M y luego se separó la cabeza, las alas, las patas y órganos. Las carcasas se lavaron 3 veces con solución de ClNa 0,15M y luego se homogeneizaron en un buffer Tris-ClH PH=7,5 10mM (buffer A), con un equipo Omnimixer-Sorvall, a máxima velocidad por 2 minutos. El homogenato se centrifugó a 12.000 RPM por una hora. Se utilizaron en

tre 100 y 400 embriones por preparación.

b- Cromatografía en DEAE celulosa.

El sobrenadante de una preparación de 400 embriones se aplicó a una columna de DE-52 (20cm x 5cm), equilibrada con buffer A. A la fracción que se retuvo en la columna, se adicionó un volumen de lavado. Posteriormente la columna se eluyó con un gradiente lineal de ClNa de 0 a 0,5M (500 ml de cada uno). Se colectaron fracciones de 3,5 ml. Las proteínas se determinaron por el método de Lowry (115).

c- Ensayo de quinasas de proteínas de embrión de pollo.

El ensayo se realizó como en (116). El sistema de ensayo contuvo en un volumen final de 80 ul: Acetato de Mg 4mM, EGTA 0,25 mM, MES 25 mM PH= 6,9, Histona IIAS 4 mg/ml, ( $\gamma^{32}\text{P}$ ) ATP 10 uM (200.000cpm/ tubo) y AMPc 1,25 uM. En los ensayos se agregaron cantidades variables de enzima y de modulador.

d- Calentamiento a 100°C y precipitación etanólica.

Las fracciones activas detectadas como en 1-d, se juntaron y calentaron por 3 minutos a 100°C. Luego de centrifugar a  $\approx$  10.000RPM por 10 minutos, el sobrenadante se precipitó con 3 volúmenes de etanol a 0°C. Luego de centrifugar a 10.000RPM por 10 minutos, el sobrenadante se concentró a presión reducida a menos de 50°C hasta un volumen de 3 ml.

e- Cromatografía en geles.

El extracto anterior se cromatografió en una columna de

Biogel P<sub>4</sub> (200cm x 2,5), desarrollada con Acetato de Piridina 100mM PH=6,5. El volumen de las fracciones fue de 3,6 ml.

Alícuotas de 20 ul de cada fracción se hicieron reaccionar con fluorescamina según la técnica descrita en (117).

f- Cromatografías en papel y capa delgada de celulosa.

Las fracciones activas de la columna se concentraron individualmente en un rotavapor y se aplicaron a un papel Whatman 3MM. Se desarrolló una cromatografía descendente utilizando como solvente n-Butanol-Piridina-Acido Acético-Agua (15-10-3-12).

En el caso de los productos de reducción de 2 y 4 mercaptopirimidinas, el solvente utilizado fue n-Butanol-Acido Acético-Agua, (16-2,4-6).

Las cromatografías en capa delgada se realizaron usando como soporte placas de celulosa (Kodak), y como reveladores vapores de Iodo o solución de ninhidrina 0.1% en etanol (118).

3- ENSAYOS BIOLÓGICOS

a- Quinasa de proteínas de músculo de conejo.

La quinasa de proteínas se preparó como se describe en(116). Se ensayó la inhibición con cantidades variables de fracciones provenientes de las columnas (DEAE celulosa o Biogel), o con fracciones eluídas del papel luego de la cromatografía.

b- Actividad de adenosina trifosfatasa.

Los ensayos se realizaron según la técnica descrita en (119), utilizando membranas de eritrocito de pavo como fuente

te de enzima.

c- Actividad de fosfodiesterasa.

La enzima de cerebro bovino, se purificó y midió según la técnica descrita en (120), a una concentración de AMPc de 200 uM.

d- Ensayo del inhibidor de músculo esquelético de conejo.

El ensayo se realizó con inhibidor preparado según (121), utilizando un concentración final de 5 ug/ml.

e- Cultivo de células de tumor de mama humano - Curva de crecimiento.

La línea de tumor de mama humano T47D, se obtuvo del Dr. Keidar (Israel). Las células crecieron en medio RPMI 1640 (Gibco), que contenía 2 mM de L-glutamina, 100 u/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomycin y 10% de suero fetal bovino. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de aire/CO<sub>2</sub> (95%/5%). Los repiques se realizaron incubando las células por tres minutos con 0.0125% de tripsina, 0.5 mM EDTA y luego colectándolas en medio completo. La curva de crecimiento se realizó sembrando  $3 \times 10^4$  células en c/u de las 24 secciones de las placas de cultivo múltiples (Limbro), con 1 ml de medio RPMI 1640 completo. 24 horas después se agregó medio fresco y cantidades variables de fracción inhibitoria.

f- Ensayo de incorporación de <sup>32</sup>P - Gel de poliacrilamida - Autorradiografía



La marcación se realizó en placas de Petri de 35mm, en las cuales las células T47D se encontraban cercanas a confluencia. Luego de un ayuno de 30 horas, en medio RPMI1640 con 1 mg/ml de seroalbúmina bovina, las células fueron tratadas durante 24 horas con la fracción inhibitoria, con suero fetal o con ambos.

Posteriormente se lavaron con medio libre de fosfato y se incubó con 1 ml del mismo medio, en presencia de 150 uCi de  $^{32}\text{P}$  durante 45 minutos a 37°C. Finalmente se lavó con medio de fosfato salino (PBS), y las células se solubilizaron con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2% en fosfato monosódico 5 mM (150 ul por placa).

Una alícuota fue contada para expresar la entrada de fosfato a las células. Otra parte igual (50 ul), se precipitó con TCA al 10%. El precipitado se retuvo sobre filtros de fibra de vidrio (Millipore AP), y se lavó exhaustivamente con TCA 10%. Los filtros fueron secados y contados con tolueno - omnifluor. Los 50 ul restantes fueron calentados durante 3 minutos a 95°C, y se les agregó 30 ul de un buffer que contenía glicerol 200 ul, ditiotreitol 35 mg, azul de bromofenol 0,1 mg y agua 200 ul.

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de acrilamida al 11%, con 0,1% de SDS y gel separador de acrilamida al 5%. El tiempo de corrida fue de 16 horas a 15 mA. En la corrida se incluyeron los siguientes marcadores de peso molecular:  $\beta$  galactosidasa (120K), fibrinógeno (97K), albúmina (65K), ovoalbúmina (45K), tripsina (24K), miosina (18K), lisozima (14K). Los marcadores se tiñeron con Coomasie Brilliant Blue.

El gel fue fijado, secado y autorradiografiado a -70°C por 24 horas usando película Kodak X - Omat AR-5.

#### 4.- ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS - METODO DE OBTENCION DE DERIVADOS SILILADOS.

Los sitios de unión de AMPc y del compuesto inhibitorio a la quinasa de proteínas de tipo I, fueron estudiados por la fluorescencia intrínseca del triptofano, con un espectrofluorómetro SLM-AMINCO, conectado por una interfase a un computador Hewlett-Packard, según las técnicas descriptas por La Porte (122) y en (123).

Los espectros de absorción en el infrarrojo (IR), se realizaron en dispersión en Nujol con un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 710B.

Los espectros de absorción en el ultravioleta (U.V.), se realizaron en solución de metanol o de agua con un espectrofotómetro Beckman D K-2A.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN- $^1\text{H}$ ), se realizaron a 100 MHz con un espectrómetro Varian X-L-100-15. Los desplazamientos químicos se expresan en  $\delta$  (ppm), y las constantes de acoplamiento J en Hz.

La cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-EM) se realizó en un cromatógrafo Varian 1400, equipado con una columna de vidrio de 1,8 m de longitud y 2 mm de diámetro interno, que contenía como fase fija OV-17 3% sobre Chromosorb W-AW DMCS (80-100).

El cromatógrafo estaba acoplado a un espectrómetro de masa Varian-MAT-CH-7A y todo el sistema era comandado por una computadora Varian-MAT DATA SYSTEM 166.

Las cromatografías gas-líquido (CGL) fueron realizadas en un cromatógrafo gas-líquido Hewlett-Packard 5830 A, con detector de ionización de llama, con una columna rellena con la misma fase fija empleada en (CG-EM).

La temperatura del horno se varió a razón de 10°C/min en forma programada, en rangos de 60 a 290°C.

El método de sililación de las pirimidinas se describe en (124), con la diferencia que se usó BSTFA ( N,O, bis tri metil silil trifluoroacetamida), en lugar de BSA ( N,O, bis trimetil silil acetamida), análogo no fluorado del anterior.

## 5.- SINTESIS ORGANICA

### a.- Obtención de 4 mercaptopirimidina (II), a partir de 4 hidroxipirimidina (I) (125).

Una mezcla de 4 hidroxipirimidina (2g), y pentasulfuro de fósforo (4g), en piridina (28 ml), fue hervida a reflujo por una hora. Luego de enfriar, la mezcla se agrega sobre a gua (120 ml) y la solución se concentra hasta 30 ml, sobre un baño de agua. Al enfriarse se separa un sólido marrón amarillento, que es recristalizado de agua(carbón), dando 4 mercaptopirimidina, con un rendimiento del 50%.

UV: 291, 329 nm (en metanol).

IR: 1620,1440, 1280,1220,1180,1140,1000,840  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  8,25 (s,1H), 7,82 (d,1H) J=6Hz, 7,15 (d,1H) J=6Hz. (en dimetil sulfóxido)

### b.- Obtención de 2,4 dimercaptopirimidina (III), a partir de 2 mercapto 4 hidroxipirimidina (IV) (126)

2 mercapto 4 hidroxipirimidina (1,4g), se hirvió en xile~~n~~o (20ml), en presencia de pentasulfuro de fósforo (4.2g) a una temperatura de 157-160°C durante 8 horas. Se enfrió y removió el xileno por filtración. Se lavó la torta y se secó.El sólido se agregó en porciones a una mezcla de amoníaco/agua (3/10). Se llevó luego a 90°C y se agregó 0.3g de carbón. Se

filtró por Buchner con lecho de celite y a la solución caliente, se agregó suficiente ácido acético para llevar el PH hasta 7. En estas condiciones precipitó el ditiol. La suspensión se enfrió a 5°C, se filtró y se lavó con agua. Se recristalizó de agua con carbón. El rendimiento fue del 46%.

UV: 281, 352 nm.

IR: 1580, 1260, 1240, 1220, 1140, 1120  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  7,2 (d, 1H) J=6Hz, 6,5 (d, 1H) J=6Hz, (realizado en dimetil sulfóxido).

c.- Síntesis de 2-4 dimercapto 5-6 dihidropirimidina (V) a partir de 2-4 dihidroxi 5-6 dihidropirimidina.

La síntesis se realizó según (127), utilizando 2-4 dihidroxi 5-6 dihidropirimidina, en lugar de uracilo.

La dihidropirimidina (1g) se suspendió en tetralina (20ml); se agregó pentasulfuro de fósforo (3g), y se calentó durante 2 horas a 180°C. El producto de la reacción se extrajo con benceno y se cristalizó de benceno hexano con un rendimiento del 32%

UV: 225, 314 nm.

IR: 1610, 1320, 1240, 1160, 1080, 920, 810  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$ : 9,96 (s; ancho), 3,3 (t, 2H) J=6 Hz, 2.9 (t, 2H) J=6Hz (en dimetil sulfóxido).

d.- Preparación del catalizador de níquel-aluminio.

La preparación del catalizador de níquel-aluminio se realizó según la técnica de Brown (126), por tratamiento de una mezcla de níquel-aluminio (1-1), con solución de hidróxido de sodio.

e.- Reducción de 2 mercaptopirimidina (VII) y de 4 mercaptopirimidina. Separación cromatográfica.

La técnica utilizada fue una adaptación del método comunicado para la obtención de derivados reducidos del uracilo (128). La mercapto pirimidina (0,3g), se reflujo durante 6 horas con catalizador de níquel-aluminio (1,5g), utilizando etanol (50ml). Luego el catalizador se removió por filtración y el filtrado se llevó a sequedad. El producto se disolvió en 300  $\mu$ l de etanol y se aplicó sobre un papel Whatman 3MM de 10 x 40 cm y se desarrolló una cromatografía descendente en n-butanol-ácido acético-agua (16-2.4-6).

Los bordes del papel se revelaron con vapores de yodo y las zonas con material se eluyeron con metanol, se concentraron y se utilizaron para ensayos de actividad biológica y para cromatografía gaseosa-espectrometría de masa.

## VI- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1- CULTIVO DE CELULAS CHO-K<sub>1</sub>, BUSQUEDA DE MODULADORES

El primer sistema elegido para la búsqueda de factores moduladores, lo constituyó la línea celular CHO-K<sub>1</sub>.

Esta línea que crece en monocapa, fue adaptada para crecer en suspensión modificando el medio de cultivo. Para ello de una monocapa tratada con tripsina, se obtuvo un inóculo que fue utilizado en un medio para células que crecen en suspensión (medio libre de Ca y Mg). Un inóculo de  $10^5$  células se multiplicó 15 veces en 7 días a 37°C.

Teniendo a punto el sistema de producción de células, conociendo la correlación entre la activación de la quinasa de proteínas y la aparición de cambios morfológicos (128) (129), y sabiendo que más del 80% de la actividad quinasa de proteínas de células CHO estaba asociada al citosol (130), se eligió esta fracción para iniciar la búsqueda de factores.

La posibilidad de perder un factor citosólico dializable, se evitó aplicando a la columna de DE 52, un sobrenadante no dializado de 12000 RPM, como se describe en materiales y métodos. Se obtuvo un perfil de actividad quinasa de proteínas como el que se muestra en la figura 4 partiendo de  $10^8$  células. La elución con gradiente de ClNa dio lugar a la aparición de dos picos parcialmente resueltos, cuya actividad aumentaba en presencia de AMP cíclico.

Cuando se ensayaron alícuotas calentadas de todas las fracciones de la columna, en presencia de las fracciones con actividad quinasa de proteínas, no se observó ningún efecto modulador.

La ausencia de efecto podía deberse a dos razones: la pri

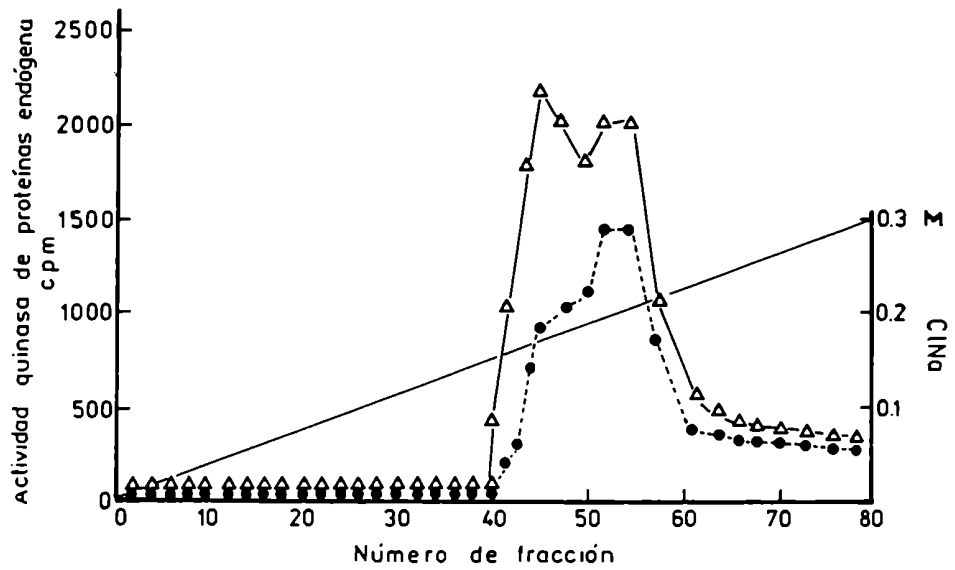


FIGURA 4. Cromatografía en DE-52 de un sobrenadante de 12.000 RPM, de células CHO-K<sub>1</sub>. Actividad quinasa de proteínas en presencia de AMPc (Δ), y en ausencia del mismo (●).

mera, que la cantidad de células utilizadas fuera insuficiente para aportar una concentración detectable de moduladores; la segunda, que el sistema no poseyera moduladores.

La primera posibilidad tenía como límite el número de células que podían cultivarse en el laboratorio. La segunda llevaba, de ser cierta a la necesidad de cambiar el sistema biológico.

