

Tesis de Posgrado

Estudio de las fosfatasas de fosfoproteínas en el hongo dimórfico *Mucor rouxii*

Seigelchifer, Mauricio Angel

1985

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

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

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

Cita tipo APA:

Seigelchifer, Mauricio Angel. (1985). Estudio de las fosfatasas de fosfoproteínas en el hongo dimórfico *Mucor rouxii*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1880_Seigelchifer.pdf

Cita tipo Chicago:

Seigelchifer, Mauricio Angel. "Estudio de las fosfatasas de fosfoproteínas en el hongo dimórfico *Mucor rouxii*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1880_Seigelchifer.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LAS FOSFATASAS DE
FOSFOPROTEINAS EN EL HONGO
DIMORFICO MUCOR ROUXII

AUTOR: Mauricio Angel Seigelchifer
DIRECTOR: Dra. María Susana Di Bernardo de Passeron
LUGAR DE TRABAJO: Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (U.B.A.)

Tesis presentada para optar por el Título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LAS FOSFATASAS DE
FOSFOPROTEINAS EN EL HONGO
DIMORFICO MUCOR ROUXII

AUTOR: Mauricio Angel Seigelchifer
DIRECTOR: Dra. María Susana Di Bernardo de Passeron
LUGAR DE TRABAJO: Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (U.B.A.)

Tesis presentada para optar por el Título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

-1985-

1
Tesis 1880
Ej. 2

A mis padres

A mis hermanas y sobrinos

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Susana Di Bernardo de Passeron por brindarme la posibilidad de realizar esta Tesis bajo su dirección y por la invalorable ayuda que me ofreció durante el desarrollo de la misma.

A la Dra. Silvia Moreno, por los múltiples aportes brindados.

A la Dra. María L. Cantore, al Dr. Ricardo Pastori, al Dr. Miguel Galvagno, a la Lic. Cristina Paveto y al Lic. Néstor Kerner, quienes hicieron mucho más agradables mis horas de trabajo.

A la Dra. Cristina Maggesse, quien me apoyó y asesoró cuando fue necesario.

A los miembros del Departamento de Química Biológica por su cooperación.

A los miembros del INGEBI por la colaboración que brindaron.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Comisión Nacional de Energía Atómica por la ayuda económica prestada para la realización de este trabajo.

A los integrantes del Programa de Regulación Hormonal y Metabólica (PRHOM, CONICET) por su estímulo y cooperación.

A la Sra. Alicia B. de Alcaráz y a las Srtas. Ema Balderramos y Noemí Argüello por la asistencia técnica proporcionada.

Al Sr. Federico Rafael De Martino por la esmerada labor dactilográfica y al Sr. Norberto Malarini por la dedicación puesta en la realización de los dibujos y gráficos.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

AcO	acetato
AMP	5' adenosina monofosfato
AMP _c ó AMP cíclico	3'-5' adenosina monofosfato cíclico
ATP	5' adenosina trifosfato
Bt ₂ AMP _c	dibutril AMP _c
cpm	cuentas por minuto
DEAE	dietilaminoetil
EDTA	etilendiamintetracetato
GMP _c	3'-5' guanosina monofosfato cíclico
h	hora
K _m	Constante de Michaelis de la enzima para el sustrato
μ mol	micromol
μ l	microlitro
min	minutos
pmol	picomol
P	ortofosfato unido a proteína
P _i	ortofosfato libre
PP _i	pirofosfato libre
PM	peso molecular
rpm	revoluciones por minuto

INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	1
I. FOSFORILACION Y DEFOSFORILACION DE PROTEINAS	2
I.1. Generalidades	2
I.2. Fosforilación y AMP _c	4
II. QUINASAS DE PROTEINAS	8
II.1. Clasificación	8
II.2. Quinasas de proteínas dependientes de AMP _c	9
II.3. Otras quinasas de proteínas	13
III. FOSFATASAS DE FOSFOPROTEINAS	16
III.1. Antecedentes	16
III.2. Fosfatasa de fosfoproteínas en tejidos de eucariontes superiores	17
III.2.1. Hígado	18
III.2.2. Músculo esquelético	21
III.2.3. Corazón	23
III.2.4. Músculo liso	24
III.2.5. Reticulocitos	25
III.2.6. Fosfatasa de fosfoproteínas de otras fuentes	26
III.2.7. Fosfatasa de fosfoproteínas dependientes de ATP-Mg	27

III.2.8.	Calcineurina	28
III.2.9.	Fosfatasa de fosfotirosina	29
III.3.	Regulación de las fosfatasa de fosfoproteínas	30
III.3.1.	Cationes divalentes	30
III.3.2.	Efecto de los agentes desnaturizantes y la proteólisis sobre las propiedades catalíticas de las fosfatasa de fosfoproteínas	32
III.3.3.	Moduladores proteicos de las fosfatasa de fosfoproteínas	34
III.3.4.	Otros moduladores de las fosfatasa de fosfoproteínas	37
III.4.	Una clasificación de las fosfatasa de fosfoproteínas	38
III.5.	Estructura de las fosfatasa de fosfoproteínas	43
III.6.	Fosfatasa de fosfoproteínas en eucariontes inferiores	46
IV.	AMP _c Y MUCOR	48
V.	OBJETIVO DE LA TESIS	54
	<u>MATERIALES Y METODOS</u>	55
I.	BUFFERS UTILIZADOS	56
II.	PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO	56
II.1.	Organismo	56
II.2.	Obtención de las esporas y mantenimiento de la cepa	56

II.3.	Medio de cultivo	58
II.4.	Cultivos	58
III.	OBTENCION DE LAS FOSFATASAS DE FOSFO- PROTEINAS DE M. ROUXII	59
III.1.	Preparación de los extractos	59
III.2.	Primera cromatografía en DEAE-celulosa	59
III.3.	Segunda cromatografía en DEAE-celulosa	61
III.4.	Filtración en Sephacryl S-300	61
IV.	OBTENCION DE LOS INHIBIDORES DE LAS FOSFATASAS DE FOSFOPROTEINAS	62
V.	PREPARACION DE LOS SUSTRATOS FOSFORI- LADOS	63
V.1.	Fosforilación de histona	63
V.2.	Fosforilación de fosforilasa	64
V.3.	Fosforilación de caseína	65
V.4.	Fosforilación de kémtido	66
VI.	ENSAYOS ENZIMATICOS	66
VI.1.	Fosfatasa de fosfoproteínas	66
VI.2.	Inhibidores de fosfatasas de fosfoproteínas	69
VI.3.	Quinasa de proteínas	69
VII.	TRATAMIENTOS CON AGENTES DESNATURA- LIZANTES Y PROTEASAS	70
VII.1.	Tratamiento de las enzimas con etanol	70

VII.2.	Tratamiento de las enzimas con β -mercapto- etanol	71
VII.3.	Proteólisis de las enzimas con tripsina	71
VII.4.	Tratamiento de los inhibidores a y b con trip- sina	71
VIII.	DETERMINACION Y CALCULO DE LOS PARA- METROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LAS ENZIMAS Y LOS INHIBIDORES	72
VIII.1.	Ultracentrifugación en gradientes de sacaro- sa	72
VIII.2.	Filtración molecular	72
VIII.3.	Cálculo del Radio de Stokes de las enzimas I y II	73
VIII.4.	Cálculo de los coeficientes de sedimentación de las enzimas I y II.	74
VIII.5.	Cálculo de los pesos moleculares de las enzi- mas I y II	74
VIII.6.	Cálculo de los cocientes friccionales de las enzimas I y II	75
VIII.7.	Cálculo de los pesos moleculares de los inhi- bidores a y b	76
IX.	PARAMETROS DE LAS PROTEINAS MARCADORAS	76
X.	OTRAS TECNICAS	76
X.1.	Síntesis de ATP (γ -P ³²)	76
X.2.	Dosaje de proteínas	78
X.3.	Determinación de las proteínas marcadoras	78

X.4.	Medición de la radiactividad	79
X.5.	Medición de la conductividad	79
XI.	REACTIVOS	80
<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>		81
I.	FOSFATASAS DE FOSFOPROTEINAS EN M. ROUXII	82
1.1.	Caracterización preliminar de la actividad de fosfatasa de fosfoproteínas	82
1.2.	Purificación parcial de dos fosfatasas de fosfoproteínas	87
1.3.	Determinación de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de las fosfatasas I y II	90
1.3.1.	Determinación de los coeficientes de sedimentación	93
1.3.2.	Determinación de los radios de Stokes	93
1.3.3.	Cálculo de los pesos moleculares	95
1.3.4.	Determinación de los cocientes friccionales	95
1.3.5.	Algunas consideraciones sobre los parámetros hidrodinámicos y moleculares de las fosfatasas de <u>M.rouxii</u>	97
1.4.	Propiedades catalíticas de las enzimas I y II	98
1.4.1.	Requerimiento de cationes divalentes	98
1.4.2.	Especificidad de sustrato de las fosfatasas I y II	98

1.5.	Efecto de nucleótidos, FNa y fosfato sobre la actividad de las fosfatasas I y II	102
1.6.	Tratamiento de las enzimas con agentes desnaturalizantes y con proteasas	104
II.	INHIBIDORES DE FOSFATASAS DE FOSFOPROTEINAS EN <u>M. ROUXII</u>	110
II.1.	Separación de dos inhibidores de fosfatasas de fosfoproteínas	110
II.2.	Cálculo de los pesos moleculares de los inhibidores a y b	115
II.3.	Naturaleza de los inhibidores a y b	115
II.4.	Efecto de los inhibidores a y b sobre las fosfatasas de <u>M rouxii</u>	117
II.4.1.	Utilizando histona-P como sustrato	117
II.4.2.	Utilizando fosforilasa a como sustrato	118
II.5.	Comparación de la acción de los inhibidores a y b con la de los quelantes de metales	120
II.6.	Efecto del "envejecimiento" sobre el inhibidor b	122
III.	ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LAS FOSFATASAS DE M. ROUXII Y SUS INHIBIDORES	124
IV.	CONCLUSIONES	128
	BIBLIOGRAFIA	130

INTRODUCCION

I. FOSFORILACION Y DEFOSFORILACION DE PROTEINAS.

I.1. Generalidades

La modificación covalente de enzimas y proteínas regulatorias a través del ciclo fosforilación-defosforilación de residuos de serina, treonina o tirosina es un mecanismo muy importante en la regulación de numerosos procesos biológicos (Weller, 1979; Cohen, 1978; Cohen et al, 1981).

En la década del 30, Lipmann y Levene (1932, 1933) demostraron la existencia de fosfato unido en forma covalente a proteínas de la clara del huevo y de la leche. Sin embargo, debieron pasar 20 años para que Krebs y Fischer (1956; Krebs et al., 1959) primero y luego Friedman y Larsen (1963), trabajando con las enzimas del ciclo del glucógeno, establecieron la relación entre el proceso de fosforilación-defosforilación y la regulación enzimática.

Las enzimas que fosforilan proteínas, transfiriendo el fosfato terminal de un nucleósido trifosfato a un residuo de aminoácido, se denominan quinasas de proteínas (EC 2.7.1.37). La remoción del fosfato se debe a las fosfatasas de fosfoproteínas (EC 3.1.3.16; EC 3.1.3.17). La acción de estas enzimas

queda esquematizada en la figura 1.

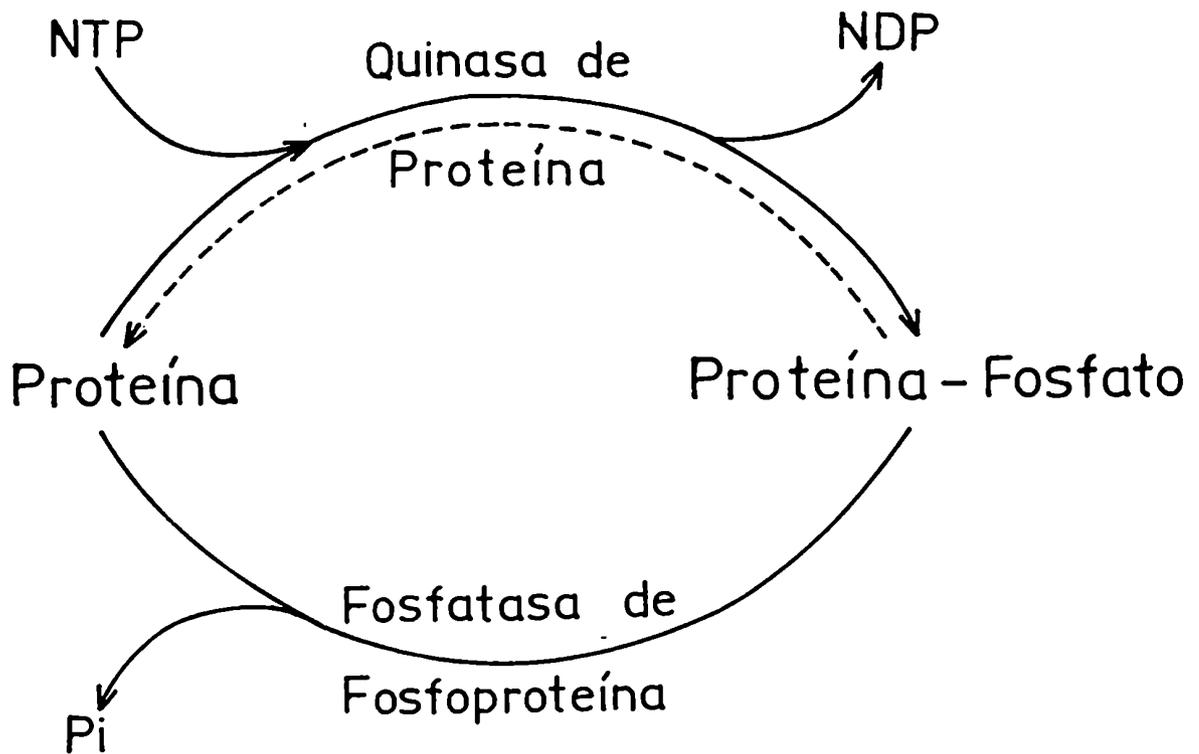


Figura 1: Fosforilación y defosforilación de proteínas.

NTP: nucleósido trifosfato; NDP: nucleósido difosfato.

El fosfato, unido en forma covalente a la proteína, puede modificar las propiedades originales de ésta y, así, afectar el

proceso metabólico en el que la proteína toma parte.

Quizás, uno de los aspectos más importantes en este sistema sea el hecho de que una misma quinasa o fosfatasa pueda actuar sobre numerosos sustratos proteicos. Esta particularidad determina que un amplio espectro de procesos pueda ser controlado por un número discreto de enzimas.

Aunque la fosforilación-defosforilación se presenta, aparentemente, como un mecanismo sencillo de regulación metabólica, hay que tener en cuenta que numerosas proteínas se fosforilan en más de un sitio (Hayakawa et al., 1973; Cohen, 1973; Embi et al., 1980; Cohen, 1982). La fosforilación en diferentes sitios puede tener efectos distintos y, además, puede ser catalizada por más de una quinasa (Embi et al., 1980; Cohen, 1982), así como diferentes fosfatasas pueden llevar a cabo la defosforilación (Antoniw y Cohen, 1976 ; Ganapathi et al., 1981; Cohen, 1982).

1.2. Fosforilación y AMP_c

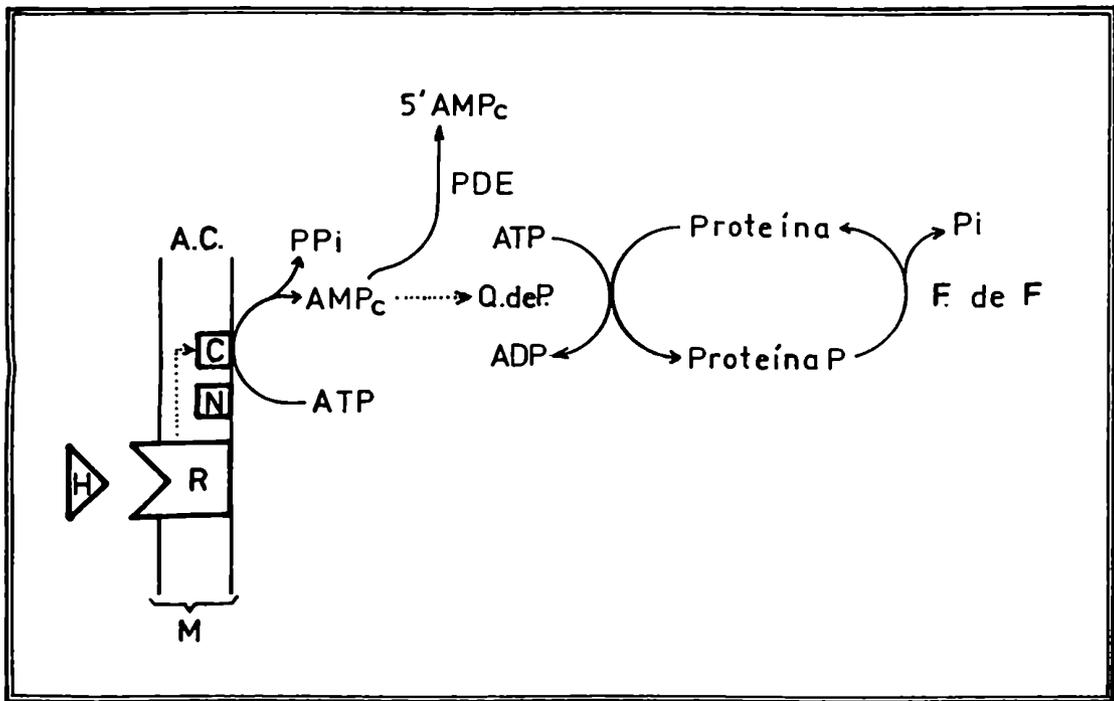
A fines de la década del 50, el grupo de Sutherland (Rall et al., 1957) descubrió que una molécula pequeña era la responsable del efecto activante de ciertas hormonas sobre la fosforilasa del glucógeno. Este metabolito resultó ser el AMP_c. El mismo au-

tor le adjudicó al nucleótido cíclico el papel de segundo mensajero (Robinson et al., 1971), siendo el primer mensajero las hormonas. Estas llevan la información desde el órgano que las produce o las acumula al órgano "blanco". En las células del órgano receptor del mensaje, el que lo trasmite es el AMP_c.

Las hormonas peptídicas, las catecolaminas y las prostaglandinas se unen a receptores específicos localizados en la parte externa de la membrana celular. Como consecuencia de esta unión, se activa la adenilato ciclasa, enzima cuya subunidad catalítica se encuentra en la zona interna de la membrana. Al aumentar los niveles intracelulares de AMP_c, se activan las quinasas de proteínas dependientes de este nucleótido y fosforilan ciertas proteínas, hecho que desencadena determinados efectos fisiológicos. El ciclo comienza a revertirse cuando la fosfodiesterasa de AMP_c disminuye los niveles de este metabolito. Las fosfatasa defosforilan las proteínas volviendo el sistema a su estado original. Estos eventos quedan esquematizados en la figura 2.

Los siguientes criterios fueron propuestos por Krebs (1973) para decidir si un efecto del AMP_c está mediado por fosforilación proteica:

1- El tipo de célula involucrado en el efecto del AMP_c contiene



una quinasa de proteínas dependiente de AMP_c

- 2- Existe un sustrato proteico que tiene una relación funcional con el proceso.
- 3- La fosforilación del sustrato altera su función in vitro.
- 4- El sustrato proteico se modifica in vivo en respuesta al nucleótido cíclico.
- 5- Existe una fosfatasa de fosfoproteínas capaz de revertir el proceso.

Si bien son numerosos los procesos que responden a estas pautas, los tres más ampliamente estudiados son los siguientes:

- 1 - La aceleración de la glucogenolisis, proceso en el cual, una serie de fosforilaciones en cadena llevan a la activación de la fosforilasa del glucógeno (Krebs y Fischer, 1956; Krebs et al., 1959).
- 2 - La inhibición de la síntesis del glucógeno por inactivación de la sintetasa del glucógeno (Friedman y Larner, 1963; Schlender et al., 1969; Soderling et al., 1970).
- 3 - Aumento de la lipólisis en tejido adiposo por activación de la lipasa (Huttunen et al., 1970).

Finalmente, es importante tener en cuenta que el mecanismo descrito actúa también como amplificador del mensaje, ya que la hormona, en concentraciones de 10^{-10} - 10^{-8} M lleva la concentración del AMP_c de 10^{-8} M a 10^{-5} M y éste causa efectos sobre metabolitos cuya concentración está en el orden de 10^{-4} - 10^{-3} M.

II. QUINASAS DE PROTEINAS

II.1. Clasificación.

Krebs y Beavo (1979) hicieron una clasificación de las quinasas de proteínas, tomando como criterio el efector del cual depende la actividad de la enzima.

En la Tabla I se detalla esta clasificación con algunos agregados.

TABLA I

Clasificación de las quinasas de proteínas

Efector	
AMP _c	Tipo I y II.
Ca ²⁺	Quinasa de la fosforilasa Quinasa de la cadena li- viana de la miosina.
GMP _c	1
Hemina	1
ARN de doble cadena	1
Poliaminas	1
FEC (factor epidérmico de crecimiento)	1
Ca ²⁺ y fosfolípidos	1
Sin modulador conocido	Varios ejemplos.

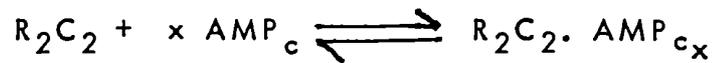
11.2. Quinasas de proteínas dependientes de AMP_c

Este tipo de enzimas fue descrito por primera vez a fines de la década del 60 (Walsh et al., 1968; Angan, 1968). Su mecanismo de activación fue dilucidado casi simultáneamente por el grupo de Lipmann (Tao et al., 1970) y por Gill y Garren (1971). Trabajando con quinasa de proteínas de reticulocitos de conejo, descubrieron que la enzima estaba formada por dos tipos de subunidades diferentes: una responsable de la actividad catalítica (C), encargada de transferir el fosfato del ATP a la proteína y otra con propiedades regulatorias (R), que en ausencia de AMP_c se halla unida a C, inhibiéndola. Ambas subunidades forman una holoenzima inactiva de estructura tetramérica R₂C₂ (Beavo et al., 1975). Cuando la enzima se disocia, se liberan dos subunidades catalíticas y un dímero de la subunidad regulatoria (R₂). Esto ocurre en presencia de AMP_c, ya que la subunidad regulatoria se une al nucleótido cíclico y pierde afinidad por la subunidad catalítica.

La estequiometría de la reacción fue dilucidada por Corbin et al. (1980) y se puede esquematizar de la siguiente manera:



Los estudios cinéticos llevados a cabo por varios autores (Armstrong y Kaiser, 1978; Yücel y Ozer, 1981) favorecen la hipótesis de la formación de un complejo ternario como paso intermedio de la disociación:



En esta reacción no se conocen aún cuántos moles de AMP_c se unen por mol de holoenzima.

En nuestro laboratorio, trabajando con quinasa de Mucor rouxii, se ha logrado aislar este complejo ternario (Pastori et al., 1981).

Las quinastas de proteínas obtenidas de diferentes tejidos tienen propiedades similares. Se puede lograr fosforilación utilizando sustratos y enzimas obtenidos de diferentes fuentes e, incluso, es posible reconstituir holoenzimas heterólogas utilizando subunidades regulatorias y catalíticas de distinto origen (Huttunen et al., 1970; Corbin et al., 1970; Yamamura et al., 1972).

Se pueden diferenciar dos tipos de quinastas de proteínas dependientes de AMP_c . Se las denomina I y II según el orden en que eluyen de una columna de DEAE-celulosa.

Las principales diferencias entre las dos enzimas son las

siguientes:

- 1- Las de tipo II requieren AMP_c para disociarse, mientras que las del tipo I lo pueden hacer no sólo por nucleótido cíclico sino también en presencia de histona o de alta concentración salina (Corbin et al., 1975).
- 2- Las subunidades de las quinasas de tipo II se reasocian inmediatamente cuando se elimina el AMP_c del medio, salvo que la concentración salina sea muy alta (Cl Na 0,5M). Por el contrario, las quinasas del tipo I pueden mantenerse disociadas en ausencia de AMP_c y Cl Na (Fleischer et al., 1976).
- 3- En las quinasas del tipo II puede haber autofosforilación de la subunidad regulatoria (Erlichman et al., 1974).

Las subunidades regulatorias de estas enzimas son distintas y a esto se puede atribuir las diferencias observadas en el comportamiento de las holoenzimas I y II, ya que sus subunidades catalíticas son muy similares, sino idénticas (Takai et al., 1974).

Las quinasas de proteínas dependientes de AMP_c actúan sobre un gran número de sustratos. En la Tabla II se compilan algunas de las proteínas que pueden ser fosforiladas por estas enzimas.

TABLA II

Algunos sustratos de las quinasas de proteínas dependientes de AMP_c

Sustrato

Quinasa de la fosforilasa (Subunidades α y β)

Sintetasa del glucógeno (sitios 1a, 1b y 2)

Inhibidor 1 de las fosfatasa de fosfoproteínas

Piruvato quinasa

Acetil CoA carboxilasa

Histonas (H2B, H1)

Lipasa sensible a hormonas

Troponina I

Fosfodiesterasa de AMP_c

Colesterol esterasa

Walsh y Ashby (1973) descubrieron un inhibidor termoestable de quinasas de proteínas dependientes de AMP_c, cuyo efecto inhibitorio se debe a que se une específicamente a la subunidad catalítica libre.

II. 3. Otras quinastas de proteínas.

La quinasa de la fosforilasa, (enzima que fosforila la fosforilasa del glucógeno, activándola) es un complejo formado por cuatro subunidades diferentes: α , β , γ y δ , organizadas de manera $(\alpha \beta \gamma \delta)_4$ (Cohen, 1973; Hayakawa et al., 1973). La subunidad δ es la que lleva la actividad catalítica (Skuster et al. 1980); la subunidad β se fosforila (ver Tabla II) y activa a la enzima (Cohen, 1973; Hayakawa et al., 1973); la subunidad α también se fosforila, pero se desconoce el efecto que este proceso produce (Cohen, 1973; Ganapathi et al., 1981). La subunidad δ es capaz de unir Ca^{2+} y su estructura es idéntica a la de la calmodulina (Grand et al., 1980). El Ca^{2+} aumenta la actividad de la quinasa de la fosforilasa.

La enzima que fosforila la cadena liviana de la miosina también se activa por Ca^{2+} , por un mecanismo que requiere la presencia de calmodulina (Nair y Perry, 1978).

Kuo y Greengard (1970) encontraron, en artrópodos, una actividad de quinasa de proteínas dependiente de GMP_c . Posteriormente se encontró esta misma actividad en tejidos de mamíferos (Nakazawa y Sano, 1975; Hofmann y Sold, 1979). Estas quinastas pueden fosforilar una amplia gama de sustratos proteicos.

En lisados de reticulocitos de conejo existe una quinasa que fosforila el factor de iniciación 2 de la síntesis de proteínas (IF_2). Esta fosforilación inhibe la síntesis de proteínas. La hemina inhibe a esta enzima y, como consecuencia, activa la síntesis de proteínas (Trachsel, 1977; Levin et al., 1978).

Farrell et al. (1977) descubrieron que la inhibición que ejercía el ARN de doble cadena sobre la síntesis de proteínas, se debía a la activación, por este ácido nucleico, de una quinasa capaz de fosforilar la subunidad α del IF_2 .

El factor epidérmico de crecimiento (FEC) es una hormona peptídica que, al unirse a receptores específicos en la célula "blanco", desencadena una serie de procesos celulares. Una respuesta inmediata que genera el FEC es una fosforilación rápida de proteínas asociadas a la membrana. Una característica peculiar de la quinasa estimulada por FEC es que fosforila las proteínas en residuos de tirosina (Haigler et al., 1978).

Atmar et al. (1981) encontraron una quinasa de proteínas nucleares no histónicas, dependiente de poliaminas.

Takai et al. (1979) identificaron una enzima (quinasa de proteínas C) que se activa por Ca^{2+} y fosfolípidos. Esta enzima se halla en varios tejidos y fosforila sustratos como la

proteína básica de la mielina y las subunidades I y T de la tropomina.

