

Tesis de Posgrado

Mecanismo de regulación de la fosfodiesterasa de AMP cíclico del hongo dimórfico *Mucor rouxii* por fosforilación y proteólisis : Variaciones de las formas enzimáticas durante el crecimiento filamentoso

Kerner, Néstor Alberto

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:

Kerner, Néstor Alberto. (1985). Mecanismo de regulación de la fosfodiesterasa de AMP cíclico del hongo dimórfico *Mucor rouxii* por fosforilación y proteólisis : Variaciones de las formas enzimáticas durante el crecimiento filamentoso. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1890_Kerner.pdf
Kerner, Néstor Alberto. "Mecanismo de regulación de la fosfodiesterasa de AMP cíclico del hongo dimórfico *Mucor rouxii* por fosforilación y proteólisis : Variaciones de las formas enzimáticas durante el crecimiento filamentoso". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1890_Kerner.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis 1890

ej. 2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

MECANISMO DE REGULACION DE LA FOSFODIESTERASA DE
AMP cíclico DEL HONGO DIMORFICO Mucor rouxii POR
FOSFORILACION Y PROTEOLISIS

VARIACIONES DE LAS FORMAS ENZIMATICAS
DURANTE EL CRECIMIENTO FILAMENTOSO

AUTOR: Néstor Alberto Kerner

DIRECTOR: Dra. María Susana Di Bernardo de Passeron

LUGAR DE TRABAJO: Departamento de Química Biológica

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA)

Tesis presentada para optar por el título de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

- 1985 -

1890
ej. 2



A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Susana Passeron por sus enseñanzas y apoyo constante y generoso, y por haberme dado la oportunidad de iniciarme en la investigación bioquímica.

A Silvia Moreno y a Ricardo Pastori por todas las enseñanzas impartidas, la dedicación brindada, el aliento y el cariño siempre presentes en todos y cada uno de los días de trabajo.

A Mauricio Seigelchifer por la amistad, el compañerismo y la comprensión que tanto han significado para mí.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Cristina Paveto, Miguel Galvagno y María Leonor Cantore por los gratos momentos vividos, la colaboración permanente y todas las enseñanzas que me han dado.

A la Dra. Cristina Maggese por el asesoramiento y apoyo brindados en todo momento.

A la Sra. Alicia B. de Alcaraz y a las Stas. Ema Balderramos y Noemí Arguello por la bondad cotidiana y la esmerada asistencia técnica proporcionada.

A Patricia Reynal y a Mariana Quesada por su gran colaboración en todos los aspectos administrativos.

Al personal de mantenimiento de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por su eficiente intervención en la resolución de los problemas técnicos.

A los miembros del Departamento de Química Biológica por la generosa cooperación brindada, en particular a todos los miembros del PRHM.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado las becas que hicieron posible desarrollar este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

I N D I C E

<u>ABREVIATURAS Y SIMBOLOS</u>	1
<u>INTRODUCCION</u>	3
<u>I. LA FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS</u>	3
<u>II. EL AMP cíclico</u>	6
II.1. El segundo mensajero	6
II.2. Metabolismo del AMP cíclico, su síntesis y su acción	7
II.2.1. Adenilato ciclase	8
II.2.2. Quinasas de proteína	10
II.2.3. Fosfatasas de fosfoproteínas	12
<u>III. LA DEGRADACION DEL AMP cíclico</u>	
<u>Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos</u>	14
III.1. Formas múltiples en los tejidos de los organismos superiores	15
III.2. El problema de la nomenclatura	16
III.3. La determinación de las distintas formas enzimáticas	17
III.3.1. La especificidad de sustrato	17
III.3.2. La acción de los efectores endógenos	18
III.3.3. Las propiedades físicas	19
III.3.4. El examen inmunológico	19
III.4. Las propiedades de las distintas formas enzimáticas	20
III.4.1. La forma activable por calcio-calmodulina	20
III.4.2. Fosfodiesterasas que unen GMP cíclico	23

a) Fosfodiesterasas de GMP cíclico, activada por luz de bastoncillos de retina	24
b) Fosfodiesterasa de nucleótido cíclico estimulada por GMP cíclico	27
c) Fosfodiesterasas que unen GMP cíclico en plaquetas y pulmón	29
III.4.3. Forma específica de AMP cíclico	29
III.4.4. Otras fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos	30
III.5. Variabilidad del equipamiento de fosfodiesterasas de los tejidos	31
III.6. Regulación fisiológica de las fosfodiesterasas	33
III.6.1. Regulación por los sustratos	33
III.6.2. Regulación de la PDE activable por calcio. Acción de lípidos y fosfolípidos	34
III.6.3. Regulación por proteólisis	36
III.6.4. Regulación por insulina. Fosforilación de la fosfodiesterasa	38
III.6.5. Acciones hormonales diversas sobre las fosfodiesterasas	41
III.6.6. Fenómenos de regulación lenta	43
III.7. Fosfodiesterasas en plantas superiores	44
III.8. Fosfodiesterasas en eucariontes inferiores	44
IV. <u>DIMORFISMO EN MUCOR. ACCION DEL AMP cíclico</u>	50
V. <u>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</u>	54

<u>MATERIALES Y METODOS</u>	55
1. <u>PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO</u>	56
1.1. Organismo utilizado	56
1.2. Obtención de esporas y mantenimiento de la cepa	56
1.3. Cultivos	57
2. <u>PREPARACION DE EXTRACTOS ENZIMATICOS</u>	57
2.1. Preparación de extractos de los distintos estadios del crecimiento filamentoso	58
2.1.1. Método de ruptura suave	58
2.1.2. Método de ruptura drástico	58
2.2. Preparación de extractos de esporas de <u>N. rouxii</u>	58
3. <u>PURIFICACION PARCIAL DE LA ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA DE AMP ciclico</u>	59
3.1. Cromatografía en DEAE-celulosa	59
3.2. Cromatografía en Sephacryl S-300	60
3.3. Cromatografía en Sephadex G-100	60
4. <u>OTROS PASOS DE PURIFICACION</u>	61
4.1. Cromatografía en Azul 2-agarosa	61
4.1.1. Elución por fuerza iónica y AMP ciclico	62
4.1.2. Elución por aumento de pH	62
4.2. Cromatografía en AMP ciclico - agarosa	62
5. <u>CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA</u>	63

6. <u>ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA</u>	64
6.1. Procesamiento de los geles después de electroforesis	64
6.1.1. Tinción para proteínas. Autorradiografía	65
6.1.2. Dosaje de actividad de fosfodiesterasa y de incorporación de ^{32}P a proteína en los geles de poliacrilamida	65
7. <u>FOSFORILACION DE LA FOSFODIESTERASA POR MEDIO DE LA SUBUNIDAD CATALITICA DE LA QUINASA DE PROTEINA DEPENDIENTE DE AMP ciclico</u>	66
8. <u>TRATAMIENTO CON TRIPSINA DE LA PREPARACION DE FOSFODIESTERASA</u>	66
8.1. Tripsinización de la fracción PDE I	67
8.2. Tripsinización de la fracción G-100	67
9. <u>TRATAMIENTO DE LA PREPARACION DE PDE EN CONDICIONES FAVORABLES A LA PROTEOLISIS ENDOGENA</u>	67
10. <u>METODOS DE ENSAYO</u>	68
10.1. Ensayo habitual de PDE de AMP cíclico	68
10.2. Activación de la PDE por tripsina	69
10.3. Activación de la PDE por fosforilación	69
10.4. Actividad de PDE medida después de electroforesis en gel	69
10.4.1. Activación por tripsina de la PDE después de electroforesis en gel de poliacrilamida	70

10.4.2. Activación de la PDE por fosforilación después de electroforesis en gel de poliacrilamida	70
10.5. Ensayo de actividad de quinasa de proteína	71
10.6. Ensayo de otras actividades enzimáticas	72
10.6.1. Actividad de peroxidasa	72
10.6.2. Actividad de fosfatasa alcalina	72
10.6.3. Actividad de glucosa oxidasa	72
10.6.4. Actividad de β -galactosidasa	72
10.7. Ensayo de proteína	72
11. <u>DETERMINACION Y CALCULO DE LOS PARAMETROS FISICOS</u>	
<u>E HIDRODINAMICOS</u>	73
11.1. Radio de Stokes	73
11.2. Coeficiente de sedimentación	73
11.3. Peso molecular	74
11.4. Coeficiente friccional	74
11.5. Parámetros de las proteínas marcadoras	75
12. <u>DETERMINACION DE LOS VALORES DE LOS PARAMETROS CINETICOS</u>	76
13. <u>OTRAS TECNICAS APLICADAS</u>	78
13.1. Síntesis de ATP-[γ 32 P]	78
13.2. Purificación del AIP cíclico-[3 H]	78
14. <u>MEDICION DE LA RADIOACTIVIDAD</u>	78
15. <u>REACTIVOS UTILIZADOS</u>	79

<u>RESULTADOS</u>	81
1. Variaciones de la forma molecular de la PDE según el estadio del crecimiento filamentoso	81
2. Actividades proteolíticas y activación de la PDE de <u>M. rouxii</u>	83
3. Purificación parcial de la forma activable de PDE	92
4. Estudio de los parámetros físicos	105
5. Mecanismo de regulación por fosforilación y proteólisis	108
<u>DISCUSION</u>	115
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	123

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

AMP cíclico: 3'-5' Adenosina monofosfato cíclico

5' AMP: 5' Adenosina monofosfato

ATP: 5' Adenosina trifosfato

CMP cíclico: 3'-5' Citidina monofosfato cíclico

cpm: cuentas por minuto

DEAE: Dietil-aminoetil

EDTA: Etilendiaminotetraacetato

EGTA: etilenglicol-bis-(β aminoetil éter)N,N' tetracético

GMP cíclico: 3'-5', Guanosina monofosfato cíclico

IMP cíclico: 3'-5', Inosina monofosfato cíclico

K: Kilodalton

K_m: Constante de Michaelis de la enzima para el sustrato

min: minuto

μ mol: micromol

PDE: fosfodiesterasa

PEA: Alcohol fenetílico

PEI: fosfoetilenimino

PIPES: Piperazina-N,N'-bis(2-ácido etanosulfónico)

pmol: Picomol

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoruro

POPOP: 1,4-bis 2(4-metil-5-fenil oxazolil benceno)

PPO: 2,5-difeniloxazol

TCA: ácido tricloroacético

TEMED: N,N,N',N' tetrametiletildiamina

TRIS: 2-amino-2(hidroximetil)-1,3 propanodiol

V_m: Velocidad máxima de hidrólisis del sustrato por la enzima

INTRODUCCION

I- LA FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS

La fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (E.C.3.1.4.17) es la enzima responsable de la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos 3',5'-monofosfato en los correspondientes nucleótidos 5'-monofosfato. Esta reacción constituye la primera etapa del catabolismo de los nucleótidos cíclicos preponderantes, AMP cíclico, GMP cíclico y de otros más raros como el IMP cíclico o el CMP cíclico. Una actividad fosfodiesterásica de nucleótidos cíclicos ha sido descrita en todos los tejidos u organismos estudiados.

En la fig I se ejemplifica la acción de la fosfodiesterasa sobre el AMP cíclico.

El estudio de esta actividad enzimática presenta, por diversas razones, un interés particular. En principio, la actividad fosfodiesterásica desempeña un papel primordial en la regulación de los niveles intracelulares de los nucleótidos cíclicos. Diversos estudios teóricos han mostrado que la fosfodiesterasa tiene una importancia similar a la de la adenilato ciclasa (enzima sintetizante de AMP cíclico) en la determinación de los niveles de AMP cíclico basales o estimulados por hormonas en los organismos sensibles a estas últimas. Diversos autores (Erneux et al. 1980; Reynolds, 1982) demostraron que los niveles intracelulares de AMP cíclico en el equilibrio, después de una estimulación hormonal de la ciclasa, dependen de las características cinéticas de la fosfodiesterasa.

Una particularidad de la fosfodiesterasa, que justifica los numerosos estudios que le han sido consagrados, es su gran complejidad en el aspecto bioquímico. Comprende muchas formas, de propiedades y distribución celular

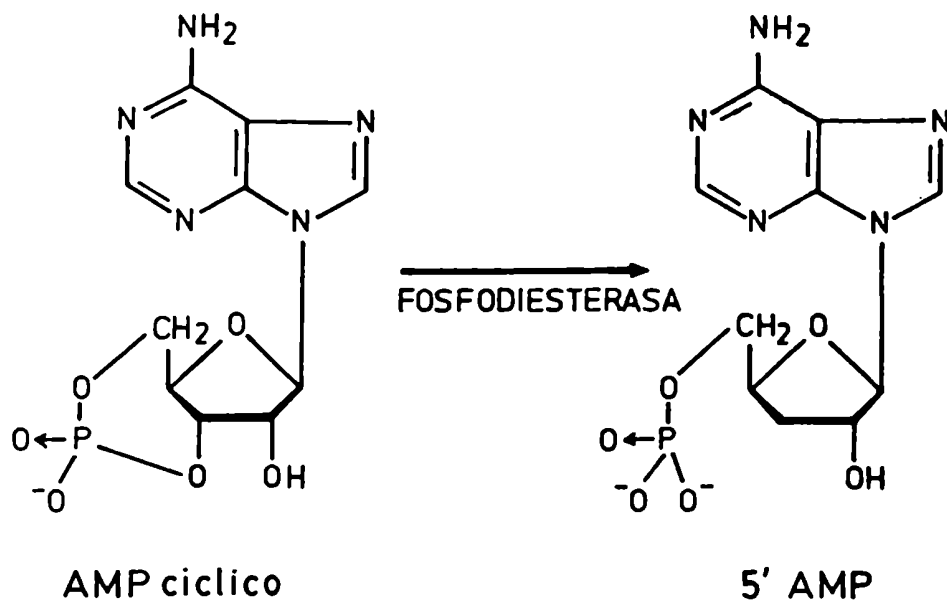


Fig I. Hidrólisis del AMP cíclico por acción de la fosfodiesterasa

notablemente diferentes. Ciertas formas revelan propiedades cinéticas no clásicas, que evidencian fenómenos complejos de cooperatividad entre sitios múltiples (Wells y Hardman, 1977; Beavo et al., 1982).

La fosfodiesterasa está sometida a diversos mecanismos fisiológicos de regulación, los que modulan su actividad a través de los iones Ca^{2+} (complejo Ca-calmodulina), hormonas, lípidos y otros (Wells y Hardman, 1977; Beavo et al., 1982; Thompson y Strada, 1978).

II- EL AMP cíclico

II.1. El segundo mensajero

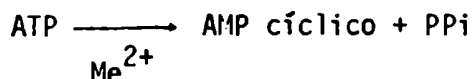
Dos nucleótidos muy importantes desempeñan un papel clave en la acción bioquímica de cierto número de hormonas: el AMP cíclico y el GMP cíclico. El AMP cíclico se produce a partir de ATP por acción de una enzima generalmente localizada en la membrana celular, la adenilato ciclasa, la cual en organismos eucariontes superiores es regulada por hormonas aportadas por el torrente sanguíneo. Recibe el AMP cíclico el nombre de "segundo mensajero" porque transmite y amplifica en el interior de la célula las señales químicas que aportan las hormonas, los primeros mensajeros.

En los vertebrados, la secreción de adrenalina a la sangre provoca en el organismo un aumento de la presión sanguínea, un incremento en el ritmo cardíaco, la relajación de algunos músculos lisos, la contracción de otros, esto es, respuestas fisiológicas que lo preparan para "luchar o huir". Ocurre simultáneamente un gran incremento en la velocidad de degradación del glucógeno en los músculos produciendo lactato y en el hígado, provocando un aumento de la glucemia. A comienzos de la década del '50 E.W. Sutherland estudió este último fenómeno *in vitro*; la adición de adrenalina a cortes de tejido hepático intacto conducía a la aparición de glucosa en el medio de suspensión (Robinson et al, 1971). A partir de estos resultados, las ya clásicas investigaciones ulteriores sirvieron para establecer las bases bioquímicas de la acción de la adrenalina. En una primera etapa, la adrenalina actúa sobre la membrana de la célula hepática induciendo la formación enzimática de un factor termoestable en una reacción que requiere ATP y Mg; en una segunda etapa, el factor termoestable estimula la degradación

enzimática del glucógeno activando la fosforilasa (Rall et al, 1957). El compuesto termoestable resultó ser el AMP cíclico. Posteriormente se determinó la estructura de este compuesto (Cook et al, 1957), y se fueron descubriendo numerosos efectos de este nucleótido cíclico sobre todos los niveles de organización celular. Se le asignó el papel de "segundo mensajero" (Robinson et al, 1971), que transferiría a la maquinaria celular la información que aportan las hormonas a las células receptoras. La mayoría de las hormonas peptídicas, las catecolaminas y las prostaglandinas producen una modificación en los niveles intracelulares de AMP cíclico en las células receptoras. El primer paso en este proceso consiste en la unión de la hormona a su receptor específico de la superficie externa de la membrana plasmática. En respuesta a esta unión se produce la activación de la enzima adenilato ciclasa que cataliza la síntesis de AMP cíclico a partir de ATP; de este modo aumentan los niveles intracelulares de AMP cíclico en respuesta a la hormona específica. El mecanismo bioquímico efector por el que se expresa el mensaje hormonal es la activación de las quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico (Walsh et al, 1968; Langan, 1968; Miyamoto et al, 1969; Kuo y Greengard, 1969; Corbin y Krebs, 1969), enzimas que por la acción activadora del nucleótido cíclico son capaces de fosforilar diversos sustratos proteicos.

II.2. Metabolismo del AMP cíclico, su síntesis y su acción

La síntesis del AMP cíclico, catalizada por la enzima adenilato ciclasa, transcurre según la reacción:



donde Me es Mg^{2+} en eucariontes superiores o bien Mn^{2+} en eucariontes inferiores.

La adenilato ciclasa está generalmente localizada en la membrana plasmática (Pohl et al, 1969). En los organismos superiores, la unión de la hormona a su receptor específico de la superficie externa de la membrana citoplasmática, conduce a la activación de la adenilato ciclasa; como consecuencia de ello, se produce un aumento de los niveles intracelulares de AMP cíclico y la consiguiente activación de la quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico. De esta manera se produce la fosforilación de algún sustrato proteico el cual modifica su función y por lo tanto conduce a un efecto fisiológico determinado. La reversión de dicho proceso fisiológico se da a través de la desfosforilación posterior del sustrato proteico por acción de las fosfatasas de fosfoproteínas (fig II).

II.2.1. Adenilato ciclasa

Se sabe que la adenilato ciclasa sensible a hormonas está compuesta por al menos tres proteínas interactuantes (Ross y Gilman, 1980): una subunidad catalítica (C) que no es regulable; una proteína que une nucleótidos de guanina (N); uno o más receptores hormonales (R). Se propuso un modelo de interacción de los tres componentes del sistema (Limbird, 1981). Al unirse el receptor a su antagonista se facilita la formación de un complejo R-N cuya conformación conduce a la posterior estructuración de un complejo N-C; esto produce un incremento de la actividad catalítica. La unión de GTP a la subunidad N disocia al complejo R-N permitiendo la formación del complejo N-C; esta formación perdura hasta que el GTP se hidroliza a GDP disociando a N de C y cerrando entonces el ciclo de activación.

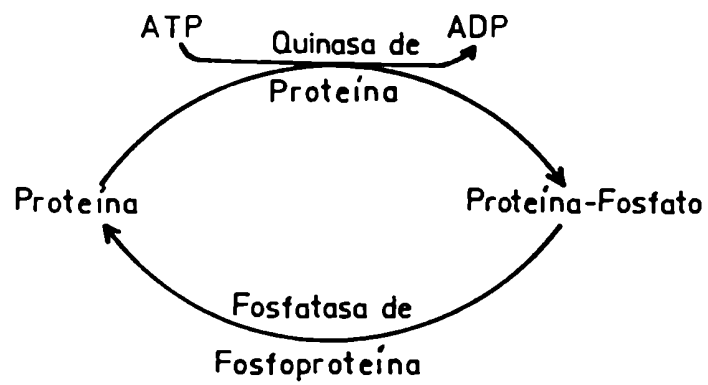


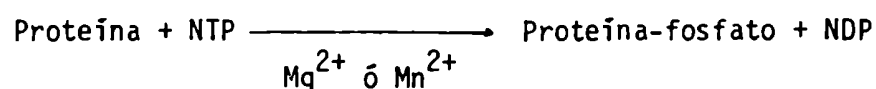
Fig II. Mecanismo de fosforilación-desfosforilación de proteínas

En eucariontes inferiores, la adenilato ciclasa se comporta en general, como la subunidad catalítica de los sistemas superiores. Sin embargo, se ha encontrado activabilidad por hormonas de las enzimas de Neurospora crassa (Flawiá y Torres, 1972; Flawiá y Torres, 1973) y de Phycomyces blakesleeanus (Cohen et al, 1980), como así también activación por nucleótidos de guanosina de las enzimas de N. crassa (Rosenberg y Pall, 1983), de Saccharomyces cerevisiae (Casperson et al, 1983) y de P. blakesleeanus (Cohen et al, 1980).

En Mucor rouxii la adenilato ciclasa se halla en la fracción proteica de restos de pared con membrana asociada que sedimenta a bajas revoluciones. La enzima puede solubilizarse con ClK 0,5 M, tiene un requerimiento absoluto de iones Mn^{2+} no reemplazables por Mg^{2+} y es insensible a los moduladores que actúan sobre las enzimas de eucariontes superiores, GTP, fluoruro u hormonas (Cantore y Passeron, 1982).

II.2.2. Quinasas de proteínas

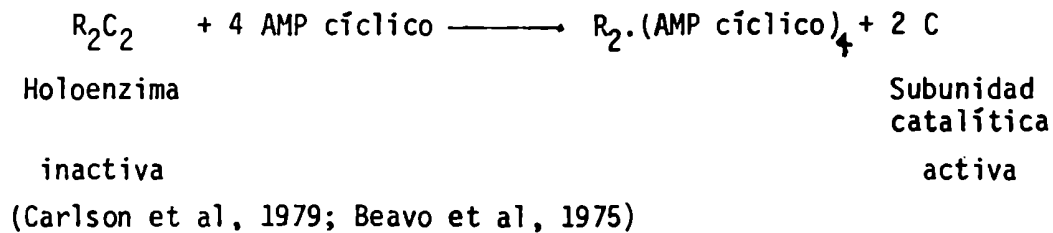
Las quinasas de proteínas catalizan la siguiente reacción:



donde NTP es generalmente ATP y raramente GTP (Rodnight y Lavin, 1964; Traugh et al, 1973). La fosforilación ocurre principalmente sobre el grupo hidroxilo de una serina de la proteína sustrato, aunque en menor grado puede ser sobre el de una treonina; se han descripto algunas quinasas específicas que pueden transferir el fosfato a histidina, lisina o tirosina (Smith et al, 1974; Hunter y Sefton, 1980).

Existen diversos agentes moduladores que interactúan directamente y regulan la actividad de las quinasas de proteínas. Entre ellos, el AMP cíclico, cuyo mecanismo de activación fue exhaustivamente estudiado (Bros-trom et al, 1970; Gill y Garren, 1970; Tao et al, 1970; Kumon et al, 1970).

Las quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico están formadas por dos tipos de subunidades: Catalíticas (C) y Regulatorias (R), y son activadas por el nucleótido cíclico de la siguiente manera:



Las numerosas quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico que han sido caracterizadas, independientemente de su origen, muestran gran similitud en cuanto a propiedades tales como afinidad por el AMP cíclico y especificidad de sustrato (Kuo et al, 1970; Yamamura et al, 1972). Se han realizado estudios que demuestran la actividad de la enzima de un tejido sobre sustratos de otros, así como aquellos en que se han reconstituido quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico utilizando subunidades catalíticas y regulatorias de distinto origen (Huttunen et al, 1970; Corbin et al, 1970; Yamamura et al, 1972). La mayoría de las quinasas de proteínas estudiadas tienen un peso molecular de alrededor de 140-190 K (Miyamoto et al, 1971; Corbin et al, 1972; Gill y Garren, 1971; Reimann et al, 1971). Los pesos moleculares de la subunidad catalítica, una proteína típicamente básica, y del dímero de subunidad regulatoria, subunidades estas que son

ácidas y cuyo carácter confieren a la holoenzima, son de 40 K y de 110 K respectivamente (Lincoln y Corbin, 1978).

En eucariontes inferiores el número de estudios sobre las quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico es comparativamente mucho menor. Se han caracterizado estas enzimas en Saccharomyces cerevisiae (Takai et al, 1974). En Coprinus macrorhizus se encontró que la actividad quinásica aumenta durante la formación de los basidiocarpos (Uno e Ishikawa, 1974). En Dictyostelium discoideum se encontraron varias formas de esta enzima (Sampson, 1977). En Neurospora crassa se encontraron formas múltiples de quinasas de proteínas, de las cuales una de ellas es dependiente de AMP cíclico (Powers y Pall, 1980; Judewicz et al, 1981). En Ustilago maydis se ha descrito una forma de quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico con características que combina algunas de las descritas para eucariontes superiores (Kerner y Passeron, 1984).

En Mucor rouxii se ha demostrado la existencia de una quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico en extractos solubles de ambas morfologías del hongo (Moreno et al, 1977). Sus parámetros físicos, estructurales y su mecanismo de activación han sido exhaustivamente estudiados (Moreno y Passeron, 1980; Pastori et al, 1981; Moreno et al, 1983).

II.2.3. Fosfatasas de fosfoproteínas

Las reacciones de fosforilación de proteínas deben ser reversibles para que cumplan un papel regulatorio en los eventos metabólicos. La desfosforilación de las proteínas fosforiladas se realiza por la acción de fosfatasas de fosfoproteínas, completando de esta manera el mecanismo de regulación por fosforilación.

En Mucor rouxii se ha descrito la existencia de al menos dos formas de fosfatasas de fosfoproteínas en la fracción soluble de la forma filamentosa del hongo (Seigelchifer y Passeron, 1984). Estas dos formas difieren en sus requerimientos de catión divalente y en su peso molecular: La Forma I dependiente de Mn^{2+} ; peso molecular, 40 K. La Forma II activa en ausencia de catión, peso molecular 30 K. Estas formas de bajo peso molecular serían semejantes a la subunidad catalítica aislada de tejidos superiores, la cual se halla asociada a proteínas reguladoras las que le confieren un peso molecular mayor (Lee et al, 1973; Killilea et al, 1976; Li et al, 1978).

III- LA DEGRADACION DEL AMP cíclico

Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

Diferentes formas enzimáticas contribuyen a la actividad de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (PDE). Existe actualmente interés y controversias con respecto al número, regulación y función de las múltiples formas. Es el esfuerzo presente de los investigadores de este campo el intentar determinar si estas formas enzimáticas múltiples son productos de diferentes genes o bien, productos del mismo gen modificados por un procesamiento diferencial.

A partir de los estudios inicialmente citados en que la reacción de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos fuera originalmente estudiada (Butcher y Sutherland, 1962; ver párrafo II.1) se hizo posible la separación de múltiples formas de la actividad (Beavo et al, 1970; Thompson y Appleman, 1971; Russel et al, 1973). Algunas de estas formas difieren en su especificidad de sustrato, distribución y propiedades cinéticas. Los primeros intentos de identificación y caracterización de las enzimas individuales se basaron en la posición de elución en cromatografías en DEAE-celulosa. Sin embargo, este criterio no resultó completamente satisfactorio, abordandose el de las diferencias funcionales, describiendo las actividades primeramente como fosfodiesterasas de AMP cíclico o de GMP cíclico. Tampoco este sistema resultó satisfactorio a partir de la demostración de que una misma enzima era capaz de hidrolizar ambos nucleótidos cíclicos con relativamente alta eficiencia (Beavo et al, 1970; Ho et al, 1977). Más recientemente, varias de las diversas fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos han sido purificadas a homogeneidad aparente, lo que permitió el

el inicio de las caracterizaciones (Miki et al, 1975; Ho et al, 1977; Martins et al, 1982; Thompson et al, 1979).

Es probable que a través de los caminos de estudio actualmente elegidos, se puedan entender más profundamente las bases moleculares de las diferencias responsables de las múltiples formas.

III.1. Formas múltiples en los tejidos de los organismos superiores

En la mayoría de los tejidos estudiados las diversas técnicas separativas revelan la existencia de varias formas de PDE. Su número es variable según el tejido y comprende desde una forma, como por ejemplo en el útero (Gardner et al, 1978), hasta seis diferentes en el cerebelo (Pledger et al 1974). Por otra parte, para un mismo organismo, el método y las condiciones de fraccionamiento empleados influyen notablemente sobre el número de formas puestas en evidencia. Así, por ejemplo, se muestra que a partir de riñón de rata se pueden obtener desde una hasta tres formas fosfodiesterásicas, de propiedades variables. según la técnica resolutive utilizada (isoelectroenfoque, cromatografía de intercambio iónico, filtración molecular en gel, centrifugación en gradiente de densidad), según la presencia o no de agentes que afectan grupos tiólicos o que influyen sobre el carácter hidrofóbico del medio, según el pH del medio, etc. (Van Inwegen et al, 1976).

Es probable que en ciertos casos, algunas formas detectadas representen artificios de la técnica; así, la proteólisis limitada puede hacer aparecer formas suplementarias (Epstein et al, 1978; Tucker et al, 1981; Sakai et al, 1978). La agregación de proteínas enzimáticas podría también

dar origen a algunas de las distintas fracciones descritas en ciertos sistemas (Naridrasorasak et al, 1982; Pichard y Cheung, 1976), así como también alteraciones en el contenido lipídico unido a la molécula enzimática (Minneman, 1976), fenómenos de fosforilación y desfosforilación de la enzima (Weber y Appleman, 1982), etc.