Se prepararon homogenatos provenientes de cantidades variables de células, hasta el límite de  $2,5 \times 10^9$  células, no pudiendo detectar en las preparaciones la presencia de modulador alguno.

Se optó por cambiar el sistema biológico, debido a que por problemas de infraestructura no podía superarse la cantidad de  $3 \times 10^9$  células.

## 2- QUINASA DE PROTEINAS DE TEJIDO CONECTIVO DE EMBRION DE POLLO

Los cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo, se preparan habitualmente, utilizando la carcaza del embrión de 8 a 10 días de edad. En este estadio del desarrollo, la composición celular de la carcaza, está dominada por la presencia de células de la progenie fibroblástica.

El tratamiento con tripsina libera las células, las cuales se inoculan en un medio de cultivo adecuado, obteniéndose los llamados cultivos primarios de fibroblastos.

La disponibilidad de embriones de pollo, y la facilidad con la cual se obtienen las carcazas, nos decidió a trabajar con este sistema, que provee una cantidad elevada de fibroblastos, evitando la limitación de los cultivos de células.

Preparado el homogenato celular, y la columna de DE-52 como se describe en la sección experimental, pudo obtenerse



una primera descripción de este sistema, como puede observarse en la figura 5.

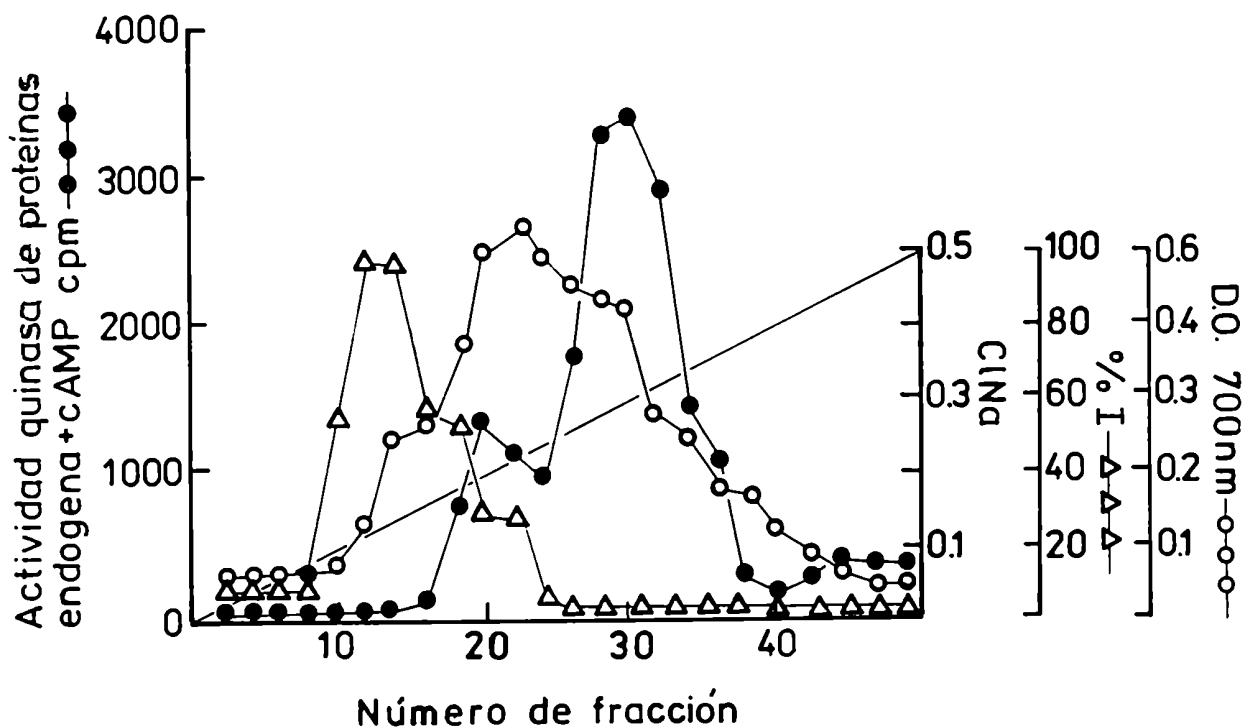


FIGURA 5. Cromatografía en DE-52 de un sobrenadante de 12000 RPM. Alícuotas de 30 ul. fueron calentadas por 3 minutos a 100°C, como se describe en materiales y métodos, y ensayadas en presencia de la actividad quinasa de proteínas endógena, para detectar la existencia de fracciones termoestables, con capacidad de modulador de la actividad enzimática.

Cuando se calentaron alícuotas de las fracciones obtenidas de la columna y se ensayaron en presencia de la actividad quinasa de proteínas endógena, pudo detectarse que la zona que eluye entre 0,15 y 0,20 M, posee una actividad altamente inhibitoria.

Esta actividad no sólo se presentó sobre la quinasa de proteínas endógena, sino también sobre las actividades fosforilantes de las quinasas de proteínas de músculo de conejo, tanto las de tipo I, como las de tipo II, en presencia o ausencia de AMPc.

Estos hallazgos impusieron la necesidad de desarrollar un esquema de purificación para dicho inhibidor.

### 3-AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL FACTOR TERMOESTABLE

Algunos de los métodos utilizados con más frecuencia para purificar compuestos termoestables, con características de reguladores metabólicos han sido: precipitación con ácido tricloroacético, como en el caso del inhibidor de quinasa de proteínas de Walsh (121), precipitación con ácido acético a PH=4 para el inhibidor de fosforilación de testículo de rata (132), y extracción con etanol ácido como en el caso de los factores de crecimiento transformantes (103).

Para purificar las fracciones activas, se utilizó etanol, que se llevó a una concentración final del 66%. En estas condiciones el grueso de las proteínas del extracto puede ser separado por centrifugación, quedando la actividad inhibitoria en el sobrenadante.

A esta altura de la purificación tomó cuerpo la idea de que el inhibidor no podía ser una proteína convencional, sino más bien un péptido pequeño, del tipo de los factores de crecimiento transformante (133).

Sin embargo si el homogenato de carcazas era extraído por

el procedimiento de Davoren (134), (método empleado para purificar glucagón, insulina, secretina y factores de crecimiento transformantes), no se obtenía ningún precipitado activo, luego de tratar con la mezcla de etanol-éter(2-4).

La posibilidad de tener en la mano un principio activo de bajo peso molecular, decidió la utilización de tamices moleculares del tipo Biogel P<sub>4</sub> o P<sub>2</sub>, que resuelven mezclas de compuestos pequeños.

Por otra parte, la sospecha de que se tratara de un péptido, llevó a la utilización de la fluorescamina, para realizar el relevamiento de las columnas.

Como los extractos etanólicos ocupaban un volumen considerable, fueron concentrados a presión reducida.

La columna de Biogel P<sub>4</sub>, se desarrolló con un buffer volátil, previendo la posterior concentración de las fracciones activas. La calibración se realizó con una mezcla de oligosacáridos radioactivos.

En la figura 6, puede observarse el perfil de una columna de Biogel P<sub>4</sub>: la máxima inhibición no coincidió con zonas con reacción significativa a la fluorescamina y reveló un peso molecular del orden del de la glucosa, o aún menor.

Alícuotas de las fracciones inhibitorias y no inhibitorias de dicha columna, fueron cromatografiadas en capa fina de celulosa, y reveladas con ninhidrina (figura 7). Pudo apreciarse que solamente las fracciones inhibitorias presentaban una mancha blanca contra el fondo violeta de la ninhidrina.

Repitiendo la cromatografía de las fracciones activas, se observó una buena correspondencia, entre el tamaño de la zona blanca y el grado de inhibición, como se muestra en la figura 8. Por otra parte la presencia de manchas con reacción positiva a la ninhidrina no pudo correlacionarse con ninguna actividad moduladora.

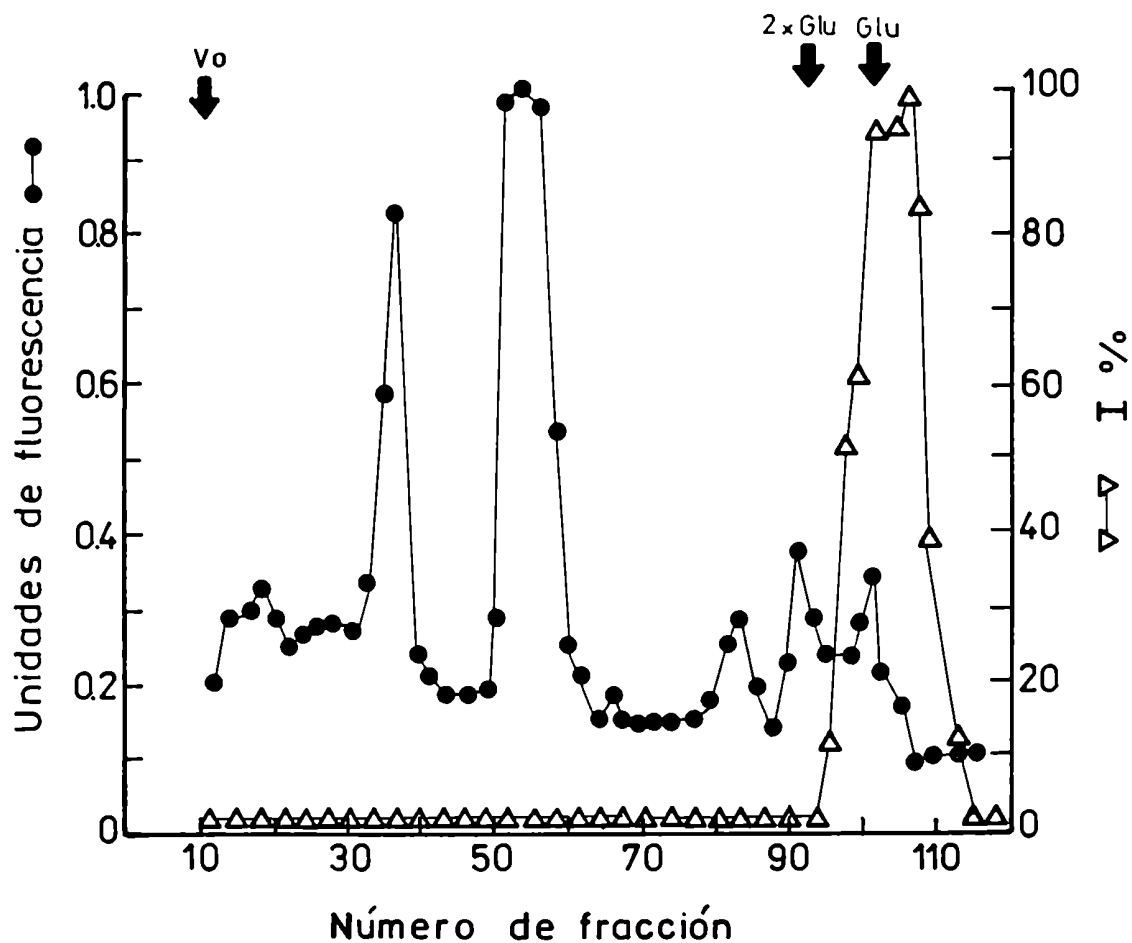


FIGURA 6:Cromatografía en Biogel P<sub>4</sub>, del extracto etanólico concentrado hasta un volumen de 3 ml. Las fracciones activas se detectaron ensayando 30 ul de c/u, en presencia de quina-  
sa de proteínas de tipo II.

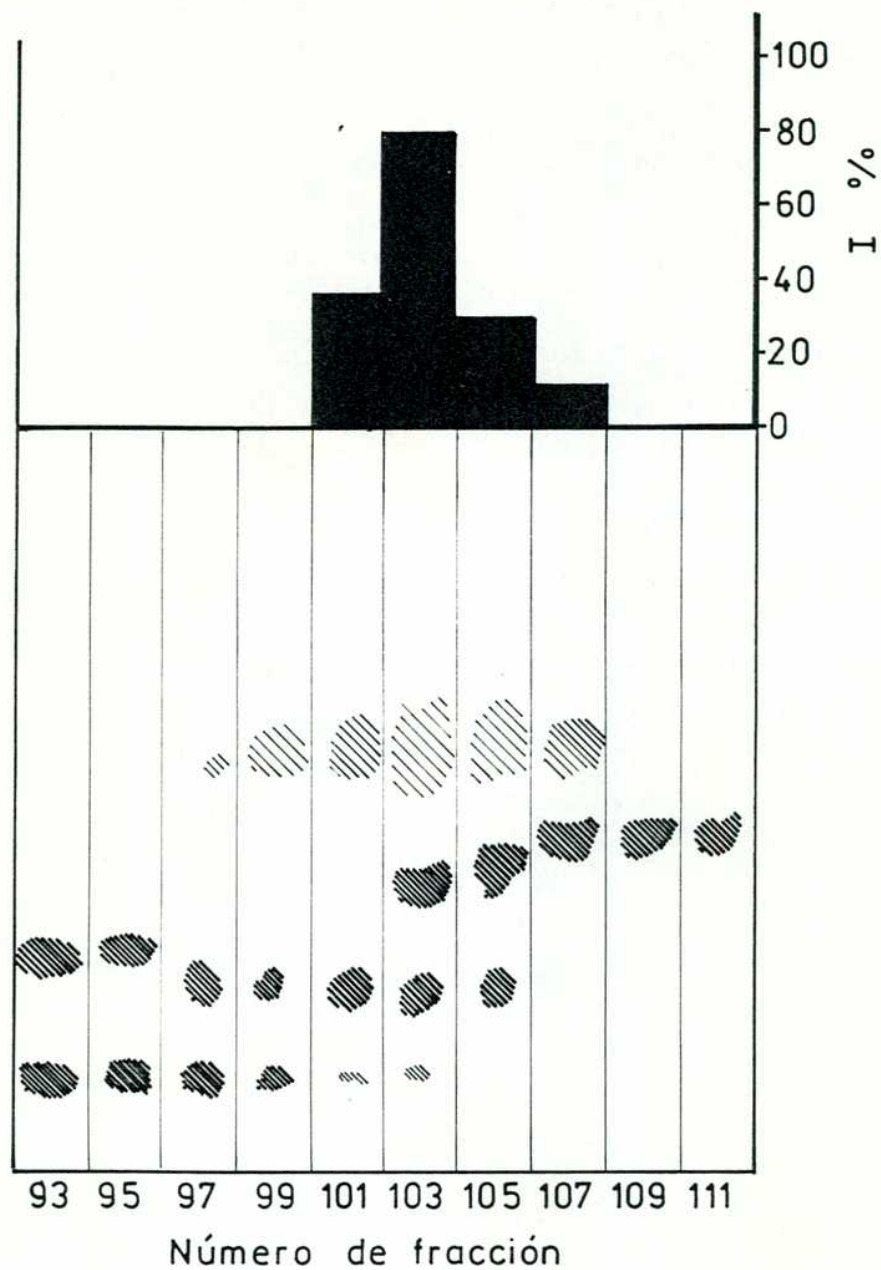


FIGURA 7: Análisis por cromatografía en capa fina de celulos, de las fracciones de la columna de Biogel P<sub>4</sub>. Se estudiaron inicialmente las fracciones activas y las adyacentes a las mismas. Se utilizó ninhidrina como revelador. Las condiciones de la cromatografía se describen en materiales y métodos.