Finalmente existen varias quinasas sin moduladores conocidos. Entre estas enzimas podemos citar las que fosforilan la piruvato dehidrogenasa (Sugden et al., 1979), caseína (Flockart y Corbin, 1982) y la sintetasa del glucógeno en los sitios 3a, b y c (Embi et al., 1980) y en el sitio 5 (Cohen et al., 1982).

Dentro del grupo de quinasas cuyos moduladores se desconocen (o no los tienen), podemos ubicar a las quinasas de tirosina (distintas a la ya mencionada quinasa de tirosina que se activa por FEC). El virus del sarcoma de aves, VSA (Levinson et al., 1980), el del sarcoma de Rous, VSR (Hunter y Sefton, 1980) y el del sarcoma felino, VSF (Reynolds et al., 1980) producen transformaciones malignas en las células que infectan. Las transformaciones están relacionadas con el producto de un gen en particular (oncogen) que, en el caso del VSA, se llama src y su producto ($pp60^{src}$) es una quinasa de tirosina (Beemon y Hunter, 1978). Posteriormente se descubrió que las células normales tienen un gen, el sarc, cuya proteína, llamada $pp60^{sarc}$, es análoga a la $pp60^{src}$, teniendo también una actividad fosforilante de tirosina

(Purchio et al., 1978; Beemon y Hunter, 1978; Collet et al., 1978).

III. FOSFATASAS DE FOSFOPROTEINAS.

III.1. Antecedentes.

Cori y Green (1943) describieron una enzima que transformaba la fosforilasa a (activa) en fosforilasa b (inactiva). La llamaron enzima PR, porque supusieron que eliminaba un grupo prostético. En la misma década, Harris (1946) encontró, en huevos de sapo, una actividad que hidrolizaba grupos fosfato unidos a proteína y la llamó fosfatasa de fosfoproteínas.

Sutherland y Wosilait (1955) encontraron que la enzima PR era una fosfatasa. Friedman y Larner (1963) demostraron que la enzima que activaba la sintetasa del glucógeno también era una fosfatasa. Krebs y colaboradores descubrieron una fosfatasa de la quinasa de la fosforilasa (Riley et al., 1968).

Todos estos estudios condujeron a suponer que cada uno de estos sustratos tenía una fosfatasa específica. Sin embargo, cuando se descubrió la amplia especificidad de sustratos de la quinasa

de proteínas dependiente de AMP_c , se supuso que la(s) fosfatasa(s) de fosfoproteínas podrían comportarse de un modo similar.

Actualmente, esta especulación ha sido ampliamente confirmada por numerosos estudios, en los que se comprobó que enzimas aisladas de diferentes fuentes, actuaban sobre numerosos sustratos (Li, 1982; Ingebritsen y Cohen, 1983).

Sin embargo, hasta el presente, se hace muy difícil una clasificación sistemática de las fosfatasas de fosfoproteínas e, incluso, es dificultosa la comparación entre las enzimas descritas por diferentes autores.

Los métodos de extracción, sustratos utilizados y criterios de clasificación adoptados en los distintos laboratorios, conducen a esta confusión.

Sin embargo, poco a poco, se han ido estableciendo similitudes entre las enzimas descritas por distintos grupos de investigación y hay intentos de clasificación que podrían abarcar todas las enzimas estudiadas.

III.2. Fosfatasas de fosfoproteínas en tejidos de eucariontes superiores.

III. 2.1. Hígado

Luego de los primeros estudios en los que se pudo establecer la existencia de actividad fosfatásica de fosfoproteínas (ver sección III.1. de esta Introducción), se realizaron trabajos conducentes a aislar y caracterizar estas enzimas en los diferentes tejidos.

Meisler y Langan (1969) describieron la existencia, en hígado de rata, de una actividad capaz de defosforilar histona y protamina fosforiladas. Esta actividad se desdoblaba en dos picos por cromatografía en DEAE-celulosa.

Lee y sus colaboradores realizaron exhaustivos estudios sobre las fosfatasas de la fosforilasa a en hígado de conejo. Lograron purificar a homogeneidad una enzima de $PM=35.000$ con un procedimiento que incluía un tratamiento de los extractos crudos con etanol al 80 %: la actividad total de fosfatasa aumentaba luego del tratamiento con alcohol (Brandt et al., 1975a). Esta enzima era independiente de cationes y se inhibía en presencia de AMP. Posteriormente se estableció la amplia especificidad de sustratos que presentaba (Killilea et al., 1976). Estos mismos autores obser

varon que esta entidad de bajo peso molecular a la que llamaron C (subunidad catalítica) derivaba de formas de mayor peso molecular (Killilea et al., 1979; Mellgren et al., 1979). Con procedimientos suaves de ruptura y extracción, detectaron la presencia de una enzima de PM= 260.000 a la que llamaron holoenzima (H). Posteriormente, tanto en el laboratorio de Lee (Ganapathi et al., 1981) como en el de Cohen (Ingebritsen et al., 1980) se demostró que la fosfatasa C era, en realidad, una mezcla de dos enzimas diferentes.

Kobayashi et al. (1975), trabajando con extractos solubles de hígado de conejo, separaron por cromatografía en DEAE-celulosa, tres actividades fosfatásicas (I, II y III). Todas actuaban sobre la fosforilasa α y sobre fosfohistona, pero con distinta especificidad. Mientras que las enzimas I y II actuaban en forma similar sobre ambos sustratos, la enzima III era preferentemente una fosfatasa de la fosforilasa α . Estas enzimas se activaban por el agregado de Mn^{2+} .

Khandewal, Vandenheede y Krebs (1976) a partir de hígado de conejo, lograron purificar a homogeneidad dos enzimas (I y II) que se separaban en una columna de afinidad de histona -

Sepharosa. El peso molecular de las enzimas I y II resultó ser 30.500 y 34.000 respectivamente. Ambas defosforilaban la fosforilasa a, la sintetasa del glucógeno, fosfocaseína y fosfohistona.

Mackenzie et al. (1980), trabajando con la porción soluble de hígado de rata, separaron tres enzimas (I, II y III). La enzima II, a su vez, pudo ser desdoblada en dos fracciones diferentes, IIa y IIb. Luego las clasificaron en dos grupos, de acuerdo a sus propiedades. El grupo 1, formado por las enzimas I, IIa y III tenía preferencia por la fosforilasa a, sus pesos moleculares eran mayores que 100.000 y se activaban por tratamiento con etanol. El grupo 2, formado sólo por la enzima IIb, prefería la sintetasa del glucógeno como sustrato, su peso molecular era 50.000, no se activaba por tratamiento con etanol y era dependiente de catión divalente.

Tsuiki y sus colaboradores (Tamura y Tsuiki., 1980; Tamura et al., 1980; Hiraga et al., 1981), trabajando con extractos de hígado de rata, aislaron tres enzimas, IA, IB y II. La enzima IA (PM=69.000), actuaba sobre la sintetasa del glucógeno y sobre fosfohistona; la enzima IB (PM=260.000), defosforilaba fosfohistona y fosforilasa a, mientras que la enzima II (PM=160.000) también ac-

tuaba sobre estos dos sustratos, pero con preferencia hacia la fosforilasa a.

Goris et al. (1977) aislaron, a partir de hígado de perro, una fosfatasa de la fosforilasa a asociada al glucógeno, que se podía diferenciar de la hallada en el citosol.

En otros laboratorios se describieron fosfatasas de fosfoproteínas de hígado, utilizando diferentes sustratos (Pinna et al., 1976; Titanji et al., 1980; Doperé et al., 1980; Jett et al., 1981).

III.2.2. Músculo esquelético.

Kobayashi y Kato (1977) separaron tres enzimas de la fracción soluble de músculo de conejo. Las propiedades de estas enzimas eran similares a las de las enzimas correspondientes aisladas de hígado por estos mismos autores (ver sección III.2.1. de esta Introucción).

En el laboratorio de Fischer (Gratecos et al., 1977), a partir de músculo esquelético de conejo, se purificó una fosfatasa de la fosforilasa a, que estaba unida al glucógeno. Esta purificación incluía una cromatografía de afinidad en polilisina-Sepharosa y, para eluir la enzima de la columna, se utilizó urea 6M. El

peso molecular de la enzima era, aproximadamente, 33.000. Esta fosfatasa actuaba también sobre troponina I, pero no sobre la sintetasa del glucógeno, la quinasa de la fosforilasa o sobre fosfoésteres.

Antoniw y Cohen (1976), partiendo de músculo de conejo, separaron dos enzimas que defosforilaban la quinasa de la fosforilasa. Una actuaba específicamente sobre la subunidad α de esta enzima, mientras que la otra lo hacía sobre la subunidad β . Sus pesos moleculares eran 180.000 y 80.000 respectivamente. Posteriormente (Antoniw et al., 1977) separaron tres enzimas por columna de filtración molecular: la fosfatasa I (PM=300.000), era principalmente una fosfatasa de fosfohistona; la enzima II (PM=170.000) defosforilaba la subunidad α de la quinasa de la fosforilasa y también fosfohistona, pero su actividad sobre otros sustratos no era apreciable en este tejido; y la enzima III (PM=75.000 ó 46.000) era la principal fosfatasa de la fosforilasa α , de la sintetasa del glucógeno y de la subunidad β de la quinasa de la fosforilasa. Posteriormente clasificaron estas enzimas en dos grupos (ver sección III.4. de esta Introducción).

Lee y sus colaboradores encontraron en músculo esquelético de conejo, dos enzimas similares a las que habían descrito en

hígado (ver sección III.2.1. de esta Introducción). Ambas eran de bajo peso molecular (32.000 y 33.500). Una de ellas defosforilaba específicamente la subunidad β y la otra, la subunidad α de la quinasa de la fosforilasa (Lee et al., 1980; Ganapathi et al., 1981; Silberman et al., 1984).

III.2.3. Corazón.

En el laboratorio de H.C.Li se realizaron extensivos estudios sobre las fosfatasas de fosfoproteínas de corazón canino (Li, 1975; Hsiao et al., 1977; Li y Hsiao, 1977; Li et al., 1978; Binstock y Li, 1979). Se describieron cinco entidades: A, B, C, U₁ y U₂, de pesos moleculares 156.000, 161.000, 95.000, 61.000 y 49.000 respectivamente. Las primeras tres enzimas actuaban sobre fosforilasa α , fosfocaseína y fosfohistona, y no requerían cationes divalentes, aunque el Mn^{2+} las activaba débilmente. Estas enzimas también actuaban como fosfatasas alcalinas en presencia de Mg^{2+} . Por el contrario, U₁ y U₂ eran dependientes de cationes divalentes, y estos autores encontraron que U₂ era la principal responsable de la defosforilación de la sintetasa del glucógeno en músculo cardíaco.

Chou, Alfano y Rosen (1977), a partir de corazón bovino y

siguiendo un procedimiento similar al utilizado por Brandt et al. (1975a) en hígado, lograron llevar a homogeneidad una enzima de $PM=30.000$, capaz de defosforilar la quinasa de proteínas dependiente de AMP_c . Esta enzima actuaba también sobre otros sustratos. La defosforilación de la quinasa requería AMP_c , no así la de otras proteínas fosforiladas.

Killilea et al. (1978) por un lado y Khandelwal (1979) por el otro, utilizando tratamientos que incluían precipitación con etanol, lograron purificar enzimas con propiedades similares a las de las enzimas de bajo peso molecular estudiadas en otros tejidos.

Diferentes autores pudieron hallar, en mitocondrias de células cardíacas, una enzima capaz de defosforilar a la piruvato de hidrogenasa (Teague et al., 1982; Pratt et al., 1982).

III.2.4. Músculo liso.

Pato y Adelstein (1980; 1983a; 1983b), a partir de buche de pavo, purificaron dos fosfatasas (I y II) capaces de defosforilar la cadena liviana de la miosina. La enzima I era independiente de cationes divalentes y actuaba también sobre la quinasa de la miosina, aunque con menor eficiencia que sobre la miosina misma. La enzima

II requería Mg^{2+} para su actividad y, prácticamente, no actuaba sobre la quinasa de la miosina.

III.2.5. Reticulocitos.

Mumby y Traugh (1980), trabajando con reticulocitos de conejo, lograron separar, por cromatografía en DEAE-celulosa y filtración molecular, varias fosfatasa de fosfoproteínas. Las clasificaron en varios grupos según su peso molecular: el grupo B (PM=270.000) defosforilaba la proteína ribosomal S6 (fosforilada por la quinasa de proteínas dependiente de AMP_c), el factor de iniciación 3 de la síntesis de proteínas (fosforilado por la quinasa II de caseína) y el factor de iniciación 2 (fosforilado por diferentes quinasas). La forma C (PM=140.000) defosforilaba todos estos sustratos, salvo el factor de iniciación 2. Las formas A (PM > 500.000) y D (PM=180.000) se hallaban en cantidades escasas.

Grankowsky et al. (1980a) caracterizaron, en reticulocitos de conejo, una enzima capaz de defosforilar el factor de iniciación 2, fosforilado por el represor de la síntesis de proteínas controlado por hemina. El peso molecular de esta enzima estaba en el orden de 76.000 y su actividad era estimulada por Mn^{2+} .

Crouch y Safer (1980) purificaron hasta homogeneidad aparente, también a partir de reticulocitos de conejo, una enzima de PM=98.000 capaz de defosforilar el factor de iniciación 2, tanto en la subunidad α como en la β .

III.2.6. Fosfatasa de fosfoproteínas de otras fuentes.

Maeno y Greengard (1972) hallaron varias actividades de fosfatasa de fosfoproteínas en diferentes fracciones de la corteza cerebral. Knight y Skala (1979) describieron fosfatasa en tejido adiposo pardo de rata. Krakower y Kim (1981) purificaron una fosfatasa de la acetil CoA carboxilasa a partir del pánículo adiposo del epidídimo de rata. También se encontraron fosfatasa de fosfoproteínas en diferentes células sanguíneas (Klener y Westhead, 1980; Clari y Moret, 1981), así como en otros tejidos de mamíferos (Hardie y Cohen, 1979; Reyl y Lewin, 1981; Mellgren y Schlender, 1982).

Albin y Newburgh (1975) hallaron actividad fosfatásica en el sistema nervioso central del insecto Manuca sexta.

En vegetales se describieron estas enzimas en hipocótilos de soja (Paul et al., 1980) y en cloroplastos de Pisum sativum (Bennett, 1980).

III.2.7. Fosfatasa de fosfoproteínas dependiente de ATP-Mg.

En el laboratorio de Merlevede (Defreyn et al., 1977; Goris et al., 1977; Yang et al., 1980; Vandenneede et al., 1980), a partir de diferentes tejidos, se aisló, purificó y caracterizó una fosfatasa de fosfoproteínas dependiente de ATP-Mg.

Los estudios de Merlevede y colaboradores demostraron que la defosforilación del sustrato la lleva a cabo un factor catalítico (F_C , PM=70.000) que, además de ATP y Mg^{2+} requiere, para ser activado, la presencia de otro factor (F_A , PM=50.000). En estudios posteriores se precisó que F_A es una quinasa de la sintetasa del glucógeno y que puede ser reemplazada por C (la subunidad catalítica de la quinasa de proteínas dependiente de AMP_C) en la activación de F_C . Pese a que esto conduciría a pensar que estaría implicada una fosforilación en el mecanismo de activación, no se observó incorporación significativa de fosfato a ninguno de los factores (Yang et al., 1980).

Recientemente se descubrió que una fosfatasa espontáneamente activa se puede volver dependiente de ATP-Mg por tratamiento con el inhibidor 2 de fosfatasas de fosfoproteínas (Hemmings et al., 1982). De este modo, F_C sería un complejo inactivo de una subuni-

dad catalítica y el inhibidor 2. Una fosforilación transiente del inhibidor 2 en presencia de ATP-Mg y F_A o C, permitiría la liberación de la subunidad catalítica y su activación.

La especificidad de sustrato de esta enzima es idéntica a la de las enzimas clasificadas por Cohen como fosfatasas del tipo 1 (ver sección III.4. de esta Introducción).

III.2.8. Calcineurina.

Stewart et al. (1982), trabajando con una fosfatasa de músculo esquelético de conejo que se activaba por Mn^{2+} (fosfatasa 2 B, ver sección III.4. de esta Introducción), descubrieron que la activación era mayor si en lugar de Mn^{2+} se agregaba Ca^{2+} y calmodulina. Esta enzima estaba compuesta por dos subunidades (PM=60.000 y 15.000). Todos estos datos condujeron a postular que la enzima podría tener identidad con la calcineurina (Klee et al., 1979; Wallace et al., 1980), proteína que en presencia de calcio es capaz de unirse a la calmodulina (Cheung, 1970; Cheung, 1981). Por otra parte, preparaciones purificadas de calcineurina mostraban una actividad fosfatásica indistinguible, en cuanto a sus propiedades, de la fosfatasa 2 B.

A su vez, Yang et al. (1982) demostraron que la actividad fosfatásica y la calcineurina cosedimentaban en gradiente de sacarosa y coincidían en gel de poliacrilamida no desnaturizante.

III.2.9. Fosfatasa de fosfotirosina.

Cuando se habla de fosfatasa de fosfoproteínas, sin otra aclaración, se da por sobreentendido que se trata de las enzimas que defosforilan residuos de serina o treonina.

A partir del descubrimiento de las quinasas que fosforilan proteínas en residuos de tirosina y la relación de estas fosforilaciones con ciertas transformaciones malignas (ver la sección II.3. de esta Introducción), se abrió el campo para el estudio de las enzimas que revierten este proceso.

Brautigan et al. (1981) describieron, en carcinoma epidermoide humano, una fosfatasa que defosforilaba preferentemente proteínas fosforiladas en tirosina. Esta enzima (PM=40.000) se inhibía por Zn^{2+} y su actividad aumentaba en presencia de EDTA o fluoruro (inhibidores tradicionales de las fosfatasa de fosfoproteínas). Sus propiedades eran claramente diferenciables de las del resto de las fosfatasa de fosfoproteínas (que defosforilan treoni-

na y serina) y de las fosfatasas alcalinas.

Foulkes et al. (1981) hallaron en extractos de músculo e hígado de rata, una enzima capaz de defosforilar la cadena pesada de la inmunoglobulina G, fosforilada sólo en residuos de tirosina. Esta enzima también se inhibía por Zn^{2+} y era diferente del resto de las fosfatasas de fosfoproteínas.

Swarup et al. (1982) pudieron establecer que, mientras que en fosfatasas alcalinas se podía detectar una actividad importante de fosfatasa de fosfotirosina, en fosfatasas de fosfoproteínas, esta actividad era despreciable. Sin embargo, Li et al. (1981) habían hallado que las fosfatasas de fosfoproteínas llamadas I y II tenían capacidad de defosforilar, en presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} , fosfoinmunoglobulina (IgG-Tyr-P).

III.3. Regulación de las fosfatasas de fosfoproteínas.

III.3.1. Cationes divalentes.

El efecto de los cationes divalentes sobre las fosfatasas es otro tema controvertido. No sólo es difícil establecer la relación entre las diferentes enzimas activables por cationes divalentes o entre las activables y las no activables, sino que algunas

enzimas descritas muestran dependencia de este tipo de iones cuando actúan sobre un sustrato y no cuando actúan sobre otro.

En numerosos laboratorios se describieron fosfatasas activables por cationes divalentes, siendo Mn^{2+} , Mg^{2+} y Co^{2+} , en este orden, los más citados (Li y Hsiao, 1977; Binstock y Li, 1979; Kobayashi et al., 1975; Brautigan et al., 1980; Li, 1982; Ingebritsen y Cohen, 1983). Otros autores estudiaron fosfatasas insensibles o algo inhibibles por cationes divalentes (Brandt et al., 1975a; Li et al., 1978; Gratecos et al., 1977; Lee et al., 1980; Li, 1982).

Se puede decir que, en general, aunque no en forma absoluta, las actividades de fosfatasa de fosfohistona y de sintetasa de glucógeno, se activan en presencia de cationes divalentes, mientras que las de fosforilasa a y de quinasa de la fosforilasa, son insensibles o se inhiben.

Torres y Chelala (1970) encontraron que una fosfatasa de la fosforilasa a, obtenida de músculo esquelético de conejo, se inhibía por diferentes nucleótidos. Posteriormente, numerosos estudios (Li, 1982; Kandelwal, 1977; Hsiao et al., 1978; Khatra y Soderling, 1978; Mackenzie et al., 1980) dan cuenta de la acción

de nucleótidos y otros agentes quelantes de metales (fluoruro, EDTA) sobre las fosfatasas.

En general, estos agentes inhiben a la enzima en forma permanente, incluso luego de haber sido retirados. Esta inhibición se revierte por el agregado de cationes divalentes (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+}).

Estos datos condujeron a postular que algunas fosfatasas de fosfoproteínas podrían ser metaloenzimas espontáneamente ac tivas. El tratamiento con quelantes sustraería el metal y tornaría inactiva a la enzima. La presencia del catión divalente en el ensayo, o la preincubación con estos metales, volvería la enzima a su estado inicial activo (Li, 1982).

Si bien muchos datos apoyan esta hipótesis, Fischer y sus colaboradores, trabajando con $^{54}Mn^{2+}$, no pudieron observar radiactividad unida a proteína en una enzima de músculo esquelético de conejo que previamente había sido tratada con agentes quelantes (Brautigan et al., 1980).

III.3.2. Efecto de los agentes desnaturalizantes y la proteólisis sobre las propiedades catalíticas de las fosfatasas de fosfoproteínas.

El tratamiento de las fosfatasa de fosfoproteínas con agentes desnaturizantes o la proteólisis controlada, producen, además de variaciones en el tamaño de las enzimas (ver sección III.5. de esta Introducción), cambios importantes en sus propiedades catalíticas.

Brandt et al. (1975a), al tratar extractos crudos de hígado de conejo con altas concentraciones de etanol (80%), notaron que la actividad total de fosfatasa de fosforilasa a aumentaba sensiblemente.

Kobayashi et al. (1975), trabajando con tres fracciones diferentes de fosfatasa, provenientes de hígado de conejo, observaron que, luego de ser congeladas y descongeladas en presencia de β -mercaptoetanol 0,2M, la actividad fosfatásica de fosforilasa a aumentaba sensiblemente, no así la de histona. En todos los casos, el Mn^{2+} , que antes del tratamiento era activante, luego del mismo no modificaba la actividad (cuando se utilizaba fosfohistona como sustrato) o la inhibía (cuando se utilizaba fosforilasa a).

Brautigan et al. (1982), trabajando con una fosfatasa de la fosforilasa a de músculo de conejo, encontraron que el tratamiento con tripsina activaba a la enzima y que, si la proteólisis

se realizaba en presencia de un catión divalente (Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}) esta activación era mucho más notable.

Por otra parte, diferentes autores describieron la existencia de formas latentes de fosfatasas de fosfoproteínas, cuyas actividades sólo se hacen evidentes después de tratamientos con agentes desnaturizantes (Brautigan et al., 1980; Jett y Hers, 1981; Ingebritsen et al., 1983a).

Los trabajos en que se detallan variaciones en las propiedades catalíticas de fosfatasas de fosfoproteínas por este tipo de tratamientos son numerosos (Lee et al., 1980; Li, 1982; Ingebritsen et al., 1983a): por otra parte, muchas enzimas descritas no modifican sus propiedades luego del tratamiento con agentes desnaturizantes (Li, 1982; Ingebritsen et al., 1983a).

III.3.3. Moduladores proteicos de las fosfatasas de fosfoproteínas.

Brandt et al. (1974; 1975b) descubrieron, en extractos de hígado, la presencia de un inhibidor termoestable de fosfatasas de fosfoproteínas. Este inhibidor era destruído por tratamiento con etanol.

Huang y Glinsmann (1975; 1976a; 1976b) hallaron, en músculo esquelético, dos inhibidores proteicos termoestables

que se separaban en columna de intercambio iónico (se llamó inhibidor 1 al que eluía primero de estas columnas e inhibidor 2 al segundo). El inhibidor 1 es activo sólo cuando está fosforilado. Esta fosforilación es catalizada por la subunidad catalítica de la quinasa de proteínas dependiente de AMP_c . Por el contrario, el inhibidor 2 es espontáneamente activo. Los pesos moleculares respectivos son 20.000 y 25.000 (aunque el peso molecular del inhibidor 1 varía mucho según el criterio utilizado para calcularlo debido a que es una molécula fuertemente asimétrica). Posteriormente, otros autores confirmaron la existencia de estos inhibidores en diferentes tejidos (Goris et al., 1978; Knight y Teal, 1980; Li, 1982).

En el laboratorio de Phillip Cohen se realizaron exhaustivos estudios sobre estos inhibidores. Se pudo establecer que la secuencia de aminoácidos de ambos moduladores era diferente, por lo que se descartó un posible origen común o la derivación de uno en el otro (Nimmo y Cohen, 1978; Foulkes y Cohen, 1980; Aitken et al., 1982). En ese mismo laboratorio se logró comprobar que existía un comportamiento diferencial de las fosfatasas respecto de los inhibidores (Cohen, 1980; Ingebritsen y Cohen,

1983). Aprovechando esta propiedad y otras, Cohen clasificó a las fosfatasas de fosfoproteínas en dos grupos (ver sección III. 4. de esta Introducción). Las enzimas del grupo 1 se inhiben en presencia de cualquiera de estos dos inhibidores, mientras que las del grupo 2 no se ven afectadas por ninguno de ellos. Un hecho que tiene implicancias regulatorias importantes es que, si bien el inhibidor 1 fosforilado inhibe completamente la actividad de las fosfatasas de fosfoproteínas del grupo 1, no inhibe su propia defosforilación por estas enzimas; de esta manera, el inhibidor 1 puede ser defosforilado y desactivado tanto por las enzimas del grupo 1 como por las del grupo 2.

Teniendo en cuenta que:

- 1- El inhibidor 1 es fosforilado y activado por la quinasa de proteínas dependiente de AMP_c .
- 2- La fosforilación del inhibidor 1 aumenta cuando se tratan las células con adrenalina o agonistas β -adrenérgicos (Foulkes et al., 1982).
- 3- Las fosfatasas de fosfoproteínas del grupo 1 defosforilan sus -tratos fosforilados no sólo por la quinasa de proteínas dependiente de AMP_c , sino también por otras quinasas.
- 4- El inhibidor 1 inhibe a las fosfatasas de tipo 1 pero no inhibe

su propia defosforilación por estas enzimas.

Se puede concluir que este sistema no sólo serviría como control de las fosfatasas, sino que permitiría al AMP cíclico controlar procesos en los que intervienen quinasas que no dependen de este nucleótido.

El estudio de activadores de las fosfatasas está mucho menos desarrollado que el de los inhibidores. Sin embargo, algunos autores detectaron la presencia de activadores de fosfatasas en diferentes tejidos (Khandelwal y Zinman, 1978; Grankowsky et al., 1980b; Knight y Skala, 1982).

III.3.4. Otros moduladores de las fosfatasas de fosfoproteínas.

Además del fluoruro, el EDTA, los nucleótidos, los cationes divalentes y los moduladores proteicos, son muchas las sustancias capaces de afectar la actividad de estas enzimas.

El fosfato y el pirofosfato son potentes inhibidores (Li y Hsiao, 1977; Khandelwal, 1978; Li, 1982).

Algunos trabajos dan cuenta de la acción estimuladora de la alta concentración salina (Li y Hsiao, 1977; Khandelwal et al., 1980).

Shimazu et al. (1978) encontraron que una fosfatasa de

hígado se inactivaba por tratamiento con glutatión oxidado.

III.4. Una clasificación de las fosfatasas de fosfoproteínas.

Dadas las aparentes diferencias existentes entre las enzimas descritas por distintos autores, la confección de una clasificación que pudiera agrupar a todas las fosfatasas conocidas se transformó en un proyecto muy ambicioso.

Sin embargo, Phillip Cohen y colaboradores, luego de hacer estudios exhaustivos de las fosfatasas de fosfoproteínas en diferentes tejidos, propusieron una clasificación que abarcaría la mayoría, sino todas las enzimas de mamíferos, excepto las fosfatasas de fosfotirosina (Cohen, 1980; Ingebritsen y Cohen, 1983).

Esta clasificación, según se muestra en la Tabla III, toma en cuenta la especificidad de cada enzima, sus moduladores y el comportamiento que presentan frente a los inhibidores termo estables.