Sea como fuere, se sabe actualmente que muchos tejidos contienen varias formas distintas de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos no interconvertibles, particuladas o citosólicas. Las múltiples formas también se expresan durante los ciclos de crecimiento. Así, en cultivos primarios de hepatocitos de rata adulta se aprecian cambios que dependen del estado de crecimiento celular (Lad et al, 1984), los cuales están relacionados con los niveles de actividad de la adenilato ciclasa. En estudios realizados en embrión de pollo, se han encontrado diferentes actividades fosfodiesterásicas durante los diferentes estadios embrionarios e incluso en las distintas capas germinales durante la etapa de gastrulación (Neuman, 1983). Recientemente se han realizado estudios que sugieren que varias formas múltiples de PDE son entidades moleculares distintas (Takemoto et al, 1982). La comparación de los mapas peptídicos trípticos de diversas fosfodiesterasas (fosfodiesterasa de cerebro sensible a calmodulina, PDE de hígado sensible a insulina, PDE de retina) establecen una muy escasa correlación entre las formas enzimáticas estudiadas.

III.2. El problema de la nomenclatura

El hecho de que varias enzimas distintas puedan catalizar la hidrólisis de nucleótidos cíclicos, ha causado un problema considerable en la nomenclatura. Dado que no han sido descritas propiedades únicas e inambiguas

para la mayoría de las distintas formas enzimáticas, resulta muy difícil asignarles nombres descriptivos. Se ha recomendado el uso de los términos fosfodiesterasa de nucleótido cíclico para las enzimas que catalizan la hidrólisis de AMP cíclico y de GMP cíclico, en tanto que fosfodiesterasa de GMP cíclico o fosfodiesterasa de AMP cíclico para las enzimas con poca capacidad de hidrolizar cualquier otro nucleótido cíclico. A medida que se vaya ganando información acerca de cada uno de estos tipos, seguramente se realizarán ulteriores subclasificaciones.

III.3. La determinación de las distintas formas enzimáticas

Los estudios que relacionan las propiedades cinéticas, físicas y regulatorias, han permitido obtener considerables progresos en cuanto a la determinación de una cierta actividad fosfodiesterásica.

III.3.1. La especificidad de sustrato

Se han encontrado grandes diferencias en la especificidad de sustrato entre muchas PDE parcialmente purificadas. En algunos casos la especificidad para cierto nucleótido cíclico es casi absoluta, reflejándose ésta en los valores de V_m y de afinidad. En otros casos existen grandes diferencias solamente en los valores de las K_m aparentes para el AMP cíclico y el GMP cíclico. Así, los ensayos de actividad a concentraciones de sustrato saturante y subsaturante pueden ser diagnósticos. Sin embargo, si no existiese una completa separación de las formas enzimáticas, las diferencias solamente en la especificidad de sustrato no son definitivas. Por ejemplo, extractos de pulmón humano cromatografiados a través de una columna DEAE-ce-

lulosa evidencian una sola forma principal de PDE cuando se hace el estudio con GMP cíclico 100 μ M. Sin embargo, con AMP cíclico 1 μ M como sustrato, se determinan picos adicionales de actividad. Del mismo modo, han sido descritos otros estudios similares (Russel et al, 1973; Appleman y Terasaki, 1975).

III.3.2. La acción de los efectores endógenos

A los efectos de determinar y cuantificar una determinada forma enzimática, ha resultado muy útil la medida de la actividad en presencia y ausencia de efectores conocidos, por ejemplo en el caso de la PDE que es activada varias veces por calcio y calmodulina. Por lo tanto, cualquier fracción activada por estos factores o inhibida por EGTA es considerada portadora de esta forma enzimática (ver por ejemplo Ho et al, 1977). Desafortunadamente, la falta de respuesta a un efector en una fracción enzimática no significa necesariamente la ausencia de la forma fosfodiesterásica. Muchas de las fosfodiesterasas nativas son altamente sensibles a proteólisis y a menudo los productos proteolíticos iniciales son completamente activos pero no ya sensibles a efectores. Esto ya ha sido demostrado para la fosfodiesterasa estimulable por calmodulina (Tucker et al, 1981), para la fosfodiesterasa de retina activada por luz (Miki et al, 1975) y para las enzimas específicas de AMP cíclico de las membranas plasmáticas de muchas células (Epstein et al, 1978; Loten et al, 1980). Todas estas formas pueden también ser activadas por proteólisis limitada, convirtiéndolas en insensibles a la acción del efector (complejo Ca-calmodulina, rodopsina activada por la luz, activación en respuesta a la insulina). La fosfodiester-

rasa de AMP cíclico estimulable por GMP cíclico puede a veces identificarse por la acción del GMP cíclico sobre la hidrólisis del AMP cíclico. Pero la presencia de alta actividad de otras fosfodiesterasas en el sistema puede eclipsar el efecto estimulante por el crecimiento de la actividad basal hidrolítica de AMP cíclico, lo que indica una vez más que los resultados negativos no son suficientes para excluir la presencia de una determinada forma enzimática.

También la respuesta de una actividad enzimática hacia otros efectores conocidos puede resultar una herramienta útil en la determinación de la forma enzimática presente. Por ejemplo, solamente la forma estimulable por calmodulina puede ser activada por imidazol o bien el caso de ciertas formas fosfodiesterásicas que presentan una reactividad diferencial a varios inhibidores competitivos (Weiss et al, 1974; Amer y Kriegbaum, 1975; Wells et al, 1975).

III.3.3. Las propiedades físicas

Resultan muy útiles como examen diagnóstico en preparaciones crudas, las mediciones de ciertos parámetros físicos tales como el tamaño y la forma molecular o bien el orden de elución en cromatografía de intercambio iónico.

III.3.4. El examen inmunológico

La identificación de fosfodiesterasas específicas en preparaciones crudas encuentra en el análisis inmunológico el más sensible y quizás el más exacto de los métodos (Tucker et al, 1981; Hansen y Beavo, 1982; Sa-

rada et al, 1982). Las nuevas tecnologías para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales específicos de sitio parecen ser particularmente promisorias para los propósitos de identificación de las diversas formas.

III.4. Las propiedades de las distintas formas enzimáticas

III.4.1. La forma activable por calcio-calmodulina

La forma de PDE más intensamente estudiada, la primeramente descrita (Butcher y Sutherland, 1962) es la generalmente llamada "forma de alta Km", fosfodiesterasa de nucleótido cíclico activada por calcio-calmodulina (Cheung, 1970; Kakiuchi y Yamazaki, 1970). Ha sido purificada por diversos grupos de trabajo a partir de cerebro (Klee et al, 1979; Morril et al, 1979; Sharma et al, 1980; Tucker et al, 1981; Kincaid et al, 1981) y de corazón bovino (Ho et al, 1977; La Porte et al, 1979). Esta forma enzimática es citosólica y presenta la particularidad de ser activable por la proteína termoestable, fijadora de calcio, la calmodulina (Cheung et al, 1978). Por otra parte, esta propiedad ha sido muy utilizada como herramienta en la purificación de la enzima, haciendo uso de la cromatografía de afinidad en una columna de calmodulina inmovilizada.

Hasta el momento se han encontrado por lo menos tres formas distintas de la fosfodiesterasa activable por Ca^{2+} -calmodulina, la proveniente de cerebro, la de corazón y la de baja Km. Estas pueden diferenciarse por sus pesos moleculares y su especificidad de sustrato.

Las enzimas provenientes de corazón y de cerebro pueden ser reversible-

mente activadas por lo menos diez veces por el complejo Ca^{2+} -calmodulina. La proteólisis limitada es capaz de convertirlas en una forma totalmente activada, independiente de la presencia de Ca^{2+} -calmodulina (Tucker et al, 1981). Ambas enzimas son precipitables por anticuerpos contra la enzima de corazón (Hansen y Beavo, 1982). Sin embargo la enzima de cerebro parece tener una movilidad algo menor en electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS que la forma de corazón. A través de esta técnica se han determinado pesos moleculares de 61 K para la forma de cerebro y de 59 K para aquella de corazón.

Existen controversias en cuanto a la estructura polimérica de las enzimas. Los diferentes autores que han obtenido preparaciones más próximas a la homogeneidad aparente, han propuesto una estructura homodimérica (Morris et al, 1979; Sharma et al, 1980; Ho et al, 1977; La Porte et al, 1979). El peso molecular de esta forma dimérica sería de 120 K y uniría dos moléculas de calmodulina por cada dímero de fosfodiesterasa obteniendo una activación máxima. También se han propuesto estructuras homotetramérica (Tucker et al, 1981), heterotrimérica (Klee et al, 1979) o monomérica en equilibrio con una forma agregada (Kincaid et al, 1981). Recientemente, estudios realizados mediante la preparación de anticuerpos monoclonales (Sharma et al, 1984) revelaron la existencia de dos formas monoméricas diferentes de la fosfodiesterasa de cerebro activable por calmodulina, las cuales se combinarían para dar tres formas diméricas diferentes.

En los tejidos, la cantidad de calmodulina se halla en exceso respecto de la fosfodiesterasa y quizás también en exceso sobre todas las proteínas que ligan calmodulina, de modo que el factor limitante sea proba-

blemente el nivel de Ca^{2+} libre (Sharma et al, 1980). La mayoría de los datos cinéticos indican que debe existir energía acoplante entre el sitio activo y el sitio de unión de la calmodulina dado que el sustrato causa un incremento aparente en la afinidad de la enzima por la calmodulina (Keller et al, 1982).

Recientemente se ha demostrado que la enzima de cerebro es sustrato de la quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico (Sharma et al, 1980). La enzima incorpora dos moléculas de fosfato por molécula de holoenzima a una velocidad comparable a la de la mezcla de histonas. Sin embargo, no se ha encontrado que esta fosforilación provoque cambios en la actividad de la enzima ni se ha encontrado que ocurra en la célula intacta.

Tanto el AMP cíclico como el GMP cíclico son relativamente buenos sustratos para esta enzima, con valores de K_m de alrededor de $10 \mu\text{M}$ para el GMP cíclico y de $200 \mu\text{M}$ para el AMP cíclico, siendo la V_m mayor para este último sustrato.

Aunque la actividad de las enzimas activadas por calmodulina es inhibida por los derivados de la fenotiazina (Levin y Weiss, 1977), estos agentes no parecen ser inhibidores más específicos que lo que lo es el EGTA.

Recientemente han aparecido varios estudios sobre una actividad de PDE específica y de alta afinidad para el AMP cíclico que es estimulable por Ca^{2+} -calmodulina (Smoake et al, 1981; Purvis et al, 1981; Andrenyak y Epstein, 1982). Esta actividad enzimática ha sido descrita durante el desarrollo de corazón de pollo, y también en membranas de hígado. La susceptibilidad a calmodulina se pierde con el almacenado y sólo es evidente a

bajas concentraciones de AMP cíclico. Anticuerpos monoclonales contra las fosfodiesterasas estimulables por calmodulina de cerebro o de corazón no reaccionan contra esta enzima. Es probable que esta forma sea responsable de al menos parte de la actividad de fosfodiesterasa específica de AMP cíclico, de baja Km, observada en cromatografía en DEAE-celulosa de muchos extractos tisulares. Hasta el momento no se conoce el mecanismo molecular de la acción activadora de la calmodulina sobre esta forma enzimática.

Los resultados obtenidos del estudio de la forma fosfodiesterásica activable por calmodulina difieren de un equipo de investigación a otro; así se han observado estimulaciones que van de cinco a sesenta veces con respecto del nivel basal. La variación de los resultados según la forma de preparación de la enzima pura, parece responder a dos fenómenos: 1- La presencia eventual o no de proteasas endógenas, muy difíciles de eliminar totalmente, que aumentando el nivel basal de la enzima, disminuyen su activabilidad por calmodulina. 2- La posibilidad de interconversión monómero-dímero, regida por las condiciones y duración del almacenaje, que conllevan a una modificación de la sensibilidad de la enzima a la calmodulina. La fijación de calmodulina induce en la fosfodiesterasa un cambio conformacional que al igual que la proteólisis limitada, descubre los sitios catalíticos de la enzima.

III.4.2. Fosfodiesterasas que unen GMP cíclico

Se han descripto hasta ahora tres tipos distintos de fosfodiesterasa que unen GMP cíclico con alta afinidad y tienen diferentes propiedades

cinéticas, regulatorias y físicas. La distribución tisular de las mismas varía y algunas de ellas son relativamente específicas de ciertos tipos de tejidos. Todas estas formas contienen un sitio de unión de GMP cíclico aparentemente distinto del sitio del sustrato. Los tres tipos descriptos son:

a) Fosfodiesterasa de GMP cíclico, activada por luz, de bastoncillos de retina

Uno de los más interesantes mecanismos para el control de la actividad de fosfodiesterasa de nucleótido cíclico está siendo estudiado en relación a la enzima principal encontrada en los segmentos exteriores de los bastoncillos de la retina (Stryer et al, 1981; Pober y Bitensky, 1979). El grado de blanqueo de la rodopsina controla la actividad de esta enzima. Los detalles del mecanismo a través del cual la rodopsina activada por luz causa un incremento en la actividad de PDE permanecen aún poco comprendidos. Sin embargo, parecería probable que el mecanismo molecular fuera análogo al propuesto para la activación hormonal de adenilato ciclasa. En resumen, ha sido demostrado que el GTP y una proteína de la membrana periférica que une GTP, la transducina, son necesarios para la actividad de la enzima nativa (Stryer et al, 1981). Así se produce un flujo de información que va desde la rodopsina fotoexcitable, pasa por el complejo que forman la transducina y el GTP, y termina en la forma activada de la PDE. La transducina, además de ligar GTP, está formada por tres tipos de cadenas polipeptídicas: subunidad $T\alpha$ de 39 K, subunidad $T\beta$ de 36 K y subunidad $T\gamma$ de 10 K. En presencia de GDP, estas tres cadenas están asociadas, en cambio, cuando está unido GTP, la subunidad $T\alpha$ se disocia de las otras dos (Fung et al, 1981; Stryer, 1983). La subunidad $T\gamma$

posee una actividad GTPásica activada por luz (Shinozawa et al, 1980). La rodopsina, facilita la formación del complejo transducina-GTP, el cual activa la fosfodiesterasa (fig III). La activación puede ser revertida por la conversión de GTP a GDP en un paso que requiere de la subunidad T γ de la transducina (Pober y Bitensky, 1979). Además el estado de activación de la rodopsina puede ser modificado por una fosforilación independiente de nucleótidos cíclicos catalizada por una quinasa de opsina (Kuhn et al, 1973).

La actividad de la fosfodiesterasa de los segmentos externos de las células en bastoncillos de retina de anfibio y bovina, ha sido purificada a homogeneidad (Miki et al, 1975; Baehr et al, 1979). Por estudios electroforéticos, las enzimas purificadas se revelaron como un doblete de 108 K y 110 K para la enzima de rana y de 84 K y 88 K para la bovina. Una propiedad característica de estas fosfodiesterasas es su baja actividad catalítica en la oscuridad. Se encontró una estimulación de la actividad basal de hasta veinte veces por digestión controlada con tripsina (Miki et al, 1975), lo que sugiere que la enzima está sujeta a un represor inhibitorio, de cuya existencia ha habido informes (Hurley et al, 1981). Recientemente se encontró una tercera subunidad que completa el doblete, con un peso molecular de 20 K (Pober y Bitensky, 1979) para la de anfibio y de peso molecular 11 K para la bovina (Baehr et al, 1979). Esta pequeña subunidad inhibe la actividad de fosfodiesterasa confiriendo a la enzima susceptibilidad regulatoria; es sensible a la tripsinización y su degradación proteolítica puede ser responsable de la activación por tripsina de estas enzimas (Stryer et al, 1981).

La PDE de los segmentos externos de los bastoncillos de la retina une

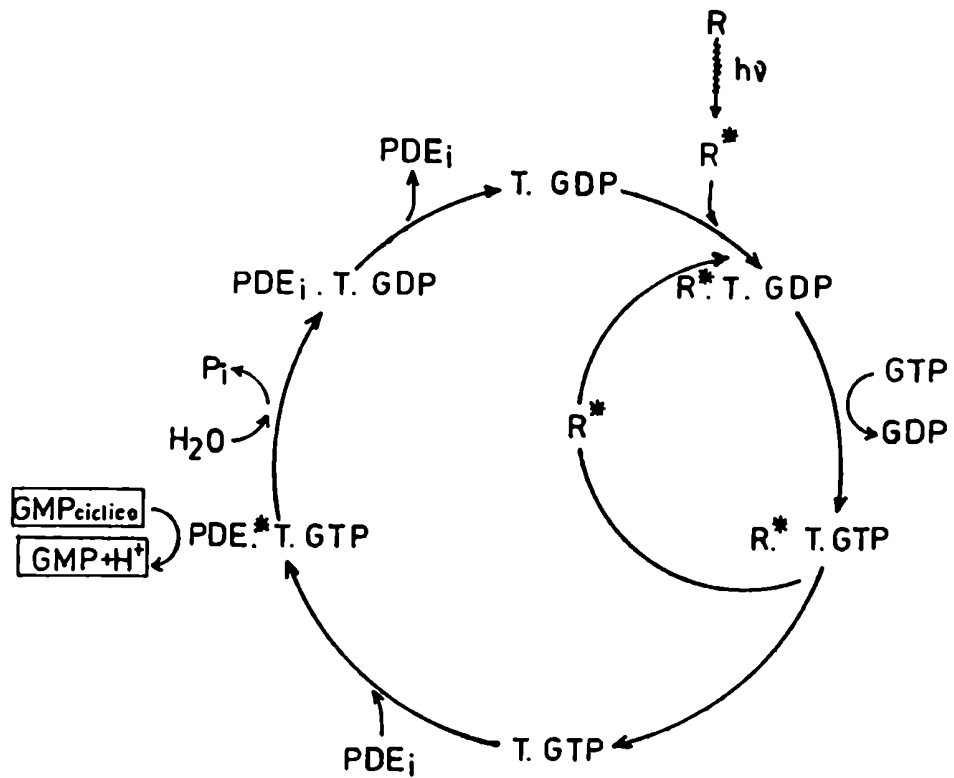


Fig III. Mecanismo de activación de la fosfodiesterasa de bastoncillos de retina (tomado de STRYER, 1983)

R*: Rodopsina fotoexcitada; cataliza el intercambio GDP-GTP. Se forman alrededor de 500 T.GTP por molécula de rodopsina excitada.

T: Transducina

PDE_i: fosfodiesterasa inactiva

PDE*: fosfodiesterasa activada

GMP cíclico en un sitio cinéticamente similar a aquellos en que lo hacen las enzimas de corazón y de pulmón (como se comentará luego). Presenta curvas de asociación bifásicas con valores de K_d aparentes de $0,16 \mu\text{M}$ y de $0,83 \mu\text{M}$. Parece ser que el sitio de unión del GMP cíclico es distinto del sitio catalítico (Yamazaki et al, 1980). La subunidad inhibitoria de la PDE puede también modular la unión de GMP cíclico (Yamazaki et al, 1982). La función de la unión del nucleótido cíclico a la enzima aún no ha sido dilucidada.

La enzima hidroliza GMP cíclico con una K_m de $150 \mu\text{M}$ después de activación por tripsina (Baehr et al, 1979), pero hidroliza AMP cíclico con mucha menos eficiencia.

b) Fosfodiesterasa de nucleótido cíclico estimulada por GMP cíclico

La forma estimulada por GMP cíclico debe su nombre al hecho de que a niveles subsaturantes de GMP cíclico se produce un incremento en la velocidad de hidrólisis del AMP cíclico, cuando la concentración de este nucleótido cíclico es menor que la saturación (Beavo et al, 1971; Terasaki y Appleman, 1975).

Los estudios cinéticos indican que la hidrólisis de GMP cíclico o de AMP cíclico muestra una cooperatividad positiva, aunque de mayor efecto para el AMP cíclico (Terasaki y Appleman, 1975; Martins et al, 1982).

Esta enzima, estimulable por GMP cíclico, ha sido purificada a homogeneidad a partir de tejido cardíaco y suprarrenal bovinos (Martins et al, 1982). Los estudios mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS revelan una sola banda de peso molecular 105 K y en ausencia de SDS una de alrededor de 240 K , con un coeficiente de sedimentación de $8,8 \text{ S}$. La enzima pura cataliza la hidrólisis de GMP cíclico y de AMP cíclico

con valores de K_m de $40 \mu M$ y de $10 \mu M$ respectivamente, a valores semejantes de V_m . Existiría un sitio de unión del GMP cíclico por el que otros nucleótidos cíclicos incluyendo al AMP cíclico no competirían. El GMP cíclico puede estimular la enzima de 50 a 80 veces, pero a niveles de concentración fisiológicos puede verse un incremento de alrededor de cinco veces (Martins et al, 1982). Recientemente, la enzima estimulable por GMP cíclico proveniente de hígado de ternera fue purificada a homogeneidad, revelándose como un dímero asimétrico de dos subunidades de peso molecular = $102 K$ cada una de ellas y un coeficiente de sedimentación de $6,9 S$ cada subunidad (Yamamoto et al, 1983).

Los sitios de sustrato unirán e hidrolizarán AMP cíclico o GMP cíclico y parecen estar funcionalmente ligados en una forma de cooperatividad positiva. Parece además haber otra clase de sitios distintos del catalítico y como ya se señalara específico para el GMP cíclico. La ocupancia de este sitio causa la pérdida de la interacción cooperativa entre los sitios del sustrato (Martins et al, 1982). Estos resultados son avalados por los estudios realizados acerca del efecto de varios análogos de nucleótidos cíclicos sobre la activación de la enzima (Erneux et al, 1981 y 1982). Sus datos sugieren que el "sitio alostérico" es distinto del sitio catalítico.

Utilizando anticuerpos monoclonales contra la fosfodiesterasa estimulable por GMP cíclico, que no inhiben la actividad catalítica, ha sido posible medir la cantidad de esta enzima en muestras crudas conteniendo otras fosfodiesterasas (Hurtwitz et al, 1982). Así, por ejemplo, en hígado o adrenal bovinos esta enzima es responsable de más del 80% de la actividad hidrolítica total de AMP cíclico, indicando la importancia de es-

ta forma enzimática en el mantenimiento de los niveles de nucleótidos cíclicos en estos tejidos.

c) Fosfodiesterasas que unen GMP cíclico en plaquetas y pulmón

En plaquetas se ha descripto una PDE que hidroliza GMP cíclico, presentando además sitios de unión de GMP cíclico distintos de los sitios catalíticos (Coquil et al, 1980). Parecería ser que esta enzima actúa muy poco sobre el AMP cíclico.

En pulmón, la PDE de GMP cíclico comparte con la quinasa de proteína dependiente de GMP cíclico la categoría de proteínas receptoras de dicho nucleótido cíclico; cada una de ellas liga cantidades equivalentes de GMP cíclico, medido a igual concentración de nucleótido (Francis et al, 1980). Esta PDE de pulmón parece ser idéntica a la enzima de plaquetas.

Hasta el momento no ha sido demostrada la función de la unión del GMP cíclico a la enzima.

III.4.3. Forma específica de AMP cíclico

Otro tipo de PDE observado en numerosos tejidos se caracteriza por una fuerte afinidad por el AMP cíclico, una afinidad considerablemente menor por el GMP cíclico e insensibilidad a la calmodulina y a los iones calcio. No hay certeza acerca de si todas las fracciones de fosfodiesterasa específica de AMP cíclico son derivadas del mismo precursor o son productos génicos separados. En muchos tejidos este tipo de actividad enzimática aparece en la fracción particulada, aunque son de fácil solubilización por procedimientos relativamente suaves. Algunas formas son muy susceptibles a proteólisis, tratamiento que las activa y convierte en formas solubles

(Epstein et al, 1978; Loten et al, 1980; Wilson y Houslay, 1983). También han sido descritas formas solubles de esta enzima. Así, ha sido purificada a homogeneidad y caracterizada la PDE de AMP cíclico soluble de riñón de perro (Thompson et al, 1979; Epstein et al, 1982). La enzima corresponde a un monómero de cerca de 60 K, con cinética michaeliana, presentando una K_m para el AMP cíclico de $2,2 \mu M$ y para el GMP cíclico de $312 \mu M$. Es posible que esta forma se halle, al menos parcialmente, unida a la membrana celular y que la homogenización en medio hipotónico conduzca a su solubilización. Una forma aparentemente semejante presente en pulmón humano, ha sido purificada (Moore y Schroedter, 1982), y también se ha purificado una enzima con la misma especificidad de sustrato a partir de membranas de hígado de rata (Marchmont et al, 1981). Para esta enzima de membrana se ha observado una cinética de cooperatividad negativa (K_m para el AMP cíclico de $0,7 \mu M$; coeficiente de Hill: 0,62). Esta forma enzimática periférica, débilmente unida a la membrana plasmática, es fácilmente solubilizable a alta fuerza iónica. Se presenta bajo la forma de monómeros de 52 K y quizás sea diferente de una forma intrínseca de las membranas de hígado, no extraíble por simple lavado, y de una forma citosólica de fuerte afinidad por el AMP cíclico (Marchmont y Houslay, 1980a).

III.4.4. Otras fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

Se han descrito las propiedades de una PDE presente en varias líneas celulares de células de linfoma S 49 (Brothers et al, 1982) las que la asemejan a la actividad de fosfodiesterasa de GMP cíclico de alta afinidad. Presenta una K_m para el GMP cíclico de $40 \mu M$ y para el AMP cíclico de 100

μM ; la K_m para el GMP cíclico es mucho menor que la de la mayoría de las otras fosfodiesterasas descritas. Esta forma enzimática no está presente en extractos de células de tipo salvaje y no se sabe si es el resultado de un producto génico de PDE alterado o bien se trata de un gen que no se transcribe normalmente en los linfocitos S 49. Estas líneas celulares mutantes son resistentes a la muerte por acción de agentes que aumentan los niveles de AMP cíclico en la célula.

También se ha purificado y caracterizado a partir de hígado porcino una PDE no específica que hidroliza eficientemente AMP cíclico y CMP cíclico (Helfman et al, 1981); esta enzima tiene muy baja actividad frente al GMP cíclico. Es responsable de solamente el 1% de la actividad fosfodiesterásica citosólica. Está constituida por un monómero de 33 K y es capaz de hidrolizar diversos nucleótidos 2',3' (Helfman y Kuo, 1982).

Es importante destacar que el papel del CMP cíclico en la célula es aún desconocido; quizás se trate de un efector positivo de la proliferación celular (Helfman y Kuo, 1982).

III.5. Variabilidad del equipamiento de fosfodiesterasas de los tejidos

Las diferencias de especificidad, de cinética, de sensibilidad a diversos activadores, de estructura cuaternaria y de pesos moleculares son considerables entre las diversas formas enzimáticas. Resulta poco probable que la multiplicidad de tipos observados sea en todos los casos un artificio. Sin embargo, la existencia de subunidades comunes entre las distintas formas enzimáticas no ha sido descartada por ciertos autores (Thompson et al, 1979; Moore y Schroedter, 1982), lo que apoyaría la teo-

ría de un origen común o de la interconvertibilidad de la mayoría de las fosfodiesterasas. Existe inmunorreactividad cruzada entre las formas específicas de AMP cíclico y de GMP cíclico de riñón de perro (Sarada et al, 1982). Por otra parte, se ha encontrado también relación inmunológica entre la PDE de alta afinidad por el AMP cíclico de membranas de hígado de rata y la forma específica de GMP cíclico de dichas membranas, pero no con la forma citosólica de alta Km de hígado (Whitson y Appleman, 1982).

El hecho se basa en la similitud eventual entre las formas fosfodiesterásicas detectadas en diferentes tejidos. La presencia de formas aparentemente idénticas, correspondientes a los tres tipos principales (forma activable por calcio-calmodulina; forma específica de AMP cíclico; forma modulada por GMP cíclico), ha sido constatada en numerosos tejidos de una misma especie o de especies diferentes (Appleman y Terasaki, 1975; Hidaka et al, 1977).

En ciertos casos (como por ejemplo, PDE de retina activable por luz) una forma enzimática puede estar circunscripta a un solo tejido. Sin embargo, en general, lo que parece diferenciar principalmente al equipamiento de fosfodiesterasas de diversos tipos celulares es la proporción de cada una de las formas principales. Por ejemplo, la forma dependiente de Ca^{2+} es minoritaria en hígado de rata, mientras que es preponderante en corazón de conejo (Appleman y Terasaki, 1975) y representa más del 90% de la actividad cerebral (Kincaid et al, 1981). La relación entre actividad citosólica y particulada varía considerablemente de tejido en tejido; alrededor del 50% de la actividad hidrolítica de AMP cíclico se halla en la membrana de hígado de rata (Whitson y Appleman, 1982) mientras que la actividad de pulmón humano es casi exclusivamente citosólica (Moore y Schro-

edter, 1982).

La degradación de los nucleótidos cíclicos en los tejidos es la resultante de la acción de todas las formas presentes, lo que determina una regulación variable según el tipo celular.

III.6. Regulación fisiológica de las fosfodiesterasas

La importancia del papel desempeñado por la actividad de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos en la regulación de los niveles celulares de dichos nucleótidos, permite prever la existencia de sistemas de regulación fisiológicos de esta actividad.