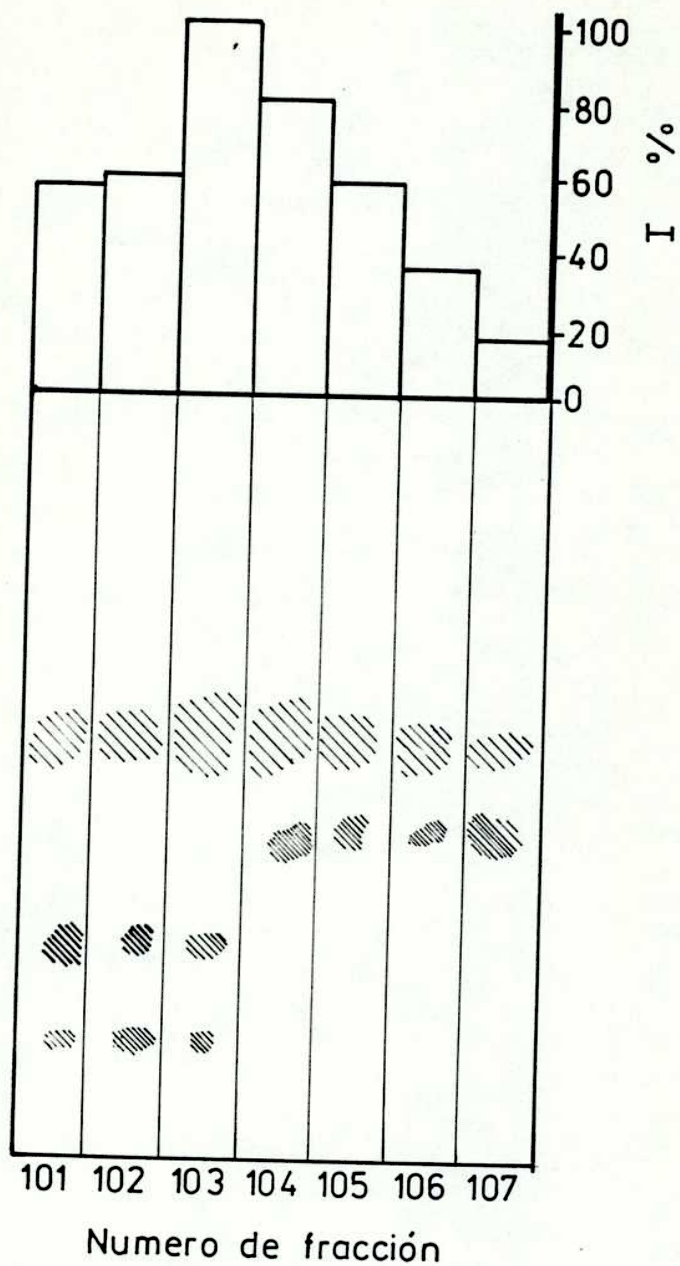


FIGURA 8: Análisis de las fracciones activas de la columna de Biogel P<sub>4</sub>. Se utilizó la misma metodología que en el experimento descrito en la figura 7.

La posible naturaleza peptídica del compuesto no podía aún ser descartada pues, es bien conocido el efecto de adsorción que presentan los pequeños péptidos tanto sobre las matrices de Sepharosa, como sobre las matrices de acrilamida (135), lo cual en una columna de Biogel puede determinar un volumen de elución mayor al teóricamente esperado, pues la muestra sale retrasada.

Para tener una idea exacta del compuesto era entonces necesario continuar con su purificación. Por ello se procedió a la cromatografía de las fracciones inhibitorias obtenidas de la columna de Biogel, en papel de filtro Whatman 3MM, utilizándose como solvente de corrida el mismo que se había usado para desarrollar la cromatografía en capa fina de celulosa, es decir n butanol-piridina-ácido acético-agua (15-10-3-12).

Luego de revelar con ninhidrina, se observaron 2 manchas coloreadas y una mancha blanquecina. Eluídas todas con agua, se observó que la mancha clara poseía un fuerte efecto inhibitorio sobre la fosforilación, cuando se medía en el ensayo estandar.

Una parte de este material se utilizó para los análisis biológicos y el resto para realizar los estudios estructurales.

De la banda que presentaba actividad biológica, se realizó un espectro en agua observándose un máximo de absorbancia a 256 nm, como puede verse en la figura 9.

Este máximo podía indicar la presencia de algún nucleótido o base, y teniendo en cuenta que los nucleótidos presentan valores de coeficientes de absorbancia que van de 10 a  $15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , se tomaron estos valores como posibles coeficientes, y en base a ellos se calculó la concentración de la solución.

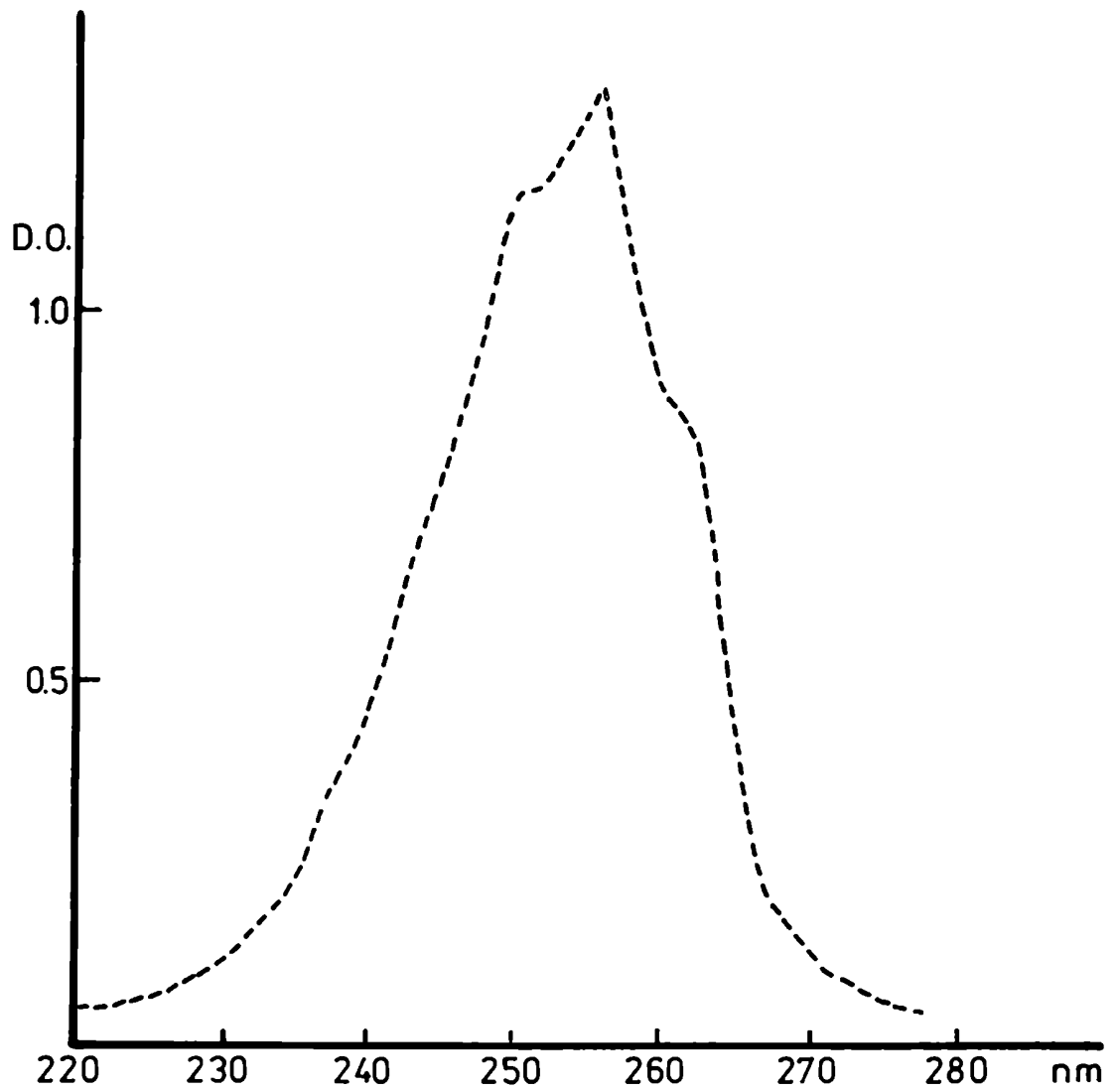


FIGURA 9. Espectro de absorción en agua de la fracción biológicamente activa eluída de papel Whatman 3 MM.



#### 4- ALGUNOS SISTEMAS BIOLÓGICOS Y SU MODULACIÓN POR EL INHIBIDOR TERMOESTABLE.

##### a- Cinética de la quinasa de proteínas de tipo II, de músculo de conejo.

Se realizaron curvas de tiempo, para distintas concentraciones de ATP, utilizando dos cantidades de inhibidor. Una de éstas se muestra en la figura 10.

Por otra parte el gráfico de inversas (Lineweaver Burke), mostró que el compuesto se comportaba como un inhibidor competitivo, con un valor de  $K_I$  del orden de  $10^{-4}M$ , como se ve en la figura 11.

Una inhibición del tipo competitivo puede indicar que el compuesto reconoce en la enzima, el mismo sitio que el sustrato, en este caso el ATP. Puesto que existe una gran variedad de enzimas que tienen como sustrato al ATP, se decidió estudiar el efecto del factor, en otro sistema enzimático.

##### b- Curva de tiempo de la adenosina trifosfatasa de eritrocito de pavo.

El transporte activo de Na y de K. en los eritrocitos, está acoplado al sistema de adenosina trifosfatasa (ATPasa), dependiente de Mg. Se realizó una curva de tiempo, en presencia o ausencia de la fracción inhibitoria, con el resultado que se muestra en la figura 12.

La concentración final en el ensayo fue del orden de  $1mM$  para el inhibidor, y  $0,2mM$  para el ATP. En estas condiciones se observó una inhibición de un 30%, que resultó menor que la observada en las quinasas de proteínas a concentraciones similares del compuesto.

Ensayos realizados ulteriormente, revelaron un  $K_I$  del orden de  $10^{-4}M$ , con un comportamiento de inhibidor competitivo,

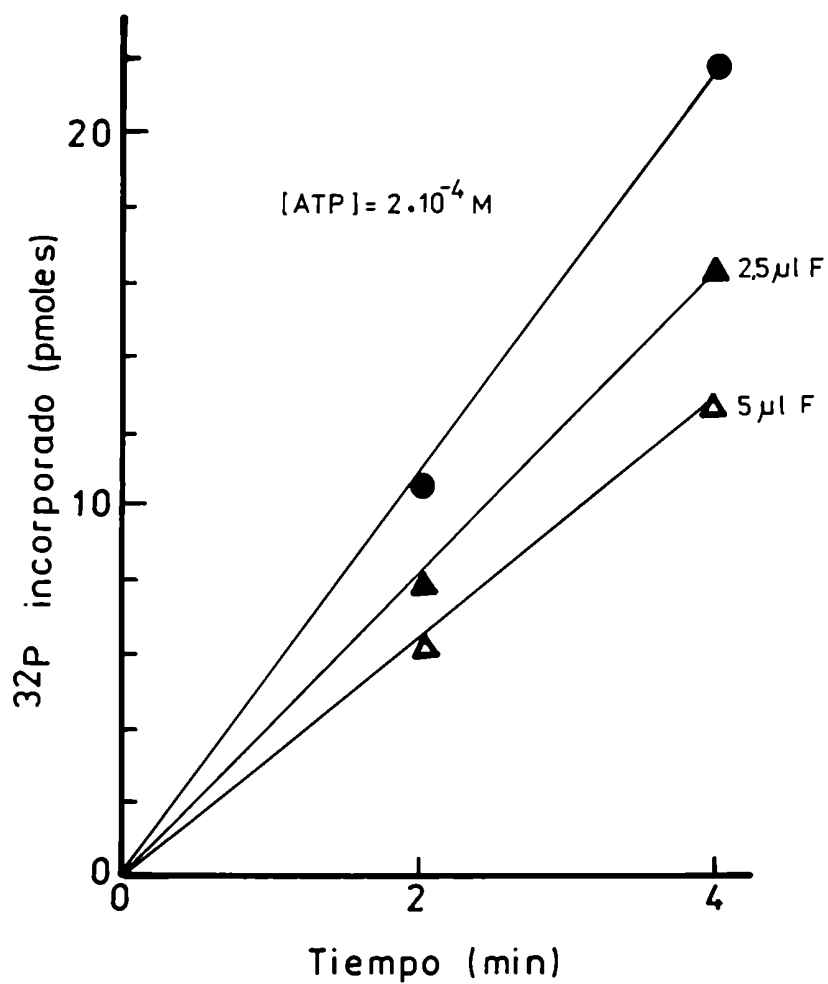


FIGURA 10. Curvas de tiempo de ensayo para la actividad quinasa de proteínas del tipo II de músculo de conejo en presencia de AMPc.

Sin adiciones (●). En presencia de dos cantidades de inhibidor (F) (▲ △).

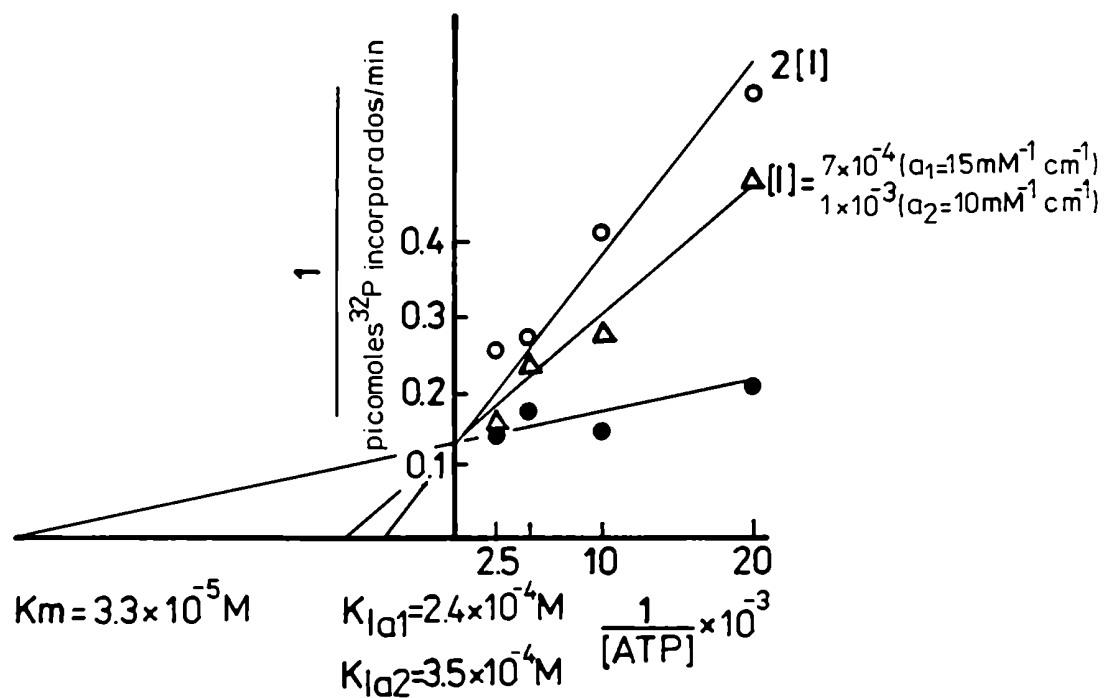


FIGURA 11: Gráfico de inversas (Lineweaver-Burke), de quinasa de proteínas de tipo II, en presencia de AMPc. Se ensayó la enzima sola, y en presencia de dos concentraciones estimadas de inhibidor, (suponiendo que los valores posibles del coeficiente de extinción sean  $a_1$  o  $a_2$ )

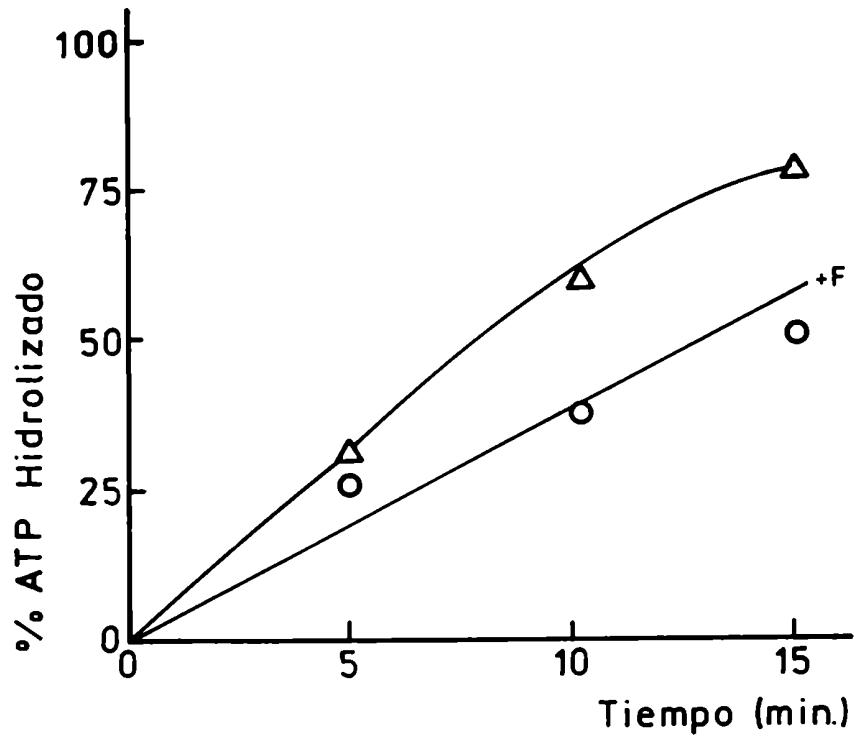


FIGURA 12: Curva de tiempo de Adenosina Trifosfatasa de eritrocito de pavo, en ausencia  $-\Delta-\Delta-$ , o en presencia de inhibidor (F)  $-o-o-$ . El compuesto se encontraba a una concentración aproximada de 1mM, y el ATP a 0,2mM.

