

Tesis de Posgrado

Estudio del mecanismo de activación de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc de *Mucor Rouxii*

Paveto, María Cristina

1987

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

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

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

Cita tipo APA:

Paveto, María Cristina. (1987). Estudio del mecanismo de activación de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc de *Mucor Rouxii*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2095_Paveto.pdf

Cita tipo Chicago:

Paveto, María Cristina. "Estudio del mecanismo de activación de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc de *Mucor Rouxii*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2095_Paveto.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DEL MECANISMO DE
ACTIVACION DE LA QUINASA
DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE
AMPc DE MUCOR ROUXII

AUTOR : María Cristina Paveto
DIRECTOR : Dra. María Susana Di Bernardo de Passeron
LUGAR DE TRABAJO : Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tesis presentada para optar por el Título de

Doctor en Química Biológica

-1987-

- 2095 -
Ej: 3

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Susana Passeron por conducir mis primeros pasos en la investigación científica, por el ejemplo de su dedicación al trabajo, por sus enseñanzas y su constante apoyo y sobre todo por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección.

A la Dra. Silvia Moreno porque su invaluable colaboración y su entusiasmo contribuyeron grandemente a la realización de este trabajo.

A María Leonor Cantore, porque me apoyó y aconsejó serenamente en momentos de duda y dificultades y me acompañó siempre con su amistad.

A mis compañeros Miguel Galvagno, Patricia Pardo, Mauricio Seigelchifer, Claudia Tomes, Susana Silberstein, Marcelo Guthmann y Andrés Muro porque mis horas de trabajo fueron más lindas en su compañía.

A la Sra. Alicia B. de Alcaraz y a las Srtas. Noemí Arguello y Ema Balderramos por el apoyo cotidiano y la esmerada asistencia técnica que me proporcionaron.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

A los miembros del Departamento de Química Biológica, en especial a los integrantes del PRHOM y del INGEBI por su desinteresada y generosa colaboración.

A mis alumnos, porque el reflejo que de mis sencillas enseñanzas he visto en ellos a lo largo de todos estos años fueron el más grande estímulo que me ha impulsado en la tarea de mejorar y superarme en mi formación profesional.

A la Sra Mónica U. de Barbui por su eficiente colaboración en el área administrativa.

A la Srta. Rosario Palacios por la paciente y esmerada labor dactilográfica.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

ABREVIATURAS

AMP	5' adenosina monofosfato
ADP	5' adenosina difosfato
AMPc	3'-5' adenosina monofosfato cíclico
ATP	5' adenosina trifosfato
CM-Sephadex	carboximetil Sephadex
DEAE	dietilaminoetil
EDTA	etilendiamintetracetato
EGTA	etilenglicol-bis(aminoetileter)tetracetato
GMPc	3'-5' guanosina monofosfato cíclico
h	horas
IMPc	3'-5' inosina monofosfato cíclico
KD	kilo Dalton
umol	micromol
min	minutos
ng	nanogramos
P	ortofosfato unido a proteína
Pi	ortofosfato libre
PI	punto isoeléctrico
pmol	picomol
Pipes	piperazina-N,N-bis(2-ácido etanolsulfónico)
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro
ta	temperatura
RMN	resonancia magnética nuclear

(hidroximetil
lfato sódico)

INDICE

INTRODUCCION

I.	MODIFICACION COVALENTE DE PROTEINAS	2
I.1	Fosforilación-Defosforilación	2
I.2.	Quinasas de proteínas dependientes de nucleótidos cíclicos	3
II.	PURIFICACION DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP _c .	7
II.1.	Holoenzima	7
II.2.	Subunidad regulatoria	8
II.3.	Subunidad catalítica	9
III.	CARACTERIZACION Y PROPIEDADES FISICAS DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP _c	10
III.1.	Subunidad catalítica	10
III.2.	Subunidad regulatoria	12
III.3	Holoenzima	14
IV.	ANTECEDENTES DE RC	19
V.	MECANISMO DE ACCION DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP _c	21
V.1.	Mecanismo de acción de la subunidad regulatoria	22
V.2.	Mecanismo de acción de la subunidad catalítica	27
VI.	QUINASAS DE PROTEINAS DEPENDIENTES DE AMP _c EN EU-CARIONTES INFERIORES	29
VII.	RELACION EVOLUTIVA ENTRE PROTEINAS RECEPTORAS DE AMP _c Y QUINASAS DE PROTEINAS	31
VIII.	DIMORFISMO EN MUCOR. ACCION DEL AMP _c	39
IX.	ENZIMAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DEL AMP _c EN <u>MUCOR ROUXII</u>	42

X.	OBJETIVO DE ESTA TESIS	45
	<u>MATERIALES Y METODOS</u>	47
I.	BUFFERS UTILIZADOS	48
II.	PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO	48
II.1.	Organismo	48
II.2.	Obtención de esporas y mantenimiento de la cepa	48
II.3.	Cultivos	50
III.	OBTENCION DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP _c (HOLOENZIMA)	50
IV.	PREPARACION DE LA ESPECIE DIMERICA R'C' POR PROTEOLISIS CONTROLADA	52
V.	PREPARACION DE SUBUNIDAD CATALITICA DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP _c	52
VI.	PURIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP _c	54
VII.	ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA	55
VIII.	ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA	56
IX.	ENSAYOS ENZIMATICOS	58
IX.1.	Medición de la actividad quinásica	58
IX.2.	Medición de la actividad receptora de AMP _c	59
X.	DETERMINACION Y CALCULO DE LOS PARAMETROS FISICOS E HIDRODINAMICOS DE LA ESPECIE DIMERICA R'C' Y SUS SUBUNIDADES	60
X.1.	Radio de Stokes	60
X.2	Coefficiente de sedimentación	61
X.3.	Peso Molecular	61
X.4.	Coefficiente friccional	62
X.5.	Parámetros de las proteínas marcadoras	62

XI.	DETERMINACION DEL NUMERO DE HILL	63
XII.	OTRAS TECNICAS	64
XII.1.	Determinación de las proteínas marcadoras en geles de filtración molecular y en gradientes de sacarosa	64
XII.2.	DOSAJE DE PROTEINAS	65
XII.3.	SINTESIS DE ATP- γ -P ³²	65
XII.4.	MEDICION DE LA RADIOACTIVIDAD	65
XIII.	REACTIVOS	66
	<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	68
I.	IDENTIFICACION DE UNA ESPECIE DIMERICA R'C'	69
I.1.	Aparición espontánea	69
I.2.	Características de la especie dimérica	72
I.3.	Estudios de disociación de la especie dimérica usando pequeñas columnas de DEAE-celulosa	74
II.	OBTENCION DE LA ESPECIE DIMERICA R'C' POR PROTEOLISIS CONTROLADA	77
II.1	Determinación de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la especie dimérica R'C' y sus subunidades	78
II.1.1	Determinación de los coeficientes de sedimentación	78
II.1.2.	Determinación de los radios de Stokes	79
II.1.3.	Determinación del peso molecular	81
II.1.4.	Determinación del peso molecular del monómero R proveniente de la forma tetramérica R ₂ C ₂	81
II.1.5.	Determinación del coeficiente friccional	81
III.	ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACTIVACION DE LAS ESPECIES HOLOMERICAS R ₂ C ₂ Y R'C'	85

III.1	Cooperatividad positiva en la reacción de activación de la quinasa de proteínas	85
III.2.	Efectos sinérgicos de la combinación de análogos del AMPc en la activación de las holoenzimas diméricas y tetraméricas	87
IV.	ESTUDIO DE LOS SITIOS DE INTERACCION DEL AMPc CON LA SUBUNIDAD REGULATORIA (R' Y R ₂)	91
IV.1.	Disociación del AMPc unido a la subunidad regulatoria libre	92
IV.2.	Disociación del AMPc unido a la holoenzima	94
IV.3.	Estudio de la selectividad para análogos de los sitios de unión para el AMPc	95
	<u>CONCLUSIONES</u>	101
	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	103

I-MODIFICACION COVALENTE DE PROTEINAS

I-1 Fosforilación-Defosforilación

La modificación covalente reversible de las proteínas constituye uno de los mecanismos fundamentales de regulación celular en células procariontes y eucariontes (1). De acuerdo a los requerimientos celulares una proteína interconvertible pasa de una forma covalentemente modificada a una inmodificada o viceversa merced a dos enzimas que catalizan reacciones opuestas. Dentro de las modificaciones covalentes las reacciones de fosforilación-defosforilación de proteínas han sido los mecanismos de modificación post-traduccional más estudiados desde que Burnett y Kennedy describieron por primera vez la existencia de una quinasa de proteínas en hígado de rata (2). Los eventos fisiológicos tales como contracción del músculo liso, (3) resistencia celular a algunos virus (4) y la respuesta celular a hormonas adrenérgicas, insulina y factor epidérmico de crecimiento (5) están mediados por fosforilación reversible de proteínas enzimáticas. Más de treinta enzimas involucradas en el metabolismo de los hidratos de carbono, de las proteínas, de los lípidos y ácidos nucleicos, son reguladas por fosforilación-defosforilación (6). El estado de equilibrio de fosforilación-defosfo

rilación de una proteína enzimática, esta regulado dinámicamente por quinasas de proteínas, fosfatasas de fosfoproteínas (7) y sus respectivos efectores.

1-2- Quinasas de proteínas dependientes de nucleótidos cíclicos

Interesa particularmente el estudio de los nucleótidos cíclicos como efectores del mecanismo de fosforilación de proteínas enzimáticas debido a la ubicuidad de las quinasas de proteínas dependientes de nucleótidos cíclicos y al rol central de éstos en el control de procesos bioquímicos celulares (8). Este tipo de sistema de regulación en cascada puede proveer a la célula viva de un mecanismo de control potente, efectivo, eficiente y sensible ya que tiene potencial para la amplificación y cooperatividad de la respuesta (8,9). Sutherland y col. realizaron las primeras investigaciones sobre las quinasas de proteínas dependientes de AMPc y desarrollaron el concepto de segundo mensajero intracelular de la acción de hormonas para el nucleótido cíclico (10-11). Las hormonas, el primer mensajero, llevan la información desde el órgano que las produce o las acumula hasta el órgano "blanco". Se unen allí a receptores específicos localizados en la parte externa de la membrana celular.

Como consecuencia de esta unión se activa la adenilato ciclasa, enzima cuya subunidad catalítica se encuentra en la zona interna de la membrana.

Al aumentar los niveles intracelulares de AMPc se activan las quinasas de proteínas dependientes de este nucleótido y fosforilan ciertas proteínas enzimáticas, hecho que desencadena determinados efectos fisiológicos. El ciclo se revierte cuando la fosfodiesterasa de AMPc disminuye los niveles de este metabolito y las fosfatasas defosforilan las proteínas volviendo el sistema a su estado original (11) Fig. 1.

La quinasa de proteínas dependiente de AMPc es el más importante sino el único receptor intracelular para el nucleótido cíclico. En eucariontes superiores estas enzimas tienen una estructura tetramérica del tipo R_2C_2 formada por dos subunidades catalíticas monoméricas (C) que catalizan la actividad fosfotransferasa y una subunidad regulatoria dimérica (R_2) que inhibe la actividad de la subunidad catalítica y tiene 4 sitios de unión para el AMPc, dos en cada cadena monomérica. Cuando este nucleótido se une a la subunidad regulatoria causa un gran cambio en la afinidad que ésta tiene por C y se produce la disociación de la enzima.

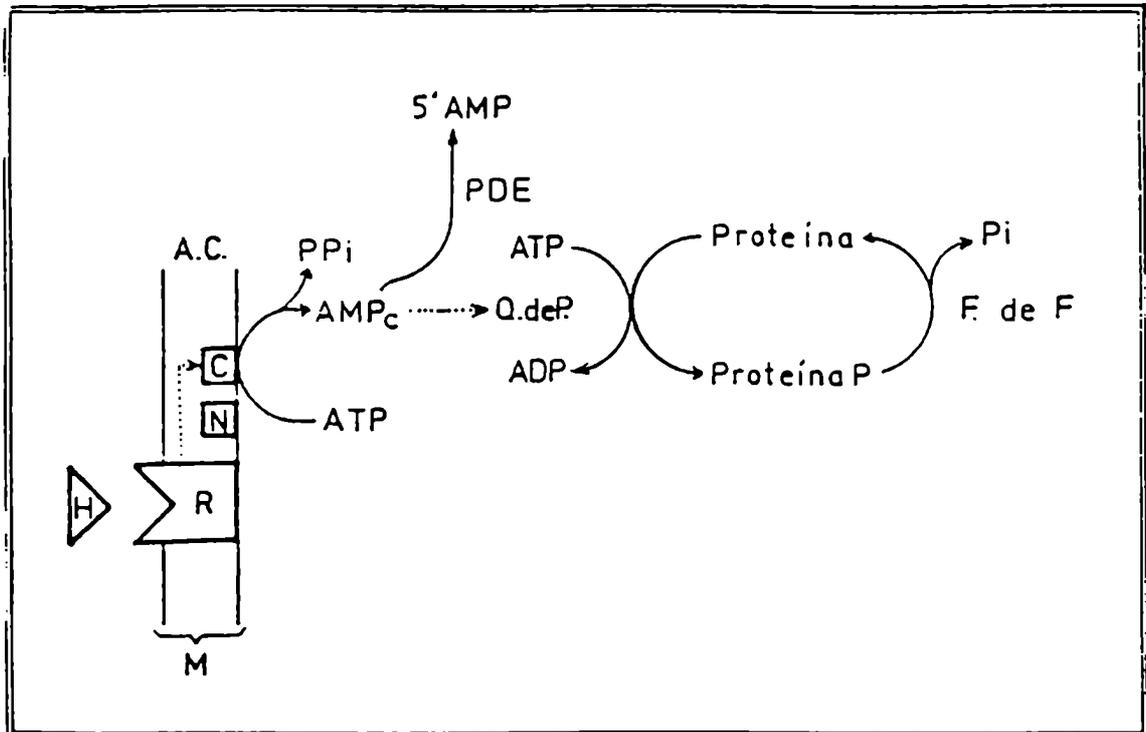
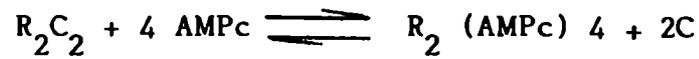


Figura 1- Metabolismo del AMP_c y su mecanismo de acción. Las flechas punteadas indican activación de una enzima o un proceso. H: hormona; M: membrana plasmática; R: receptor de membrana; N: proteína ligante de nucleótidos de guanina; C: subunidad catalítica de la adenilato ciclasa; AC: sistema adenilato ciclasa formado por R, N y C; PDE: fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos; Q de P: quinasa de proteínas; F de F: fosfatasa de fosfoproteínas.

Esta activación puede ser representada por la siguiente ecuación

(12) :



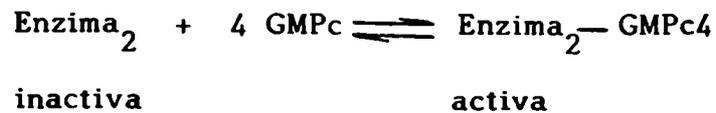
holoenzima

activa

inactiva

cuando el AMPc se hidroliza por acción de una fosfodiesterasa es pecífica el equilibrio de la reacción vuelve hacia la izquierda, C se reasocia con R_2 y termina la actividad fosfotransferasa (13,14). La estructura tetramérica es común a dos tipos principales de isoenzimas que se definen operacionalmente porque eluyen a diferentes concentraciones salinas de una columna de DEAE-celulosa : las de tipo I que eluyen a una concentración de 0,1 M o menor y las del tipo II que eluyen a una concentración salina mayor σ igual a 0,1 M (15). Esa característica de las holoenzimas se debe a diferencias estructurales y funcionales en sus subunidades regulatorias R1 y R1I (15). La quinasa de proteínas dependiente de GMPc ha recibido menos atención y sin embargo tiene un papel importante en el control de eventos celulares por fosforilación-defosforilación (16). El mecanismo de activación e inactivación de esta

enzima se puede esquematizar de la siguiente manera :



Esta quinasa es un dímero y cada uno de los monómeros contiene un componente catalítico y un componente regulatorio que liga GMPc (17). A diferencia de lo que ocurre con las quinasas de proteínas dependientes de AMPc no ocurre separación de subunidades en la reacción de activación.

Cuando el GMPc es hidrolizado por la fosfodiesterasa de GMPc el equilibrio vuelve hacia la izquierda y se restablece la conformación inactiva de la enzima.

II-PURIFICACION DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP_c

II-1- Holoenzima

En 1973 Walsh y Krebs describieron la primer purificación parcial de la holoenzima de músculo esquelético de conejo y desde entonces se la ha logrado purificar a homogeneidad a partir de numerosos tejidos en varios laboratorios. La isoenzima de tipo I de músculo esquelético de conejo (18,19) y la iso

enzima de tipo II de corazón bovino (20,21) se tomaron como enzi
mas prototipo. Estos tejidos resultaron ideales para purificar las
respectivas quinasas pues contienen principalmente una de las
formas. Los esquemas clásicos de purificación se han ampliado
con modificaciones apropiadas para obtener la holoenzima total o
parcialmente purificada de organismos muy separados en la esca_
la evolutiva (22). Los procedimientos para obtener preparaciones
homogeneas de holoenzimas utilizaron hasta ahora con éxito cromatografía en DEAE-celulosa, fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía en alúmina C_8 , técnicas de filtración molecular y cromatografía líquida de alta resolución HPLC (23). Las preparaciones homogéneas generalmente están purificadas de 1000 a 3000 veces de
pendiendo del tejido y de la isoenzima. Ahora es habitual obtener la holoenzima pura purificando por separado las subunidades regulatoria y catalítica y combinandolas en condiciones apropiadas para reconstituir la holoenzima (24,25). Cabe señalar, sin embargo, que no está definitivamente aclarado si en todos los casos esta recombinación reproduce en todos los aspectos la holoenzima nativa.

II-2-Subunidad regulatoria

Para dilucidar el rol biológico de las isoenzimas I y II y estudiar en profundidad el mecanismo de activación de la quinasa se necesitó contar con técnicas simples y rápidas para la preparación de subunidades regulatorias y catalíticas homogéneas (26). La subunidad regulatoria pura se puede obtener fácilmente por cromatografía de afinidad utilizando análogos del AMPc inmovilizados en agarosa (27,29). Ambas subunidades RI y RII se pueden preparar homogéneas con esta técnica pero es conveniente utilizar diferentes ligandos para cada una (26). RI y RII pueden ser eluidas de las resinas de afinidad con urea 8 M ó con AMPc. El primer método tiene la ventaja de proporcionar R libre del nucleótido cíclico pero sus propiedades pueden alterarse aun cuando se la libere totalmente de la urea; la elución con AMPc evita estos inconvenientes pero la remoción del AMPc de la subunidad regulatoria es muy dificultosa y acarrea pérdidas parciales de la actividad receptora (14).

II-3-Subunidad catalítica

Se logró purificarla a partir de un gran número de tejidos (30). Los procedimientos de purificación más eficientes se basan en el comportamiento diferente de la holoenzima y de R

respecto de C frente al intercambio iónico y también en que las holoenzimas se disocian en sus subunidades específicamente en presencia de AMPc o análogos (31,32).

La subunidad catalítica se puede obtener homogénea por dos vías de aproximación diferentes : una es tratando una preparación parcialmente purificada de holoenzima I ó II con AMPc antes del pasaje por CM-celulosa que une C pero no R (33,34); la otra es tratando con AMPc y uniendo a DEAE-celulosa toda la proteína menos la subunidad catalítica que se produjo por disociación (28). La preparación se termina con un paso ulterior de concentración o purificación según sea necesario utilizando ó hidroxilapatita (34), ó CM-celulosa (16) o filtración molecular por Sephadex G-100 o azul de dextrano (35).

III-CARACTERIZACION Y PROPIEDADES FISICAS DE LA QUINASA

DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMPc

III-1-Subunidad catalítica

Las subunidades catalíticas de las isoenzimas son indistinguibles respecto de sus propiedades por un gran número de criterios : cromatográficos, químicos, físicos,

inmunológicos y catalíticos. Además pueden reasociarse en forma cruzada con las subunidades regulatorias I y II (30,34). Sudgen y col. demostraron la existencia de tres formas de C con diferentes puntos isoeléctricos provenientes de la holoenzima II de hígado bovino (34). Kumon y col. (36,38) describieron dos formas con puntos isoeléctricos de 7,4 y 8,2 para las C provenientes de las holoenzimas de tipo II respectivamente en hígado de rata. Recientemente se descubrió que hay por lo menos dos genes bovinos que codifican para la subunidad catalítica (39). Es posible que los productos de estos dos genes secuenciados por Uhler y col. (39) correspondan a las dos formas con distintos puntos isoeléctricos hallados por Kumon en hígado de rata ya que las proteínas esperadas en teoría para los genes darían mapas tripticos y puntos isoeléctricos diferentes. Los datos de peso molecular obtenidos para subunidad catalítica de la holoenzima de tipo II de corazón bovino calculado por : electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, a partir del Radio de Stokes y el coeficiente de sedimentación y el que se deduce de la secuencia de aminoácidos indican que se trata de una proteína globular de 40KD(34).

III-2-Subunidad regulatoria

La purificación a homogeneidad de las subunidades regulatorias I y II de diversas fuentes permitió encarar estudios estructurales de las mismas.

Así se demostró que subunidades regulatorias del tipo I y II poseen una estructura dimérica formada por dos monómeros iguales unidos entre sí por una zona cercana al amino terminal. La proteólisis controlada proporcionó información muy valiosa sobre los dominios funcionales de la molécula (40). La comparación de las actividades de los fragmentos proteolíticos con las funciones de la proteína nativa permitió establecer para ^{la} subunidad regulatoria los siguientes dominios funcionales : desde el carboxilo terminal dos sitios de unión para el AMPc, una zona correspondiente al dominio de interacción con C y al sitio de fosforilación y el sitio de dimerización cercano al amino terminal. Se ha determinado que existe un gen para RI y al menos dos genes para RII. Se ha clonado el gen de la subunidad regulatoria I de testículo bovino (39) y uno de tipo II de ovario de rata (41). El gen identificado para la de tipo I codifica para una proteína que tiene la misma secuencia de

aminoácidos que la de RI de músculo esquelético y a su vez el ADN que corresponde a la de tipo II lo hace para una proteína de 52KD de peso molecular que ^{es} homóloga pero diferente de la RII de corazón bovino (42). Estas dos subunidades regulatorias del tipo II tienen se cu en ci as de am ino ác id os se me ja nt es en las zo nas de am ino y el car bo xi terminal y dos se cu en ci as du p li ca das que pod rí an ser los dom in ios de un i ón al AMPc. Estas secuencias duplicadas y las que rodean al si ti o de fos fo ri l a ci ón son las que dife re nc ian a las dos pro te í nas (42). Cada monómero de la subunidad regulatoria RI ó RII tiene dos dife re nt es cl as es de s i t ios de un i ón para el AMPc (43,44). Es prec is am en te en los dom in ios de un i ón con el AMPc en don de la hom ol og ía de las se cu en ci as de RI y RII son m ás fu er tes. Las secuencias de otros dom in ios est án men os con ser va das (45) y amb as sub un id ades o sus res pec t iv as hol oen z imas pued en dife re nc ia rse entre si por car ac ter íst icas fí s ic as, in mun ol óg ic as y cin ét ic as (13). Las descripciones de la sub un id ad reg ul ato ria de tipo II en tér mi nos de radio ax ial y co ef ic ie n te fr ic ci on al ind ican una estruct ura obl on ga y as im é tr ica (46). RI es un poco menos as im é tr ica (47). Los pesos moleculares determinados rec ien tem ente por se cu en ci as de am ino ác id os dan un valor de 42804 para RI

y algo mayor para RII: 45004 (46). Los datos de peso molecular aparentes para las RI y RII obtenidos de los parámetros hidrodinámicos difieren según el tejido del que provienen y la metodología utilizada, pero siempre los valores para las RI son menores que para las RII (47,49).

III-3. Holoenzima

Las holoenzimas de tipo I y de tipo II tienen distintos determinantes antigénicos (50,53). Cada tipo de holoenzima o su subunidad regulatoria, usada como antígeno, produce anticuerpos que reconocen a R. Sin embargo para generar anticuerpos contra C es necesario utilizar C libre como antígeno. Los antisueros son específicos de isoenzima pero carecen de especificidad de especie en mamíferos (50). Weldon y col. (54) prepararon anticuerpos monoclonales contra RII de corazón bovino cuyo sitio antigénico está localizado en una región que comprende al sitio de dimerización, al de fosforilación y a uno de los sitios de unión con el AMPc. Esta secuencia está conservada en la isoenzima de corazón porcino y es reconocida con afinidad parecida en ambas especies por un solo Ac monoclonal.

Hay diferencias cinéticas importantes entre las isoenzimas de tipo I y II y son éstas las que más se usan para distinguir las cuando ambas están presentes en una misma preparación (56). La holoenzima I se

disocia en presencia de histona ó alta sal (15,56) y esa disociación se previene con ATP-Mg; las subunidades se reasocian lentamente en presencia o ausencia de sal. La holoenzima II se disocia solamente por AMPc, este proceso no es influenciado por ATP-Mg, se reasocia rápidamente en ausencia de sal y lentamente en presencia de sal. La presencia de fosfato en el sitio de fosforilación de RII (46) aumenta la constante de disociación para R_2C_2 y baja la velocidad de reasociación (57,59).