III.6.1. Regulación por los sustratos

Las características de las diversas formas de la enzima muestran que la actividad de ciertas fosfodiesterasas puede estar bajo control de su propio sustrato. Así, la cooperatividad negativa observada en la cinética enzimática de ciertas formas específicas de AMP cíclico quizás tenga importante repercusión sobre los niveles del nucleótido. Un sistema de cooperatividad negativa podría permitir, luego de una estimulación hormonal, el mantenimiento de un nivel elevado de AMP cíclico durante un tiempo suficiente como para permitir que se completen sus efectos fisiológicos; una enzima de cinética michaeliana llevaría mucho más rápido al sustrato su nivel basal (Russel et al, 1972). Estudios teóricos muestran que la cooperatividad negativa amplifica el factor de estimulación de las concentraciones de AMP cíclico.

El GMP cíclico podría también, en cierta medida, regular in vivo la

actividad de la forma fosfodiesterásica de cinética de cooperatividad positiva (Martins et al, 1982; Terasaki y Appleman, 1975). La unión de GMP cíclico en los sitios regulatorios de la enzima estimula la actividad hidrolítica de los sitios catalíticos lo que produce una cinética de cooperatividad positiva para la hidrólisis de GMP cíclico y a baja concentración de AMP cíclico una estimulación de su hidrólisis. La importancia fisiológica de esta regulación ha sido puesta en duda porque solamente sería observable in vitro a concentraciones de la enzima poco probables de existir in vivo (Guan y Cheung, 1980).

III.6.2. Regulación de la PDE activable por calcio. Acción de lípidos y fosfolípidos

Un modo de regulación muy importante corresponde al que ejerce sobre la fosfodiesterasa de alta K_m el complejo Ca^{2+} -calmodulina. La concentración óptima de Ca^{2+} para el proceso de estimulación se encuentra en el orden de las concentraciones fisiológicas de este ión (1-5 μM).

Así, las variaciones del calcio intracelular podrían entonces influir sobre la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos. La calmodulina, que constituye el nexo esencial de las acciones reguladoras del calcio está presente en gran cantidad (hasta 600 mg/kg de tejido) en todas las células de los organismos superiores. Es una proteína de peso molecular 16.700 cuya estructura primaria ha sido determinada en cerebro bovino (Watterson et al, 1980). Posee cuatro sitios de unión de Ca^{2+} , en cuya presencia sufre un cambio conformacional uniéndose con alta afinidad a numerosas proteínas, entre ellas, la fosfodiesterasa de alta K_m . Las proteínas ligadoras de cal-

modulina, cuyas actividades biológicas se ven modificadas por esta unión, pertenecen a sistemas celulares muy variados: quinasa de la cadena liviana de la miosina, regulando así el estado contráctil de las fibras lisas; ATPasa dependiente de Ca^{2+} - Mg^{2+} de eritrocitos; quinasa de proteína de membrana, dependiente de Ca^{2+} ; etc.

La PDE activable por calmodulina es también estimulable in vitro por numerosos lípidos y fosfolípidos que se fijan independientemente del calcio sobre una zona hidrofóbica de la molécula enzimática, que podría ser el sitio de unión de la calmodulina (Gietzer et al, 1982). La estimulación observada es del mismo orden que la provocada por la calmodulina.

Los agentes activos comprenden ácidos grasos saturados e insaturados (oleico, linoleico, esteárico), fosfolípidos (fosfatidilinositol), lisofosfolípidos (lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilcolina), etc. (Wolf y Brostrom, 1976; Tai y Tai, 1982). Estas acciones de los lípidos podrían tener influencia fisiológica importante por su participación en isquemias cardíacas o en las manifestaciones contráctiles patológicas (Katoh et al, 1982). Además, ciertos productos del metabolismo de los fosfolípidos (ácidos grasos insaturados, fosfatidatos, lisofosfatidilinositol) podrían estar implicadas en uno de los efectos de los agentes colinérgicos o α -adrenérgicos: la disminución de los niveles de AMP cíclico intracelular (Tai y Tai, 1982; Nemecek y Honeyman, 1982). Estos agentes provocan una acumulación de fosfatidato, una aceleración de la producción de ácidos grasos insaturados y de lisofosfatidilinositol, y estos compuestos son activadores de la fosfodiesterasa sensible a calmodulina. Así se explicaría parcialmente la relación entre el AMP cíclico y ciertos efectos fisiológicos de los agentes colinérgicos y α -adrenérgicos

(Nemecek y Honeyman, 1982).

Sin embargo, la acción estimuladora de lípidos y fosfolípidos también ha sido descrita para la fosfodiesterasa específica de AMP cíclico de diversos tejidos, insensible a calmodulina. La PDE de AMP cíclico de alta afinidad purificada parcialmente a partir de la fracción microsomal y membranas plasmáticas de adipocitos es estimulable por fosfolípidos aniónicos (lisofosfatidilglicerol, lisofosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina) en un proceso en el que aumenta la V_m de la enzima pero no se modifica la K_m para el sustrato. Esta acción de los fosfolípidos sobre la PDE de baja K_m ha sido encontrada también en membranas intactas por lo que se postula un papel de los fosfolípidos en la regulación metabólica (Lance Macaulay et al, 1983 -a y b-).

De las tres formas solubles de fosfodiesterasa de corazón de rata separadas por isoelectroenfocado (Némoz et al, 1981), se ha encontrado que la enzima específica de AMP cíclico es estimulable por acción de la fosfolipasa c y su producto de metabolismo, el ácido fosfatídico (Prigent et al, 1984). La forma de PDE de AMP cíclico particulada de alta afinidad de cerebro de rata es inestable, inclusive conservada a 4 °C o a -20 °C. Se ha encontrado que los fosfolípidos extraídos de cerebro de rata, buey y de cerdo, estabilizan la enzima y además, estimulan su actividad (Ong y Koh, 1982 -a y b-). El mecanismo molecular por el cual estos fosfolípidos ejercen su acción permanece aún desconocido.

III.6.3. Regulación de proteólisis

La regulación de la actividad fosfodiesterásica por acción de la pro-

teólisis ha sido descrita en diversos sistemas. En la mayoría de los casos, la proteólisis ejerce un efecto estimulador de la actividad catalítica siendo responsable de procesos tales como el de desenmascaramiento de una actividad parcialmente inactiva (Cheung, 1969) hasta de la aparición de múltiples formas derivadas de una original (Narindrasorasak et al, 1982).

En todos los casos descritos, este mecanismo de regulación irreversible provoca la eliminación de una región de la molécula enzimática que ejercería un efecto inhibitorio sobre la actividad fosfodiesterásica. De esta manera se inducirían cambios en el tamaño molecular, en algunos casos muy apreciables; así la proteólisis de la PDE de AMP cíclico soluble de útero de rata lleva a la enzima de una forma cuyo coeficiente de sedimentación es 7 S a otra de 4 S (Epstein et al, 1978). Es muy probable que la remoción de la región regulatoria de las fosfodiesterasas induzca cambios conformacionales en la molécula de la enzima, tal como actuaría el complejo Ca^{2+} -calmodulina sobre las proteínas receptoras del mismo. Se ha encontrado que muchas fosfodiesterasas estimulables por calmodulina también lo son por proteólisis controlada, siendo ambos efectos no aditivos sino alternativos, como se encontrara en la activación por quimotripsina de la fosfodiesterasa de GMP cíclico soluble de hígado de rata (Moss et al, 1978). La proteólisis estimula la actividad fosfodiesterásica, tornándola insensible a la acción de la calmodulina (Tucker et al, 1981; Prigent et al, 1984; Orellana et al, 1984).

La proteólisis controlada estimuladora de la actividad fosfodiesterásica ha sido encontrada también en otros sistemas no sensibles a calmo-

dulina, como el de la PDE activada por luz de bastoncillos de retina (Miki et al, 1975) (ver Fosfodiesterasas de GMP cíclico activadas por luz parágrafo III.4.2.a) o el de la PDE de mioblastos y músculo esquelético de rata (Narindrasorasak et al, 1982). En este último sistema se ha encontrado una forma nativa original cuya actividad es regulada por un proceso de fosforilación dependiente de AMP cíclico. Dicha forma nativa generaría por proteólisis otras formas enzimáticas no sensibles a la regulación por fosforilación. Al igual que en otros sistemas, en músculo de rata no se ha dilucidado si la generación de múltiples formas por proteólisis es un proceso regulatorio fisiológico o si se trata de un artificio debido a proteólisis inespecíficas durante las preparaciones enzimáticas. No obstante ello, en hígado (Saki et al, 1978) y en riñón de rata (Strewter y Manganiello, 1979), se ha encontrado una proteasa lisosomal que activa las respectivas fosfodiesterasas solubles de dichos sistemas y cuya acción activadora es suprimida por inhibidores de proteasas tales como la leupeptina, antipaína e inhibidor de catepsina B1. También se ha encontrado que en sistemas de fosfodiesterasas particuladas, la actividad puede ser solubilizada por acción de la tripsinización controlada, como ocurre con las varias fosfodiesterasas descritas en retículo endoplasmático (Wilson y Houslay, 1983).

III.6.4. Regulación por insulina. Fosforilación de la fosfodiesterasa

Entre los casos observados de modulación hormonal de la fosfodiesterasa, la acción de la insulina ha dado lugar a numerosos estudios. Es conocido desde el año 1970 y ampliamente verificado que la insulina produce

en dosis fisiológicas, por contacto con las células del tejido adiposo intactas un incremento de dos a cinco veces en la actividad fosfodiesterásica que sobreviene en pocos minutos (Francis y Kono, 1982). La forma enzimática estimulada presenta una alta afinidad por el AMP cíclico y corresponde a una fracción membranosa. Una acción semejante de la insulina ha sido también observada en hepatocitos. La estimulación de la degradación del AMP cíclico por insulina, una de las numerosas acciones celulares de esta hormona, puede explicar sus efectos sobre los niveles de AMP cíclico hepático: el decrecimiento de los mismos que habían sido incrementados previamente por acción del glucagón. Aquí puede radicar, al menos parcialmente, el origen de los efectos inhibitorios de la insulina sobre la glucogenolisis y la glucogénesis y constituye un ejemplo del antagonismo entre estas dos hormonas.

El mecanismo de acción de la insulina sobre la fosfodiesterasa permanece aún en el terreno especulativo. Se ha demostrado que *in vivo* no hay interacción directa entre la hormona y la molécula enzimática (Marchmont y Houslay, 1981) ni se halla involucrada síntesis proteica (Francis y Kono, 1982). Las experiencias de solubilización de la enzima han aportado algunos elementos de información. La insulina posee receptores de membrana disociables de la enzima luego de la solubilización de esta última (Appleman y Terasaki, 1975). Una proteólisis limitada de las membranas de hígado o de adipocitos puede imitar el efecto activador de la insulina sobre la actividad fosfodiesterásica y liberar a la fracción soluble un fragmento de PDE con actividad catalítica. Se puede suponer que un elemento regulador, que ejerce en ausencia de insulina una inhibición sobre la

fosfodiesterasa intacta queda incluido en la membrana. La insulina modificaría las propiedades de ese elemento regulador que eliminaría la inhibición sufrida por la parte catalítica (Francis y Kono, 1982; Loten et al, 1980). La solubilización de la enzima por acción de detergentes produce un aumento del radio de Stokes después de estimulación hormonal, lo que puede reflejar un cambio conformacional o la fijación de una subunidad suplementaria bajo los efectos de la insulina (Loten et al, 1980). Un mecanismo de fosforilación había sido sugerido como implicado en este proceso. Recientemente se ha demostrado una estrecha relación entre la fosforilación de una PDE periférica de la membrana de hígado y el aumento de su actividad bajo el efecto de la insulina. Estos efectos son observables in vitro sobre una preparación de membranas, requiriendo la presencia de AMP cíclico e involucrando la acción de una quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico. Una concentración de este nucleótido de $4 \mu\text{M}$, correspondiente a los niveles observados en hígado después de una estimulación de la adenilato ciclasa por glucagón, es óptima para estos fenómenos y permite obtener una duplicación de la actividad fosfodiesterásica (Marchmont y Houslay, 1980b). Esto explicaría las fluctuaciones del efecto estimulador de la insulina encontradas en hepatocitos intactos, cuyos niveles de nucleótidos cíclicos pueden ser variables. La enzima sensible a insulina ha sido purificada a homogeneidad (Marchmont y Houslay, 1981; Marchmont et al, 1981). En su forma activada incorpora un fosfato por molécula de enzima. El efecto de la fosforilación conduce principalmente a un incremento de la cooperatividad negativa con respecto a la enzima nativa (el coeficiente de Hill pasa de 0,62 a 0,47), lo que se traduce, a

las concentraciones fisiológicas del sustrato, en un incremento de la actividad hidrolítica (Marchmont y Houslay, 1981). La fosfodiesterasa hepática sensible a insulina se fija reversiblemente con gran afinidad a las membranas plasmáticas sobre receptores proteicos (Houslay y Marchmont, 1981), que podrían coincidir o al menos ser parte de los receptores insulínicos. La insulina, por su fijación sobre su receptor, conduciría a un cambio conformacional de la fosfodiesterasa, permitiendo que esta enzima se torne accesible a una quinasa de proteína, luego sea fosforilada y por ende activada. Sin embargo es importante destacar que la enzima de membrana de hígado que se fosforila no sería la misma enzima descrita por Loter (Loter et al, 1980), la cual es activada por insulina y también por glucagón (Heyworth et al, 1983). Los resultados obtenidos por el grupo de Houslay permiten proponer un mecanismo coherente para la estimulación de la fosfodiesterasa hepática por insulina. Sin embargo estos resultados no han sido confirmados por otros grupos y no se sabe si pueden ser extrapolados al tejido adiposo. Ciertos autores proponen una mediación de diversos efectos celulares de la insulina por la liberación de una pequeña molécula de peso molecular 1000-1500, quizás peptídica, que actuaría luego de que la hormona se fija a sus receptores de membrana. Este factor parecería capaz de activar la PDE del tejido adiposo (Kiechle y Jarett, 1981). Este modelo no es necesariamente excluyente del precedente.

III.6.5. Acciones hormonales diversas sobre las fosfodiesterasas

Ha sido descripto otro tipo de regulación hormonal de la PDE de membrana: los agentes lipolíticos estimulan la PDE luego de estar en contac-

to algunos minutos con células aisladas de ciertos tejidos. Las catecolaminas y la corticotrofina (ACTH) (Makino y Kono, 1980) son activas sobre la enzima de adipocitos; el glucagón estimula la enzima de hepatocitos (Loten et al, 1978). Estos efectos son imitados por el AMP cíclico o el dibutiril AMP cíclico y son independientes de síntesis proteica. En adipocitos parece ser que la misma especie enzimática es activada por insulina y por adrenalina, en hepatocitos por insulina y por glucagón (ver parágrafo III.6.4.). Es probable que los agentes lipolíticos actúen a través de la fosforilación dependiente de AMP cíclico de alguna proteína. Se puede suponer que la insulina y los agentes lipolíticos inducen la fosforilación de sitios distintos de una misma fosfodiesterasa (Makino y Kono, 1980). Resulta paradójico que agentes hormonales cuyas principales acciones fisiológicas son antagónicas produzcan un efecto aparentemente idéntico sobre un mismo destinatario enzimático. La estimulación de PDE podría ser responsable de la disminución de los niveles de AMP cíclico que ocurre luego del alza inducida por el glucagón en hepatocitos o in vivo (Loten et al, 1978).

Otras hormonas podrían estar implicadas en la regulación de la actividad de PDE. Las hormonas tiroideas provocan una caída de la actividad de muchas formas de la enzima en tejido adiposo (Nuñez y Correze, 1981) y en hígado (Ilorgan et al, 1982). El hipertiroidismo aumenta notablemente las actividades fosfodiesterásicas normales; la caída de la concentración de AMP cíclico suprime la respuesta de las células a las hormonas lipolíticas. El mecanismo de acción de las hormonas tiroideas sobre la PDE aún no se conoce.

También las hormonas esteroideas participan en la modulación de la PDE. El estradiol in vivo disminuye la actividad fosfodiesterásica en útero de rata (Gardner et al, 1973). La testosterona induce la caída de la actividad de PDE en epidídimo y próstata de rata; en ratas adultas, la castración o los compuestos antiandrogénicos incrementan la actividad de hidrólisis de AMP cíclico de cinco a diez veces (Holtz et al, 1981). La suprarrenalectomía incrementa la actividad de la PDE de GMP cíclico en diversos tejidos, efecto reversible por la administración de glucocorticoides (Thompson y Williams, 1974). Por otro lado, los glucocorticoides a concentraciones fisiológicas inhiben a la PDE in vitro (Schmidtke et al, 1976). La importancia fisiológica de estas respuestas del organismo a las hormonas esteroideas no ha sido aún establecido. La mayoría de los efectos de las hormonas esteroideas sobre la PDE son relativamente lentos y parecen depender de síntesis proteica, quizás un modulador que inhiba la enzima (Holtz et al, 1981).

III.6.6. Fenómenos de regulación lenta

Existe, efectivamente, una regulación a largo plazo de la actividad fosfodiesterásica. La inducción de la síntesis "de novo" de ciertas formas de la enzima es observable en diversos tipos de células en cultivo, por el agregado de agentes que aumentan los niveles intracelulares de AMP cíclico (catecolaminas, inhibidores de la PDE, dibutiril AMP cíclico). Por ejemplo, en mioblastos se observan en estas condiciones la inducción de una sola de las varias formas específicas de AMP cíclico presentes (Ball et al, 1980). En una línea de células de hepatoma, el mantenimiento

de las concentraciones elevadas de AMP cíclico intracelular induce la forma específica de AMP cíclico, mientras que la incubación prolongada de las células en presencia de glucocorticoides provoca una represión de las dos formas específicas de GMP cíclico (Vaughan et al, 1981). La influencia de los nucleótidos cíclicos sobre la modulación a largo plazo de su propia degradación ha sido constatada en numerosos otros sistemas celulares (Wells y Hardman, 1977; Strada y Thompson, 1978).

III.7. Fosfodiesterasas en plantas superiores

La presencia de AMP cíclico en tejidos de plantas superiores (Brown y Newton, 1973) alentó la búsqueda de los sistemas enzimáticos regulatorios. Así, se han encontrado actividades fosfodiesterásicas de nucleótidos cíclicos en diversas especies vegetales: Spinacea deracea Brown et al, 1980), Solanum tuberosum (Ashton y Polya, 1975; Zau-kowleczewska et al, 1984), Hordeum vulgare (Vandepeute et al, 1973), Pisum sativum (Po chao y Varner, 1972) y callos de soja (Brewin y Northcote, 1973).

En la mayoría de los casos la actividad fosfodiesterásica se ejerce sobre nucleótidos cíclicos 2',3' y 3',5'. Son formas de alto peso molecular (180 K - 370 K), generalmente formadas por subunidades agregadas, no regulables por los inhibidores clásicos (metilxantinas, por ejemplo) ni activadores (calmodulina o imidazol).

III.8. Fosfodiesterasas en eucariontes inferiores

En algunos eucariontes inferiores se ha informado de la presencia de más de una forma de PDE, pero en la mayoría de los casos resulta muy di-

fácil asimilarlas a alguno de los tipos descritos para organismos superiores. Así, por ejemplo, se han encontrado en el musgo Funaria hygrometrica dos formas de PDE que se separan por cromatografía de afinidad en columna de AMP cíclico-agarosa. Una forma que eluye con el lavado (PDE I) es insensible a metilxantinas e imidazol y copurifica con nucleotidasas. Esta forma se relaciona por sus propiedades con las encontradas en plantas superiores. La otra forma (PDE II) eluye de la resina a 100 μ M de AMP cíclico, es inhibible por metilxantinas y estimulable por imidazol y está libre de nucleótidos; esta forma está relacionada con las fosfodiesterasas encontradas en animales (Sharma y Johri, 1982). Por cromatografía en DEAE-celulosa, se separan dos picos de propiedades diferentes y por recromatografía del segundo se obtiene un desdoblamiento en otros dos picos nuevos con ganancia de actividad específica (Sharma y Johri, 1983). Estos resultados sugieren que las múltiples formas podrían derivar de una forma nativa, quizás por un proceso de proteólisis, a juzgar por la ganancia de actividad, y por analogía a lo que ocurre con las fosfodiesterasas de animales superiores.

Los estudios de fosfodiesterasas realizados en hongos han demostrado la existencia de una gran variedad de formas enzimáticas; sin embargo, y quizás a causa de que no son muchos los estudios realizados, no ha podido confeccionarse una clasificación generalizadora de dichas formas.

En Dictyostelium discoideum se ha descrito la existencia de al menos dos tipos de PDE de AMP cíclico, una extracelular y otra asociada a la membrana plasmática (Chang, 1968; Gerish et al, 1972; Pannbacker y Pravard, 1972). La forma extracelular se excretaría al medio como una forma de

alta afinidad (K_m para el AMP cíclico $15 \mu M$) durante todo el desarrollo. Esta actividad es modulada por la cosecreción de una proteína inhibidora (Dicou y Brochet, 1979; Riedel et al, 1973) que forma un complejo con la enzima elevando la K_m a $2 mM$. Existen varias formas de PDE extracelular que se distinguen por cromatografía de intercambio iónico y por su peso molecular (Toorchen y Henderson, 1979). Se trataría de las diferentes asociaciones de dos subunidades de glicoproteínas de peso molecular $50 K$ y $52 K$, relacionadas inmunológicamente (McDonald y Sampson, 1983). La PDE asociada a membrana (Malchow et al, 1972) es una forma de alta afinidad por el AMP cíclico (K_m $10 \mu M$) y comparte con la enzima extracelular las propiedades cinéticas, el punto isoeléctrico, el peso molecular de la subunidad de $50 K$ y similares mapas peptídicos (Shapiro et al, 1983) lo que sugeriría una relación genética entre ambas enzimas.

En Physarum polycephalum se han descrito dos formas de PDE, una particulada y otra soluble que se excreta al medio; ambas formas tienen como sustrato AMP cíclico, requieren catión divalente, son inhibibles por metilxantinas y por ATP y son de baja afinidad por el sustrato (Murray et al, 1971; Kincaid y Mansour, 1979).

En Aspergillus niger se han encontrado dos formas de PDE de AMP cíclico, una extracelular y otra intracelular (Wold y Suzuki, 1974) y en A. giganteus variaciones de los niveles de actividad de PDE de AMP cíclico durante la fotomorfogénesis de conidióforas gigantes (Zurzycka et al, 1983).

En Blastocladiella emersonii se ha demostrado la existencia de una actividad de PDE de AMP cíclico soluble en extractos de zoosporas (Maia

y Camargo, 1974) que es inhibible por adenina más que por metilxantinas. También se ha descrito una fosfodiesterasa de GMP cíclico soluble que se presenta en varias formas de distinto coeficiente de sedimentación, quizás un equilibrio de asociación de subunidades (Vale et al, 1975).

En Coprinus macrorhizus se describió una actividad de PDE de AMP cíclico inducida por el pasaje de la oscuridad a la luz (Uno et al, 1974).

En Phycomyces blakesleeanus existe una actividad de PDE de AMP cíclico activable por luz azul en presencia de GTP, es soluble, de alta afinidad por el AMP cíclico, siendo el GMP cíclico un inhibidor de la actividad (Cohen, 1974; Cohen, 1979).

En Saccobolus platensis se ha estudiado la actividad de PDE encontrándose acción hidrolítica sobre AMP cíclico y GMP cíclico. La luz requerida por S. platensis para producir apotecios puede ser reemplazada en oscuridad por el agregado al medio de cultivo de dibutiril AMP cíclico, AMP cíclico, 3-isobutil-1-metilxantina (MIX) o teofilina, estos dos últimos compuestos, inhibidores clásicos de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos. Los cultivos sometidos a luz blanca presentan un nivel de actividad de PDE menor que los sometidos a oscuridad (Galvagno et al, 1984).

En levadura de panadería se ha estudiado una PDE soluble de alta K_m que contiene Zn, e hidroliza AMP cíclico y GMP cíclico. Se trata de un dímero cuyas subunidades tienen un peso molecular de 43 K (Londesborough y Suoranta, 1983). En la fracción microsomal y en su sobrenadante se ha encontrado una PDE de AMP cíclico de alta afinidad por su sustrato (K_m : $0,2 \mu M$). Es probable que esta enzima pueda unirse reversiblemente a ribosomas y a otras partículas (Londesborough, 1977; Londresborough y Jankkari,

1982). Para esta enzima se describen dos formas, una de una sola cadena polipeptídica de 61 K de la que derivaría por acción proteolítica una forma de dos cadenas: 45 K y 17 K unidas no covalentemente. Esta forma de dos cadenas polipeptídicas presenta mayor actividad específica que la forma monomérica (Suoranta y Londesborough, 1984).

Los estudios realizados en Neurospora crassa permitieron describir una actividad de PDE de AMP cíclico asociada a la fracción particulada, inhibible por metilxantinas y estimulable por imidazol (Scott y Solomón, 1973). También se han descrito varias actividades solubles de PDE, resolviéndose dos formas, una que tiene como sustrato AMP cíclico y GMP cíclico por igual, y otra que es fundamentalmente activa en la hidrólisis de GMP cíclico (Tellez-Iñón et al. 1982). Se ha encontrado además que cada uno de estos tipos es capaz de desdoblarse en otros e incluso de sufrir estos una interconversión con las especies primitivas; esto sugeriría que se trata de formas agregadas (Tellez-Iñón et al, 1982). En N. crassa fue aislada y caracterizada la proteína ligadora de calcio, la calmodulina, la cual comparte las propiedades de la calmodulina de los vertebrados y su composición de aminoácidos es similar a la calmodulina de plantas (Ortega-Perez et al, 1981; Cox et al, 1982). Existen controversias acerca de la existencia en este organismo de una PDE regulable por calmodulina. Ha sido informado que existen en extractos solubles dos formas de PDE de GMP cíclico y de AMP cíclico, termoestable una y termolabil la otra, las cuales son inhibibles por calcio en un proceso aparentemente independiente de calmodulina o de proteasa estimulable por calcio (Shaw y Harding, 1983). También a partir de extractos solubles del hongo se ha purificado

parcialmente una PDE estimulable por calmodulina e inhibible por antagonistas de la calmodulina, como ser pimozida, trifluoperazina y clorpromezina (Ortega-Perez et al, 1983). Esta enzima es retenida por una columna de calmodulina-Sepharosa y es posible eluirla por quelación del calcio con EGTA.

Recientemente se ha demostrado la existencia de dos actividades fosfodiesterásicas extracelulares en cultivos de N. crassa (Hasunuma, 1983). Se trata de dos formas homopoliméricas de una subunidad de peso molecular 50 K y tiene como sustratos nucleótidos cíclicos 2',3' y 3',5', como las fosfodiesterasas encontradas en vegetales superiores.

IV- DIMORFISMO EN MUCOR, ACCION DEL AMP cíclico

Existen ciertos hongos que presentan el fenómeno de la dualidad morfológica. Así, según las condiciones ambientales pueden crecer bajo la forma de micelio filamentosos ramificados, tabicados o cenocíticos, o bien bajo la forma de células levaduriformes que se reproducen por gemación. Se ha definido el dimorfismo como la conversión reversible de formas micelias y levaduriformes controlada por el entorno ambiental (temperatura, composición de la atmósfera, nutrientes, etc.).

MUCOR es un género de hongos perteneciente a la clase ZYGOMYCETES, orden MUCORALES cuyo dimorfismo está controlado por las condiciones atmosféricas de crecimiento. En anaerobiosis desarrolla un micelio cenocítico típico, produciendo estructuras de reproducción vegetativa, las clamidosporas. Bajo ciertas condiciones, se producen en los extremos de las hifas esporangios portadores de esporas asexuales, esporangiosporas. La reproducción sexual se produce por copulación gametangial produciendo una cigospora. En la figura IV se puede ver el ciclo de vida aeróbico de este género.

Como una respuesta adaptativa de MUCOR a una atmósfera pobre en oxígeno, aparecen células esféricas o hifas cortas muy engrosadas que se reproducen por gemación. Esta fase levaduriforme desaparece por aereación. MUCOR resulta así un excelente sistema biológico para el estudio de la diferenciación celular a nivel bioquímico.