(J.P. Rossi, comunicación personal). Finalmente, ensayos realizados con la enzima adenilil ciclasa de *Neurospora crassa* revelaron coincidencia en la inhibición de la fracción ensayada (M.M. Flawiá).

Estos datos sugerían que el compuesto inhibitorio podría ser un análogo del ATP.

c- La fosfodiesterasa de cerebro bovino en presencia de la fracción inhibitoria.

Cuando se mide el efecto sobre la fosfodiesterasa de cerebro bovino, dependiente de calmodulina, se observa que la inhibición tiene lugar afectando los valores de actividad basal, como los valores de la enzima estimulada. Estos resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Inhibidor (mM)	Actividad basal*	Actividad+CM*
3,4	0,048	0,380
1,7	0,060	0,400
0,7	0,090	0,580
0,4	0,160	0,660
0,2	0,200	0,750
0	0,200	0,820

\*

Actividad en nmoles de AMPc hidrolizado por minuto.

Es importante destacar, que a bajas concentraciones de inhibidor no se ve efecto sobre los valores basales, pero sí sobre los valores de la enzima activada por CM.

Estos datos sugerían que esta fracción inhibitoria era capaz de reconocer el sitio de unión del AMPc a la fosfodiesterasa.

d- Comparación con el inhibidor de músculo de conejo.

? | La caracterización del inhibidor aislado de músculo de conejo, indica que éste es un inhibidor de tipo no competitivo, y que actúa previniendo la liberación de subunidad catalítica de la holoenzima por efecto del AMPc (136).

Se analizó el comportamiento de la quinasa de proteínas de tipo II, en presencia de AMPc y de ambos inhibidores (músculo y embrión de pollo). Las curvas de tiempo se muestran en la figura 13.

Los efectos de ambos inhibidores no son aditivos, por el contrario puede especularse sobre la existencia de una interacción entre ambos inhibidores. Este efecto sustraería factor embrionario del medio de reacción, por unión al inhibidor de músculo de conejo.

e- Efectos moduladores sobre la multiplicación celular y la fosforilación de proteínas "in vivo".

Existe un interés muy grande en la actualidad, por encontrar principios activos nuevos, tanto de origen sintético como de origen natural, que puedan regular el crecimiento de células transformadas.

Se estudió el efecto de la fracción inhibitoria, sobre la línea celular de tumor de mama humano, T47D, con la intención de ver alteraciones sobre la velocidad de crecimiento de las células y sobre el perfil de la fosforilación de sus proteínas.

La curva de crecimiento se muestra en la figura 14. En la misma se observa que según las concentraciones ensayadas, el inhibidor es capaz de detener el crecimiento celular e inclusive de alterar los fenómenos de adhesión celular, (a la

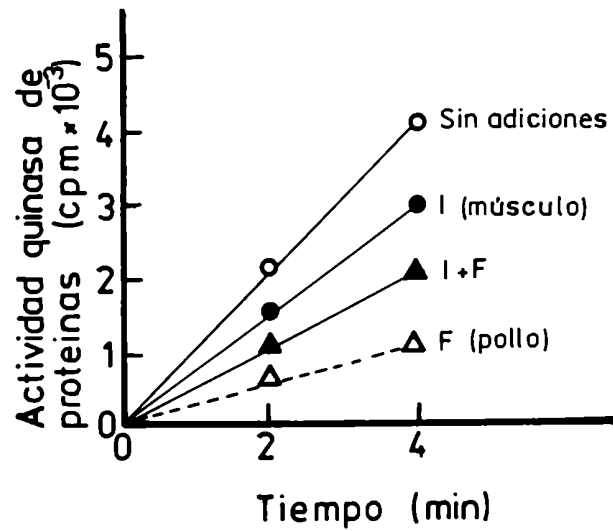


FIGURA 13. Curvas de tiempo de quinasa de proteínas de tipo II en presencia de AMPc. La concentración final de inhibidor de músculo esquelético fue de 5 ug/ml.

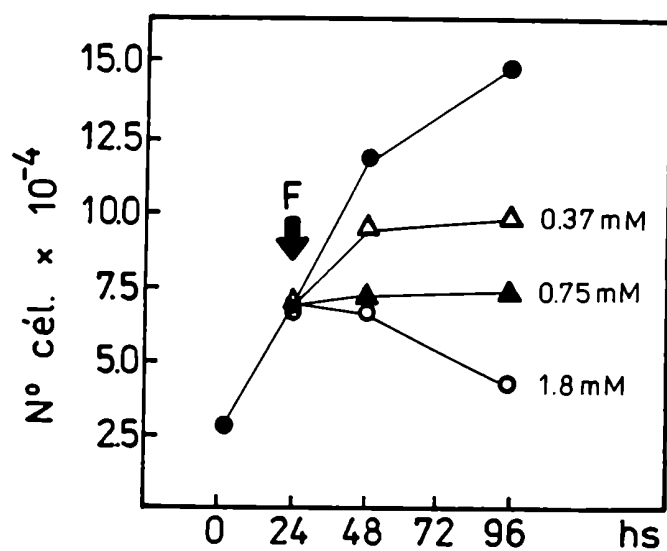


FIGURA 14: Efecto citostático de la fracción inhibitoria, sobre la línea celular de carcinoma de mama humano T47D. La curva de crecimiento se realizó como se describe en materiales y métodos.



más alta concentración).

Estos resultados indicaron que la fracción inhibitoria era capaz de regular el crecimiento celular, y por lo tanto se decidió investigar la correlación de la fosforilación de proteínas con este fenómeno.

La pregunta fue entonces si este modulador actuaría en forma diferencial sobre la fosforilación de proteínas, o en una forma más general.

Se realizó el ensayo de incorporación de  $^{32}\text{P}$  total a las células, como se indica en materiales y métodos, y en la figura 15, sorprendentemente puede observarse el aumento de aproximadamente un 30%, en la incorporación que produce la asociación del efecto del suero fetal con el factor, sobre el efecto del suero fetal.

La mayor incorporación por efecto del factor sólo es posible en presencia de suero.

Cuando se investigó cuál era la radioactividad asociada a material macromolecular precipitable por TCA, (figura 16) se vio que el factor en presencia de suero, produce una elevación de los niveles de incorporación de fosfato.

Para estudiar si este aumento, podía estar a nivel de proteínas específicas, el lisado de células fue sometido a una electroforesis en gel de poliacrilamida.

Este gel mostró (figura 17), que selectivamente proteínas de peso molecular 56,44 y 27K, eran fosforiladas por efecto del modulador.

Si bien el significado de estos resultados no está bien comprendido, podría pensarse que estas tres proteínas o alguna de ellas en particular, participa, por mecanismos de fosforilación-defosforilación, en la determinación de los efectos del compuesto a nivel de la multiplicación celular.

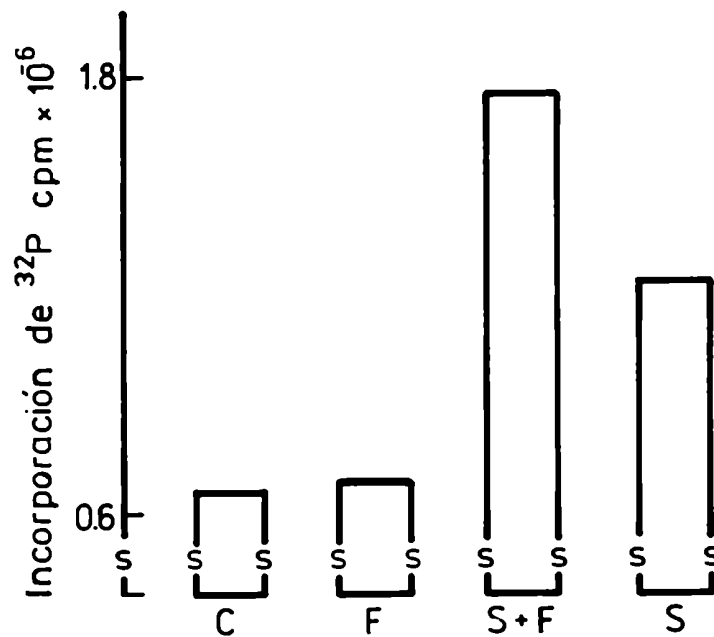


FIGURA 15. Incorporación de <sup>32</sup>P a células T47D.

C= control (el medio de cultivo contenía únicamente 1 mg/ml de seroalbúmina bovina).

F= fracción inhibitoria (la concentración aproximada fue de 0,5 mM).

S= suero fetal bovino al 10%.

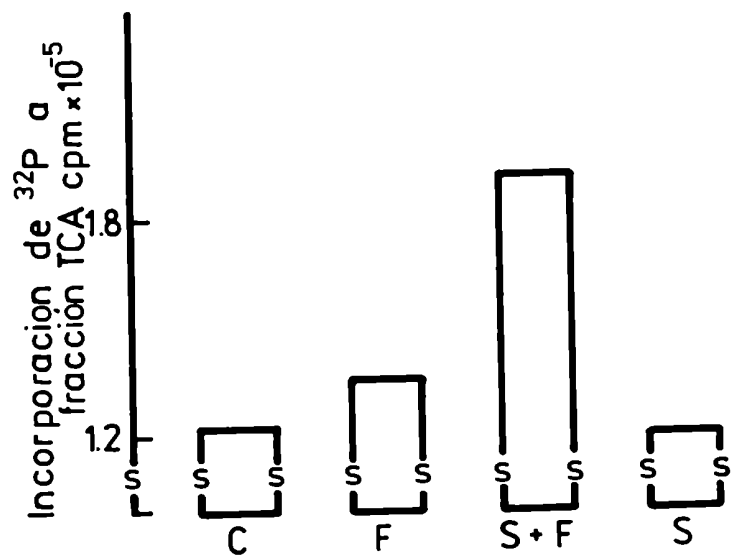


FIGURA 16. Incorporación de radioactividad asociada a material precipitable por TCA. Las concentraciones son las que se describieron en la figura anterior.

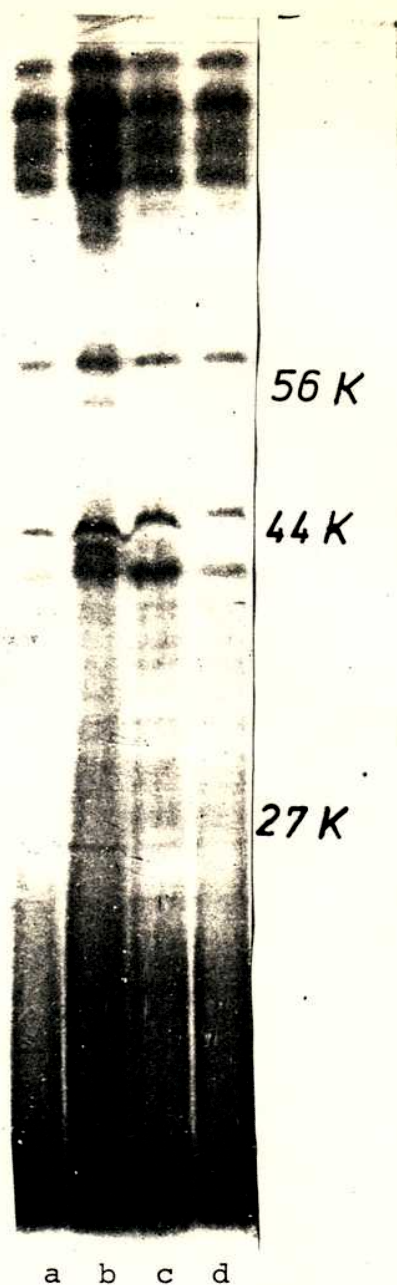


FIGURA 17. Gel de poliacrilamida al 11% del lisado de células T47D.

a: las células fueron tratadas con la fracción inhibitoria (0,5 mM).

b: las células fueron tratadas con la fracción inhibitoria y 10% de suero.

c: las células sólo fueron tratadas con suero.

d: el medio contenía 1 mg/ml de seroalbúmina bovina.

f- Estudios espectroscópicos de los sitios de unión del AMPc y de la fracción inhibitoria a la quinasa de proteínas de tipo I

La subunidad regulatoria (R) de la quinasa de proteínas de tipo I, de músculo esquelético, contiene dos moles de triptofano por mol de monómero (137).

La figura 18, muestra la titulación de R, con AMPc monitoreada por cambios en la fluorescencia de los triptofanos endógenos. Se observó una relación lineal entre los cambios de fluorescencia y la concentración de AMPc.

El experimento fue hecho a una concentración aproximada de R de 0,4  $\mu$ M, en buffer citrato a PH=5. En estas condiciones aparentemente se detectan cambios a nivel de un sólo sitio de unión.

Por otra parte, la fracción inhibitoria, produce un gráfico con dos componentes, que podrían reflejar la existencia de dos clases separadas de sitios de unión.

Numerosas proteínas en las cuales se producen cambios conformacionales presentan, cambios en la fluorescencia de los triptofanos (138). Además se conocen evidencias sobre la existencia de dos clases de sitios de unión de nucleótidos cíclicos, en subunidad regulatoria, de quinasas de proteínas de tipo II.

Es entonces posible postular, que en la subunidad R<sub>I</sub> existen dos sitios de unión para el factor, si bien sería necesario confirmar esta hipótesis con experimentos complementarios, mediante la utilización de ligando marcado.

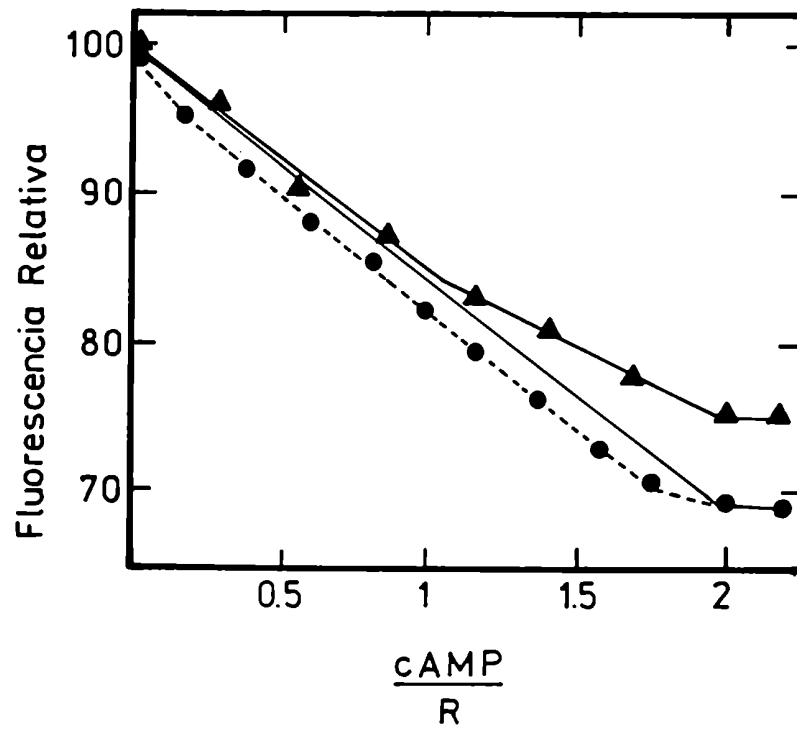


FIGURA 18. Titulación de la subunidad regulatoria  $R_I$ , con AMPC (●) y con la fracción inhibitoria (▲). Se ha trazado la curva teórica para el AMPC, que une el 100% con el 70 % .