Una diferencia muy importante entre las enzimas I y II es la susceptibilidad de sus subunidades regulatorias a ser fosforiladas. La quinasa de tipo II es capaz de autofosforilarse, incorpora el fosfato γ - del ATP a su propia molécula mediante un mecanismo intramolecular, (19,60). La quinasa del tipo I no se autofosforila aunque RI al igual que RII puede ser fosforilada in vitro por quinasas independientes de AMPc (61,62). Aunque todavía no está claro el significado biológico de la autofosforilación se aceptan algunas propuestas que intentan explicarlo. Rangel Aldao y col. (59), propusieron que la holoenzima de tipo II existe in vitro en la forma fosforilada lo que aparentemente favorece la disociación. Recientemente Scott y Mumby (63) demostraron que en el músculo liso existen las formas fosforilada y

defosforilada de RII y que las cantidades relativas de ambas se modifican por el AMPc intracelular.

El uso de análogos de AMPc permitió encontrar diferencias en la cinética de unión del nucleótido a las quinasas del tipo I o del tipo II. Los oxígenos 3' y 5' de la ribosa del AMPc son ambos importantes para activar ambas isoenzimas. El uso de análogos sustituidos con sulfuro en esas posiciones evidenció diferencias existentes en las isoenzimas, en uno o en los dos sitios de unión que reconocen al anillo de ribosa y el fosfato cíclico (64). Ogreid y col. (65) comunicaron un estudio muy completo que consiste en la prueba de 100 análogos del AMPc ensayados para activar las holoenzimas del tipo I y II. Las diferencias más importantes entre las cinéticas de unión al AMPc de las isoenzimas se hacen evidentes cuando se estudian conjuntamente ambos sitios. (Fig.2). Para ambas holoenzimas el sitio 1 tiene velocidad de disociación lenta y una selectividad relativa para el C₈ de la base (análogos sustituidos en C₈). El sitio 2 tiene alta velocidad de disociación y selectividad relativa para análogos modificados en la posición C₆ (análogos C₆) (44,47,66,68). Los experimentos de unión realizados usando IMPc-(H³), selectivo para el sitio 2, y 8-azido-(P³²)-AMPc selectivo para el sitio 1 permitieron establecer que la unión a cada sitio estimula

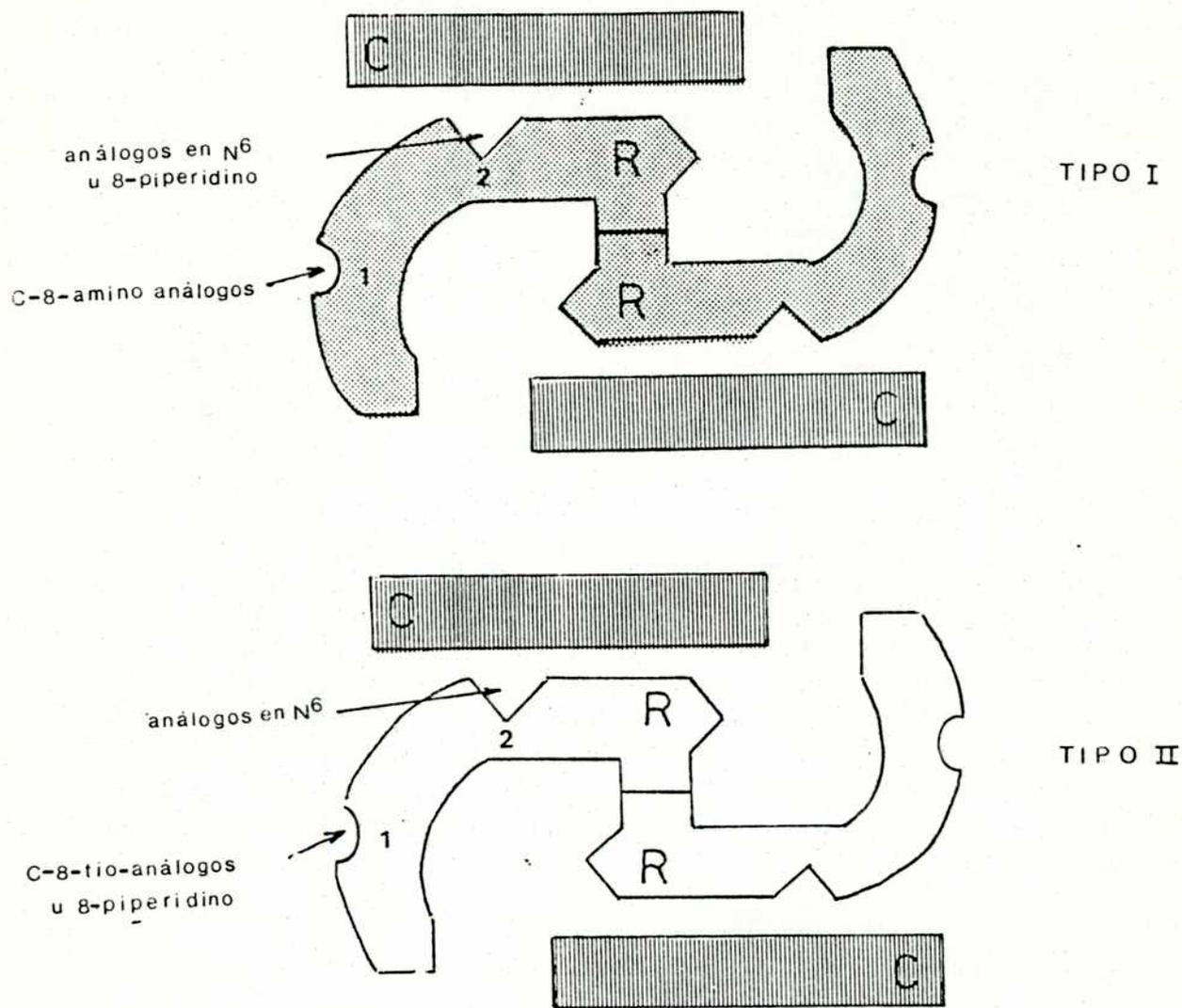


Figura 2- Homologías estructurales propuestas entre las quinasas de proteínas dependientes de AMPc pertenecientes al tipo I y al tipo II. Se indica la selectividad de análogos del AMPc de los dos sitios de unión para el AMPc para ambas subunidades regulatorias R; C: su subunidad catalítica.

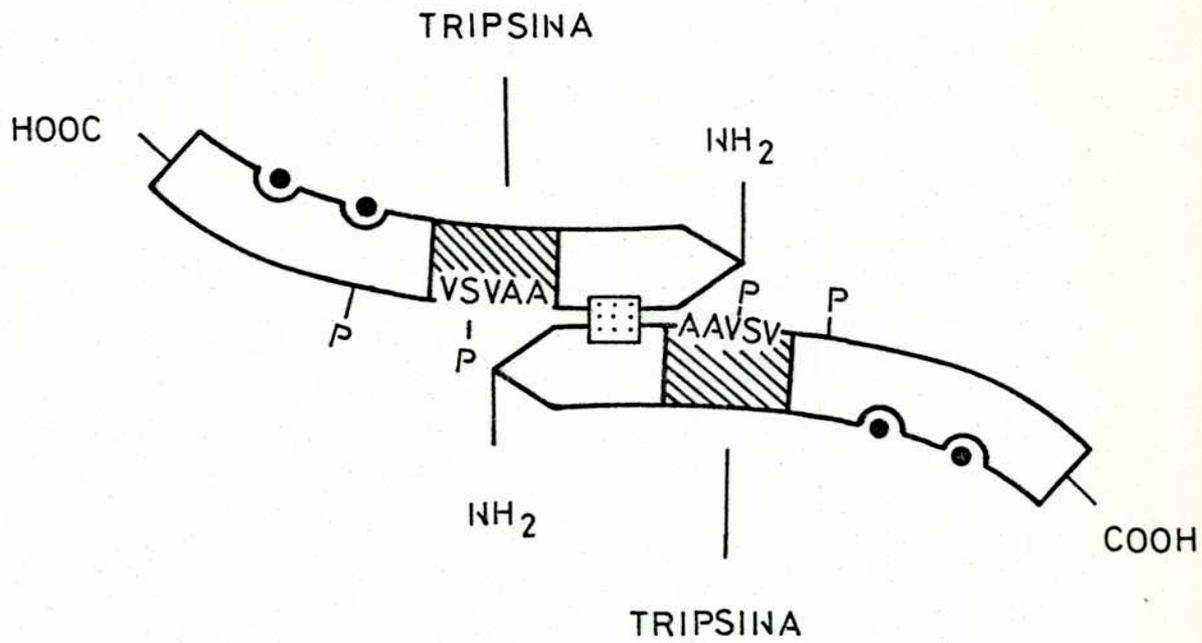
la unión del nucleótido al otro sitio para ambas isoenzimas (68-70). Esta cooperatividad positiva en el ligado se refleja por una cooperatividad positiva en la activación de la quinasa (71). Robinson-Steiner y col. (71) y posteriormente Beebe y col. (72) demostraron un efecto sinérgico en la activación de la quinasa para cada isoenzima usando una combinación de análogos selectivos para los sitios 1 y 2. Aquí aparece entonces la diferencia importante entre ambas isoenzimas y es que para cada una el efecto sinérgico se logra con una combinación de análogos diferente.

Otro hallazgo importante fue el de Ogreid y col. (65) al demostrar que el 8-piperidino-AMPC, un análogo inusual recientemente caracterizado es selectivo del sitio 1 para la RII pero prefiere el sitio 2 en la RI^(Fig.2). Estos autores lograron determinar experimentalmente in vitro cual es la mejor combinación de análogos que debe usarse para conseguir la activación de una sola enzima cuando se trabaja in vivo. El perfeccionamiento de las técnicas de análisis de las estructuras enzimáticas complicaron el panorama establecido por Nimmo y Cohen (73) cuando clasificaron las quinasas de proteínas dependientes de AMPC en I y II. Ahora se sabe que al menos las de tipo II presentan una variedad de formas microheterogéneas. El comportamiento de elución en DEAE-celulosa es diferente para varias isoen-

zimas del tipo II (74). Malkinson y col. (75) presentaron evidencias de que una aparente isoenzima del tipo I de tejido adiposo eluye a una concentración salina más alta de tal modo que contamina la de tipo II. Existen varias comunicaciones de investigadores que purificaron y caracterizaron dos o más isoformas de la quinasa de tipo II (76-78) usando criterios inmunológicos, electroforéticos, marcación por fotoafinidad y fosforilación. Por lo tanto actualmente es necesaria una investigación meticulosa y exhaustiva para identificar una isoenzima.

IV-ANTECEDENTES DE RC

Como se ha dicho la quinasa de proteínas dependiente de AMPc de eucariontes superiores ha sido descrita como un tetrámero R_2C_2 . Potter y col., purificaron a homogeneidad las subunidades regulatorias de las quinasas del tipo I y del tipo II de músculo porcino (79). Encontraron que no obstante las diferencias estructurales existentes entre ellas su comportamiento frente a la acción de las proteasas era muy similar. Mediante la utilización de diversas proteasas generaron fragmentos, los caracterizaron y relacionándolos con su estructura nativa pudieron definir de este modo la estructura general y funcional de zonas o dominios regulatorios de la molécula (40) (Fig. 3). En un trabajo posterior del mismo grupo se demostró que el dímero que constituye la subunidad regulatoria en la isoenzima I está compuesto por dos protómeros unidos covalentemente por una unión disul-



-  AMPc
-  Dominio inhibitorio
-  Dominio de dimerización

Figura 3- Modelo propuesto para la estructura de la subunidad reguladora. AAVSV indica la secuencia primaria arginina-arginina-valina-serina-valina de uno de los sitios de fosforilación.

furo intercatenaria (90).

Se han detectado además varias especies de quinasa que contienen menos de 4 subunidades en tejidos animales, y cuya existencia se atribuye al clivaje proteolítico ocurrido durante el proceso de extracción (19,81).

Vogel y Heinz describieron la estructura dimérica RC para la quinasa de proteínas dependiente de AMPc en hígado bovino (82). La explican como el resultado de proteólisis endógena a partir de la estructura tetramérica clásica. Posteriormente aparecieron varios informes sobre la existencia de holoenzima de tipo II modificada por proteólisis in vitro hasta llegar a una estructura de tipo R'C' en hígado bovino (83), músculo de conejo (84) y corazón bovino (84,85). Estas enzimas se comportan como dímeros en gradientes de sacarosa y en filtración molecular. Reimann (85) demostró una estructura dimérica en corazón bovino lograda por reconstitución a partir de R y C homogéneas. Cabe mencionar aquí la estructura dimérica propuesta por Mutzel y col. (86) para la quinasa del eucarionte inferior Dyctiostelium discoideum.

V- MECANISMO DE ACCION DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE

DE AMPc.

V-1 Mecanismo de acción de la subunidad regulatoria

El mecanismo exacto por el cual la subunidad regulatoria inhibe a la subunidad catalítica está todavía por esclarecerse y hay varios grupos trabajando en el tema.

Sudgen y Corbin en hígado bovino (83), Rannels y col. en músculo de conejo (84) y Reimann (85) en corazón de bovino presentaron resultados confluyentes sobre el producto de proteólisis de la holoenzima de tipo II : en todos los casos se comportó como un dímero del tipo R'C' en gradiente de sacarosa y filtración molecular. Estudiando en detalle el dímero de músculo de conejo y de corazón bovino (84,85) se pudo establecer que las proteasas actúan sobre el cuarto de molécula que corresponde al amino terminal y que el fragmento monomérico carboxilo terminal contiene los dos sitios de unión para el AMPc, el sitio de autofosforilación, y su capacidad de inhibir la subunidad catalítica. La figura 4 ilustra estos resultados. Se propuso entonces que aunque la estructura dimérica nativa de la subunidad regulatoria está altamente conservada el monómero es suficiente para la acción inhibitoria.

El o los dominios inhibitorios de RII están contenidos alrededor del sitio de autofosforilación como sugieren los resultados de los experimentos en que al modificar esta región se pierde la actividad in

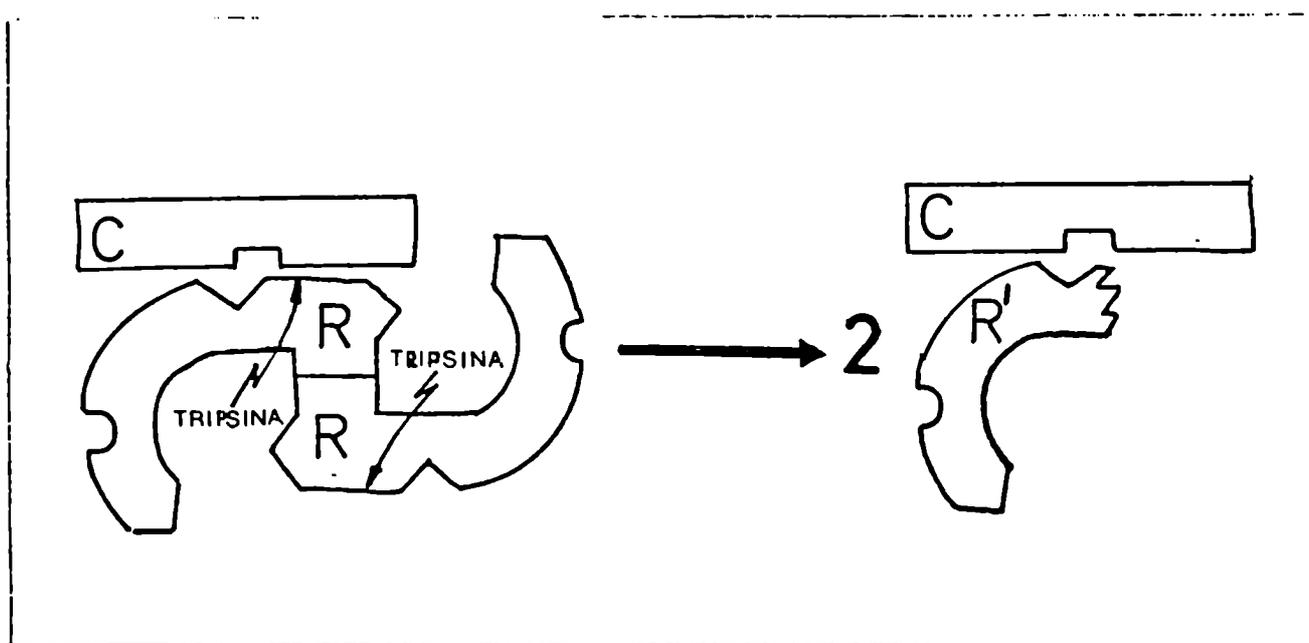


Figura 4- Formación de un dímero funcionalmente competente por tratamiento con tripsina de la especie tetramérica.

h inhibitoria (14,57,87,88).

Flockhart y Corbin sugieren que la subunidad regulatoria inhibe C actuando como un "sustrato análogo" de alta afinidad que tapa el sitio de unión del sustrato peptídico a la subunidad catalítica.

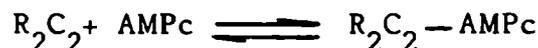
El sitio de autofosforilación sería el sustrato análogo en cuestión.

Granot y col (87) por estudios de resonancia magnética consideraron a RII como un sustrato de punto final ya que la holoenzima respectiva une ADP-Mg con alta afinidad. Un hecho interesante que sustenta la teoría del sustrato análogo para RII es que la desnaturalización térmica de la misma destruye la actividad inhibitoria de R pero no su capacidad de actuar como sustrato de autofosforilación (88).

Estos hechos tomados en conjunto demostrarían que la autofosforilación de RII no bloquea el sitio de unión de ATP-Mg a C pero sí el sitio de unión del sustrato proteico. En tejidos de mamíferos se ha caracterizado una proteína termoestable inhibitoria de la actividad de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc, con alta afinidad por la misma (89-91). Este inhibidor ha sido útil en los estudios del mecanismo de acción y rol celular de la quinasa; es probable que actúe como un análogo del sustrato (o inhibidor competitivo)(92). Scott y col. estudiaron la secuencia de aminoácidos de un fragmento de proteólisis del inhibidor que retiene su capacidad inhibitoria (93) y encontraron secuencias análogas a las de sustratos conocidos. Lograron

sintetizar un peptido fuertemente inhibidor de la quinasa ($K_i=0,8 \mu\text{M}$) cuya secuencia de aminoácidos corresponde a los 20 primeros aminoácidos del fragmento obtenido por proteólisis. Dicha secuencia es semejante a otra contenida en el dominio que inhibe a C en la subunidad regulatoria.

Los estudios cinéticos llevados a cabo por varios autores (94-97) indican que durante la activación de la holoenzima se forma un complejo ternario y proponen que la formación de dicho complejo es un paso intermedio de la disociación:



Cobb y colaboradores (23), usando HPLC-DEAE lograron separar y caracterizar un complejo ternario formado por R y C dependiente de AMPc en la actividad fosfotransferasa y con la mitad de sus sitios ocupados con AMPc. Connelly y col. (98) identificaron y aislaron un complejo ternario estable entre AMPc y una especie trimérica del tipo R_2C pero a diferencia del de Cobb y col. éste se formó durante la reasociación de la subunidad catalítica y la subunidad regulatoria a partir de C de corazón bovino y de $R_2 - \text{AMPc}$.

Se propone entonces que al AMPc se liga "paso a paso" a los 4 sitios de unión de la holoenzima. La cinética de unión presenta cooperatividad positiva con constantes de Hill de 1,6-1,8 para la activación de

la quinasa (13). Esta cooperatividad se demuestra en una forma más directa usando análogos selectivos de sitio; se ve que la unión de un nucleótido cíclico a uno de los dos sitios intra-subunidad de la subunidad regulatoria tiene un gran efecto estimulador sobre la unión al otro (69).

Los resultados de varios experimentos hechos con holoenzima II sugieren que la unión al sitio 2 está bloqueada por la subunidad catalítica pero este sitio se hace accesible por la ocupancia del sitio 1 (64). Probablemente el AMPc se una primero al sitio 1 y entonces estimule la unión al 2. Cuando Doskeland y Ogreid (99) usaron R1 libre para experimentos de disociación del AMPc unido a la subunidad regulatoria encontraron que cuando está ocupado el sitio 2 la disociación del AMPc del sitio 1 se retarda. Esta característica puede explicar en parte la estimulación del ligado al sitio 1 y al sitio 2.

No está claro del todo el mecanismo exacto por el cual la unión del AMPc a la enzima causa su activación pero sí se puede afirmar que ambos sitios de una subunidad están implicados en la activación (14,71,100). Queda por dilucidar si están directamente involucrados ambos o si el ligado a un sitio sirve simplemente como estímulo pa_

ra que pueda ligarse al otro.

Los estudios de espectroscopía de fluorescencia de Seville y colaboradores (101) demostrarían que la unión de dos moléculas de AMPc bastarían para causar la disociación de las dos C. Desde el hallazgo del heterodímero RC se lo ha propuesto como la unidad funcional de la enzima lo que implica que una C es reemplazada por vez del tetrámero nativo durante la activación por AMPc.

Para concluir hay que mencionar los estudios de Brostrom y Corbin (102) sobre el efecto estimulador del agregado de C en la disociación del AMPc de la subunidad regulatoria. Para la subunidad regulatoria de tipo I este proceso es estimulado por ATP-Mg.

Y-2 Mecanismo de acción de la subunidad catalítica

Lincoln y Corbin estudiaron exhaustivamente el mecanismo de acción de la subunidad catalítica y publicaron una recopilación de los hallazgos más importantes (103). Las evidencias indican que la subunidad catalítica tiene un único sitio activo. El monómero incorpora un único sustituyente cuando se lo marca por fotoafinidad con el 2', 5'-dialdehído derivado de ATP (104). También puede marcarse C en un único sitio con o-ftalaldehído (105) o con sustratos peptídicos que tienen grupos tales como 3-p-nitro-2-piridinsulfenilo (106).

De las investigaciones de varios grupos pudo conocerse que los agentes químicos que modifican los grupos sulfhidrilos inhiben la actividad de C y que el ATP-Mg previene esta inhibición (33,107,108). Bramson y col. (106) proponen la existencia de cisteína en el sitio activo.

Hay estudios de especificidad de análogos del ATP y de RMN que permiten conocer la geometría que adopta este nucleótido al unirse al sitio activo. (109)

A pesar de que desde los primeros estudios sobre la quinasa de proteínas dependiente de AMPc numerosos grupos de investigadores se abocaron a dilucidar el mecanismo por el cual la subunidad catalítica cataliza la transferencia de fosfato- γ del ATP al sustrato protéico (110-114) recién en 1983 Whitehouse y col. aclararon esta cuestión (114). Analizaron el mecanismo de la reacción usando C, ATP-Mg, sustrato peptídico, análogos del sustrato protéico e inhibidor de la quinasa y concluyeron que la cinética del estado estacionario sigue un mecanismo ordenado Bi-Bi en el cual el ATP-Mg se liga primero. Proponen un cambio conformacional debido a la unión del ATP-Mg per se o al subsiguiente ligado del sustrato protéico. Así procede la catalísis liberándose secuencialmente el sustrato fosforilado y el ADP-Mg. Es bien conocido que la subunidad catalítica requiere de un sustrato que po

sea en su composición un par de aminoácidos básicos del lado del amino terminal de las serinas o treoninas fosforilables, esta especificidad de sustrato se extiende a las quinasas dependientes de GMPc. Los mejores sustratos son entonces pequeños péptidos con secuencias de aminoácidos de este tipo.

Reed y Kinzel (115) estudiaron el mecanismo de unión de C al sustrato protéico y concluyeron que de esta unión resulta un cambio conformacional en el sitio de unión para el ATP. Este cambio aparentemente ocurre en dos pasos, uno dependiente de la presencia de serina o treonina fosforilable en el sustrato y el segundo del par de aminoácidos básicos. Además, los resultados de experimentos de competición con el inhibidor protéico les permitieron postular que el sitio de unión se cierra sobre la proteína sustrato como paso posterior a la unión inicial.

VI-QUINASAS DE PROTEINAS DEPENDIENTES DE AMPc EN EUCARIONTES INFERIORES

En organismos eucariontes inferiores se estudiaron las quinasas de proteínas dependientes de AMPc fundamentalmente con el propósito de determinar si los receptores para el nucleótido cíclico en estos organismos se asemejan o no en estructura y función a los de

eucariontes superiores. Los estudios más importantes han sido los de Hixon y Krebs (116) y Uno e Ishikawa (117,118) en Saccharomices cerevisiae, los de Trevilliant y Pall (119) y Torres y col. (120) en Neurospora crassa, los de Maia y col. (121,123) en Blastocladiella emersonii y los de Majerfeld y col. (124) y Gunzburg y col. (125) en Dyctiostelium discoideum. La estructura de la enzima en todos estos organismos parece ser tetramérica excepto la de D. discoideum descrita como dimérica por Mutzel y col. (86)

Para la enzima de N. crassa se han descrito 4 sitios de unión para el AMPc por dímero de subunidad regulatoria (119), mientras que en S. Cerevisiae parecería existir solo dos sitios de unión para el AMPc en el dímero de R (116).

Muy recientemente se reportó el clonado y secuenciación de la subunidad regulatoria de D. discoideum (86) y de S. cerevisiae (126,127).

De dichos estudios se han sacado importantes conclusiones sobre los dominios funcionales de las subunidades regulatorias.

En S. cerevisiae existe un 40% de homología con las secuencias de las RI y RII de mamíferos, especialmente en las zonas de unión del AMPc y en el dominio de fosforilación y de interacción con la subunidad catalítica. En D. discoideum existirían al menos los dominios correspondientes a los sitios de unión con el AMPc, los sitios de fosforilación y dominio de

de interacción con la subunidad catalítica. Faltaría el dominio correspondiente a la zona de dimerización lo cual estaría de acuerdo con la estructura monomérica de R propuesta por Mutzel y col (86).