Las enzimas de tipo 1 se inhiben por ambos inhibidores proteicos y defosforilan específicamente la subunidad β de la quinasa de la fosforilasa, mientras que las del tipo 2 son insensibles a estos moduladores y defosforilan la subunidad α de la quinasa de la fosforilasa.

TABLA III

Fosfatasa de fosfoproteínas según la clasificación de P. Cohen

Tipo	Enzima	Sensibilidad a los inhibidores 1 y 2	Especificidad por las subunidades de la quinasa de la fosforilasa	Especificidad de sustrato	Actividad de fosfatasa de fosforilasa	Moduladores conocidos
1		Sí	Subunidad β	amplia	alta	inhibidores 1 y 2
2	A	No	Subunidad α	amplia	alta	
2	B	No	Subunidad α	restringida	muy baja	Ca^{2+} y calmodulina
2	C	No	Subunidad α	amplia	muy baja	Mg^{2+}

Las fosfatasa de fosfoproteínas de tipo 1 pueden presentarse en dos formas: una forma espontáneamente activa y otra que se activa en presencia de ATP-Mg y un factor fosforilante. Esta última sería un complejo de la forma activa y el inhibidor 2 (ver sección III.2.7. de esta Introducción).

La actividad 2A tiene amplia especificidad de sustrato y es independiente de cationes. Se puede separar, por pasaje por DEAE-celulosa en tres fracciones: $2A_0$, $2A_1$ y $2A_2$. Mientras que las formas $2A_1$ y $2A_2$ se activan por tratamiento con agentes desnaturizantes (β -mercaptoetanol), la forma $2A_0$ requiere este tratamiento para manifestarse; es decir, se trata de una forma "latente" o "encubierta" que se transforma en activa luego de ser tratada con β -mercaptoetanol. El tratamiento desnaturizante convierte a estas tres formas en una subunidad catalítica común de PM=34.000 (Ingebritsen et al., 1983a).

La enzima 2B depende de Ca^{2+} y calmodulina y es, probablemente, la calcineurina (ver sección III.2.8. de esta Introducción).

La enzima 2C depende de Mg^{2+} y es activa sobre la sintetasa del glucógeno y la subunidad α de la quinasa de la fos-

forilasa, aunque no defosforila a la fosforilasa a (Ingebritsen y Cohen., 1983).

Algunas de estas enzimas se pueden diferenciar también por sus pesos moleculares, según se puede observar en la Tabla IV.

TABLA IV

Pesos moleculares de las enzimas descritas por Cohen y col.

<u>Enzima</u>	<u>Peso molecular</u>
1	Formas múltiples
2 A ₀	210.000
2 A ₁	210.000
2 A ₂	150.000
2 B	98.000
2 C	45.000

Otro aspecto que encaró Cohen en sus estudios, es la importancia relativa de cada una de estas enzimas en diferentes prog

cesos metabólicos y en distintos tejidos (Ingebritsen et al., 1983a; Ingebritsen et al., 1983b; Ingebritsen et al., 1983c; Pato et al., 1983; Stewart et al., 1983).

De esta manera logró establecer que, en músculo esquelético, la fosfatasa de fosfoproteínas de tipo 1 es la principal responsable de la defosforilación de la fosforilasa a, de la sintetasa del glucógeno y de la quinasa de la fosforilasa (subunidad β); por lo tanto, es la que determina la inactivación de la glucógenolisis y la estimulación de la síntesis del glucógeno. El 50% de la actividad de esta enzima está asociada en un complejo con el glucógeno.

En hígado, las fosfatasas 2A y 2C, también desempeñan un papel importante en el metabolismo del glucógeno. La enzima 1 actúa sobre los mismos sustratos que en músculo y es la única que forma un complejo con el glucógeno. En este tejido, en la defosforilación de la fosforilasa a y de la sintetasa del glucógeno, la enzima 2A tiene una importancia considerable. La enzima 2C actúa en forma detectable sobre la sintetasa del glucógeno.

En ambos tejidos, en ausencia de cationes divalentes, la fosfatasa 2A es la mayor actividad defosforilante de la sub-

unidad α de la quinasa de la fosforilasa y del inhibidor 1. En presencia de Ca^{2+} , este papel lo desempeña la enzima 2B.

La enzima 2A tendría una participación importante en la regulación glucólisis-glucogenolisis y en la síntesis de ácidos grasos, mientras que la enzima 2C lo haría en la síntesis del colesterol, ya que defosforila enzimas relacionadas con estos procesos metabólicos.

III.5. Estructura de las fosfatasas de fosfoproteínas.

El tratamiento de diferentes preparaciones de fosfatasas de fosfoproteínas con agentes desnaturizantes o enzimas proteolíticas, además de modificar las propiedades catalíticas de las fosfatasas (ver sección III.3.2. de esta Introducción), producía una reducción en el tamaño de las mismas (Li, 1982; Lee et al., 1980).

En numerosos laboratorios se logró purificar enzimas de bajo peso molecular (30.000-40.000) cuando, en el proceso de extracción, se incluía un tratamiento con los agentes mencionados (Brandt et al., 1975a; Gratecos et al., 1977; Chou et al., 1977). Las enzimas obtenidas en las extracciones que no incluían estos tratamientos, eran, en general, de pesos moleculares mayores (Lee et al., 1980).

Estos hechos condujeron a Lee et al. (1976; 1978; 1980) a postular que las enzimas de bajo peso molecular podrían ser subunidades catalíticas derivadas de "holoenzimas" de mayor tamaño. Estos autores, utilizando métodos de extracción muy suaves, pudieron detectar en hígado de conejo, una enzima de peso molecular cercano a 260.000, a la que denominaron H(Killilea et al., 1979). La manipulación de esta enzima resultó muy difícil, ya que originaba formas de menor tamaño. A pesar de esta dificultad, lograron llevarla a homogeneidad y comprobaron que estaba formada por subunidades catalíticas de $PM=35.000$ y otras subunidades de $PM=70.000$ (Paris et al., 1984).

En la Tabla V se pueden observar los datos obtenidos en diferentes laboratorios sobre la estructura polimérica de algunas enzimas.

La subunidad que aparece con el nombre de α sería la que posee capacidad catalítica y las otras serían regulatorias.

La estructura de la fosfatasa dependiente de ATP-Mg y la de la enzima 2 B o calcineurina, ya fueron descritas en las secciones III.2.7. y III.2.8. de esta Introducción.

Por otra parte, existen fosfatasas de fosfoproteínas que no tienen estructura cuaternaria y por lo tanto, el tratamiento

con agentes desnaturalizantes no modifica su peso molecular
(Hiraga et al., 1981; Ingebritsen et al., 1983a).

TABLA V

Estructura de algunas fosfatasa de fosfoproteínas

Fuente	Pesos moleculares		Estructura propuesta	Referencias
	Holoenzima	Subunidades		
Hígado de rata	Fosfatasa II 160.000	α :35.000 β :65.000	$\alpha\beta_2$	Tamura et al. (1980)
Buche de pavo	Fosfatasa I 132.000	α :38.000 β :65.000 γ :55.000	$\alpha\beta\gamma$	Pato y Adelstein (1980)
Reticulocitos de conejo	Fosfatasa del factor de iniciación IF-2 98.000	α :39.000 β :60.000	$\alpha\beta$	Crouch y Safer (1980)
Corazón bovino	Fosfatasa tipo I 95.000	α :35.000 β :62.000	$\alpha\beta$	Li (1982)
Músculo esquelético de conejo	Fosfatasa H	α :35.000 β :70.000	$\alpha_2\beta_2$	Paris et al. (1984)

III.6. Fosfatasa de fosfoproteínas en eucariontes inferiores.

En comparación con lo que se sabe sobre fosfatasa de fosfoproteínas en eucariontes superiores, el conocimiento que se tiene de estas enzimas en organismos inferiores es escaso.

Se describieron fosfatasa implicadas en la regulación de la fosforilasa del glucógeno y de la sintetasa del glucógeno, en Saccharomyces cerevisiae (Fosset et al., 1971; Huang y Cabib, 1974) y en Neurospora crassa (Tellez-Iñón et al., 1969; Tellez-Iñón y Torres, 1970), así como en la regulación de la piruvato deshidrogenasa en N. crassa (Wieland et al., 1972).

Sin embargo, la purificación y caracterización de fosfatasa de fosfoproteínas en este tipo de organismos, es relativamente reciente.

Hemmings (1981), trabajando con la levadura Candida utilis, purificó parcialmente una fosfatasa de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD. Esta enzima se activaba en presencia de cationes (Mg^{2+} > Mn^{2+}). Su peso molecular aparente era 40.000 y podía defosforilar otros sustratos (caseína, histona y kémtido).

Wingender-Drissen y Becker (1983) encontraron, en le-

vadura comercial y utilizando fosforilasa a de músculo de conejo como sustrato, tres fracciones con actividad fosfatásica, a las que llamaron a, b y c. Cuando utilizaron fosforilasa a proveniente de la misma levadura como sustrato, sólo la fracción c tuvo capacidad de defosforilarla. Esta enzima era totalmente dependiente de cationes divalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+}) y se activaba por ATP-Mg. Cuando se desnaturalizaba a las enzimas a y b en presencia de β -mercaptoetanol, estas se volvían capaces de defosforilar el sustrato endógeno. La enzima c purificada tenía un peso molecular de 78.000 y, en este estado, era capaz de defosforilar caseína pero no la fosforilasa a de conejo.

Mc Clure y Korn (1983) purificaron una fosfatasa de la miosina II de *Acanthamoeba castellanii*. Su peso molecular era 39.000. Esta enzima también actuaba sobre la cadena liviana de la miosina, pero no sobre ésteres de fósforo ni sobre proteínas fosforiladas en residuos de tirosina. Si bien no se observó activación por moduladores, el ATP, el pirofosfato y el fluoruro inhibían su actividad. Esta última inhibición se revertía parcialmente en presencia de Cl_2Mn . Esta enzima no se inhibía por el inhibidor 2 de conejo. Estos datos condujeron a los autores a postular que esta enzima sería del tipo 2A, según la clasifica-

ción de Cohen (ver sección III.4. de esta Introducción).

Palen et al. (1983) hallaron varias actividades de fosfatasa de fosfoproteínas en Saccharomyces cerevisiae, pero caracterizaron sólo una de ellas, capaz de defosforilar fosfocaseína y las proteínas ribosomales acídicas L44 y L45. El peso molecular de esta enzima es de aproximadamente 80.000 y como el procedimiento de purificación incluye un tratamiento con etanol, los autores concluyen que esta enzima no estaría relacionada con la subunidad catalítica multifuncional de eucariontes superiores. Esta enzima aumentaba su actividad cuando se agregaba a los ensayos Mn^{2+} en bajas concentraciones.

IV. AMP_c Y MUCOR.

Los hongos del género Mucor (Clase: Zygomycetes, Orden: Mucorales) tienen la propiedad de presentar dos formas de crecimiento diferentes, según el medio en que se desarrollen. Esta característica, que es compartida con otros organismos, se denomina dimorfismo.

Cuando Mucor crece en medio aeróbico, lo hace en forma de micelio cenocítico típico, dando hifas (ver Figura 3).

En un ambiente anaeróbico, la morfología que presenta es levaduriforme. Estas formas tienen la capacidad de interconvertirse cuando se modifican las condiciones ambientales.

Las propiedades citadas hacen de Mucor un modelo interesante para el estudio de las bases bioquímicas de la diferencia ción morfológica.

El estudio de estos fenómenos se encaró desde distintos ángulos: se analizó la influencia de hidratos de carbono (Bartnicki-García, 1968; Friedenthal et al., 1974), el metabolismo respiratorio (Paznokas y Sypherd, 1975), la síntesis de proteínas (Orlowsky y Sypherd, 1977) y la influencia de las poliaminas (Inderlied et al., 1980).

Un avance fundamental se produjo cuando se pudo establecer una relación entre el dimorfismo y el AMP_c. Larsen y Sypherd (1974) encontraron que la adición de Bt₂AMP_c a cultivos aeróbicos de M. recemosus inhibía el crecimiento apical y promovía la morfología levaduriforme. También hallaron que la concentración de AMP_c es mayor en la forma levaduriforme que en la filamentosa. Passeron y colaboradores obtuvieron resultados similares trabajando con M. rouxii. (Paveto et al., 1975; Cantore et al., 1980). De los estudios llevados a cabo por estos dos laboratorios,

se pudo establecer que durante la aereación de un cultivo levaduriforme, los niveles de AMP_c disminuyen y que dicha disminución precede a la aparición de los tubos germinativos.

Los diferentes resultados obtenidos conducen a suponer que la regulación del dimorfismo en Mucor es el resultado de una interacción de factores ambientales, nutricionales y metabólicos, donde el AMP_c desempeña un papel muy importante. El estudio de su mecanismo de acción debe tenerse en cuenta en cualquier modelo de regulación del dimorfismo.

En la Figura 3 se muestra el ciclo de vida de M.rouxii y la influencia de diferentes factores sobre el mismo.

Mucor no es el único eucarionte inferior en el que el AMP_c tiene importancia fisiológica: en Blastocladiella emersonii se ha estudiado la relación entre este nucleótido y la diferenciación (Maia y Camargo, 1974); en Neurospora crassa (Terenzi et al., 1974; Scott, 1976) y en Dictyostelium discoideum (Loowis, 1972) el AMP_c es determinante de la morfología.

La presencia de AMP_c en M. rouxii y la relación descubierta entre este nucleótido y el dimorfismo del hongo condujeron a encarar, en nuestro laboratorio, el estudio de las enzimas relacionadas con el metabolismo del AMP_c en este organismo.

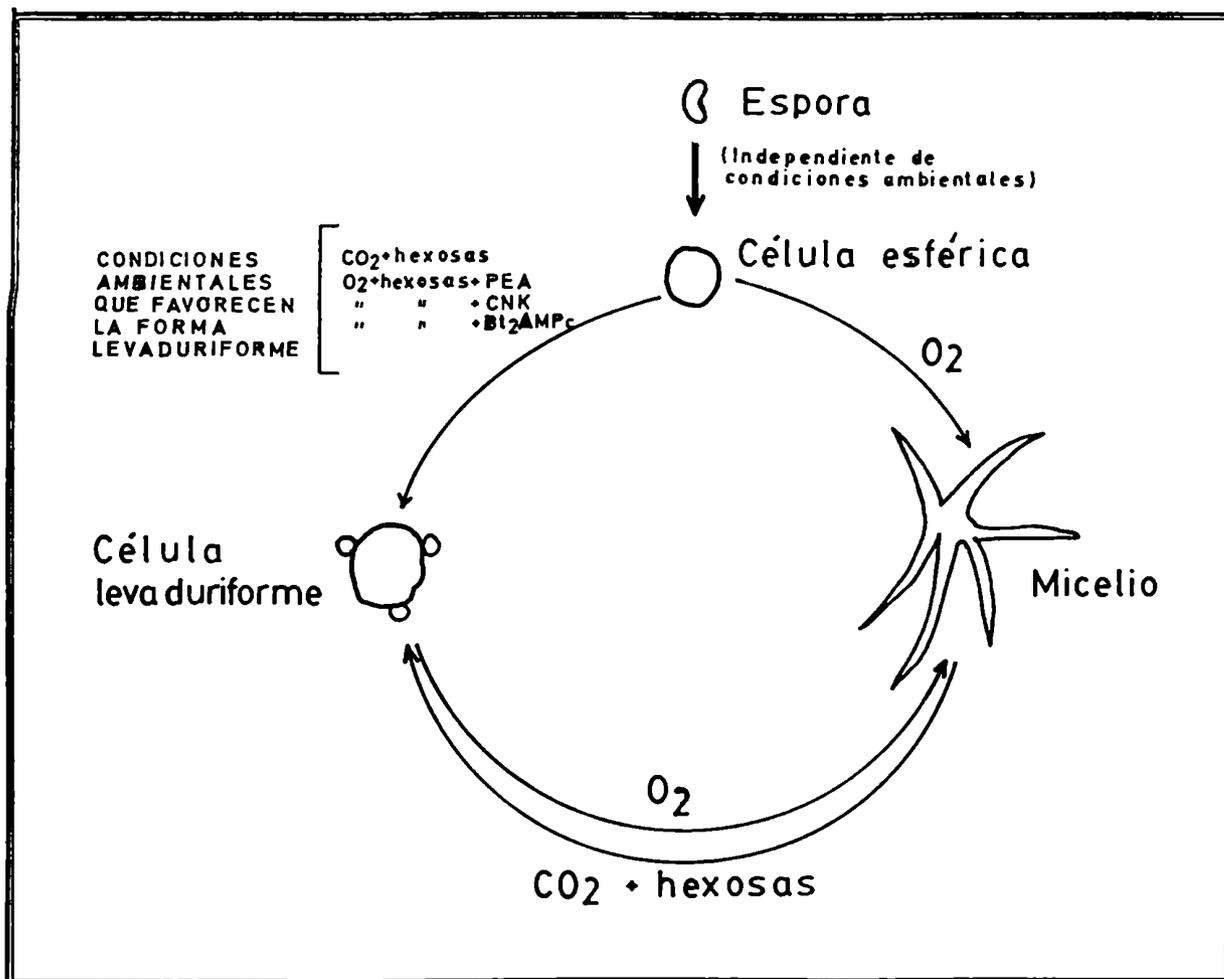


Figura 3: Ciclo de vida asexual, aeróbico y anaeróbico de M. rouxii. Condiciones ambientales y nutricionales que influyen sobre el dimorfismo.

PEA: fenetil alcohol.

La adenilato ciclasa fue caracterizada en fracciones particuladas de las formas filamentosa y levaduriforme de M.rouxii.

Esta actividad, una vez separada de restos de pared celular, se sedimentaba a 100.000xg junto con la fracción de membrana (Cantore et al., 1980). Las propiedades cinéticas de la enzima unida a membrana son similares a las de las ciclasas de otros eucariontes inferiores (Flawiá y Torres, 1973; Londesborough y Nurminen, 1972; Gomes y Maia, 1979). Al igual que estas enzimas, la adenilato ciclasa de M. rouxii depende de iones Mn^{2+} y es insensible al fluoruro y a nucleótidos de guanina. La enzima pudo ser solubilizada con ClK 0,5 N. La ciclasa soluble resultó tener un peso molecular muy alto, del orden de 500.000 (Cantore y Passero, 1982).

La fosfodiesterasa de AMP_c de M. rouxii es una enzima que tiene una K_m para el AMP_c de 2-5 μM , que la ubica entre las fosfodiesterasas de alta afinidad para este nucleótido. Se encontró también que esta enzima, en extractos poco purificados, se activaba por incubación con ATP-Mg y AMP_c y que esta activación permanecía luego de eliminarse los factores activantes (Galvagno et al., 1979). Si se separaba la quinasa de proteínas dependiente de AMP_c de la fosfodiesterasa, la activación por ATP-Mg y AMP_c requería el agregado de quinasa exógena que podía ser de distintos orígenes (Kerner, 1984). La incubación de

la enzima activada, en condiciones que favorecían la defosforilación, hacía que la actividad volviese a sus niveles basales. Cuando la enzima sin tratar era proteolizada, se activaba hasta niveles similares a los obtenidos con quinasa, ATP-Mg y AMP_c. Estos datos condujeron a postular que la fosfodiesterasa de M. rouxii se activa por proteólisis y por un proceso que involucra fosforilación. Dado que estos procesos no son aditivos, se postuló que ambos mecanismos afectarían la misma zona de la molécula proteica (Kerner, 1984).

Cuando se encaró el estudio de las quinasas de proteínas, se encontraron formas múltiples en extractos solubles del hongo (Moreno et al., 1977). Posteriormente se purificó parcialmente y caracterizó una quinasa dependiente de AMP_c. Se encontró que posee algunas de las propiedades de las enzimas del tipo II de eucariontes superiores (Moreno y Passeron, 1980). Sin embargo se descubrió que esta enzima posee la peculiaridad de que no se disocia en presencia de AMP_c solo, aún en concentraciones altas, sino que además requiere la presencia de histona o ClNa. Aprovechando esta propiedad, se pudo visualizar y demostrar la existencia de un complejo ternario holoenzima-AMP_c (R₂C₂-AMP_c) en electroforesis en gel de poliacrilamida y en gradientes de

sacarosa (Moreno et al., 1983; Pastori, 1983). El AMP_c unido a la holoenzima se intercambia rápidamente, mientras que el nucleótido unido a la subunidad regulatoria libre tiene una velocidad de intercambio baja. También se demostró que el número de moléculas de AMP_c que se unen a la holoenzima es la mitad del que lo hace a la subunidad regulatoria.

V. OBJETIVO DE LA TESIS.

Dado que en M. rouxii existen las enzimas encargadas de la síntesis y degradación del AMP_c (adenilato ciclasa y fosfodiesterasa de AMP_c) y también existe una quinasa de proteínas dependiente de AMP_c; para que los procesos mediados por este nucleótido sean reversibles, es necesario que en Mucor existan fosfatasa(s) de fosfoproteína(s).

El objetivo de esta tesis es la búsqueda y caracterización de fosfatasas de fosfoproteínas en Mucor rouxii y de los posibles moduladores endógenos que pudieran regular la actividad de estas enzimas.

MATERIALES Y METODOS

I. BUFFERS UTILIZADOS

Buffer M: Tris-ClH 10 mM, pH 7,3, EDTA 1,5 mM, β -mercaptoetanol 2 mM.

Buffer M-50: Tris-ClH 50 mM, pH 7,3, EDTA 1,5 mM, β -mercaptoetanol 2 mM.

II. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

II.1. Organismo.

En el presente estudio se utilizó el hongo dimórfico Mucor rouxii (NRRL 1894), cepa original del Dr. W. Hesseltine (Northern Utilization Research and Development Division Peoria, Ill) cedida por el Dr. Roger Stork (Rice University, Houston, Texas).

II.2. Obtención de esporas y mantenimiento de la cepa.

Se hizo esporular al hongo en un medio que contenía agar al 5%-jugo de tomate (1:1). Ambos componentes se esterilizaron en autoclave por separado y se mezclaron en caliente; la mezcla se trasvasó inmediatamente a botellas de Roux (50 ml) y se dejó

solidificar. Las botellas se mantuvieron por 24 h a 25° C como prueba de esterilidad. Transcurrido este tiempo se sembraron en cada botella 2 ml de una suspensión de esporas conteniendo aproximadamente 100 esporas/ml y las botellas se incubaron a 30° C durante 4-6 días. Para cosechar las esporas se agregó agua destilada (20 ml) a cada botella y se raspó suavemente la superficie del cultivo con un ansa de vidrio para desprender las esporas de los esporangios. La suspensión obtenida se filtró por una malla de nylon, para retener trozos de micelio o de medio que se pudieran haber desprendido. Las esporas se recogieron por centrifugación a 3.000 rpm durante 15 minutos. El precipitado fue resuspendido en agua destilada y vuelto a centrifugar. Este proceso se repitió tres veces. Finalmente las esporas se suspendieron en agua destilada y en una alícuota de la suspensión se contaron utilizando una cámara cuentaglóbulos. La suspensión se fraccionó y se guardó en viales de vidrio conteniendo 3-4 ml cada uno.

En estas condiciones las esporas permanecen viables por 1-2 meses.

Para mantener la cepa, se inocularon dos tubos en pico de flauta con medio agar-jugo de tomate. Los tubos se incubaron

en las mismas condiciones que las botellas de Roux y, una vez producida la esporulación, se guardaron a 4°C.

En todos los casos se trabajó en condiciones de esterilidad.

11.3. Medio de cultivo.

El micelio fue crecido en medio YPG (Bartnicki-García y Nickerson, 1962) cuya composición es: extracto de levadura (Difco) 0,3%, peptona (Inorp. tipo MC3) 1% y glucosa (Roux Ocefa) 3%. El pH se ajustó a 4,5 con ácido sulfúrico 5 N. Se preparó la solución de glucosa en forma independiente, se autoclavó por separado y luego se mezcló con los otros componentes.

11.4. Cultivos.

Para obtener micelio en fase logarítmica tardía, se realizaron cultivos en erlenmeyers de 2 l conteniendo 600 ml de medio YPG. El inóculo fue de $3-5 \times 10^5$ esporas/ml y el cultivo se dejó crecer aeróbicamente con agitación constante durante 16-18h a 28°C. El micelio se cosechó por filtración al vacío sobre papel Whatman N° 1 y se lavó sobre el filtro con agua destilada

fría. Se escurrió el agua retenida por el micelio, presionándolo entre dos hojas de papel de filtro y se lo guardó cortado en trozos a -70°C hasta el momento de ser utilizado.

Hasta el paso en que se cosechó el micelio, todos los procesos se realizaron en condiciones de esterilidad.

III. OBTENCION DE LAS FOSFATASAS DE FOSFOPROTEINAS DE M. ROUXII.

III.1. Preparación de los extractos.

Todos los pasos se realizaron entre 0 y 4°C . El micelio fue molido en nitrógeno líquido y el polvo obtenido se suspendió en dos volúmenes de buffer M (peso a volumen). Se agitó suavemente la mezcla durante 30 minutos y se la filtró por tela de algodón. El filtrado se centrifugó a $2.000 \times g$ durante 15 min. El sobrenadante se volvió a centrifugar, esta vez a $100.000 \times g$ durante 60 min. Se descartó el precipitado y la fracción soluble (S_{100}) se dializó exhaustivamente contra buffer M.

III.2. Primera cromatografía en DEAE-celulosa.

En una preparación típica, 30 ml de S_{100} , conteniendo

870 mg de proteína, provenientes de 30 g de micelio (peso húmedo), se sembraron en una columna de DEAE-celulosa (2 x 32 cm), a razón de 7-10 mg de proteína/ml de resina empaquetada. La columna fue lavada con 2 volúmenes de buffer M y la proteína se eluyó con un gradiente lineal de ClNa (0-0,4 M) en el mismo buffer (volumen total del gradiente, 1.000 ml). Se recogieron fracciones de 10 ml y en cada una se ensayó actividad de fosfatasa de fosfoproteínas en presencia y en ausencia de Cl_2Mn 10 mM. Las fracciones con actividad (delimitadas por barras en la Fig. 7) se recogieron separadamente y la proteína se precipitó con sulfato de amonio sólido hasta una concentración de 75% de saturación, ajustándose el pH a 7,3 con Tris base 2 M. Los precipitados, que contenían 63 y 14,4 mg de proteína respectivamente, fueron disueltos en forma separada en 2 ml de buffer M y dializados durante 2 horas (de modo que la conductividad fuese menor a 4 mMHO) contra el mismo buffer. A la fracción que eluía primero en DEAE-celulosa y se activaba en presencia de Mn^{2+} , se la llamó enzima I, a la que eluía a mayor fuerza iónica y no se activaba en presencia del catión, se la llamó enzima II.

III.3. Segunda cromatografía en DEAE-celulosa.

Las fracciones I y II, provenientes de la primera cromatografía de intercambio iónico, se sembraron en sendas columnas de DEAE-celulosa (1,2 x 13 cm y 1 x 9,5 cm respectivamente). El procedimiento utilizado para la elución fue idéntico al empleado en la primera cromatografía, salvo que los volúmenes utilizados estuvieron de acuerdo con el tamaño de las columnas. La proteína de las fracciones con actividad de fosfatasa de fosfoproteínas fue precipitada con sulfato de amonio sólido hasta 75% de saturación, centrifugada y redisuelta, en cada caso, en 0,5 ml de buffer M.

III.4. Filtración en Sephacryl S-300.

Las soluciones concentradas de las enzimas I y II, provenientes de la segunda cromatografía en DEAE-celulosa, conteniendo 34 y 4,7 mg de proteína respectivamente, se filtraron separadamente en columnas de Sephacryl S-300 (1,2 x 50 cm) previamente equilibradas con buffer M-50. Las muestras se eluyeron con el mismo buffer, a un flujo de 0,25 ml/min. Se recogieron fraccio -

nes de 0,5 ml y se ensayó actividad de fosfatasa de fosfoproteínas en cada una de ellas. Las fracciones con actividad se junron y concentraron hasta 1 ml, dializándolas contra sacarosa 2M en buffer M. Las muestras fueron guardadas a -20°C . En estas condiciones las enzimas resultaron activas, al menos, durante dos meses. El esquema de purificación está resumido en la Tabla VII.

