

Tesis de Posgrado

Estudio del AMP cíclico en sistemas fotosintéticos

Bianchini, Graciela Mabel

1988

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:

Bianchini, Graciela Mabel. (1988). Estudio del AMP cíclico en sistemas fotosintéticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2177_Bianchini.pdf

Cita tipo Chicago:

Bianchini, Graciela Mabel. "Estudio del AMP cíclico en sistemas fotosintéticos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2177_Bianchini.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ESTUDIO DEL AMP CICLICO EN SISTEMAS FOTOSINTETICOS

Graciela Mabel Bianchini

Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas

Director: Dra. Mirtha M. Flawiá

1988

Instituto de Investigaciones en
Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)
CONICET

Tesis.
2177
p. 3.

A Estela,
Jorge, Liliana,
Antonio y Jorgito

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mirtha M. Flawiá, por su invaluable ayuda e incesante empuje que hicieron posible la realización de esta Tesis.

A la Dra. María T. Téllez-Iñón, por su guía generosa. Muchos de los experimentos de esta Tesis fueron posibles gracias a su colaboración.

Al Dr. Héctor N. Torres, por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto y acceder a sus enseñanzas.

A mis queridísimos compañeros de equipo Jorge Muschiatti, Ana Pastini y Horacio Martinetto, por brindarme su invaluable ayuda, con quienes compartí los diferentes momentos vividos durante esta etapa.

A los inolvidables camaradas del 211: El tano (Guillermo Taccioli), Chuchu (Daniel Altschuler), Ricky (Ricardo Attar) y Erich Grotewold, por haber compartido tantas horas de humor.

A mi amiga María Laura Gómez por su querida amistad.

A Leonardo Erijman, por su desinteresada ayuda y cálida amistad.

A Mercedes Goin, Patricia Levy-Yeyati, Facundo Batista, Rosana Celnik, Omar Coso, Laura Moratinos y Gabriela Levitus, por su grata compañía.

A Adriana Urman, por su paciencia y profesionalismo en la transcripción de esta tesis.

A Norberto Malarini, por su disposición y conocimiento para la realización de los dibujos.

A Mariano Rodríguez, María Julia Alvarez y Leonor Acevedo, por su esmerada colaboración técnica.

No se ha de condenar
el que en el curso del proceso
científico se formule alguna
regla general de una conclusión previa

Leonardo Da Vinci

I N D I C E

Página

ABREVIATURAS

INTRODUCCION.....	1
I. CONSIDERACIONES GENERALES.....	2
II. PROPIEDADES GENERALES DE LAS ADENILATO CICLASAS.....	3
II.1. Sustrato.....	4
II.2. Distribución.....	4
II.3. Localización.....	4
III. ADENILATO CICLASA SENSIBLE A HORMONAS.....	8
III.1. Receptores.....	8
III.2. Componente catalítico.....	11
III.3. Componente regulatorio. Proteínas G.....	13
G _{sa}	17
G _{ia}	18
G _{ra}	19
G _{oa}	20
Otras proteínas G.....	20
Subunidades β	22
Subunidades γ	22
III.4. Mecanismo de regulación de la adenilato ciclasa mediada por receptor.....	23
IV. ADENILATO CICLASA EN EUCARIOTES INFERIORES.....	31

V.	ADENILATO CICLASA EN BACTERIAS.....	36
VI.	ADENILATO CICLASAS ESTIMULABLES POR Ca ²⁺ - CALMODULINA.....	43
VII.	CYANOBACTERIAS.....	45
	Taxonomía.....	45
	Célula vegetativa.....	48
	Heterocisto.....	54
	Acineto.....	57
	Metabolismo.....	59
	OBJETIVOS.....	61
	MATERIALES Y METODOS.....	64
I.	<i>ANABAENA</i> sp.....	65
I.1.	Cepa utilizada y condiciones de cultivo.....	65
I.2.	Fraccionamiento subcelular.....	66
II.	PURIFICACION DE ADENILATO CICLASA.....	66
II.1.	Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.....	66
II.2.	Cromatografía en columna de Hexilamino-sepharosa.....	67
II.3.	Cromatografía en Ultrogel AcA34.....	67
III.	DETERMINACION DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LA ADENILATO CICLASA.....	68
III.1.	Filtración en geles.....	68
III.2.	Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa.....	68