VII - RELACION EVOLUTIVA ENTRE PROTEINAS RECEPTORAS DE AMPc Y QUINASAS DE PROTEINAS

En 1983, Lincoln y Corbin (128) propusieron un modelo para demostrar homología estructural entre quinasas dependientes de AMPc y quinasas dependientes de GMPc. Posteriormente se sugirió que los dos sitios de unión a nucleótidos cíclicos intrasubunidad en las dos proteínas se habrían producido evolutivamente a partir de duplicación de genes contiguos (15,64,128). Takio y col. (46) trabajando con corazón bovino probaron que estas dos quinasas tenían secuencias de aminoácidos con alto grado de homología en ambas R y en ambas C y propusieron un progenitor común. Respecto del componente regulatorio, hay homología en las secuencias que corresponden a los dominios que intervienen en la unión a los nucleótidos cíclicos, y entre los dos sitios de unión intrasubunidad. En cambio hay menos homología aparente en la secuencia primaria que corresponde al

dominio de dimerización.

Las subunidades regulatorias de las dos más importantes formas de isoenzimas de las quinasas dependientes de AMPc de tipo I y de tipo II exhiben fuerte homología aunque no está enteramente conservada la secuencia primaria de dicha subunidad (45).

Beebe y Corbin, proponen en un trabajo no publicado aún que los componentes regulatorio y catalítico de las quinasas dependientes de AMPc han evolucionado independientemente ya que no hay homología de secuencia aparente entre ambos: cada una es miembro de una u otra de dos diferentes familias, la familia de las proteínas ligantes de AMPc y la familia de las quinasas de proteínas.

No hay evidencias concretas de la existencia de quinasas de proteínas dependientes de AMPc en procariontes pero estos organismos contienen una proteína receptora de AMPc conocida como CRP. (101, 102, 129,130).

De acuerdo a Corbin esta proteína cumpliría en Escherichia coli un rol similar al que subunidad regulatoria de la quinasa dependiente de AMPc cumple en el hígado de mamíferos. Cuando en la célula procarionte baja la disponibilidad de azúcar sube el nivel del AMPc intracelular, se liga a la proteína receptora y esto lleva a un aumen-

to en la disponibilidad de azúcar. En hígado de mamíferos el azúcar disponible en sangre aumenta por incremento de la glucógenolisis y la gluconogénesis (mecanismo en cascada cíclico); en bacterias en cambio ocurre por la activación de un operón (regulación catabólica) para varias proteínas implicadas en el transporte y la utilización de azúcar. Ambos procesos están mediados por el AMPc unido a la proteína receptora.

La proteína CRP tiene un dominio que corresponde al sitio de unión al AMPc y un dominio cercano al carboxilo terminal por el que se une al ADN y regula la expresión génica. Este dominio precisamente tiene homología estructural y de secuencia con proteínas que se unen específicamente al ADN tales como un represor viral (131) y otro bacteriano (132).

El dominio que corresponde al sitio de unión con el AMPc en la CRP tiene un alto grado de homología con los dominios de unión al nucleótido de las subunidades regulatorias de las quinasas de proteínas dependientes de AMPc (133).

Pabo y Lewis (132) determinaron que la proteína CRP es un dímero asimétrico formado por dos subunidades iguales cada una de las cuales une una molécula de AMPc.

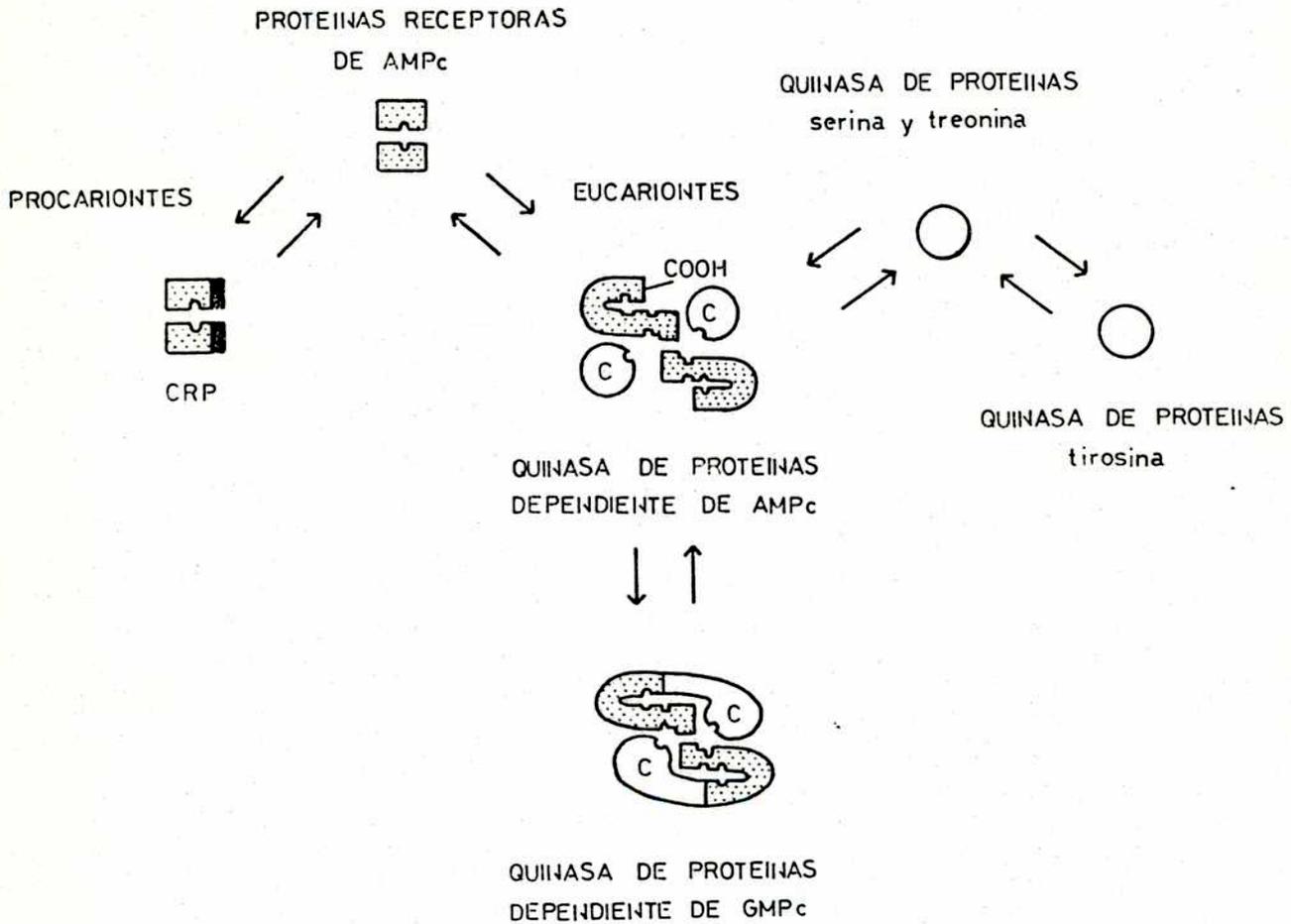


Figura 5- Posible ruta evolutiva entre proteínas receptoras de nucleótidos cíclicos y quinasas de proteínas. En la proteína CRP se indica con una barra negra el sitio de unión al ADN.

La unión del AMPc a la CRP exhibe cooperatividad (134). Esto es semejante a lo que ocurre con los dos sitios intrasubunidad del componente regulatorio de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc. Se sugiere entonces que un posible precursor evolutivo de los sitios de unión al AMPc es un dímero asimétrico (Fig.5).

La proteína CRP podría haber evolucionado a partir del mismo adquiriendo un dominio para el sitio de unión al ADN por fusión génica. La subunidad regulatoria podría haber evolucionado a partir de éste adquiriendo al menos un dominio para la unión con C y otro para la dimerización del lado del amino terminal. Por duplicación y fusión génica podrían haberse producido dos sitios de unión para el AMPc sobre la cadena proteica, sitios con emplazamientos relativos similares a los del CRP dimérico. Si esta teoría fuese correcta podría servir para explicar que los dos sitios de unión a AMP cíclico en cada subunidad sean cooperativos, estén cerca uno del otro y que cada nucleótido se una a dominios de ambos componentes.

Rangel Aldao y Ruiz (135) describieron en Trypanosoma cruzi, un eucariote inferior parásito, una proteína receptora de AMPc diferente de la quinasa o de la CRP en varios aspectos aunque recientemente se ha logrado detectar una quinasa de proteínas dependiente de AMPc en ese organismo (M.T. Tellez de Iñon, comunicación personal).

La amplia familia de las quinasas incluye entre sus miembros al componente catalítico de las quinasas de proteínas dependientes de AMPc y de GMPc también. Se puede agrupar las quinasas en dos subfamilias según catalicen la transferencia de fosfato del ATP a serina/^ytreonina ó a tirosina. Las quinasas dependientes de AMPc, las dependientes de Ca²⁺ y calmodulina, y otras que catalizan la fosforilación de serina o treonina están relacionadas entre sí por homología en la secuencia de aminoácidos (136). En cambio el grupo que fosforila tirosina está poco relacionado con la subunidad catalítica. Beebe y Corbin en un trabajo en preparación proponen una explicación para la aparición de la actual quinasas de proteínas dependiente de AMPc y es que originariamente la subunidad regulatoria fuese un sustrato de una quinasas relacionada filogenéticamente a C y que a través de mutaciones sucesivas se haya desarrollado tal afinidad que evite en forma competitiva la fosforilación de otros sustratos actuando como un inhibidor competitivo. Avalan esta propuesta dos hechos: 1) El sitio de fosforilación de R está cerca de la región de unión a la subunidad catalítica (137). 2) La autofosforilación demostrada para la quinasas de proteínas de tipo II en varios tejidos (15). Hay otro modelo hipotético propuesto para explicar la evolución

de las subunidades regulatorias de las quinasas de proteínas de AMPc (Fig.6); es el de Mutzel y col. (86) y está basado en estudios comparativos de secuencias de aminoácidos de la subunidad regulatoria de la quinasa de D. discoideum y de la de corazón bovino.

Proponen como punto de partida una proteína ancestral receptora de nucleótidos cíclicos de baja afinidad por el ligando que a través de una serie de eventos genéticos como duplicación, fusión génica y mutación puntual derivó en la subunidad regulatoria actual de la quinasa de mamíferos.

En tanto la estructura descrita para la quinasa de proteínas dependiente de AMPc de D. discoideum es dimérica y R tiene dos diferentes dominios de unión para el AMPc (no demostrado cinéticamente), Mutzel propone que la duplicación génica ocurrida para una putativa proteína ancestral receptora de AMPc tuvo lugar antes de la adquisición del dominio de dimerización.

En este modelo la R de S. cerevisiae figura como un dímero con dos sitios de unión para el AMPc uno solo de alta afinidad en cada subunidad porque se basa en los resultados de experimentos cinéticos.

Ya existen evidencias obtenidas por el análisis estructural de la secuencia de la R levadura (126,127) que prueba la existencia de dos domi-

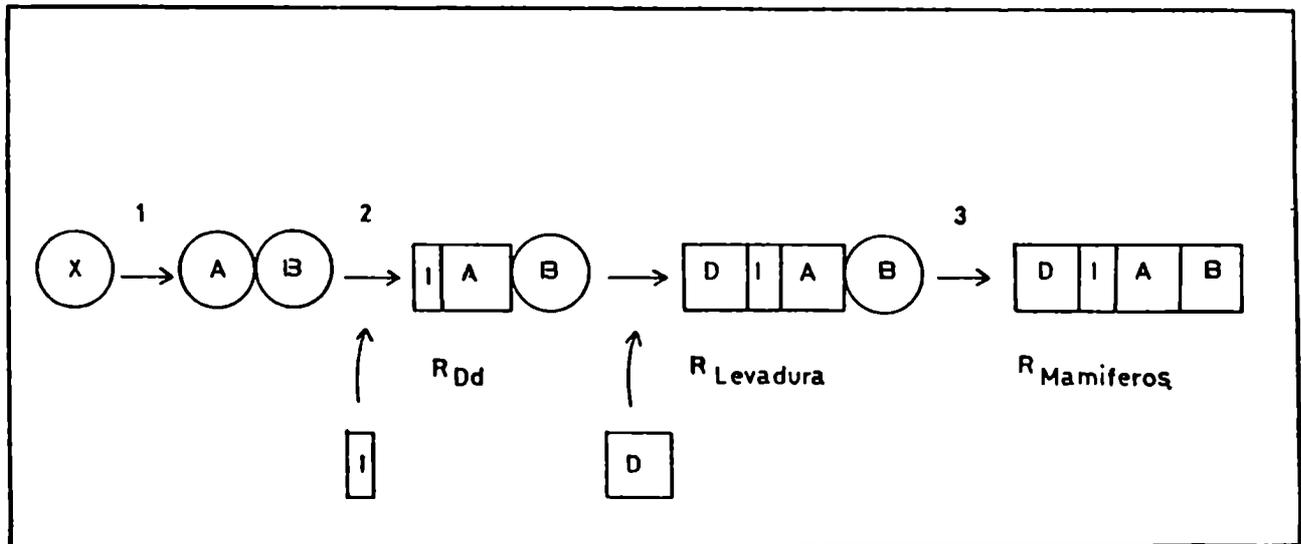


Figura 6- Hipotética ruta evolutiva de la subunidad reguladora de las quinasas de proteínas dependientes de AMPc. Las proteínas se representan como secuencias de dominios funcional y estructuralmente homólogos. Las flechas significan adquisición de nuevas funciones merced a una serie de eventos genéticos. 1: Duplicación; 2: Modificación de A e introducción de I; 3: Modificación de B. La presencia de dos dominios de unión para el AMPc está predicha por el modelo. X: Proteína receptora de AMPc ancestral de baja afinidad; A y B: Dominios de unión para el AMPc de baja afinidad (círculos) y alta afinidad (cuadrados). I: Dominio de interacción con C; D: Dominio de dimerización.

nios de unión para el AMPc con alto grado de homología con la R de co__
razón bovino.

VIII - DIMORFISMO EN MUCOR. ACCION DE AMPc

Mucor es un género de hongos perteneciente a la clase Zigomice__
tes, orden Mucorales, que crece bajo dos formas diferentes según el me__
dio en que se halle. En aerobiosis, en medio sólido o líquido desarrolla
un micelio cenocítico típico produciendo estructuras de reproducción vege__
tativa, las clamidosporas. Bajo ciertas condiciones se producen en los ex__
tremos de las hifas esporangios portadores de esporas asexuales, esporan__
giosporas. La reproducción sexual se produce por copulación gametangial
produciendo una cigospora. En la figura 7 se puede ver el ciclo de vida
aeróbico de este género.

Como una respuesta adaptativa de Mucor a una atmósfera pobre en oxíge__
no aparecen células esféricas o hifas cortas muy engrosadas que se repro__
ducen por gemación. Esta fase levaduriforme desaparece por aereación. Mu
cor resulta así un excelente sistema biológico para el estudio de la dife__
renciación celular a nivel bioquímico.

El fenómeno del dimorfismo se ve influenciado por diversos factores como

los hidratos de carbono (138-139), el metabolismo respiratorio (140), y la síntesis de proteínas (141-144).

Se han realizado importantes adelantos en cuanto a la dilucidación de las bases moleculares de dimorfismo en Mucor estudiando el papel desempeñado por el AMPc. La adición de dibutiril AMPc a cultivos aeróbicos del hongo inhibe el crecimiento apical promoviendo el crecimiento levaduriforme (145). Las células levaduriformes tienen una concentración intracelular de AMPc mayor que la de la forma filamentosa. Durante la aereación de un cultivo levaduriforme los niveles de AMPc disminuyen, disminución esta que precede a la aparición de los tubos germinativos (146). Estos efectos requieren la presencia de un azúcar fermentable en el medio de cultivo.

Paveto y Passeron demostraron en Mucor rouxii la activación in vitro por AMPc de una enzima clave de la glucólisis, la fosfofructoquinasa (147).

De acuerdo a 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 AMPc 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 di

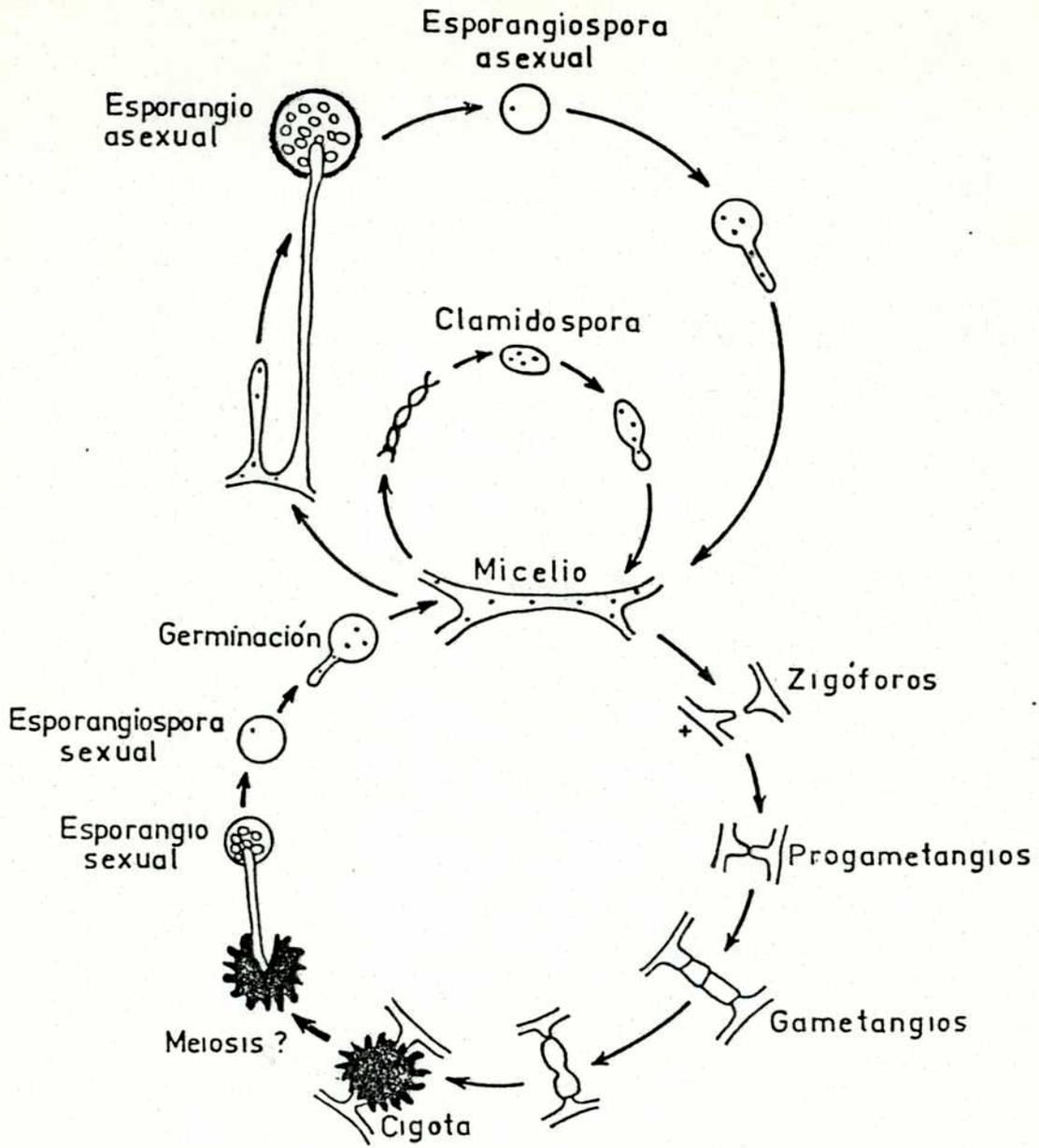


Figura 7- Ciclo de vida aeróbico de Mucor.

morfismo. En la figura 8 puede verse un esquema de los principales factores ambientales y nutricionales que participan en las transiciones dimórficas en M. rouxii. En muchos otros organismos eucariontes inferiores se ha demostrado que el AMPc cumple un papel importante en la diferenciación celular. Así Maia y col. encontraron en el hongo acuático B. emersonii una relación entre los cambios de las concentraciones intracelulares del nucleótido cíclico y la citodiferenciación (148-151). Scott y col. y Torres y col. demostraron en N. crassa que el AMPc es determinante de la morfología (152-155). En D. discoideum Konijn y col. (156) describieron por primera vez la importancia del AMPc en el ciclo de vida.

IX - ENZIMAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DEL AMPc EN M. ROUXII

Cantore y Passeron caracterizaron la enzima adenilato ciclasa en la forma filamentosa del hongo (157). Las propiedades cinéticas de la enzima unida a membrana son similares a las de las ciclasas de otros eucariontes inferiores (158,159).

Passeron y col. estudiaron la fosfodiesterasa de AMPc (160-162). Encontraron que la enzima es específica para el nucleótido cíclico y de al

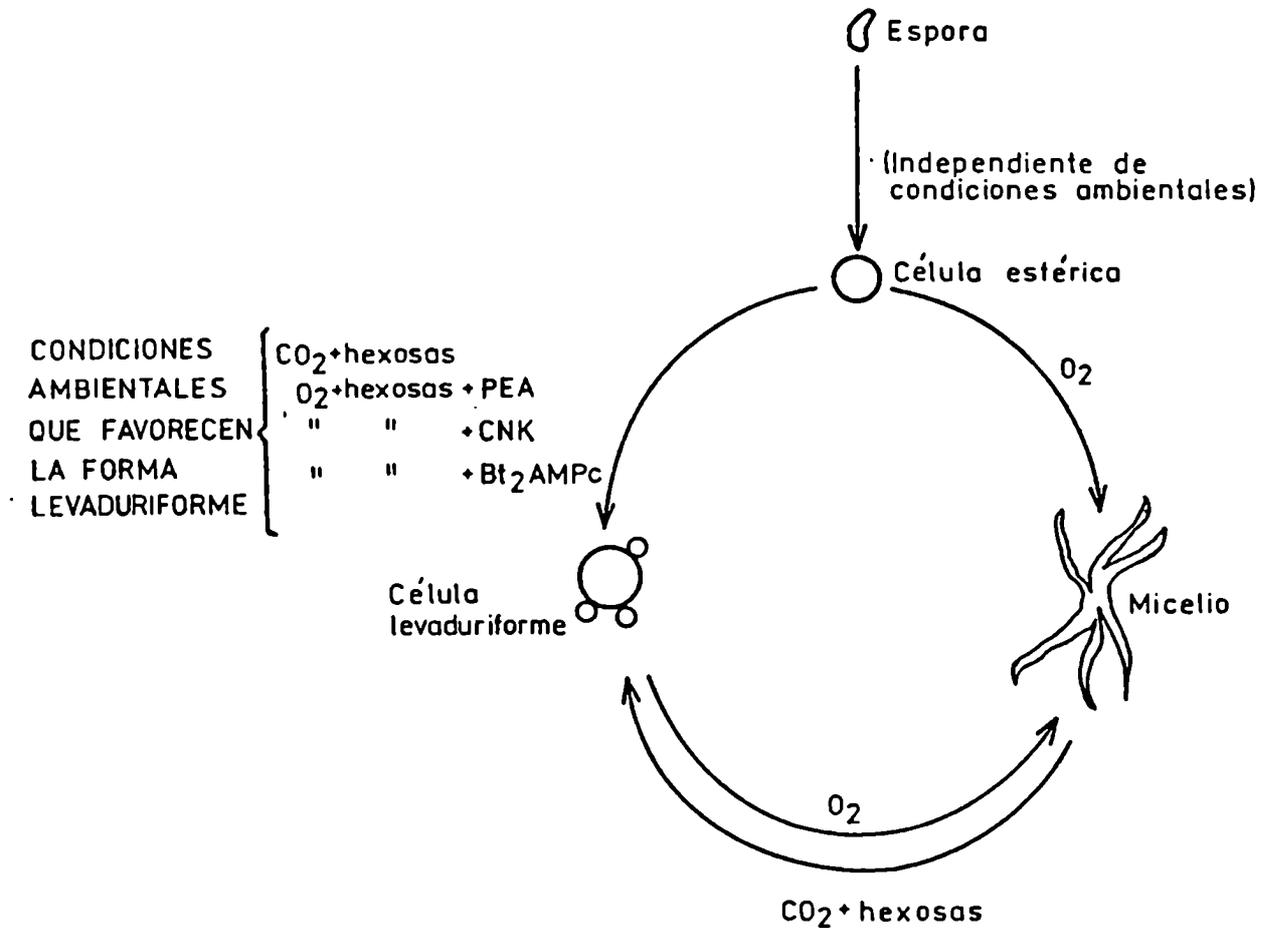


Figura 8-- Ciclo de vida asexual, aeróbico y anaeróbico de M rouxii. Condiciones ambientales y nutricionales que influyen sobre el dimorfismo.

ta afinidad por el mismo. También demostraron por primera vez que la enzima se regula por un mecanismo de fosforilación dependiente de AMPc y por proteólisis controlada.

Seigelchifer y Passeron (163) estudiaron las fosfatasas de fosfoproteínas del hongo. Encontraron dos formas de la enzima interconvertibles susceptibles de ser moduladas por inhibidores endógenos (164).