##### 5- CROMATOGRAFIA GASEOSA+ESPECTROMETRIA DE MASA DE LA FRACCION INHIBITORIA.

La combinación de las técnicas de cromatografía gaseosa con espectrometría de masa (CG-EM), ha tenido un considerable impacto en el análisis de muestras biológicas, posibilitando la caracterización de sus componentes con la necesaria sensibilidad y exactitud.

La técnica sólo tiene la limitación de aplicarse a compuestos de pequeña masa, los cuales deben ser volátiles.

Esta metodología se presentó como la más adecuada para analizar, las muestras con actividad biológica obtenidas, luego de la cromatografía en papel.

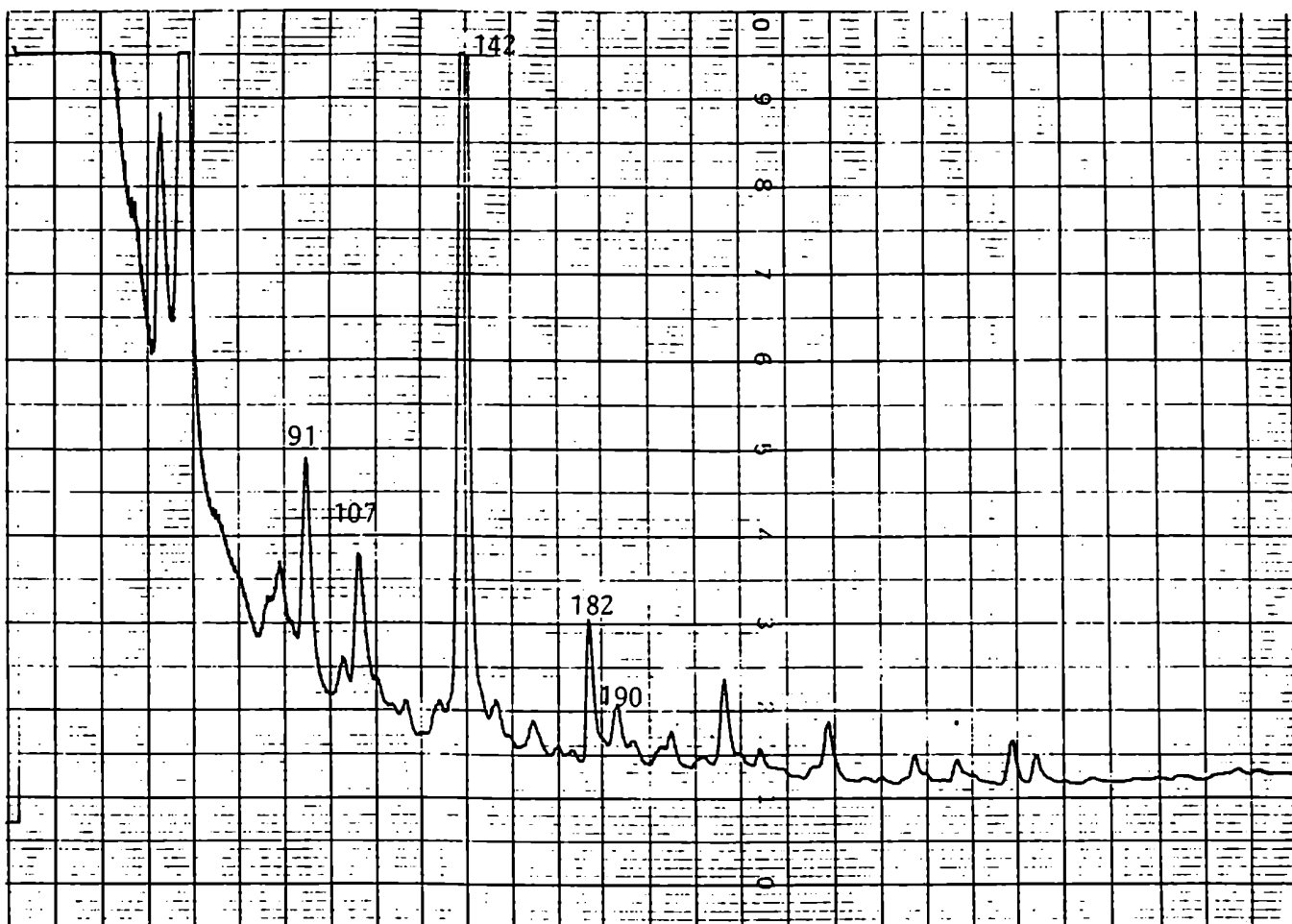
Las muestras se eluyeron con agua, el extracto acuoso fue llevado a sequedad por liofilización, completándose la deshidratación en desecador al vacío sobre  $P_2O_5$ .

El residuo fue sililado por tratamiento con N,O, bis trimetil silil trifluoroacetamida (BSTFA), conteniendo 1% de tetrametil clorosilano (TMCS), en un vial cerrado, mantenido a  $100^{\circ}C$ , durante 60 minutos, según la técnica descrita en (124).

El producto sililado fue analizado por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa, en las condiciones indicadas en la sección experimental.

El cromatograma por corriente iónica total, se muestra en la figura 19. Se observan aproximadamente 20 señales, de las cuales una es mayoritaria, acompañada de otras 5 de regular intensidad.

Las figuras 20, 21, 22, 23 y 24 presentan el registro potenciométrico por acumulación sucesiva de espectros de masa, de los picos 91, 107, 142, 182 y 190.

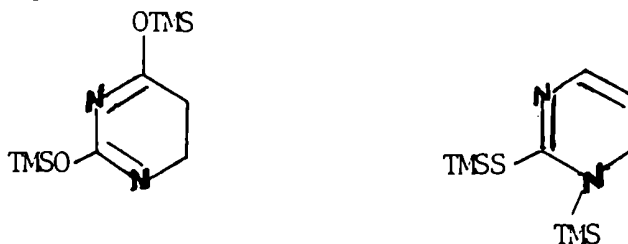


**FIGURA 19.** Cromatograma por corriente iónica total, del producto proveniente de la cromatografía en papel. El método de sililación se describe en materiales y métodos.

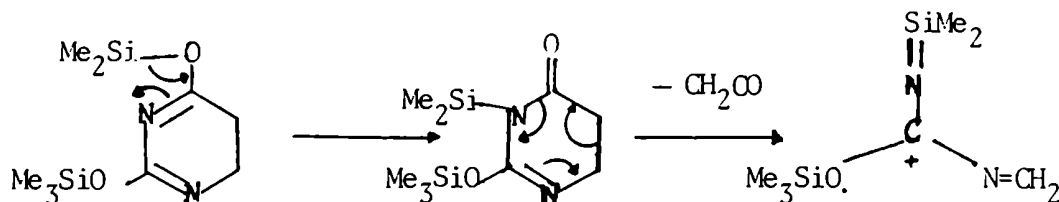


El primero de los picos analizados, correspondiente al espectro 91 (figura 20), presenta un ión molecular a  $m/z$  258, y fragmentos representativos a: 243 (M-15), 213, 201, 147 (base) 144, 131, 116, 75 y 73, asimilables a una base dihidropirimidina, con dos restos trimetil sililo (TMS), unidos a dos oxígenos, o a un nitrógeno y un azufre.

Por ejemplo:

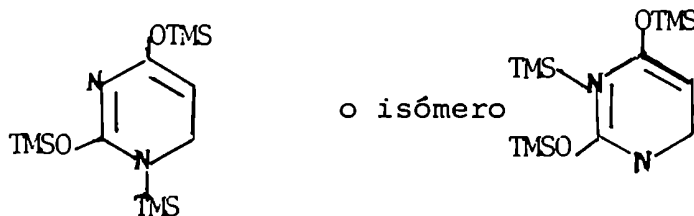


La presencia en el espectro de un fragmento a  $m/z$  201, producto posible de la siguiente fragmentación (124):



llevaría a la conclusión que de las opciones presentadas podría tratarse del derivado disililado del 5-6 dihidrouracilo.

El segundo pico analizado (espectro 107, figura 21), presenta fragmentos a  $m/z$  330 (M+), 315 (M-15), 243, 214, 199, 189, 147 (base), 116, 75 y 73, que puede considerarse como estructuralmente relacionado al compuesto anterior, pero con un grupo TMS adicional. Por ello podrían considerarse los siguientes compuestos:



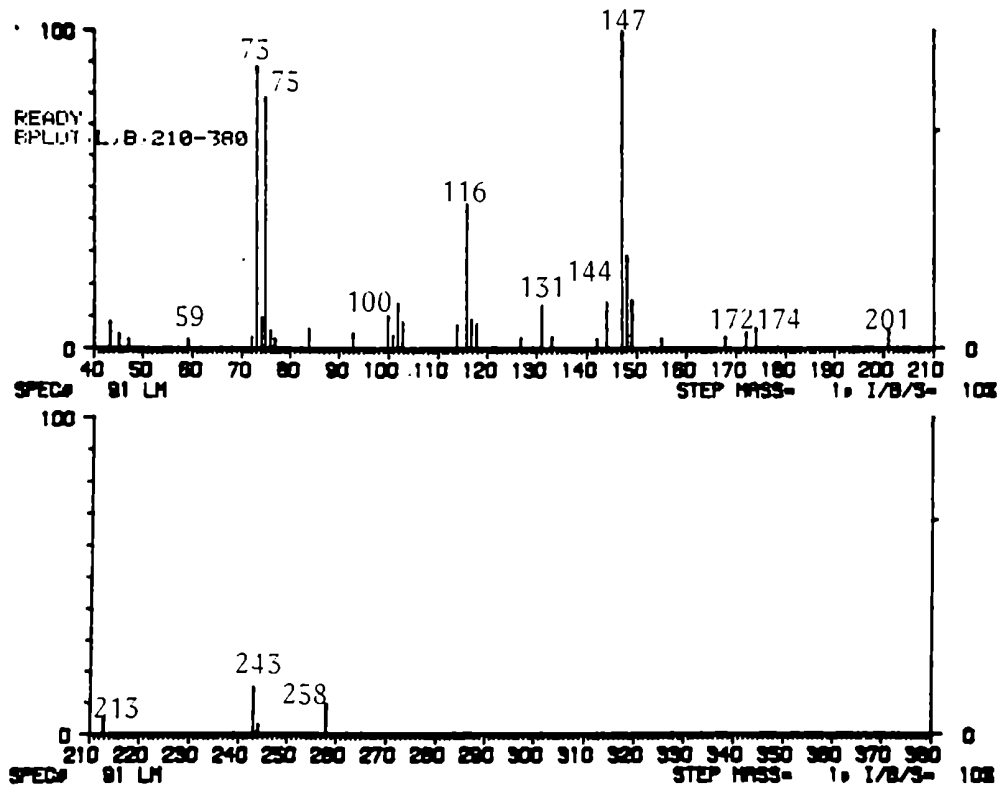


FIGURA 20. Registro potenciométrico por acumulación sucesiva de espectros de masa del pico 91.

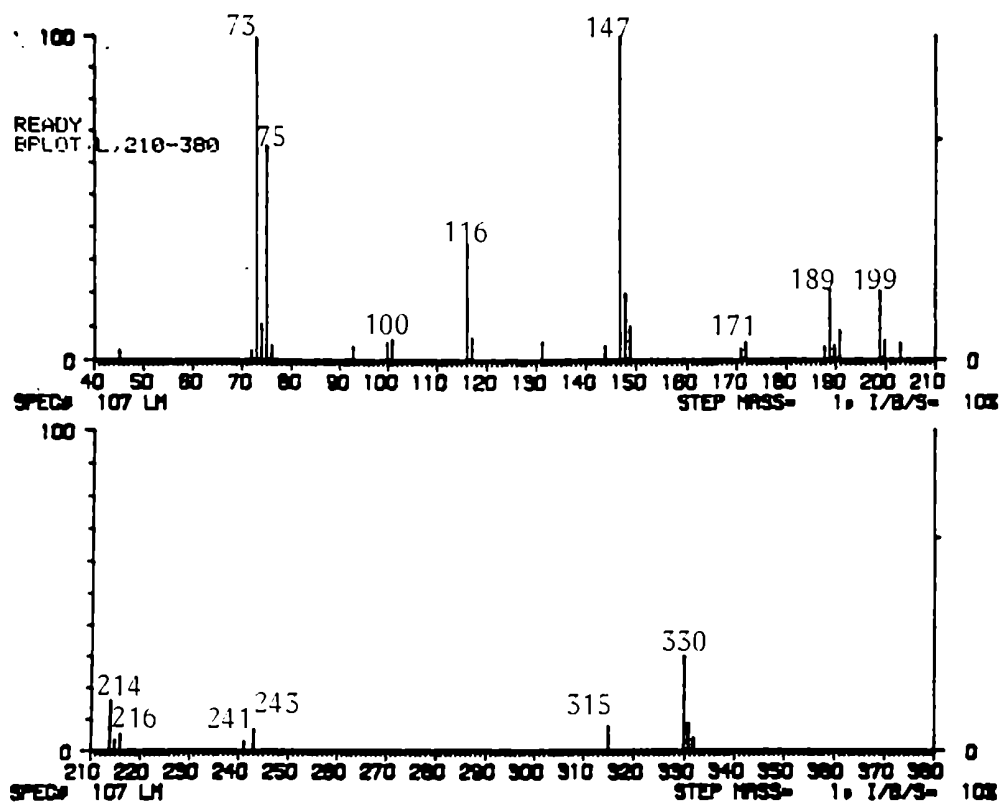
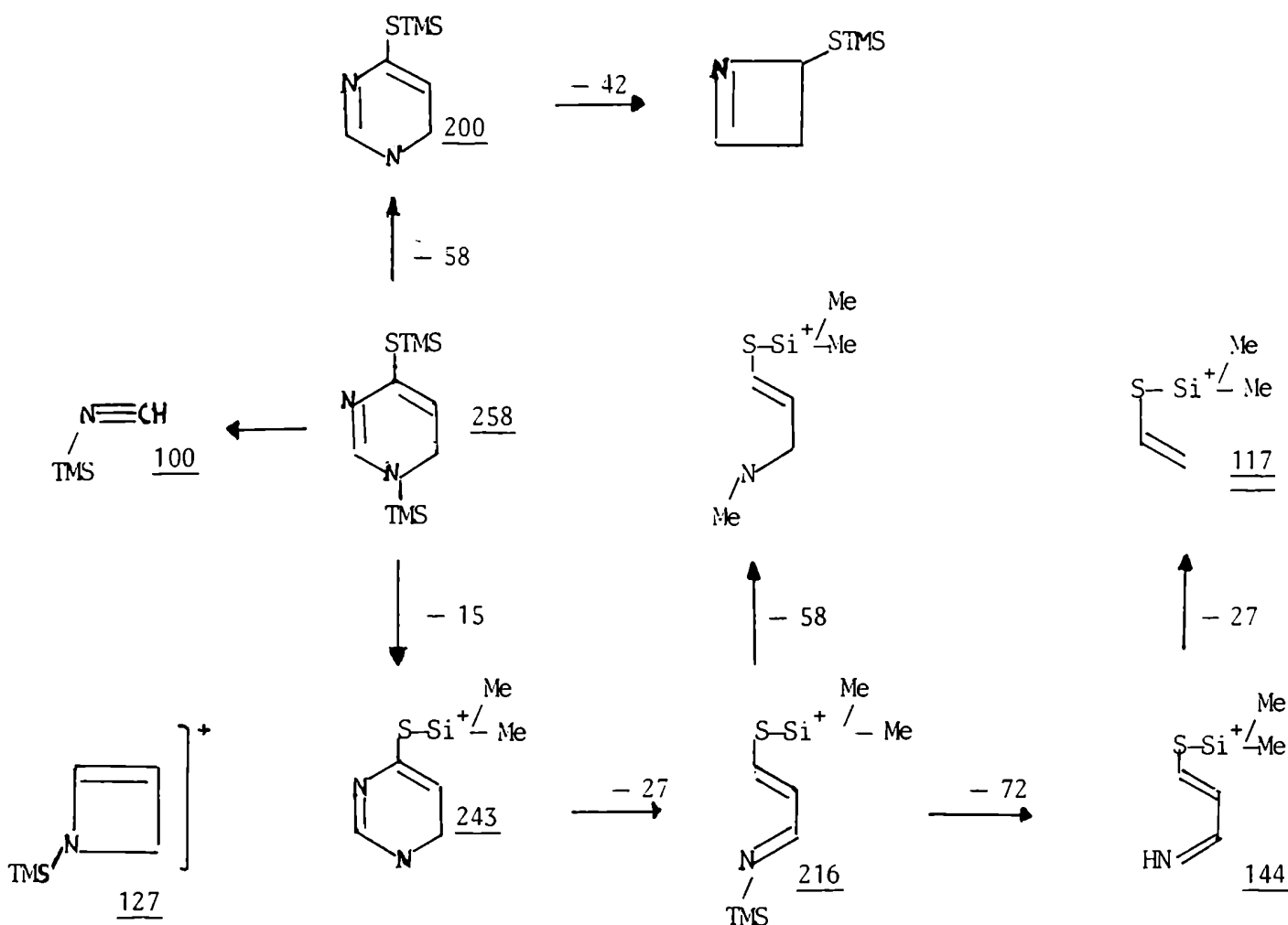
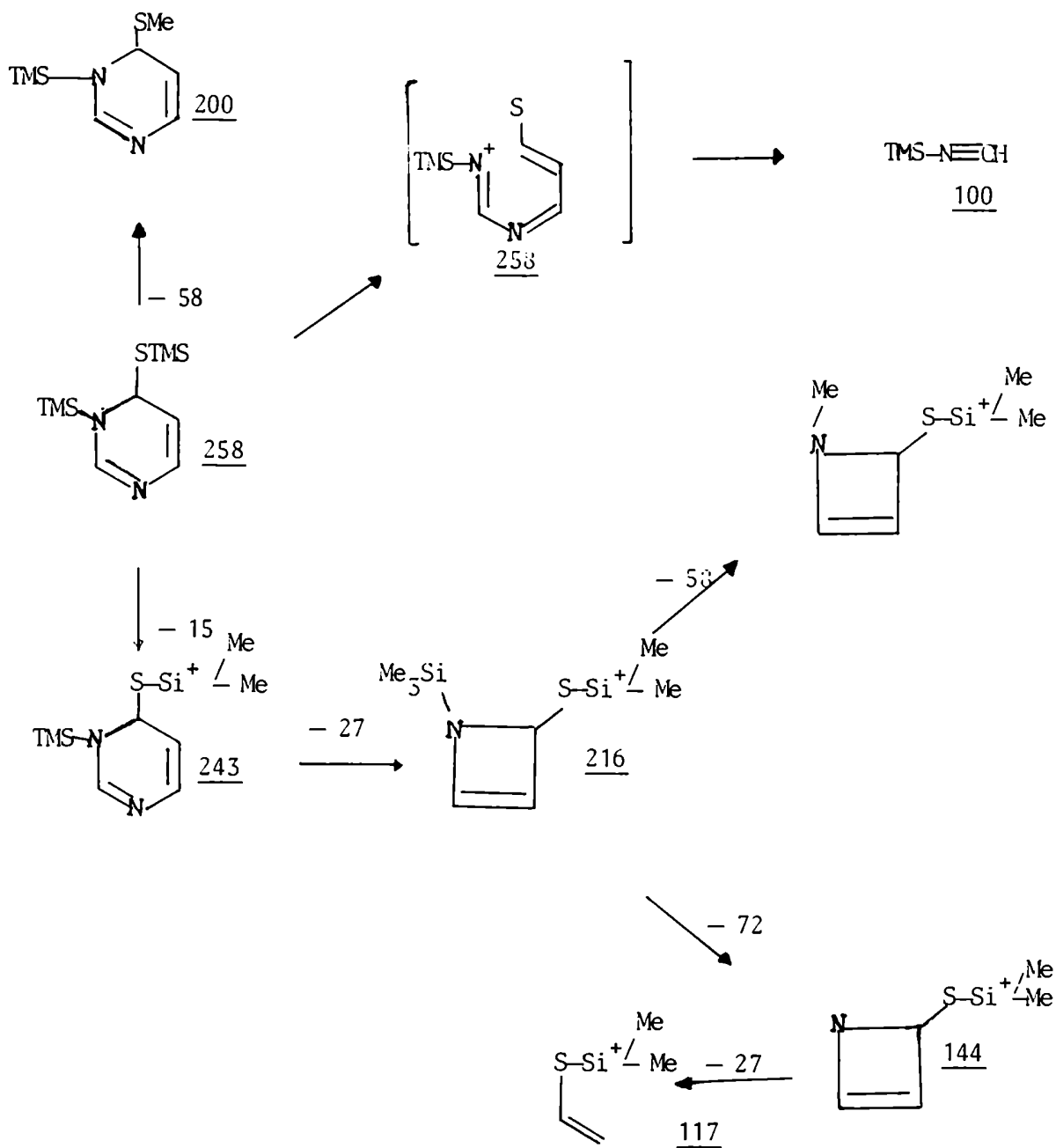