IV. OBTENCION DE LOS INHIBIDORES DE LAS FOSFATASAS DE FOSFOPROTEINAS.

Todos los procesos se realizaron a $0 - 4^{\circ}\text{C}$, salvo que se aclare otra cosa.

En una preparación típica, 150 g de micelio (peso húmedo) de M. rouxii, fueron congelados en nitrógeno líquido y molidos en un mortero de porcelana. El polvo obtenido se suspendió en 2 volúmenes de buffer M. La mezcla se filtró a través de tela de algodón y se centrifugó a $30.000 \times g$ durante 30 min. El sobrenadante (extracto crudo) se calentó a $90 - 100^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. en un baño de agua hirviendo. Después de enfriar, la suspensión se centrifugó a $5.000 \times g$ durante 15 min. El sobrenadante

te clarificado se dializó exhaustivamente contra buffer M. La solución dializada (39 mg de proteína) se sembró en una columna de DEAE-celulosa (1,5 x 5 cm) equilibrada con buffer M. La columna se lavó con dos volúmenes de buffer M y la proteína se eluyó con 50 ml (correspondientes a 10 volúmenes de columna) de un gradiente lineal de ClNa (0-0,7 M) en el mismo buffer. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y las que tenían actividad inhibidora (marcadas como a y b en la Fig. 15) se juntaron separadamente y concentraron contra sacarosa 2 M en buffer M. Las soluciones concentradas (1 ml) fueron filtradas a través de columnas de Sephadex G-75 (1,1 x 65 cm) preequilibradas con buffer M-50. Los inhibidores se eluyeron con el mismo buffer y se recogieron fracciones de 0,65 ml. Se juntaron las fracciones con actividad inhibidora y se concentraron contra sacarosa 2 M en buffer M. Estas preparaciones se guardaron a -20°C.

V. PREPARACION DE LOS SUSTRATOS FOSFORILADOS.

V.1. Fosforilación de histona.

Una mezcla de reacción típica para la fosforilación de histona contenía buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,4, β -mercapto-

etanol 20 mM, EDTA 1,5 mM, Cl_2Mg 10 mM, 1,5 mg/ml de histona 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMP_c (250 unidades/ml) y 0,1 mM de ATP (γ - P^{32}) (2.500 cpm/mol) en un volumen final de 10 ml. La incubación se desarrolló durante 2 h a 30°C. Finalizado este período, la reacción se detuvo por calentamiento a 65°C durante 4 min. La proteína se precipitó agregando 4 volúmenes de solución saturada y neutralizada de sulfato de amonio. El precipitado se recogió por centrifugación a 12.000 x g durante 15 minutos. La histona se redisolvió en 10 ml de agua destilada y se volvió a precipitar con solución de sulfato de amonio. Este proceso se repitió entre 3 y 4 veces. Finalmente el precipitado se disolvió en 5 ml de agua destilada y se dializó exhaustivamente contra el mismo solvente. La histona fosforilada (10 pmoles P^{32}/mg de proteína) se fraccionó en varios tubos y se guardó a -20°C.

V.2. Fosforilación de fosforilasa.

Para la preparación de la fosforilasa se siguió esencialmente el método descrito por Chou et al. (1977). La mezcla de reacción contenía, en 1 ml, buffer Tris-ClH 25 mM. pH 8,6,

(AcO)₂Mg 20 mM, Cl₂Ca 1 mM, ATP (γ-P³²) 1 mM (400 - 500 cpm/pmol), 10 mg de fosforilasa b y 0,05 mg de quinasa de la fosforilasa. La reacción se desarrolló a 30°C durante 60 min. y la fosforilasa a (P³²) se aisló en forma idéntica a la utilizada para la histona (P³²), salvo que en lugar de agua para disolver y dializar la proteína, se utilizó buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,4. En estas condiciones se logró incorporar 0,7 - 1 mol de fosfato por subunidad de fosforilasa (PM=93.000). La proteína fosforilada se guardó a 4°C.

V.3. Fosforilación de caseína.

La caseína se fosforiló utilizando quinasa de proteínas independiente de nucleótido cíclico obtenida de M. rouxii (Moreno et al., 1977). La mezcla de reacción contenía, en 1 ml, buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,4, Cl₂Mg 20 mM, ATP (γ-P³²) 0,15 mM (500 cpm/pmol), 4,5 mg de caseína y 0,4 mg de enzima parcialmente purificada. La reacción se incubó 60 min. a 30°C y la caseína (P³²) se aisló de la misma forma que la histona (P³²) y se guardó a -20°C. En estas condiciones se incorporó, aproximadamente, 1 pmol de fosfato por mg de proteína.

V.4. Fosforilación del kemptido.

El kemptido (Kemp et al., 1976) se fosforiló utilizando subunidad catalítica de quinasa de proteínas dependiente de AMP_c. Se incubaron 0,05 mg/ml de kemptido con buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,4, EDTA 1,5 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, Cl₂Mg 10 mM, ATP (γ -P³²) 1 mM (300 cpm/pmol) y la enzima (10 μ g, 160 unidades) en un volumen de 0,2 ml. La reacción se desarrolló a 30°C durante 2 h. El péptido fosforilado (0,4 moles de fosfato por mol de kemptido) se aisló utilizando la metodología descrita por Kemp et al. (1976).

VI. ENSAYOS ENZIMATICOS.

VI.1. Fosfatasa de fosfoproteínas.

La actividad de fosfatasa de fosfoproteínas se midió, en los ensayos de rutina y cuando no se aclara otra cosa, por la liberación de Pi (P³²) a partir de histona (P³²). La mezcla de reacción contenía buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,4, β -mercaptoetanol 2 mM, EDTA 1 mM, Cl₂Mn 10 mM (cuando se indica), 10 μ g de histona (P³²) (40.000-70.000 cpm) y la enzima, en un volumen

final de 50 μ l. Las reacciones se iniciaron por el agregado de enzima, se desarrollaron a 30°C durante 20 min. y se detuvieron agregando 20 μ l de solución de albúmina (20 mg/ml) y 20 μ l de una mezcla que contenía ácido tricloroacético al 35%, fosfato monoácido de sodio 10 mM y ácido sílico-tungstico 80 mM. Después de dejar reposar 10 min. a 4°C, los tubos se centrifugaron a 5.000 rpm durante 15 min. en centrífuga clínica, se tomaron alícuotas del sobrenadante (50 μ l) y se mezclaron con 2 ml de mezcla centelleadora de tritón-tolueno y se dosaron (los detalles se describen en la sección X.4. de Materiales y Métodos).

El desarrollo de las reacciones fue lineal con el tiempo y proporcional a la cantidad de enzima utilizada, en condiciones en que no más del 30-40% del sustrato fuera defosforilado. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 pmol de fosfato por minuto en las condiciones del ensayo antes descriptas.

Para confirmar que el P^{32} liberado al sobrenadante se debiera exclusivamente a P_i (P^{32}) y no a péptidos (P^{32}) formados por la acción de proteasas, se utilizó, sólo como control en algunos casos, el siguiente método de dosaje: a los 50 μ l de reacción se

agregaron 20 μ l de albúmina (20 mg/ml) y 100 μ l de ácido tri - cloroacético al 10%. La mezcla se centrifugó 15 min. a 5.000 rpm, se tomaron 100 μ l del sobrenadante y se le agregaron 25 μ l de fosfato monoácido de sodio 50 mM y 75 μ l de molibdato de amonio al 5% en ácido sulfúrico 3N. Luego de dejar reposar 10 min. a temperatura ambiente, se agregaron 300 μ l de isobutanol saturado en agua, para extraer el complejo fosfomolibdico. La mezcla se agitó varias veces en forma intensa y, luego de dejar que las fases se separaran, se tomaron 250 μ l de la fase orgánica, se mezclaron con 3 ml de solución centelladora de tritón-tolueno y se contó la radiactividad como se detalla en la sección X.4. de Materiales y Métodos. En todos los casos los resultados obtenidos por los dos métodos de dosaje fueron coincidentes.

El mismo ensayo descrito para histona (P^{32}) se utilizó para fosforilasa a (P^{32}), caseína (P^{32}) y kemptido (P^{32}). Las cantidades utilizadas de cada sustrato se describen en el texto. Cuando se utilizó kemptido (P^{32}) como sustrato, se empleó para el dosaje de radiactividad, exclusivamente el método de extracción con isobutanol.

VI.2. Inhibidores de fosfatasa de fosfoproteínas.

El ensayo de inhibidores de fosfatasa de fosfoproteínas fue esencialmente igual al utilizado para medir la actividad de estas enzimas, salvo que se agregó inhibidor a la reacción. La cantidad de enzima utilizada fue la necesaria para defosforilar el 30% del sustrato en ausencia del inhibidor. Una unidad de inhibidor se definió como la cantidad capaz de inhibir en un 50% la actividad de la enzima II en las condiciones descriptas previamente.

VI.3. Quinasa de proteínas.

La actividad de quinasa de proteínas se midió por la fosforilación de histona o de kémtido. Una mezcla de reacción típica contenía buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,4, β -mercaptoetanol 2 mM, Cl_2Mg 10 mM, ATP(γ - P^{32}) 0,1 mM (200-300 cpm/pmol), el sustrato fosforilable (75 μg de kémtido o 150 μg de histona) AMP_c 1 μM y enzima en un volumen de 100 μl . Las reacciones se desarrollaron a 30°C 10 min., al cabo de los cuales, las mezclas se sembraron en papeles de fosfocelulosa (2,5 x 2,5 cm). Los papeles se lavaron varias veces con agua corriente, luego se secaron y se sumergieron en 3 ml de mezcla centelladora de tolueno. En

la sección X.4. de Materiales y Métodos se detalla la forma en que se midió la radiactividad.

VII. TRATAMIENTOS CON AGENTES DESNATURALIZANTES Y PROTEASAS.

VII.1. Tratamiento de las enzimas con etanol.

En este procedimiento se siguió, esencialmente, el método utilizado por Brandt et al. (1974). Un volumen de enzima se mezcló con dos volúmenes de solución saturada y neutralizada de sulfato de amonio a 4°C. La suspensión se centrifugó a 13.000 x g durante 15 min. y el precipitado se redisolvió en un volumen de buffer M. A esta solución se le agregaron 5 volúmenes de etanol (95%) a temperatura ambiente e, inmediatamente, se centrifugó en las mismas condiciones a las anteriores. La proteína precipitada se disolvió en 1 volumen de buffer M, se clarificó por centrifugación, se descartó el precipitado de proteína desnaturizada y el sobrenadante se dializó exhaustivamente contra buffer M. Cuando la concentración de las proteínas en la muestra a tratar fue menor que 5 mg/ml, se agregó seroalbúmina bovina hasta llegar a una concentración de 10 mg de proteína/ml.

VII.2. Tratamiento de las enzimas con β -mercaptoetanol.

La muestra conteniendo enzima se llevó a una concentración de 0,2 M en β -mercaptoetanol y se congeló a -20°C durante 16 h (Kobayashi et al., 1975). Al cabo de este tiempo, la muestra se descongeló y centrifugó a $13.000 \times g$ durante 15 min. Se descartó la proteína precipitada y el sobrenadante se utilizó como fuente de enzima.

VII.3. Proteólisis de las enzimas con tripsina.

Un volumen de enzima se mezcló con un volumen de solución de tripsina (2mg/ml) y se incubó durante 20 min. a 25°C . La reacción se detuvo agregando un volumen de inhibidor de tripsina (6 mg/ml).

VII.4. Tratamiento de los inhibidores a y b con tripsina.

El tratamiento de los inhibidores con tripsina fue idéntico al utilizado con las enzimas, salvo que la incubación se realizó a 30°C durante 30 min.

VIII. DETERMINACION Y CALCULO DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LAS ENZIMAS Y LOS INHIBIDORES.

VIII.1. Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa.

Los gradientes lineales de sacarosa (5-20%) en buffer M se prepararon con 4 capas de 1,14 ml cada una, cuyas concentraciones en sacarosa fueron, respectivamente, 20, 15, 10 y 5%. Los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 2 h, luego se llevaron a 4°C y se utilizaron inmediatamente. Los gradientes, una vez sembradas las muestras, se centrifugaron a 40.000 rpm durante 16 h a 4°C, en un rotor modelo Spinco SW 55 Ti. Los gradientes se fraccionaron en alícuotas de 0,2 ml haciendo sifón desde el fondo del tubo y se ensayaron las actividades enzimáticas en cada fracción.

Las proteínas utilizadas como marcadores fueron: citocromo c, peroxidasa y fosfatasa alcalina.

VIII.2. Filtración molecular.

Las enzimas se filtraron por columnas de Sephacryl S-300, el inhibidor a, por Sephadex G-50 y el b, por Sephadex G-75.

Las columnas de Sephacryl S-300 (1,2 x 50 cm) fueron equilibradas con buffer M-50. Se sembraron muestras de 0,5 ml y se eluyeron con el mismo buffer de equilibrio, a un flujo de 10 ml/hora. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y se midió la actividad enzimática en cada una de ellas. Las proteínas marcadoras fueron citocromo c, peroxidasa, catalasa y β -galactosidasa.

Para los casos en que se utilizó Sephadex G-50 y G-75, el procedimiento fue exactamente el mismo, salvo que el tamaño de las columnas fue distinto (1,1 x 65 cm) y las fracciones recogidas fueron de 0,65 ml. Las proteínas marcadoras, cuando se utilizó Sephadex G-75, fueron: citocromo c, mioglobina y anhidrasa carbónica, y cuando se utilizó Sephadex G-50, hormona adrenocorticotrófica (ACTH) citocromo c y mioglobina.

En todos los casos el volumen de exclusión se midió utilizando azul dextrano disuelto en buffer M-50 con ClNa 0,5 M y la columna fue equilibrada y eluida con el mismo buffer.

VIII.3. Cálculo del radio de Stokes de las enzimas I y II.

Para estimar el radio de Stokes de las enzimas I y II, se utilizaron los datos de las columnas de Sephacryl S-300. El valor

numérico se obtuvo por interpolación en el gráfico (Laurent y Killander, 1964) representando el $(-\log K_{av})$ versus el radio de Stokes de las proteínas marcadoras.

Para definir K_{av} , se tomó la ecuación

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

donde V_e : volumen de elución de la proteína.

V_o : volumen de exclusión de la columna.

V_t : volumen total de la resina.

VIII.4. Cálculo de los coeficientes de sedimentación de las enzimas I y II.

Los valores de los coeficientes de sedimentación (s) de las enzimas se calcularon a partir de los datos de sedimentación en gradientes de sacarosa. Se graficó el $S_{20,w}$ de las proteínas marcadoras en función de la distancia recorrida desde la superficie del gradiente y, por interpolación a partir del dato de la distancia recorrida, se obtuvo el coeficiente de sedimentación de las enzimas.

VIII.5. Cálculo de los pesos moleculares de las enzimas I y II.

El peso molecular de las enzimas I y II se calculó según

el método de Siegel y Monty, (1966) aplicando la fórmula:

$$PM = \frac{6 \pi \cdot N \cdot \eta_{20,w} \cdot a \cdot s}{1 - \bar{v} \rho_{20,w}}, \text{ donde:}$$

N: número de Avogadro.

$\eta_{20,w}$: viscosidad del agua a 20°C ($1,1 \times 10^{-2}$ g/cm x seg).

a: radio de stokes en nm.

s: coeficiente de sedimentación en 10^{-13} seg.

\bar{v} : volúmen específico parcial (se tomó $\bar{v} = 0,74$ cm³/g).

$\rho_{20,w}$: densidad del agua a 20°C (0,988 g/cm³).

VIII.6. Cálculo de los cocientes friccionales de las enzimas I y II.

Para calcular el cociente friccional de las enzimas I y II se utilizaron los parámetros calculados previamente, a y PM, y se aplicó la fórmula de Siegel y Monti (1966):

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

VIII.7. Cálculo de los pesos moleculares de los inhibidores a y b.

Para el cálculo de los pesos moleculares de los inhibidores a y b se siguió el método descrito por Andrews (1964) utilizando los datos obtenidos de las filtraciones por columnas de Sephadex.

Se graficó el logaritmo del peso molecular de los marcadores en función del cociente V_e/V_o y, por interpolación, se obtuvieron los pesos moleculares de los inhibidores.

IX. PARAMETROS DE LAS PROTEINAS MARCADORAS.

Los valores de los parámetros de las proteínas utilizadas como marcadores en los gradientes de sacarosa y en las filtraciones en gel, se resumen en la Tabla VI.

X. OTRAS TECNICAS.

X.1. Síntesis de ATP ($-\gamma -P^{32}$).

Este nucleótido se preparó siguiendo el método de Glynn y Chappell (1964) con las modificaciones introducidas por Chang et al. (1974).

TABLA VI

Parámetros hidrodinámicos y moleculares de las proteínas marcadoras

Proteína	Coefficiente de sedimentación $S_{20,w}$ (S)	Radio de Stokes r_s^a (nm)	Peso molecular	Fuente
β -galactosidasa	15,9	6,8	520.000	(Haga et al., 1977)
Eatalasa	11,3	5,21	247.000	(Haga et al., 1977)
Citocromo c	1,7	1,8	12.400	(Haga et al., 1977)
Peroxidasa	11,3	3,04	39.800	(Cecyl y Ogston, 1948)
Fosfatasa alcalina	6,3	2,93	80.000	(Cecyl y Ogston, 1951)
Mioglobina			17.800	(Edmundson y Hirs, 1962)
Anhidrasa carbónica			31.000	(Davis, 1961)
Hormona adrenocortico-trófica (ACTH)			4.600	(Sepherd et al., 1956)

X.2. Dosaje de proteínas.

La proteína fue valorada según el método de Bradford (1976) utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

X.3. Determinación de las proteínas marcadoras.

Catalasa: Se midió la actividad enzimática valorando el sustrato no consumido (H_2O_2) con solución de IK de acuerdo al método de Terenzi et al. (1971).

Citocromo c: Se valoró por espectrofotometría, midiendo la absor**u**bancia a 410 nm.

Peroxidasa: Se dosó midiendo la aparición de color por oxidación de la o-dianisidina al descomponerse el H_2O_2 , según el método descrito en el manual de Worthington (1972).

Fosfatasa alcalina: Se valoró midiendo la absorbancia a 410 nm debida a la aparición de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenilfosfato, según la técnica del manual de Worthington (1972).

Anhidrasa carbónica: Se valoró según el método descrito en el manual de Worthington (1972), por varia-

ción del pH en agua saturada con CO₂.

Mioglobina y ACTH: Se valoraron por el método de Bradford (1976).

X.4. Medición de la radiactividad.

La radiactividad de las muestras se valoró en un contador de centelleo líquido marca Packard Tricarb Mod. 3003. Las muestras, con la correspondiente solución centelladora, se contaron en viales de plástico chicos, dentro de los viales de vidrio del aparato.

La mezcla centelladora de tolueno contenía: 0,1 g de dimetil POPOP (1,4 bis 2 (4 metil-5 fenil benceno)) y 4 g de PPO (2,5 difeniloxazol) por litro de tolueno.

La mezcla centelladora que se nombra como tritón-tolueno contenía 1 volumen de tritón y 3 volúmenes de mezcla centelladora de tolueno.

La radiactividad del P³² se midió con una ganancia del 25% y con una ventana de 50 - 00.

X.5. Medición de la conductividad.

La conductividad en las soluciones se midió con un con-

ductímetro marca PARSEC modelo Antares III.

XI. REACTIVOS.

El ortofosfato (P^{32}) utilizado para la preparación de ATP (γ - P^{32}) fue provisto por la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Los siguientes reactivos se compraron a Sigma: DEAE-celulosa microgranular, la subunidad catalítica de la quinasa de proteínas (de corazón bovino), la histona (tipo II S), la fosforilasa b (de músculo de conejo) la quinasa de la fosforilasa (de músculo de conejo), la caseína (de leche), el kémtido, la seroalbúmina bovina, la tripsina, el inhibidor de la tripsina, el azul dextrano, el Sephacryl S-300 y los Sephadex G-50 y G-75 y las proteínas utilizadas como marcadores.

El resto de los reactivos fue de grado analítico.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. FOSFATASAS DE FOSFOPROTEINAS EN M. ROUXII.

I.1. Caracterización preliminar de la actividad de fosfatasa de fosfoproteínas.

Fué posible detectar actividad de fosfatasa de fosfoproteína en extractos crudos de *M. rouxii*. En el sobrenadante de 100.000 x g (S_{100}) esta actividad crecía en función de la cantidad de extracto agregado y se estimulaba en presencia de Cl_2Mn 10 mM (Fig. 4). Como puede observarse en la misma figura, la actividad enzimática, en ausencia de Mn^{2+} , deja de ser lineal muy rápidamente; mientras que, con el agregado del catión divalente, la linealidad se mantiene hasta cantidades mayores de proteína.

Cuando el S_{100} se filtró por columna de Sephacryl S-300 (Fig. 5), toda la actividad de fosfatasa de fosfoproteínas eluyó después de la fosfatasa alcalina. De esta manera se pudo comprobar que no hay formas enzimáticas de peso molecular mayor a 80.000. Cuando se utilizaron inhibidores de protea

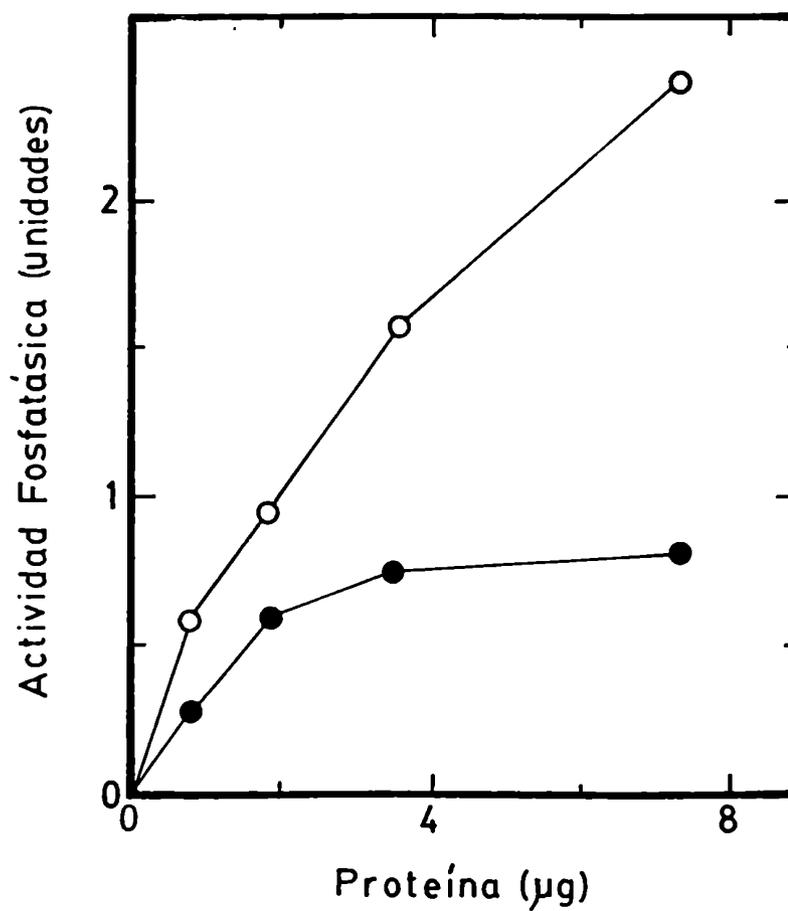
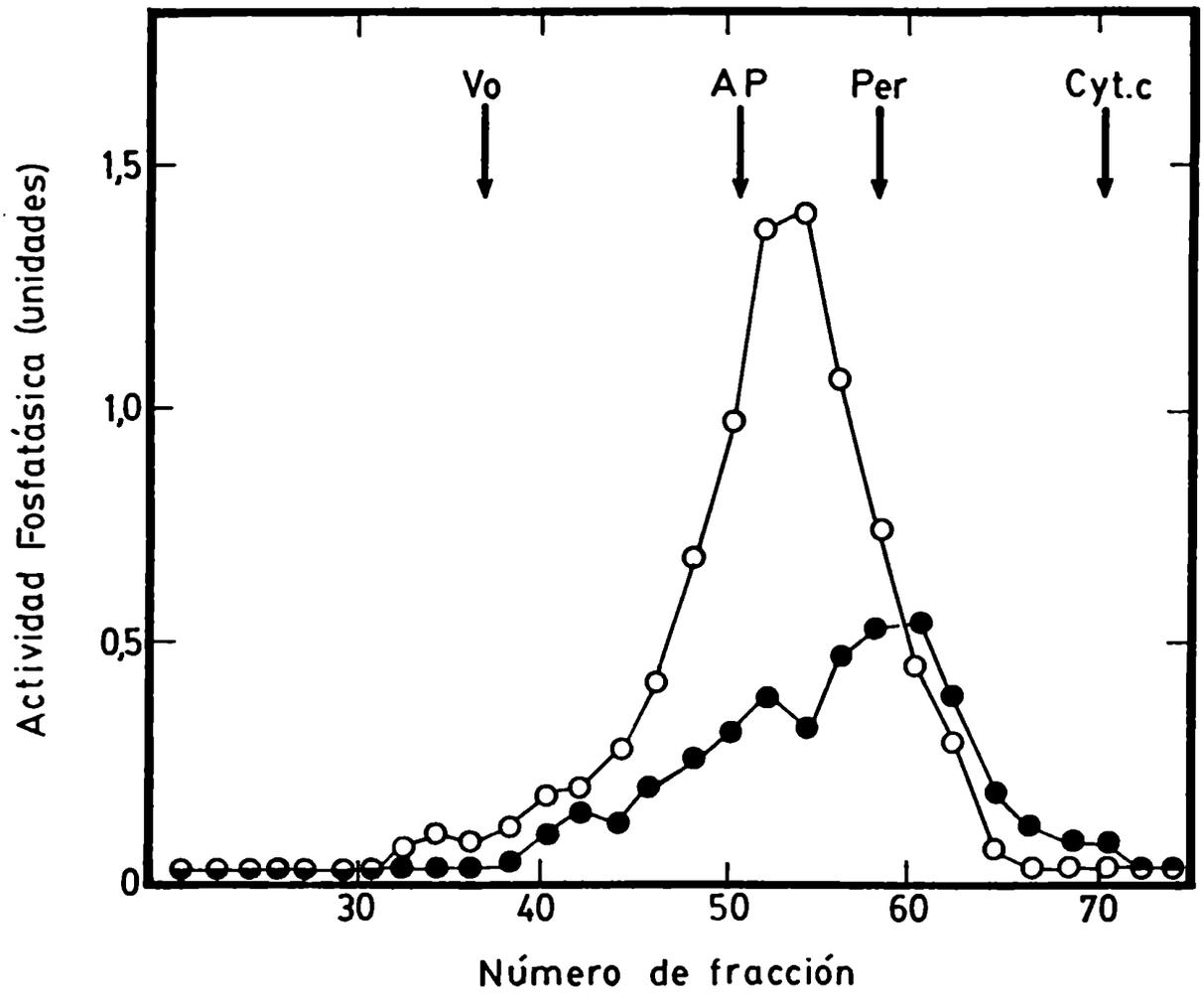


Figura 4.- Actividad de fosfatasa de fosfoproteínas en el S₁₀₀.
La actividad enzimática se midió en presencia (—○—) y en ausencia (—●—) de Cl₂Mn 10 mM, en función de cantidades crecientes de extracto.

Figura 5.- Cromatografía del S₁₀₀ en Sephacryl S-300. Una muestra de 0,8 ml, conteniendo 23 mg de proteína de la preparación de S₁₀₀ se sembró en una columna (1,2 x 50 cm) de Sephacryl S-300, previamente equilibrada con buffer M-50, y fue eluída con el mismo buffer. Se recogieron fracciones de 0,5 ml. La actividad de fosfatasa de fosfoproteínas se midió en presencia (—○—) y en ausencia (—●—) de Cl₂Mn 10 mM. Las posiciones de las proteínas marcadoras (cyt c, citocromo c; Per, peroxidasa; AP, fosfatasa alcalina) y del volumen muerto (V₀) se indican con flechas.



sas como benzamidina y EGTA en el buffer de homogenización, se obtuvieron esencialmente los mismos resultados (estos datos no se muestran). En esta figura, también se puede observar que la actividad estimulable por Mn^{2+} eluía un poco antes que la actividad independiente del catión. Este resultado parecería indicar la existencia de dos entidades diferentes.