Se ha estudiado el fenómeno del dimorfismo en MUCOR desde diversos puntos de vista, como ser: la influencia de los hidratos de carbono (Bartnicki-García, 1963; Friedenthal et al, 1974), el metabolismo respiratorio (Paznokas y Sypherd, 1975), la síntesis de proteínas (Orlowsky y

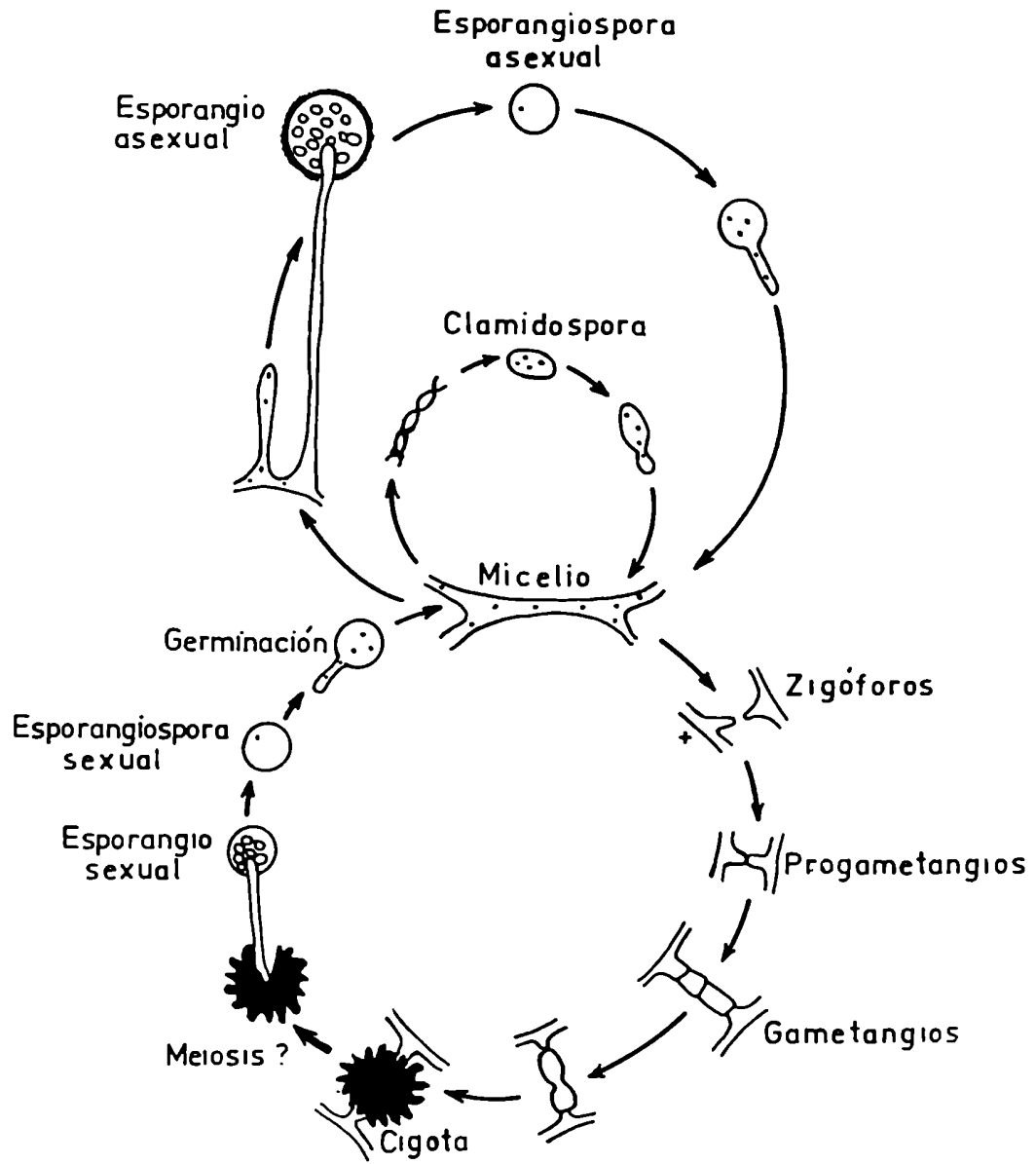


Fig IV. Ciclo de vida de MUCOR

Sypherd, 1977). Se han realizado importantes adelantos en cuanto a la elucidación de las bases moleculares del dimorfismo en MUCOR estudiando el papel desempeñado por el AMP cíclico. La adición de dibutirilAMP cíclico a cultivos aeróbicos del hongo inhibe el crecimiento apical, promoviendo el crecimiento levaduriforme. Las células levaduriformes tienen una concentración intracelular de AMP cíclico mayor que la de la forma filamentosa (Larsen y Sypherd, 1974; Paveto et al, 1975). Durante la aereación de un cultivo levaduriforme los niveles de AMP cíclico disminuyen, disminución esta que precede a la aparición de los tubos germinativos. Estos efectos requieren la presencia de un azúcar fermentable en el medio de cultivo (Larsen y Sypherd, 1974; Cantore et al, 1983).

De acuerdo con los estudios hasta ahora realizados, la regulación del dimorfismo en MUCOR es el resultado de una interacción compleja de factores ambientales y nutricionales en donde el AMP cíclico desempeña un papel muy importante. Por lo tanto resulta indispensable considerar su mecanismo de acción para el estudio de las bases moleculares de la regulación del dimorfismo. En la fig V puede verse un esquema de los principales factores ambientales y nutricionales que participan en las transiciones dimórficas en MUCOR ROUXII.

En muchos otros organismos eucariontes inferiores se ha demostrado que el AMP cíclico cumple un papel importante. Así, se ha encontrado en el hongo acuático B. emersonii una relación entre los cambios de las concentraciones intracelulares del nucleótido cíclico y la citodiferenciación (Maia y Camargo, 1974). En M. crassa (Scott, 1976; Terenzi et al, 1974) lo mismo que en D. discoideum (Loowis, 1972), el AMP cíclico es determinante de la morfología del hongo.

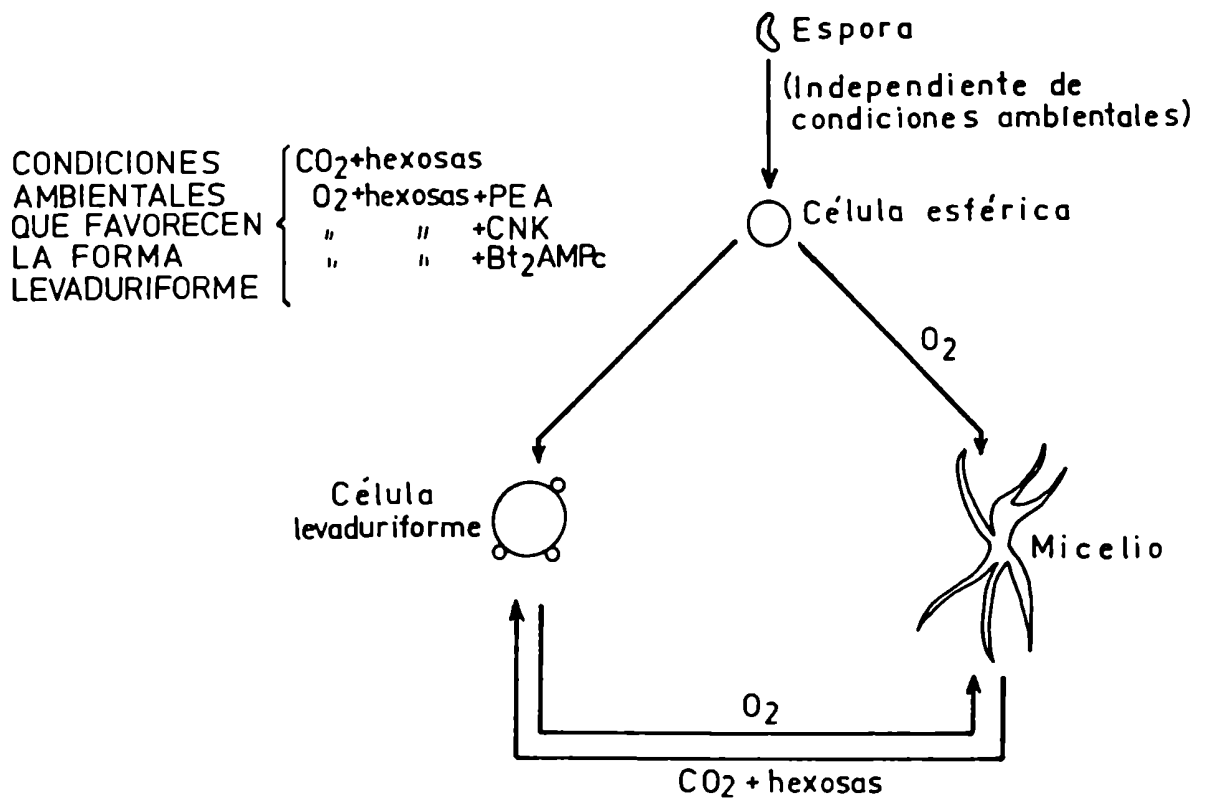


Fig. V. Condiciones ambientales y nutricionales que influyen sobre el dimorfismo de Mucor rouxii

V- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la PDE soluble de Mucor rouxii es una enzima de alta afinidad por el AMP cíclico y específica para su sustrato. Estudiados sus requerimientos se encontró una dependencia absoluta de catión divalente, Mg^{2+} o Mn^{2+} , insensibilidad a la inhibición por metilxantinas e indiferencia absoluta a activadores clásicos tales como el imidazol o el complejo Ca^{2+} -calmodulina. Sin embargo, presenta un mecanismo de control de su actividad catalítica por fosforilación dependiente de AMP cíclico y por proteólisis controlada. Ambos mecanismos, independientemente, conducen a un aumento no aditivo de la actividad fosfodiesterásica (Galvagno et al, 1979; Moreno et al, 1982).

A la luz de estos resultados, altamente novedosos para una fosfodiesterasa de nucleótido cíclico de un organismo eucarionte inferior, y que constituyeron parte de la tesis doctoral del Dr. H.A. Galvagno, nos propusimos estudiar los eventos moleculares que regulan la actividad de la enzima de M. rouxii.

MATERIALES Y METODOS

Lista de soluciones utilizadas

Solución A: Tris-ClH 10 mM pH 7,4, 2-Mercaptoetanol 2 mM, EDTA 1,5 mM, EGTA 1 mM, Antipaina 3 µg/ml.

Solución B: Tris-ClH 50 mM pH 8,1, 2-Mercaptoetanol 4 mM, EDTA 1,5 mM, EGTA 1 mM, Antipaina 3 µg/ml.

Solución C: Tris-ClH 50 mM pH 7,4, 2-Mercaptoetanol 4 mM, EDTA 1,5 mM, EGTA 1 mM, Antipaina 3 µg/ml.

Solución D: Pipes 10 mM pH 6,3, 2-Mercaptoetanol 2 mM, glicerol 10%, Antipaina 3 µg/ml.

Solución E: 2-Mercaptoetanol 2 mM, glicerol 10%, Antipaina 3 µg/ml.

Solución M: Tris-ClH 10 mM pH 7,4, 2-Mercaptoetanol 2 mM, EDTA 1,5 mM, EGTA 1 mM, Benzamidina 10 mM.

Solución L: Tris-ClH 10 mM pH 7,4, 2-Mercaptoetanol 2 mM, EDTA 1,5 mM.

I. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO

I.1. Organismo utilizado

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

I.2 Obtención de esporas y mantenimiento de la cepa

Para la obtención de esporas se hizo crecer el hongo en un medio agar 5 % - jugo de tomate (1:1) mezclados inmediatamente después de someter a los componentes a esterilización por autoclave, y vertidos en botellas de Roux. Como prueba de esterilidad, se mantuvieron las botellas durante 24 hs a 28 °C; al cabo de este tiempo se sembró en cada botella una suspensión de esporas (alrededor de 2 ml; 100 esporas/ml) que se incubaron durante 18 hs más. Luego, se invirtieron las botellas y se dejaron incubando a 28 °C a lo largo de 5-7 días. Las esporas se cosecharon por suspensión de las mismas en agua destilada esteril mediante raspado de la superficie del cultivo con una varilla de vidrio con el objeto de desprender las esporas de los esporangios. Las esporas, lavadas reiteradas veces con agua destilada esteril mediante sucesivas suspensiones y centrifugaciones, fueron guardadas en suspensión de agua esteril en fracciones de 3-4 ml a 4 °C por espacio de uno o dos meses. Se mantuvo la cepa por inoculación de tres tubos en pico de flauta con medio agar-jugo de tomate; una vez producida la esporulación, luego de incubar los tubos en las condiciones antes descriptas, se guardaron los mismos a 4 °C.

1.3. Cultivos

Se realizaron inoculando esporas (5×10^5 esporas/ml de medio de cultivo) en Erlenmeyers de 2 l conteniendo 600 ml de un medio de cultivo complejo, el cual contenía:

- a- Glucosa 2 % como principal fuente carbonada.
- b- Extracto de levadura (Difco) 0,3 %.
- c- Hidrolizado ácido de caseína (casaminoácidos; Difco) o bien peptona (inorp tipo M C 3) 1 %, según se indica.
- d- Acido sulfúrico 5 N para ajustar el pH a 4,5.

Se crecieron los cultivos aeróbicamente con agitación constante a 28 °C hasta la fase de crecimiento deseada: 7 hs para un cultivo de células en germinación incipiente, 12 hs para uno de un micelio en fase exponencial media, 16-18 hs para un cultivo de fase estacionaria. Se cosechó el micelio por filtración sobre papel Whatman Nº 1 y se lavó exhaustivamente con solución fría de Tris-ClH 10 mM, pH 7,4; 2-Mercaptoetanol 2 mM, EDTA 1,5 mM, EGTA 1 mM, Antipaina 3 µg/ml (Solución A). En las primeras preparaciones, este lavado exhaustivo se hizo con agua destilada fría. Luego del lavado, se secó el micelio obtenido por presión entre dos láminas de papel de filtro y se lo molió con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual fue procesado inmediatamente o guardado a - 70 °C.

2. PREPARACION DE EXTRACTOS ENZIMATICOS

Todos los pasos se realizaron a 4 °C.

2.1. Preparación de extractos de los distintos estadios del crecimiento filamentoso

2.1.1. Método de ruptura suave

Se suspendió el polvo de micelio en dos volúmenes de Solución A y la suspensión resultante se agitó suavemente con varilla de vidrio durante 60 min, al cabo de los cuales se centrifugó el extracto a 1000 xg durante 10 min; el sobrenadante obtenido se centrifugó a 2000 xg durante 15 min. Al sobrenadante resultante se lo centrifugó a 100 000 xg durante 60 min y el sobrenadante obtenido constituyó la fracción S 100.

2.1.2. Método de ruptura drástico

El polvo de micelio se suspendió en tres volúmenes de solución conteniendo Tris-ClH 10 mM pH 7,4, 2-Mercaptoetanol 2 mM, EDTA 1 mM, Benzamida 10 mM (Solución M); se agregaron dos volúmenes de perlas de vidrio (75-150 μ m) y la mezcla se homogeneizó en un homogenizador Omnimixer Sorvall durante 5 min en períodos de 1 min de operación y 30 seg de intervalo, a máxima velocidad. El homogeneizado se centrifugó durante 10 min a 2000 xg y se recogió el sobrenadante; el precipitado se lavó, por suspensión y centrifugación, con un volumen de solución M; se juntaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 100 000 xg durante 60 min. El sobrenadante constituyó la fracción S 100.

2.2. Preparación de extractos de esporas de Mucor rouxii

Las esporas se molieron en un mortero de porcelana con dos volúmenes de arena y 0,3 volúmenes de Solución A, hasta lograr un 90 % de ruptura (por observación al microscopio). Se agregaron a la mezcla dos volúmenes de Solución A y a la suspensión obtenida se centrifugó a 2000 xg durante 10 min. Se recogió el sobrenadante y se lavó el precipitado con un volumen de Solución A y se centrifugó en las mismas condiciones descriptas. Se juntaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 100 000 xg durante 60 min. El sobrenadante constituyó la fracción S 100.

3. PURIFICACION PARCIAL DE LA ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA DE AMP cíclico

Todos los pasos se realizaron a 4 °C. Se sometió a la fracción S 100 a un corte de 0 a 50 % de saturación con sulfato de amonio sólido y se recogió el precipitado por centrifugación a 10 000 xg durante 20 min (fracción SA).

3.1. Cromatografía en DEAE-celulosa

Se cromatografió la fracción SA, resuspendida en Solución A (10 mg de proteína/ml) y desalada por filtración a través de una columna de Sephadex G-25, en una columna de DEAE-celulosa equilibrada en Solución A. Se sembró la muestra en una relación de 10 mg de proteína/ml de resina empaquetada y se desarrolló la cromatografía con un gradiente lineal de 0 a 0,35 M de ClNa en Solución A, cuyo volumen fue diez veces mayor que el de la columna. Se recogieron fracciones de un décimo del volumen de la columna a una velocidad de flujo de una fracción cada 10 min. En cada

fracción se dosó proteína y actividad de fosfodiesterasa basal y activada bajo condiciones de fosforilación o de tripsinización controlada. Se separaron dos fracciones designadas arbitrariamente PDE I (fracción activable) y PDE II (fracción no activable). Estas se concentraron separadamente por precipitación con sulfato de amonio sólido hasta 80 % de saturación. Cuando se utilizó la cromatografía en DEAE-celulosa con carácter analítico, se procedió exactamente de la misma manera en cuanto a equilibrio de la resina, sembrado de la muestra, desarrollo de la cromatografía, dosaje de las fracciones y concentrado de aquellas con actividad enzimática.

3.2. Cromatografía en Sephacryl S-300

Se resuspendió la fracción proveniente del paso de DEAE-celulosa (fracción PDE I o PDE II) en solución de Tris-ClH 50 mM pH 8,1, 2-Mercaptoetanol 4 mM, EDIA 1,5 mM, EGTA 1 mM, Antipaína 3 µg/ml (Solución B) a una concentración de 10 mg de proteína/ml; la suspensión se clarificó por centrifugación y se la cromatografió en una columna de Sephacryl S-300 (relación altura a diámetro de alrededor de 40) equilibrada con Solución B, a una velocidad de flujo de un volumen de columna cada 16 hs. Se recogieron fracciones de volumen de un centésimo del de la columna y en cada una se dosó proteína y actividad de PDE basal y activada. Se juntaron las fracciones con actividad y se las concentró por precipitación con sulfato de amonio sólido (fracción S-300).

3.3. Cromatografía en Sephadex G-100

Se resuspendió la fracción S-300 en solución de Tris-ClH 50 mM pH 7,4, 2-Mercaptoetanol 4 mM, EDTA 1,5 mM, EGTA 1 mM, Antipaina 3 μ g/ml (Solución C) a una concentración de proteína de 10 mg/ml y se clarificó por centrifugación. Se desarrolló la cromatografía en una columna de Sephadex G-100 (relación altura a diámetro de alrededor de 45) equilibrada con Solución C, a una velocidad de flujo de un volumen de columna cada 48 hs. Se recogieron fracciones de un centésimo del volumen de la columna en las cuales se dosó proteína y actividad de PDE basal y activada. Se juntaron las fracciones con actividad enzimática, las cuales se concentraron por diálisis contra sacarosa 2,5 M preparada en Solución C, hasta una concentración de proteína de 5 mg/ml (fracción G-100).

4. OTROS PASOS DE PURIFICACION

4.1. Cromatografía en columna de Azul 2-agarosa

Las fracciones PDE I o PDE II provenientes del paso DEAE-celulosa, resuspendidas separadamente en solución de Pipes (Piperazina -N, N' - bis [2-ácido etanosulfónico]) 10 mM pH 6,3, 2-Mercaptoetanol 2 mM, glicerol 10 %, Antipaina 3 μ g/ml (Solución D) Cl_2Mg 2 mM se sometieron a cromatografía en minicolumnas de Azul-2 agarosa (1 ml). Se equilibró la columna con Solución D y se sembró la muestra diluída a una concentración de proteína de 1 mg/ml; el percolado se volvió a pasar por la columna dos veces más para asegurar un máximo de pegado de la enzima. Luego se lavó la columna con cuatro volúmenes de Solución D, recolectando el lavado en fracciones de un volumen de columna cada una. La elución se desarrolló

alternativamente por dos métodos.

4.1.1. Elución por fuerza iónica y AMP cíclico

Se procedió al desarrollo de la cromatografía eluyendo con diez volúmenes de columna de Solución D conteniendo ClNa 0,1 M y AMP cíclico 10 mM. Se recogieron diez fracciones iguales, cada una de las cuales se dializó exhaustivamente contra Solución A.

4.1.2. Elución por aumento de pH

Se desarrolló la elución pasando a través de la columna cuatro volúmenes de cada una de las siguientes soluciones en forma sucesiva:

- a- 2-Mercaptoetanol 2 mM, glicerol 10 %, Antipaina 3 μ g/ml (Solución E),
Bis Tris propano-ClH 10 mM pH 6,8.
- b- Solución E, Bis Tris propano-ClH 10 mM pH 7,1.
- c- Solución E, Bis Tris propano-ClH 10 mM pH 7,5.
- d- Solución E, Bis Tris propano-ClH 10 mM pH 8,1.

En todos los casos se recogieron fracciones de un volumen de columna. Se tomaron alícuotas de cada una de ellas y se dializaron exhaustivamente contra Solución A. Luego se dosó en cada una proteína y actividad de PDE basal y activada por fosforilación o tripsinización. Se concentraron las fracciones con actividad enzimática por diálisis contra sacarosa 2,5 M preparada en Solución A.

4.2. Cromatografía en columna de AMP cíclico - agarosa

Se cromatografiaron las fracciones de PDE I o PDE II provenientes del paso de DEAE-celulosa en una minicolumna (1 ml) de AMP cíclico - agarosa. Las soluciones de resuspensión de las fracciones y de equilibrio de la columna, utilizadas alternativamente, fueron las siguientes:

<u>Solución de resuspensión</u>	<u>Solución de equilibrio</u>
a- Solución D	Solución D
b- Solución D, Cl_2Mg 2 mM	Solución D
c- Solución A, Cl_2Mg 2 mM	Solución A

Se sembraron las muestras a una concentración de proteína de 1 mg/ml mediante tres pasajes sucesivos a través de la columna. Inmediatamente después se lavó la resina con cuatro volúmenes de la correspondiente solución de equilibrio y se recogieron cuatro fracciones iguales. Finalmente se pasaron cuatro volúmenes de solución de equilibrio conteniendo ClNa 1 M y AMP cíclico 1 mM (eluído específico). Se recogieron fracciones de un volumen de columna cada una y alícuotas de cada fracción fueron desaladas a través de pequeñas columnas de Sephadex G-25 equilibradas con Solución A. En cada fracción se dosó proteína y actividad de PDE basal y activada por fosforilación o proteólisis.

5. CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA

Se realizaron centrifugaciones en gradientes de sacarosa lineales de 5 a 20 % (P/V) preparados mediante siete capas superpuestas de 0,65 ml cada una de Solución A conteniendo sacarosa 20 %, 17,5 %, 15 %, 12,5 %, 10 %, 7,5 % y 5 %.

10 %, 7,5 % y 5 % respectivamente. Los gradientes se dejaron a temperatura ambiente durante dos horas, luego se enfriaron a 4 °C y se utilizaron inmediatamente. Las centrifugaciones se realizaron en un rotor SW 55 Ti Beckman a 140 000 xg durante 16 hs a 4 °C. Se utilizaron como marcadores de coeficientes de sedimentación:

Fosfatasa alcalina (E. coli) : 6,3 S

Peroxidasa (Rábano picante) : 3,5 S

Citocromo c (corazón equino) : 1,7 S

Luego de la centrifugación, se fraccionaron los gradientes desde el fondo a la superficie, mediante un dispositivo sifón, en 21 fracciones; en cada una de ellas se dosó actividad de PDE basal y activada bajo condiciones de fosforilación o de tripsinización controlada.

6. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Se desarrolló la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes a 4 °C según las instrucciones del manual de Canalco (1980) en geles planos o cilíndricos conteniendo acrilamida más N,N'-metilenbisacrilamida 7% (P/V). En todos los casos se precorrieron los geles durante dos horas a 1,2 mA/cm de gel (geles planos) o bien a 2 mA/gel (geles cilíndricos). Las corridas fueron de cuatro horas a 2 mA/cm de gel (geles planos) o a 2 mA/gel (geles cilíndricos) hasta que el marcador de frente (azul de bromo fenol) recorriera unos 8 cm aproximadamente.

6.1. Procesamiento de los geles después de electroforesis

6.1.1. Tinción para proteínas. Autorradiografía

El revelado de las proteínas se hizo por tinción con azul de Coomassie brillante siguiendo las recomendaciones del manual de Canalco (1980). En los casos en que se realizaron autorradiografías, los geles previamente secados se expusieron a una película Kodak X-Omat S Film en una pantalla amplificadora a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un período de 5-7 días.

6.1.2. Dosaje de actividad de PDE y de incorporación de ^{32}P a proteína en los geles

En los casos en que se determinó la actividad de PDE se procedió a cortar el gel, luego de la electroforesis, desde el origen hasta la posición del marcador de frente, en rodajas de 2 mm de ancho cada una. Se utilizó cada una de estas rodajas (o fracciones de las mismas) como fuente de fosfodiesterasa en una mezcla de incubación para un ensayo de actividad en las condiciones requeridas en cada caso:

a- Geles en los que se midió actividad basal y activación. En este caso se utilizó un cuarto de rodaja para la actividad basal y un cuarto para cada una de las mediciones de actividad activada (bajo condiciones fosforilantes y de tripsinización controlada).

b- Geles en los que se midió actividad e incorporación de ^{32}P . Se utilizó media rodaja para medir actividad enzimática y la otra mitad para medir incorporación de fosfato radioactivo. En este último caso se disolvió la fracción de la rodaja de gel en 0,4 ml de H_2O_2 al 30 % P/V (30 min a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se contó la radiactividad vertiendo la solución sobre la mezcla

centelleadora de Arkopal - Tolueno (ver parágrafo 14. Medición de radioactividad).

7. FOSFORILACION DE LA FOSFODIESTERASA POR MEDIO DE LA SUBUNIDAD CATALITICA DE LA QUINASA DE PROTEINA DEPENDIENTE DE AMP cíclico

Se incubó una alícuota de la fracción G-100 de PDE de MUCOR (250 μ g de proteína en 50 μ l) durante 20 min a 30 °C en una mezcla conteniendo fosfato de potasio 20 mM pH 7,4, Cl_2Mg 10 mM, ATP [γ - ^{32}P] 0,1 mM (800-1000 cpm/pmol) y 200 unidades de subunidad catalítica de quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico de corazón bovino (unidades definidas según Sigma). Inmediatamente después se filtró la mezcla a través de una pequeña columna de Sephadex G-25 equilibrada con Solución C, a los efectos de eliminar el ATP [γ - ^{32}P] que no reaccionó. Se concentró la muestra por diálisis contra sacarosa 2,5 M preparada en Solución C hasta una concentración de proteína de 5 mg/ml. La fracción así obtenida, tal cual o bien tripsinizada según se detalla más abajo (ver 8. Tratamiento con tripsina de la preparación de PDE), fue analizada por electroforesis en gel como se indica en el parágrafo precedente (6. Electroforesis en gel de poliacrilamida).

8. TRATAMIENTO CON TRIPSINA DE LA PREPARACION DE PDE

Del paso de purificación que se indique se sometió a proteólisis controlada una alícuota de preparación de PDE por tratamiento con tripsina en solución o bien con tripsina inmovilizada en acrilamida.

8.1. Tripsinización de la fracción PDE I

Se procedió a tripsinizar una alícuota de la fracción PDE I proveniente del paso de DEAE-celulosa (15 mg de proteína en 1,5 ml de Solución L, la cual está libre de inhibidores de proteasas), incubándola durante 30 min a 4 °C con 1 mg de tripsina. La reacción fue detenida por el agregado de 3 mg de inhibidor de tripsina de clara de huevo. Se sometió a la muestra así obtenida a análisis por cromatografía en DEAE-celulosa, centrifugación en gradientes de sacarosa o bien electroforesis en gel de poliacrilamida.

8.2. Tripsinización de la fracción G-100

Se sometió a la fracción G-100 fosforilada o sin fosforilar (ver sección 7.) a tripsinización controlada con tripsina inmovilizada en acrilamida. Se incubó una alícuota de la preparación (100 µg de proteína) con 5 unidades de tripsina-acrilamida durante 20 min a 4 °C con agitación constante. La reacción se detuvo centrifugando la mezcla, se tomó el sobrenadante y se realizaron los análisis ulteriores (electroforesis en gel después de fosforilar o no con ATP [γ -³²P]).

9. TRATAMIENTO DE LA PREPARACION DE PDE EN CONDICIONES FAVORABLES A LA PROTEOLISIS ENDOGENA

Se filtró una alícuota de la fracción PDE I (30 mg de proteína en 3 ml de Solución M) a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada con solución L (la cual está libre de inhibidores de proteasas) y se man-

tuvo a 4 °C durante 24 hs. La preparación así obtenida fue sometida a ulteriores análisis (cromatografía en DEAE-celulosa, centrifugación en gradientes de sacarosa).

10. METODOS DE ENSAYO

10.1. Ensayo habitual de PDE de AMP cíclico

Se ensayó la actividad de PDE siguiendo el método de dos pasos descrito por Thompson y Appleman, 1971. La mezcla de incubación consta de: Tris-ClH 50 mM pH 7,4, 2-Mercaptoetanol 2 mM, 50 µg de seroalbúmina bovina, Cl₂Mg 10 mM, AMP cíclico 5 µM (50.000-80.000 cpm) y la preparación enzimática, en un volumen final de 0,1 ml. Se incubaron las mezclas durante 12 min a 30 °C y la reacción se detuvo calentando a 100 °C durante 45 seg. Después de enfriar se agregaron 50 µg de veneno de serpiente (Ophiophagus hannah); se incubó durante 10 min a 30 °C y la reacción se detuvo por el agregado de 1,1 ml de una suspensión de resina de intercambio aniónico AGI - X 2 (suspensión 1:2 de resina en metanol 50 %). Se centrifugaron los tubos y se tomaron 0,5 ml del sobrenadante cuya radioactividad se determinó en mezcla centelleadora de Arkopal - tolueno. En todos los casos se ajustaron las condiciones de modo que las reacciones fueran lineales con el tiempo y que el consumo de sustrato no fuera mayor del 25 %.

Se definió como una unidad de actividad de PDE a la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 pmol de AMP cíclico por min bajo las condiciones habituales de ensayo.

10.2. Activación de la PDE por tripsina

Se realizó la activación de la PDE por tripsina mediante la preincubación de la alícuota de preparación enzimática a ensayar con 10 μ g de tripsina durante 10 min a 4 °C en un volumen final de 50 μ l. Se detuvo la proteólisis agregando 30 μ g de inhibidor de tripsina de clara de huevo. Luego se midió la actividad de PDE en la muestra completa bajo las condiciones habituales de ensayo.