IV.	CALCULO DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS.....	69
IV.1.	Volumen específico parcial.....	69
IV.2.	Radio de Stokes.....	72
IV.3.	Peso molecular.....	72
IV.4.	Coeficiente friccional.....	72
IV.5.	Parámetros de las proteínas marcadoras.....	73
V.	ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	74
V.1.	Sistema desnaturalizante y recuperación de la enzima.....	74
VI.	ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA.....	75
VII.	ADENILATO CICLASA DE <i>Anabaena sp</i> (PCC 7119): OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	76
VII.1.	Esquema de inmunización.....	76
VII.2.	Procedimiento de fusión y cultivo.....	77
VII.3.	Determinación de anticuerpos en el medio de cultivo de hibridomas.....	78
VII.4.	Determinación de anticuerpos específicos de adenilato ciclasa.....	79
VIII.	PURIFICACION DE UN FACTOR SEMEJANTE A CALMODULINA.....	80
VIII.1.	Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.....	80
VIII.2.	Cromatografía de afinidad en columa de Phenyl- sepharosa	80
IX.	DETECCION DE CALMODULINA.....	81

X.	FOSFODIESTERASA DE AMP CICLICO (PDE).....	82
X.1.	Purificación parcial de la PDE de cerebro bovino.....	82
X.2.	Ensayo de la actividad de la PDE de <i>Anabaena sp</i> (PCC 7119).....	82
XI.	PROCEDIMIENTOS ANALITICOS.....	82
XI.1.	Determinación de proteínas.....	82
XI.2.	Determinación de la posición de las proteínas marcadoras en los gradientes de sacarosa y en las columnas de Ultrogel Aca34.....	83
XI.3.	Desalado de muestras proteicas.....	83
XII.	REACTIVOS.....	84
	RESULTADOS Y DISCUSION.....	85
I.	ADENILATO CICLASA DE <i>ANABAENA sp</i> (PCC 7119).....	86
I.1.	Localización subcelular.....	86
I.2.	Propiedades cinéticas de la adenilato ciclasa de <i>Anabaena sp</i> (PCC 7119).....	91
II.	PURIFICACION DE LA ADENILATO CICLASA DE <i>ANABAENA sp</i> (PCC 7119).....	96
II.1.	Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.....	96
II.2.	Cromatografía en columna de hexilamino-sepharosa.....	98
II.3.	Cromatografía preparativa en Ultrogel Aca34.....	98
II.4.	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	101

III.	PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LA ADENILATO CICLASA DE <i>ANABAENA sp</i> (PCC 7119).....	107
III.1.	Filtración por geles.....	107
III.2.	Ultracentrifugaciones en gradientes de sacarosa.....	107
IV.	PURIFICACION DE UNA PROTEINA SIMILAR A CALMODULINA....	112
IV.1.	Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.....	112
IV.2.	Cromatografía de afinidad en columna de Phenyl- sepharosa.....	112
V.	REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE ADENILATO CICLASA DE <i>Anabaena sp</i> (PCC 7119).....	115
V.1.	Activación por calmodulina.....	115
VI.	CONCLUSIONES.....	128
	BIBLIOGRAFIA.....	129

ABREVIATURAS EMPLEADAS

5' AMP.....	adenosina 5'-monofosfato
ADP.....	adenosina 5'-difosfato
AMPc.....	adenosina 3'-5' monofosfato cíclico
ATP.....	adenosina 5'-trifosfato
BSA.....	seroalbúmina bovina
CaM.....	calmodulina
CAP o CRP.....	proteína que une AMPc
cDNA.....	ácido deoxiribonucleico copia
CT.....	toxina del cólera
DEAE.....	dietyl aminoetil
DG.....	diacylglicerol
DNA.....	ácido deoxiribonucleico
EDTA.....	ácido etilenaminotetracético
EGTA.....	etilenglicol-bis-(β-aminoetil-éter)-tetraacetato
GDP.....	guanosina 5'-difosfato
GMPc.....	guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico
GMP.....	guanosina 5'-monofosfato
GPP(NH)P.....	5'guanilil-imidodifosfato
GTP-γ-S.....	guanosina 5'-0-(3-tiotrifosfato)
GTP.....	guanosina 5'-trifosfato
HAT.....	hipoxantina-aminopterina-timidina
HT.....	hipoxantina-timidina
IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfato
Me ²⁺	catión divalente
NAD.....	nicotinamida adenina dinucleótido
NADP.....	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PDE.....	fosfodiesterasa
PEG.....	polietilen glicol
PEP.....	Fosfoenol piruvato