El S_{100} fue sometido también a centrifugación en gradiente de sacarosa (Fig. 6). Se puede observar un pico de actividad dependiente de Mn^{2+} con un coeficiente de sedimentación ligeramente menor que el de la peroxidasa, mientras que la actividad en ausencia del catión fue prácticamente despreciable. Con esto se confirma que, al menos la forma dependiente de catión divalente, es de bajo peso molecular. La escasa actividad independiente de Mn^{2+} no es fácil de explicar, aunque se podría deber a la existencia de un inhibidor que cosedimente con esta actividad o a algún otro motivo desconocido.

Del conjunto de estos resultados se puede concluir que:

- 1º) Existe actividad de fosfatasa de fosfoproteínas en extractos crudos de M. rouxii.
- 2º) No existen formas de alto peso molecular como las descritas en eucariontes superiores (ver sección III.5. de la Introducción).

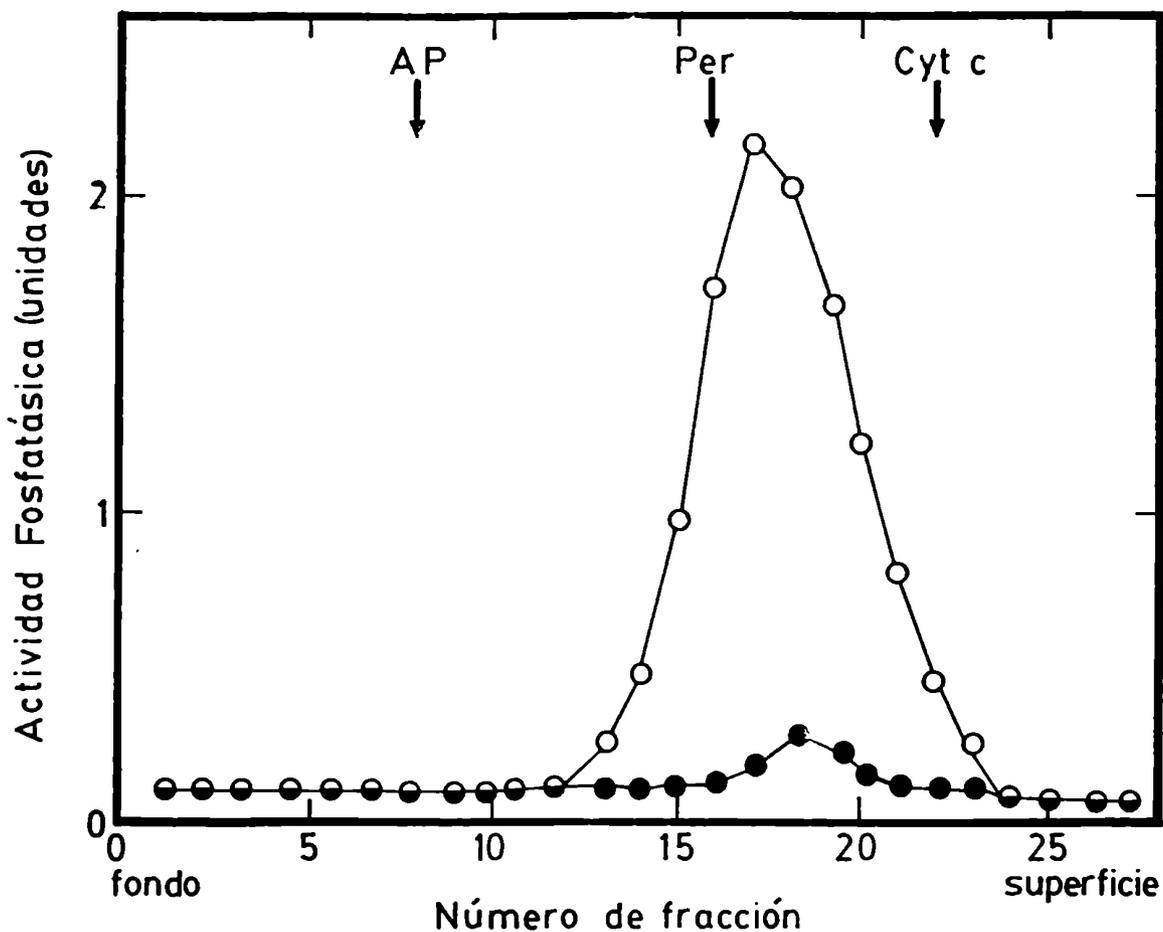


Figura 6.- Centrifugación en gradiente de sacarosa del S_{100} . Una alícuota de $100 \mu l$ de la preparación de S_{100} , conteniendo $2,9 \text{ mg}$ de proteína, junto con los marcadores, se sembró en un gradiente de sacarosa preparado, centrifugado y fraccionado como se indica en la sección VIII.1. de Materiales y Métodos. Las posiciones de las proteínas marcadoras (cyt c, citocromo c; Per, peroxidasa y AP, fosfatasa alcalina) se indican con flechas. Los ensayos se realizaron en presencia (—○—) y en ausencia (—●—) de Cl_2Mn 10 mM .

3°) En columnas de filtración molecular parecen separarse dos actividades, una dependiente y otra independiente de Mn^{2+} .

1.2. Purificación parcial de dos fosfatasa de fosfoproteínas.

En la Fig. 7 se muestra la cromatografía del S_{100} en DEAE-celulosa. Se puede observar la separación parcial de dos actividades. Una, cuyo pico lo encontramos en 30 mMHO (enzima I), se activa por iones Mn^{2+} , mientras que otra, que eluye a 40mMHO es prácticamente independiente del catión divalente.

Esto indicaría la existencia de dos enzimas. Para corroborar esta hipótesis, las fracciones delimitadas por las barras en la Fig. 7 fueron recromatografiadas independientemente en columnas de DEAE-celulosa. Como se puede observar en la Fig. 8 (A y B), el comportamiento cromatográfico de las dos enzimas fue similar al observado en la primera cromatografía, es decir que los picos de cada una se hallaron en el mismo rango de concentración de ClNa. En esta misma figura se observa también que la enzima I se activa por iones Mn^{2+} , mientras que la enzima II es insensible al agregado de este catión.

Las fracciones delimitadas por las barras en la Fig. 8 A y B, se juntaron y, luego de ser concentradas, se filtraron separa-

Figura 7.- Cromatografía en DEAE-celulosa del S₁₀₀. Los detalles del procedimiento utilizado se describen en la sección III.2. de Materiales y Métodos. La actividad de fosfatasa de fosfoproteínas se midió en presencia (—○—) y en ausencia (—●—) de Cl₂Mn 10 mM. En alícuotas apropiadas se dosó proteína (••••••••••). La línea llena representa la conductividad medida en las diferentes fracciones.

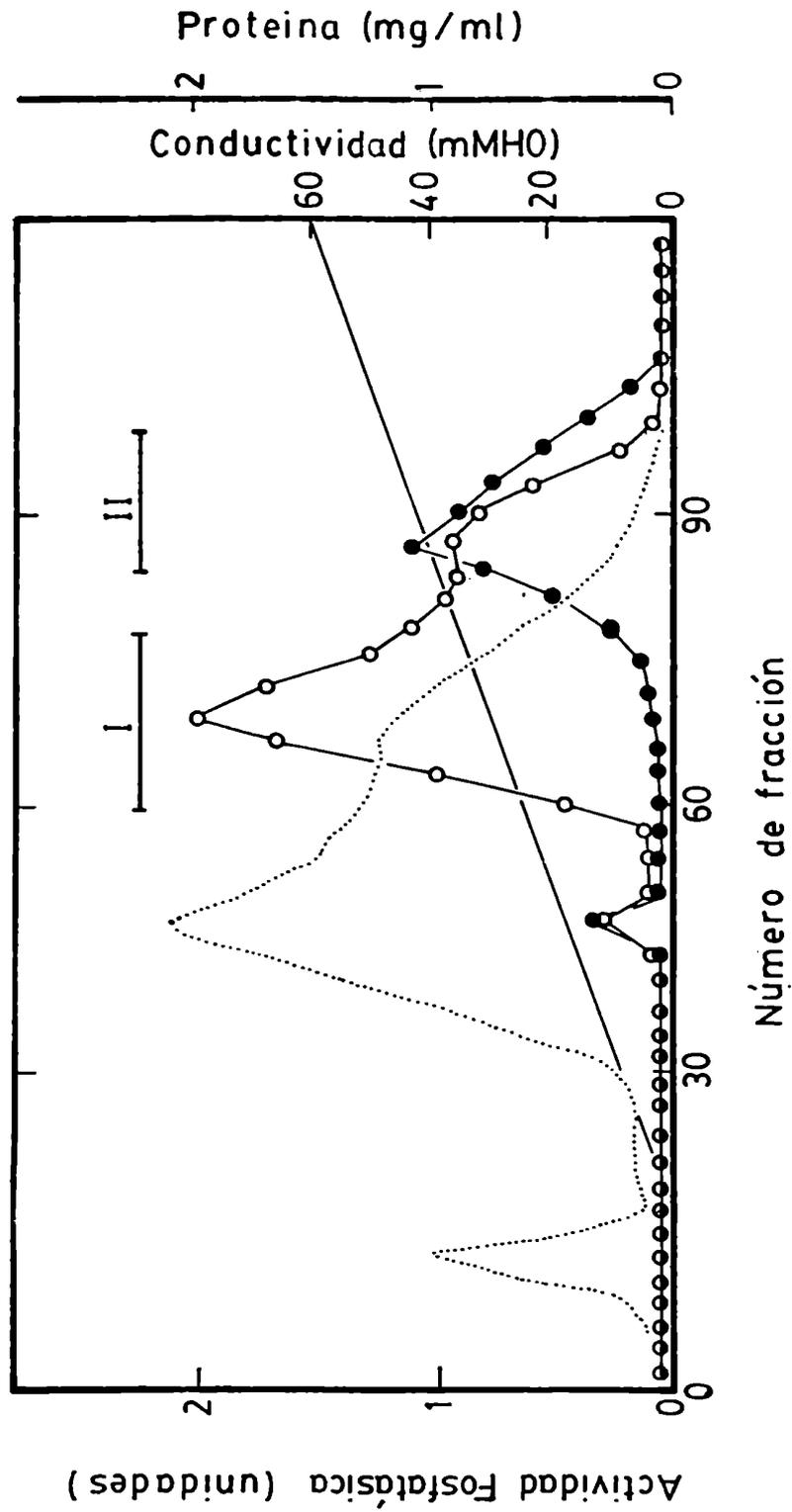
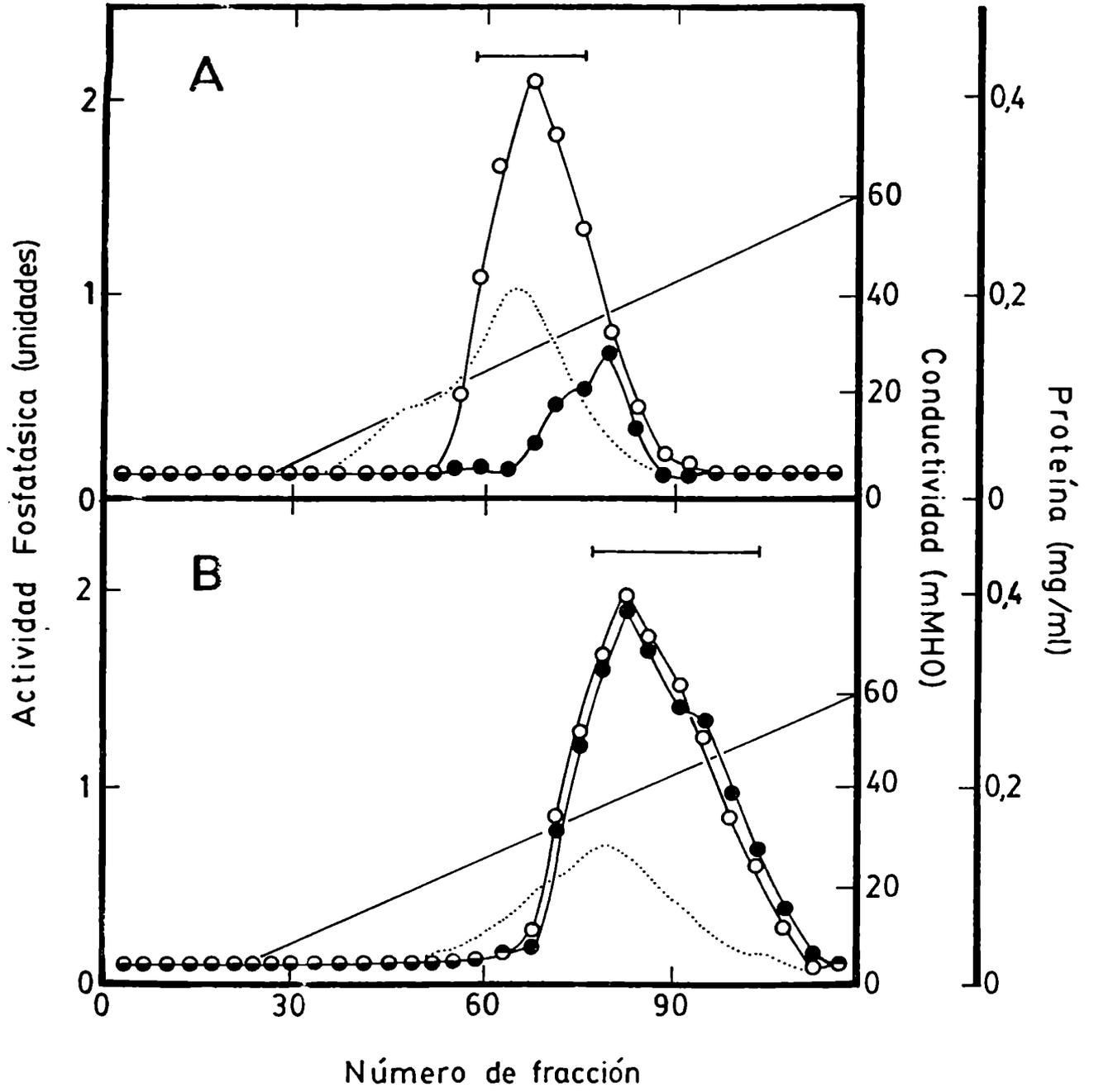


Figura 8.- Recromatografía en DEAE-celulosa de las fosfatasa
de fosfoproteínas I y II. Las enzimas I y II, prove-
nientes de la primera cromatografía en DEAE-celu-
losa, fueron sembradas en sendas columnas de la
misma resina. Se las lavó, eluyó y se recogieron las
fracciones como se detalla en la sección III.3. de
Materiales y Métodos. En alícuotas apropiadas se
dosó actividad fosfatásica en presencia (—○—) y
en ausencia (—●—) de Cl_2Mn 10 mM. También se
dosó en las diferentes fracciones la proteína (.....)
y la conductividad (———).
A. Fosfatasa I; B Fosfatasa II.



damente por columnas de Sephacryl S-300. Como se ve en la Fig. 9 A, la enzima I eluyó como un pico simétrico, 9 ml después del volumen muerto y su actividad era absolutamente dependiente de Mn^{2+} . La enzima II eluyó 12 ml después del volumen muerto (Fig. 9 B) y su actividad se inhibía ligeramente por el agregado de Cl_2Mn .

En este último paso de purificación, las actividades específicas de las fosfatasas I y II eran 30 y 150 veces mayores, respectivamente, que las calculadas para la fracción S_{100} (Tabla VII).

Las dos fosfatasas de fosfoproteínas se obtuvieron en diferentes preparaciones, aunque las cantidades relativas de las mismas podían variar.

La inclusión de benzamidina y/o EGTA (inhibidores de proteasas) en los buffers de extracción, condujo a los mismos resultados (estos datos no se muestran).

1.3. Determinación de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de las fosfatasas I y II.

Para la obtención del radio de Stokes y del coeficiente de sedimentación de las enzimas I y II se utilizaron los datos provenientes de la filtración en Sephacryl S-300 y de centrifugación

Figura 9.- Filtración de las fosfatasa de fosfoproteínas I y II a través de Sephacryl S-300. A. Fosfatasa I; B. Fosfatasa II. Alícuotas apropiadas, provenientes de la segunda cromatografía en DEAE-celulosa, fueron filtradas por columnas de Sephacryl S-300. Los detalles se describen en la sección III.4. de Materiales y Métodos. La actividad enzimática se midió en presencia (—○—) y en ausencia (—●—) de Cl_2Mn 10 mM. En alícuotas apropiadas se dosó proteína (.....). V_0 indica el volumen muerto de la columna.

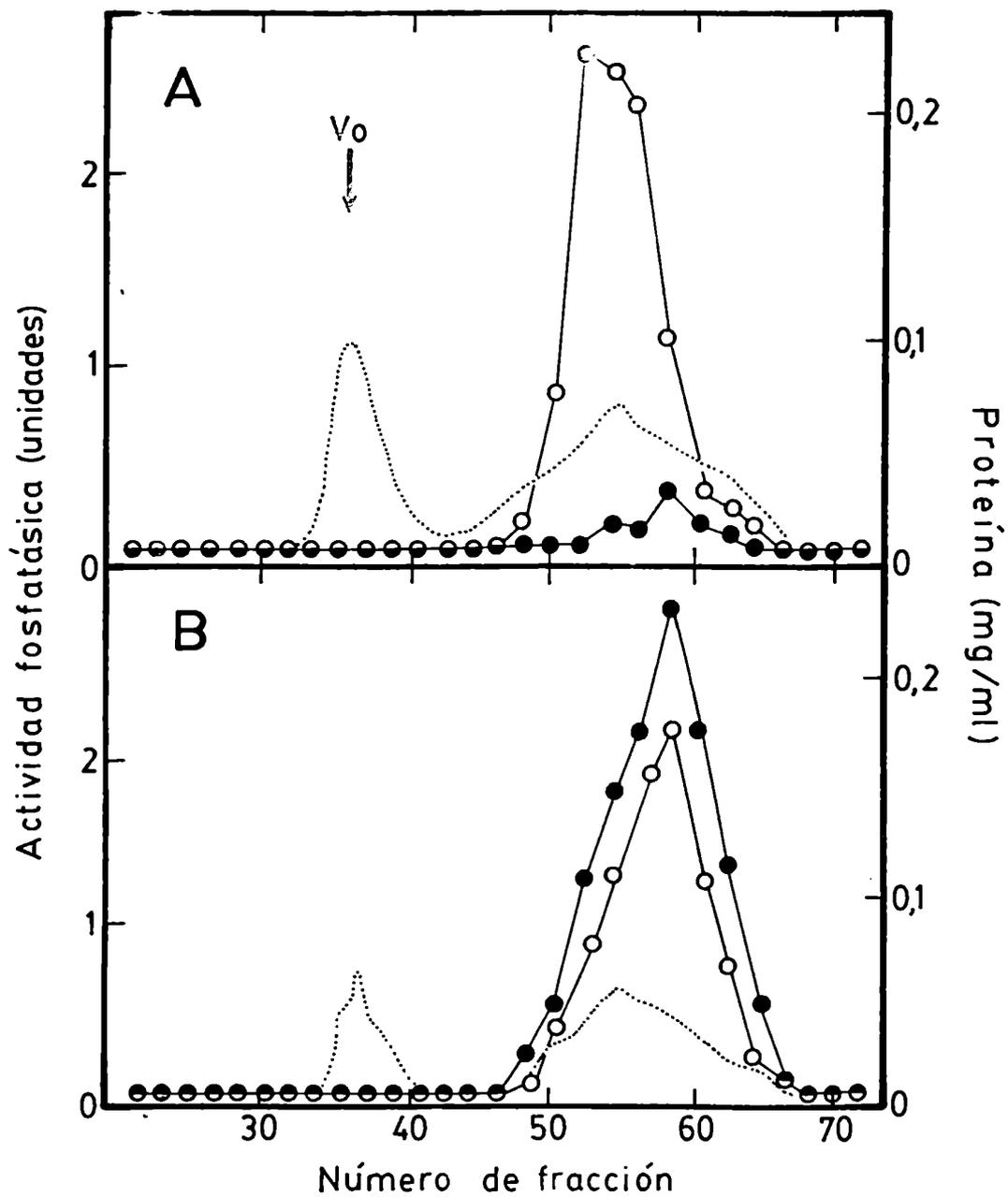


TABLA VII

Purificación de las fosfatasa de fosfoproteínas I y II ^a

Paso	Proteína (mg)	Actividad específica (unidades/mg)	Actividad total (unidades)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
S ₁₀₀	870				
Enzima I ^b		380	330.600	1	100
Enzima II		215	187.050	1	100
Primera cromatografía en DEAE-celulosa					
Enzima I	63	2.250	141.750	5,9	42,8
Enzima II	14,4	10.180	146.590	47,3	78,4
Segunda cromatografía en DEAE-celulosa					
Enzima I	34	3.780	128.520	9,9	38,9
Enzima II	4,7	19.140	89.950	89	48,1
Cromatografía en Sephacryl S-300					
Enzima I	6,4	11.400	72.960	30	22,1
Enzima II	1,7	32.250	54.820	150	29,3

^a : Se partió de 30 g de micelio, peso húmedo.

^b: La actividad de la enzima I se midió en presencia de Cl₂Mn 10 mM y la de la enzima II en ausencia del catión. En el S₁₀₀, la actividad de la enzima I se calculó restando la actividad en ausencia de Mn²⁺ a la actividad medida en presencia del catión.

en gradiente de sacarosa.

1.3.1. Determinación de los coeficientes de sedimentación.

Las centrifugaciones en gradientes de sacarosa se llevaron a cabo de la manera que se describe en Materiales y Métodos, en la sección XIII.1.

La Fig. 10 muestra las posiciones de las fosfatasa I (Fig. 10 A) y II (Fig. 10 B) y de las proteínas marcadoras, luego de haber sido centrifugadas en gradientes de sacarosa.

Por interpolación en la recta que relaciona las distancias recorridas por las proteínas marcadoras con sus coeficientes de sedimentación (Fig. 10 C), fue posible calcular los coeficientes de sedimentación de las dos enzimas, obteniéndose los valores de 3,2 S para la enzima I y 3,0 S para la enzima II.

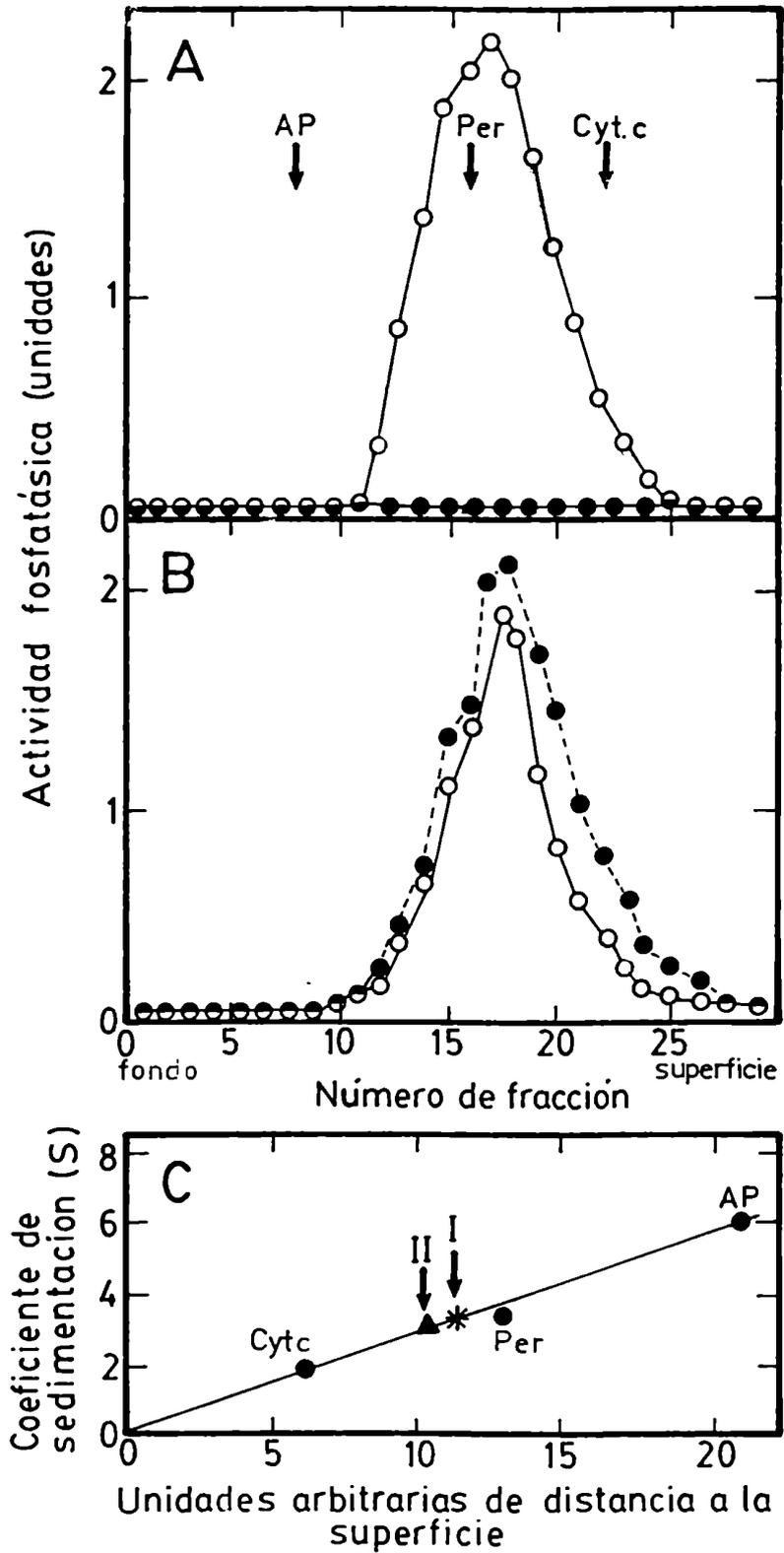
1.3.2. Determinación de los radios de Stokes.

Para determinar los radios de Stokes de las fosfatasa de M. rouxii, se las filtró en forma separada por columnas de Sephacryl S-300, calibradas con proteínas marcadoras, como se detalla en la sección VIII.2. de Materiales y Métodos. Con los datos obte

Figura 10.- Centrifugación en gradientes de sacarosa de las enzimas I y II. Se sembraron alícuotas de 100 μ l de cada una de las enzimas, provenientes de la etapa de Sephacryl S-300, junto con los marcadores, en sendos gradientes de sacarosa. Los gradientes fueron preparados, centrifugados y fraccionados de la manera que se describe en la sección VIII. 1. de Materiales y Métodos. La posición de las proteínas marcadoras se indica con flechas. La actividad enzimática se midió en presencia (—○—) y en ausencia (—●—) de Cl_2Mn 10 mM.

A. Enzima I; B. Enzima II

C. Se grafican los coeficientes de sedimentación ($S_{20,w}$) de las proteínas marcadoras (●) en función de las distancias recorridas, medidas en unidades arbitrarias. Luego se interpolaron los valores obtenidos para las enzimas I (*) y II (▲). Las proteínas utilizadas como marcadores fueron citocromo c, Cyt c; peroxidasa, Per y fosfatasa alcalina, PA.



nidos de la filtración en gel, se graficó el $(-\log K_{av})^{1/2}$ en función del radio de Stokes (Fig. 11). Por interpolación en este gráfico fue posible calcular los valores del radio de Stokes de las dos fosfatasas, encontrándose un valor de 4,2 nm para la enzima I y 3,0 nm para la enzima II.