10.3. Activación de la PDE por fosforilación

Se realizó la activación de la enzima por fosforilación preincubando durante 10 min a 30 °C la muestra de PDE con subunidad catalítica de quinasa de proteína de corazón bovino bajo condiciones fosforilantes. La mezcla de preincubación contenía: fosfato de potasio 50 mM pH 7,4, 2-Mercaptoetanol 2 mM, Cl_2Mg 10 mM, 50 μ g de seroalbúmina bovina, ATP 0,1 mM, 5 unidades de subunidad catalítica de quinasa de proteína y la muestra de PDE en un volumen de 50 μ l. Después de la preincubación se inició el ensayo de PDE por el agregado de AMP cíclico-[3H]5 μ M llevando la mezcla a un volumen final de 0,1 ml y la reacción se siguió en las condiciones habituales.

10.4. Actividad de PDE medida después de electroforesis en gel de poliacrilamida

Se midió la actividad de PDE después de electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando como fuente enzimática una rodaja del gel o frac-

ción de la misma (ver sección 6.1.2.) en una mezcla de incubación de 250 μ l conteniendo: Tris-ClH 50 mM pH 7,4, 2-Mercaptoetanol 2 mM, Cl_2Mg 10 mM, glicerol 20 %, 125 μ g de seroalbúmina bovina, AMP cíclico-[3H] 1,5 μ M (50.000-80.000 cpm). Luego de incubar durante 90 min a 30 °C, se tomó una alícuota de 100 μ l de la mezcla de incubación y se desarrolló el segundo paso del ensayo bajo condiciones habituales, mediante el agregado de 50 μ g de veneno de serpiente.

10.4.1. Activación por tripsina de la PDE después de electroforesis en gel de poliacrilamida

Se preincubó la fracción de rodaja del gel con 10 μ g de tripsina durante 20 min a 4 °C en un volumen de 200 μ l conteniendo todos los componentes de la mezcla de incubación para la medición de actividad de PDE dosada en gel, salvo AMP cíclico-[3H] y seroalbúmina bovina. Se detuvo la preincubación por agregado de 30 μ g de inhibidor de tripsina de clara de huevo y se inició la incubación del ensayo de PDE por el agregado de AMP cíclico-[3H] y seroalbúmina bovina. El dosaje se realizó tal cual lo descrito en el parágrafo 10.4.

10.4.2. Activación de la PDE por fosforilación después de electroforesis en gel de poliacrilamida

En cada fracción de rodaja del gel se realizó la activación por fosforilación después de electroforesis en gel de la PDE, simultáneamente con el ensayo de actividad. De este modo se agregó a la mezcla de incubación

ATP 0,1 mM y 10 unidades de subunidad catalítica de quinasa de proteína. El ensayo fue desarrollado entonces como lo descrito en el parágrafo 10.4.

10.5. Ensayo de actividad de quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico

El ensayo de actividad de quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico se realizó de acuerdo a lo descrito por Moreno et al, 1982. La mezcla de incubación contenía en 0,1 ml: Tris-ClH 50 mM pH 7,4, Cl_2Mg 10 mM, 2-Mercaptoetanol 2 mM, histona (tipo II S-Sigma) 1,5 mg/ml, ATP [γ - ^{32}P] 0,1 mM (300-1.000 cpm/pmol), AMP cíclico 10 μM y la fracción enzimática a ensayar (cuando la fuente de enzima fue la subunidad catalítica de quinasa de proteína, el AMP cíclico se omitió). Las incubaciones se realizaron durante 10 min a 30 °C. La reacción se detuvo por dos métodos alternativos:

a- Agregando 50 μg de seroalbúmina bovina y 1 ml de TCA 10 %. La proteína precipitada fue colectada por centrifugación y lavada dos veces por resuspensión en fosfato de sodio y amonio 1 M y reprecipitación en TCA 10 %. Finalmente la muestra disuelta en 0,1 ml de OHK 1 N, fue sembrada en papeles Whatman N° 1 de 2 cm de lado los que fueron secados en estufa. La radioactividad fue determinada en mezcla centelleadora de tolueno.

b- Sembrando la mezcla en papeles de fosfo celulosa de 2 cm x 2 cm. Los papeles entonces fueron lavados exhaustivamente con agua, secados y la radioactividad se determinó en mezcla centelleadora de tolueno.

10.6. Ensayo de otras actividades enzimáticas

10.6.1. Actividad de peroxidasa

Se siguió la técnica descrita en el manual de Worthington (1972) midiendo el color desarrollado por la oxidación de la o-dianisidina luego de la descomposición enzimática del H_2O_2 .

10.6.2. Actividad de fosfatasa alcalina

Se utilizó la técnica del dosaje de p-nitrofenol liberado (lectura a 410 nm) a partir de p-nitrofenilfosfato (Worthington Enzyme Manual, 1972).

10.6.3. Actividad de glucosa oxidasa

Se siguió la técnica de Hugget y Nixon (1957), modificada por el acople del sistema peroxidasa - o-dianisidina.

10.6.4. Actividad de β -galactosidasa

Se siguió el método descrito en el manual de Worthington (1972) utilizando o-nitrofenil β -D-galactopiranosido (ONPG) como sustrato.

10.7. Dosaje de proteína

La proteína se dosó según el método de Bradford, 1976, utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

11. DETERMINACION Y CALCULO DE LOS PARAMETROS FISICOS E HIDRODINAMICOS

11.1 Radio de Stokes

A los efectos de estimar el radio de Stokes de los distintos tipos de fosfodiesterasa de M. rouxii se utilizaron los datos de elución de la columna de Sephadex G-100. Se usaron las siguientes proteínas marcadoras: β -Galactosidasa para determinar el volumen de exclusión (V_0), Glucosa oxidasa (4,2 nm), Peroxidasa (3 nm), Citocromo c (1,8 nm).

Los valores de los radios de Stokes buscados se obtuvieron por interpolación gráfica de acuerdo con el método de Laurent y Killander (1964), representando el $(-\log K_{av})^{1/2}$ en función del radio de Stokes correspondiente de las proteínas marcadoras. El K_{av} se define como la relación:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

donde V_e : volumen de elución de la proteína.

V_0 : volumen de exclusión de la columna.

V_t : volumen total de la resina.

11.2. Coeficiente de sedimentación (s)

Los valores de coeficientes de sedimentación se obtuvieron de los datos de sedimentación en gradientes de sacarosa, a partir de la relación lineal que se logra graficando la distancia recorrida por las proteínas

marcadoras desde la superficie del gradiente, en función de sus respectivos valores de s (Martin y Ames, 1961). Los coeficientes de sedimentación de los distintos tipos de PDE se obtuvieron por interpolación gráfica.

11.3. Peso molecular (M_r)

Se utilizó para el cálculo de los pesos moleculares el método descrito por Siegel y Monty, 1966, aplicando la fórmula:

$$M_r = \frac{6 \pi N \eta_{20,w}}{1 - \bar{V} \rho_{20,w}} \cdot a \cdot s_{20,w}$$

donde N : Número de Avogadro

$\eta_{20,w}$: Viscosidad del agua a 20 °C $1,1 \times 10^{-2} \frac{\text{g}}{\text{cm Seg}}$

a : radio de Stokes (nm)

$S_{20,w}$: coeficiente de sedimentación (10^{-13} seg)

\bar{V} : volumen específico parcial (se consideró $\bar{V} = 0,74 \text{ cm}^3/\text{g}$)

$\rho_{20,w}$: densidad del agua a 20 °C ($0,988 \text{ g/cm}^3$)

11.4. Coefficiente friccional (f/f_0)

Para determinar el coeficiente friccional se utilizaron los parámetros calculados de los radios de Stokes (a) y de los pesos moleculares (M_r); se aplicó la fórmula de Siegel y Monty, 1966:

$$\frac{f}{f_0} = \frac{a}{\frac{3 \bar{V} \rho M_r}{4 \pi N}}^{1/3}$$

11.5. Parámetros hidrodinámicos de las proteínas marcadoras

La siguiente tabla resume los valores de los parámetros utilizados correspondientes a las proteínas marcadoras.

PROTEINA	COEFICIENTE DE SEDIMENTACION (s)	RADIO DE STOKES (nm)	PESO MOLECULAR (K)
β -galactosidasa	15,9 ^a	6,8 ^a	520
Citocromo c	1,7 ^a	1,8 ^a	12,4
Peroxidasa	3,5 ^b	3,04 ^c	39,8 ^b
Fosfatasa alcalina	6,3 ^d	2,93 ^c	80 ^d
Glucosa oxidasa	8,3 ^e	4,18 ^c	152 ^e

a- Haga et al, 1977

b- Cecil y Ogston, 1948

c- Valores de radios de Stokes obtenidos a partir de la fórmula de Haga et al, 1977:

$$a = \frac{k T}{6 \pi \eta_{20,w} D_{20,w}}$$

donde los valores de coeficientes de difusión corregidos ($D_{20,w}$) fueron obtenidos de tablas (Cecil y Ogston, 1951; Garen y Levinthal, 1960).

k : Constante de Boltzman

$\eta_{20,w}$: viscosidad del agua a 20 °C

T : 293 °K

d- Cecil y Ogston, 1951

e- Garen y Levinthal, 1960

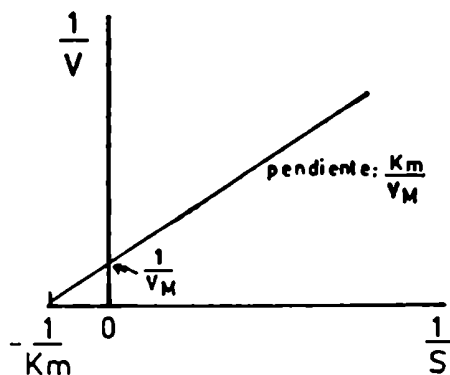
12. DETERMINACION DE LOS VALORES DE LOS PARAMETROS CINETICOS

A los efectos de la determinación de los valores de K_m y V_m , se utilizaron varias formas de tratamiento de los datos obtenidos en el estudio de las velocidades iniciales (v) en función de diferentes concentraciones de sustrato (S) según la ecuación de Michaelis:

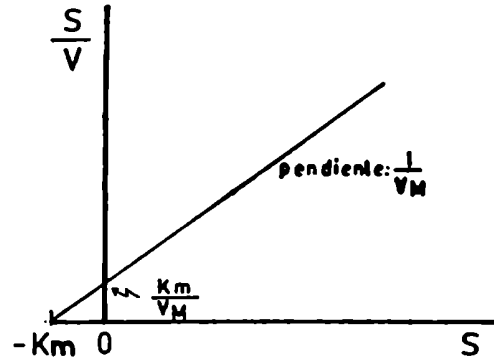
$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{S}}$$

Así, siguiendo a Dixon y Webb, 1958, se analizó cada conjunto de datos mediante las siguientes ecuaciones:

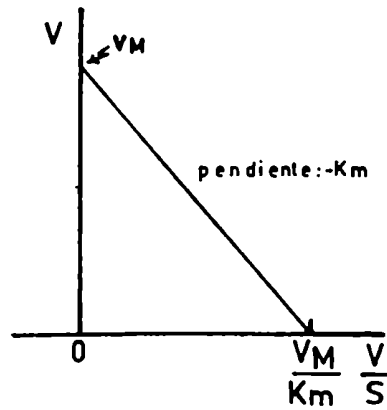
$$a- \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m}$$



$$b- \frac{s}{v} = \frac{K_m}{V_M} + \frac{1}{V_M} \cdot S$$



$$c- v = V_M - K_m \frac{v}{S}$$



13. OTRAS TECNICAS APLICADAS

13.1. Síntesis de ATP-[γ 32 P]

Se siguió la técnica de Glynn y Chappel, 1964, con las modificaciones introducidas por Chang et al, 1974.

13.2. Purificación del AMP cíclico [3 H]

Se procedió a la purificación del AMP cíclico [3 H] mediante el pasaje de la muestra a través de una pequeña columna de resina AG 50 W - X8 (100-200 mesh), en su forma H^+ . Luego de sembrada la muestra, se eluyó la columna con agua destilada, recogién dose el eluido en pequeñas fracciones en las cuales se dosó la radioactividad; se descartó el primer pico (5' AMP) y se juntaron las restantes fracciones con radioactividad (AMP cíclico), las que se llevaron a sequedad en un evaporador rotatorio a temperatura ambiente. Se resuspendió el residuo seco en etanol 50 % en un volumen igual al original y se guardó a -20 °C. Para constatar la pureza del nucleótido, se cromatógrafió una alícuota de la fracción purificada en capas delgadas de PEI - celulosa, utilizando $ClLi$ 1 M como solución de desarrollo.

14. MEDICION DE LA RADIOACTIVIDAD

Se realizó la medición de las muestras radioactivas en un contador de centelleo líquido utilizando solución centelleadora de tolueno. Para medir la radioactividad en soluciones acuosas (ensayo de PDE, contaje de

las rodajas de gel de poliacrilamida disueltas) se utilizó una mezcla de solución centelleadora de Arkopal - Tolueno (1:3 V/V).

Composición de la solución centelleadora:

0,1 g de dimetil POPOP 1,4 bis 2(4-metil-5fenil oxazolil benceno)

4 g de PPO 2,5-difeniloxazol

en 1 l de tolueno

15. REACTIVOS UTILIZADOS

AMP cíclico 2,8 [^3H]: Actividad específica 38 Ci/mmol. Radio Chemical Centre (Amersham).

^{32}P : En solución clorhídrica, utilizado en la síntesis de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ Comisión Nacional de Energía Atómica.

Reactivos provistos por Sigma Chemical Company:

Todas las proteínas y enzimas marcadoras. Veneno de serpiente (Ophiophagus hannah). Tripsina de páncreas bovino tipo III, inhibidor de tripsina de clara de huevo tipo III, Tripsina-acrilamida, Seroalbúmina bovina cristalina fracción V, Subunidad catalítica de quinasa de proteína de corazón bovino, histona tipo II - S de timo de ternera, antipaína, leupeptina, PMSF, TLCK, benzamidina, EGTA, EDTA, TCA, Pipes, 2-Mercaptoetanol, sulfato de amonio (grado III), sacarosa (grado I), PPO, dimetil POPOP, ATP, AMP cíclico, 5' AMP, adenosina, Reactivo azul 2-agarosa (1-4 μmoles de reactivo azul 2 por ml de gel), AMP cíclico-agarosa (AMP cíclico ligado por el C_8 a través de un brazo espaciador de 6 átomos de carbono) y DEAE-celulosa (microgranular).

El Arkopal fue donado por Química Hoechst.

Acrilamida, bisacrilamida y azul de coomassie fueron provistos por Merck o Fluka.

Temed fue de Eastman Kodak, o-dianisidina fue de BDH.

Las resinas AGI - X 2 (200-400 mesh) y AG 50 W - X 8 (100-200 mesh) fueron de Bio-Rad.

Sephadex G-25 (poro medio), Sephacryl S-300, Sephadex G-100 (de poro super fino) fueron provistos por Pharmacia Fine Chemicals (UPPSALA).

El papel de fosfoCelulosa fue Whatman.

El resto de los reactivos utilizados fue de grado analítico.

R E S U L T A D O S

1. VARIACIONES DE LA FORMA MOLECULAR DE LA PDE DE AMP cíclico SEGUN EL ESTADIO DEL CRECIMIENTO FILAMENTOSO

Los primeros estudios del mecanismo de regulación de la PDE de AMP cíclico de M. rouxii por fosforilación y por proteólisis habían establecido que ambos mecanismos producen un incremento de la actividad catalítica en forma alternativa, no aditiva y que dicho incremento es del orden de 1,5 a 3 veces respecto de la actividad basal (Galvagno et al, 1979; Moreno et al, 1982). Estos valores fueron variables entre las distintas preparaciones, e incluso el que algunas fueran insensibles a dicho mecanismo regulatorio, hizo pensar en la existencia de una población molecular heterogénea de la enzima. El problema consistió en establecer qué tipo de heterogeneidad era la responsable de las variaciones a la susceptibilidad regulatoria. Esto es, si existen dos tipos de moléculas, unas regulables y otras insensibles, que conducen a que la activación resultante sea en consecuencia un reflejo de la proporción de uno y otro tipo molecular, o bien si existe una población única de moléculas, todas las cuales responden de un mismo modo a la activación, pero que dicha población varía en los diferentes cultivos. Una tercera alternativa resulta de una combinación de ambas posibilidades.

Así, cuando se procesó una preparación enzimática, proveniente de un micelio de fase exponencial media, hasta la etapa de fraccionamiento por un sulfato de amonio (ver Materiales y Métodos) y se la sometió a cromatografía en DEAE-celulosa, se obtuvieron los resultados de la figura 1-a.

Fig. 1. Perfiles de elución de la actividad de fosfodiesterasa en cromatografía de DEAE-celulosa de extracto de micelios cosechados en diferentes estadios de crecimiento.

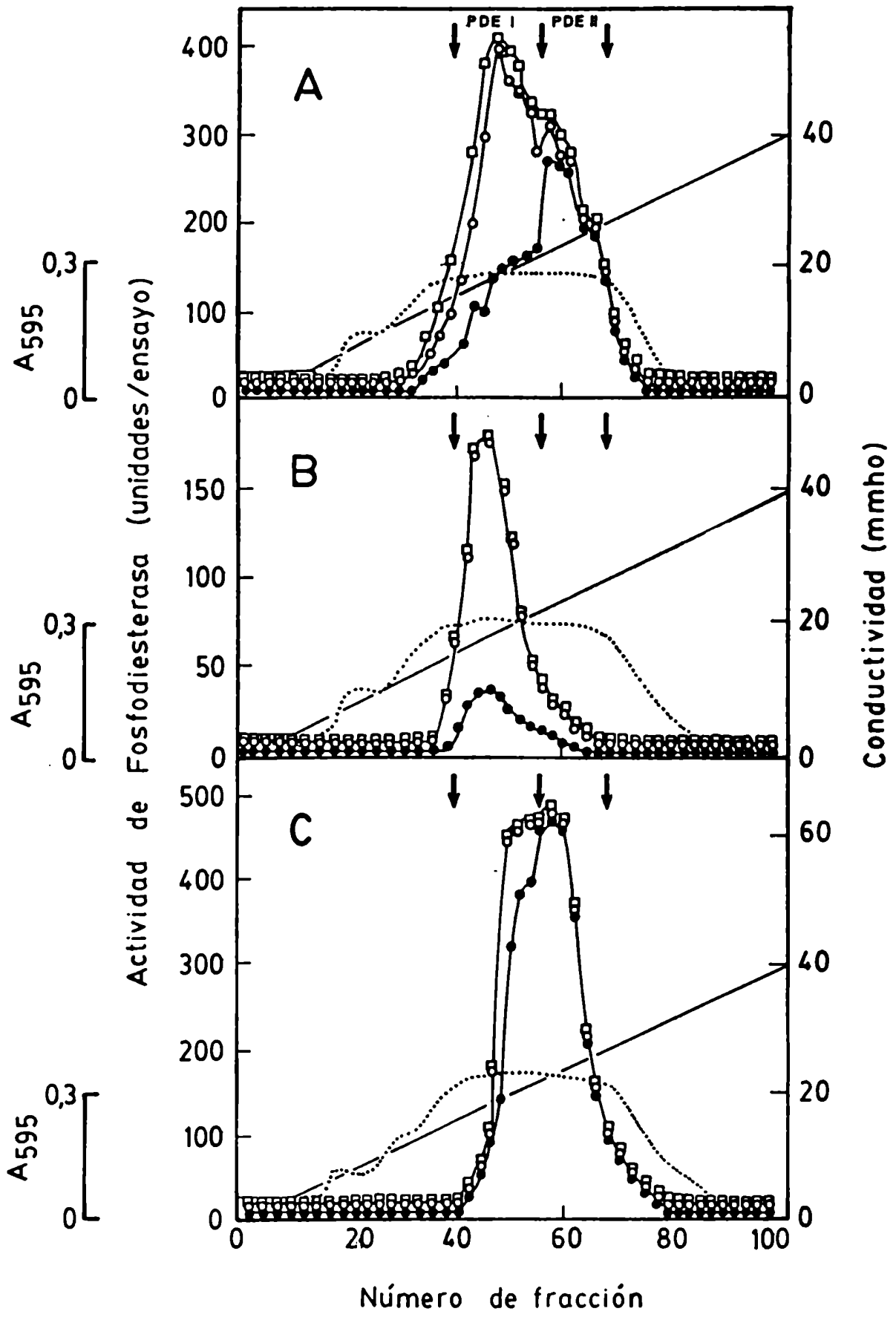
- A- fracción SA (175 mg) de un micelio cosechado en fase exponencial media.
- B- fracción SA (50 mg) de células en germinación incipiente.
- C- fracción SA (167 mg) de un micelio de fase estacionaria.

La cromatografía se desarrolló como se describe en Materiales y Métodos en una columna de 1,4 cm x 14,5 cm (A y C) y en una columna de 1 cm x 6 cm (B).

En alícuotas apropiadas se dosó: actividad de fosfodiesterasa basal (●), después de tripsinización (○), bajo condiciones fosforilantes (◻).

Proteína (A₅₃₅ ...)

Conductividad (—)



Como puede verse, la actividad de PDE eluyó como un ancho pico que abarcó un amplio rango de concentración salina. Cuando se comparó la actividad basal con la obtenida mediante el ensayo en condiciones fosforilantes o después de tratamiento con tripsina, se encontró, como puede observarse en la misma figura, que las fracciones eluidas a fuerza iónica más baja fueron muy activables, en tanto que las eluidas a mayor concentración salina fueron insensibles a los tratamientos de activación. De este modo se pudieron separar distintos tipos de PDE que difieren en el grado de respuesta a la activación (desde las muy activables hasta inclusive aquellas completamente insensibles), todos provenientes de un mismo cultivo. A los efectos de simplificar el lenguaje, de aquí en más se van a denominar PDE I al tipo activable y PDE II al tipo insensible, por supuesto sin querer significar con ello formas moleculares definidas.

En la figura 1-a puede verse también que los grados de activación obtenidos son valores que comprenden 4 a 6 veces, esto es, variables y mayores a los encontrados previamente (de 1,5 a 3 veces) en que se había trabajado con el conjunto de ambos tipos PDE I y PDE II (Galvagno et al, 1979; Moreno et al, 1982). De esta forma resultaría que el grado de activación en una preparación dada es, muy probablemente, la resultante de cada uno de los correspondientes de un conjunto de formas moleculares, cada uno aportando un distinto nivel de susceptibilidad a la activación por ambos mecanismos de fosforilación y proteólisis.

A los efectos de estudiar la composición de la población enzimática en distintas fases de crecimiento de micelio, se realizó el mismo tipo de análisis mediante cromatografía en DEAE-celulosa, de preparaciones enzi-

máticas provenientes de los siguientes estadios:

- a- Cultivo de células redondas con tubo germinal incipiente (fig 1-b).
- b- Cultivo de micelio de fase estacionaria en el que el crecimiento se ha interrumpido y ha comenzado la autólisis de las hifas más viejas (fig 1-c).

Como puede verse, en la cromatografía en DEAE-celulosa de las preparaciones de células en germinación incipiente, toda actividad de PDE es sensible en alto grado a la activación y eluye en el rango de fuerza iónica correspondiente al tipo PDE I; en el eluido a concentración salina mayor, no se detecta actividad de PDE. Por el contrario, las preparaciones obtenidas de micelio cosechado en fase estacionaria, dan un agudo perfil de actividad en cromatografía en DEAE-celulosa, casi insensible a la activación por fosforilación o por proteólisis y que eluye a una fuerza iónica correspondiente al tipo PDE II (fig 1-c). Estos resultados indicarían que las formas moleculares de PDE obtenidas varían según el estado de crecimiento del hongo, pasando de un tipo altamente activable en las células en germinación incipiente hasta un tipo completamente insensible en un micelio de fase estacionaria; estadios de crecimiento intermedio evidencian ambos tipos moleculares en proporciones variables entre las distintas preparaciones (resultados no mostrados).

Estos resultados sugieren la existencia de una forma molecular "nativa" activable por fosforilación o proteólisis que daría origen al tipo insensible muy probablemente por un mecanismo de proteólisis endógena. Esta idea se sustenta en el hecho de la susceptibilidad demostrada por la PDE de MUCOR a la activación por tripsinización controlada y en el hecho

de que esta transformación torna a la enzima insensible a la activación por fosforilación (ver más adelante). Además es bien conocido que la fase estacionaria en los hongos filamentosos está acompañada por autólisis con la consecuente liberación de enzimas catabólicas como, por ejemplo, diversas proteasas. Si se pensara en un proceso proteolítico gradual, se podría entonces entender el ancho perfil en cromatografía en DEAE-celulosa de una preparación proveniente de un micelio de fase exponencial media (fig 1-a); resultaría así una población heterogénea de moléculas de PDE producida por distintos grados de proteólisis ocurrida "in vivo" o durante las preparaciones enzimáticas, a pesar de la inclusión de inhibidores de proteasas en las soluciones preparativas (ver más adelante y Tabla I).

Con el objeto de estudiar si en las esporas de M. rouxii existe una PDE preformada y a qué tipo corresponde, se procedió a realizar una preparación enzimática proveniente de esporas y a analizarla por cromatografía en DEAE-celulosa. Efectivamente, se encontró una actividad de PDE de AMP cíclico activable por fosforilación y por proteólisis con un perfil cromatográfico (fig 2) muy parecido al obtenido a partir de una preparación de células en germinación incipiente (comparar con la fig 1 b); si bien se encontró exclusivamente el tipo activable, el grado de activabilidad resultó ser menor que el encontrado para las células germinales incipientes y, en general, para el tipo PDE I. Esto podría deberse a una acción proteolítica más pronunciada como consecuencia de utilizar un método de ruptura de las esporas más drástico y por ello quizás conducente a la liberación de proteasas por disrupción de estructuras subcelulares (ver Materiales y Métodos).

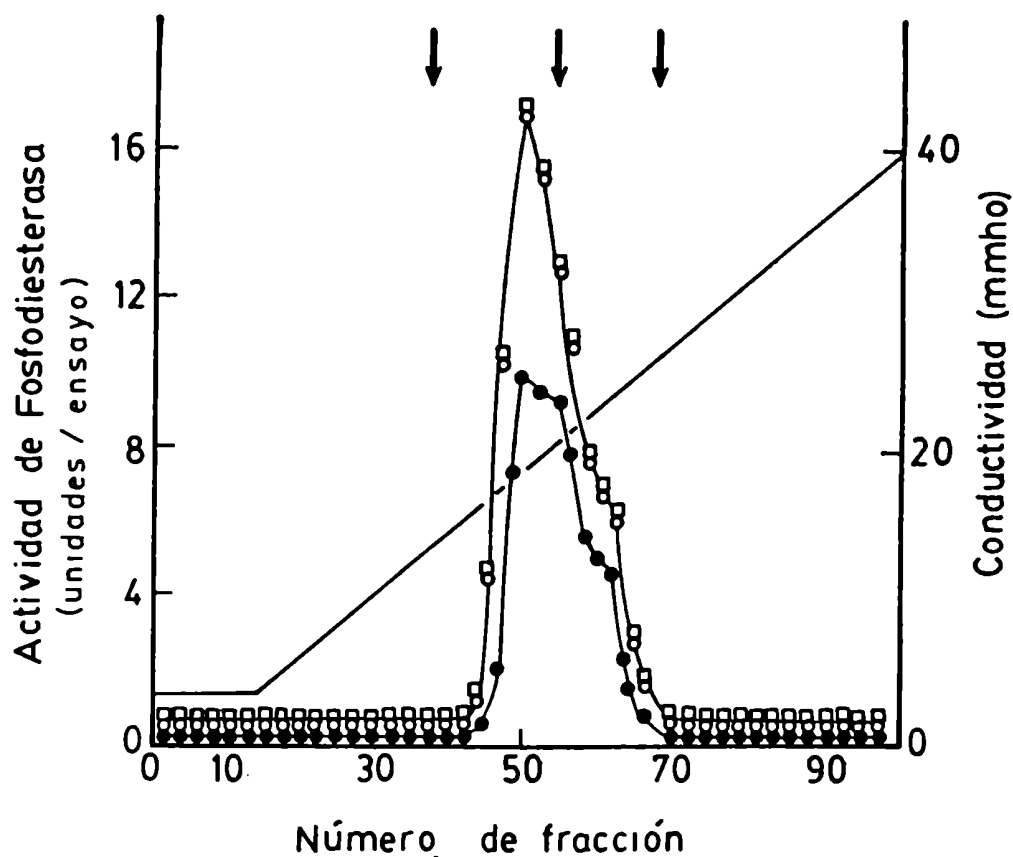


Fig. 2. Perfil de elución en cromatografía de DEAE-celulosa de la actividad de fosfodiesterasa proveniente de esporas.

La fracción SA de una preparación proveniente de esporas (5 mg) fue cromatografiada en una columna de 0,8 cm x 3 cm. En alícuotas apropiadas se dosó actividad de fosfodiesterasa basal (●), activada por tripsinización (○) o bajo condiciones fosforilantes (□). Se midió conductividad (—) a través de todo el gradiente.

Las flechas ubican la posición de elución de las fracciones PDE I y PDE II (ver fig. 1.).