Abreviaturas

Pi.....	ortofosfato inorgánico
PIP ₂	fosfatidil inositol 4,5-difosfato
PIPES.....	ácido 1,4 piperazina-dietano sulfúrico
PLC.....	fosfolipasa C
PMSF.....	fluoruro de fenil metil sulfonato
PPi.....	pirofosfato inorgánico
PSA.....	persulfato de amonio
RNA.....	ácido ribonucleico
SDS.....	dodecil-sulfato de sodio
TEMED.....	N,N,N',N' tetrametil etilendiamina
TRIS.....	2-amino-2(hidroximetil)-1,3 propanodiol

INTRODUCCION

I. CONSIDERACIONES GENERALES

La estructura de la 3',5' adenosina monofosfato cíclico fue descripta por primera vez por el grupo de Sutherland (1,2) y por Markham (3,4). El descubrimiento de su papel fisiológico data de 1957, cuando Sutherland y sus colaboradores encontraron que el AMP cíclico mediaba el efecto de hiperglucemia producido por la adrenalina y el glucagón, estimulando la conversión de la glucógeno fosforilasa de la forma inactiva a la activa (1,5). Desde ese momento se ha trabajado en un gran número de laboratorios y se ha establecido tanto la ubicuidad del AMP cíclico, como la universalidad de sus funciones regulatorias.

El brillante concepto de Sutherland de **segundo mensajero** (6), hipótesis que establece que el nucleótido cíclico media el efecto de una amplia variedad de hormonas y otros agentes biológicos activos, ha encontrado amplia confirmación. En este modelo, la hormona representa el **primer mensajero**. La presencia del primer mensajero modificaría la concentración interna del segundo mensajero. La mayoría de las hormonas, y en especial las polipeptídicas por su gran tamaño, serían incapaces de atravesar la barrera constituida por la membrana plasmática, que es la encargada de reconocer señales del medio externo y transducirlos en forma de mensajes intracelulares, los cuales, a su vez, originan respuestas fisiológicas determinadas. En la superficie celular existen moléculas, llamadas receptores hormonales, que son capaces de reconocer específicamente a las diferentes hormonas, y de tomar contacto con el sistema interno encargado de producir AMP cíclico.

El AMP cíclico sintetizado puede, a su vez, ser degradado por la enzima **fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos**, con producción de 5'AMP, siendo esta reacción inhibida por las **metilxantinas**.

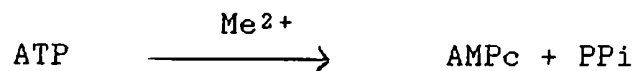
Los estudios realizados han abierto un nuevo panorama en el control del metabolismo celular, control en el que está involucrado el Ca^{2+} como **segundo mensajero** de amplificación de señales extracelulares. Los tres mensajeros (las hormonas, el AMPc y el Ca^{2+}) se complementan no sólo en la distancia que recorre la señal, sino en la intensidad y duración de la respuesta celular (7).

Un ejemplo de interacción de sistemas de segundo mensajero es el caso de la regulación de la adenilato ciclasa por el Ca^{2+} de las ciliias del paramecio (8).

En procariotas, el caso más estudiado es el de *Escherichia coli*, donde el AMPc actúa a través de una proteína receptora, llamada CAP o CRP, que se une al nucleótido, y a su vez este complejo (CRP-AMPc) se une al DNA, permitiendo a la RNA polimerasa iniciar la transcripción de ciertos operones que codifican enzimas que intervienen en el catabolismo de ciertos azúcares (lactosa, arabinosa, galactosa, etc.)(9,10).