Passeron y col. encararon el estudio de las quinasas de proteínas en extractos solubles del hongo (165). Encontraron quinasas de caseína y quinasa de proteínas dependiente de AMPc. Posteriormente purificaron parcialmente y caracterizaron esta última enzima (166). Los resultados más importantes obtenidos hasta el momento de realización de esta tesis son los siguientes : a) la quinasa de proteínas eluye de una columna de DEAE-celulosa como las enzimas de tipo II de eucariontes superiores y al igual que las mismas posee una estructura tetramérica del tipo R_2C_2 ; b) presenta la peculiaridad de que no se disocia en presencia de AMPc sólo sino que además requiere la presencia de un sustrato protéico ó $CaCl_2$ 0,5 M; c) se puede demostrar la existencia de complejo ternario holoenzima

AMPc en electroforesis en gel de poliacrilamida y en gradiente de sacarosa (167-168); d) el AMPc unido a la holoenzima se intercambia rápidamente mientras que el nucleótido unido a la subunidad regulatoria libre tiene una velocidad de intercambio baja. También hay evidencias de que el número de moléculas de AMPc que se unen a la holoenzima es la mitad del que lo hace a la subunidad regulatoria (169); e) en base a experimentos de reconstitución de la holoenzima con subunidades catalíticas y regulatorias homóloga y heteróloga se propuso un modelo estructural para la quinasa (Fig.9).

XI- OBJETIVO DE ESTA TESIS

El objetivo de esta tesis se propone ahondar en el mecanismo de activación de la quinasa dependiente de AMPc como paso previo para conocer aspectos de su regulación y su intervención en procesos metabólicos que estarían bajo el control de AMPc.

Los estudios se realizaron con dos enfoques:

- 1) el estudio de la interacción del nucleótido cíclico con la subunidad regulatoria y 2) la caracterización de una especie dimérica como posible intermediario del mecanismo de activación.

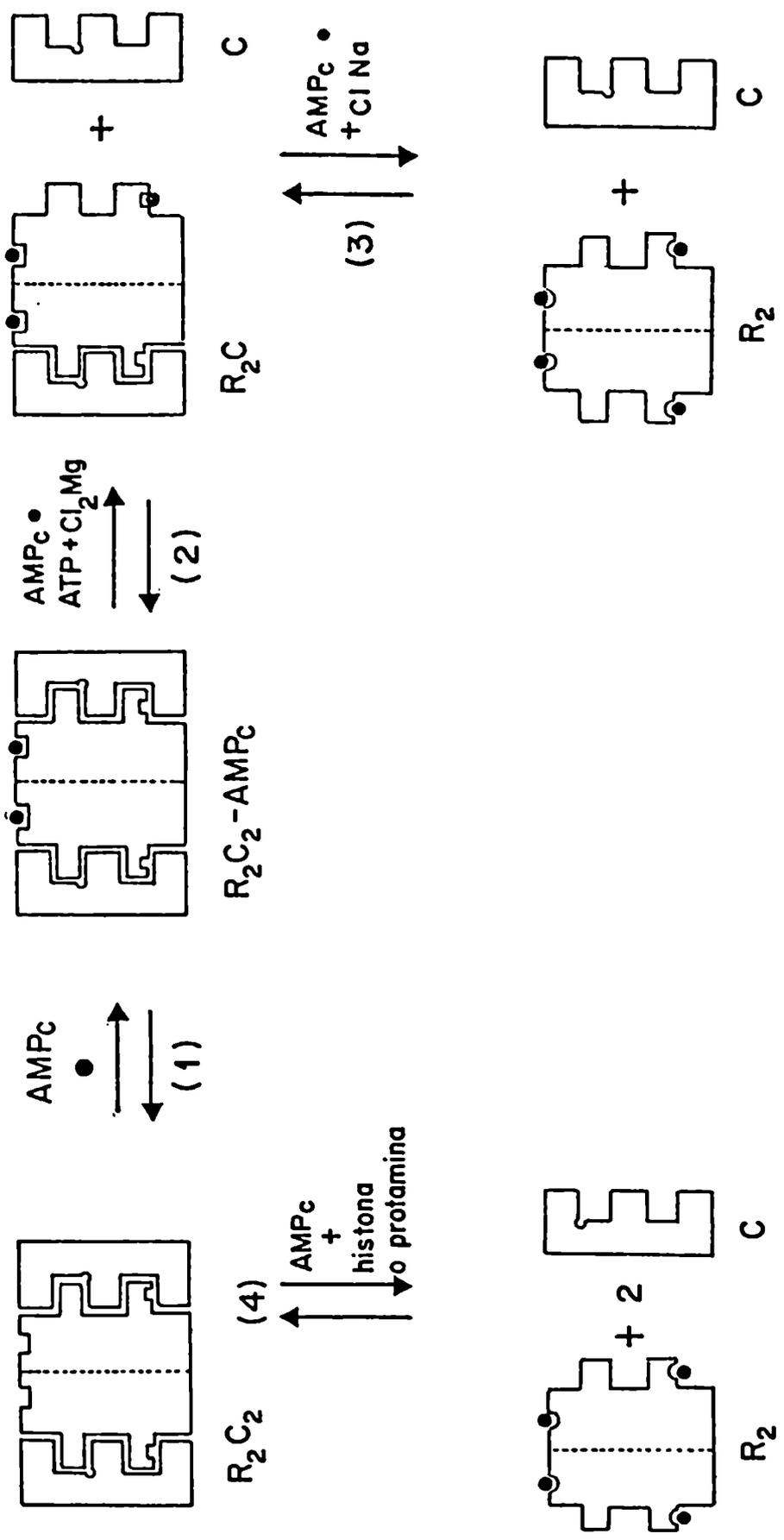


Figura 9- Modelo estructural propuesto para la quinasas de proteínas dependientes de AMPc de Mucor rouxii y de su posible mecanismo de disociación.

LES

MATERIALES Y METODOS

I. Buffers utilizados

Buffer A: Tris-C1H 10 mM pH 7,5, EDTA 1mM, EGTA 4 mM
2-mercaptoetanol 10 mM, azida sódica 1 mM,
PMSF 0,5 mM.

Buffer B: Tris-C1H 50 mM pH 7,5 , EDTA 1 mM, EGTA 4 mM
2-mercaptoetanol 10 mM, azida sódica 1 mM;
PMSF 0,5 mM.

Buffer C: Tris-C1H 20 mM pH 7.

Buffer D: Pipes 10 mM pH 6,3, EDTA 2 mM, 2-mercaptoe__
tanol 2 mM.

II. PREPARACION DE MATERIAL BIOLÓGICO

II.1. Organismo

Durante el presente estudio se utilizó el hongo dimórfico Mucor rouxii (NRRL 1894), cepa original del Dr. W.C. Hesseltine (Northern Utilización Research an Development Division, Peoria, III) cedida por el Dr. Roger Stork (Rice University, Houston, Texas).

II.2. Obtención de esporas y mantenimiento de cepa

Para la obtención de esporas se hizo crecer el hongo en medio de agar 5%-jugo de tomate (1:1). Los dos componentes del medio de

autoclavaron por separado y se mezclaron en caliente; la mezcla se trasvasó inmediatamente a botellas de Roux (50 ml en cada una) y se dejó solidificar. Las botellas se mantuvieron por 24 h a 25°C como prueba de esterilidad. Transcurrido este tiempo se sembró en cada botella 2 ml de una suspensión de esporas de aproximadamente 100 esporas/ml y se incubaron a 30°C durante una noche. Al día siguiente se invirtieron las botellas y se mantuvieron a 30°C durante 4-6 días, transcurridos los cuales se procedió a cosechar las esporas. Para efectuar la cosecha se agregó a cada botella 20 ml de agua destilada estéril y se raspó suavemente la superficie del cultivo con un ansa de vidrio para desprender las esporas de los esporangios. La suspensión así obtenida se filtró estérilmente por una malla de nylon para retener los trozos de medio o el micelio que pudieran haberse desprendido y se recolectaron las esporas por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos. Las esporas se lavaron 3 veces por centrifugaciones y resuspensiones sucesivas, con agua destilada estéril; se contó una alícuota de la suspensión en cámara cuentaglóbulos y se guardó la suspensión a 4°C en fracciones de 3-4 ml en viales de vidrio estériles. En estas condiciones las esporas permanecen viables por 1-2 meses.

Para mantener la cepa se inocularon, al mismo tiempo que las bote

llas de Roux, dos tubos en pico de flauta con medio agar-jugo de tomate; los tubos se incubaron igual que las botellas y una vez producida la esporulación se guardaron en heladera a 4°C.

II.3 Cultivos

El micelio fue crecido en medio YPG (202) que contenía: extracto de levadura (Difco) 0,3%, peptona ó hidrolizado de caseína (Leclerc) 1%, glucosa (Roux Ocefa) 3%. El pH se ajustó a 4,5 con ácido sulfúrico 5N.

Para obtener micelio los cultivos se realizaron en erlenmeyers de 4l conteniendo 2 l de medio YPG. El inóculo fue de $3-5 \times 10^5$ esporas/ml y el cultivo se dejó crecer aeróbicamente con agitación constante por 10 ó 18 h a 28°C (fase logarítmica temprana o tardía respectivamente). El micelio se cosechó por filtración al vacío sobre papel Whatman N°1 y se lavó sobre el filtro con agua destilada fría. Se escurrió la mayor parte del agua retenida presionando el micelio entre 2 hojas de papel de filtro y se lo guardó cortado en trozos a -70°C ó fue usado inmediatamente.

III- OBTENCION DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENE DE AMPc

(HOLOENZIMA)

Todos los pasos se realizaron a 4°C. El micelio crecido 10 h se pulverizó con N₂ líquido y el polvo se suspendió en 3 vol de buffer A

La suspensión se agitó suavemente durante 30 minutos y se la filtró a través de tela de gasa doble y el filtrado se centrifugó a 15000 xg durante 60 minutos. El sobrenadante se sembró en una columna de DEAE-Sepharosa equilibrada con buffer A guardando una relación de 30 mg de proteína/ml de resina empaquetada. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0,4 M de ClNa de buffer A cuyo volumen fue 10 veces mayor que el de la columna y el volumen de las fracciones recogidas igual a un décimo del de la columna con un flujo de 7 minutos por fracción. Las fracciones con actividad quinásica que eluyeron entre 22 y 28 Mho se juntaron y concentraron por precipitación con sulfato de amonio sólido hasta un 60 % de saturación. El precipitado disuelto en buffer B se sembró en una columna de Sephacryl S-300 equilibrada con buffer B. El volumen de siembra fue el 1-2 % del volumen de la columna. La proteína se eluyó con el mismo buffer a un flujo de 10 minutos por fracción y se recogieron fracciones de un centésimo del volumen de la columna. Se juntaron aquellas con actividad de quinasa y se concentró la proteína por diálisis contra una solución saturada de sulfato de amonio preparada en buffer A. Se recogió el precipitado por centrifugación, se resuspendió en buffer^A y se desaló por diálisis contra el mismo buffer. Esta preparación se guardó fraccionada en pequeños volúmenes a -20°C

hasta su utilización. De esta forma se obtuvieron preparaciones enzimáticas que tenían una actividad específica entre 3000 y 4000 unidades/mg de proteína.

IV-PREPARACION DE LA ESPECIE DIMERICA R'C' POR PROTEOLISIS

CONTROLADA

La fracción enzimática obtenida de la Sephacryl S-300 se incubó con solución de tripsina en buffer A durante 8 minutos a 0°C. La proporción de tripsina utilizada fue de 10 µg/mg de proteína enzimática. Se detuvo la reacción por el agregado de 30 µg de inhibidor de tripsina de clara de huevo (ETI) por mg de proteína enzimática. Alícuotas apropiadas se utilizaron para ensayar las actividades de quinasa y receptora de AMPc.

V-PREPARACION DE SUBUNIDAD CATALITICA DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTES DE AMPc

Salvo cuando se indique, todos los pasos de esta purificación se realizaron a 4°C. La preparación de holoenzima proveniente de 150 g de micelio (peso húmedo), purificada parcialmente hasta la etapa de filtración molecular se llevó a pH 6,3 con ácido acético 1N, agregado lentamente, y la suspensión se dejó reposar durante 10 minutos y se centrifugó por 20 minutos a 12000 x g. Se tomó el sobrenadante y

se dializó contra 100 volúmenes de buffer D. El dializado se sembró en una columna de CM-Sephadex equilibrada con el mismo buffer, manteniendo una relación de 3 mg de proteína por ml de resina empaquetada. Se sembró el percolado en una columna de afinidad de AMPc-agarosa de 1 ml, equilibrada con buffer D. Luego de la siembra se lavó la columna con este buffer hasta que la concentración proteica en el eluído fuera menor de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Se eluyó la subunidad catalítica con buffer D conteniendo ClNa 0,5 M, se colectaron fracciones de 0,3 ml, se descartaron las 3 primeras fracciones, se cerró la columna y se la incubó a 20°C durante 5 minutos. Se continuó la elución con la misma solución a t^a ambiente hasta que la actividad quinásica fuera despreciable. Las fracciones obtenidas se llevaron inmediatamente a 4°C, se descartaron aquéllas con una alta relación de proteína/actividad enzimática y se juntaron todas las otras fracciones con actividad quinásica. Estas se dializaron contra buffer D durante 1 hora con cambios de buffer cada 20 minutos. El dializado se sembró en una columna de CM-Sephadex de 0,5 ml equilibrada con buffer D la cual se lavó con 6 volúmenes del mismo buffer. La enzima se eluyó con una solución de ClNa 0.35 M en buffer D. Las fracciones con actividad quinásica se concentraron por diálisis contra sacarosa 2 M preparada en buffer D y se

guardaron a 4°C.

VI- PURIFICACION DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMPc

10 ml de preparación de holoenzima de la etapa de Sephacryl-S 300 aproximadamente con 100 mg. de proteína se sembró en una columna de 5 ml de CM-Sephadex equilibrada con buffer A. Se recogió el percolado y se lo sembró en una columna de AMPc-agarosa de 1 ml. El percolado se descartó y la columna se lavó con el buffer de equilibrio hasta que en el líquido de lavado no se detectó proteína. La columna se lavó entonces con ClNa 0,5 M en buffer A para eliminar de la resina la subunidad catalítica. Este lavado se continuó hasta que no se detectó actividad quinásica en el eluido. Un tercer lavado se efectuó con ClNa 1 M hasta la desaparición de proteína detectable por el método de Bradford en el lavado. El contenido de la columna se volcó en un tubo de ensayo, se le agregó un volumen de buffer A que contenía AMPc 20 mM y ClNa 0,5 mM y se lo incubó durante 1 h a 25°C con agitación constante. La columna se rearmó, se eluyó la totalidad del líquido, se lavo con un volumen más de la mezcla de incubación, se juntaron ambos eluidos y se los concentró por diálisis contra 50 volúmenes de sacarosa 70 % en buffer A. El con__

centrado se dializó contra buffer A durante 24 h con 3 cambios de buffer y se guardó fraccionado a -20°C .

La pureza de la preparación se analizó en geles de poliacrilamida como se describe en la sección VIII.2.

VII- ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA

Esta técnica se utilizó como un paso adicional de purificación de la holoenzima o de la especie dimérica y para determinar los coeficientes de sedimentación de las mismas especies y de sus subunidades. Mediante esta metodología también fue posible visualizar el complejo ternario R'C'-AMPc y estudiar la disociación de ambas especies por sustrato protéico, AMPc ó alta sal.

Se utilizaron gradientes lineales de 5-20% (4,5 ml) de sacarosa preparados en buffer A. Los gradientes se armaron con 7 capas sucesivas una sobre otra de 20, 17,5, 15, 12,5, 10, 7,5 y 5 % cada una de 0,65 ml. Luego de 2 h a t^{a} ambiente los tubos se enfriaron a 4°C para sembrar la muestra inmediatamente antes de la corrida. Los gradientes se centrifugaron en un rotor SW 55 Ti Beckman a 100000 xg durante 16 ó 20 h a 4°C . Después de la corrida se colectaron fracciones de 0,2 ml haciendo sifón desde el fondo del tubo.

VIII - ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

VIII-1. Preparación de los geles

La electroforesis se desarrolló en geles planos verticales de 1,5 mm de espesor. Se prepararon según las instrucciones del manual de Canalco (170) con una concentración de acrilamida más N,N-metilen-bisacrilamida del 7 % (p/v). La corrida en condiciones no desnaturizantes se realizó a 4°C y a temperatura ambiente cuando los geles se hicieron en buffer con SDS (desnaturizantes). Los geles no desnaturizantes se precorrieron durante 2 h en el buffer de armado a 1,2 mA/cm de gel y las corridas fueron de 4 h a 2 mA/cm de gel (hasta que el marcador de frente avanzara unos 8 cm desde el lugar de la siembra).

VIII.2. Tinción de los geles

Se realizó de acuerdo a dos técnicas según se necesitara menor o mayor sensibilidad para detectar cantidades más o menos pequeñas de proteínas.

a) Tinción con Azul de Coomassie: se colocaron los geles en una solución de 0,24 gr de colorante cada 100 ml de una mezcla de metanol: ácido acético: agua (5:1:5) durante 1 hora a 60° C. Después de la tinción se lavaron exhaustivamente con una mezcla de metanol : ácido acético : agua (25:50:825).

b) Tinción con plata: se siguió la técnica de Merrill y col. (171). Se colocaron los geles en TCA 12 % (p/v) durante una hora a temperatura ambiente, se lavaron con agua destilada y se dejaron no menos de dos horas en metanol 50 %. Luego de este tratamiento se sumergieron los geles en una solución de plata amoniacal (preparada agregando gota a gota 4 ml de nitrato de plata 20 % (p/v) sobre 22,4 ml de HONa 0,35 M, HONH₄ 0,92 M y llevando a 100 ml con agua (bidestilada) y se dejaron 15 minutos con agitación constante. Los geles se lavaron en la misma forma con agua destilada durante 5 minutos y finalmente se los sumergió en abundante solución reveladora fresca (citrato de sodio 0,05 ‰) (p/v) formaldehído 0,18 ‰ (v/v) hasta observar la aparición de bandas de proteína coloreadas (aproximadamente 5 minutos). Los geles se secaron al vacío sobre una hoja de papel Whatman N 3.

VIII-3 Medición de actividad receptora de AMPc en los geles

Se cortó el carril correspondiente en secciones de 2 mm de ancho, cada una de las cuales se sumergió en 200 μ l de la siguiente mezcla de extracción : buffer Tris-ClH 2 mM pH 7,2 , EDTA 2 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, albúmina 1 mg/ml y glicerol 20 %. Los tubos se dejaron agitando toda la noche suavemente a 4°C. Se determinó la actividad receptora de AMPc incubando 100 μ l del sobrenadante con

AMPc-(³H) 500 nM (act. sp. 1000 cpm/pmol) durante 10 minutos a 30° C. Se terminó el ensayo como se indica en la sección IX-2 de Materiales y Métodos.

VIII-4. Medición de la radiactividad en los geles

Se cortó el carril correspondiente como se indicó arriba y las secciones se sumergieron en 200 µl de H₂O₂ 30% (p/v) y se calentaron en un baño a 100°C durante 20 minutos para disolver el gel. Transcurrido ese tiempo se trasvasó la solución a viales de plástico conteniendo solución centelladora de tritón-tolueno y se contó la radiactividad de las mismas (sección X-4 de Materiales y Métodos).

IX - ENSAYOS ENZIMATICOS

IX-1. Medición de la actividad quinásica de proteína

Salvo cuando se requirió alguna variación en particular el ensayo se realizó en presencia o ausencia de AMPc 10 µM en la siguiente mezcla de incubación : Tris-ClH 50 mM pH 7,3, Cl₂Mg 10 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, ATP -γ- (P³²) 0,1 mM (200-800 cpm/pmol y kéemptido 0,25 mg/ml en un volúmen final de 0,1 ml. Se incubó durante 10 minutos a 30°C, se detuvo la reacción sembrando 70 µl de la mezcla de incubación en papeles de fosfocelulosa de 2 x 2 cm

los cuales se lavaron por inmersión en abundante solución de ácido fosforico 75 mM tres veces consecutivas y una con etanol 96 %.

Los papeles se secaron con corriente de aire caliente y la radiactividad de los mismos se contó según se describe en la sección X-4 de Materiales y Métodos. Una unidad enzimática se define como los picomoles de P transferidos al kemptido en las condiciones del ensayo.

IX-2. Medición de la actividad receptora de AMPc

La actividad receptora de AMPc se midió por el método de filtración a través de membranas de nitrocelulosa de dos modos diferentes : a) En un volumen final de 50 ul conteniendo AMPc 0,5 μ M (act. sp. 1000 cpm/pmol), buffer Tris-ClH 10 mM pH 7,3 y la alícuota a ensayar cuando quería medirse el AMPc ligado a la holoenzima o a la especie dimérica.

b) En las mismas condiciones que las del ensayo anterior pero conteniendo además la mezcla de incubación 1,5 mg/ml de histona 11-S y ClNa 0,5 M con el fin de provocar la disociación de la enzima para medir el AMPc ligado a la subunidad regulatoria.

En ambos casos las incubaciones se llevaron a cabo durante 10 minutos a 30°C o 60 minutos a 4°C. Cada mezcla de reacción se filtró al vacío por membranas de nitrocelulosa (2x2 cm) y las membranas

se lavaron con 10 ml de buffer C. Se secaron en estufa y se contó la radiactividad de las mismas en solución centelladora de tolueno según se describe en la sección X-4 de Materiales y Métodos.

X- DETERMINACION Y CALCULO DE LOS PARAMETROS FISICOS E HIDRO DINAMICOS DE LA ESPECIE DIMERICA R'C' Y DE SUS SUBUNIDADES

X-1. Radio de Stokes

Para estimar el radio de Stokes de la especie R'C' y de sus subunidades se utilizaron los datos de elución de una columna de Sephacryl S-300 de 36 ml (1x45)cm.

La columna se equilibró con buffer B, el volúmen de exclusión se midió con Azul de Dextrano. Las proteínas marcadoras usadas fueron catalasa (hígado de vaca), fosfatasa alcalina (E.coli), peroxidasa (rábano picante) y citocromo C (corazón equino). El valor del radio de Stokes se obtuvo graficamente según el método de Laurent y Killander (172) representando $(-\log K_{av})^{1/2}$ versus el radio de Stokes de las proteínas marcadoras. El K_{av} se define como la relación:

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

donde V_e = volúmen de elución de la proteína.
na.

Vo = volúmen de exclusión de la columna

Vt = volúmen total de la resina

X-2. Coeficiente de sedimentación (S)

Los valores de coeficientes de sedimentación se obtuvieron a partir de los datos de sedimentación en gradientes de sacarosa. 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 S (173) se obtuvieron los de las proteínas incógnitas por interpolación.

X-3. PESO MOLECULAR

El peso molecular de la especie dimérica R'C' y de sus subunidades fue calculado de acuerdo al método de Siegel y Monty (174) aplicando la fórmula :

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

N= número de Avogadro

η = viscosidad del agua a 20°C

a = radio de Stokes

S = coeficiente de sedimentación

\bar{v} = volumen específico parcial (0,74 cm³/g)

ρ = densidad del agua a 20°C (0,988 g/cm)

X-4. Coeficiente friccional

Para calcular el coeficiente friccional f/f° se utilizaron los parámetros calculados antes (a y PM) aplicando la fórmula de Siegel y Monty (174):

$$f/f_0 = a. \left[\frac{4 \pi \eta N}{3 \bar{v} \rho^{PM}} \right]^{1/3}$$

X-. Parámetros de las proteínas marcadoras

Los parámetros de las proteínas marcadoras utilizadas en los gradientes de sacarosa y en la filtración molecular se resumen en la Tabla I

TABLA I

Parámetros hidrodinámicos y moleculares de las proteínas marcadoras utilizadas.

Proteína	Coefficiente de Sedimentación $S_{20,w}$	Radio de Stokes a (nm)	Peso Molecular (K)
Citocromo C	1,7	1,8	12,4
Catalasa	11,3	5,21	247
Peroxidasa	3,5	3,04	39,8
Fosfatasa alcalina	6,3	2,93	80

Los valores del radio de Stokes (a) se obtuvieron de la fórmula $a = kT/6\pi\eta_{20,w}D_{20,w}$ tomada de Haga y colaboradores (175) utilizando los valores de coeficiente de difusión corregidos ($D_{20,w}$) tabulados (176,177) donde k es la constante de Boltzman, $\eta_{20,w}$ es la viscosidad del agua a 20°C y T es 293° K.

XI DETERMINACION DEL NUMERO DE HILL

La determinación de la constante de Hill para la activación de la holoenzima y del dímero R'C' se efectuó utilizando los datos de sendas curvas de activación por AMPc y la ecuación de Hill (178):

$$\log \frac{v}{V_{\max} - v} = h \cdot \log [S] - \log K$$

donde h es un valor constante función del número de sitios de unión (n) y de la fuerza de interacción entre ellos. Graficando el $\log v/(V_{\max} - v)$ en función del \log de S el valor de n se deriva de la pendiente de la recta; v representa la actividad fosfotransferasica para concentraciones variables de AMPc y V la actividad máxima alcanzada.

XII -OTRAS TECNICAS

XII-1. Determinación de las proteínas marcadoras en geles de filtración molecular y en gradientes de sacarosa

Catalasa: se midió la actividad enzimática valorando el sustrato no consumido (H_2O_2) con solución de IK de acuerdo al método de Terenzi y col. (179).

Citocromo C: se valoró midiendo la absorbancia a 410 nm.

Peroxidasa: se siguió la técnica descrita en el Manual de Worthington (180) midiendo el color desarrollado cuando la o-dianisidina se oxida completamente al descomponerse el H_2O_2 en presencia de la enzima.

Fosfatasa alcalina: se dosó midiendo a 410 nm el p-nitrofenol liberado al tratar el p-nitrofenilfosfato con la enzima según la técnica des

cripta en el Manual de Worthington (180).