2. ACTIVIDADES PROTEOLITICAS Y ACTIVACION DE LA PDE DE M. rouxii

La activación de las enzimas por proteólisis controlada es un hecho ampliamente conocido, en particular para varias fosfodiesterasas de distintos orígenes y localización tisular (Epstein et al, 1978; Tucker et al, 1981; Strewler et al, 1978; Miki et al, 1975), en cuyos sistemas se han encontrado actividades proteolíticas endógenas responsables de modificaciones estructurales.

Ante las evidencias de la existencia de actividades proteolíticas en nuestro propio sistema y los antecedentes registrados en la literatura, se estudió la relación entre la activabilidad de la molécula fosfodiesterásica de MUCOR, la aparición de las múltiples formas y las actividades proteolíticas endógenas. Todas las preparaciones enzimáticas se habían realizado en presencia de benzamidina y EGTA por su acción inhibidora de proteasas. Para estudiar la acción proteolítica endógena, se eliminaron de una muestra de la fracción PDE I altamente activable los inhibidores de proteasas presentes en las soluciones preparativas. Para ello, la muestra fue filtrada rápidamente por una columna de Sephadex G-25 equilibrada con una solución conteniendo Tris-ClH 10 mM pH 7,4, 2-mercaptoetanol 2 mM, EDTA 1,5 mM (Solución L). Inmediatamente después de la filtración en una alícuota se dosaron las actividades basal y activada, valores estos que se consideraron "control" (ver Tabla I), en tanto que la muestra restante fue dividida en diversas fracciones y mantenida a 4 °C durante 24 hs. Cada fracción contenía por separado cada uno de los inhibidores de proteasas indicados en la Tabla I o ninguno. Después del período de 24 hs, se ensayaron nuevamente las actividades basal y activada en cada una de

Tabla I. Activación por tripsina de la actividad de fosfodiesterasa después de su mantenimiento en presencia de inhibidores de proteasas

500 unidades de la fracción PDE I se filtraron rápidamente a través de una columna de Sephadex G-25 (ver texto). En una alícuota de 2 μ l del eluido, se dosó inmediatamente la actividad de fosfodiesterasa basal y activada por tripsina, obteniéndose los valores de 3,0 y 10,1 unidades respectivamente (valor "control"). El eluido restante fue dividido en muestras de 20 μ l cada una y mantenido a 4 °C durante 24 hs con los agregados indicados. Después de este período, se ensayó actividad de fosfodiesterasa basal y activada por tripsina en alícuotas de 2 μ l de cada una de las muestras (ver Materiales y Métodos). Bajo estas condiciones, los inhibidores de proteasas quedan diluidos 40 veces durante la preincubación con tripsina. Todos los ensayos fueron hechos por triplicado.

<u>Agregados</u>	<u>Actividad de Fosfodiesterasa</u> (unidades)		<u>Activación (%)</u>
	<u>Basal</u>	<u>+ Tripsina</u>	
Ninguno	8,7	10,4	119
TLCK (0,1 mM)	5,3	10,7	201
PMSF (0,4 mM)	4,5	10,5	471
Benzamidina (20 mM)	1,9	9,6	505
EGTA (5 mM)	2,1	10,4	495
Antipaína (3 μ g/ml)	2,0	10,1	505
Leupeptina (20 μ g/ml)	1,8	9,8	544

las fracciones. Como puede verse (Tabla I), la actividad basal de la enzima mantenida en ausencia de inhibidores se elevó a casi el valor de la actividad control activada (resultó activable solamente 1,2 veces). En algunas preparaciones, la actividad basal alcanzó el valor exacto de la activada, reduciendo las veces de activación al valor límite de 1 después de 24 hs a 4 °C (resultados que no se muestran). Sin embargo, las fracciones conteniendo inhibidores tales como EGTA, antipaína, leupeptina y benzamidina, mantuvieron los valores de actividad basal y las veces de activación en el orden de los correspondientes al control. Como puede verse, la pérdida de las veces de activación ocurre a expensas de un aumento de la actividad basal hasta el valor activado alcanzado en condiciones fosforilantes o de tripsinización controlada. La inclusión de ciertos inhibidores de proteasas evitó este proceso de aumento de la actividad basal (algunos inhibidores tales como TLCK y PMSF sólo resultaron parcialmente eficientes a las concentraciones utilizadas) lo que está evidenciando una vez más la participación de proteólisis endógena en la pérdida de la susceptibilidad regulatoria de la PDE de M. rouxii.

Con la hipótesis de que la actividad proteolítica es la responsable de la heterogeneidad de las formas moleculares de la PDE de MUCOR, se intentó convertir al tipo PDE I en el PDE II por proteólisis endógena. La figura 3 muestra que la PDE I mantenida en ausencia de inhibidores de proteasas durante 24 hs a 4 °C y habiendo aumentado su actividad basal unas cinco veces, exhibe un perfil cromatográfico en DEAE-celulosa similar al correspondiente al tipo PDE II (sólo se ve una muy pequeña porción que eluye a la fuerza iónica correspondiente a la de la PDE I, probablemente consecuencia de proteólisis incompleta). En forma similar, se ha podido

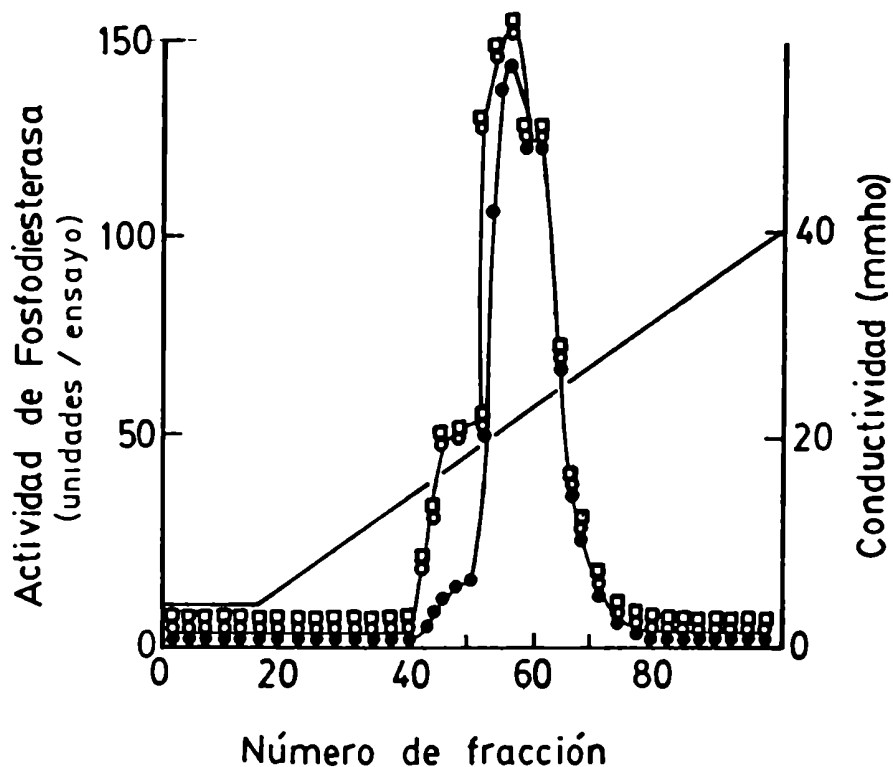


Fig. 3. Perfil de elución de la actividad fosfodiesterásica en cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción PDE I sometida a proteólisis endógena.

La fracción PDE I (4 mg) obtenida de una columna de DEAE-celulosa (ver fig 1 A) fue dializada durante 24 hs a 4 °C contra solución L y luego cromatografiada en una columna de 0,8 cm x 3 cm. Alícuotas apropiadas de cada fracción fueron dosadas para actividad de fosfodiesterasa basal (●), activada por tripsina (○) y bajo condiciones fosforilantes (◻). Conductividad (—).

transformar el comportamiento en cromatografía en DEAE-celulosa del tipo PDE I en el de la PDE II por tripsinización controlada de aquella (se han obtenido perfiles idénticos al mostrado en la figura 3).

De esta forma, se ha podido demostrar que la proteólisis es, al menos, uno de los mecanismos responsables del polimorfismo de la PDE de AHP cíclico de MUCOR, coincidiendo estos resultados con otros sistemas informados en la literatura, como por ejemplo, el de mioblastos de rata (Narindrasorasak et al, 1982).

Si en Mucor el proceso generador de la heterogeneidad de formas moleculares fuera la proteólisis endógena, entonces podrían encontrarse diferencias en el tamaño molecular de los tipos PDE I y PDE II. Sometidos estos dos tipos a centrifugación en gradientes lineales de sacarosa, se encontró que la forma activable sedimenta con un coeficiente de sedimentación aparente de 4,1 a 4,5 S (figura 4 a); un valor dentro de este rango fue obtenido para la enzima proveniente de células en germinación incipiente (resultados no mostrados). La forma PDE II sedimentó con un valor de 3,1 a 3,5 S (figura 4 b), coincidiendo con el perfil de la enzima proveniente de un micelio de fase estacionaria y con la PDE I transformada por proteólisis endógena o por tripsinización controlada (resultados no mostrados). Estos hechos son congruentes con la idea de que la acción proteolítica es generadora de las múltiples formas de la enzima.

3. PURIFICACION PARCIAL DE LA FORMA ACTIVABLE DE PDE

El estudio acerca de la participación de la proteólisis en la aparición de múltiples formas enzimáticas, en la pérdida de la susceptibilidad

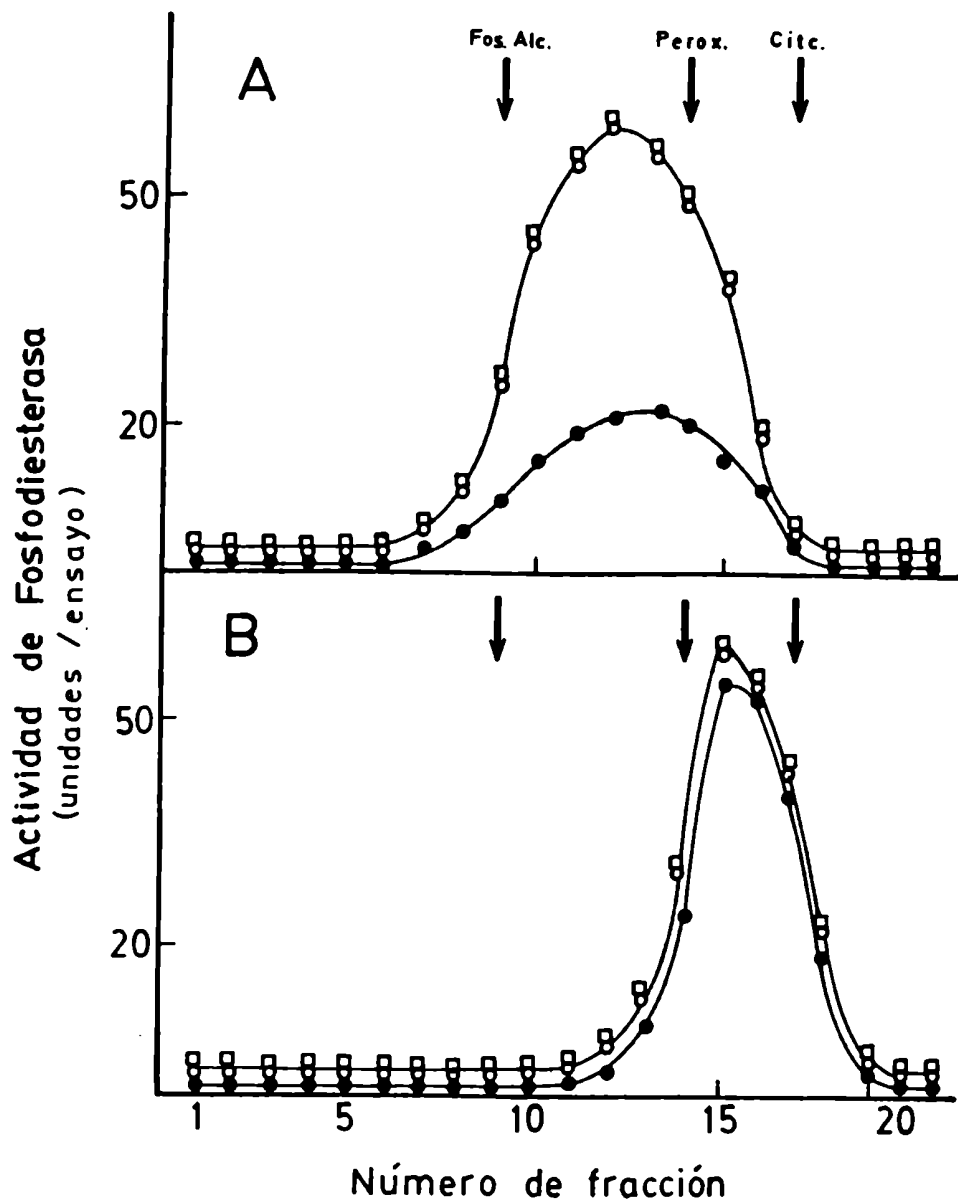


Fig. 4. Perfiles de Sedimentación de las fracciones PDE I y PDE II obtenidas por cromatografía en DEAE-celulosa.

A- Fracción PDE I (15 mg; 3900 unidades)

B- Fracción PDE II (23 mg; 3800 unidades)

La centrifugación se realizó como se describe en Materiales y Métodos. En alícuotas de cada fracción se dosó actividad de fosfodiesterasa basal (●), activada por tripsina (○) y bajo condiciones fosforilantes (◻).

regulatoria y en las variaciones con el estadio de crecimiento del micelio, no aclara la función que in vivo tendría la proteólisis como mecanismo regulatorio. Hasta el momento no se ha podido dilucidar a través de estas aproximaciones experimentales si la acción proteolítica que activa irreversiblemente a la enzima ocurre en el organismo como un mecanismo de regulación específico, o bien si se produce durante las preparaciones enzimáticas, como consecuencia de la liberación generalizada de enzimas degradativas (las cuales varían con el estado de crecimiento del hongo) en el proceso de ruptura del material biológico.

Sea como fuere, resulta imprescindible, a los efectos de purificar la enzima en su forma activable para estudiar los mecanismos moleculares de su forma de regulación, la minimización de los efectos de la proteólisis endógena en las preparaciones.

Consecuentemente con este planteo, se modificó el medio de cultivo del hongo reemplazando la peptona del mismo (ver Moreno et al, 1982) por un hidrolizado ácido de caseína con el fin de minimizar la inducción de proteasas. Así mismo, se intentó un método de ruptura del micelio lo menos drástico posible (ver Materiales y Métodos), de manera de no provocar la destrucción de lisosomas y vesículas con la consiguiente liberación de actividades proteolíticas.

Por otra parte, se incorporaron habitualmente a las soluciones preparativas y a lo largo de todos los pasos de purificación, inhibidores de proteasas tales como el EGTA y la antipaína. Con estos nuevos procedimientos se intentó purificar parcialmente la enzima activable a través de los pasos detallados en la Tabla II. La fracción soluble del micelio co-

sechado en fase exponencial media, sometido a un corte con sulfato de amonio, constituyó la muestra que se cromatografió en DEAE-celulosa para obtener la porción activable (PDE I) de un perfil similar al mostrado en la figura 1 a (ver Materiales y Métodos). Posteriormente se sometió a la fracción PDE I a cromatografía en Sephacryl S-300 (figura 5 a) primero y luego a Sephadex G-100 (figura 6 a). Como puede verse, en ambas filtraciones moleculares, la actividad de PDE presenta un perfil de elución relativamente agudo, activable en toda su extensión. Al cabo del último paso, Sephadex G-100, se pudo obtener una purificación de unas 500 veces respecto de la fracción S-100 (Tabla II). Se realizaron los cálculos de purificación en función de las actividades activadas por cuanto los niveles basales aumentan con el transcurso del tiempo a causa de la proteólisis endógena. En efecto, a pesar de las modificaciones introducidas en las preparaciones y de la inclusión de inhibidores de proteasas en las soluciones preparativas, el proceso proteolítico no se detiene completamente. Esta dramática pérdida de la capacidad de activación con el envejecimiento de la preparación resulta un factor muy difícil de salvar en los intentos de purificación de la enzima y es coincidente con antecedentes expuestos en la literatura, para otros sistemas enzimáticos (Tucker et al, 1981).

Estas dificultades hicieron imposible avanzar en la purificación de la forma activable más allá de los niveles logrados. Sin embargo resulta muy importante destacar que las nuevas condiciones de crecimiento del micelio y la ruptura suave para la preparación de los extractos enzimáticos resultaron muy ventajosas. Así, cuando los medios de cultivo contienen

Tabla II. Purificación de la forma activable de la fosfodiesterasa de AMP cíclico.

Preparación a partir de 100 g de micelio (peso húmedo). Todos los detalles de preparación se detallan en Materiales y Métodos.

<u>Fracción</u>	<u>Proteína</u> (mg)	<u>Volumen</u> (ml)	<u>Actividad total</u> (unidades)	<u>Actividad específica</u> (unidades/mg)	<u>Rendimiento</u> (%)	<u>Purificación</u> (veces)
S-100	3500	200	38.500	11	100	1
SA	945	95	35.000	37	91	3,4
DEAE-celulosa	66	6,5	17.300	262	45	23,7
SEPHACRYL S-300	16	1,5	10.000	625	26	55,3
SEPHADEX G-100	1,1	0,25	6.100	5.545	16	493

Fig. 5. Cromatografía en Sephacryl S-300. Perfil de elución de la actividad de fosfodiesterasa.

- A- Fracción PDE I obtenida a partir de un extracto de un micelio crecido en un medio conteniendo casaminoácidos y sometido a condiciones suaves de ruptura (ver Materiales y Métodos).
- B- Fracción PDE I obtenida de un extracto de un micelio crecido en un medio conteniendo peptona y sometido a condiciones drásticas de ruptura.

La cromatografía se realizó sembrando 70 mg de proteína (alrededor de 18.000 unidades) en cada uno de los casos, en una columna de 2,1 cm x 88 cm y se desarrolló según se detalla en Materiales y Métodos. En alícuotas de cada fracción se dosó actividad de fosfodiesterasa basal (●), activada por tripsina (○) y bajo condiciones fosforilantes (◻), y proteína (...).

V_0 : Volumen de exclusión

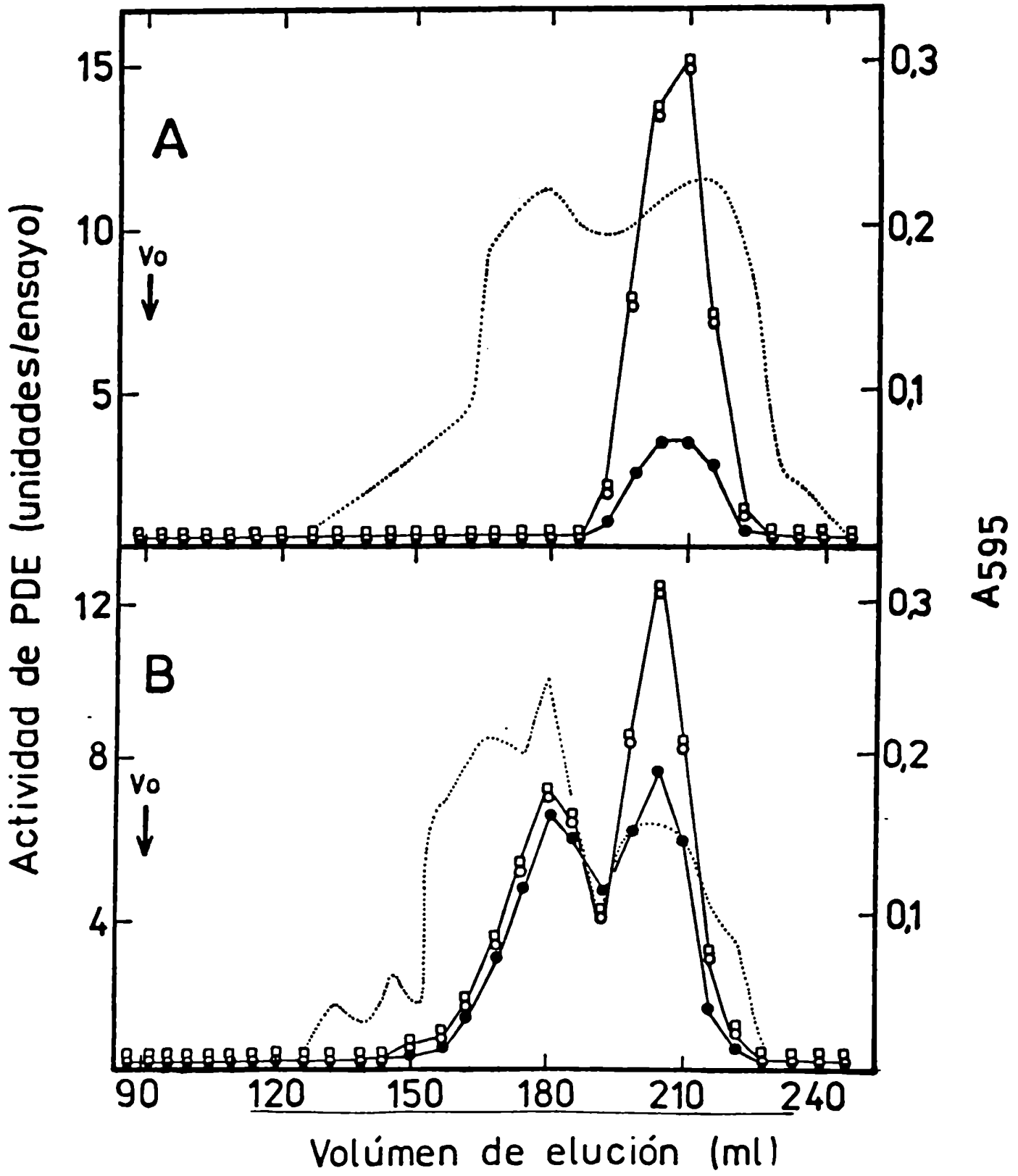


Fig. 6. Cromatografía en Sephadex G-100. Perfil de elución de la actividad de fosfodiesterasa.

- A- Fracción S-300 correspondiente al extracto de un micelio crecido en un medio conteniendo casaminoácidos y sometido al método suave de ruptura.
- B-Fracción S-300 correspondiente al extracto de un micelio crecido en un medio conteniendo peptona y sometido a condiciones drásticas de ruptura.
- C- Representación gráfica de la relación entre los valores del $(-\log K_{AV})^{1/2}$ de cada una de las proteínas marcadoras y sus correspondientes valores de radios de Stokes.

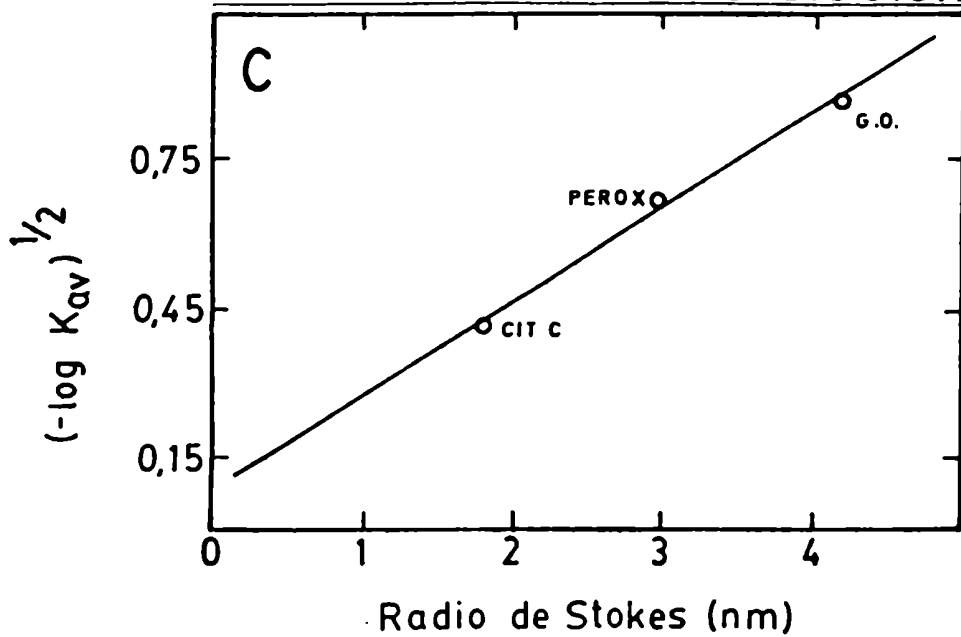
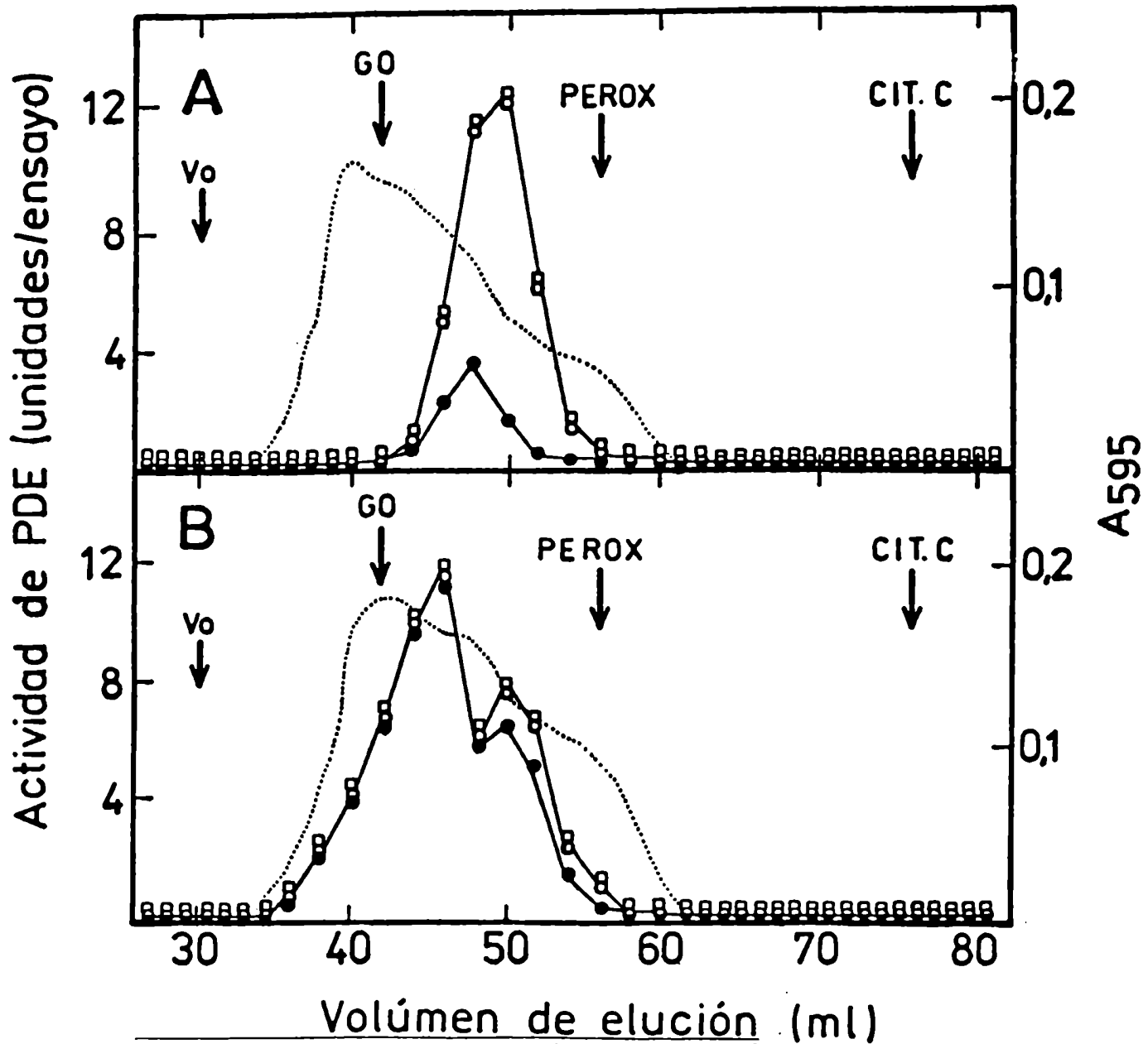
Se sembraron 16 mg de proteína (alrededor de 10.000 unidades) en cada caso y se desarrolló la cromatografía en una columna de 1,5 x 57 cm según lo descrito en Materiales y Métodos. En alícuotas de cada fracción se dosó actividad de fosfodiesterasa basal (●), activada por tripsina (○) y bajo condiciones fosforilantes (◻) y proteína (...)

V_0 : Volumen de exclusión

Cit c: Citocromo c

Perox: Peroxidasa

G.O.: glucosa oxidasa



peptona y la ruptura del material biológico se hace en un homogenizador Omnimixer con perlas de vidrio, la acción proteolítica se expresa mucho más aceleradamente. Bajo estas condiciones, si bien se ha podido obtener luego de cromatografía en DEAE-celulosa el perfil ya mostrado resolviendo las fracciones PDE I y PDE II, las cromatografías sucesivas de la fracción PDE I por Sephacryl S-300 (figura 5 b) y por Sephadex G-100 (figura 6 b) muestran perfiles relativamente anchos, desdoblados y con pérdida de la capacidad de activabilidad, comparado con los correspondientes provenientes de la preparación de un micelio crecido y procesado bajo las nuevas condiciones descritas (fig 5 a y 6 a). Estos resultados evidencian una acción proteolítica más persistente en estos casos, a pesar de la inclusión de inhibidores de proteasas en las soluciones preparativas.

Ulteriores pasos de purificación conducen a una pérdida total de la susceptibilidad regulatoria a la fosforilación o a la proteólisis controlada.