II. PROPIEDADES GENERALES DE LAS ADENILATO CICLASAS

La adenilato ciclasa [ATP pyrophosphate-lyase (cyclizing) E.C. 4.6.1.1], es la enzima que cataliza la síntesis de AMP cíclico a partir de ATP, según la siguiente reacción:



II.1. Sustrato

Los sustratos de esta reacción pueden ser los complejos ATPMg^{2+} o ATPMn^{2+} , donde el Mn^{2+} o el Mg^{2+} son activadores de la misma. La actividad enzimática de las adenilato ciclasas de *Neurospora crassa* (11), *Mucor rouxii* (12), *S. cerevisiae* (13), testículo (14) y la de muchas bacterias, depende casi exclusivamente de Mn^{2+} . Esta dependencia casi absoluta de Mn^{2+} es, aparentemente, una consecuencia de la ausencia o disfuncionalidad del componente regulatorio de la enzima, ya que éste le confiere a la subunidad catalítica la capacidad de utilizar ATPMg^{2+} como sustrato (15). Como la concentración de Mg^{2+} es aproximadamente diez veces mayor que la de Mn^{2+} , la mayor afinidad del ATP por este último podría explicar que la enzima actuase *in vivo* con ambos cationes (16).

II.2. Distribución

La adenilato ciclasa está presente en la mayoría de los organismos a lo largo de la escala evolutiva. Esta enzima está presente en bacterias (17-20), levaduras (13), hongos (11,12), protozoos (21,22), plantas superiores (23) y animales (24).

II.3. Localización

En todas las células eucariotas estudiadas, las adenilato ciclasas son enzimas unidas a membranas, que se encuentran en la cara interna de la misma. Hasta el momento, las excepciones a esta regla las constituyen las ciclasas de los tubos seminíferos (14,25) y la de *Medicago sativa* (alfalfa) (23), que tienen localización citoplasmática.

En eucariotes inferiores y procariotes, la localización de la adenilato ciclasa varía de un organismo a otro.

En *Escherichia coli* (31), el 80% de la actividad enzimática está en la fracción citosólica, indicando que la enzima es soluble o, a lo sumo, débilmente unida a membrana. En *Streptococcus salivarius* (32) es citoplasmática y en el caso de *Bordetella pertussis* (33), la enzima es excretada al medio.

En hongos, como en el caso de *Neurospora crassa* (34), la adenilato ciclasa está asociada débilmente a membrana, mientras que tanto en *Mucor rouxii* (12) como en *Trypanosoma cruzi* (22), es intrínseca de membrana.

En la Tabla 1, se puede ver un resumen de la distribución y localización de diferentes adenilato ciclasas de eucariotes superiores, definidas como holociclasas, ya que presentan las subunidades regulatorias y la catalítica. Son regulables por hormonas, GTP, GPP(NH)P, forskolina, etc.

En la tabla 2 se resumen las adenilato ciclasas de eucariotes inferiores y bacterias, que son típicas protociclasas; presentan sólo el componente catalítico; con excepción de la enzima de *T. cruzi* que tiene un componente regulatorio rudimentario.

ORGANISMO	Cación		Localiz.	FACTOR			REFERENCIA
	Mn ²⁺	Mg ²⁺		F	GTP	C.Tx	
HOLOCICLASAS							
<i>Fasciola hepatica</i>	+	+	M	+	+		266
Hígado	+	+	M	+	+	+	24,30
Tejido adiposo	+	+	M	+	+	+	25,246
Eritrocitos	+	+	M	+	+	+	26
Músculo esquelético	+	+	M	+	+	+	27
Cerebro	+	+	M	+	+	+	28
Ovario	+	+	M	+	+	+	29,6
Riñón	+	+	M	+	+	+	29

Tabla 1: Distribución y localización de diferentes holociclasas.