XII-2. DOSAJE DE PROTEINAS

La proteína se valoró por el método de Bradford (181) utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

XII-3. SINTESIS DEL ATP - γ -P³²

En líneas generales se siguió la técnica de Glyn y Chappell (182) con las modificaciones introducidas por Chang y col. (183)

XII-4. MEDICION DE LA RADIATIVIDAD

Para el conteo de las muestras radiactivas se utilizó un contador de centelleo líquido marca Packard Tricab Mod. 3003. Las muestras resultantes del ensayo de quinasa y las del ensayo de la actividad receptora de AMPc se contaron en viales de vidrio standard del aparato con la cantidad necesaria de solución centelladora para sumergir totalmente el papel continente de la muestra, la composición de la solución centelladora fue: 0,1 g de dimetil POPOP .1,4-bis 2 (4-metil-5-fenil oxazonil benceno), 4 g de PPO (2,5-difeniloxazol) por litro de tolueno.

La radiactividad del p^{32} se midió con una ganancia del 25% y con una ventana de 50- ∞ . La del H^3 se midió con 60% de ganancia y con una ventana de 50-1000.

XIII-REACTIVOS

El AMPc (H^3) (actividad específica 38 ci/mmol) fue provisto por Radio Cemical Centre (Amersham)

El p^{32} en solución clorhídrica utilizado para la síntesis del ATP - γ - p^{32} se obtuvo de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Los siguientes reactivos fueron provistos por Sigma: citocromo C, albúmina bovina sérica cristalina, las proteínas marcadoras, ATP, AMPc, Tris base, EDTA, SDS, TCA, sulfato de protamina, kémptido, histona tipo II-S, DEAE-Sepharosa, DEAE-celulosa (microgran.), AMPc-agarosa (con el AMPc ligado a la resina por el C_8 a través de un brazo espaciador de 6 átomos de C) y PMSF.

La acrilamida fue provista por Merck, la bisacrilamida por Fluka y el Temed por Eastman-Kodak.

Las siguientes resinas se obtuvieron de Pharmacia (Uppsala): Sephadex G-25 de poro medio, CM-Sephadex C-50 y Sephacryl S-300. Las placas de PEI celulosa fueron de Baker.

El papel de fosfocelulosa fue Whatman y las membrans de nitrocelu_

losa de Schleicher & Schull BA 85 de 0,45 μm de poro.

Los análogos del AMPc fueron gentilmente proporcionados por J.D. Corbin.

El resto de los reactivos utilizados fue de grado analítico.

RESULTADOS Y DISCUSION

I- IDENTIFICACION DE UNA ESPECIE DIMERICA R'C'

I-1. Aparición espontánea

Una preparación de quinasa de la etapa de Sephacryl-S-300 proveniente de un cultivo de 18 h (fase de crecimiento logarítmico tardío) fue analizada en un gradiente de sacarosa y presentó un coeficiente de sedimentación de 4,5 S en vez del esperado 9 S previamente conocido para la holoenzima tetramérica R_2C_2 (184) Fig. 10 (A y B).

Se hizo entonces un nuevo extracto de micelio crecido 18 h para identificar en las etapas previas de purificación de la holoenzima esta especie que sedimenta a menor velocidad. Se observó que la actividad quinásica eluye de una columna de DEAE-Sepharosa como dos picos o un pico con un gran hombro. Esto se ilustra en Fig.11. Si se analiza un gradiente de sacarosa los tubos correspondientes a la actividad máxima de los picos llamados I y II que eluyen a 24 y 30 Mho respectivamente, estos presentan coeficientes de sedi__

Figura 10- Sedimentación en gradiente de sacarosa de las especies dimerica y tetramérica. Centrifugación en gradiente de sacarosa de 5-20 % de la enzima proveniente de un cultivo en fase de crecimiento exponencial (A) y de la enzima proveniente de un cultivo de fase de crecimiento logarítmico tardío (B). Se sembró en cada caso 100 unidades de cada preparación proveniente de la etapa de Sephacryl-S300. En alícuotas adecuadas de cada fracción se midió la actividad quinásica con el ensayo estandar y la actividad receptora de AMPc. La figura C muestra la correlación entre los coeficientes de sedimentación ($S_{20,w}$) y las distancias recorridas desde el sitio de siembra por las proteínas marcadoras (●), por R_2C_2 (◻) y por R'C' (Δ). Como proteínas marcadoras se utilizaron : fosfatasa alcalina, peroxidasa y citocromo C.

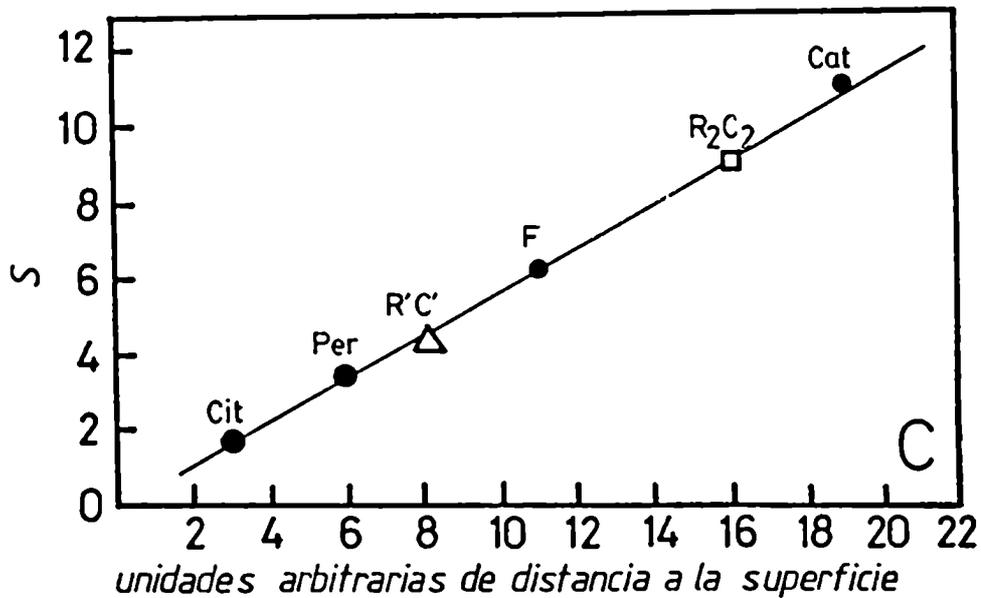
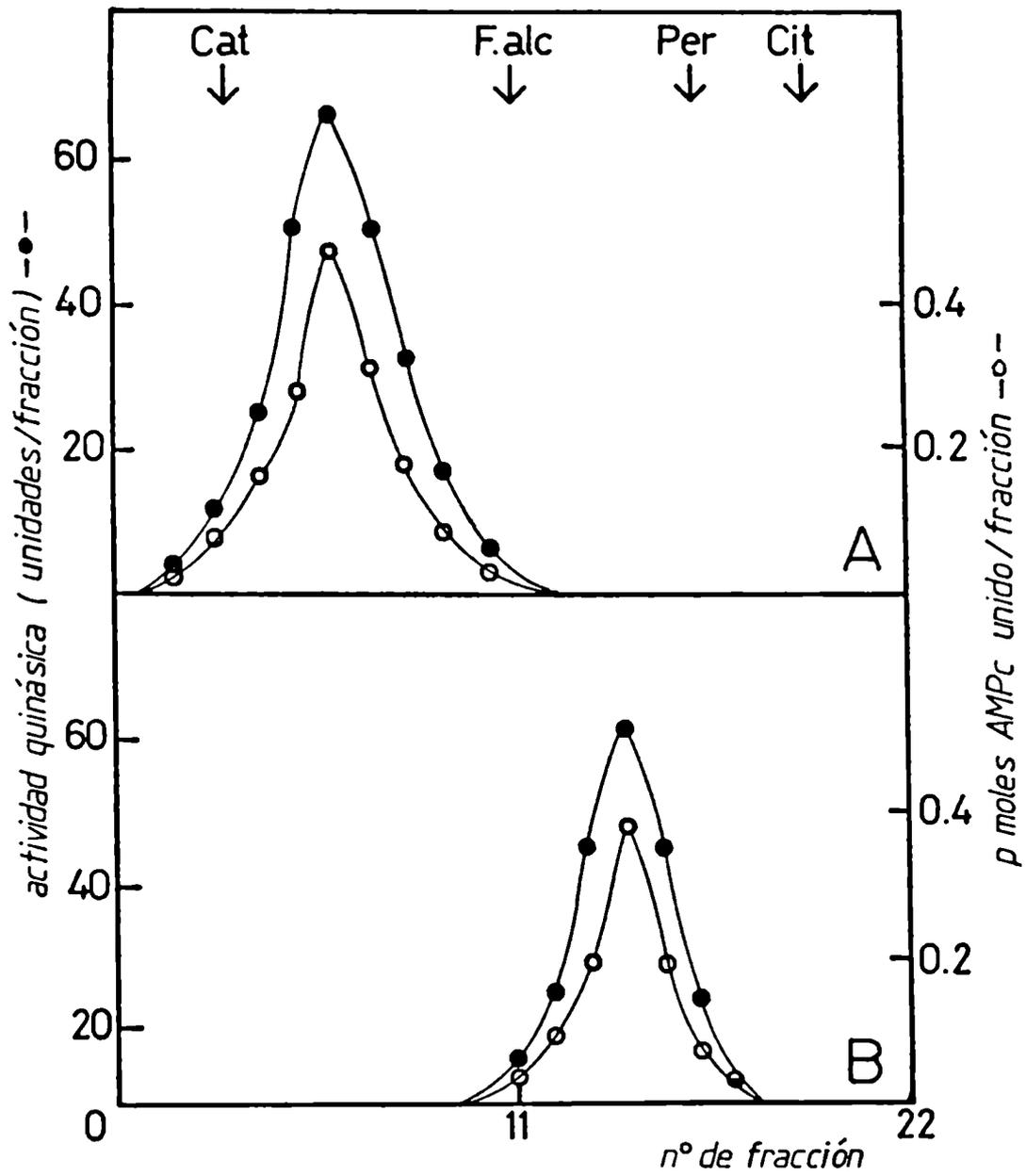
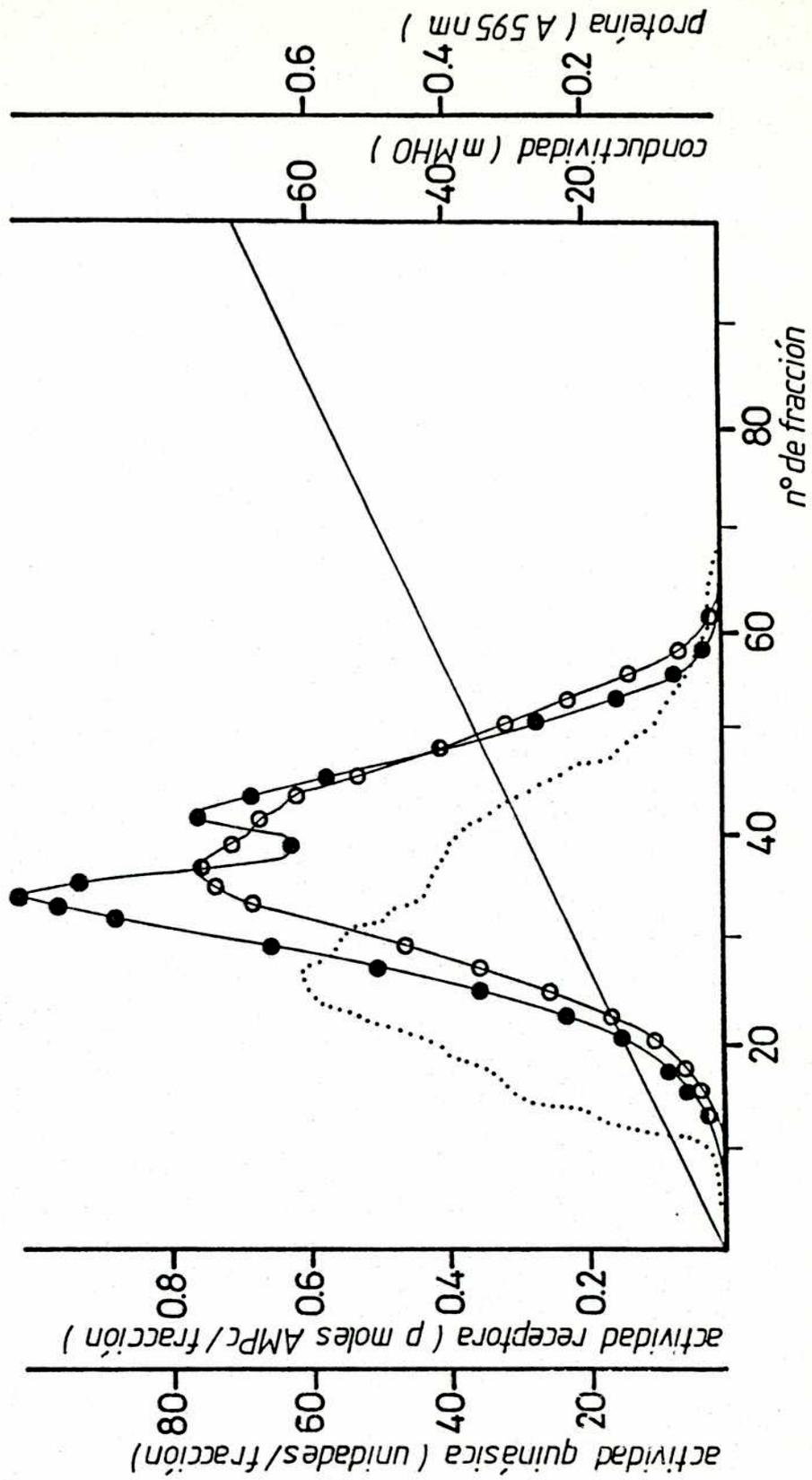


Figura 11-Cromatografía en DEAE-Sepharosa del sobrenadante de 15000 g. Se utilizó una alícuota de la fracción conteniendo 1,2 g de proteína para una columna de 40 ml (2x12 cm) y procesó según se indica en la sección III de Materiales y Métodos. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de 0-0,4 M ClNa y en cada fracción se ensayó actividad quinásica en presencia de AMPc (•) y actividad receptora de AMPc (-o-) se midió la concentración de proteínas (.....) y la conductividad (—).



mentación de 9 y 4,5 S respectivamente (Ver Fig. 10).

A su vez si se somete la totalidad de las fracciones con actividad obtenidas de la columna de DEAE-Sepharosa a una filtración molecular en Sephacryl- S300 se observan dos picos de actividad (Fig. 12), el que eluye primero sedimenta en un gradiente de sacarosa con un coeficiente de 9 S y el que eluye después lo hace con un coeficiente de 4,5 S.

1-2. Características de la especie dimérica

Esta nueva especie de menor coeficiente de sedimentación conserva la relación de actividades quinásica y receptora de AMPc descrita para la holoenzima R_2C_2 y su dependencia del nucleótido en la actividad fosfotransferásica (184).

Se analizó entonces la influencia del AMPc en la producción de subunidades para ver si esta especie presentaba algún cambio frente al nucleótido cíclico, al sustrato protéico y a la presencia de $ClNa$ (166).

Para ello se sometieron alícuotas de la preparación enzimática de 4,5 S obtenida de un gradiente de sacarosa a diferentes condiciones de preincubación y se analizó el comportamiento en gradientes de sacarosa.

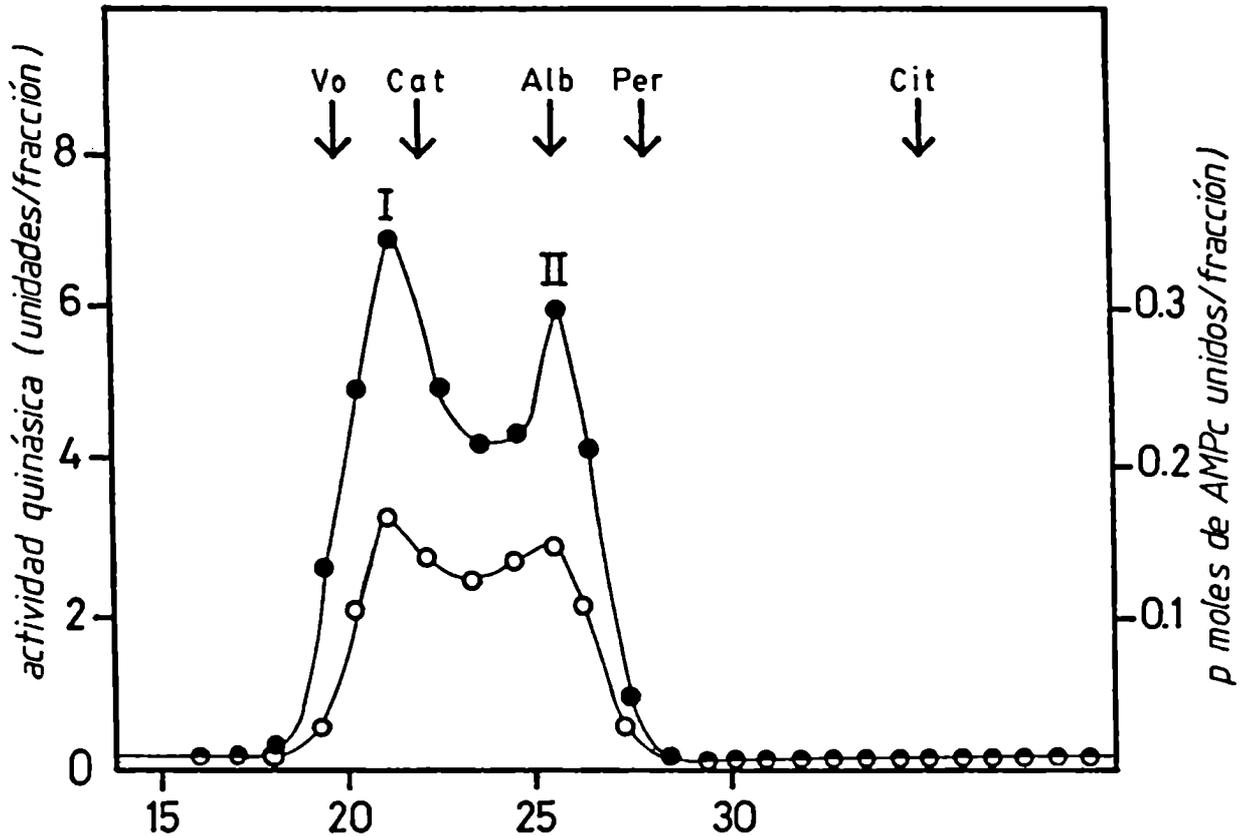


Figura 12- Filtración en columna de **Sephacryl-S300**. Se procesó una alícuota de una preparación proveniente de un cultivo de fase de crecimiento logarítmico tardío de la etapa de DEAE-Sepharosa conteniendo 100 unidades de quinasa por una columna de 1 x 64 cm. La filtración se desarrolló como se indicó en la sección III de Materials y Métodos. En alícuotas de las fracciones eluidas se midió la actividad quinásica (●) y la actividad receptora de AMPc (○).

Una alícuota se preincubó durante 5 minutos a 30°C con AMPc-(³H) 1μM (Fig. 13B), otra con protamina 1,5 mg/ml (Fig. 13C) y una tercera con protamina y AMPc a las concentraciones mencionadas más arriba (Fig. 13D). El panel A de la Fig. 13 muestra el comportamiento de la enzima preincubada sin adiciones. La disociación total de la especie R'C' en sus subunidades se obtiene solamente en presencia de AMPc y el sustrato protéico. Cuando se usó kemptido en la preincubación en vez de protamina también se logró disociación total con el mismo perfil de la figura 13 D pero no se produjeron cambios en el perfil de sedimentación cuando solo se usó el kemptido en la preincubación (dato no mostrado). La especie en estudio reproduce las características de la holoenzima R₂C₂ respecto de la disociación total en sus subunidades en presencia de AMPc y C1Na 0,5 M; en estas condiciones el perfil de sedimentación obtenido reproduce exactamente el de la figura 13 D.

I-3. Estudios de disociación de la especie dimérica usando pequeñas columnas de DEAE-celulosa

Dado el carácter catiónico de la subunidad catalítica a pH neutro y la carga neta negativa de la subunidad regulatoria y de la holoenzima se aprovechó de estas propiedades para estudiar la in__

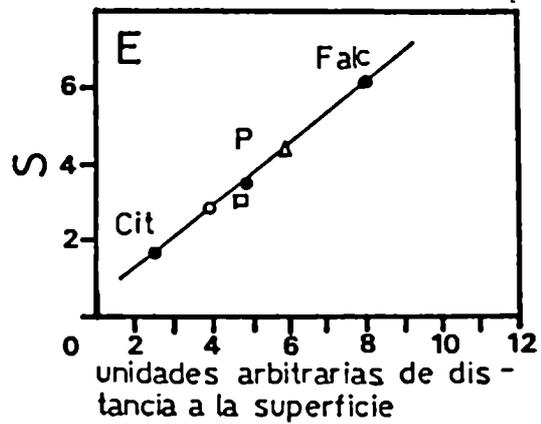
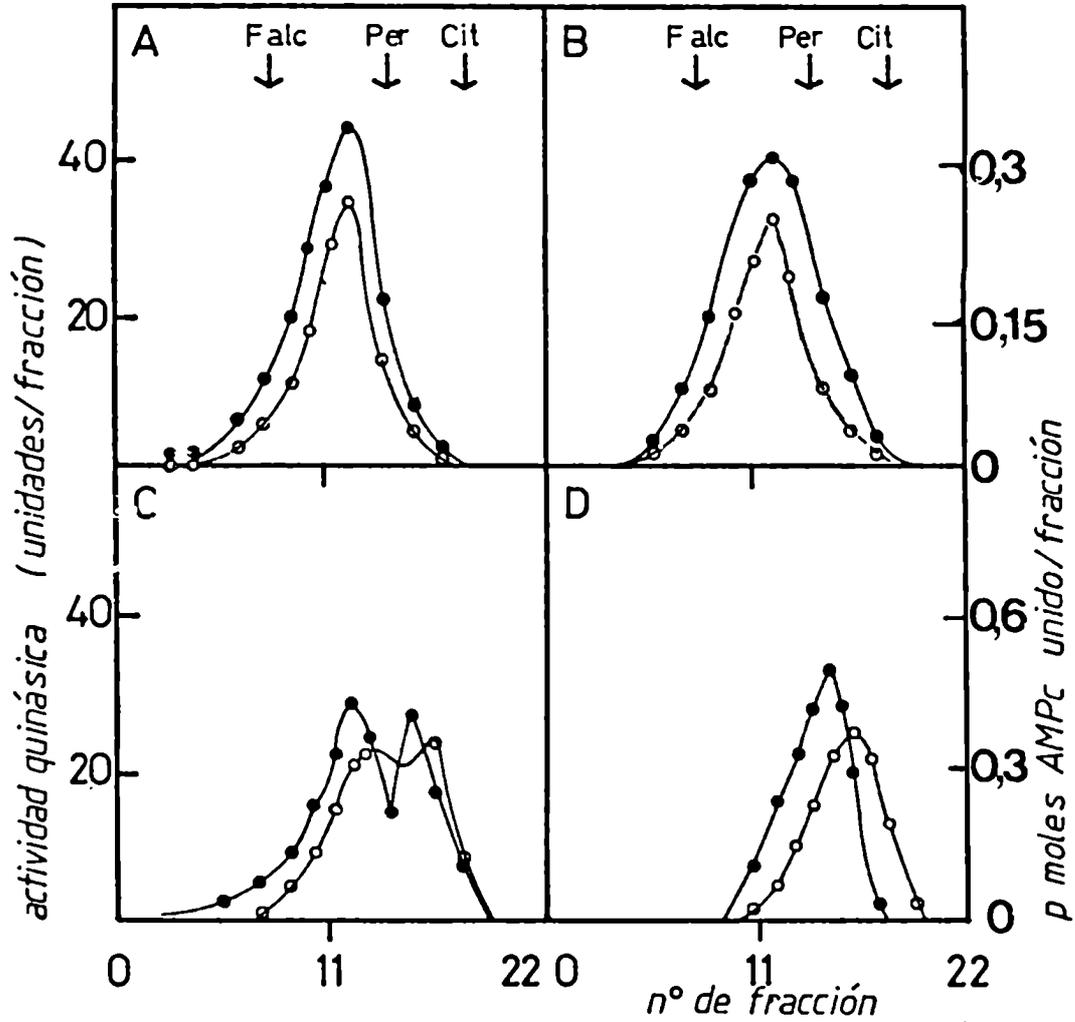


Figura 13— Efecto del AMPc y el sustrato protéico sobre la disociación de R'C'. Se centrifugaron en gradientes de sacarosa 5–20 % alícuotas de una preparación de R'C' con 100 unidades enzimáticas proveniente de la etapa de Sephacryl-S300. En cada uno de los gradientes se sembró una alícuota de 0,2 ml de la preparación preincubada 5 min a 30°C con los siguientes agregados (A) ninguno, (B) 1 μ M AMPc-³H, el gradiente equilibrado con AMPc-³H/200 nM; (C) 1,5 mg/ml de protamina; (D) 500 nM AMPc-³H y protamina 1,5 mg/ml. El perfil que se ilustra coincidió con los obtenidos preincubando con AMPc-³H/500 nM, kemptido 50 μ M ó con AMPc-³H/500 nM, ClNa 0,5 M. El gradiente se equilibró con ClNa 0,5 M, albúmina 0,5 mg/ml y AMPc-³H/200 nM. En alícuotas adecuadas de cada fracción se midió la actividad quinásica (●) según se indica en la sección IX-1 de Materiales y Métodos. La actividad receptora de AMPc (○) se midió por filtrado directo de alícuotas apropiadas en (B) y (D) y con el ensayo descrito en la sección IX-2 (a) de Materiales y Métodos. La figura 13 (E) muestra la relación entre los coeficientes de sedimentación y las distancias recorridas desde el sitio de siembra por las proteínas marcadoras (●), R'C' (Δ) y sus subunidades regulatoria R' (○) y catalítica C' (□).

fluencia de sustratos y efectores sobre la disociación de la enzima.