1.3.3. Cálculo de los pesos moleculares.

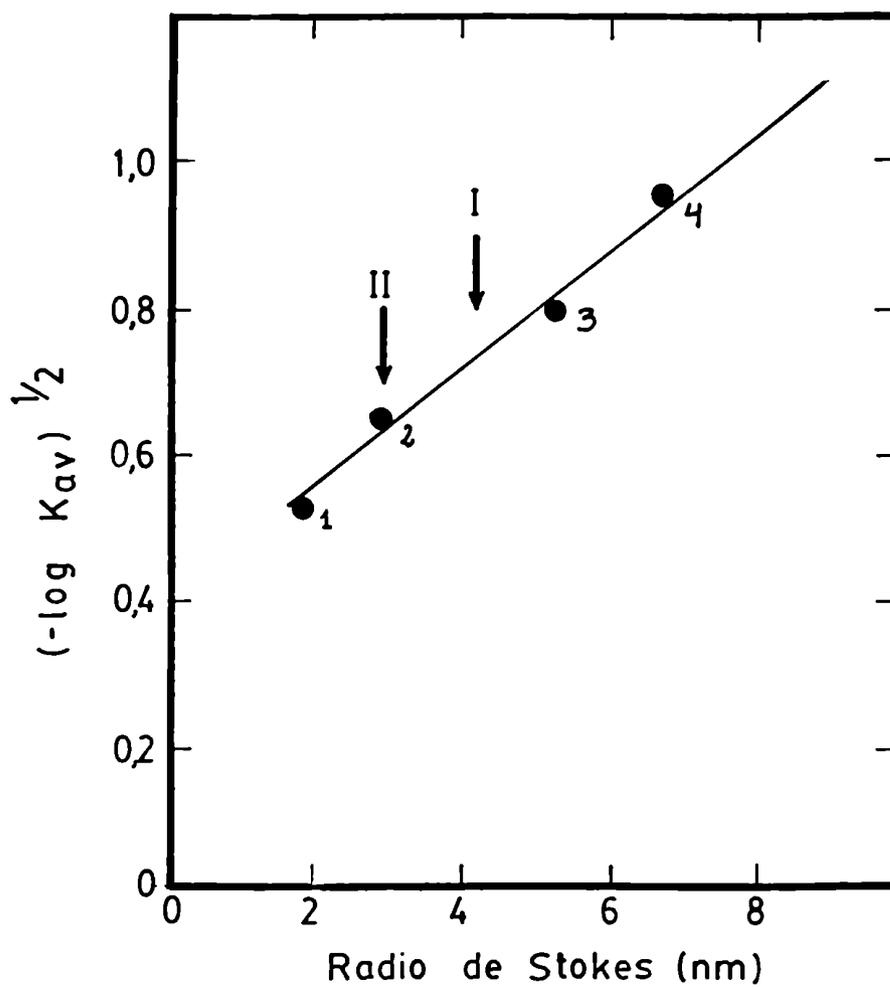
Combinando los datos del coeficiente de sedimentación y del radio de Stokes, utilizando la ecuación planteada en la sección VIII.5. de Materiales y Métodos, fue posible calcular los pesos moleculares de ambas enzimas. Los datos obtenidos fueron 64.000 para la enzima I y 46.000 para la enzima II.

1.3.4. Determinación de los cocientes friccionales.

Con los valores de los pesos moleculares y de los radios de Stokes se calcularon los cocientes friccionales f/f_0 de ambas enzimas, aplicando la fórmula planteada en la sección VIII.6. de Materiales y Métodos.

Los valores obtenidos fueron 1,58 para la enzima I y 1,26 para la enzima II.

Figura 11.- Determinación del radio de Stokes de las fosfatasas de fosfoproteínas I y II por filtración en Sephacryl S-300. Las enzimas I y II (0,5 ml de cada una, provenientes de la segunda cromatografía en DEAE-celulosa) se cromatografiaron en columnas de Sephacryl S-300, como se describe en la sección VIII.2. de Materiales y Métodos. Las proteínas marcadoras, en el mismo volumen final, se cromatografiaron en forma separada. Luego se graficó el $(-\log K_{av})$ en función del radio de Stokes, según se describe en la sección VIII.3. de Materiales y Métodos, de las proteínas marcadoras (•) y se interpolaron los valores obtenidos para las enzimas I y II (sus posiciones se señalan con flechas). Las proteínas marcadoras utilizadas fueron: 1, citocromo c; 2, peroxidasa; 3, catalasa y 4, β -galactosidasa.



1.3.5. Algunas consideraciones sobre los parámetros hidrodinámicos y moleculares de las fosfatasas de *M. rouxii*.

Los resultados obtenidos del cálculo de estos parámetros se hallan resumidos en la Tabla VIII. Como se puede observar, los pesos moleculares de ambas enzimas están muy por debajo de los de las holcenzimas descritas en eucariontes superiores (ver sección III.5. de la Introducción).

Por otra parte, analizando los cocientes friccionales, se puede deducir que la enzima I es una molécula asimétrica, ya que su f/f_0 es relativamente alto. El cociente friccional de la enzima II, cercano a la unidad, indicaría que ésta es una enzima globular.

TABLA VIII

Parámetros hidrodinámicos y moleculares de las enzimas I y II

	Enzima I	Enzima II
s (S)	3,2	3,0
a (nm)	4,2	3,0
PM	64.000	46.000
f/f_0	1,58	1,26

1.4. Propiedades catalíticas de las enzimas I y II.

1.4.1. Requerimiento de cationes divalentes.

La enzima I es inactiva en ausencia de cationes divalentes. En la Fig. 12 se observa el aumento de su actividad en función de la concentración de Cl_2Mn . La misma sigue una cinética "michaeliana" y es posible calcular, graficando la inversa de la velocidad en función de la inversa de la concentración de manganeso (gráfico insertado en la Fig. 12), la concentración de catión necesaria para llegar a la mitad de la velocidad máxima ($K_{0,5}$). Este valor es de 2 mM.

En la Tabla IX se puede observar que el Mg^{2+} es tan efectivo como el Mn^{2+} para activar a la enzima I, mientras que el Ca^{2+} , si bien puede activarla, lo hace con menor eficiencia.

La enzima II no requiere cationes divalentes para su actividad.

1.4.2. Especificidad de sustrato de las fosfatasas I y II.

En la Tabla X se puede observar la acción de las fosfatasas I y II sobre diferentes sustratos fosforilados.

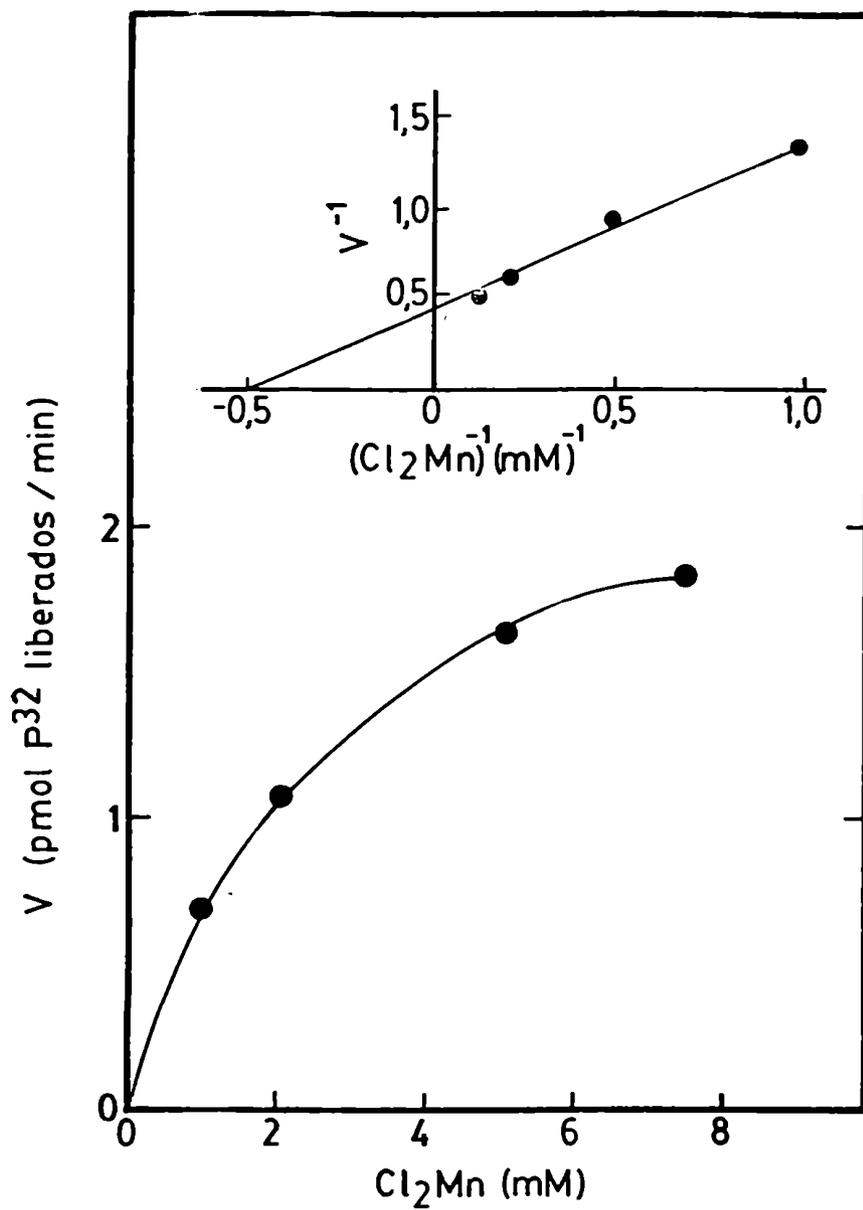


TABLA IX

Efecto de los cationes divalentes sobre las enzimas I y II

Actividad enzimática^a (unidades)

Cación ^b	Actividad enzimática ^a (unidades)	
	Enzima I	Enzima II
-	0,1	3,2
Mn ²⁺	3,2	2,8
Mg ²⁺	3,3	2,7
Ca ²⁺	0,6	2,3

^a: La actividad enzimática se midió como se describe en la sección VI.1. de Materiales y Métodos, utilizando 0,35/μg de la enzima I y 0,1 μg de la enzima II, provenientes del paso de Sephacryl S-300.

^b: Los cationes se agregaron en forma de sal cloruro (10 mM).

TABLA X

Especificidades de sustrato de las fosfatasa de fosfoproteínas I y II

Substrato ^b	Actividad ^a (unidades)			
	Enzima I		Enzima II	
	-Mn ²⁺	+Mn ²⁺	-Mn ²⁺	+Mn ²⁺
Histona-P	0,1	3,2	3,2	2,8
Fosforilasa a	0,1	0,4	2,3	0,7
Caseína-P			0,4	0,2
Kémtido-P	0,1	0,1	0	0

^aLa actividad de fosfatasa de fosfoproteínas se midió como se describe en la sección VI.1. de Materiales y Métodos, en presencia o ausencia de Cl₂Mn 10 mM. Se utilizaron 0,35 μ g de la enzima I y 0,1 μ g de la enzima II provenientes del paso de Sephacryl S-300.

^bLas cantidades de los sustratos fosforilados utilizados en los ensayos fueron: histona-P, 10 μ g; fosforilasa a, 10 μ g; caseína-P, 100 μ g y kémtido-P, 0,175 μ g. En todos los casos, la cantidad de P³² unido a la proteína fue, aproximadamente, 100 pmoles.

En presencia de Mn²⁺, la enzima I sólo defosforila, en forma eficiente, histona-P. En ausencia de catión divalente su actividad es nula.

La enzima II, en ausencia de catión divalente, es activa so

bre histona-P y sobre fosforilasa α . La actividad fosfatásica sobre fosforilasa α es fuertemente inhibida por iones Mn^{2+} , mientras que sobre histona-P la inhibición es mucho menor.

La K_m para la histona-P de la enzima I es, en presencia de Cl_2Mn 10 mM, 60 $\mu g/ml$, mientras que la de la enzima II, en ausencia del catión, es 90 $\mu g/ml$ (datos que no se muestran).

1.5. Efecto de nucleótidos, FNa y fosfato sobre la actividad de las fosfatasas I y II.

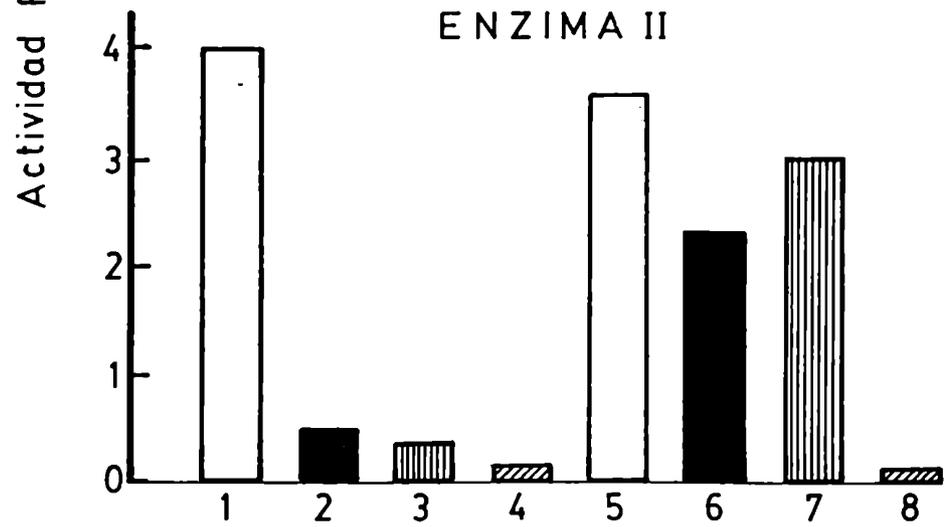
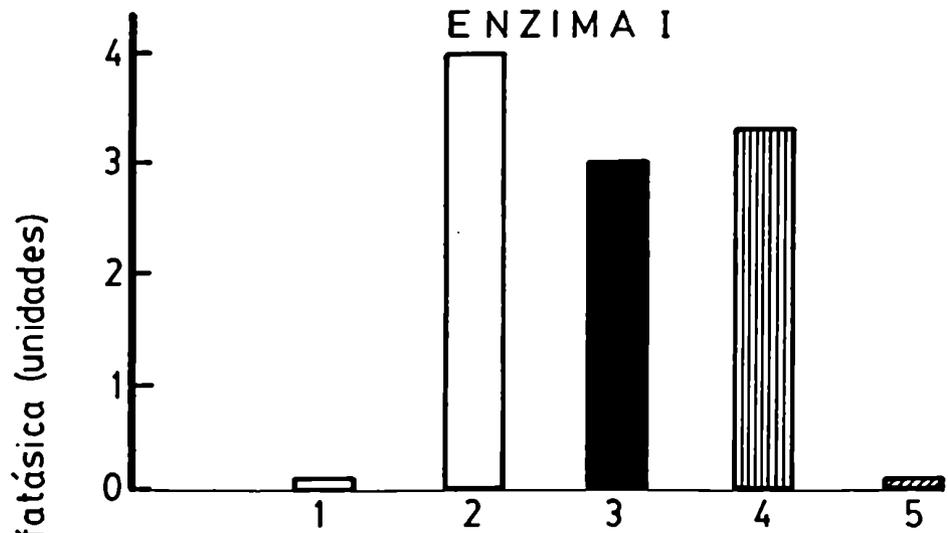
Tanto los iones fluoruro, los iones fosfato, así como diversos nucleótidos, inhiben las fosfatasas de fosfoproteínas en diferentes tejidos (ver sección III.3.1. y III.3.4. de la Introducción).

En la Fig. 13 se muestra el efecto de estas sustancias sobre las enzimas de M. rouxii.

El fosfato 20 mM inhibe completamente a ambas enzimas. Esta inhibición no se revierte, en el caso de la enzima II, por el agregado de Mn^{2+} .

El FNa (50mM) o el ATP (1mM) inhiben marcadamente a la enzima II, pero no a la fosfatasa I. La inclusión de Cl_2Mn en el ensayo revierte esta inhibición. Cuando en lugar de ATP se utilizó ADP los resultados obtenidos fueron esencialmente los mismos

Figura 13.- Efecto del ATP, el FNa y el Pi sobre las actividades de las fosfatasas I y II. Se ensayó la actividad de la enzima I (0,35 μ g) y de la enzima II (0,1 μ g), provenientes del paso de purificación de Sephacryl S-300, de la forma en que se detalla en la sección VI.1. de Materiales y Métodos. Los ensayos se hicieron sin ningún agregado (barras blancas), con ATP 1 mM (barras negras), con FNa 50 mM (barras con rayas verticales) o con Pi 20 mM (barras con rayas diagonales). La enzima I se ensayó en ausencia (1) y en presencia (2-5) de Cl_2Mn . La enzima II se ensayó en ausencia (1-4) y en presencia (5-8) de Cl_2Mn . La concentración de Cl_2Mn utilizada fue 10^2 mM.



(estos datos no se muestran).

Dado que la inhibición por nucleótidos y por fluoruro de la enzima II es parcialmente revertida por Mn^{2+} , es posible que estas sustancias, por su capacidad quelante, estén eliminando de la molécula enzimática algún catión divalente. Sin embargo no se descartan otros posibles mecanismos de inhibición.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con fluoruro y nucleótidos, y como en los ensayos, de rutina se utilizaba EDTA, se probó qué efecto tenía omitir este agente quelante en las reacciones. Los resultados obtenidos fueron exactamente los mismos que cuando el EDTA estaba presente (estos datos no se muestran).

La posibilidad de que la inhibición por ATP se debiera a una refosforilación del sustrato o a la fosforilación de algún factor, o de la enzima misma, que determinasen una disminución de su capacidad defosforilante, se descarta, dado que la actividad de quinasa de proteínas en las preparaciones de fosfatasa era nula (estos datos no se muestran).

1.6. Tratamiento de las enzimas con agentes desnaturizantes y con proteasas.

Como se detalla en los puntos III.3.2. y III.5. de la Introduco

ción, el tratamiento de algunas fosfatasa de fosfoproteínas de organismos superiores con agentes desnaturizantes o con proteasas, no sólo produce cambios en los pesos moleculares de estas enzimas, sino que también determina variaciones en sus propiedades catalíticas.

Con el objeto de conocer el efecto de este tipo de tratamientos sobre las fosfatasa de M. rouxii, se trataron, en primer término, los extractos crudos (S₁₀₀) con etanol, β -mercaptoetanol y tripsina, de la forma en que se detalla en Materiales y Métodos. Como puede observarse en la Tabla XI, todos estos tratamientos producen: a) una pérdida de dependencia de los iones Mn^{2+} y b) un aumento en la actividad de fosfatasa sobre la fosforilasa a, la cual se inhibe en presencia de Mn^{2+} . También puede observarse que el tratamiento con etanol es el más eficiente y que los otros tratamientos hacen perder parte de la actividad.

De estos datos se puede inferir que después del tratamiento del S₁₀₀ con agentes desnaturizantes o con tripsina, la actividad predominante en este extracto tiene propiedades similares a las de la enzima II (ver Tabla XI).

TABLA XI.

Tratamiento del S₁₀₀ con diferentes agentes

Tratamiento ^b	Actividad enzimática ^a (unidades)			
	Sustrato			
	Histona-P		Fosforilasa a ^c	
	-Mn ²⁺	+Mn ²⁺	-Mn ²⁺	+Mn ²⁺
Ninguno	1	3	0,75	0,78
Etanol	3,1	3,3	2,6	1
Tripsina	2,1	2,3	1,4	1
β-mercaptoetanol	1,2	1,3	1,1	0,8

^a: La actividad enzimática se midió como se describe en la sección VI.1. de Materiales y Métodos.

^b: El S₁₀₀ (9 ug en cada caso) fue tratado con los diferentes agentes según se describe en la sección VII de Materiales y Métodos, y utilizado como fuente de enzima.

^c: La cantidad de fosforilasa a utilizada en cada ensayo fue 10 ug (conteniendo 100 pmoles de P³² unidos en forma covalente a la proteína.

Para confirmar esta hipótesis, se procedió a tratar independientemente a ambas enzimas con etanol. En la tabla XII se muestran los resultados obtenidos. Como puede verse, después del tratamiento, prácticamente no se modifican las propiedades de la enzima II. Por otro lado, la enzima I sufre varias alteraciones: a) la actividad con histona-P se hace independiente de Mn^{2+} , b) adquiere actividad de fosfatasa de la fosforilasa a y c) esta actividad se inhibe marcadamente en presencia de Mn^{2+} . Si se observan las propiedades de la fosfatasa I, luego del tratamiento con etanol, se notará que se asemejan estrechamente a las de la enzima II.

Es de notar que resultados similares, aunque con pérdida de actividad enzimática se obtuvieron con tratamiento con β -mercaptoetanol o con proteólisis controlada (estos datos no se muestran).

Dado que la enzima I, por proteólisis o por tratamiento con agentes desnaturizantes, adquiriría propiedades similares a las de la enzima II y teniendo en cuenta que su peso molecular (64.000) es mayor que el de la fosfatasa II (40.000), podría estar ocurriendo una transformación de la enzima I en la enzima II por proteólisis o disociación de un péptido.

TABLA XII

Efecto del tratamiento con etanol en las actividades de las enzimas I y II.

Fosfatasa de fosfoproteínas	Actividad ^a (unidades)							
	Fosfatasa de Histona-P				Fosfatasa de fosforilasa a			
	Antes del tratamiento		Después del tratamiento		Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	-Mn ²⁺	+Mn ²⁺	-Mn ²⁺	+Mn ²⁺	-Mn ²⁺	+Mn ²⁺	-Mn ²⁺	+Mn ²⁺
Enzima I	0,1	3,2	3,1	3,3	<0,1	0,5	2,3	0,9
Enzima II	3,3	2,9	3,0	2,6	2,4	0,8	2,2	0,7

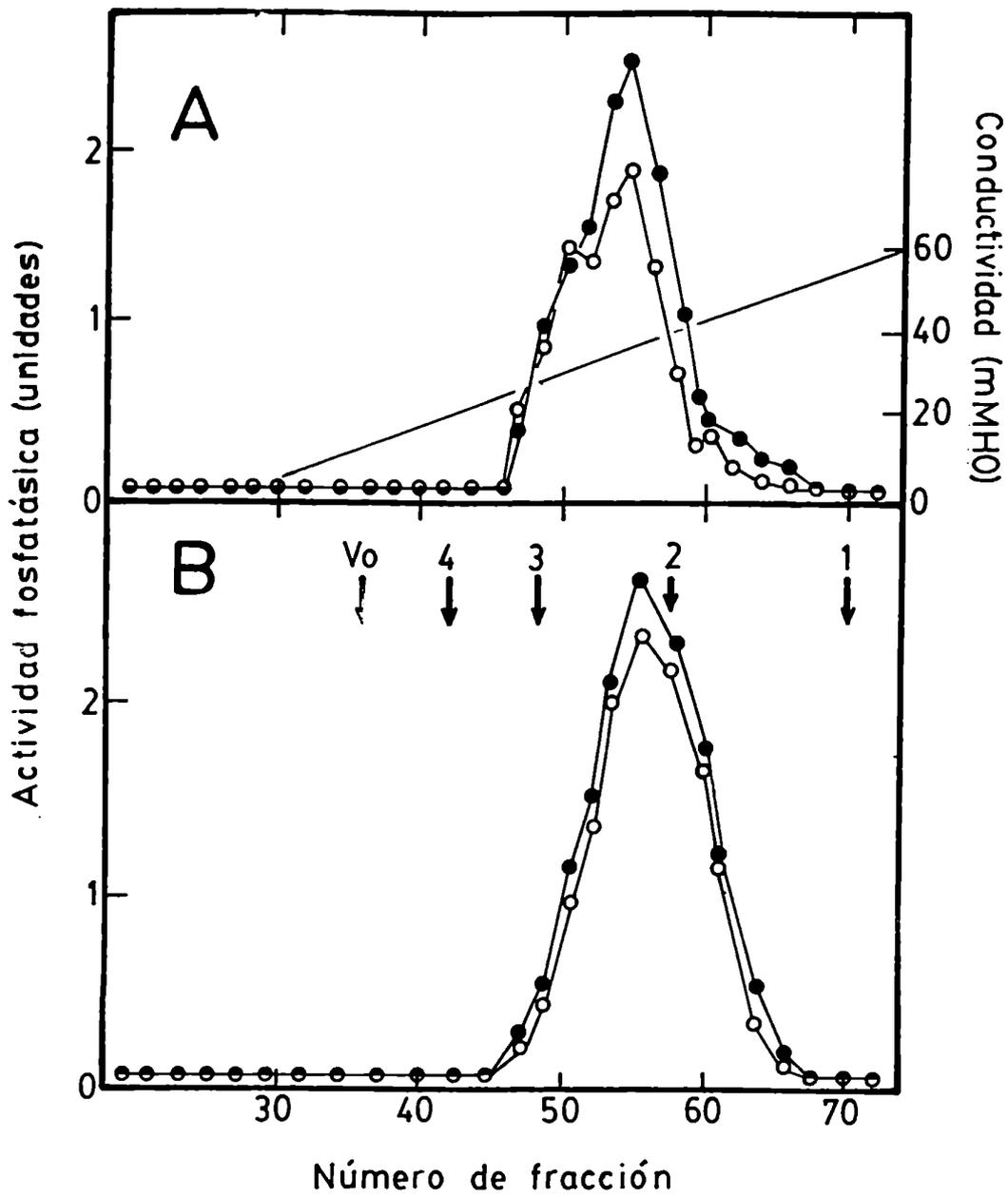
^a: Las enzimas fueron tratadas con etanol en la forma en que se detalla en la sección VII.1. de Materiales y Métodos. Las cantidades de enzimas y sustratos utilizados fueron las mismas que en la Tabla X.

Para conocer mejor las propiedades de la enzima I tratada con etanol, se estudió su comportamiento cromatográfico, tanto en DEAE-celulosa como en Sephacryl S-300. Como se puede observar en la Fig. 14 A, la conductividad a la que eluye de DEAE-celulosa, la enzima tratada, es muy similar a la necesaria para eluir a la en-

Figura 14.- Cromatografía en DEAE-celulosa y filtración en gel de la enzima I tratada con etanol. A. Una alícuota de 0,2 ml de la enzima I fue tratada con etanol de la forma en que se describe en la sección VII.1. de Materiales y Métodos. A la muestra tratada se le agregó 0,5 ml de seroalbúmina bovina (50 mg/ml) y se sembró en una columna de DEAE-celulosa (1,2 x 13 cm) preequilibrada con buffer M. La columna se lavó con 30 ml del mismo buffer. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de 0-0,4 M en ClNa en buffer M (volumen total 150 ml). Se recogieron fracciones de 1,5 ml y se ensayó actividad de fosfatasa de fosfoproteínas.

B. Una alícuota de 0,2 ml de la enzima I, procesada como se describe en A, se filtró a través de una columna de Sephacryl S-300 (1,2 x 50 cm) equilibrada con buffer M-50. Se recogieron alícuotas de 0,5 ml y se ensayó la actividad fosfatásica. El resto de las condiciones son similares a las descritas en las figuras 5 y 7.

Los ensayos se realizaron en presencia (—○—) y en ausencia (—●—) de Cl_2Mn 10 mM.



zima II de una columna similar (ver Fig. 8 B). Por otra parte, en la Fig. 14 B se observa una reducción en el tamaño de esta enzima, luego del tratamiento.

Estos datos apoyarían la hipótesis planteada anteriormente.

II. INHIBIDORES DE FOSFATASAS DE FOSFOPROTEINAS EN M.

ROUXII.

La pérdida de linealidad en los extractos crudos, en ausencia de Mn^{2+} (ver Fig 4) así como la reducción en el tamaño de la enzima I y la variación de sus propiedades luego del tratamiento con agentes desnaturalizantes, condujeron a pensar en la posibilidad de que existiesen en M. rouxii moduladores de las fosfatasas de fosfoproteínas.

II.1. Separación de dos inhibidores de fosfatasas de fosfoproteínas.

Los extractos crudos de M. rouxii, luego de ser calentados, fueron capaces de inhibir a ambas enzimas del hongo, aunque con diferente intensidad (estos datos no se muestran). Cuando los extractos calentados se cromatografiaron en DEAE-celulosa, se separaron parcialmente dos picos con actividad inhibitoria (ver Fig.15).