ORGANISMO	Cación		Localiz.	FACTOR			REFERENCIA
	Mn ²⁺	Mg ²⁺		F	GTP	C.Tx	
PROTOMICLASAS							
<i>Bordetella pertussis</i>	+	+	S	-	-	-	177-179
<i>Escherichia coli</i>	+	+	M,S	-	-	-	31
<i>Brevibacterium liq.</i>	+	+	S	-	-	-	35,36
<i>Streptococcus salivarius</i>	+	+	M,S	+	-	-	32
<i>Dictyostelium dis.</i>	+	+	M	-	-	-	37
<i>Blastocladiella emersonii</i>	+	-	M	-	-	-	38
<i>Saccharomyces cerevis.</i>	+	+	M	-	-	-	13
<i>Neurospora crassa</i>	+	-	M,S	-	-	-	11
<i>Mucor rouxii</i>	+	-	M,S	-	-	-	39
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	?	+	M,S	+	-	-	40
<i>Trypanosoma cruzi</i>	+	-	M	-	-	-	22
Células testículo	+	-	S	-	-	-	14,25
Linfoma S-49	+	-	M	-	-	-	117
<i>Medicago sativa</i>	+	+	S	-	-	-	23

Σ = soluble?

Tabla 2: Distribución y localización de diferentes protomiclasas

III. ADENILATO CICLASA SENSIBLE A HORMONAS

Los sistemas celulares transductores de los estímulos externos en señales intracelulares son los componentes esenciales de la membrana plasmática.

Un paradigma que surge de estos "sistemas transmembrana" es que generalmente involucran tres componentes distintos.

1. Receptores específicos expuestos en la cara externa de la membrana celular, que reconocen e interactúan con hormonas o drogas, o responden a estímulos externos como la luz.
2. Las proteínas transductoras que unen e hidrolizan GTP, se interponen física y funcionalmente entre muchos receptores y moléculas efectoras. Estas son proteínas regulatorias, llamadas "proteínas G" (42).
3. Enzimas efectoras expuestas a la cara citoplasmática, como la adenilato ciclasa, que genera un segundo mensajero, el AMP cíclico (41).

III.1. Receptores

Existen gran variedad de hormonas que ejercen su acción celular a través de la adenilato ciclasa (24); la mayoría de ellas ejerce un efecto activador, mientras que otras, ejercen un efecto inhibitorio sobre la enzima (43,44). Los avances recientes en el estudio de la superficie celular han elevado la identificación de por lo menos cuatro clases funcionales de receptores: aquéllos que presentan actividad de tirosina quinasa, los que

Asociados a los canales de iones, los que median la internalización del ligando y los que catalizan el intercambio de nucleótidos de guanina mediante las proteínas G, en respuesta a la unión con el ligando (45).

Dentro de estos últimos existen los llamados receptores β -adrenérgicos (46), que están asociados a la estimulación de la adenilato ciclasa y los α -adrenérgicos o muscarínicos (47), asociados a la inhibición de la enzima.

Estos receptores se han purificado a homogeneidad (48-50) y reconstituido con proteínas G en vesículas de fosfolípidos (51). Se ha estudiado su regulación por modificación covalente (52) y, recientemente, se han aislado y secuenciado los genes y/o cDNAs (DNAs copia) de tres de los cuatro subtipos (53-58).

Esta familia de receptores ejemplificada por los receptores adrenérgicos, incluye también a la rodopsina, que está acoplada vía la proteína G, transducina, a una fosfodiesterasa de GMP cíclico (59), y es posible que los receptores de las sustancias odoríferas formen parte de este grupo (60).

Se ha deducido la secuencia aminoacídica para los receptores β_1 (56), β_2 (53,54) y α_2 (57). Los receptores adrenérgicos y relacionados son proteínas integrales de membrana que requieren detergentes para su solubilización.

En el diagrama de la Figura 1 se puede observar como estos receptores están dispuestos en la membrana plasmática.

Todos los receptores presentan siete tramos transmembrana, de 20 a 28 aminoácidos hidrofóbicos, que están conservados. Otras zonas como los *loops* citoplasmáticos C-I y C-II están razonablemente conservados. Los dominios extracelulares, el *loop* citoplasmático C-III y el carboxilo terminal son divergentes.

Tienen uno o más sitios potenciales de N-glicosilación cerca del N-terminal, y sitios potenciales de fosforilación en los dominios citoplasmáticos.