En la Tabla II se muestran los resultados obtenidos.

TABLA II

Estudios de disociación de R'C' en pequeñas columnas de DEAE-celulosa.

condiciones de preincubación	% de actividad retenida #	% de actividad en el percolado ##
—	90-100	0-10
AMPc 100 μ M	75-88	12-25
ATP 0,1 mM		
-Mg 10 mM	90-100	0-10
Protamina 1,5 mg/ml	55	50
Protamina 1,5 mg/ml , AMPc 10 μ M	0	110

Columnas de 0,2 ml de DEAE-celulosa equilibradas con buffer A se sembraron con alícuotas de 100 μ l de enzima proveniente de la etapa de Sephacryl-S300. Las columnas se lavaron con 2 vol del mismo buffer para eluir la subunidad catalítica libre, luego con 2 vol de bu

ffer A, 80 mM ClNa para eluir el AMPc y finalmente se eluyó la holoenzima no disociada con 2 vol de ClNa 0,5 M en buffer A. Se ensayó actividad fosfotransferásica con protamina en el percolado y en el eluido con ClNa 0,5 M en ausencia y en presencia de AMPc 10 μ M.

Actividad quinàsica en presencia de AMPc. (dependiente de AMPc)

Actividad quinàsica en ausencia de AMPc (independiente de AMPc)

Estos resultados confirman los obtenidos del análisis en gradiente de sacarosa. El AMPc no tiene efecto disociante per se sobre la especie, como tampoco el ATP-Mg. La protamina produce disociación parcial a concentraciones en que como sustrato es saturante. La disociación es total en presencia de protamina y AMPc.

11- OBTENCION DE LA ESPECIE DIMERICA R'C' POR PROTEOLISIS

CONTROLADA

Ante la dificultad de obtener en forma sistemática y reproducible la especie dimérica se intentó prepararla a partir de la holoenzima tetramérica por proteólisis controlada. Una alícuota conteniendo 200000 UE de una preparación proveniente de un gradiente de sacarosa con un coeficiente de sedimentación de 9S se incubó durante 8 minutos a 4°C con tripsina en una proporción de 1,5 μ g de tripsi

na en una proporción de 1,5 μg de tripsina cada 100 μl de prepara_ ción. La incubación se detuvo con ETI. Se logró obtener una espe_ cie molecular que sedimentó en un gradiente de sacarosa con un coe_ ficiente de 4,5 S y un perfil análogo al de la figura 10 B. Esta espe_ cie resultó absolutamente dependiente de AMPc usando kemptido como sustrato. A partir de este hallazgo se trabajó con la especie diméri_ ca obtenida por tripsinización.

11-1. Determinaciones de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la especie dimérica R'C' y sus subunidades

Para la obtención del radio de Stokes y del coeficiente de sedi_ mentación de la enzima R'C' y sus subunidades se utilizaron los da_ tos provenientes de filtración de Sephacryl-S300 y de centrifugación en gradientes de sacarosa respectivamente.

11-1.1. Determinación de los coeficientes de sedimentación

Las centrifugaciones en gradientes de sacarosa se llevaron a cabo de la manera que se describió en Materiales y Métodos, Sección X.2.

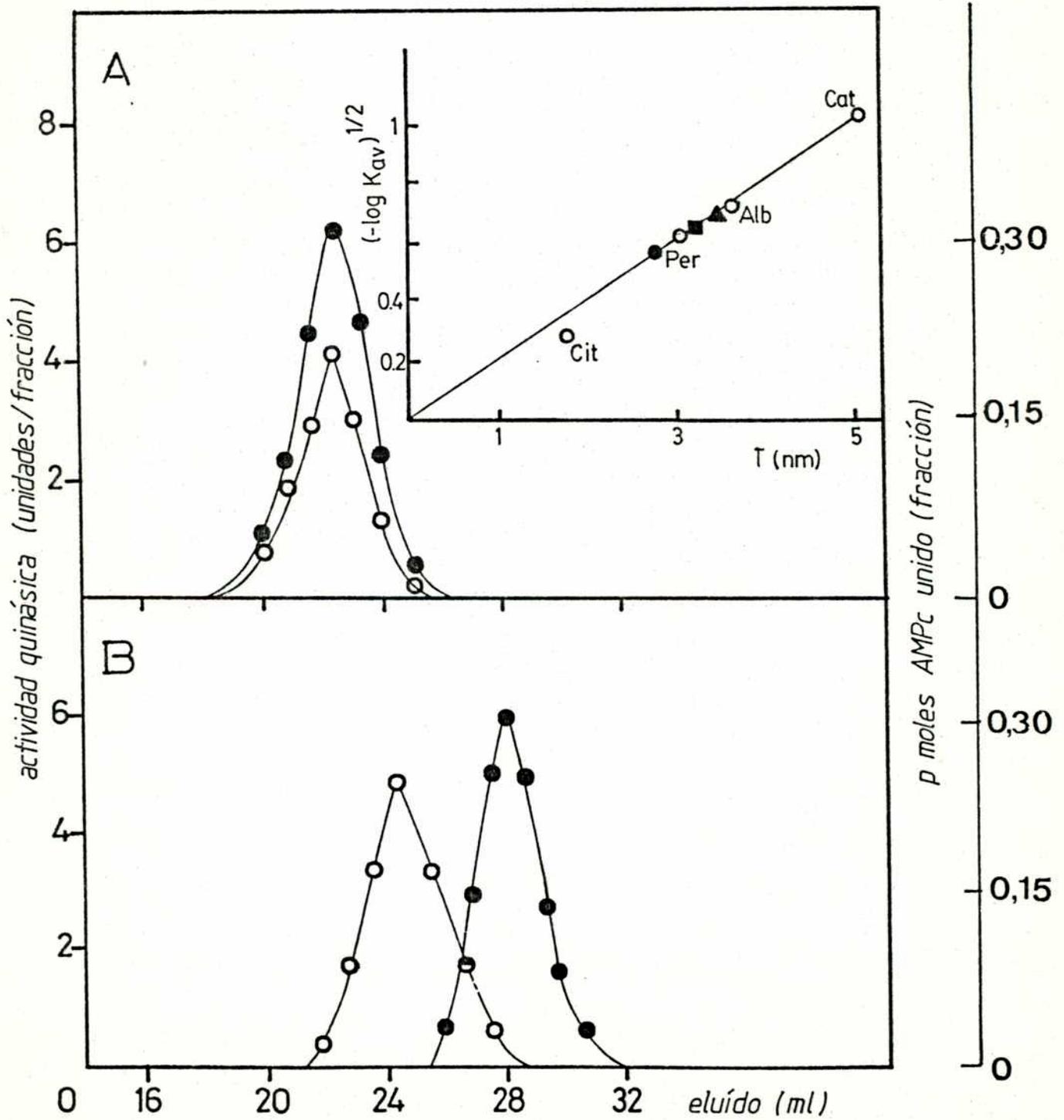
La figura (13 A) y de sus subunidades (13 D) y de la de las proteínas marcadoras. Por interpolación en la recta que relaciona las

distancias recorridas por las proteínas marcadoras con sus coeficientes de sedimentación (Fig. 13 E) se calcularon los coeficientes de sedimentación de las tres proteínas incógnitas obteniéndose los valores de 4,5 S para el dímero R'C', 2,5 S para la subunidad regulatoria R' y 3,2 S para la subunidad catalítica C'.

II-1.2. Determinación de los radios de Stokes

Para determinar los radios de Stokes del dímero R'C' y de sus subunidades se utilizó la filtración molecular en Sephacryl-S300 como se indicó en la sección X-1 de Materiales y Métodos. Para obtener las subunidades se incubó R'C' en condiciones disociantes con ClNa y AMPc-(³H) y la columna estaba equilibrada con buffer B conteniendo ClNa y AMPc-(³H). La figura 14 muestra el perfil de actividades obtenido para R'C' (A) y para sus subunidades (B).

En el inserto de la figura se puede ver la relación entre el $(-\log K_{av})^{\frac{1}{2}}$ y el radio de Stokes de las proteínas marcadoras y las posiciones correspondientes a R'C' y sus subunidades regulatorias y catalíticas. Por interpolación se obtuvieron los siguientes radios de Stokes: especie dimérica R'C' 3,6 nm, subunidad regulatoria R' 3,2 nm y subunidad catalítica C' 2,8 nm.



II-1.3. Determinación del peso molecular

Una vez conocidos los coeficientes de sedimentación y el radio de Stokes del dímero R'C' y de sus subunidades R' y C', se calcularon los respectivos pesos moleculares de las tres especies utilizando la ecuación planteada en la sección X.3 de Materiales y Métodos. Como dato del volumen específico parcial se utilizó el de las proteínas globulares solubles (0,74 ml/g).

Así los pesos moleculares calculados fueron 88 KD para R'C', 38 KD para R' y 41 para C'.

II-1.4. Determinación del peso molecular del monómero de la subunidad regulatoria R proveniente de la forma tetramérica R₂C₂.

Este se obtuvo en geles de poliacrilamida desnaturalizantes a partir de la subunidad regulatoria purificada por columnas de afinidad de AMPc-agarosa. Como se ve en la Fig. 15 en la tinción con plata se observa una banda principal correspondiente a un peso molecular de 64000. En otras preparaciones se observaron bandas minoritarias de mayor movilidad electroforética, muy probablemente debidas a proteólisis.

II-1.5. Determinación del coeficiente friccional

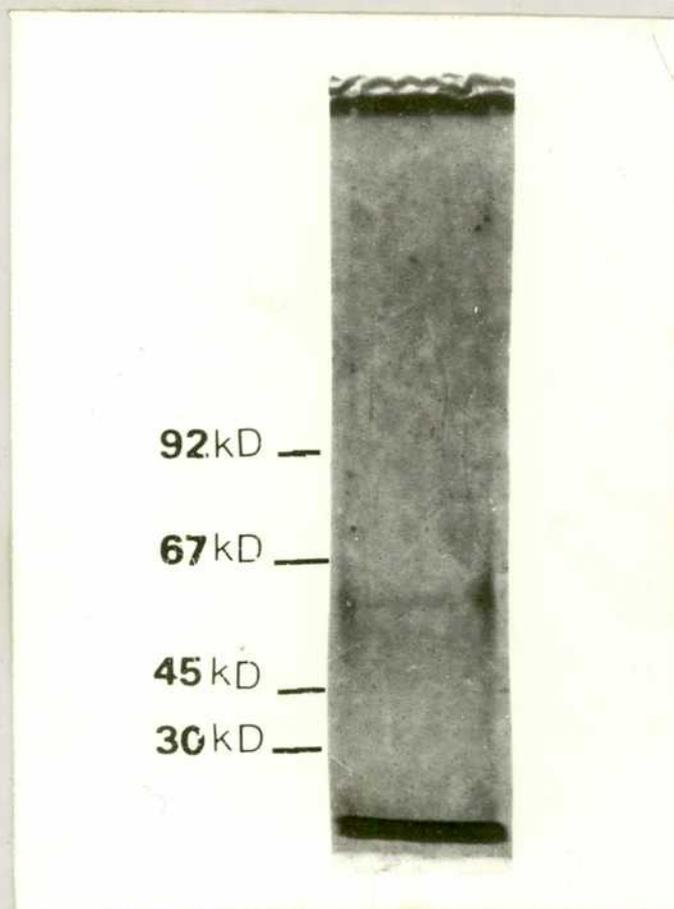


Figura 15- Electroforesis en gel plano de poliacrilamida de la subunidad regulatoria de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc. Se sembró en el gel 7 % con SDS (desnaturalizante) una alícuota con 100 ng de proteína proveniente de la etapa de purificación a través de AMPc-agarosa. A continuación se procedió como se describió en la sección VIII de Materiales y Métodos. Se utilizó la tinción con plata. Proteínas marcadoras: fosforilasa B (92), albúmina (67) ovoalbúmina (45) y anhidrasa carbónica (30).

Con los valores de los pesos moleculares y de los radios de Stokes se calcularon los valores de los coeficientes friccionales f/f° aplicando la formula planteada en la sección X. 4 de Materiales y Métodos. Los valores obtenidos fueron :1,30 para R'C', 1,99 para R' y 1,20 para C'. Este último valor coincide con el obtenido para la subunidad catalítica de la holoenzima (184).

En la Tabla III se resumen los valores de los parámetros moleculares e hidrodinámicos obtenidos en este trabajo para la especie dimérica R'C', sus subunidades y también los ya reportados para la holoenzima R_2C_2 (168). De la observación de los mismos surge que R'C' es una molécula asimétrica bastante más pequeña que el tetrámero R_2C_2 . Teniendo en cuenta que las propiedades de la subunidad catalítica no han variado apreciablemente es altamente probable que la disminución de tamaño respecto del teórico para RC se deba a proteólisis de la subunidad regulatoria. El PM determinado para R por gels de poliacrilamida desnaturalizantes también arroja un valor mayor que el obtenido por cálculo teórico para la R' proveniente de la especie dimérica de 4,5 S lo cual permite suponer que R' carecería de un importante trozo que abarca el sitio de dimerización (ver Fig. 4).

Figura 14—Filtración en columna de Sephacryl S-300 (1 x 64 cm) de la especie dimérica (A) y de sus subunidades regulatoria R' y catalítica C' (B). Se incubaron 60 unidades de una preparación de holoenzima R'C' en un volumen final de 1 ml durante 5 min a 30°C con los siguientes agregados: (A) Nada, (B) AMPc-(³H) 2 μM, ClNa 0,5 M y albúmina 0,5 mg/ml. En este caso la columna se equilibró con AMPc (³H) 120 nM, ClNa 0,5 M y albúmina 0,5 mg/ml. La filtración se desarrolló como se indicó en la sección III de Materiales y Métodos. En alícuotas de las fracciones se midió la actividad quinásica con el ensayo habitual. La actividad receptora de AMPc se midió con el método descrito en la sección IX-2 de Materiales y Métodos en el experimento (A) y por filtración directa de una alícuota a través de membranas de nitrocelulosa (B). En el gráfico insertado se muestra la relación entre el (-log Kav) 1/2 y el radio de Stokes de las proteínas marcadoras. Estas fueron: catalasa (Cat), albúmina bovina (Alb), peroxidasa (Per) y citocromo C (Cit).

TABLA III

Parámetros moleculares e hidrodinámicos de las especies holomé-
ricas y de sus subunidades

Especie	S	a nm	PM (KD)		f/f _o
			geles de SDS	S y radio de Stokes	
R ₂ C ₂	9	6,5		230	1,54
R'C'	4,5	3,58		88	1,30
R ₂	6,2	5,9		169	1,61
R			64		
R'	2,5	3,3		38	1,99
C	3,5	2,8		44	1,20
C'	3,2	2,8		41	1,20

III- ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACTIVACION DE LAS ESPECIES

HOLOMERICAS R_2C_2 Y $R'C'$

Los estudios se encararon con dos enfoques: uno de través del estudio de la activación de la actividad fosfotransferásica por efecto del AMPc y análogos del mismo; el otro, a través del estudio de la interacción del AMPc y análogos con la subunidad regulatoria.

III-1. Cooperatividad positiva en la reacción de activación de la quinasa de proteínas

En la figura 16 se observa la curva de activación de las especies holoméricas R_2C_2 y $R'C'$ en su capacidad fosforilante de kemptido en función de la concentración de AMPc. En ambos casos se observa una curva de caracter sigmoideo lo que indica cooperatividad positiva. Estos datos se confirmaron con la representación de los mismos usando la ecuación de Hill insertada en la figura. De estos se obtiene un $n=1,6$ que corrobora la existencia de más de un sitio de unión para el AMPc y la interacción entre ellos, aún en la especie dimérica $R'C'$.

Esta cooperatividad positiva se observa también cuando se usa pro_

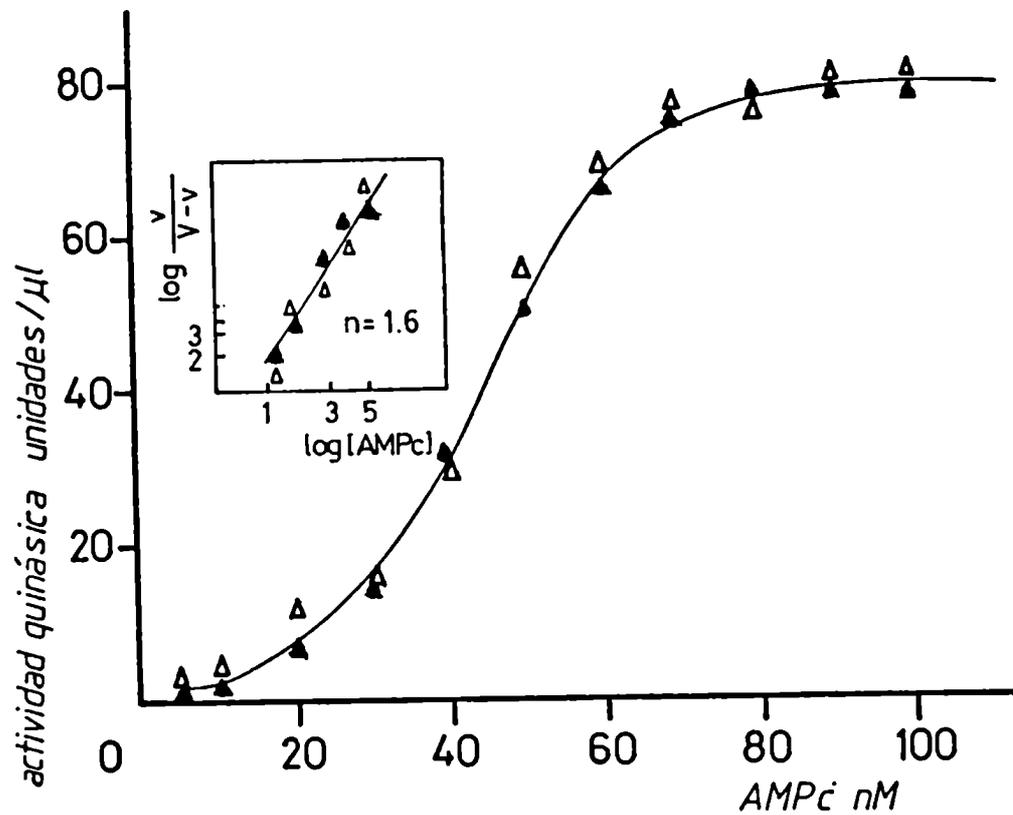


Figura 16- Efecto de la concentración de AMPc sobre la actividad fosfotransferásica. Se ensayaron alícuotas de una preparación de R_2C_2 proveniente de un gradiente de sacarosa (▲) o de R'C' preparada a partir de la anterior por proteólisis controlada (Δ). Se practicó el ensayo estandar usando concentraciones crecientes de AMPc. Ambas preparaciones enzimáticas se diluyeron hasta igualar el mismo número de unidades/ml. En el inserto se muestra la gráfica de Hill. Los datos de actividad usados tiene restados los valores de actividad basal que en todos los casos fueron menores que un 10 %.

tamina como sustrato (datos no mostrados).

III-2. Efectos sinérgicos de la combinación de análogos del AMPc en la activación de las holoenzimas dimérica y tetramérica

Ya está bien establecido en eucariontes superiores que las subunidades regulatorias de la isoenzimas I y II poseen dos sitios de unión para el AMPc intracatenarios, que se diferencian en cuanto a la velocidad de disociación del nucleótido cíclico y en su relativa especificidad para análogos del AMPc.

La existencia de dos sitios de unión interactuantes para el AMPc en la subunidad regulatoria de la especie dimérica R'C' evidenciados por la cooperatividad positiva llevó a estudiar si también se diferenciaban en cuanto a la selectividad por análogos del AMPc. Para ello se investigó el comportamiento de las formas diméricas y tetramérica de la quinasa respecto de la activación de diferentes análogos. Se dispuso de tres análogos clásicamente selectivos para el sitio 1: 8-S-benzylcAMP, 8-Bromo-cAMP y 8-aminohexylamino-cAMP y tres para el sitio 2: N⁶-benzoyl-cAMP, N⁶-monobutyryl-cAMP y N⁶-aminohexycarbamoylmethyl-cAMP.

En la figura 17 se representan los resultados de los experimentos de activación de la enzima tetramérica en función de la concentración

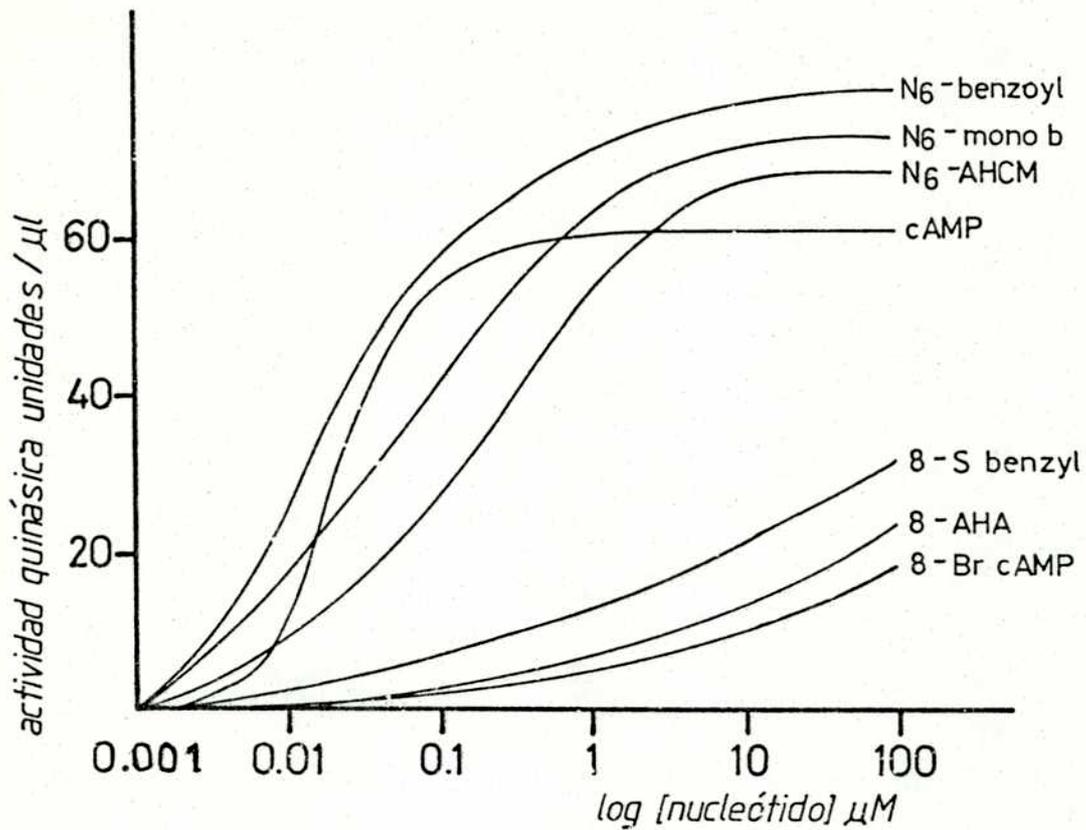


Figura 17- Efecto de la concentración de análogos de AMPc sobre la actividad quinásica. Se ensayaron alícuotas de una preparación de enzima tetramérica proveniente de un gradiente de sacarosa con un coeficiente de sedimentación de 9 S. El ensayo se realizó con la mezcla estándar y el agregado de concentraciones crecientes de cada análogo. La actividad basal se restó en todos los casos.

de cada análogo. Como se puede ver, la activación de la actividad fosfotransferásica para los tres análogos del tipo N⁶ es similar así como lo es la forma de las curvas para los análogos del tipo C-8. Por otra parte la actividad máxima se logra para los análogos del tipo N⁶ a concentraciones a las cuales recién se ve una ligera activación para los análogos del tipo C-8.

De los datos de la figura 17 se pueden elegir las concentraciones de análogos a usar para tener una activación individual con cada uno de ellos del orden del 10-20 %. Este es el rango de actividad óptimo para poder observar efectos sinérgicos entre análogos de distinto sitio.