Como se ha señalado, el tiempo de envejecimiento de las preparaciones resulta un parámetro crítico en el intento de purificación de la forma activable de PDE. Con el objeto de obtener un grado de purificación mayor en el menor número de pasos posibles, se intentaron cromatografías de afinidad que habían sido utilizadas exitosamente en la purificación de fosfodiesterasas de otros organismos (Morril et al, 1979; Helfman et al, 1981; Sharma y Johri, 1982). El intento de utilizar una columna de AMP cíclico-agarosa resultó infructuoso pues la actividad de PDE de MUCOR no es retenida por dicha resina, como así tampoco la mayor parte de la proteína de la preparación. Un ejemplo de un perfil de cromatografía en esta

columna puede verse en la figura 7.

También se ensayó la cromatografía en Azul 2 - agarosa. Si bien la forma insensible de la enzima (fracción PDE II) es retenida por la resina y el eluible utilizando soluciones de alta fuerza iónica conteniendo AMP cíclico o bien mediante soluciones de alto pH (alrededor de pH 8), el tipo activable PDE I no se retiene en la columna y además el procesamiento de la cromatografía conduce a una gran pérdida de la actividad enzimática. Un perfil de cromatografía en Azul 2 - agarosa de la fracción PDE I puede verse en la figura 8. El que la forma activable no sea retenida en tanto que la insensible sí, podría deberse a una afinidad diferencial de ambos tipos enzimáticos por el ligando de la resina. Estos resultados son similares a los descritos para la PDE de cerebro, estimulable por calmodulina, cuyo comportamiento en columnas de Azul dextrano - agarosa depende del grado de proteólisis sufrido (Tucker et al, 1981).

Antecedentes de estos resultados fueron presentados previamente (Galvagno, 1982); la cromatografía en Azul 2 - agarosa conducía a una pérdida de la capacidad de activación de la PDE de MUCOR. Los estudios realizados por Galvagno se llevaron a cabo con el conjunto de la preparación enzimática, sin separar los tipos activable e insensible y sin una minimización eficiente de la proteólisis endógena por el uso de inhibidores adecuados; del conjunto de la enzima cromatografiada, solamente una porción era retenida y recuperada ésta por elución, resultaba entonces insensible. Se hace evidente ahora, a la luz de los actuales resultados, que en dicha operación ocurría una separación de ambos tipos enzimáticos.

Podemos entonces concluir que los intentos de acortar los tiempos de

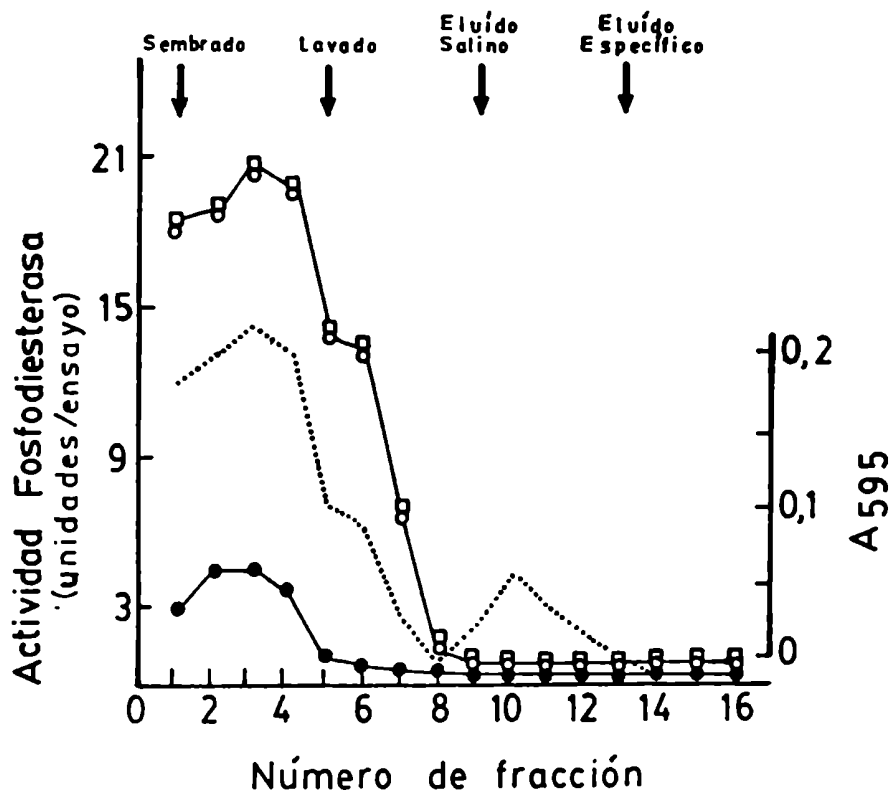


Fig. 7. Cromatografía en columna de AMP cíclico - agarosa

Se sembraron 4 ml de la fracción PDE I (1 mg de proteína/ml; 1.000 unidades) resuspendida en Solución D, en una columna de 1 ml de AMP cíclico - agarosa equilibrada con Solución D. La cromatografía se desarrolló como se describe en Materiales y Métodos. En cada fracción se dosó actividad de fosfodiesterasa basal (●), activada por tripsina (○) y bajo condiciones fosforilantes (◻) y proteínas (...).

Fractions 1-4: Percolado del sembrado; 5-8: Lavado con Solución D

9-12: Eluido con ClNa 1 M en Solución S (Eluido salino)

13-16: Eluido con ClNa 1 M, AMP cíclico 1 mM en Solución D (Eluido específico)

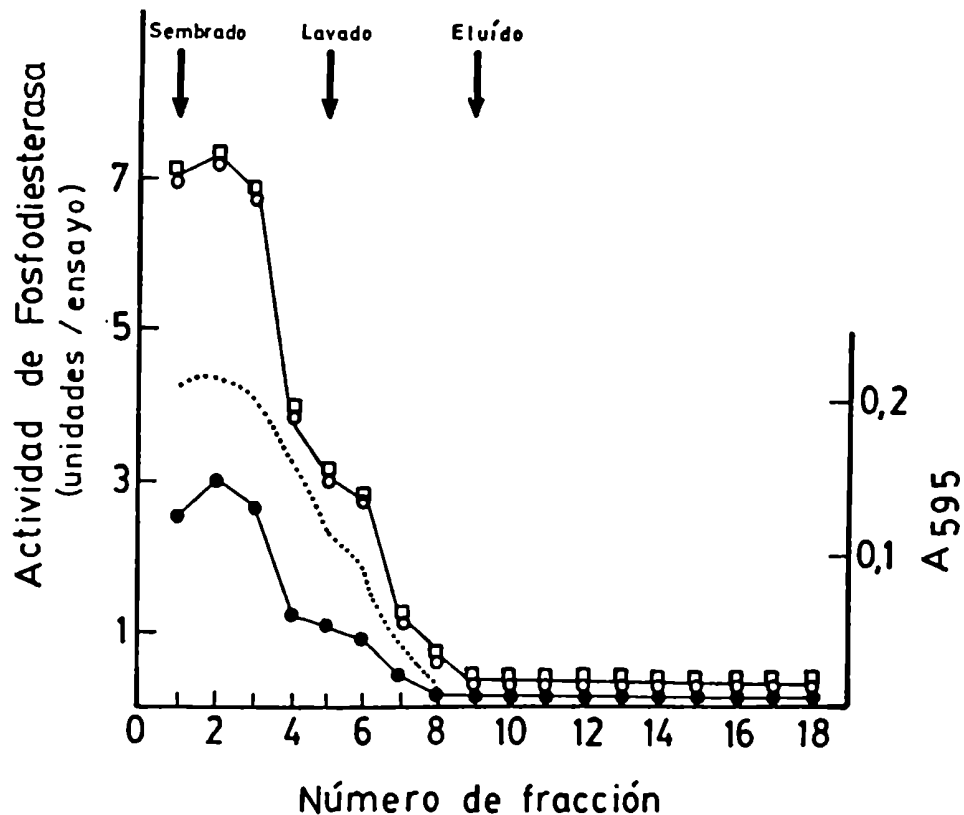


Fig. 8. Cromatografía en columna de Azul 2-agarosa

Se cromatografiaron 4 ml de la fracción PDE I (1 mg de proteína/ml; 1.000 unidades) en una columna de 1 ml de Azul 2-agarosa equilibrada con Solución D. La cromatografía se desarrolló como se indica en Materiales y Métodos mediante la elución por fuerza iónica y AMP cíclico. En cada fracción se dosó actividad de fosfodiesterasa basal (●), activada por tripsina (○) y bajo condiciones fosforilantes (□) y proteína (...).

Fracciones 1-4: Percolado del sembrado; 5-8: Lavado con Solución D

9-18: Elución con ClNa 0,1 M, AMP cíclico 10 mM en Solución D

envejecimiento en el proceso de purificación resultaron, hasta el momento, infructuosos.

4. ESTUDIO DE LOS PARAMETROS FISICOS

Se ha intentado avanzar en la caracterización de las múltiples formas de PDE de M. rouxii a través de una aproximación a los parámetros físicos y cinéticos.

Como ha sido evidenciado, la proteólisis endógena es un proceso gradual, que se expresa en la aparición de una población molecular heterogénea. Esto puede apreciarse inmediatamente a partir del amplio rango de concentración salina que cada tipo abarca en la cromatografía en DEAE-celulosa (ver figura 1). Esta heterogeneidad se hace también evidente en los demás estudios de caracterización física. Así, la amplitud de los perfiles de filtración molecular (fig 5 y 6) son variables entre las distintas preparaciones y en aquellas en donde aparecen picos desdoblados, la proporción entre los mismos es distinta en cada preparación (resultados no mostrados). Por supuesto, también son variables los valores de coeficientes de sedimentación para cada una de las preparaciones enzimáticas obtenidas del paso de Sephadex G-100. De allí que los parámetros físicos obtenidos presenten un rango de valores, como puede verse en la Tabla III. Esta multiplicidad de formas moleculares se hace también evidente del patrón de proteínas con actividad enzimática obtenido por electroforesis en gel de poliacrilamida (ver figura 10 a y a').

A juzgar por los valores de radios de Stokes obtenidos, la proteólisis

conduciría a un cambio conformacional de la molécula enzimática que va expresando una asimetría creciente desde la forma activable a la insensible (Tabla III).

Con el objeto de estudiar desde el punto de vista cinético el mecanismo que conduce a la activación por fosforilación y por proteólisis, se determinaron los valores de K_m y V_m para las actividades basal, activada por fosforilación y activada por proteólisis, del tipo PDE I, así como las determinaciones cinéticas para el tipo insensible (PDE II; Tabla III). Como puede verse, la activación de la PDE I conduce a un incremento de los valores de V_m de hasta 15 veces respecto del correspondiente para la actividad basal; los valores de K_m no sufren una modificación significativa, como tampoco respecto de los valores correspondientes de K_m del tipo insensible PDE II (Tabla III). También aquí los valores difieren de preparación en preparación, indicando una heterogeneidad de especies moleculares. Los valores de activación que se han logrado en estos ensayos son mucho mayores que los informados anteriormente (Galvagno et al, 1979; Moreno et al, 1982), lo que pone de manifiesto el éxito alcanzado en la preparación y conservación del tipo activable lo más "nativo" posible.

Los valores logrados evidencian además que la activación de la enzima por cualquiera de los dos mecanismos, fosforilación o proteólisis, no provoca un cambio de afinidad de la enzima por el sustrato, sino solamente un aumento en la velocidad de reacción. El que la forma insensible tampoco difiera en la afinidad enzima-sustrato respecto de la forma activable, basal y activada por tripsina, apoya la idea de la proteólisis endógena como responsable de la formación del tipo no activable.

Tabla III. Parámetros físicos y cinéticos de los tipos activable e insensible de la fosfodiesterasa de AMP cíclico.

	<u>Activable</u>			<u>Insensible</u>
Radio de Stokes (nm)	3,45 - 3,55			3,65 - 3,75
Coefficiente de Sedimentación (s)	4,5 - 4,1			3,5 - 3,1
Peso Molecular (K)	72 - 67			59 - 54
Coefficiente friccional	1,25 - 1,32			1,42 - 1,5
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	
K _m (μM)	0,8 - 1,1	0,5 - 1,3	0,5 - 1,2	1,2 - 1,6
V _M (unid/mg)	16 - 20	250 - 310	270 - 320	

Todos los cálculos de los parámetros se hicieron según se describe en Materiales y Métodos. Los cálculos de los pesos moleculares se realizaron utilizando los datos individuales de radios de Stokes y de coeficientes de sedimentación correspondientes a una misma preparación.

A: Actividad basal

B: Actividad activada por fosforilación

C: Actividad activada por proteólisis

5. MECANISMO DE REGULACION POR FOSFORILACION Y PROTEOLISIS

La activación por fosforilación dependiente de AMP cíclico de la PDE de M. rouxii fue puesta en evidencia con preparaciones de la enzima libres de quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico endógena y por los requerimientos de condiciones fosforilantes (Moreno et al, 1982).

Un resultado muy importante se obtuvo al lograr activación de la PDE por subunidad catalítica de quinasa de proteína heteróloga. Este hallazgo demuestra firmemente que la fosforilación dependiente de AMP cíclico está involucrada en el proceso de activación de la actividad fosfodiesterásica de MUCOR; además constituye una herramienta muy útil para el estudio de dicho mecanismo regulatorio, por cuanto la actividad fosforilante de la subunidad catalítica no requiere AMP cíclico. Todas las activaciones por fosforilación descritas en este trabajo se han realizado utilizando subunidad catalítica de quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico de corazón bovino.

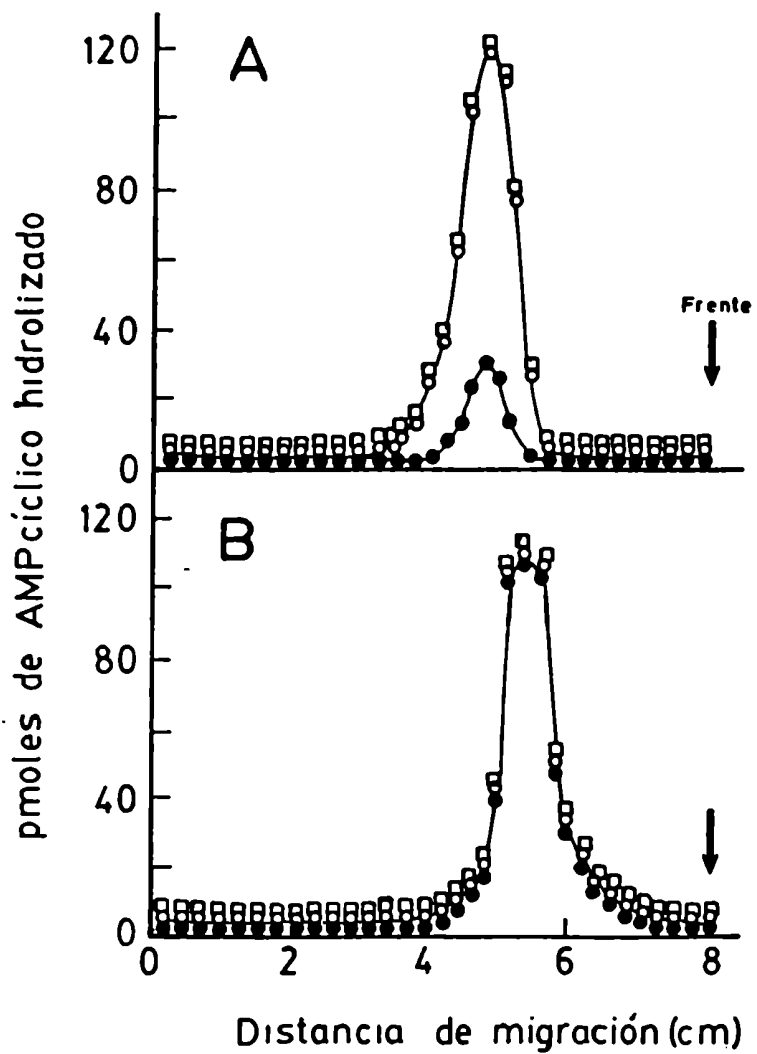
Se estudió la fosforilación de la molécula enzimática desde diversos puntos de vista. En la figura 9 pueden verse los perfiles de actividad basal de PDE y activada por fosforilación y proteólisis, de las fracciones PDE I y PDE II luego de someterlas a electroforesis en gel en condiciones no desnaturalizantes. Como puede verse en la figura 9 a., después de electroforesis el tipo PDE I permaneció muy activable por fosforilación o proteólisis controlada. Por el contrario, el tipo PDE II (figura 9 b.) se mostró absolutamente insensible a los tratamientos activantes. Estos resultados constituyen una prueba muy importante en favor de que el mecanismo de activación involucra directamente a la molécula de fosfodies-

Fig. 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones PDE I y PDE II.

A- Fracción PDE I (6 mg; 1.500 unidades)

B- Fracción PDE II (9 mg; 1.500 unidades)

El desarrollo de la electroforesis y el procesado de los geles se realizó como se describe en Materiales y Métodos. En cuartos de rodaja de gel se ensayó actividad de fosfodiesterasa basal (●), activada por tripsina (○) y bajo condiciones fosforilantes (□).



terasa. Los valores de Rf que se han obtenido en estos experimentos, realizados con diversas preparaciones, varían de unos a otros indicando una vez más la heterogeneidad de las formas moleculares. Se obtuvieron valores de Rf en el rango de 0,59-0,62.

A los efectos de demostrar fehacientemente la fosforilación de la molécula enzimática, se realizaron incubaciones en condiciones fosforilantes con subunidad catalítica y ATP- $\{\gamma^{32}\text{P}\}$ de la preparación de PDE activable proveniente del paso de Sephadex G-100 la cual está libre de quinasas de proteína endógena, de la que se separa en el paso de filtración por Sephacryl S-300 (resultados no mostrados). Luego de la incubación se sometió a la preparación a electroforesis en gel en condiciones no desnaturizantes y se dosó actividad de PDE e incorporación de ^{32}P a lo largo del gel (figura 10 a.). Como puede verse, la actividad de PDE aparece repartida en un pico principal y uno menor acompañante, mostrando ambos incorporación de fósforo radioactivo. Además, se ven dos bandas de proteína con incorporación de marca radioactiva (figura 10 a' y a''), cuyos valores de relación de frente (Rf) son coincidentes con los de actividad de PDE. Es decir que aparecen dos bandas proteicas con actividad fosfodiesterásica e incorporación de fosfato radioactivo en las mismas.

Preparaciones un poco más envejecidas presentan tres bandas de actividad e incorporación de marca radioactiva (resultados no mostrados). Estos resultados evidencian una vez más la multiplicidad de formas moleculares de PDE de M. rouxii.

Con el objeto de estudiar la interrelación molecular de los mecanismos de activación por fosforilación y por proteólisis, se estudiaron en

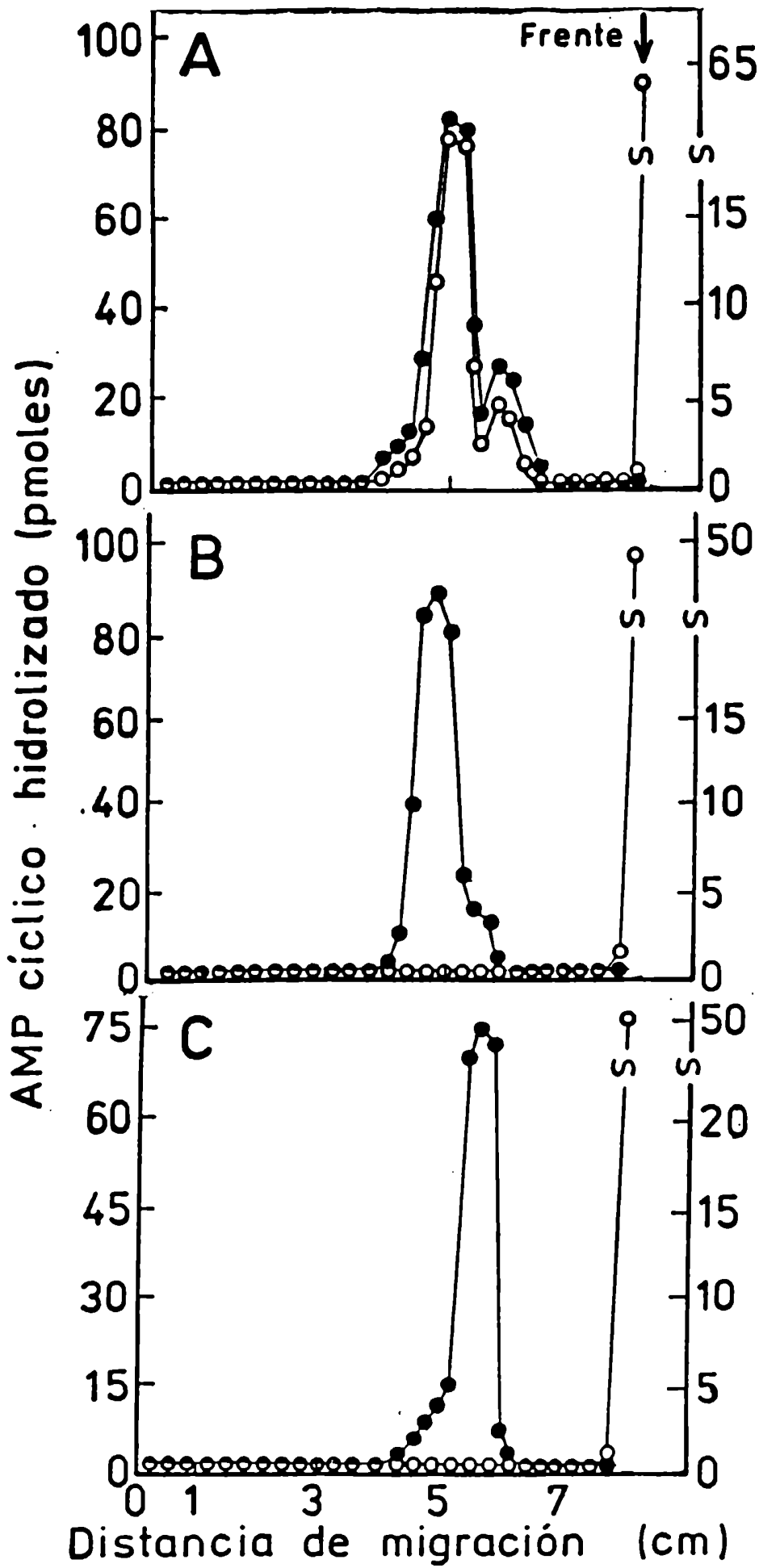
Fig. 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fracción G-100 de fosfodiesterasa fosforilada con ATP-[γ ³²P]

- A- Fracción G-100, tipo activable (175 μ g; 960 unidades)
- B- Fracción G-100, tipo activable (175 μ g; 960 unidades) sometida a proteólisis controlada con tripsina-acrilamida después de fosforilación (ver Materiales y Métodos)
- C- Fracción G-100, tipo insensible (200 μ g; 600 unidades). La fracción PDE II fue cromatografiada por Sephacryl S-300 y Sephadex G-100 (fracción G-100) y sometida a fosforilación como se describe en Materiales y Métodos).

En mitades de rodaja se dosó actividad de fosfodiesterasa (●) e incorporación de ³²P (○).

a' - c': Perfil de Proteínas teñidas con azul de coomassie de cada una de las muestras.

a'' - c'': Autorradiografía de cada una de las muestras correspondientes.



^{32}P incorporado ($\text{cpm} \times 10^{-3}$)



geles de poliacrilamida los efectos de la tripsinización controlada con tripsina-acrilamida de la enzima fosforilada previamente. Como puede verse (figura 10 b.), la marca de fósforo desapareció completamente, en tanto que la amplitud del pico de actividad así como el perfil de bandas de proteínas fue prácticamente idéntico (figura 10 b' y b''). De esta manera se evidencia que la región de fosforilación está comprendida en la región removible por proteólisis. Resultados coincidentes se han obtenido en un estudio similar en el cual primero se procedió a tripsinizar la preparación enzimática y luego a fosforilarla con ATP-[γ ³²P], y se analizaron los perfiles de actividad enzimática y radioactividad en geles de poliacrilamida. Aquí tampoco se encontró incorporación de marca radioactiva a las moléculas fosfodiesterásicas (resultados no mostrados).

Con el propósito de estudiar si la proteólisis endógena también remueve la región fosforilable de la molécula enzimática, se sometió al tipo PDE II proveniente de cromatografía en DEAE-celulosa, a los pasos de purificación de Sephacryl S-300 y Sephadex G-100. A la preparación así obtenida se la incubó en condiciones fosforilantes con ATP-[γ ³²P] y se la analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (figura 10 c.). Como puede verse, no aparece fosfato radioactivo que acompañe a la actividad fosfodiesterásica ni a ninguna otra banda de proteína (figura 10 c' y c'').

La proteólisis endógena, al igual que la tripsinización controlada, elimina de la molécula de PDE la región fosforilable. Este resultado refuerza aquellos que se obtuvieron en los que se demuestra que el tipo PDE II es producto de la proteólisis del tipo PDE I.

D I S C U S I O N

Ha sido descrita la presencia de múltiples formas de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos en muy diversos organismos, especialmente en tejidos de mamíferos (Strada y Thompson, 1978). Así se han descrito formas de fosfodiesterasas de AMP cíclico de alta Km activables por calmodulina, las de alta afinidad por el AMP cíclico insensibles a calmodulina, las mixtas que hidrolizan tanto AMP cíclico como GMP cíclico. Se han descrito formas cinéticas de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos pertenecientes a un mismo tejido, como las de mucosa de colon de rata (Craven et al, 1983). En eucariontes inferiores también se ha descrito polimorfismo de fosfodiesterasas. En levadura de panadería se han descrito dos formas, una de alta Km, soluble, que hidroliza AMP cíclico y GMP cíclico (Fujimoto et al, 1974; Londesborough y Suoranta, 1983) y otra microsomal, de baja Km y específica para el AMP cíclico (Londesborough y Jonkkari, 1982). En N. crassa se han descrito diversas formas de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (Téllez-Iñón et al, 1982) con distinta especificidad de sustrato, algunas de las cuales presentan formas agregadas. Estos constituyen algunos ejemplos dentro de los numerosos existentes que evidencian el amplio polimorfismo de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos. Puede plantearse que cuando las diversas fosfodiesterasas de un tipo celular difieren en la afinidad de sustrato, la especificidad de sustrato o la modulación por efectores, podría suponerse que estas enzimas no están relacionadas estructuralmente entre sí. Sin embargo, cuando las múltiples formas de un mismo tipo celular son indistinguibles

bles por criterios cinéticos o regulatorios simples, surgen dos cuestiones: si las varias formas están interrelacionadas o son interconvertibles y si tal interrelación posee algún significado metabólico o regulatorio.

En este trabajo se describe la presencia de múltiples formas de fosfodiesterasa de AMP cíclico en el hongo M. rouxii, cuya presencia depende del estado de crecimiento del micelio. Una forma activable por fosforilación o por proteólisis controlada (PDE I) que eluye a baja fuerza iónica en cromatografía en DEAE-celulosa y es la única forma presente en células con tubo germinal incipiente. Una forma insensible a la regulación por ambos mecanismos de fosforilación y proteólisis (PDE II) que eluye en cromatografía en DEAE-celulosa a mayor fuerza iónica y es el tipo predominante en preparaciones de micelios cosechados en fase estacionaria.

Una mezcla de ambas formas en proporciones variables aparece en preparaciones de micelios cosechados en fase exponencial media. También se pudo demostrar que la forma insensible puede obtenerse por proteólisis controlada a partir de la forma activable y que es altamente probable que esta sea la causa del polimorfismo en las preparaciones. La heterogeneidad molecular se acentúa con el transcurrir del tiempo y va alterando el tamaño molecular de la enzima.

Hasta el momento no se ha podido dilucidar el significado metabólico de la aparición de las múltiples formas, esto es, si el proceso proteolítico responsable aparentemente del polimorfismo ocurre in vivo o si la liberación generalizada de actividades proteásicas conduce a la proteólisis de la PDE de MUCOR durante la preparación de los extractos. Algún elemento de juicio para resolver este problema lo aportaría el estudio de

dichas actividades proteolíticas, investigando la posible existencia de alguna específica o íntimamente relacionada con la PDE, como ha sido descrito para otros sistemas (Strewler y Manganiello, 1979).

No ha sido estudiado hasta ahora el estado de activación de la PDE a lo largo del crecimiento filamentoso. Existen en la literatura diversos estudios acerca de cambios en los niveles de actividad de fosfodiesterasa durante los ciclos de crecimiento, como por ejemplo, en cultivos primarios de hepatocitos de rata adulta (Lad et al, 1984), en el desarrollo temprano de embrión de pollo (Neuman, 1983) o durante la agregación celular y diferenciación para formar cuerpos fructificantes en Dictyostelium discoideum (Mullens et al, 1984). En M. rouxii, la susceptibilidad a la activación por fosforilación de la fosfodiesterasa podría explicar cambios reversibles en el nivel de actividad de la enzima. Recientemente, en nuestro laboratorio, ha sido estudiada la actividad fosfodiesterásica durante la morfogénesis aeróbica levadura-micelio de M. rouxii (Cantore et al, 1983). Se ha demostrado un máximo de actividad de PDE coincidente con un mínimo en el nivel intracelular de AMP cíclico; este punto de máxima actividad resulta casi no estimable bajo condiciones fosforilantes, lo que indicaría que la enzima estaría fosforilada en dicho momento de la morfogénesis. Si bien harían falta estudios adicionales para comprobar la validez fisiológica de este mecanismo de regulación por fosforilación de la PDE de MUCOR, estos representan resultados preliminares muy importantes.