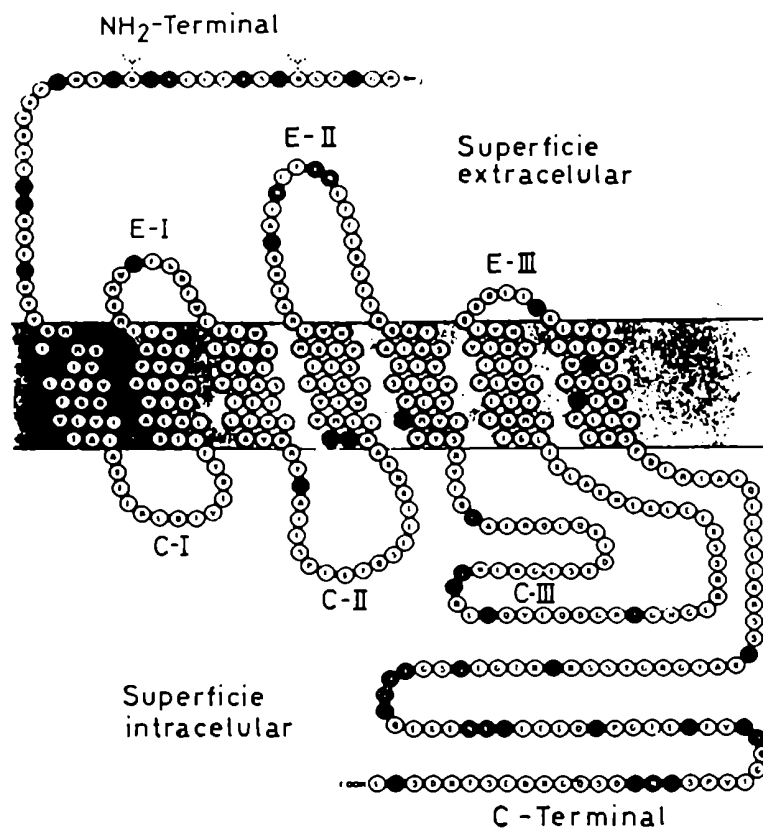


Figura 1: Representación esquemática de la posible organización de los receptores adrenérgicos. Segmentos M-I a M-VII, tramos transmembrana; aminoterminal y *loops* E-I, E-II y E-III, expuestos a la superficie extracelular; carboxilo terminal, *loops* C-I, C-II y C-III, expuestos a la cara citoplasmática

Este arreglo transmembrana que se propone, es especulativo y está basado en los estudios de hidrofiliidad de las secuencias de aminoácidos.

Hay evidencias que sugieren que las regiones conservadas transmembrana están involucradas en la unión a los ligandos y los dominios citoplasmáticos están acoplados a las proteínas regulatorias, pero hasta el momento los resultados son preliminares (61).

Los receptores están sujetos a varias formas de regulación. Cuando una hormona estimula adenilato ciclasa, los niveles intracelulares de AMP cíclico aumentan, la proteína quinasa A se activa, y el receptor β -adrenérgico se fosforila. Este importante mecanismo es el que se conoce con el nombre de desensibilización heteróloga (52).

En la Figura 2 se puede observar un modelo de los eventos moleculares involucrados en la desensibilización homóloga del receptor β -adrenérgico. La fosforilación y el desacople funcional de los receptores de la adenilato ciclasa activada ocurre luego que el agonista se ha acoplado a su receptor. Posteriormente, el receptor es internalizado dentro de las células en vesículas y allí desfosforilado, regenerado y reciclado.

III.2. Componente catalítico

El componente catalítico de la adenilato ciclasa es el encargado de catalizar la conversión de ATP a AMP cíclico, en presencia de cationes divalentes.

Aunque se ha progresado mucho en la resolución bioquímica de los componentes de la adenilato ciclasa de eucariotes, la purificación de la subunidad catalítica es la que mayores dificultades ha presentado.