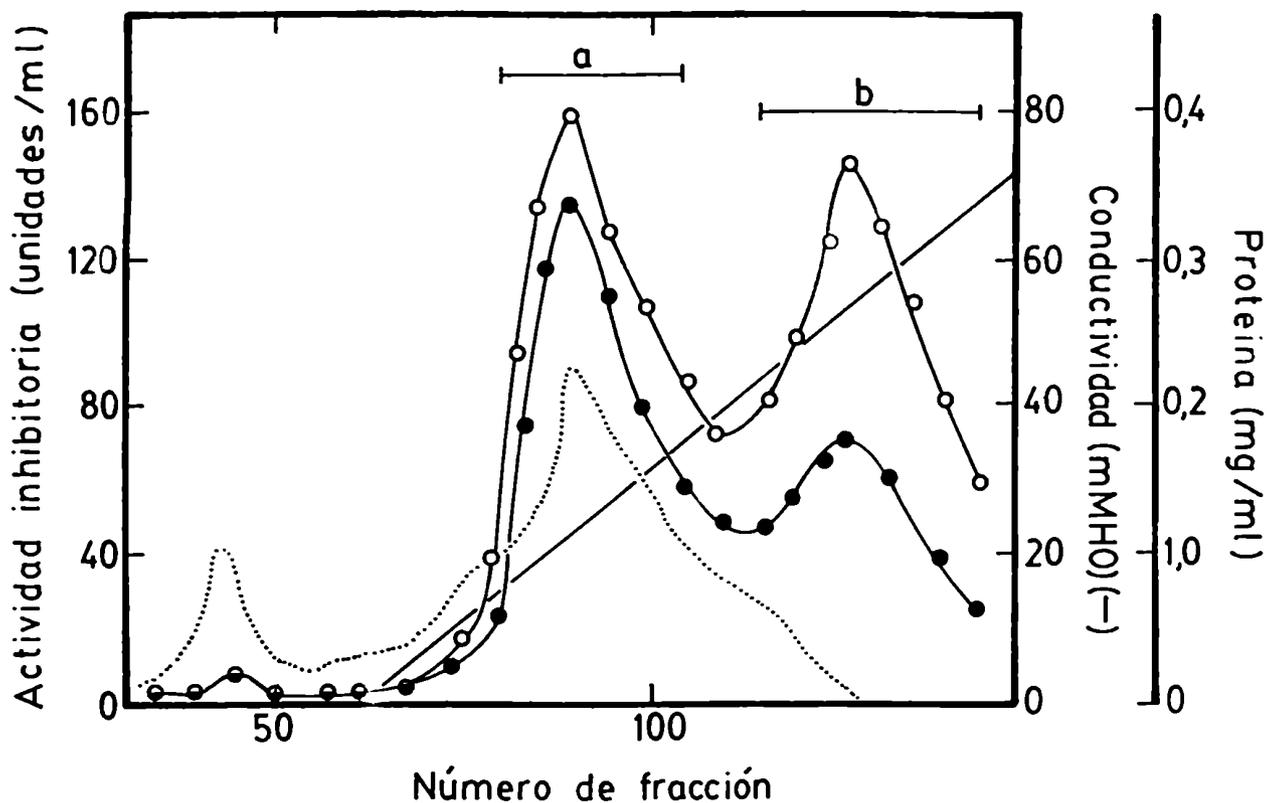


Figura 15.- Cromatografía en DEAE-celulosa del extracto calentado de *M. rouxii*. El extracto calentado (39 mg de proteína) fue cromatografiado en DEAE-celulosa de la forma que se describe en la sección IV de Materiales y Métodos. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y en alícuotas apropiadas se dosó actividad inhibitoria sobre la enzima I (—●—) y sobre la enzima II (—○—). La línea punteada indica el perfil de proteínas.

El pico de actividad del primer inhibidor se detectó a 23 mMHO (inhibidor a), mientras que el segundo (inhibidor b) eluía a 55 mMHO. En la Fig. 15 también se observa que el inhibidor b inhibe con mayor intensidad a la enzima II.

Ambos picos obtenidos de la cromatografía en DEAE-celulosa, fueron filtrados separadamente a través de columnas de Sephadex G-75. Los perfiles obtenidos se muestran en la Fig. 16, A y B. Como puede observarse, ambos inhibidores eluyen como picos simétricos, con volúmenes de elución muy diferentes (los picos pequeños que eluyen con el volumen muerto no fueron estudiados). Estos resultados eliminan la posibilidad de que la inhibición del inhibidor b sobre la fosfatasa I pudiera deberse a una contaminación con el inhibidor a.

Como se puede ver en la Tabla XIII, después del paso de filtración por Sephadex G-75, las purificaciones obtenidas fueron de 20 veces para el inhibidor a y de 80 veces para el inhibidor b, mientras que los rendimientos fueron del 5 y 10% respectivamente. Estos datos se calcularon con respecto al extracto crudo hervido, y suponiendo que ambos inhibidores, en este extracto, se hallaban en igual cantidad (ver Fig. 15).

Figura 16.- Filtración de los inhibidores a y b por Sephadex G-75.

El inhibidor a (4,5 mg) y el inhibidor b (0,43 mg),
provenientes del paso de DEAE-celulosa, se filtraron
por columnas de Sephadex G-75 (1,1 x 65 cm) de la
manera que se detalla en la sección IV de Materiales
y Métodos. Se recogieron alícuotas apropiadas y se
midió capacidad inhibitoria sobre la enzima I (—●—)
y sobre la enzima II (—○—). También se dosó proteí-
na (••••••••). V_0 indica el volumen muerto de las co-
lumnas.

A. Inhibidor a; B. Inhibidor b.

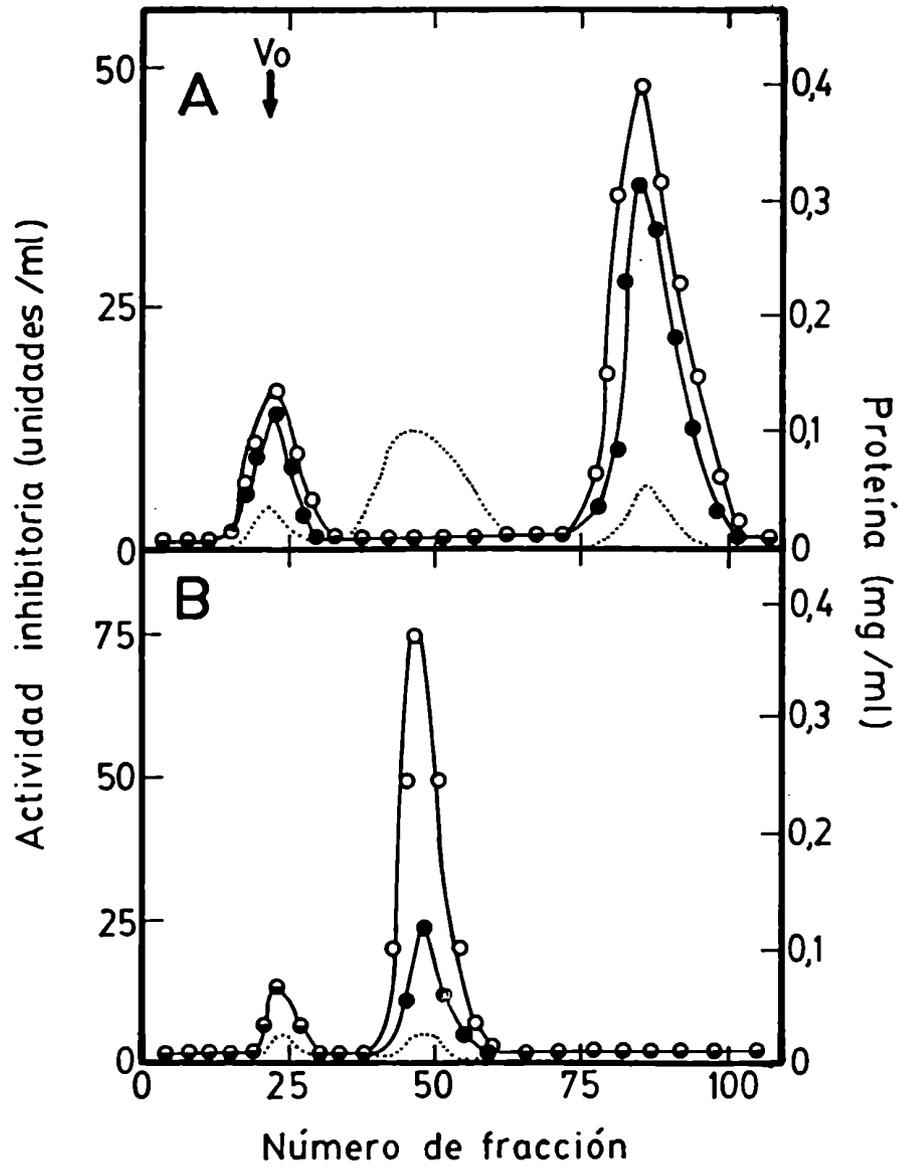


TABLA XIII

Purificación de los inhibidores a y b

Paso de purificación	Proteína (mg)	Actividad específica (unidades/ μ g)	Actividad total (unidades)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto calentado ^a	39				
Inhibidor a		0,28	11.000	1	100
Inhibidor b		0,28	11.000	1	100
Cromatografía en DEAE-celulosa					
Inhibidor a	4,5	0,86	3.840	3,1	35
Inhibidor b	0,58	6,4	3.750	22,9	34
Filtración por Sephadex G-75					
Inhibidor a	0,1	5,6	550	20	5
Inhibidor b	0,05	22,4	1.100	80	10

^a: La actividad de los inhibidores a y b en el extracto calentado fue calculada suponiendo que en dicha preparación, sus proporciones son iguales, según se desprende de la Fig. 15.

11.2. Cálculo de los pesos moleculares de los inhibidores a y b.

En la Fig. 16 A y B, se puede observar que el comportamiento de los inhibidores, cuando se los filtra por Sephadex G-75 es marcadamente distinto eluyendo ambos inhibidores en volúmenes muy diferentes.

Teniendo en cuenta esto, se utilizó una columna de Sephadex G-50 para el cálculo del peso molecular del inhibidor a y una de Sephadex G-75 para el del b.

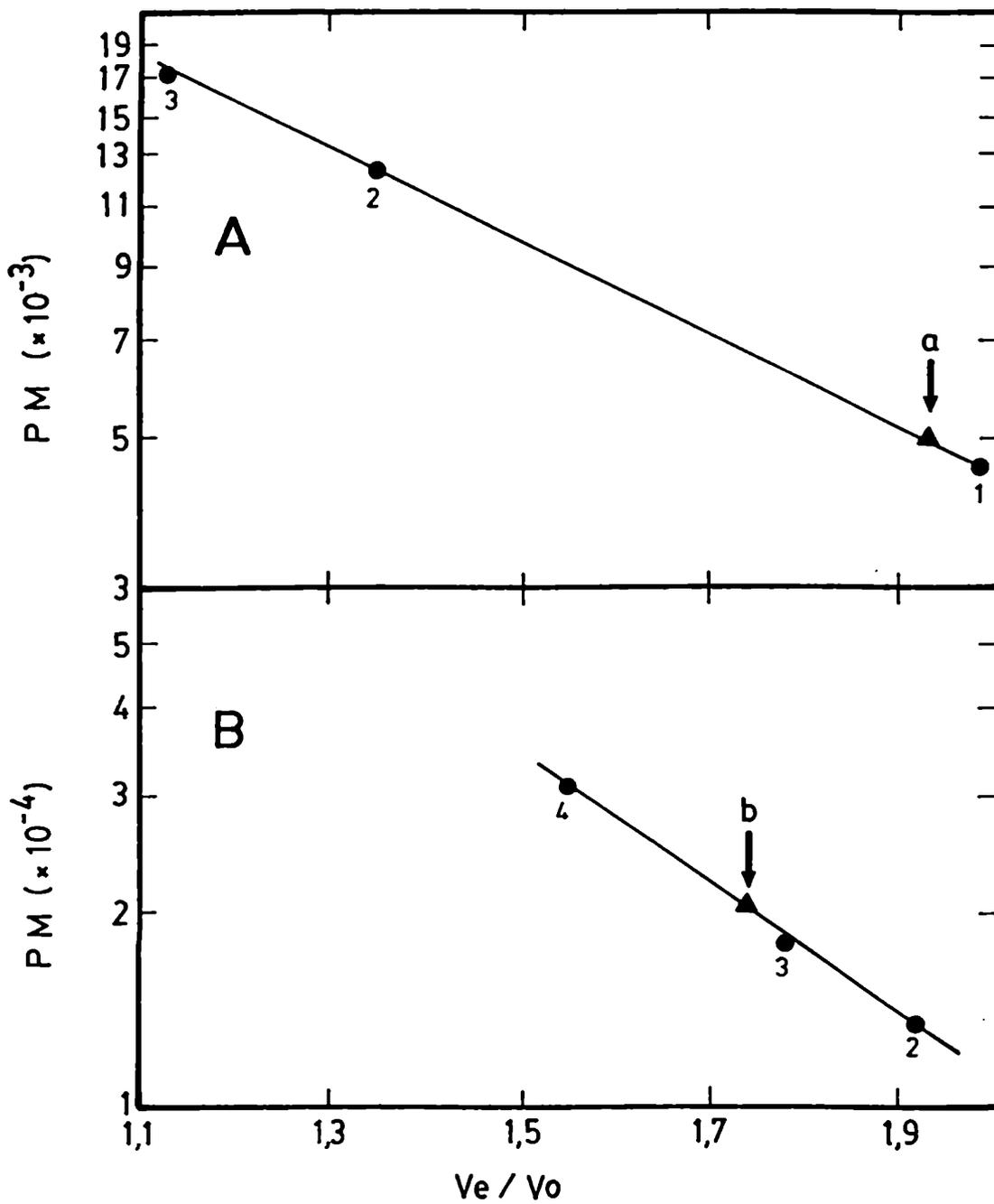
Se utilizó el método descrito en la sección VIII.7. de Materiales y Métodos, graficando el logaritmo del peso molecular de las proteínas marcadoras en función del cociente V_e/V_o . Por interpolación en las rectas obtenidas en cada caso, fue posible obtener los pesos moleculares de los inhibidores (Fig. 17, A y B).

El inhibidor a tiene un peso molecular aparente de 5.000 y el b, de 20.000.

11.3. Naturaleza de los inhibidores a y b.

En la Tabla XIV se puede observar el efecto del tratamiento proteolítico sobre los inhibidores de M. rouxii.

La preincubación con tripsina destruye completamente la



actividad de ambos inhibidores, de lo que se puede concluir que se trata de moléculas proteicas.

TABLA XIV

Efecto del tratamiento con tripsina de los inhibidores a y b.

Fosfatasa	Actividad inhibitoria ^a (%)			
	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Inhibidor a	Inhibidor b	Inhibidor a	Inhibidor b
Enzima I	48	8	0	0
Enzima II	51	52	0	0

^a: Alícuotas conteniendo 0,2 μ g de inhibidor a o 0,06 μ g de inhibidor b fueron utilizadas, antes y después de ser tratadas con tripsina según se describe en la sección VII.4. de Materiales y Métodos, como fuente de inhibidor. Se consideró 100% de inhibición a la anulación de la actividad enzimática y 0% de inhibición a la ausencia de efecto.

II.4. Efecto de los inhibidores a y b sobre las fosfatasas de *M.rouxii*

II.4.1. Utilizando histona-P como sustrato.

En la Fig. 18 A y B, se puede observar que el grado de inhi-

bición de ambas fosfatasa de Mucor depende de la cantidad de inhibidor utilizado en cada ensayo.

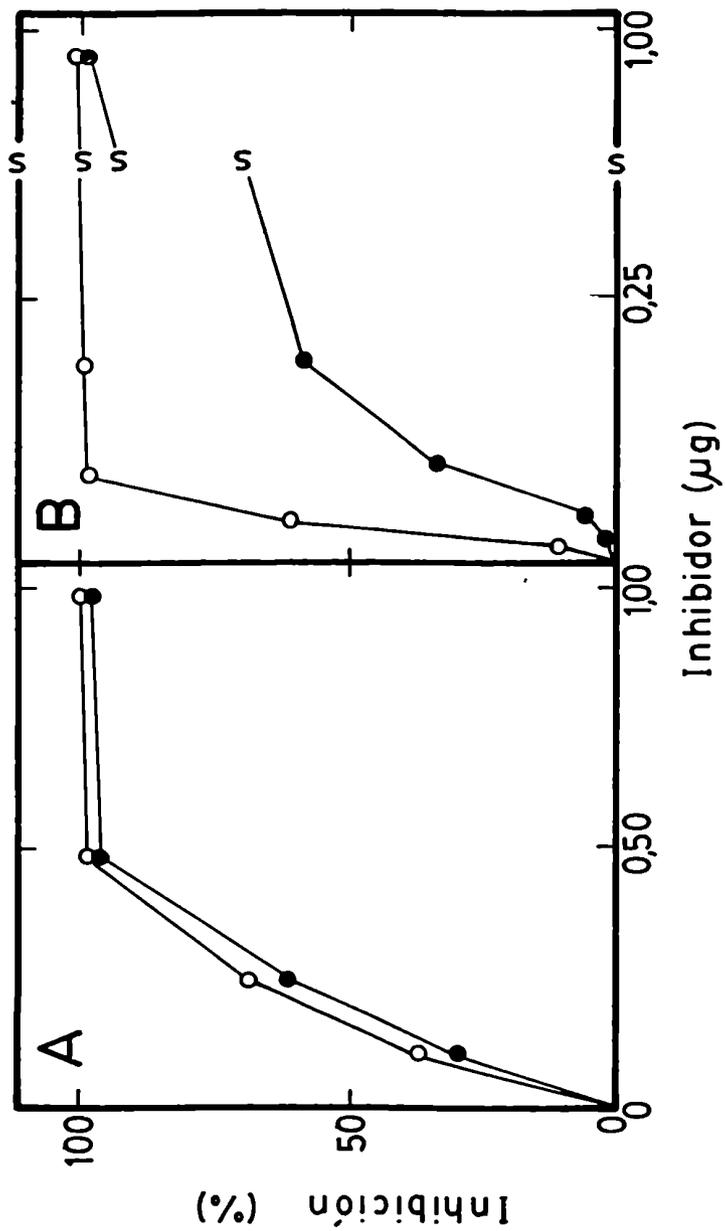
En la Fig. 18 A, se observa que las curvas de inhibición de ambas enzimas, utilizando inhibidor a, son similares. Las cantidades de inhibidor necesarias para obtener 50% y 100% de inhibición fueron 0,18 y 0,50 μ g respectivamente.

El inhibidor b, por el contrario, actúa en forma diferente sobre cada enzima, como se puede ver en la Fig. 18 B. El 50% de inhibición de la enzima II se obtuvo con 0,04 μ g de inhibidor b; para lograr igual inhibición de la enzima I fue necesario utilizar 0,16 μ g de inhibidor. Además, para llegar a la inhibición total de la enzima I, se requiere utilizar 10 veces más inhibidor b que para lograr el mismo efecto sobre la enzima II.

II.4.2. Utilizando fosforilasa a como sustrato.

Con el objeto de conocer el efecto de los inhibidores sobre la defosforilación de otras proteínas, se utilizó fosforilasa a como sustrato. Sin embargo, estos experimentos sólo se realizaron con la fosfatasa II, ya que la enzima I no actúa en forma eficiente sobre este sustrato (ver Tabla X). En la Fig. 19 se puede ver la inhibi -

Figura 18.- Inhibición de las fosfatasas de fosfoproteínas I y II en función de la concentración de los inhibidores a y b utilizando histona-P como sustrato. Las condiciones de ensayo fueron las descritas en la sección VI. 2. de Materiales y Métodos, salvo que se usaron cantidades variables de los inhibidores a y b provenientes del paso de Sephadex G-75. El sustrato utilizado fue histona-P. En cada caso se probó la inhibición sobre la enzima I (—○—) y sobre la enzima II (—○—). A. Inhibidor a; B. Inhibidor b.



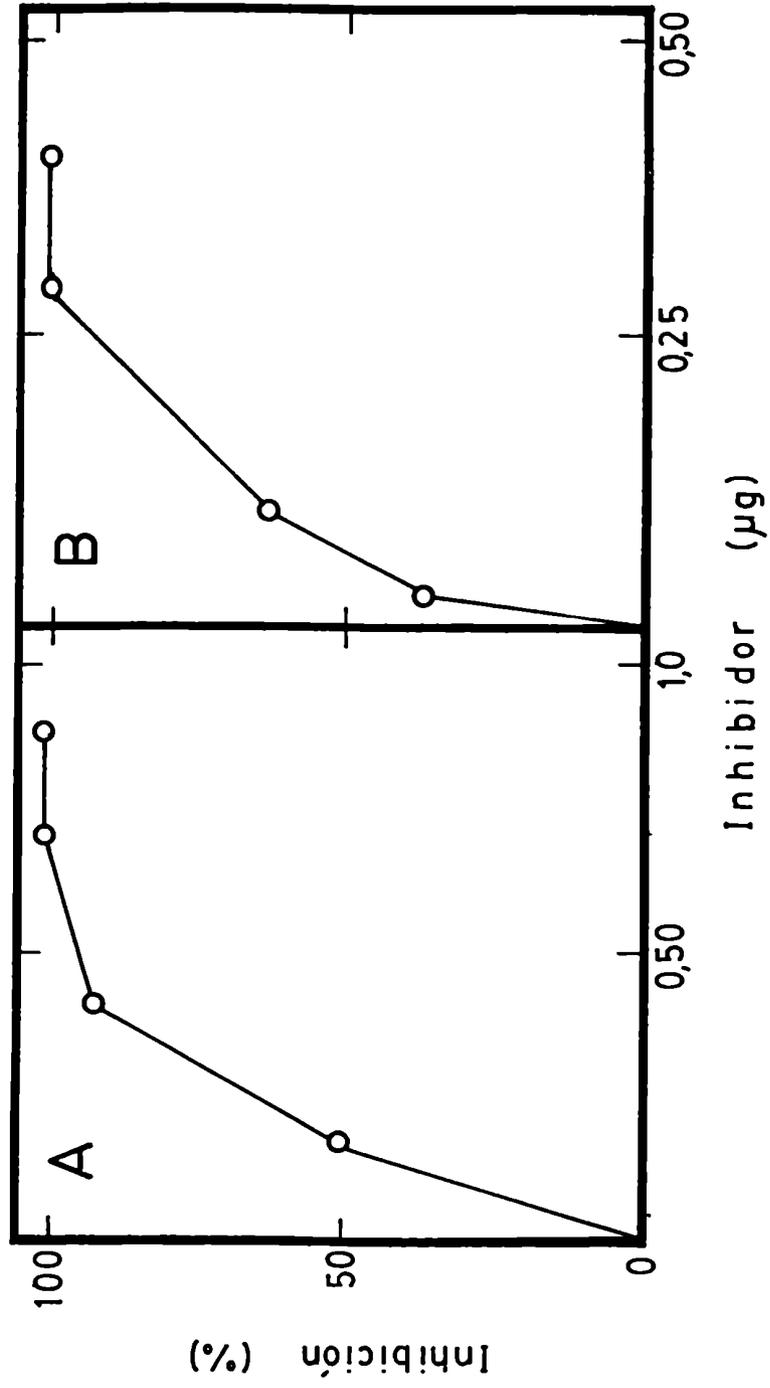
ción de la defosforilación de la fosforilasa a por la enzima II utilizando inhibidor a (Fig. 19A) o inhibidor b (Fig. 19B). El 50% de la inhibición se logra con $0,18 \mu\text{g}$ de inhibidor a y con $0,07 \mu\text{g}$ de inhibidor b; mientras que para lograr inhibición total es necesario agregar al ensayo $0,7 \mu\text{g}$ de inhibidor a ó $0,3 \mu\text{g}$ de inhibidor b.

Los resultados obtenidos muestran que la defosforilación de la fosforilasa a también es inhibida por ambos inhibidores, aunque se requieren mayores cantidades de los mismos para llegar a las mismas inhibiciones que se lograron con histona-P como sustrato.

II.5. Comparación de la acción de los inhibidores a y b con la de los quelantes de metales.

En la sección I.5. de Resultados y Discusión se muestra el efecto del ATP y el fluoruro sobre las enzimas de Mucor. Estas sustancias inhiben a la enzima II y no a la enzima I, y su efecto puede ser revertido por iones Mn^{2+} . También se postula la posibilidad de que su acción se deba a la remoción de cationes divalentes de la molécula enzimática.

El hecho de que ambos inhibidores inhiban a la fosfatasa I (aunque en diferente grado), pese a que los ensayos de esta enzima



se realizan con Cl_2Mn 10 mM indicaría que los inhibidores actúan por un mecanismo distinto al postulado para el ATP y el fluoruro.

El agregado de Mn^{2+} a los ensayos de la enzima II no revierte la acción de ninguno de los inhibidores (estos datos no se muestran). Esto confirmaría la suposición de que los inhibidores no actúan como quelantes de metales.

11.6. Efecto del "envejecimiento" sobre el inhibidor b.

Cuando se conserva el inhibidor b a -20°C durante varias semanas, se observa un incremento en su capacidad de inhibir a la enzima I (ver Tabla XV). Para estudiar el motivo de este cambio, se filtró el inhibidor b "envejecido" a través de una columna de Sephadex G-75 (ver Fig. 20). Como se puede observar, aparece un nuevo pico de actividad inhibitoria en una posición similar a la del inhibidor a, y con propiedades similares a éste. De esta manera, el inhibidor b se habría convertido en una forma de menor peso molecular con características similares a las del inhibidor a.

Por otra parte, un tratamiento similar sobre el inhibidor a no produjo ningún efecto (estos datos no se muestran).

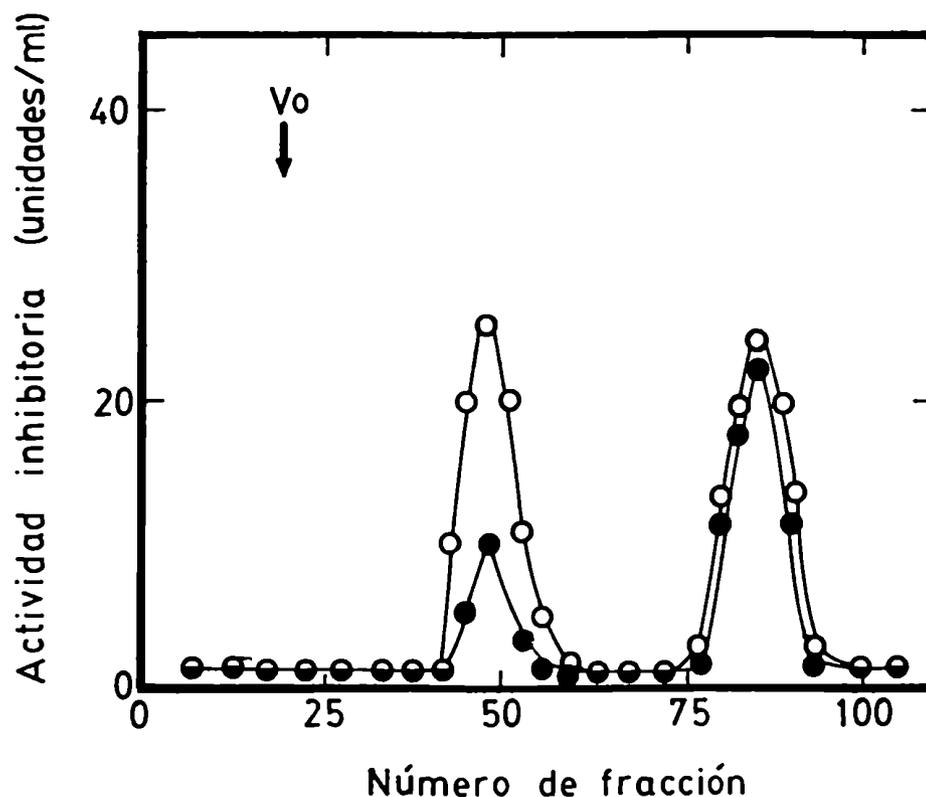


Figura 20.- Filtración del inhibidor b "envejecido" por Sephadex G-75. Una alícuota de 0,5 ml de inhibidor, conteniendo 15 μ g de proteína, se guardó a -20°C durante cuatro semanas. Luego se la filtró por una columna de Sephadex G-75 (1,1 x 65 cm) equilibrada con buffer M-50. El procedimiento utilizado es el descrito en la sección VIII.2. de Materiales y Métodos. En las fracciones recogidas se dosó capacidad inhibitoria sobre la enzima I (—●—) y sobre la enzima II (—○—). V_0 indica el volumen muerto.