También contribuiría al entendimiento del significado fisiológico del sistema regulatorio el estudio de la desfosforilación de la fosfodiesterasa in vivo. En M. rouxii han sido descritas actividades de fosfatasa de

fosfoproteínas (Seigelchifer y Passeron, 1984) y también se ha demostrado en extractos poco purificados del hongo, la reversibilidad de la activación a través de incubaciones en condiciones desfosforilantes (Moreno et al, 1982). Sería de interés investigar la existencia de una posible actividad de fosfatasa relacionada con la PDE.

A lo largo de este trabajo se ha podido demostrar concluyentemente que la activación por fosforilación involucra la incorporación de fosfato directamente en la molécula fosfodiesterásica (figura 10.). También se ha podido estudiar del mismo modo, es decir a través de la incorporación de fosfato radioactivo, la interrelación molecular de ambos procesos de activación, fosforilación y proteólisis. La región que contiene el o los sitios de fosforilación de la molécula enzimática se halla comprendida en la región susceptible a proteólisis. De este modo, podría suponerse que tanto la fosforilación como la proteólisis, aunque ésta en forma irreversible, conducirían a una alteración conformacional cuyas consecuencias serían un incremento de la V_m , como se discutirá más adelante. Este mecanismo basado en la coincidencia topográfica de las zonas regulables por fosforilación y por proteólisis ya ha sido descrito para otras actividades enzimáticas (Kaufman y Fisher, 1974; Abita et al, 1976); para estos sistemas se ha propuesto un modelo en el cual la molécula enzimática contendría un "dominio" inhibidor que sería desplazado de su sitio inhibitorio por la adición reversible de grupos fosfato que ejercerían una repulsión electrostática, o bien por la acción irreversible de la proteólisis controlada.

Un modelo similar podría explicar en nuestro sistema la no aditividad

observada en ambos mecanismos de activación. Como puede verse en la electroforesis en gel (figura 10 b') el patrón de bandas de proteína producido por tripsinización no difiere significativamente del de la preparación de la enzima "nativa" fosforilada (figura 10 a') a pesar de que este tratamiento eliminó por completo la marca radioactiva. El proceso de proteólisis que conduce a la heterogeneidad de especies de PDE es un proceso gradual que va generando las múltiples formas moleculares (nótese las heterogéneas conductas cromatográficas, las variadas velocidades de sedimentación y de migración en electroforesis en gel, los diversos grados de activabilidad a partir de los extractos enzimáticos y durante el envejecimiento de la preparación). Este proceso proteolítico gradual también ha sido descrito para la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de alta K_m , estimulable por calmodulina, de cerebro bovino (Tucker et al, 1981). Mediante la tripsinización en condiciones controladas de la PDE de MUCOR 'nativa' se logró eliminar la región de fosforilación de la molécula enzimática alcanzándose un alto grado de actividad por estimulación de la actividad basal.

Tanto la fosforilación como la proteólisis conducen a aumentar la V_m de la actividad fosfodiesterásica sin una modificación apreciable de la afinidad enzima-sustrato, a juzgar por los estudios cinéticos que se han realizado (Tabla III). Si bien las conclusiones son coincidentes con resultados previamente publicados (Ibreno et al, 1982), los valores obtenidos difieren; esto puede deberse a que los estudios anteriores fueron realizados con una mezcla de los dos tipos de enzima, activable e insensible, en una preparación más enriquecida en actividades proteolíticas endógenas y, por lo tanto, con un proceso de pérdida de la capacidad de ac-

tivación más acelerado.

Resulta muy importante destacar las dificultades presentadas a lo largo de los pasos sucesivos de purificación en cuanto a los intentos de alcanzar una minimización de la proteólisis endógena. Estas dificultades son frecuentes en los sistemas eucariontes inferiores, particularmente en hongos; tal el caso, por ejemplo, de B. emersonii en donde los estudios de regulación de la quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico se han hecho muy difíciles por la acción de proteasas endógenas, cuya actividad ha podido ser minimizada recientemente por el uso de antipaína en las soluciones preparativas (Brochetto-Braga et al, 1982; López-Gomés et al, 1983).

Como se ha demostrado a lo largo de este trabajo, las proteasas endógenas conducen a un aumento de la actividad basal que hace perder la susceptibilidad regulatoria de la PDE de MUCOR. Esto ocurre a pesar de la inclusión de inhibidores de proteasas en las soluciones preparativas, cuya acción no resulta completamente suficiente. El tiempo de envejecimiento de las preparaciones enzimáticas es dramático en cuanto a la pérdida a la susceptibilidad regulatoria. Es por ello que se buscaron procedimientos tendientes a abolir la acción de las proteasas en las preparaciones enzimáticas. De acuerdo con esto, se modificó el medio de cultivo del hongo reemplazando la peptona por un hidrolizado de ácido de caseína con el objeto de desfavorecer la inducción de proteasas; además, se ha procurado un método de ruptura del micelio relativamente suave con el fin de hacer mínima la desintegración de estructuras subcelulares, en particular, lisosomas y vesículas portadoras de proteasas. Con estas modificaciones se ha

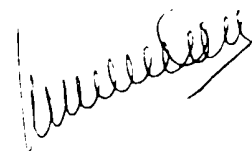
podido atenuar la acción proteolítica. Así, se ha podido purificar el tipo activable a lo largo de cuatro pasos y realizar los estudios mecanísticos comentados. Es importante destacar que pese a todas estas modificaciones, en la cromatografía en DEAE-celulosa aparece también el tipo no activable (PDE II) en preparaciones de micelios cosechados en fase exponencial media. Se ha demostrado que el estado de crecimiento del hongo es determinante para la aparición como única forma del tipo activable (cultivo de células con tubo germinal incipiente) o de una mezcla de proporciones variables de ambas formas activable e insensible. La purificación de la actividad enzimática requiere de una cantidad abundante de material biológico como punto de partida; de allí que resulte necesario trabajar con un micelio de fase exponencial media de crecimiento, cuyo rendimiento es mucho mayor.

En síntesis, se ha podido avanzar en la purificación de la enzima activable, aunque no suficientemente como para alcanzar un grado de homogeneidad de la enzima, conservando aún su susceptibilidad regulatoria. Con el objeto de reducir el número de pasos de purificación y de acortar los tiempos de envejecimiento de la preparación, se intentó la utilización de cromatografías de afinidad (cromatografía en Azul 2 - agarosa; cromatografía en AMP cíclico - agarosa) con resultados negativos. Un medio que se podría intentar en un futuro con el objeto de reducir el consumo de tiempo durante las preparaciones y que ha sido utilizado exitosamente en sistemas con dificultades parecidas, es el desarrollo de inmunocromatografías no desnaturizantes (Scott-Hansen y Beavo, 1982; Levin et al, 1982).

En relación con las variadas actividades fosfodiesterásicas de nucle-

ótidos cíclicos descriptas en los diversos sistemas, es la primera vez que se describe en eucariontes inferiores la combinación de los mecanismos de regulación descriptos en organismos superiores de fosforilación dependiente de AMP cíclico (Marchmont y Houslay, 1980, a y b) y de proteólisis (miki y Yoshida, 1972; Sakai et al, 1973; Epstein et al, 1978). En extractos de mioblastos y músculo esquelético de rata se ha descripto un sistema de múltiples formas de fosfodiesterasas de AMP cíclico de alta afinidad por el sustrato (Narindrasorasak et al, 1982; Ball et al, 1980). Las múltiples formas encontradas derivaron por procesos de agregación o de proteólisis de una forma original, la cual es capaz de ser activada por un proceso de fosforilación dependiente de AMP cíclico o por proteólisis controlada. En este sistema se plantea que algunas de las formas enzimáticas son artificios del proceso de homogenización. En el sistema de MUCOR no se ha podido dilucidar, como ya se ha comentado, si las múltiples formas ocurren in vivo o después de la preparación de los extractos enzimáticos. De todas maneras se deberá investigar este problema a través de otros enfoques experimentales. Es importante destacar la analogía aparente del sistema de fosfodiesterasa de MUCOR con el descripto en mioblastos y músculo de rata (Narindrasorak et al, 1982) antes comentado, dado que este último corresponde a un sistema biológico mucho más complejo y a una línea de evolución totalmente distinta.

La complejidad del sistema regulatorio de la PDE de MUCOR, junto a otros sistemas enzimáticos regulables descriptos en este hongo, tal como la regulación por fosforilación dependiente de AMP cíclico de la trehalasa (Dewerchin y Van Laere, 1984) harían a este género de hongos portador de un sistema metabólico altamente complejo.



BIBLIOGRAFIA

- Abita, J.; Milstien, S.; Chang, N.; Kaufman, S. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 5310-
- Andrenayak, D.; Epstein, P. (1982) *Fed. Proc.* 41, 1728-
- Amer, M.; Kreigbaum, J. (1975) *J. Pharm. Sci.* 64, 1-
- Appleman, M.; Terasaki, W. (1975) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5, 153-
- Ashton, A.; Polya, G. (1975) *Biochem. J.* 149, 329-
- Baehr, W.; Deylin, M.; Applebury, M. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 11669-
- Ball, E.; Seth, P.; Sanwal, B. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2962-
- Bartnicki-García, S. (1968) *J. Bacteriol.* 96, 1586-
- Beavo, J.; Hardman, J.; Sutherland, E. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 5649-
- Beavo, J.; Hardman, J.; Sutherland, E. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 3841-
- Beavo, J.; Bechtel, P.; Krebs, E. (1975) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5, 241-
- Beavo, J.; Hansen, R.; Harrison, S.; Hurwitz, R.; Martins, T.; Mumby, M. (1982) *Mol. Cell. Endocrinol.* 28, 387-
- Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-
- Brewin, N.; Northcote, D. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 320, 104-

- Brochetto-Braga, M.; LopezGomés, S.; Maia, J.C. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 217, 295-
- Brostrom, M.; Reimann, E.; Walsh, D.; Krebs, E. (1970) Adv. Enzyme Reg. 8, 191-
- Brothers, V.; Walker, N.; Bourne, H. (1982) J. Biol. Chem. 257, 9349-
- Brown, E.; Newton, R. (1973) Phytochem. 12, 263-
- Brown, E.; Edwards, M.; Newton, R.; Smith, C. (1980) Phytochem. 19, 23-
- Butcher, R.; Sutherland, E. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1244-
- Canalco; Sagekit (1980) Miles Laboratories.
- Cantore, M; Passeron, S. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 219, 1-
- Cantore, M.; Galvagno, M. Passeron, S. (1983) Cell Biol. int. Rep. 7, 947-
- Carlson, G.; Bechtel, P.; Graves, D. (1979) Adv. Enzymol. 50, 41-
- Casperson, G.; Walker, N.; Brasier, A.; Bourne, H. (1983) J. Biol. Chem. 258, 7911-
- Cecil, R.; Ogston, A. (1948) Biochem. J. 42, 229-
- Cecil, R.; Ogston, A. (1951) Biochem. J. 49, 105-
- Chang, K.; Marcus, M.; Cuatrecasas, P. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6854-
- Chang, y. (1968) Science 161, 57-
- Cheung, W. (1969) Biochim. Biophys. Acta 191, 303-

- Cheung, W. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 533-
- Cheung, W.; Lynch, T.; Wallace, R. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 233-
- Cohen, R. (1974) *Nature* 251, 144-
- Cohen, R. (1979) *Phytochem.* 18, 943-
- Cohen, R.; Ness, J.; Whiddon, S. (1980) *Phytochem.* 19, 1913-
- Cook, W.; Lipkin, D.; Markham, R. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3607-
- Coquil, J.; Frank, D.; Wells, J.; Dupuis, M.; Hamet, P. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 631, 148-
- Corbin, J.; Krebs, E. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 328-
- Corbin, J.; Reimann, E.; Walsh, D.; Krebs, E. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 4849-
- Corbin, J.; Bostrom, C.; Alexander, R.; Krebs, E. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 3736-
- Cox, J.; Ferraz, C.; Demaille, J.; Ortega-Perez, R.; Van Tuinen, D.; Marmé, D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10694-
- Craven, P.; Neidig, M.; De Rubertis, F. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 744, 265-
- Dewerchin, M.; Van Laere, A. (1984) *J. Bacteriol.* 158, 575-
- Dicou, E.; Brachet, P. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 1321-
- Dixon, M.; Webb, E. (1958) *Enzymes*. Ed. Longmans.
- Epstein, P.; Pledger, W.; Gardner, E.; Stancel, G.; Thompson, W.; Strada, S. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 527, 442-
- Epstein, P.; Strada, S.; Sarada, K.; Thompson, W. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 218, 119-
- Erneux, C.; Boeynaems, J.; Dumont, J. (1980) *Biochem. J.* 192, 241-
- Erneux, C.; Couchie, D.; Dumont, J.; Baroniak, J.; Stec, W.; García Abad, E.; Petridis, G.; Jastorff, J. (1981) *Em. J. Biochem.* 115, 503-
- Erneux, C.; Miot, F.; Boeynaems, J.; Dumont, J. (1982) *FEBS Lett.* 142, 251-
- Flawiá, M.; Torres, H. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 69, 2870-

- Flawiá, M.; Torres, H. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 4517-
- Francis, S.; Lincoln, T.; Corbin, J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 620-
- Francis, S.; Kono, T. (1982) *Mol. Cell. Biochem.* 42, 109-
- Friedenthal, M.; Epstein, A.; Passeron, S. (1974) *J. Gen. Microbiol.* 82, 15-
- Fujimoto, M.; Ichikawa, A.; Tomita, K. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 54-
- Fung, B.; Hurley, J.; Stryer, L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78, 152-
- Galvagno, M.; Moreno, S.; Cantore, M.; Passeron, S. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89, 779-
- Galvagno, M. (1981) Tesis doctoral Fac. Ciencias Exactas y Naturales (UBA)
- Galvagno, M.; Forchiassin, F.; Cantore, M.; Passeron, S. (1984) *Experim. Mycol.* 8, 334-
- Gardner, E.; Thompson, W.; Strada, S.; Stancel, G. (1978) *Biochemistry* 17, 2995-
- Garen, A.; Levinthal, C. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 38, 470-
- Gerish, G.; Malchow, D.; Riedel, V.; Muller, E.; Every, M. (1972) *Nature New Biol.* 235, 90-
- Gietzen, K.; Sadorf, I.; Bader, H. (1982) *Biochem. J.* 207, 541-
- Gill, G.; Garren, L. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 39, 335-
- Gill, G.; Garren, L. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 68, 786-
- Glynn, I.; Chappell, J. (1964) *Biochem J.* 90, 147-
- Guan, W.; Cheung, W. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 204, 191-
- Haga, T.; Haga, K.; Gilman, A. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5776-
- Hansen, R.; Beavo, J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79, 2788-
- Hasunuma, K. (1983) *J. Bacteriol.* 156, 291-
- Helman, D.; Shoji, M.; Kuo, J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 6327-
- Helman, D.; Kuo, J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 1044-

- Heyworth, C.; Wallace, A.; Houslay, M. (1983) *Biochem. J.* 214, 99-
- Hidaka, H.; Yamaki, T.; Ochiai, Y.; Asano, I.; Yamabe, H. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 484, 398-
- Ho, H.; Wirch, E.; Stevens, F.; Wanf, J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 43-
- Holtz, A.; Brennan, R.; Battista, D.; Ierner, C. (1981) *Endocrinol.* 108, 1538-
- Houslay, M.; Marchmont, R. (1981) *Biochem. J.* 198, 703-
- Hugget, A.; Nixson, D. (1957) *Biochem. J.* 66, 12-
- Hunter, T.; Setton, B. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77, 1311-
- Hurley, J.; Barry, B.; Ebrey, I. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 675, 359-
- Hurwitz, R.; Hansen, R.; Harrison, S.; Martins, T.; Mumby, M.; Beavo, J. (1982) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 15
- Huttunen, J.; Steimberg, D.; Mayer, S. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 67, 290-
- Judewicz, N.; Glikin, G.; Torres, H. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 206, 87-
- Kakiuchi, S.; Yamazaki, R. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1104-
- Katoh, N.; Helfman, D.; Wrenn, R.; Kuo, J. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 714, 129-
- Kautman, S.; Fisher, D. (1974) *In Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*. Hayaishi, D., Ed. Acad. Press, N.Y.
- Keller, C.; Ulwin, B.; Heideman, W.; Storm, D. (1982) *In Calcium and Cell Function*, Vol. III, Cheung, W. Ed.
- Kerner, H.; Passeron, S. (1984) *Mol. Cell. Biochem.* 60, 115-
- Kiechle, F.; Jarett, L. (1981) *FEBS Lett.* 133, 279-
- Killilea, S.; Brandt, H.; Lee, Z. (1976) *Trends Biochem. Sci.* 1, 30-
- Kincaid, R.; Mansour, T. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 588, 342-
- Kincaid, R.; Manganiello, V.; Vaughn, M. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11345-
- Klee, C.; Crouch, T.; Krinks, M. (1979) *Biochemistry* 18, 722-

- Kuhn, H.; Cook, J.; Preyer, W. (1973) *Biochemistry* 12, 7425-
- Kumon, A.; Yamamura, H.; Nishizuka, Y. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1290-
- Kuo, J.; Greengard, P. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 3417-
- Kuo, J.; Krueger, B.; Sanes, J. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 212, 79-
- Lad, P.; Blazquez, E.; Lin, M.; Leffert, H. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 679-
- Lance Macaulay, S.; Kiechle, F.; Jarrett, L. (1983 a) *Biochim. Biophys. Acta* 760, 293- (1983 b) *Arch. Biochem. Biophys.* 225, 130-
- Langan, T. (1968) *Science* 162, 579-
- Laporte, D.; Ioscano, W.; Storm, D. (1979) *Biochemistry* 18, 2820-
- Larsen, A.; Sypherd, P. (1974) *J. Bacteriol.* 117, 432-
- Laurent, T.; Killander, J. (1964) *J. Chromatog.* 14, 317-
- Lee, E.; Meugren, R.; Killilea, S.; Aylward, J. (1978) *FEBS Sympos.* 42, 327-
- Levin, M.; Daegelen, D.; Meienhofer, H.; Dreyfus, J.; Kahn, A. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, 699,77-
- Levin, R.;-Weiss, B. (1977) *Molec. Pharmacol.* 13, 690-
- Li, H.; Hsiao, K.; Chan, W. (1978) *Eur. J. Biochem.* 84, 215-
- Limbird, L. (1981) *Biochem. J.* 195, 1-
- Lincoln, T.; Corbin, J. (1978) *J. Cyclic Nucleotides Res.* 4, 3-
- Londesborough, J. (1977) *Biochem. J.* 163, 467-
- Londesborough, J.; Jonkkari, L. (1982) *Mol. Cell. Biochem.* 46, 65-
- Londesborough, J.; Suoranta, K. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2966-
- Loowis, W. (1972) *Nature New Biol.* 240, 6-
- Lopez-G6mes, S.; Juliani, M.; Maia, J.C.; Rangel-Aldao, R. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 6972-
- Loten, E.; Assimacopoulos-Jeannet, F.; Exton, J.; Park, C. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 746-

- Loten, E.; Francis, S.; Corbin, J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 7838-
- Maia, J.C.; Camargo, E.; (1974) *Cell Differ.* 3, 147-
- Makino, H.; Kono, T. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 7850-
- Malchow, D.; Nagele, B.; Schwartz, H.; Gerish, G. (1972) *Eur. J. Biochem.* 28, 136-
- Marchmont, R.; Houslay, H. (1980 a) *Biochem. J.* 187, 381-
(1980 b) *Nature* 286, 904-
(1980 c) *FEBS Lett.* 118, 18-
(1981) *Biochem. J.* 195, 653-
- Marchmont, R.; Ayad, S.; Houslay, M. (1981) *Biochem. J.* 195, 645-
- Martin, R.; Ames, B. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1372-
- Martins, T; Mumby, M.; Beavo, J. (1962) *J. Biol. Chem.* 257, 1973-
- McDonald, C.; Sampson, J. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 749, 255-
- Miki, N.; Yoshida, H. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 268, 166-
- Miki, N.; Baraban, J.; Keirns, J.; Boyce, J.; Bitensky, M. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 6320-
- Minneman, K.; (1976) *J. Neurochem.* 27, 1181-
- Miyamoto, E.; Kuo, J.; Greengard, P. (1969) *Science* 165, 63-
- Miyamoto, E.; Petzold, G.; Harris, J.; Greengard, P. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 305-
- Moore, J.; Schroeder, D. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 213, 276-
- Moreno, S.; Paveto, C.; Passeron, S. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 225-
- Moreno, S.; Passeron, S. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 199, 321-
- Moreno, S.; Galvagno, M.; Passeron, S. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 214, 573-
- Moreno, S.; Pastori, R.; Passeron, S. (1983) *Mol. Cell. Biochem.* 52, 13-
- Morgan, D.; Shaheen, O.; Keyes, W.; Heimberg, M. (1982) *Endocrinology* 110, 260-
- Morril, M.; Thompson, S.; Stellwagen, E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4371-

- Moss, J.; Manganiello, V.; Vaughan, M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 541, 279-
- Mullens, I.; Franke, J.; Kappes, D.; Kessin, R. (1984) *Eur. J. Biochem.* 142, 409-
- Murray, A.; Spizman, M.; Atkinson, D. (1971) *Science* 171, 496-
- Narindrasorasak, S.; Tan, L.; Seth, P.; Sanwall, W. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 4618-
- Nemecek, G.; Honeyman, T. (1982) *J. Cyclic Nucleotides Res.* 8, 395-
- Némoz, G.; Prigent, A.; Pageaux, J.; Pacheco, H. (1981) *Biochem. J.* 199, 113-
- Neuman, T. (1983) *Experientia* 39, 96-
- Núñez, J.; Correze, C. (1981) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 14, 539-
- Ung, K.; Koh, L. (1982 a) *Biochem. int.* 4, 235-
(1982 b) *Biochem. int.* 5, 651-
- Orellana, O.; Jedlicki, E.; Allende, J. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 231, 345-
- Orlowsky, M.; Sypherd, P. (1977) *J. Bacteriol.* 132, 204-
- Ortega-Pérez, R.; Vantuinen, D.; Marmé, D.; Cox, J.; Turian, G. (1981) *FEBS Lett.* 133, 205-
- Ortega-Pérez, R.; Van Tuinen, D.; Marmé, D.; Turian, G. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 758, 34-
- Pannbacker, R.; Bravard, L. (1972) *Science* 175, 1014-
- Pastori, R.; Kerner, N.; Moreno, S.; Passeron, S. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 663-
- Paveto, C.; Epstein, A.; Passeron, S. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 169, 449-
- Paznokas, J.; Sypherd, P. (1975) *J. Bacteriol.* 124, 134-
- Pichard, A.; Cheung, W. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 5726-
- Pledger, W.; Stancel, G.; Thompson, W.; Strada, S. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 370, 242-
- Po-Chao Lin, P.; Varner, J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 276, 454-

- Pober, J.; Bitensky, M. (1979) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 11, 265-
- Pohl, S.; Birnbauer, L.; Rodbell, M. (1969) *Science* 164, 566-
- Powers, P.; Pall, M. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 701-
- Prigent, A.; Némoz, G.; Pica, M.; Dubois, M.; Pacheco, H. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 236-
- Purvis, K.; Olsen, A.; Hansson, V. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11434-
- Rall, T.; Sutherland, E.; Berthet, L. (1957) *J. Biol. Chem.* 224, 463-
- Reimann, F.; Walsh, D.; Krebs, E. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1986-
- Reynolds, C. (1982) *Biochem. J.* 202, 125-
- Riedel, V.; Gerish, G.; Muller, E.; Beug, H. (1973) *J. Mol. Biol.* 74, 573-
- Robinson, G.; Butcher, R.; Sutherland, E. (1971) *En Cyclic AMP Acad. N. Y.*
- Rodnight, R.; Lavin, B. (1980) *J. Biochem.* 93, 84-
- Ross, E.; Gilman, A. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49, 533-
- Rosenberg, G.; Pall, M. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 221, 243-
- Russell, T.; Thompson, W.; Schneider, F.; Appleman, M. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 69, 1791-
- Russell, T.; Terasaki, W.; Appleman, M. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1334-
- Sakai, T.; Makino, H.; Tanaka, R. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 522, 477-
- Sampson, J. (1977) *Cell* 11, 173-
- Sarada, K.; Epstein, P.; Strada, S.; Thompson, W. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 215, 183-
- Schmidtke, J.; Wienker, T.; Flugel, M.; Engel, W. (1976) *Nature* 262, 593-
- Scott, W.; Solomon, B. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 1024-
- Scott, W. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 73, 2995-
- Scott Hansen, R.; Beavo, J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79, 2783-
- Seigelchifer, M.; Passeron, S. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 229, 403-
- Shapiro, R.; Franke, J.; Luna, E.; Kessin, R. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 758, 49-

- Sharma, R.; Wang, T.; Wirch, E.; Wang, J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 5916-
- Sharma, R.; Adachi, A.; Adachi, K.; Wang, J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 9248-
- Sharma, S.; Johri, H. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 217, 87-
- Sharma, S.; Johri, M. (1983) *Phytochem.* 22, 2715-
- Shaw, N.; Harding, R. (1983) *FEBS Lett.* 152, 295-
- Shinozawa, T.; Uchida, S.; Martin, E.; Cafiso, D.; Hubbell, W.; Bitensky, M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77, 1408-
- Siegel, L.; Monty, K. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 112, 346-
- Smith, D.; Chen, C.; Bruegger, B.; Holtz, S.; Halpern, R.; Smith, R. (1974) *Biochemistry* 13, 3780-
- Smoake, J.; Johnson, L.; Peake, G. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 206, 331-
- Strada, S.; Thompson, W. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 265-
- Strewler, G.; Manganiello, V.; Vaughan, M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 390-
- Strewler, G.; Manganiello, V. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 11891-
- Stryer, L.; Hurley, J.; Fung, J. (1981) *Trends Biochem. Sci.* 6, 245-
- Stryer, L. (1983) *Cold Spring Harbor Symp.* 48, 841-
- Suoranta, K.; Londesborough, J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 6964
- Tai, H.; Tai, C. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 214, 622-
- Takai, Y.; Yamamura, H.; Nishizuka, Y. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 530-
- Takemoto, D.; Hansen, J.; Takemoto, L.; Houslay, M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 14597-
- Tao, M.; Salas, M.; Lipmann, F. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 67, 408-
- Télliez-Iñón, M.; Glikin, G.; Torres, H. (1982) *Biochem. J.* 203, 611-
- Terasaki, W.; Appleman, M. (1975) *Metabolism* 24, 311-

- Terenzi, H.; Flawiã, M.; Torres, H. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 990-
- Thompson, W.; Appleman, M. (1971) *Biochemistry* 10, 311-
- Thompson, W.; Williams, R. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 165, 468-
- Thompson, W.; Strada, S. (1979) *Récep. Horm. Action* 3, 553-
- Thompson, W.; Epstein, P.; Strada, S. (1979) *Biochemistry* 18, 5228-
- Toorchen, D.; Henderson, E. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 1168-
- Traugh, J.; Mumby, M.; Traut, R. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 70, 373-
- Tucker, M.; Robinson, J.; Stellwagen, E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 9051-
- Uno, I.; Ishikawa, T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 334, 354-
- Uno, I.; Yamaguchi, M.; Ishikawa, T. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 71, 479-
- Vale, M.; Gomes, S.; Maia, J.C. (1975) *FEBS Lett.* 56, 332-
- Vandepeute, J.; Huffaker, R.; Alvarez, R. (1973) *Plant. Physiol.* 52, 278-
- Van Inwegen, R.; Pledger, W.; Strada, S.; Thompson, W. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 700-
- Vaughan, M.; Danello, M.; Manganiello, V.; Strewler, G. (1981) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 14, 263-
- Walsh, D.; Perkins, J.; Krebs, E. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 3763-
- Watterson, D.; Sharief, F.; Vanaman, T. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 962-
- Weber, H.; Appleman, M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 5339-
- Weiss, B.; Fertel, R.; Figlin, R.; Uzunov, P. (1974) *Molec. Pharmacol.* 10, 615-
- Wells, J.; Mu, Y.; Baird, C.; Hardman, J. (1975) *Molec. Pharmacol.* 11, 775-
- Wells, J.; Hardman, J. (1977) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 8, 119-
- Whitson, R.; Appleman, M. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 714, 279-

- Wilson, S.; Houslay, M (1983) *Biochem. J.* 213, 99-
- Wold, S.; Suzuki, I. (1974) *Can. J. Microbiol.* 20, 1567-
- Wolff, D.; Brostrom, C. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 173, 720-
- Worthington Enzyme Manual (1972) Worthington Biochemical Corp., Freehold New Jersey.
- Yamamoto, T.; Manganiello, V.; Vaughan, M. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 12526-
- Yamamura, H.; Inoue, Y.; Shimamura, R.; Nishizuka, Y. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 589-
- Yamazaki, A.; Sen, I.; Bitensky, M.; Casnellie, J.; Greengard, P. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11619-
- Yamazaki, A.; Bartucca, F.; Ting, A.; Bitensky, M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79, 3702-
- Zan-Kowaleczewska, M.; Bartiewicz, M.; Sierakowska, H.; Shugar, D. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 788, 62-
- Zurzycka, A.; Jerebzooff-Quintin, S.; Jerebzooff, S. (1983) *Arch. Microbiol.* 136, 199-