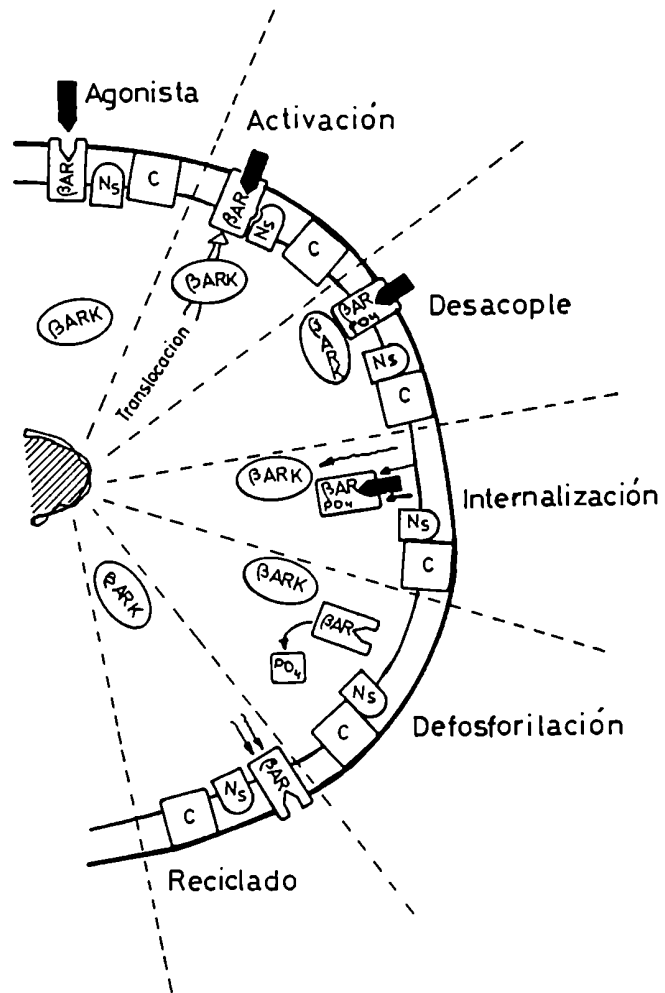


Figura 2: Modelo de desensibilización homóloga de receptores. β AR, receptor β -adrenérgico; N_s , subunidad estimuladora de la adenilato ciclasa; C, subunidad catalítica de la adenilato ciclasa; β -ARK, quinasa del receptor β -adrenérgico.

El descubrimiento del diterpeno forskolina, que actúa estimulando la adenilato ciclasa en preparaciones libres del componente regulatorio G_s , llevaron a Seamon y Daly (62) a especular que éste actúa directamente sobre la enzima. Siguiendo esta pauta, Pfeuffer y Metzger (63), prepararon una columna de afinidad, 7-0-hemisuccinildeacetil-forskolina-agarosa, que fue utilizada por Smigel (64) para purificar la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa de cerebro bovino, libre de la subunidad estimuladora de la enzima.

III.3. Componente regulatorio. Proteínas G

El hecho de que una proteína G estuviera involucrada en mecanismos de señales transmembrana fue sugerido por Rodbell, Birnbaumer y col. en 1971 (65), debido a que se descubrió el requerimiento de GTP para la activación hormonal de la adenilato ciclasa.

La purificación de las proteínas G (66) que están asociadas a la enzima, la capacidad de ciertas toxinas de ADP-ribosilar (67-72) proteínas G específicas (toxina del cólera y *pertussis*), la purificación de los receptores β -adrenérgicos (49) y por supuesto de la adenilato ciclasa, han dado una vasta información sobre los mecanismos moleculares por los cuales se transducen señales del medio externo hacia el citoplasma celular.

La regulación de la actividad de la adenilato ciclasa en respuesta a agentes estimulatorios (adrenalina, ACTH, gonadotropinas), o a sustancias inhibitorias (agonistas α_2 -adrenérgicos), es mediado por distintas proteínas G, llamadas G_s (estimuladora) y G_i (inhibitoria)(Figura 3).