TABLA XV.

·Actividad del inhibidor b "envejecido".

	Actividad inhibitoria ^a (%)	
	Enzima I	Enzima II
Inhibidor b "fresco" ^b	12	45
Inhibidor b "envejecido" ^c	37	47

^a: La actividad del inhibidor b se midió como se describe en la sección VI.2. de Materiales y Métodos, utilizando 0,06 ug del inhibidor b, proveniente del paso de Sephadex G-75.

^b: Se utilizó una muestra de Inhibidor inmediatamente después de ser filtrado por Sephadex G-75.

^c: Se utilizó una muestra guardada a -20°C durante 4 semanas.

III. ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LAS FOSFATASAS DE M. ROUXII Y SUS INHIBIDORES.

En la sección III.6. de la Introducción, se describen las características de las fosfatasas estudiadas en eucariontes inferiores. Un denominador común de todas ellas es que son de bajo peso molecular. Si bien el trabajo de Mc Clure y Korn (1983) en Acanthamoeb

ba castellanii y el de Palen et al. (1983) en Saccharomyces cerevisiae incluían en la extracción de las fosfatasas tratamientos con agentes desnaturalizantes, Hemmings (1980) en Candida utilis y Windenger-Drissen y Becker (1983) en levadura comercial, no utilizaban este tipo de procedimientos. Las enzimas descritas en el presente trabajo son también de bajo peso molecular. El conjunto de estos datos conduce a suponer que en eucariontes inferiores no existirían "holoenzimas", es decir, enzimas de alto peso molecular que por disociación originan "subunidades" más pequeñas. En Mucor no se hallaron estas formas, ni siquiera cuando se buscaron en extractos crudos y utilizando en los buffers inhibidores de proteasas.

Con respecto a los cationes divalentes, también es interesante notar que las fosfatasas de todos los eucariontes inferiores estudiados requieren o se activan por cationes divalentes. El resto de las enzimas relacionadas con el metabolismo del AMP cíclico (adenilato ciclasa, fosfodiesterasa y quinasa de proteínas) tanto en M. rouxii como en otros eucariontes inferiores, dependen completamente para su actividad de cationes divalentes (Pall, 1981). En M. rouxii, la adenilato ciclasa, la quinasa de proteínas dependiente de AMP_c y la fosfodiesterasa de AMP_c tienen un requerimiento absoluto de cationes divalentes (Mn^{2+} o Mg^{2+}). La adenilato ciclasa

actúa únicamente con Mn^{2+} , la fosfodiesterasa actúa con ambos cationes, siendo más eficiente el Mn^{2+} , mientras que la quinasa prefiere el Mg^{2+} al Mn^{2+} . La existencia de una fosfatasa de fosfoproteínas, la enzima I, dependiente de cationes divalentes ($Mn^{2+}=Mg^{2+}$) vendría a confirmar la importancia de estos iones en la regulación de las enzimas relacionadas directa o indirectamente con el metabolismo del nucleótido cíclico y sus efectos fisiológicos. Por otra parte, la fosfatasa II sería la única enzima relacionada con los efectos del AMP_c que escaparía a esta regulación.

Es muy difícil relacionar las fosfatasas de eucariontes inferiores con las de organismos superiores. Ya se explicó en la sección III.4. de la Introducción que es difícil, incluso, relacionar entre sí las enzimas de mamíferos descritas por diferentes grupos de investigación. De esta manera, sólo se pueden comparar sus propiedades y relacionar estas enzimas por sus especificidades de sustratos, sus requerimientos o sus parámetros hidrodinámicos. Teniendo en cuenta esto, no es posible todavía hacer una comparación entre las enzimas de M. rouxii y las de eucariontes superiores. Tampoco es posible hacer comparaciones serias con las enzimas de otros eucariontes inferiores, ya que todos los trabajos representan caracterizaciones parciales de las enzimas y los enfoques son diferentes (sustratos u-

tilizados, métodos de purificación, etc.).

En nuestro laboratorio se describió la regulación de la fosfodiesterasa de AMP_c de M.rouxii por fosforilación y defosforilación (Galvagno et al., 1979; Moreno et al., 1982). Sin embargo hasta el momento, no fue posible establecer si las fosfatasas aquí descritas defosforilan y desactivan a la fosfodiesterasa o si existe (n) otra (s) enzima (s) que realiza (n) este proceso.

Los inhibidores de fosfatasas de fosfoproteínas aquí descritos son los primeros hallados en eucariontes inferiores. Si bien su función "in vivo" es aún completamente desconocida, podrían desempeñar un papel muy importante en la regulación de estas enzimas.

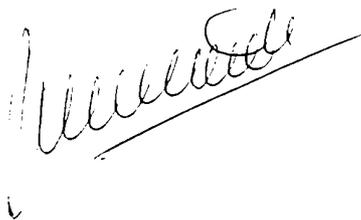
En tejidos de mamíferos se describieron dos inhibidores de fosfatasas (ver sección III.3.3. de la Introducción). Aunque es difícil establecer una relación entre estos inhibidores y los descritos en este trabajo, es importante resaltar que el inhibidor b de Mucor tiene ciertas similitudes con el inhibidor 2 de eucariontes superiores: ambos son espontáneamente activos y tienen un peso molecular cercano a 20.000.

IV. CONCLUSIONES.

1. En Mucor rouxii existen, al menos, dos fosfatasa de fosfoproteí nas (enzimas I y II).
2. Estas enzimas son de bajo peso molecular y, en extractos crudos, no se hallan formas de alto peso molecular, incluso trabajando con inhibidores de proteasas.
3. La enzima I tiene las siguientes propiedades:
 - a) Es totalmente dependiente de cationes divalentes (Mn^{2+} , Mg^{2+}),
 - b) Sólo defosforila en forma eficiente histona-P.
 - c) No se inhibe por ATP o fluoruro.
 - d) Su peso molecular aparente es de 64.000.
 - e) Eluye de DEAE-celulosa a una conductividad de 30 mMHO.
4. La enzima II tiene las siguientes propiedades:
 - a) Es independiente de cationes divalentes e, incluso, su actividad se puede inhibir por el agregado de los mismos.
 - b) Defosforila en forma eficiente histona-P y fosforilasa a.
 - c) Se inhibe por ATP y fluoruro, y esta inhibición es revertida por el agregado de Mn^{2+} .
 - d) Su peso molecular aparente es de 40.000.
 - e) Eluye de DEAE-celulosa a una conductividad de 40 mMHO.
5. El tratamiento de la enzima I con etanol la convierte en una for_

ma con parámetros físicoquímicos y propiedades catalíticas muy similares a los de la enzima II.

6. Existen en M. rouxii dos inhibidores termoestables de las fosfatasa de fosfoproteínas (inhibidores a y b).
7. Las propiedades del inhibidor a son las siguientes:
 - a) Inhibe en forma similar a ambas enzimas del hongo.
 - b) Su peso molecular aparente es de 5.000.
 - c) Eluye de una columna de DEAE-celulosa a una conductividad de 23 mMHO.
8. Las propiedades del inhibidor b son las siguientes:
 - a) Si bien inhibe a ambas enzimas, actúa en forma más eficiente sobre la enzima II.
 - b) Su peso molecular aparente es de 20.000.
 - c) Eluye de DEAE-celulosa a una conductividad de 55 mMHO.
9. El inhibidor b, después de ser guardado a -20°C durante varias semanas, se convierte parcialmente en una forma con propiedades similares a las del inhibidor a.



BIBLIOGRAFIA

- Aitken, A., Bilham, T. y Cohen, P. (1982) Eur. J. Biochem. 126, 235.
- Albin, E.E. y Newburgh, R. W. (1975) Biochim. Biophys. Acta 337, 381.
- Angan, T. (1968) Science 162, 63.
- Andrews, P. (1964) Biochem. J. 91, 222.
- Antoniwi, J.F. y Cohen, P. (1976) Eur. J. Biochem. 68, 45
- Antoniwi, J.F., Nimmo, H.G., Yeaman, S.J. y Cohen, P. (1977) Biochem. J. 162, 423.
- Armstrong, R.M. y Kaiser, E.T. (1978) Biochemistry 17, 2840.
- Atmar, V.J., Kuehn, G.D. y Casillas, E.R. (1981) J. Biol. Chem. 256, 8275.
- Bartnicki-García, S. (1968) J. Bacteriol. 96, 1586.
- Bartnicki-García, S. y Nickerson, W.J. (1962) J. Bacteriol. 84, 829.
- Beavo, J.A., Bechtel, P.J. y Krebs, E.G. (1975) Cycl. Nucleotide Res. 5, 241.
- Beemon, K. y Hunter, T. (1978) J. Virol. 28, 551.
- Bennett, J. (1980) Eur. J. Biochem. 104, 85.
- Binstock, J.F. y Li, H.C. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 1226.
- Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248.

- Brandt, H., Killilea, S.D. y Lee, E.Y.C. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 598.
- Brandt, H., Capulong, Z.L. y Lee, E.Y.C. (1975a) *J. Biol. Chem.* 250, 8039.
- Brandt, H., Lee, E.Y.C. y Killilea, S.D. (1975b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63, 950.
- Brautigan, D., Picton, C. y Fischer, E.H. (1980) *Biochemistry* 19, 5787.
- Brautigan, D., Bronstein, P. y Gallis, B. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 6519.
- Brautigan, D., Ballou, L.M. y Fischer, E.H. (1982) *Biochemistry* 21, 1977.
- Cantore, M.L., Galvagno, M.A. y Passeron, S. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 199, 312.
- Cantore, M.L. y Passeron, S. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 219, 1.
- Cecil, R. y Ogston, A.G. (1948) *Biochem. J.* 42, 229.
- Cecil, R. y Ogston, A.G. (1951) *Biochem. J.* 49, 105.
- Clari, G. y Moret, V. (1981) *Biochem. International* 3, 433.
- Cohen, P. (1973) *Eur. J. Biochem.* 34, 1.
- Cohen, P. (1978) *Curr. Top. Cel. Regulation* 14, 117.
- Cohen, P. (1980) in *Molecular Aspects in Cellular Regulation Vol. 1* (Ed. Cohen, P.; Elsevier, Amsterdam) 1.
- Cohen, P. (1982) *Nature* 296, 613.
- Cohen, P., Foulkes, J.G., Goris, J., Hemmings, B., Ingebritsen, T.S. y Stewart, A.A. (1981) in *Metabolic Interconversion of Enzymes* (ed. Holzer, H., Springer, Heidelberg) 28.

- Collet, M.S., Brugge, J.S. y Erikson, R.L. (1978) Cell 15, 1363.
- Corbin, J.D., Reinmann, E., Walsh, D. y Krebs, E.G. (1970) J. Biol. Chem. 245, 4849.
- Corbin, J.D., Keely, S.L., Soderling, T.R. y Park, C.R. (1975) Adv. Cycl. Nucleotide Res. 5, 265.
- Corbin, J.D., Sugden, P.H., West, L., Flockhart, D.A., Lincoln, T.M. y Mc Carthy, D. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4569.
- Cori, G.T. y Green, A.A. (1943) J. Biol. Chem. 151, 31.
- Crouch, D.A. y Safer, B. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7918.
- Chang, K., Marcus, M. y Cuatrecasas, P. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6854.
- Cheung, W.Y. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 533.
- Cheung, W.Y. (1981) J. Cyclic Nucleotide Res. 7, 71.
- Chou, C.K., Alfano, H. y Rosen, O.M. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2855.
- Davis, R.P. (1961) The enzymes, Vol. 5, 2nd. Ed. (Boyer, R.P., Lardy, H. y Myrback, K. Ed.) Academic Press, Inc. New York 545.
- Defreyn, G., Goris, J. y Merlevede, W. (1977) FEBS Lett. 79, 125.
- Doperé, F., Vanstapel, F. y Stalmans, W. (1980) Eur. J. Biochem. 104, 137.
- Edmundson, A.B. y Hirs, C.H.W. (1962) J. Molec. Biol. 5, 663.
- Embi, N., Rylatt, D.B. y Cohen, P. (1980) Eur. J. Biochem. 107, 519.

- Erlichman, J., Rosenfeld, R. y Rosen, O.M. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5000.
- Farrell, P.J., Balkow, K., Hent, T. y Jackson, R. (1977) Cell 11, 187.
- Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4517.
- Fleischer, M., Rosen, O.M. y Reichlin, M. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 54.
- Flockhart, D.A. y Corbin, J.D. (1982) C.R.C. Critical Reviews in Biochemistry 12, 133.
- Fosset, M., Muir, C.W., Nielsen, C.D. y Fischer, E.H. (1971) Biochemistry 10, 4105.
- Foulkes, J.G. y Cohen, P. (1980) Eur. J. Biochem. 105, 195.
- Foulkes, J.G., Howard, R.F. y Ziemiecki, A. (1981) FEBS Lett. 130, 197.
- Foulkes, J.G., Cohen, P., Strada, S.J., Everson, W.V. y Jefferson, C.S. (1982) J. Biol. Chem. 217, 12493.
- Friedenthal, M., Epstein, A. y Passeron, S. (1974) J. Gen. Microbiol. 82, 15.
- Friedman, D.L. y Larner, J. (1963) Biochemistry 2, 669.
- Galvagno, M.A., Moreno, S.M., Cantore, M.L. y Passeron, S. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 779.
- Ganapathi, M.K., Silberman, S.R., Paris, H. y Lee, E.Y.C. (1981) J. Biol. Chem. 256, 3213.
- Gill, G.N. y Garren, L.D. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 786.
- Glynn, I. y Chappell, J. (1964) Biochem. J. 90, 147.

- Gomes, S.L. y Maia, J.C.C. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 567, 257.
- Goris, J., Defreyn, G., y Merlevede, W. (1977) *Biochimie* 59, 171.
- Goris, J., Defreyn, G., Vandenneede, J. y Merlevede, W. (1978) *Eur. J. Biochem.* 91, 457.
- Grand, R.J., Shenolikar, S. y Cohen, P. (1980) *Eur. J. Biochem.* 113, 359.
- Grankowski, N., Lehmusvirta, D., Kramer, G. y Hardesty, B. (1980a) *J. Biol. Chem.* 255, 310.
- Grankowski, N., Lehmusvirta, D., Stearns, G.B., Kramer, G. y Hardesty, B. (1980b) *J. Biol. Chem.* 255, 5755.
- Gratecos, D., Detwiler, T.C., Hurd, S. y Fischer, E.H. (1977) *Biochemistry* 16, 4812.
- Haga, T., Haga, A. y Gilman, A.G. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5776.
- Haigler, H., Ash, J.F., Singer, S.J. y Cohen, S. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 3317.
- Hardie, D.G. y Cohen, P. (1979) *FEBS Lett.* 103, 333.
- Harris, D.L. (1946) *J. Biol. Chem.* 151, 541.
- Hayakawa, T., Perkins, J.P. y Krebs, E.G. (1973) *Biochemistry* 12, 574.
- Hemmings, B.A. (1981) *FEBS Lett.* 116, 47.
- Hemmings, B.A., Resink, T.J. y Cohen P. (1982) *FEBS Lett.* 150, 319.

- Hiraga, A., Kikuchi, K., Tamura, S. y Tsuiki, S. (1981) *Eur. J. Biochem.* 119, 503.
- Hofmann, F. y Sold, G. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 1100.
- Hsiao, K.J., Chan, W.W. y Li, H.C. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 483, 337.
- Hsiao, K.J., Sandberg, A.R. y Li, H.C. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 6901.
- Huang, F.L. y Glinsman, W.H. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 3004.
- Huang, F.L. y Glinsman, W.H. (1976a) *FEBS Lett.* 62, 326.
- Huang, F.L. y Glinsman, W.H. (1976b) *Eur. J. Biochem.* 70, 419.
- Huang, K.P. y Cabib, E. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 3851.
- Hunter, T. y Sefton, B.M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 1311.
- Huttunen, J., Steinberg, D. y Mayer, S. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67, 290.
- Inderlied, C.B., Cihlar, R.S. y Sypherd, P.S. (1980) *J. Bacteriol.* 141, 699.
- Ingebritsen, T.S., Foulkes, G. y Cohen, P. (1980) *FEBS Lett.* 119, 9.
- Ingebritsen, T.S. y Cohen, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* 132, 263.
- Ingebritsen, T.S., Foulkes, J.G. y Cohen, P. (1983a) *Eur. J. Biochem.* 132, 263.
- Ingebritsen, T.S., Blair, J., Guy, P., Witters, L. y Hardie, D. G. (1983b) *Eur. J. Biochem.* 132, 275.

- Ingebritsen, T.S., Stewart, A.A. y Cohen, P. (1983c) Eur. J. Biochem. 132, 297.
- Jakob, A. y Diem, S. (1979) Biochim. Biophys. Acta 567, 174.
- Jett, M.F. y Hers, H.G. (1981) Eur. J. Biochem. 118, 283.
- Jett, M.F., Hue, L. y Hers, H.G. (1981) FEBS Lett. 132, 183.
- Kemp, B.E., Benjamini, E. y Krebs, E.G. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1038.
- Kerner, N. (1984) Comunicación personal.
- Khandelwal, R.L. (1977) Biochim. Biophys. Acta 485, 379.
- Khandelwal, R.L. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 191, 764.
- Khandelwal, R.L. (1979) Can. J. Biochem. 57, 1337.
- Khandelwal, R.L., Vandenheede, J.R. y Krebs, E.G. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4850.
- Khandelwal, R.L. y Zinman, S.M. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 1340.
- Khandelwal, R.L., Zinman, S.M. y Ng, T.T.S. (1980) Biochim. Biophys. Acta 626, 486.
- Khatra, B.S. y Sodeling, T.R. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 647.
- Killilea, S.D., Brandt, H., Lee, E.Y.C. y Whelan, W.J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2363.
- Killilea, S.D., Aylward, J.H., Mellgren, R.L. y Lee, E.Y.C. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 191, 638.
- Killilea, S.D., Mellgren, R.L., Aylward, J.H., Metieh, M.E. y Lee, E.Y.C. (1979) Arch. Biochem. Biophys. 193, 130.

- Klee, C.B., Crouch, T.H. y Krinks, M.H. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 6270.
- Klener, P.A. y Westhead, N. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 551.
- Knight, B.L. y Skala, J.P. (1979) J. Biol. Chem. 254, 1319.
- Knight, B.L. y Skala, J.P. (1982) Can. J. Biochem. 60, 734.
- Knight, B.L. y Teal, T.K. (1980) Eur. J. Biochem. 104, 521.
- Kobayashi, K., Kato, K. y Sato, S. (1975) Biochim. Biophys. Acta 377, 343.
- Kobayashi, K. y Kato, K. (1977) J. Biochem. (Tokyo) 81, 93.
- Krakower, G.R. y Kim, K.H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 2408.
- Krebs, E.G. (1973) Endocrinology, Proceedings of the 4th. International Congress Excerpta Medica-Amsterdam.
- Krebs, E.G. y Fischer, E.H. (1956) Biochim. Biophys. Acta 20, 150.
- Krebs, E.G. y Beavo, J.A. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48, 923.
- Krebs, E.G., Graves, D.J. y Fischer, E.H. (1959) J. Biol. Chem. 234, 2867.
- Kuo, J.F. y Greengard, P. (1970) J. Biol. Chem. 245, 2493.
- Larsen, A. y Sypherd, P. S. (1974) J. Bacteriol. 117, 432.
- Laurent, T.C. y Killander, J. (1964) J. Chromatog. 14, 317.
- Lee, E.Y.C., Brandt, H., Capulong, Z.L. y Killilea, S.D. (1976) Adv. Enzyme Regul. 14, 467.
- Lee, E.Y.C., Mellgren, R.L., Killilea, S.D. y Aylward, J.H. (1978) in Regulatory Mechanisms of Carbohydrate Metabolism, ed. Esmann, V., 1.

- Lee, E.Y.C., Silberman, S.R., Ganapathi, M.K., Petrovic, S. Paris, M. (1980) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 13, 95.
- Levin, D.H., Ranu, R.S., Ernst, V. y London, I.M. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 3654.
- Levinson, A.D., Oppermann, M., Varmus, H.E. y Bishop, J.M. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11973.
- Li, H.C. (1975) *FEBS Lett.* 55, 134.
- Li, H.C. (1982) *Curr. Top. Cel. Reg.* 21, Acad. Press Inc., 129.
- Li, H.C. y Hsiao, K.J. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 147.
- Li, H.C., Hsiao, K.J. y Chan, W.W.S. (1978) *Eur. J. Biochem.* 84, 215.
- Li, H.C., Tarabini, D., Cheng, Y.S. y Cheng, L.B. (1981) *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 40, 1539.
- Lipmann, F. (1933) *Biochem. Z.* 262, 3.
- Lipmann, F. y Levene, P.A. (1932) *J. Biol. Chem.* 98, 109.
- Londesborough, J.C. y Nurminem, T. (1972) *Acta Chem Scand.* 26, 3396.
- Loowis, W.F. (1972) *Nature, New Biol.* 240, 6.
- Mackenzie, C.W., Bulbulian, G.J. y Bishop, J.S. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 614, 413.
- Maeno, H. y Greengard, P. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 3269.
- Maia, J.C. y Camargo, E. (1974) *Cell. Differ.* 3, 147.
- McClure, J.A. y Korn, E.D. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 14570.
- Meisler, M.H. y Langan, T.A. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4961.

- Mellgren, R.L., Aylward, J.H., Killilea, S.D. y Lee, E.Y.C. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 648.
- Mellgren, R.L. y Schlender, K.K. (1982) *J. Cycl. Nucleot. Res.* 8, 27.
- Moreno, S. y Passeron, S. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 199, 321.
- Moreno, S., Paveto, C. y Passeron, S. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 1.
- Moreno, S., Galvagno, M.A. y Passeron, S. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 214, 573.
- Moreno, S., Pastori, R. y Passeron, S. (1983) *Mol. Cel. Biochem.* 52, 13
- Mumby, M. y Traugh, J.A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 611, 342.
- Nakazawa, K. y Sano, M. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 7415.
- Nair, A.C. y Perry, S.V. (1978) *Biochem. J.* 179, 89.
- Nimmo, G.A. y Cohen, P. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87, 341.
- Orłowsky, M. y Sypherd, P.S. (1977) *J. Bacteriol.* 132, 204.
- Palen, E., Grankowski, N. y Gaisor, E. (1983) *Acta Biochim. Polon.* 30, 165.
- Pall, M.L. (1981) *Microbiological Reviews*, 462.
- Paris, H., Ganapathi, M.K., Silberman, S.R., Aylward, J. H. y Lee, E.Y.C. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 7510.
- Pastori, R. (1983) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Pastori, R., Kerner, N., Moreno, S. y Passeron, S. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 663.

- Pato, M.D. y Adelstein, R.S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 6535.
- Pato, M.D. y Adelstein, R.S. (1983a) J. Biol. Chem. 258, 7047.
- Pato, M.D. y Adelstein, R.S. (1983b) J. Biol. Chem. 258, 7055.
- Pato, M.D., Adelstein, R.S., Crouch, D., Safer, B., Ingebritsen, T.S. y Cohen, P. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 283.
- Paul, P., Lin, C., Mori, T. y Key, J.L. (1980) Plant Physiol. 66, 368.
- Paveto, C., Epstein, A. y Passeron, S. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 169, 449.
- Paznokas, J.L. y Sypherd, P. (1975) J. Bacteriol. 124, 134.
- Pinna, L. A., Donella, A., Clari, G. y Moret, V. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 1308.
- Pratt, M.L., Mahler, J.F. y Roche, T.E. (1982) Eur. J. Biochem. 125, 349.
- Purchio, A.F., Erikson, E., Brigge, J. y Erikson, R.L. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1567.
- Rall, T.W., Sutherland, E.W. y Berthet, L. (1957) J. Biol. Chem. 224, 463.
- Reyl, F. y Lewin, M.J.M. (1981) Biochim. Biophys. Acta 675, 297.
- Reynolds, F.H., Van de Ven, W.J.M. y Stephenson, J.R. (1980) J. Biol. Chem. 255, 11040.
- Riley, W.D., Delange, R.J., Bratvold, G.E. y Krebs, E.G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2209.
- Robinson, G., Butcher, R. y Sutherland, E.W. (1971) Cyclic AMP, Academic Press, N.Y.

- Scott, W. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 2995.
- Schlender, K., Wei, S. y Villar-Palasi, C. (1969) Biochim. Biophys. Acta 191, 272.
- Sepherd, R.G., et al. (1956) J. Am. Chem. Soc. 78, 5051.
- Shimazu, T., Tokulata, S. y Usami, H. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7376.
- Siegel, L.M. y Monty, K. (1966) Biophys. Acta 112, 346.
- Silberman, J.R., Speth, M., Nemani, R., Ganapathi, H.K., Dombradi, V., Paris, H. y Lee, E.Y.C. (1984) J. Biol. Chem. 259, 2913.
- Skuster, J.R., Jesselham, K.F. y Graves, D.J. (1980) J. Biol. Chem. 255, 2203.
- Soderling, T., Hickenbottom, J., Reinmann, E., Hunkaler, F. Walsh, D. y Krebs, E.G. (1970) J. Biol. Chem 245, 6817.
- Stewart, A.A., Ingebriksen, T.S., Manalan, A., Klee, C.B. y Cohen, P. (1982) FEBS Lett. 137, 80.
- Stewart, A.A., Ingebriksen, T.S. y Cohen, P. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 289.
- Sugden, P.H., Kerbey, A.L., Randle, P.J., Waller, C.A. y Reid, K.B.M. (1979) Biochem. J. 181, 419.
- Sutherland, E.W. y Wosilait, W.D. (1955) Nature 175, 169.
- Swarup, G., Cohen, S. y Garkers, D.L. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 1104.
- Takai, Y., Yamamura, H. y Nishizuka, Y. (1974) J. Biol. Chem. 249, 530.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y. y Nishizuka, Y (1979) J. Biol. Chem. 254, 3692.

- Tamura, S. y Tsuiki, S. (1980) *Eur. J. Biochem.* 114, 217.
- Tamura, S., Kikuchi, H., Kikuchi, K., Hiraga, A. y Tsuiki, S. (1980) *Eur. J. Biochem.* 104, 347.
- Tao, M., Salas, M.L. y Lipmann, F. (1970) *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 67, 408.
- Teague, W.H., Pettit, F.H., Wu, T.L., Silberman, S.R. y Reed, L.J. (1982) *Biochemistry* 21, 5585.
- Tellez-Iñón, M.T., Terenzi, H. y Torres, H.N. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 191, 765.
- Tellez-Iñón, M.T. y Torres, H.N. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 66, 459.
- Terenzi, H.F., Rosellino, E. y Passeron, S. (1971) *Eur. J. Biochem.* 18, 342.
- Terenzi, H.F., Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 990.
- Titanji, V.P.K., Zetterqvist, Ö. y Engström, L. (1980) *FEBS Lett.* 111, 209.
- Torres, H.N. y Chelala, C.A. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 198, 495.
- Trachsel, H. (1977) *Cell* 11, 187.
- Vandenheede, J.R., Yang, S.D., Goris, J. y Merlevede, N. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11768.
- Wallace, R.W., Tallant, E.A. y Cheung, W.Y. (1980) *Biochemistry* 19, 1831.
- Walsh, D.A., Perkins, J. y Krebs, E.G. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 3763.
- Walsh, D.A. y Ashby, C.D. (1973) *Recent. Prog. Horm. Res.* 29, 329.

- Weller, M. (1979) Protein phosphorylation (Lagnardo, J.R. Ed., London).
- Wieland, O.H., Hartmann, U. y Siess, E.A. (1972) FEBS Lett. 27, 240.
- Wingender-Drissen, R. y Becker, J.U. (1983) Biochim. Biophys. Acta 743, 343.
- Worthington Enzyme Manual (1972) Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey.
- Yamamura, H., Inoue, Y., Shimamura, R. y Nishizuka, Y. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 589.
- Yang, S.D., Vandenheede, J.R., Goris, J. y Merlevede, W. (1980) J. Biol. Chem. 255, 11759.
- Yang, S.D., Tallant, A. y Cheung, W.Y. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 1419.
- Yücel, M. y Ozer, I. (1981) FEBS Lett. 125, 120.