FIGURA 21. Registro potenciométrico por acumulación sucesiva de espectros de masa del pico 107.

El tercer pico correspondiente al producto más abundante de la mezcla (espectro 142, figura 22) presenta iones a  $m/z$  258 (M<sup>+</sup>), 243 (base), 216, 200, 158, 147, 144, 127, 117, 101, 100 y 73, que puede ser asimilado al espectro de monomercaptodihidropirimidina diTMS ( $C_4H_4SN_2 \cdot 2TMS$ ), tentativamente representado como:



o también:



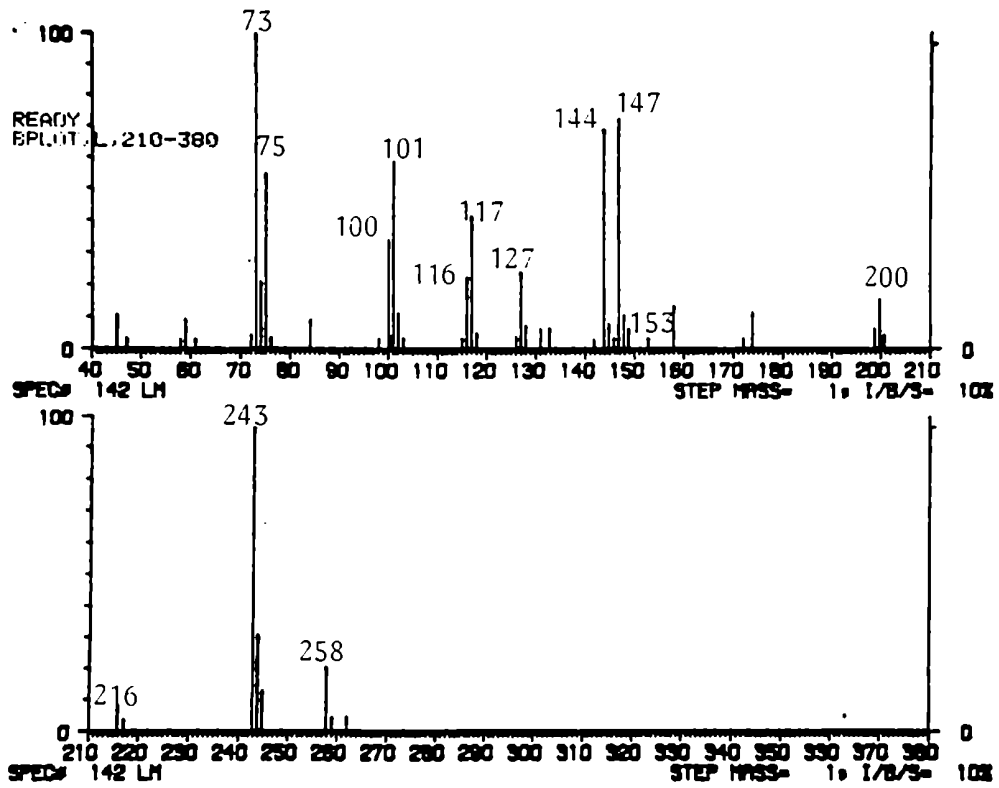
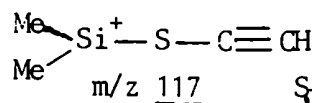


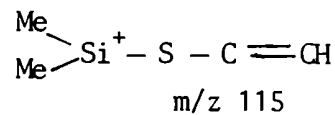
FIGURA 22. Registro potenciométrico por acumulación sucesiva de espectros de masa del pico 142.

Las fragmentaciones presentadas son exclusivamente teóricas, sin confirmación alguna, pero es importante destacar, que el más importante diagnóstico en los espectros de derivados de pirimidinas, comienza con la apertura del núcleo, luego de la formación de M-Me.

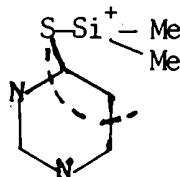
Entonces el ión:



o



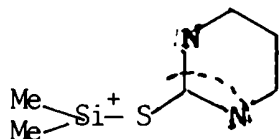
proveniente de



puede ser determinante

para conocer la posición de la tiación.

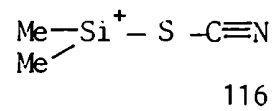
Por otro lado si:



o



entonces



En el caso de ésta muestra, el pico de m/z 117 (39%) y el de 115 (2.7%), apoyan la posibilidad de que el grupo mercapto se encuentre en posición 4, (la 4 mercaptopirimidina posee un m/z de 115).

Por otra parte, el espectro de masa de 2 mercapto 5-6 dihidropirimidina, presentó un fragmento característico a m/z 116 (30%) y el de 2,4 dimercapto 5-6 dihidropirimidina, presentó m/z a 116 (47%) y también a 117 (7,7%).

El cuarto pico estudiado (espectro 182, figura 23), presentó los iones característicos de asparagina triTMS, y fue identificado como tal por el programa de computadora.

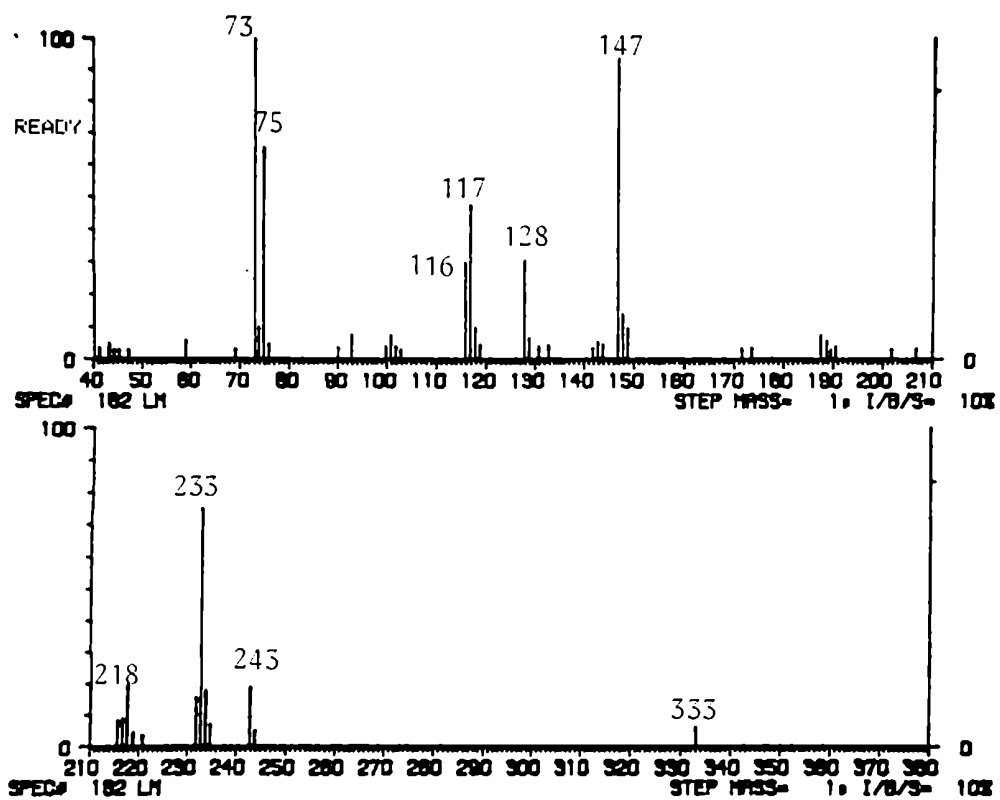


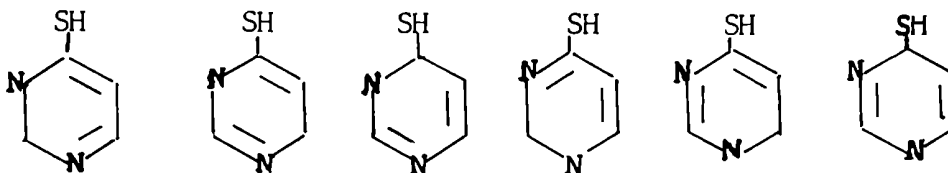
FIGURA 23. Registro potenciométrico por acumulación sucesiva de espectros de masa del pico 182.



El quinto pico estudiado, correspondiente al espectro 190 figura 24, presentó iones a  $m/z$  300 ( $M^+$ ), 285, 270, 255 y 183, y fue identificado como ácido mirístico.

Los siguientes picos tenían poca intensidad, y no permitieron establecer una identificación segura.

El compuesto candidato a ser el responsable de los efectos biológicos, pasó a ser la mercapto dihidropirimidina cuya fórmula posible es una de las siguientes:



Estas fórmulas suponen a uno de los nitrógenos no comprometido en dobles enlaces.

Consultada la bibliografía y el "Chemical Abstracts", no se encontró ningún derivado como el que hemos postulado, es decir que hasta el presente, no ha sido comunicada la existencia de mercapto dihidropirimidinas, de origen natural.

Sí se ha comunicado la síntesis de 2,4 dimercapto 5-6 dihidropirimidina (139), con intención de usar éste compuesto como análogo de bases, para ser incorporado en polirribonucleótidos.

Por otra parte en (140) y en (141), se describen los "nucleósidos modificados", la mayoría de los cuales, presenta bases atípicas que forman parte del RNA de transferencia.

Las modificaciones más corrientes son metilaciones. Pero hay una variedad de "nucleósidos hipermodificados", que son aún más complejos.

Se piensa que son el resultado de modificaciones enzimáticas de un nucleótido parental en la molécula de tRNA, o en un precursor.