Utilizando estas concentraciones y una preparación de la enzima tetramérica se realizó el experimento que se muestra en la figura 18. Puede verse allí que ciertos pares de análogos fueron sinérgicos en la activación de la actividad fosfotransferásica. Este fenómeno fue particularmente importante cuando se combinaron ciertos pares de análogos formados por uno selectivo para el sitio 1 con otro selectivo para el sitio 2. Un buen ejemplo para ilustrarlo es la combinación del par 8-Br-AMPc-N⁶-AHCM. La combinación de análogos del tipo C-8 entre sí resultó nada o escasamente sinérgica, lo mismo que para los del tipo N⁶; en algunos casos el grado de ac_

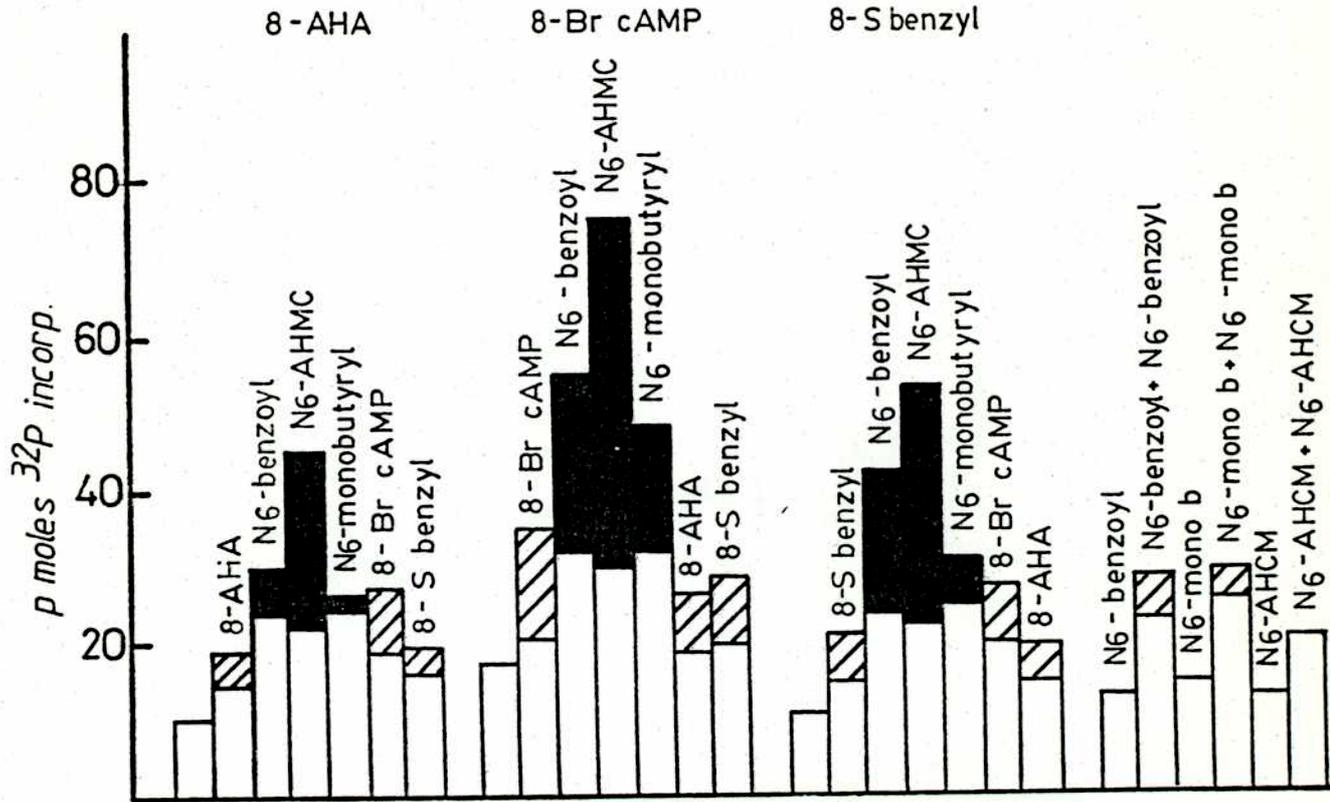


Figura 18- Efecto sinérgico en la combinación de análogos del AMPc sobre la activación de R_2C_2 . Alícuotas de una preparación de holoenzima tetramérica proveniente de una etapa de Sephacryl-S300 se ensayaron para determinar actividad quinásica con la mezcla de reacción estandar y varias combinaciones de análogos usados a las concentraciones siguientes = 10 nM N^6 -AHCM, 5 nM N^6 -monobut y N^6 -benzoyl; 1 μ M para los C-8 sustituidos: 8-AHA, 8-Br y 8-ben.

tivación obtenido fue menos que aditivo.

Este experimento fue repetido con la forma dimérica de la enzima y se obtuvieron cualitativamente los mismos resultados: los mismos pares que fueron más eficientes en la producción del efecto sinérgico para R_2C_2 lo fueron también para $R'C'$ (datos que no se muestran).

Resulta interesante hacer notar no solo la comprobación de que el dímero se comporta como el tetrámero en la activación sino también que los dos sitios de unión para el AMPc intrasubunidad que postulamos preliminarmente se conservan en R' a pesar del alto grado de proteólisis de esta especie (evidenciado en los valores de los parámetros hidrodinámicos).

IV - ESTUDIO DE LOS SITIOS DE INTERACCION DEL AMPc CON LAS SUBUNIDADES REGULATORIAS R' Y R_2

Ya se había demostrado que existen importantes diferencias entre la unión del AMPc a la holoenzima R_2C_2 y la unión del mismo a la subunidad regulatoria libre (R_2) (97). Una de ellas es que la cantidad de AMPc unido a la subunidad regulatoria libre cuando ésta es producida in situ en condiciones de disociación total es el

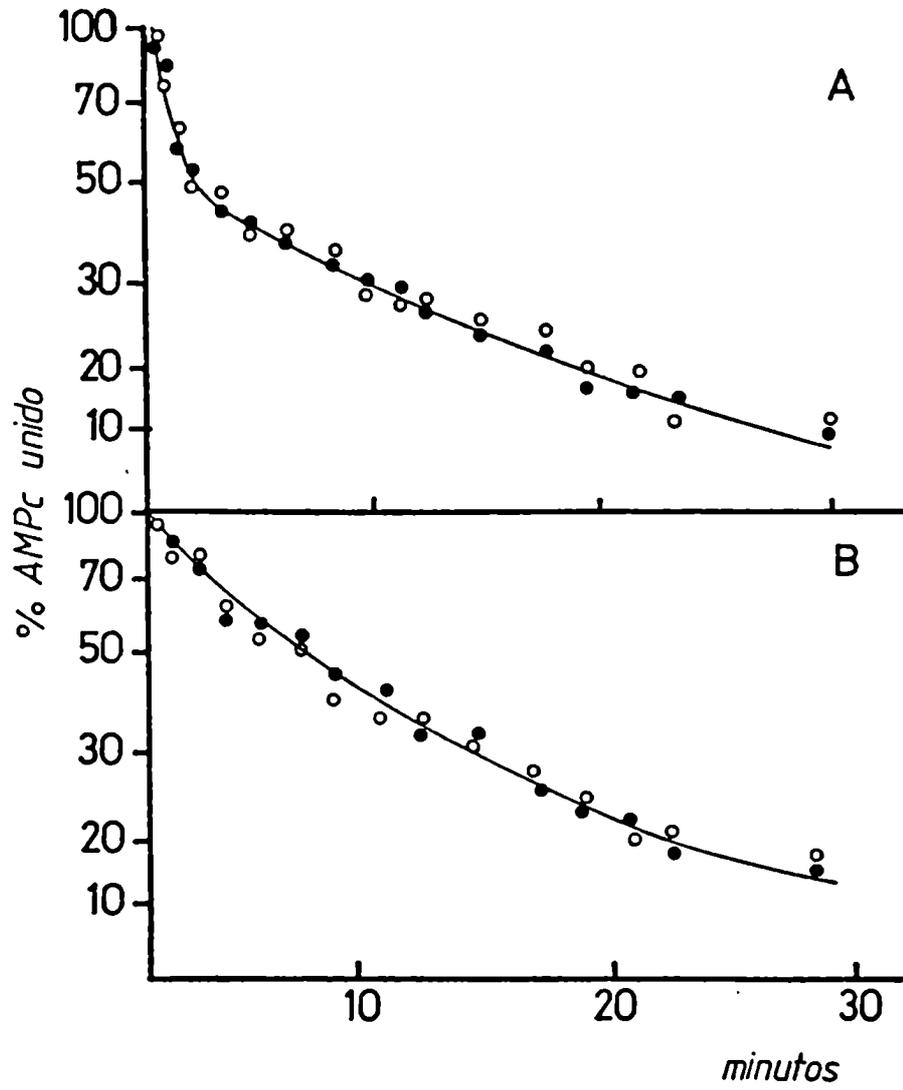
doble de la que se une a la holoenzima. La otra diferencia consiste en que la velocidad de disociación del AMPc unido a la holoenzima formando el complejo ternario es muy rápida mientras que la del AMPc unido a la subunidad regulatoria es más lenta. Por otra parte en las quinasas dependientes de AMPc de eucariontes superiores las dos poblaciones de sitios de unión se distinguen de acuerdo a su velocidad de disociación (47,69,71).

Para encarar los estudios de disociación del AMPc unido a la enzima de M. rouxii se siguieron dos estrategias con el fin de medir la velocidad de disociación del AMPc unido a la subunidad regulatoria libre y de hallar las condiciones adecuadas que permitieran medir la velocidad de disociación del nucleótido unido a la holoenzima.

IV-1. Disociación del AMPc unido a la subunidad regulatoria libre

La disociación del AMPc-(³H) que se une a R' o a R₂ se midió incubando las respectivas R'C' o R₂C₂ con AMPc-(³H) y ClNa 0,5 M. En estas condiciones la disociación de la especie holomérica en sus subunidades es total y el AMPc-(³H) se une a los dos sitios en cada subunidad regulatoria (185). En la figura 19 A se observa que el AMPc unido a la subunidad regulatoria R' o R₂ se disocia según una cinética bifásica con t $\frac{1}{2}$ de disociación de 1 min y 16 min para los sitios rápido y lento respectivamente.

Figura 19- A) Disociación del AMPc-³H, unido a las subunidades regulatorias R₂ (●) y R' (○); B) Disociación del AMPc-³H, unido a las holoenzimas R₂C₂ (●) y R'C' (○). Alícuotas apropiadas de las preparaciones enzimáticas de las holoenzimas provenientes de gradiente de sacarosa se incubaron en buffer A que contenía AMPc-³H, 0,5 μM y ClNa 0,5 M en A) y AMPc-³H, 0,5 μM en B). Después de 10 min a 30°C se agregó AMPc no radiactivo hasta 50 μM en ambos casos y además ClNa hasta 0,5 M en B) y se filtraron 70 μl de muestra a los tiempos indicados. La línea sólida representa la mejor curva de terminada por un método de regresión lineal. El 100% del AMPc unido fueron 1,3 pmoles en A) y 0,7 pmoles en B).



IV - 2. Disociación del AMPc unido a la holoenzima

La figura 19 B muestra la cinética con que el AMPc-(³H) se disocia de las holoenzimas R'C' y R₂C₂. Como puede verse, la pendiente de la gráfica de disociación es similar a la del sitio de disociación más lento de los dos que se ocupan en la subunidad regulatoria libre. Este hecho que parece contraponerse a lo informado sobre la rápida velocidad de disociación del AMPc unido al complejo ternario puede explicarse por las condiciones en las que se realizó el experimento. El AMPc se incubó con la holoenzima el tiempo que permitió la máxima unión para esas condiciones pero la cinética de disociación se midió sobre la especie disociada con ClNa 0,5 M y AMPc frío en exceso. De este modo se midió la disociación también a partir de la subunidad regulatoria libre, pero del AMPc-(³H) que se había unido al sitio expuesto en la holoenzima. Esta velocidad de disociación se ha enlentecido por la disociación de la enzima en sus subunidades. De este tipo de experimento se concluye que la cinética bifásica con que se disocia el AMPc unido tanto a R' como a R₂ evidencia la presencia de dos diferentes clases de sitios intrasubunidad. En ambas especies holoméricas uno de estos sitios estaría bloqueado a causa de la unión entre R y C.

IV-3. Estudio de la selectividad para análogos de los sitios de unión para el AMPc.

De la curva de inhibición del ligado de AMPc a la subunidad regulatoria libre por concentraciones crecientes de análogos ilustrada en la figura 20 obtuvieron valores de concentración de un análogo del AMPc del tipo C-8 y otro del tipo N⁶ tales que garantizaran al menos un 70 % de inhibición en el ligado de AMPc-(³H). De este modo se asegura que el AMPc-(³H) ocupe principalmente un solo tipo de sitios, situación que debería evidenciarse en una cinética de disociación monofásica con distinta pendiente según el tipo de análogo utilizado.

En la figura 21 se representan los resultados de un experimento control realizado con R' y R₂ en ausencia de análogos y otros dos cada uno en presencia de un análogo específico de cada sitio. Se realizó el experimento para cada una de las dos formas de la subunidad regulatoria, ligando el AMPc-(³H) en presencia de 8-Br-AMPc 70 μM en un caso y de N⁶-AHCM 20 μM en el otro. La figura muestra gráficas coincidentes para R' y R₂ en cada caso en las que puede verse como se modifica la cinética de disociación del AMPc-(³H) unido en presencia del análogo selectivo para el sitio 1 o del selectivo para el sitio 2 respecto del control. En ambos casos es una cinética de disociación.

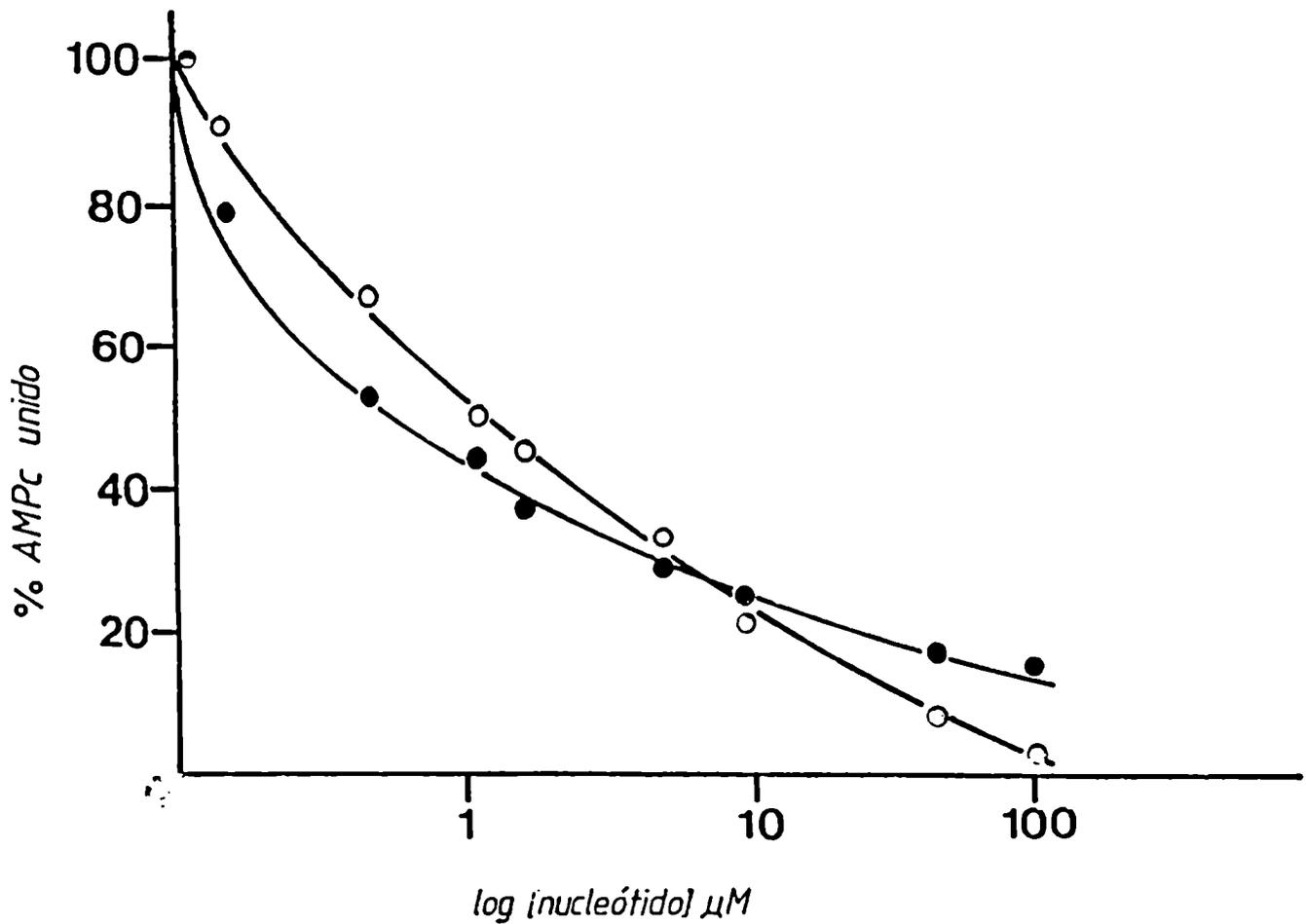
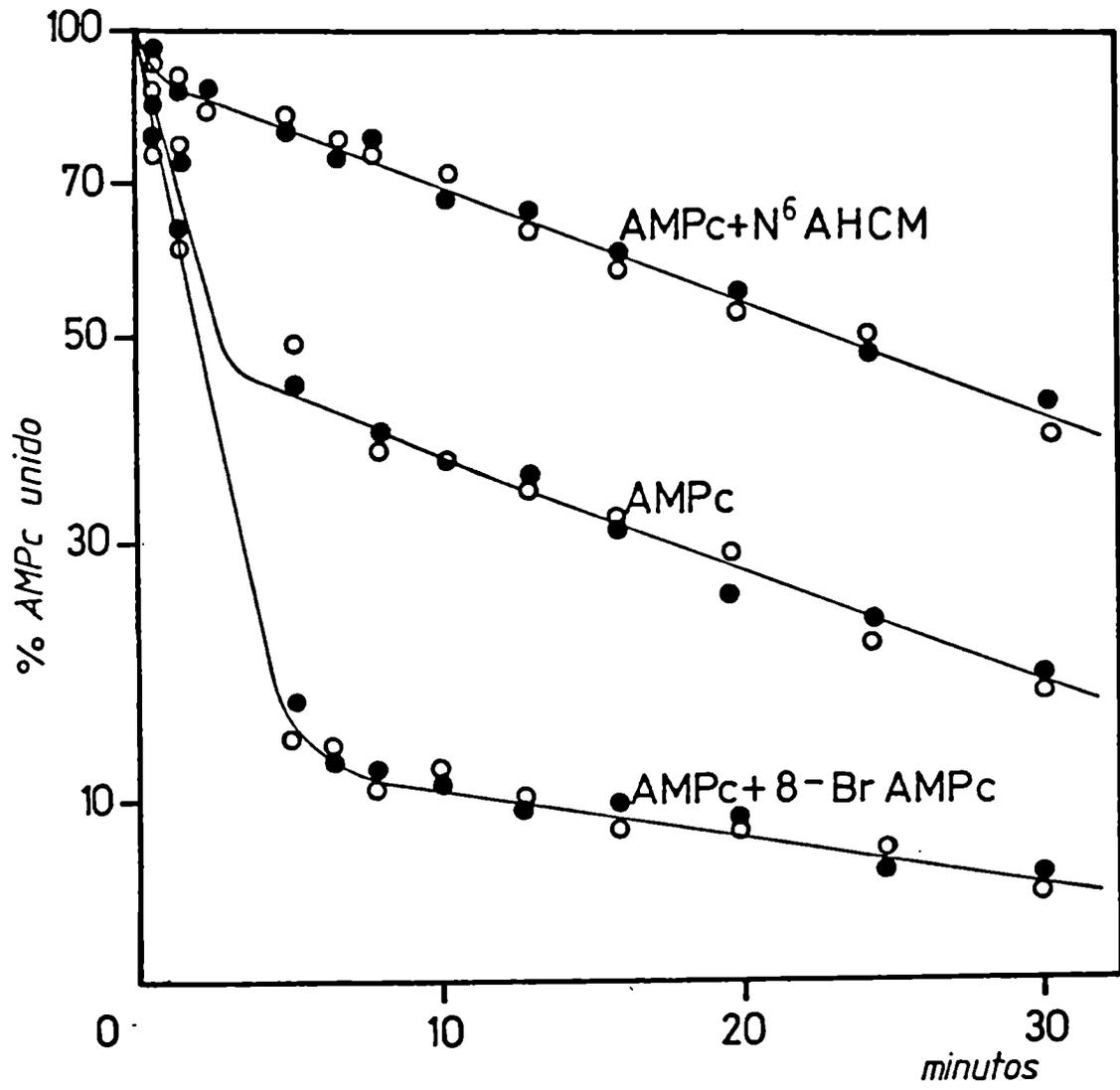


Figura 20- Efecto de la concentración de análogos del AMPc sobre la capacidad receptora de AMPc de R_2 . Los ensayos se efectuaron incubando alícuotas apropiadas de la enzima tetramérica obtenida de un gradiente de sacarosa, con AMPc-(³H), 0,5 μM, ClNa 0,5 M y cantidades crecientes de 8-Br- AMPc (○) ó de N⁶-AHCM (●).

Figura 21- efecto de la presencia de 8-Br-AMPC y N⁶-AHCM sobre la disociación del AMPC-³H) a partir de R' (○) o R₂ (●). El ensayo de actividad receptora se realizó en las mismas condiciones que en la figura 18 A (AMPC) o con el agregado de 20 μM 8-Br- o 70 μM N⁶-AHCM AMPC. Estas concentraciones de análogos inhiben alrededor de un 70 % de la capacidad receptora de AMPC.

El 100 % de AMPC unido a la enzima representa 2.5 pmoles para el control con AMPC solo, 0.8 pmoles cuando está presente el 8-Br-AMPC y 0,7 pmoles para el caso del N⁶-AHCM.



monofásica con un $t_{\frac{1}{2}}$ correspondiente al sitio lento de disociación (el que liga AMPc cuando forma parte de la holoenzima) en presencia del análogo del tipo N⁶, y un $t_{\frac{1}{2}}$ correspondiente a una cinética rápida cuando el AMPc-³H se unió al sitio que no ocupó el análogo del tipo C-8.

Al parecer el N⁶-AHCM ocuparía el sitio 2 que es el que está oculto en la holoenzima y el 8-Br-AMPc ocuparía el sitio 1 que es más lento y el que se ocupa en la subunidad regulatoria cuando está formando parte de la enzima sin disociar.

La selectividad para estos análogos reproduce el modelo propuesto para eucariontes superiores, por lo tanto es posible llamar sitio 1 al más lento (externo en la holoenzima) y sitio 2 al más rápido (interno de la holoenzima).

Volvemos a comprobar al ver el paralelismo de los resultados de los experimentos hechos con R' y con R₂ que el producto de proteólisis de la especie tetramérica conserva intactos los sitios de unión para el AMPc.

En base a las evidencias experimentales presentadas en esta Tesis se sugiere un modelo que modifica el ya propuesto para la quinasa de proteínas dependiente de AMPc de M. rouxii (168) en cuanto a la existencia de dos sitios de diferente calidad en cada monómero de la

subunidad regulatoria.

También se propone una secuencia en la formación de la especie dimerica a partir de la tetramérica. Este modelo se ilustra en la figura 22.

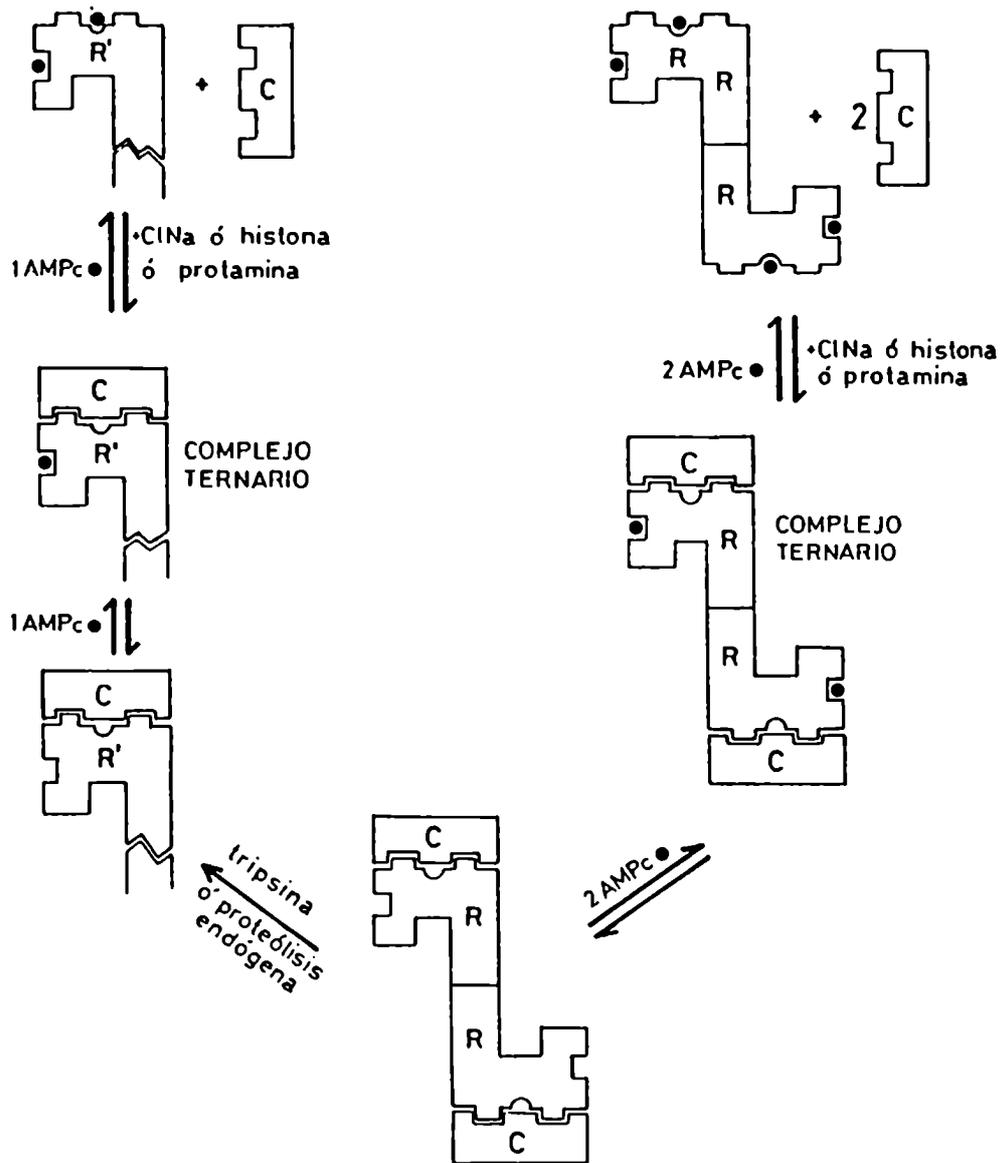


Figura 22–Modelo estructural y dinámico propuesto para la quinasa de proteínas dependiente de AMPc de *M.rouxii*.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1) La quinasa de proteínas dependiente de AMPc de M. rouxii exhibe cooperatividad positiva con un n de Hill de 1,6 en la activación por AMPc. Este hecho delata la existencia de dos calidades de sitios de unión para el nucleótido.