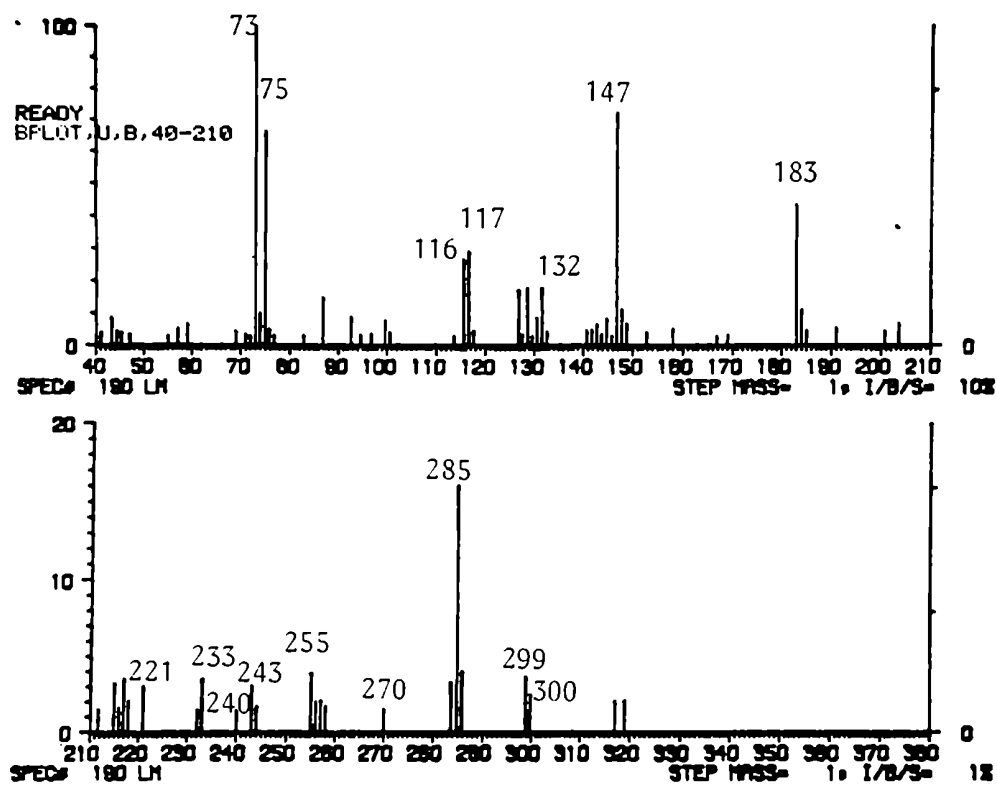
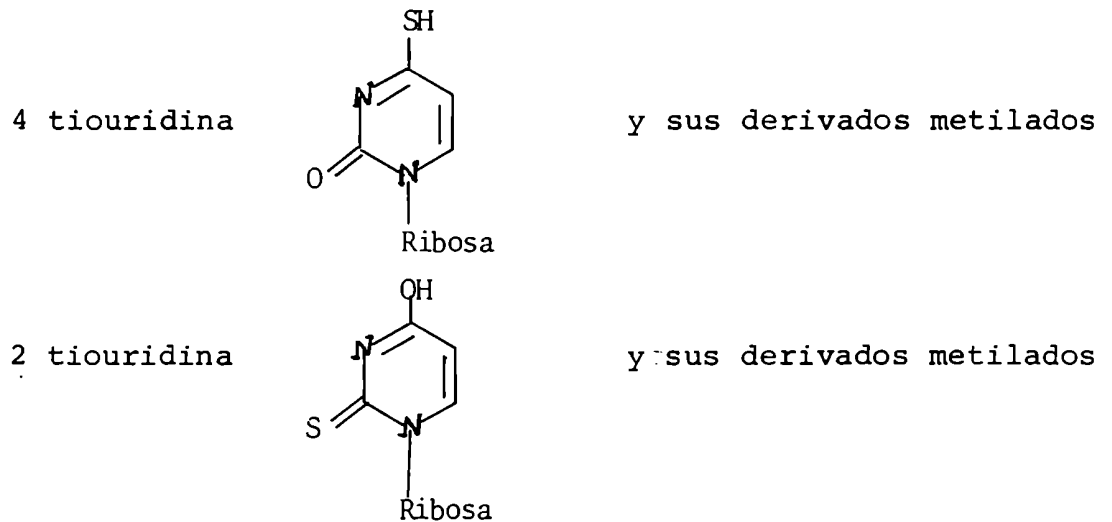


FIGURA 24. Registro potenciométrico por acumulación sucesiva de espectros de masa del pico 190.

Dentro del conjunto de éstos nucleósidos, encontramos bases con grupos mercapto, como en el caso de :



Finalmente otro compuesto comunicado es el 2 tiouracilo y sus derivados, utilizados para el tratamiento del hipertiroidismo y de la tirotoxicosis, en el hombre (142).

Este compuesto inhibe además el crecimiento de E. coli y su efecto se revierte con uracilo (143), por lo cual ha sido clasificado como un antimetabolito.

#### 6- SINTESIS ORGANICA DE COMPUESTOS RELACIONADOS CON LAS ESTRUCTURAS PROPUESTAS.

Para tener una mayor certeza de la estructura, se decidió sintetizar algunos compuestos relacionados, y por otra parte intentar la reducción catalítica de 2 y de 4 mercaptopirimidina.

La síntesis de mercapto derivados de pirimidina, se realizó como se describe en materiales y métodos. Habitualmente se preparan por clorinación de hidroxipirimidinas y reemplazo

subsecuente de los átomos de cloro, por grupos sulfhidrilo utilizando hidrosulfuros de sodio o tiourea.

El método utilizado en nuestro trabajo abrevió la síntesis, sustituyendo los grupos hidroxilo por mercapto, en un solvente inerte, utilizando  $P_2S_5$ , como dador de azufre.

En cuanto a la reducción catalítica, se intentó reducir el núcleo pirimidínico con catalizar de Pd (carbón 10%) durante 12 horas a una presión de hidrógeno de 3 atm., como se describe en (144). Cuando se ensayó con 2 aminopirimidina (VIII), la reducción fue total, obteniéndose 2 aminoexahidropirimidina (IX) (IR: 3200, 1780, 1620, 1320, 1140, 1080, 1040, 1000, 960  $cm^{-1}$ . RMN:  $\delta$  3,3 (t, 4H) J=4Hz 1,8 (quinteto, 2H) J=4Hz).

El catalizador de níquel-aluminio (Nickel-Raney) se ha utilizado para desulfurar mercaptopirimidinas, pero se ha comunicado que el reactivo trabaja en forma óptima en agua (145).

Por otra parte, se ha utilizado Nickel-Raney para reducir selectivamente el uracilo (X) a 5,6 dihidrouracilo (128).

Se realizó entonces la reducción de 2 y 4 mercaptopirimidina en condiciones similares a las descritas para la obtención de 5,6dihidrouracilo, utilizando etanol como solvente durante la hidrogenación.

Tanto la 2 mercapto, como la 4 mercaptopirimidina dan lugar, luego de la reducción, a la formación de una serie de cinco productos que se separan por cromatografía descendente, como se describe en materiales y métodos. Estos productos, que revelan con vapores de iodo, fueron numerados en orden de  $R_f$  creciente de 1 a 5. Los mismos presentaron los máximos de absorbancia que se informan, y algunos de ellos tuvieron actividad biológica.

Tabla 4

	<u>Prod.de Reduc.</u>	<u>Actividad</u>		<u>Prod.de Reduc.</u>	<u>Actividad</u>
	<u>2 mercapto(<math>\lambda</math> máx.)</u>	<u>biológica</u>		<u>4 mercapto(<math>\lambda</math> máx.)</u>	<u>biológica</u>
1	241	+	1	---	
2	250		2	283	
3	297		3	285	
4	284 (es 2 mer- captopiri- midina sin reducir)		4	297	
5	237 (271)*	++	5	271	++

\* El máx. es 237, pero el espectro presenta un hombro en la zona de 270 nm.

Las fracciones N°5 de ambos orígenes fueron derivatizadas y sometidas a CG/EM.

En cuanto a la fracción 5 proveniente de 2 mercaptopirimidina 5<sub>2</sub>, el cromatograma de corriente iónica mostró dos componentes, uno de los cuales era mayoritario y cuyo espectro de masa reveló fragmentos a m/z 186 (M+), 170 (M-15), 143, 116, 100, 73, 63, 45, 43; asimilables a 2 mercapto 5,6 dihidropirimidina (V).

El segundo pico presentó fragmentos a m/z 219 (M+), 191 (M-28), 147 (M-72), 117, 73, 45 que pueden asimilarse a una mercaptoaziridina (XI).

En cuanto a la fracción 5 proveniente de la reducción de 4 mercaptopirimidina, el cromatograma de corriente iónica reveló un pico principal y dos accesorios. El mayoritario coincidió en sus fragmentos con la mercaptoaziridina anteriormente descrita. Los dos picos accesorios no pudieron ser caracterizados.

Si bien estos estudios son preliminares, puede decirse que

la 2 mercapto 5,6 dihidropirimidina, es probablemente un compuesto con actividad biológica, y que la mercaptoaziridina podría también tener algún tipo de efecto sobre el sistema biológico.

## VII- CONCLUSION

Las pirimidinas están íntimamente asociadas a los sistemas vivientes.

Estos compuestos en su forma libre, así como en una amplia variedad de combinaciones químicas, han llamado la atención y despertado la imaginación de biólogos, enzimólogos, químicos y oncólogos.

Los derivados más conocidos de pirimidinas con efecto farmacológico son: el aloxano (2,6 dihidroxipirimidina-4-5 diona) cuyo efecto principal es ser un potente diabetógeno; el ácido barbitúrico (2,4,6 trihidroxipirimidina) y sus derivados de conocidos efectos hipnóticos y sedativos; 2 tiouracilo efectivo en el tratamiento del hipertiroidismo y finalmente 2,6 diamino pirimidinas, con grupos benzil, fenoxi o fenil en posición 5, antagonistas del ácido fólico.

Hemos presentado en este trabajo la estructura tentativa de un compuesto pirimidínico, de origen tisular cuyos efectos preliminares, lo perfilan como un posible regulador metabólico, a través de una no aún comprendida relación con dos moléculas cuya importancia está de más destacar: el AMPc y el ATP.

Esta estructura sencilla podría cumplir funciones importantes en la regulación del metabolismo tal como ocurre con otros compuestos, tales como los nucleótidos cíclicos, el diacilglicerol y el inositol trifosfato.

Es además importante destacar que la investigación del cáncer se encuentra actualmente en una etapa de definiciones.

Los genes que causan la transformación tumoral de la células han sido identificados, y se empieza a entender qué función cumplen los productos de esos genes para provocar el estado transformado.

Los productos de los proto-oncogenes, de los cuales derivan

los oncogenes, juegan papeles cruciales en el control del crecimiento celular, la diferenciación y el desarrollo embrionario; y es la fosforilación de proteínas una de las expresiones más importantes de la acción de estos oncogenes, puesto que además del producto del oncogen src, los productos de los oncogenes yes, fgr, abl, fps, fes y ros tienen la propiedad enzimática de fosforilar proteínas en tirosina.

La comparación de las secuencias de estas siete proteínas muestra la existencia de un fragmento común de 250 aminoácidos, que sería el portador de la actividad transferente de fosfato.

Esta similitud de los dominios catalíticos en varias enzimas sugiere que deben haber tenido un progenitor evolutivo común.

La evidencia que estos dominios son parte de una familia mayor, proviene de una comparación de secuencias hecha por computadora, donde se reveló que la única quinasa de proteínas específica de serina, cuya secuencia es conocida, (quinasa dependiente de AMPc), está relacionada con pp60<sup>src</sup>.

En otras palabras, no sólo existe una familia de quinasas de tirosina, sino también una superfamilia que comprende a todas las quinasas, codificada por genes que descienden de un gen antecesor simple.

La posibilidad de que el inhibidor aislado de tejidos de embrión de pollo sea capaz de impedir las fosforilaciones en tirosina es altamente sugerente.

De hecho el compuesto es capaz de inhibir quinasas de diferentes tipos y orígenes.

Por lo tanto el factor o un análogo del mismo podrían tener algunas posibilidades que merecen ser analizadas en el campo de la terapéutica antitumoral.



*José Holmstedt*



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Cohen, P.; (1982) Nature Lond. 296: 613.
2. Cori, G.T.; Cori, F.C.; (1945) J. Biol. Chem. 151: 321.
3. Cori, G.T.; Gree, A.A.; (1943) J. Biol. Chem. 151: 31.
4. Sutherland, E.W. Jr.; Wosilait, N.D.; (1955) Nature 175: 169.
5. Rall, T.N.; Sutherland, E.W.; Berthel, J.; (1957) J. Biol. Chem. 224: 463.
6. Fisher, E.H.; Krebs, E.G.; (1955) J. Biol. Chem. 216: 121.
7. Krebs, E.G.; Fisher, E.H.; (1956) B.B.A. 20: 150.
8. Krebs, E.G.; Graves, D.J.; Fisher, E.H.; (1959) J. Biol. Chem. 234: 2867.
9. Friedman, D.L.; Larner, J.; (1963) Biochemistry 2: 669.
10. Appleman, M.M.; Belocopitow, E.; Torres, H.N.; (1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 14: 550.
11. Huijing, F.; Larner, J.; (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 56: 647.
12. Walsh, D.A.; Perkins, J.P.; Krebs, E.G.; (1968) J. Biol. Chem. 243: 3763.
13. Schlender, K.K.; Wei, S.H.; Villar-Palasi, C.; (1969) B.B.A. 191: 272.
14. Soderling, R.A.; (1970) J. Biol. Chem. 245: 6317.
15. Linn, T.C.; Pettit, F.H.; Reed, L.J.; (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 64: 227.
16. Krebs, E.G.; (1972) Curr. Top. Cell. Regul. 5: 99.
17. Rubin, C.S.; Rosen, O.M.; (1975) Annu. Rev. Biochem. 44: 831.
18. Rosen, O.M.; Rangel-Aldao, R.; Erlichmann, J.; (1977) Curr. Top. Cell. Regul. 12: 39.

19. Cohen, P.; (1978) Curr.Top.Cell.Regul. 14: 118.
20. Krebs, E.G.; Beavo, J.A.; (1979) Annu.Rev.Biochem. 48: 923.
21. Hofmann, F.; Beavo, J.A.; Betchel, P.J.; Krebs, E.G.; (1975) J.Biol.Chem. 250: 7795.
22. Beavo, J.A.; Betchel, P.J.; Krebs, E.G.; (1975) Adv.Cyclic.Nucleotide Res. 5: 241.
23. Rosen, O.M.; Erlichman, J.; Rubin, C.S.; (1975) Adv.Cyclic.Nucleotide Res. 5: 253.
24. Corbin, J.D., Sugden, P.H.; West, L.; Flockhart, D.A.; Lincoln, T.M.; McCarthy, D.; (1978) J.Biol.Chem. 253: 3997.
25. Builder, S.E.; Beavo, J.A.; Krebs, E.G.; (1980) J.Biol.Chem. 255: 2350.
- ✓ 26. Tsuzuki, J.; Kiger, J.A.Jr.; (1978) Biochemistry 17: 2961.
- ✓ 27. Chan, B.; Huang, L.C.; Romero, G.; Biltonen, R.L.; Huang, C. (1980) Biochemistry 19: 924.
- ✓ 28. Builder, S.E.; Beavo, J.A.; Krebs, E.G.; (1980) J.Biol.Chem. 255: 3514.
29. Miyamoto, E.; Petzold, G.L.; Harris, J.S.; Greengard, P.; (1971) Biochem.Biophys.Res.Comm. 44: 305.
30. Tao, M.; (1972) Biochem.Biophys.Res.Comm. 46: 56.
31. Haddox, M.K.; Newton, N.E.; Hartle, D.K.; Goldberg, N.D.; (1972) Biochem.Biophys.Res.Comm. 47: 653.
32. Gill, G.N.; Walton, G.M.; Sperry, P.J.; (1977) J.Biol.Chem. 252: 6443.
33. Gheahlen, R.L.; Krebs, E.G.; (1980) J.Biol.Chem. 255: 1164.
34. Gill, G.N.; Holdy, K.E.; Walton, G.M.; Kanstein, C.B.; (1976) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 73: 3918.
35. Cheung, W.Y.; (1970) Biochem.Biophys.Res.Comm. 38: 533.
36. Dabrowska, R.; Sherry, J.M.F.; Aromatorio, D.K.; Hartshorne, D.J.; (1978) Biochemistry 17: 253.
37. Cohen, P.; Burchell, A.; Foulkes, J.G.; Cohen, P.T.W.; Vanaman, T.C.; Nairn, A.; (1978) FEBS Lett. 92: 287.

38. Schulman, H.; Greengard, P.; (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 5432.
39. Huang, C.Y.; Chan, V.; Chock, P.B.; Sharma, R.K.; Wang, J.; (1980) Fed. Proc. 39: 288.
40. Blumenthal, D.K.; Stull, J.T.; (1980) Biochemistry 19: 5608.
41. Larner, J.; Rosell-Pérez, M.; Friedman, D.L.; Craig, J.W.; (1963) "Insulin and the control of UDPG- $\alpha$ -glucano transglucosylase activity in control of glycogen metabolism" (ed. Whelan, W.J.; Cameron, M.P.) p. 273, Little, Brown, Boston.
42. Soderling, T.R.; Hickenbotton, J.P.; Reimann, E.M.; Hunkeler, F.L.; Walsh, D.A.; Krebs, E.G.; (1970) J. Biol. Chem. 245: 6317.
43. Lin, D.C.; Segal, H.C.; (1973) J. Biol. Chem. 248: 7007.
44. Danforth, W.H.; (1965) J. Biol. Chem. 240: 588.
45. Huijing, F.; Nuttall, F.Q.; Villar-Palasi, C.; Larner, J.; (1969) Biochem. Biophys. Acta 177: 204.
46. Villar-Palasi, C.; (1969) Ann. N.Y. Acad. Sci. 166: 719.
47. Takai, Y.; Kishimoto, A.; Iwasa, Y.; Kawara, Y.; Mori, T. Nishizuka, Y.; (1979) J. Biol. Chem. 254: 3692.
48. Jausky, A.M.; Srere, P.A.; Cornell, N.W.; Veech, R.L.; (1979) J. Biol. Chem. 254: 9365.
49. Linn, T.C.; Srere, P.A.; (1979) J. Biol. Chem. 254: 1691.
50. Ramakrishna, S.; Benjamin, W.B.; (1979) J. Biol. Chem. 254: 9232.
51. Spence, J.T.; Pitot, H.C.; Zalitis, G.; (1979) J. Biol. Chem. 254: 12169.
52. Guy, P.S.; Cohen, P.; Hardie, D.G.; (1980) FEBS Lett. 109: 205.
53. Benjamin, W.B.; Singer, I.; (1974) Biochem. Biophys. Acta 351: 28.