Al igual que en las quinasas de mamíferos existe sinergismo en la activación de la actividad fosfotransféricas por análogos del AMPc selectivos para cada tipo de sitio. En este aspecto la quinasa de M. rouxii no difiere de la de eucariontes superiores.

2) Del análisis de la cinética de disociación del AMPc-³H) unido a la subunidad regulatoria se deduce que éste se ha unido a dos tipos de sitios de los cuales se disocia con diferente velocidad.

3) El AMPc-³H) se disocia con una cinética monofásica cuando está unido a la holoenzima (en condiciones de formación de complejo ternario). Esto indica que se ha unido a un solo tipo de sitios; la cinética de disociación coincide en este caso con la más lenta de las dos de la subunidad regulatoria.

4) Los experimentos de disociación realizados en presencia de análogos selectivos para los sitios 1 y 2 respectivamente (según la nomenclatura utilizada para las quinasas de eucariontes superiores) permiten concluir que los análogos sustituidos en C-8 son específicos para el sitio que ocupa el AMPc en la holoenzima (sitio 1) y que los análogos sustituidos en N⁶ ocupan el sitio que no es accesible al AMPc cuando la subunidad regulatoria está unida a la subunidad catalítica (sitio 2).

5) Se ha identificado una nueva especie molecular de la quinasa dependiente de AMPc de M. rouxii de menor coeficiente de sedimentación y radio de Stokes más pequeño. Su absoluta dependencia respecto del AMPc en la actividad fosfotransferásica y la relación actividad quinásica / actividad receptora de AMPc, hacen pensar en una especie dimérica a la que se denominó R'C'. Esta especie aparece espontáneamente en cultivos de fase estacionaria o en extractos enzimáticos almacenados cierto tiempo. Además fue obtenida por proteólisis controlada conservando los parámetros hidrodinámicos y las características de la aparecida espontáneamente probablemente por proteólisis endógena. Los estudios cinéticos realizados sobre el dímero R'C' indican que R' posee dos tipos de sitios de unión para el AMPc. Se propone en

tonces que el numero de sitios para el AMPc es 2 en el monómero de la subunidad regulatoria y por consiguiente 4 en el dímero R_2 .

6) La subunidad regulatoria R' evidencia alto grado de proteólisis de acuerdo a los valores de los parámetros hidrodinámicos; sin embargo R' sigue conservando los dominios de unión para el AMPc y el dominio de inhibición de la subunidad catalítica. Por otra parte la subunidad catalítica parece no afectarse de manera significativa durante el proceso de proteólisis espontánea o experimental.

BIBLIOGRAFIA

- 1- P.B.Chock, S.G.Rhee y E.R.Stadman, *Annu.Rev.of Biochem.* 49, 813 (1980)
- 2- G.Burnett y E.P.Kennedy, *J.Biol.Chem.* 211, 969 (1954)
- 3- R.S.Adelstein y E.Eisemberg, *Annu.Rev. Biochem.* 48, 923 (1979)
- 4- P.Lengyel, *Annu.Rev.Biochem.* 51, 251 (1982)
- 5- P.Cohen, *Nature(Lond)* 296, 613 (1982)
- 6- E.G.Krebs, D.J.Graves y E.H.Fisher, *J.Biol.Chem.* 234, 2867 (1959)
- 7- H.C.Li, *Curr.Top Cell.Reg.* 21, 27 (1982)
- 8- P.B.Chock y E.R.Stadman, *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.* 74, 2766 (1977)
- 9- E.Shacter, P.B.Chock y E.R.Stadman, *J.Biol.Chem* 259, 12252 (1984)
- 10- G.A.Robinson, R.W.Butcher y C.W.Sutherland, "Cyclic AMP", *Acad. Press, New York* (1971)
- 11- E.G.Krebs, *Curr.Top Cell.Reg.* 5, 99 (1972)
- 12- E.G.Krebs y J.A.Beavo, *Annu.Rev.Biochem.* 48, 923 (1979)
- 13- D.A.Flockhart y J.D.Corbin, *CRC Critical Reviews in Biochem.* 12, 133 (1982)
- 14- J.D.Corbin, P.H.Sudgen, L.West, D.A.Flockhart, T.M.Lincoln y D.Mac Carthy, *J.Biol.Chem.* 253, 3997 (1978)
- 15- J.D.Corbin, S.L.Keely y C.R.Park, *J.Biol.Chem.* 250, 218 (1975)
- 16- J.F.Kuo y P.Greengard, *J.Biol.Chem.* 245, 2493 (1970)
- 17- J.F.Kuo y P.Greengard, *J.Biol.Chem.* 246, 7159 (1970)
- 18- J.A.Beavo, P.J.Bechtel y E.G.Krebs, *Methods in Enzymol.* 38(1), 299 (1974)

- 19-F. Hoffmann, J. A. Beavo, P. J. Bechtel y E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* 250, 7795(1975)
- 20-C. S. Rubin, J. Erlichman y O. M. Rosen, *J. Biol. Chem.* 247, 36(1972)
- 21-C. S. Rubin, J. Erlichman y O. M. Rosen, *Methods in Enzymol.* 38(C), 308(1974)
- 22-T. A. Langann, *Adv. Cyc. Nucl. Res.* 3, 102(1973)
- 23-C. Cobb y J. D. Corbin, *Methods in Enzymol.* (in press)
- 24-R. Rangel Aldao y O. M. Rosen, *J. Biol. Chem.* 252, 7140(1977)
- 25-P. A. Connelly, T. G. Hasting y E. M. Reimann, *J. Biol. Chem.* 261, 2235(1986)
- 26-S. Rannels, A. Beasley y J. D. Corbin, *Methods in Enzymol.* 99, 55(1983)
- 27-W. L. Dills, J. A. Beavo, P. J. Bechtel y E. G. Krebs, *Adv. Cycl. Nucl. Res.* 5, 829(1975)
- 28-W. L. Dills, J. A. Beavo, P. J. Bechtel y E. G. Krebs, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 62, 70(1975)
- 29-E. Rieke, N. Pantz, A. Eigel y K. G. Wagner, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 356, 1177(1975)
- 30-G. M. Carlson, P. J. Bechtel y D. J. Graves, *Adv. in Enzymol.* 50, 41(1979)
- 31-E. M. Reimann y R. A. Beham, *Methods in Enzymol.* 99, 51(1983)
- 32-P. S. Stralfors y P. Belfrage, *Biochim. Biophys. Acta* 721, 434(1982)
- 33-P. J. Bechtel, J. A. Beavo y E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* 252, 2691(1977)
- 34-P. H. Sudgen, L. A. Holladay, E. M. Reimann y J. D. Corbin, *Biochem. J.* 159, 409(1976)
- 35-K. Muniyappa, F. H. Leibach y J. Mendicino, *Moll. Cell. Biochem.* 50, 157(1983)
- 36-H. Yamamura, Y. Inone, R. Shimomura y Y. Nishizuka, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 46, 589(1972)

- 37-A. Kumon, K. Nishiyama, H. Yamamura y Y. Nishizuka, *J. Biol. Chem.* 247, 3726(1972)
- 38-H. Yamamura, K. Nishiyama, R. Shimomura y Y. Nishizuka, *Biochem.* 12, 856(1973)
- 39-M. D. Uhler, D. F. Carmichael, D. C. Lee, J. C. Criva, E. G. Krebs y G. S. McKnight, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 1302(1983)
- 40-R. L. Potter y S. S. Taylor, *J. Biol. Chem.* 255, 9706(1980)
- 41-S. Shoji, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, E. H. Fisher y K. Titani, *Biochem.* 22, 3702(1983)
- 42-J. Jahnsen, L. Hedin, S. M. Lohmann, U. Walter, V. J. Kidd, S. L. Ratoosh, W. Beattie, T. Z. Schulz y J. S. Richards(en prensa)
- 43-J. D. Corbin, P. H. Sudgen, L. West, D. A. Flockhart, T. M. Lincoln y D. McCarthy, *J. Biol. Chem.* 253, 3997(1978)
- 44-S. O. Doskeland, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 83, 542(1978)
- 45-A. M. Robinson-Steiner, S. J. Beebe, S. R. Rannels y J. D. Corbin, *J. Biol. Chem.* 259, 10596(1984)
- 46-K. Takio, S. B. Smith, E. G. Krebs, K. A. Walsh y K. Titani, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2544(1982)
- 47-S. R. Rannels y J. D. Corbin, *J. Cyclic. Nucl. Res.* 6, 203(1980)
- 48-P. A. Connelly, T. G. Hastings y E. M. Reimann, *J. Biol. Chem.* 261, 2325(1986)
- 49-J. L. Hedrik y A. J. Smith, *Arch. Biophys. Biochem.* 126, 155(1968)
- 50-N. Fleisher, O. M. Rosen y M. Reichlin, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 54(1976)
- 51-F. Hoffmann, P. J. Bechtel y E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* 252, 1441(1977)

- 52-C.S.Rubin,R.A.Rangel-Aldao,D.Sarkar,J.Erlichman y N.Feischer,
J.Biol.Chem.254,3797(1979)
- 53-C.L.Kapoor,J.A.Beavo y A.L.Steiner,J.Biol.Chem.254,12427(1979)
- 54-S.L.Weldon,M.C.Mumby,J.A.Beavo y S.S.Taylor,J.Biol.Chem.258,
1129(1983)
- 55-M.J.Zoller,A.R.Kerlavage y S.S.Taylor,J.Biol.Chem.254,2408(1979)
- 56-J.D.Corbin,T.R.Soderling y C.R.Park,J.Biol.Chem.248,1813(1973)
- 57-J.Granot,A.S.Mildvan,K.Hiyama,H.Kondo y E.T.Kaiser,J.Biol.Chem.
255,4569(1980).
- 58-O.M.Rosen,J.Erlichman y C.S.Rubin,Adv.Cycl.Nucl.Res.5,253(1975)
- 59-R.Rangel-Aldao y O.M.Rosen,J.Biol.Chem.249,5000(1974)
- 60-J.Erlichman,R.Rosenfeld y O.M.Rosen,J.Biol.Chem.251,3375(1976)
- 61-B.A.Hemmings,A.Aiten,P.Cohen,M.Rymond y F.Hoffmann,Eur.J.Biochem.
27,473(1982)
- 62-D.F.Carmichael,R.L.Geahlen,S.M.Allen y E.G.Krebs,J.Biol.Chem.257,
10440(1982)
- 63-C.W.Scott y M.C.Mumby,J.Biol.Chem.260,2274(1985)
- 64-T.S.Yagura y J.P.Miller,Biochem.20,879(1981)
- 65-D.Ogreid,R.Ekanger,R.H.Suva,J.P.Miller,P.Sturm,J.D.Corbin y
S.O.Doskeland,Eur.J.Biochem.150,219(1985)
- 66-S.R.Rannels y J.D.Corbin,J.Biol.Chem.257,5482(1982)
- 67-D.Ogreid,yS.O.Doskeland,F.E.B.S.Let:121,340(1980)
- 68-68-J.D.Corbin,S.R.Rannels,D.A.Flockhart,A.M.Robinson-Steiner,
M.C.Tigani,S.O.Doskeland,R.Suva y J.P.Miller,Eur.J.Biochem.
125,259(1982)

- 69-S.R.Rannels y J.D.Corbin, J.Biol.Chem. 256, 7871 (1981)
- 70-A.M.Robinson-Steiner y J.D.Corbin, J.Biol.Chem. 257, 5482 (1982)
- 71-A.M.Robinson-Steiner y J.D.Corbin, J.Biol.Chem. 258, 1032 (1983)
- 72-S.J.Beebe, R.Holloway, S.R.Rannels y J.D.Corbin, J.Biol.Chem. 219,
3539 (1984)
- 73-H.G.Nimmo y P.Cohen, Adv.Cycl.Nucl.Res. 8, 146 (1977)
- 74-J.D.Corbin, S.L.Keely, T.R.Soderling y C.R.Park, Adv.Cycl.Nucl.
Res. 5, 265 (1975)
- 75-A.M.Malkinson, D.S.Beer, J.M.Weher y J.R.Sheppard, Biochem.Biophys.
Res. Commun. 12, 214 (1983)
- 76-D.A.Schwartz y C.R.Rubin, J.Biol.Chem. 260, 6296 (1985)
- 77-F.T.Hartl y R.Roskoski, J.Biol.Chem. 258, 3950 (1983)
- 78-S.L.Weldon, M.C.Mumby y S.S.Taylor, J.Biol.Chem. 260, 6440 (1985)
- 79-R.L.Potter, P.H.Stafford y S.Taylor, Arch.Biochem.Biophys. 190,
174 (1978)
- 80-Zick y S.S.Taylor, J.Biol.Chem. 257, 2287 (1982)
- 81-R.Rangel-Aldao y O.M.Rosen, J.Biol.Chem. 252, 7140 (1977)
- 82-M.Vogel y F.Heinz, F.E.B.S.Letters 122, 223 (1980)
- 83-P.H.Sudgen y J.D.Corbin, Biochem.J. 159, 423 (1976)
- 84-S.R.Rannels, C.E.Cobb, L.R.Landiss y J.D.Corbin, J.Biol.Chem. 260,
3423 (1985)
- 85-E.M.Reimann, Biochem. 25, 119 (1986)
- 86-R.Mutzel, M.L.Lacombe, M.N.Simon, J.de Gunzburg y M.Veron, Proc.
Nat.Acad.Sci.U.S.A. 84, 6 (1987)

- 87-S.L.Weldon y S.S.Taylor, J.Biol.Chem.260, 4203(1985)
- 88-D.A.Flockhart, D.M.Watterson y J.D.Corbin, J.Biol.Chem.255, 4435(1980)
- 89-D.A.Walsh, C.D.Ashby, C.Gonzalez, D.Calkins, E.F.Fisher y E.G.Krebs,
J.Biol.Chem.246, 1977(1971)
- 90-C.Ferraz, J.G.Demaille y E.H.Fisher, Biochimie 61, 645(1979)
- 91-J.M.McPherson, S.Whitehouse y D.A.Walsh, Biochemistry 18,
4835(1979)
- 92-J.G.Demaille, K.A.Peters y E.H.Fischer, Biochemistry 16, 3080(1977)
- 93-J.D.Scott, E.H.Fischer, J.G.Demaille y E.G.Krebs, Proc.Nat.Acad.
Sci.U.S.A.
- 94-J.Tsuzuki y J.A.Kiger Jr, Biochem.17, 2961(1978)
- 95-V.Chan, L.C.Huang, G.Romero, R.L.Gillone y C.Huang, Biochem 19,
924(1980)
- 96-S.E.Builder, J.A.Beavo y E.J.Krebs, J.Biol.Chem.255, 3514(1980)
- 97-R.Pastori, N.Kerner, S.Moreno y S.Passeron, Biochem.Biophys.Res.
Commun.101, 663(1981)
- 98-P.A.Connelly, T.G.Hastings y E.M.Reimann, J.Biol.Chem.261, 2325(1986)
- 99-S.O.Doskeland y OGREID, J.Biol.Chem.259, 2291(1984)
- 100-D.OGREID, S.O.Doskeland y J.Miller, J.Biol.Chem.258, 1041(1983)
- 101-M.Seville, P.J.England y J.J.Hobrook, Biochem.J.217, 633(1984)
- 102-C.O.Brostrom, J.D.Corbin, C.A.King y E.G.Krebs, Proc.Nat.Acad.
Sci.U.S.A.68, 2444(1983)
- 103-T.M.Lincoln y J.D.Corbin, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.8, 3239(1977)
- 104-F.T.Hartl, R.Roskoski Jr, M.S.Rosendahl y N.J.Leonard, Biochem.22
2347(1983)
- 105_..

- 105-N.P.Rajinder, D.Bhatnager y R.Roskoski Jr, Fed.Proc.(abstract)
44,702(1985)
- 106-H.N.Bramson, N.Thornas, R.Matsueda, N.C.Nelson, S.S.Taylor y E.T.
Kaiser, J.Biol.Chem.257,10575(1982)
- 107-K.A.Peters, J.A.Demaille y E.H.Fisher, Biochem.16,5691(1977)
- 108-A.Kupfer, J.S.Jimenez y S.Shaltiel, Biochem.Biophys.Res.Commun.
96,77(1980)
- 109-D.A.Flockhart, W.Freist, J.Hoppe, T.M.Lincoln y J.D.Corbin, Eur.
J.Biochem.140,289(1984)
- 110-G.W.Moll Jr y E.T.Kaiser, J.Biol.Chem 251,3993(1976)
- 111-A.H.Pomerantz, V.G.Allfrey, R.B.Merrfield y E.M.Johnson, Proc.
Nat.Acad.Sci.U.S.A.74,4261(1977)
- 112-S.N.Kochetov, T.V.Bulargine, L.P.Saschenko y E.S.Severin, Eur.
J.Biochem.81,111(1977)
- 113-P.F.Cook, M.E.Neville Jr, K.Vrana, F.T.Hartl y R.Roskoski, Biochem.
21,5794(1982).
- 114-S.Withehouse, J.R.Feramisco, J.E.Casnellie, E.G.Krebs y D.A.Walsh,
J.Biol.Chem.258,3693(1983)
- 115-J.Reed y V.Kinzel, Biochem.23,968(1984)
- 116-C.S.Hixon y E.G.Krebs, J.Biol.Chem.255,2137(1980)
- 117-I.Uno y T.Ishikawa, J.Biochem.89,1275(1981)
- 118-I.Uno y T.Ishikawa, Biochim.Biophys.Acta 334,354(1974)
- 119-J.M.Trevillyan y M.L.Pall, J.Biol.Chem 257,3978(1982)
- 120-G.C.Glikin, N.D.Judewicz y H.Torres, Moll.Cell.Biochem.46,
121(1982)

- 121-M.H.Juliani,M.R.Brochtto y J.C.da Costa Maia,Cell.Diff.8,
421(1979)
- 122-M.R.Brochetto,S.Lopez Gomez y J.C.da Costa Maia,Arch.Biochem.
Biophys.217,295(1982)
- 123-S.Lopez Gomez,M.H.Juliani,J.C.da Costa Maia y R.Rangel-Aldao,
J.Biol.Chem.258,6972(1983)
- 124-I.H.Majerfeld,B.H.Leichtling,J.A.Meligeni,E.Spitz y H.V.Rickenberg,
J.Biol.Chem.259,654(1984)
- 125-J.de Gunzburg,D.Part,N.Guiso y M.Veron,Biochem 23,3805(1984)
- 126-R.Kunisawa,T.N.Davis,M.S.Urdea y J.Thorner,Nucl.Ac.Res.15(1),
368(1987)
- 127T.Toda,S.Cameron,P.Sass,M.Zoller,J.D.Scott,B.McMuller,M.Hurwitz,
E.G.Krebs y M.Wigler,Moll.Cell.Biol.7(4),137(1987)
- 128-T.M.Lincoln yJ.D.Corbin,Adv.Cycl.Nucl.Res.15,139(1983)
- 129-A.D.Riggs,G.Reiness y G.Zubay,Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.68,1222
(1971)
- 130-W.B.Anderson,A.B.Scheider,R.L.Perlman y I.Pastan,J.Biol.Chem.
246,5929(1971)
- 131-W.F.Anderson,D.H.Ohlendorf,Y.Takeda y B.Mattheus,Nature 290,
754(1981)
- 132-C.Pabo y M.Lewis,Nature 298,443(1982)
- 133-I.T.Weber,K.Takio,K.Titani y T.A.Steitz,Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.
7679(1982)
- 134-M.Takahashi,B.Blazy y A.Bandras,Biochem.19,5124(1980)
- 135-R.Rangel-Aldao,G.Tovar y M.L.de Ruiz,J.Biol.Chem.258,6979(1983)

- 136-E.Reimann,K.Titani,L.H.Ericson,R.D.Wade,E.H.Fisher y K.A.Walsh,
Biochem.23,4185(1984)
- 137-D.A.Flockhart,D.M.Watterson,y J.D.Corbin,J.Biol.Chem.255,
4435(1980)
- 138-S.Bartnicki-García,J.Bacteriol.96,1586(1968)
- 139-M.Friedenthal,A.Epstein y S.Passeron,J.Gen.Microbiol.82,15(1974)
- 140-J.L.Paznokas y P.Sypherd,J.Bacteriol.124,134(1975)
- 141-M.Orlowsky y P.Sypherd,J.Bacteriol.132,209(1977)
- 142-M.Orlowsky y P.Sypherd,J.Bacteriol.134,76(1978)
- 143-M.Orlowsky y P.Sypherd,Biochem.17,569(1978)
- 144-M.Orlowsky y P.Sypherd,Arch.Microbiol.119,145(1978)
- 145-A.Larsen y P.Sypherd,J.Bacteriol.141,20(1980)
- 146-C.Paveto,A.Epstein y S.Passeron,Arch.Biochem.Biophys.169,
449(1975)
- 147-C.Paveto y S.Passeron,Arch.Biochem.Biophys.178,1(1977)
- 148-J.C.C.Maia y E.Camargo,Cell.Differ.3,147(1974)
- 149-R.Vale,S.L.Gomez,J.C.C.Maia,L.Menucci,FEBS.Lett.67,189(1976)
- 150-S.L.Gomez,L.Menucci y J.C.C.Maia,Cell.Differ.9,169(1980)
- 151-P.M.Silverman,P.E.Epstein,"Microbiol.",ed.D.Schlessinger,
484(1975)
- 152-W.D.Scott y B.Solomon,J.Bacteriol.128,454(1975)
- 153-W.D.Scott,Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.73,2995(1976)
- 154-H.F.Terenzi,M.M.Flawiá,M.T.Tellez-Iñón y H.N.Torres,J.Bacteriol.
126,91(1976)
- 155-H.F.Terenzi,M.M.Flawiá y H.N.Torres,Biochem.Biophys.Res.Comm.
58,990(1974)
- 156-T.M.Konijn,J.G.C. van de Meene,J.T.Benner y D.S.Barkley,Proc.
Nat.Acad.Sci.U.S.A.58,1152(1967)

- 157-M.L.Cantore y S.Passeron, Arch.Biochem.Biophys.219,1(1982)
- 158-M.M.Flawiá y H.N.Torres, J.Biol.Chem.248,4517(1973)
- 159-S.L.Gomez y J.C.C.Maia, Biochim.Biophys.Acta,567,257(1979)
- 160-M.A.Galvagno, S.M.Moreno, M.L.Cantore y S.Passeron, Biochem.Biophys. Res. Commun.89,779(1979)
- 161-M.A.Galvagno, S.M.Moreno y S.Passeron, Arch.Biochem.Biophys.214, 573(1982)
- 162-N.Kerner, Tesis doctoral, U.B.A.(1984)
- 163-M.Seigelchifer y S.Passeron, Arch.Biochem.Biophys.229,403(1984)
- 164-M.Seigelchifer, Tesis doctoral, U.B.A.(1985)
- 165-S.Moreno, C.Paveto y S.Passeron, Arch.Biochem.Biophys.178,1(1979)
- 166-S.Moreno y S.Passeron, Arch.Biochem.Biophys.199,321(1980)
- 167-R.Pastori, N.Kerner, S.M.Moreno y S.Passeron, Biochem.Biophys. Res. Commun.101,663(1981)
- 168-R.Pastori, Tesis doctoral, U.B.A.(1983)
- 169-S.Moreno, R.Pastori y S.Passeron, Moll.Cell.Biochem.52,13(1983)
- 170-Canalco, Sagekit, Miles Laboratories(1980)
- 171-C.R.Merril, M.L.Cunau y D.Goldman, Anal.Biochem.110,201(1981)
- 172-T.Laurent y J.Killander, J.Chromatography 14,317(1964)
- 173-R.Martin y B.Ames, J.Biol.Chem.236,1372(1961)
- 174-L.Siegel y K.Monty, Biochim.Biophys.Acta 112,346(1966)
- 175-T.Haga, K.Haga y A.Gilman, J.Biol.Chem.252,5776(1977)
- 176-R.Cecil y A.Ogston, Biochem.J.49,105(1951)
- 177-A.Garen y C.Levinthal, Biochim.Biophys.Acta 38,470(1960)
- 178-R.Hill, Nature(Lond)174,501(1954)

- 179-H.F.Terenzi, E.Rosellino y S.Passeron, Eur.J.Biochem.18, 342(1971)
- 180-Worthington Enzyme Manual, Worthington Biochemical Corp., Freehold.
New Jersey
- 181-M.Bradford, Anal.Biochem.72, 248(1976)
- 182-I.Glynn y Chappell, Biochem, J.90, 147(1964)
- 183-K.Chang, M.Marcus y P.Cuatrecasas, J.Biol.Chem.249, 6854(1974)
- 184-R.Pastori, S.Moreno y S.Passeron, Moll.Cell.Biochem.69, 55(1985)
- 185-S.Rannels y J.D.Corbin, Methods in Enzymol.99(F), 168(1983)