54. Appleman, M.M.; Belocopitow, E.; Torres, H.N.; (1966) Biochem. Biophys. 116: 39.
55. Walsh, D.A.; Ashby, C.D.; González, C.; Calkins, D.; Fisher, E.H.; Krebs, E.G.; (1971) J. Biol. Chem. 246: 1977.
56. Demaille, J.G.; Peters, K.A.; Fisher, E.H.; (1977) Biochemistry 16: 3080.  
Costa, M.; (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 78: 1311.
57. Szmigielski, A.; Guidotti, A.; Costa, E.; (1977) J. Biol. Chem. 252: 3848.
58. Beale, E.G.; Dedman, J.R.; Means, A.; (1977) J. Biol. Chem. 252: 6322.
59. Hanafusa, H.; (1977) "Cell transformation by RNA tumor viruses. In Comprehensive virology" (ed. Fraenkel, H.; Wagner, R.R.), vol. 10, p. 401, Plenum Press, New York.
60. Brugge, J.; Erikson, R.L.; (1977) Nature 269: 346.
61. Levinson, A.D.; Oppermann, H.; Levintow, L.; Varnnis, H.E.; Bishop, J.M.; (1978) Cell 15: 561.
62. Sefton, B.M.; Beemon, K.; Hunter, T.; (1978) J. Virol. 28: 957.
63. Rubsamen, H.; Friis, R.R.; Bauer, H.; (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 967.
64. Collet, M.S.; Erikson, E.; Erikson, R.L.; (1979) J. Virol. 29: 770.
65. Hunter, T.; Sefton, B.M.; (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 1311.
66. Erikson, R.L.; Collet, M.S.; Erikson, E.L.; Purchio, A.F.; (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 6260.
67. Erikson, E.; Collet, M.S.; Erikson, R.L.; (1978) Nature 274: 919.
68. Sefton, B.M.; Hunter, T.; Beeman, K.; (1979) J. Virol. 30: 311.
69. Collet, M.S.; Purchio, A.F.; Erikson, R.L.; (1980) Nature 285: 167.

70. Sefton, B.M.; Hunter, T.; Beeman, K.; Eckhart, W.; (1980) Cell 20: 807.
71. Collet, M.S.; Erikson, R.L.; (1978) Proc.Natl.Acad.Sci. 75: 2021.
72. Opperman, H.; Levinson, A.D.; Varmus, H.E.; Levintow, L.; Bishop, J.M.; (1979) Proc.Natl.Acad.Sci. 76: 1804.
73. Rohrschneider, L.R.; (1979) Cell 16: 11.
74. Stéhelin, D.; Varmus, H.E.; Bishop, J.M.; Vogt, P.K.; (1976) Nature 260: 170.
75. Collet, M.S.; Erikson, E., Purchio, A.F.; Brugge, J.S.; Erikson, R.L.; (1979) Proc.Natl.Acad.Sci. 76: 3159.
76. Geiger, B.; (1979) Cell 18: 193.
77. Burrige, K.; Feramisco, J.; (1980) Cell 19: 587.
78. Radke, K.; Martin, G.S.; (1979) Proc.Natl.Acad.Sci. 76: 5212.
79. Erikson, E.; Erikson, R.L.; (1980) Cell 21: 829.
80. Witte, O.N.; Dasgupta, A.; Baltimore, D.; (1980) Nature 283: 826.
81. Barbacid, M.; Beeman, K.; Devare, S.G.; (1980) Proc.Natl. Acad.Sci. 77: 5158.
82. Neil, J.C.; Breitman, M.L.; Vogt, P.K.; (1980) Virology 108: 98.
83. Feldman, R.A.; Hanafusa, T.; Hanafusa, H.; (1980) Cell 22: 757.
84. Hanafusa, T.; Wany, L.H.; Anderson, S.M.; Karess, R.E.; Hayward, W.S.; Hanafusa, H.; (1980) Proc.Natl.Acad.Sci. 77: 3009.
85. Lee, W.H.; Bister, K.; Pawson, A.; Robbins, T.; Moscovici, C.; Duesberg, P.H.; (1980) Proc.Natl.Acad.Sci. 77: 2018.
86. Wellingham, M.C.; Jay, G.; Pastan, I.; (1979) Cell 18: 125.
87. Carpenter, G.; Cohen, S.; (1979) Annu.Rev.Biochem. 48: 193.

88. Das, M.; Mayakawa, T.; Fox, C.F.; Pruss, R.M.; Aharonov, A.; Herschman, H.R.; (1977) Proc.Natl.Acad.Sci. 74: 2790.
89. Downward, J.; Yarden, Y.; Mayer, E.; Scrace, G.; Totti, N.; Stockwell, P.; Ullrich, A.; Schlessinger, J.; Waterfield, M.D.; (1984) Nature 307: 521.
90. Kasuga, M.; Karlsson, F.A.; Kahn, C.R.; (1982) Science 215: 185.
91. Kasuga, M.; Zick, Y.; Blithe, D.L.; Karlsson, F.A.; Haring, H.U.; Kahn, C.R.; (1982) J.Biol.Chem. 257: 9891.
92. Kasuga, M.; Zick, Y.; Blithe, D.L.; Crettaz, M.; Kahn, C. (1982) Nature (London) 298: 667.
93. Zick, Y.; Kasuga, M.; Kahn, C.R.; Roth, J.; (1983) J.Biol. Chem. 258: 75.
94. Kasuga, M.; Fujita-Yamaguchi, Y.; Blithe, D.L.; Kahn, R. (1983) Proc.Natl.Acad.Sci. 80: 2137.
95. Rosen, O.M.; Herrera, R.; Lowe, Y.; Petruzzelli, L.; Cobb, M.H.; (1983) Proc.Natl.Acad.Sci. 80: 3237.
96. Chinkers, M.; McKanna, J.A.; Cohen, S.; (1979) J.Cell. Biol. 83: 260.
97. Weng, E.; Goldberg, A.R.; (1976) Proc.Natl.Acad.Sci. 73: 4065.
98. Ek, B.; Westermark, B.; Wasteson, A.; Helden, C.H.; (1982) Nature 295: 419.
99. Temin, H.M.; Pierson, R.W.Jr.; Dulak, N.C.; (1972) "Growth nutrition and metabolism of cells in culture" (eds. Rothblatt, G.H; Cristofolo, J.), pag. 50; Academic, New York.
100. Vogel, A.; Pollack, R.; (1974) "Methods in cell biology" vol. 8; Academic, New York.
101. Dulak, N.C.; Temin, H.M.; (1973) J.Cell.Physiol. 81:161.
102. De Larco, J.E.; Todaro, J.G.; (1978) Nature 272: 356.

103. De Larco, J.E.; Todaro, J.G.; (1978) Proc.Natl.Acad.Sci. 75: 4001.
104. De Larco, J.E.; Todaro, J.G.; (1980) J.Cell.Physiol. 102: 267.
105. Heldin, C.H.; Westermark, B.; Wasteson, A.J.; (1980) J.Cell.Physiol. 105: 235
106. Dicker, P.; Pohjanpelto, P.; Pettican, P.; Rozengurt, E.; (1981) Expl.Cell.Res. 135: 221.
107. Waterfield, M.D.; Scrace, G.T.; Wittle, N.; Stroobant, P.; Johnsson, A.; Wasteson, A.; Westermark, B.; Heldin, C.H.; Huang, J.S.; Devel, T.F.; (1983) Nature 304: 35.
108. De Larco, J.E.; Preston, Y.A.; Todaro, J.G.; (1981) J.Cell.Physiol. 109: 143.
109. Roberts, A.B.; (1980) Proc.Natl.Acad.Sci. 77: 3494.
110. Ozane, B.; Fulton, R.J.; Kaplan, P.L.; (1980) J.Cell.Physiol. 105: 163.
111. Roberts, A.B.; Anzano, M.A.; Lamb, L.C.; Smith, J.M.; Sporn, M.B.; (1981) Proc.Natl.Acad.Sci. 78: 5339.
112. Glikin, G.C.; (1981) "Quinasas de proteínas y fosfo-desterasas de nucleótidos cíclicos en Neurospora crassa"; Tesis doctoral; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
113. Puck, T.T.; (1958) J.Exp.Med. 108: 945.
114. "Chick embryo cells" en Kruse y Paterson, Tissue culture; methods and applications; pag. 119, New York Academic Press; 1973.
115. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.; (1951) J.Biol.Chem. 247: 3726.
116. Beavo, J.A.; Betchel, P.J.; Krebs, E.G.; (1974) "Methods in enzymology"; vol. 38: 3726.
117. Nakai, N.; Lai, Y.C.; Horecker, J.; (1974) Anal Biochem. 58: 563.
118. Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel E. Merck, Darmstadt, Alemania (1972)

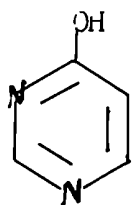
119. Blostein,R.; (1968) J.Biol.Chem. 243: 1957.
120. Téllez-Iñón,M.T.; Glikin,G.; Torres,H.N.; (1982) Biochem.J. 203: 611.
121. Walsh,D.A.; Ashby,C.D.; Gonzáles,C.; Calkins,D.; Fisher,E.H.; Krebs,E.G.; (1971) J.Biol.Chem. 246: 1977.
122. La Porte,D.C.; Builder,S.E.; Storn,D.; (1980) J.Biol.Chem. 255: 2343.
123. "Cyclic AMP dependent protein kinase: Primary steps of allosteric regulation" in Rosen and Krebs; Protein phosphorylation; pag. 55, New York, Academic Press, 1982.
124. White,E.; Krueger,U.P.M.; McCloskey,J.A.; (1972) J.Org.Chem. 37: 430.
125. Chesterfield,J.H.; McOmie,J.F.W.; Tute,M.S.; (1960) J.Chem.Soc. 4590.
126. Brown,D.J.; (1950) J.Soc.Chem.Ind. (London) 69: 353.
127. Elion,G.B.; Hitchings,G.H.; (1947) J.Am.Chem.Soc. 69: 2138.
128. Fox,J.J.; Van Praag,D.; (1960) J.Am.Chem.Soc. 82: 486.
129. Li,A.P.; Kawashima,K.; Hsie,A.W.; (1975) Biochem. Biophys.Res.Comm. 64: 507.
130. Li,A.P.; Kawashima,K.; Hsie,A.W.; (1974) In Vitro 10: 363.
131. Li,A.P.; PhD Thesis, University of Tennessee; Oak hidge graduate school of Biomedical Sciences (1976).
132. Beale,E.G.; Dedman,J.R.; Means,A.R.; (1977) J.Biol.Chem. 252: 6322.
133. De Larco,J.E.; Todaro,G.J.; (1978) Proc.Natl.Acad.Sci. 75: 4001.
134. Davoren,P.R.; (1962) Biochim.Biophys.Acta 63: 150.



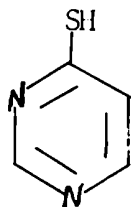
135. "Strategy and methods of sequence analysis" en Neurath y Hill; The proteins vol. III, pag. 88; New York, Academic Press (1977).
136. Ashby, C.D.; Walsh, D.A.; (1972) J.Biol.Chem. 247: 6637.
137. Corbin, J.D.; Sudgen, P.A.; West, L.; Flockhart, D.A.; Lincoln, T.M.; McCarthy, D.; (1978) J.Biol.Chem. 253: 3997.
138. Citri, N.; (1973) Adv.Enzymol. 37: 397.
139. Škarić, V.; Gašpert, B.; Jerkunica, I.; Škarić, D.; (1965) Croat.Chem.Acta 37: 199.
140. McClosky, J.A.; Nishimura, S.; (1977) Acc.Chem.Res. 10: 403.
141. Nishimura, S.; (1972) Prog.Nucleic.Acid.Res.Mol.Biol. 12: 49.
142. Astwood, E.B.; (1943) J.Ann.Med.Assoc. 122: 78.
143. Strandkov, F.B.; Wyss, O.; (1945) J.Bacteriol. 50: 237.
144. Smith, V.E.; Christensen, J.; (1955) J.Org.Chem. 20: 829.
145. Boarland, M.P.V.; McOmie, J.F.W.; Tinns, R.N.; (1952) J.Chem.Soc.: 4991.

ABRÉVIATURAS

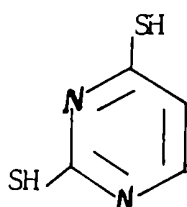
DEAE	Dietil amino etil
CHO-K <sub>1</sub>	Chinese hamster ovary clon K <sub>1</sub>
ATCC	American Type Culture Collection
TCA	Acido tricloroacético
SDS	Dodecilsulfato de sodio
PBS	Buffer de fosfato salino
CG-EM	Cromatografía gaseosa-Espectrometría de masa
BSTFA	(N,O, bis trimetil silil trifluoroacetamida)
BSA	(N,O, bis trimetil silil acetamida)
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia nuclear magnética de <sup>1</sup> H
ATPasa	Adenosina trifosfatasa
TMS	Trimetil sililo
ATP	Adenosina 5' trifosfato
Pi	Fósforo inorgánico
Ser	Serina
Thr	Treonina
AMPc	Adenosina 3' 5' monofosfato
GMPC	Guanosina 3' 5' monofosfato
PK	Quinasa de proteínas
Ca	Calcio
CM	Calmodulina
EDTA	Etilén diamino tetra acético
Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
Tris	2-amino-2(hidroximetil)-1,3 propanodiol

FORMULAS

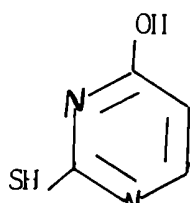
I



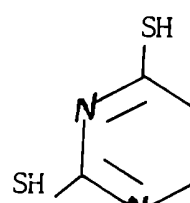
II



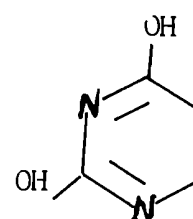
III



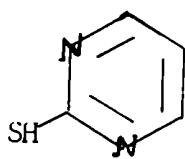
IV



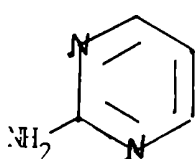
V



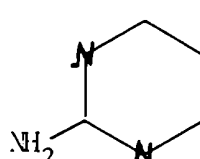
VI



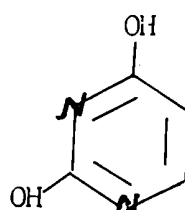
VII



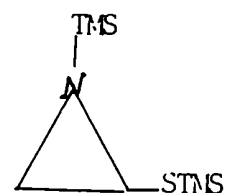
VIII



IX



X



XI

- I      4 hidroxipirimidina  
 II     4 mercaptopirimidina  
 III    2,4 dimercaptopyrimidina  
 IV    2 tiouracilo (2 mercapto 4 hidroxipirimidina)  
 V     2,4 dimercapto 5-6 dihidropirimidina  
 VI    5,6 dihidrouracilo  
 VIII   2 mercaptopirimidina  
 IX    2 aminohexahidropirimidina  
 X     uracilo  
 XI    mercaptoaziridina diTMS

### FE DE ERRATAS

En la página 61, donde dice " registro potenciométrico por acumulación sucesiva de espectros de masa ", debe decir " espectros de masa" .

En las leyendas de las figuras 20, 21, 22, 23, y 24 vale la aclaración anterior.

---