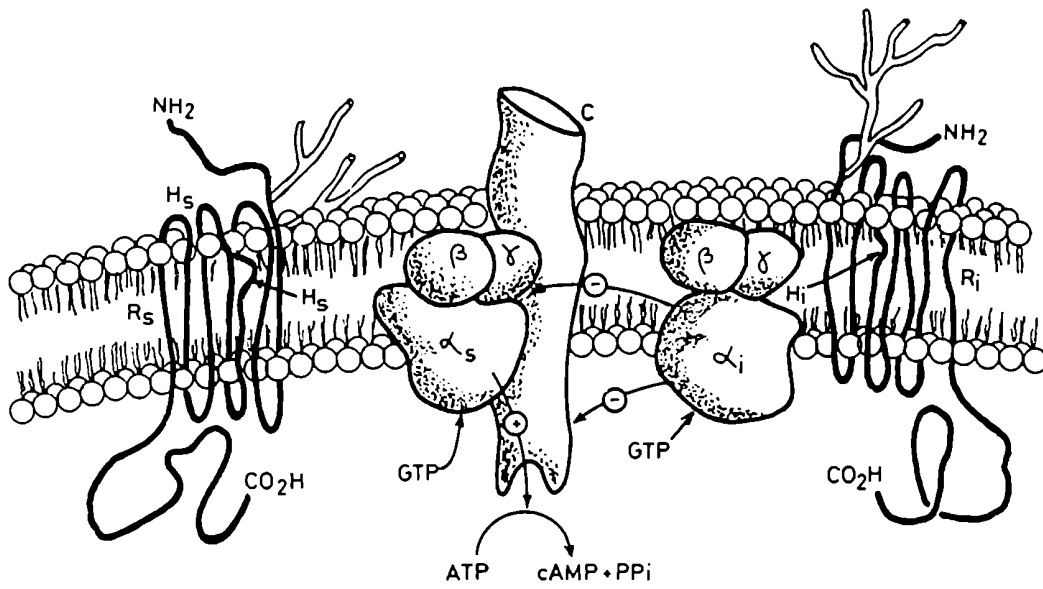


Figura 3. Sistema adenilato ciclasa. R_s, receptor estimuladorio; R_i, receptor inhibitorio; α_sβγ, subunidad regulatoria; α_iβγ, subunidad inhibitoria; C, subunidad catalítica.

La concentración de GMP cíclico en los segmentos externos de los bastones de la retina, determinante crucial de la excitación visual, es regulada por una proteína G llamada transducina o Gt, la cual activa la fosfodiesterasa de GMP cíclico en respuesta a la rodopsina activada por luz (59)(Figura 4).

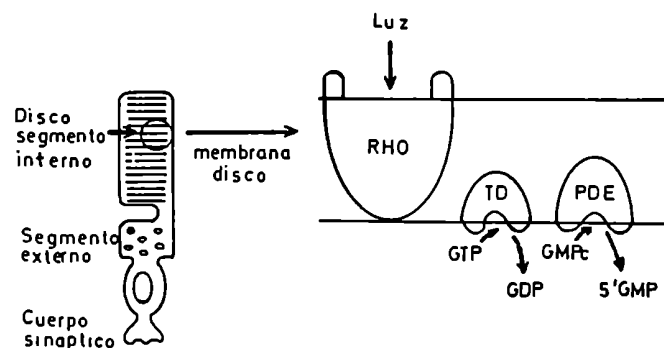


Figura 4. Estimulación fosfodiesterasa de GMP cíclico en la retina. RHO, rodopsina; TD, transducina; PDE, fosfodiesterasa de GMP cíclico.

Muchas hormonas movilizan Ca^{2+} intracelular por la habilidad de hidrolizar el fosfatidil inositol 4,5-difosfato (PIP_2) a inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) (73,74), mediante la fosfolipasa C (PLC) que está influenciada por nucleótidos de guanina. La estimulación de la PLC mediada por receptores está probablemente asociada a proteínas G. Un modelo simple propone que, una vez formado el IP_3 y el diacilglicerol (DG), éstos sirven como segundos

mensajeros, el primero (IP_3) para liberar las reservas de Ca^{2+} intracelular y el segundo (DG) activaría la proteína quinasa C, dependiente de fosfolípidos (75), modelo que no está probado. En la Figura 5 se puede observar un esquema de este modelo.

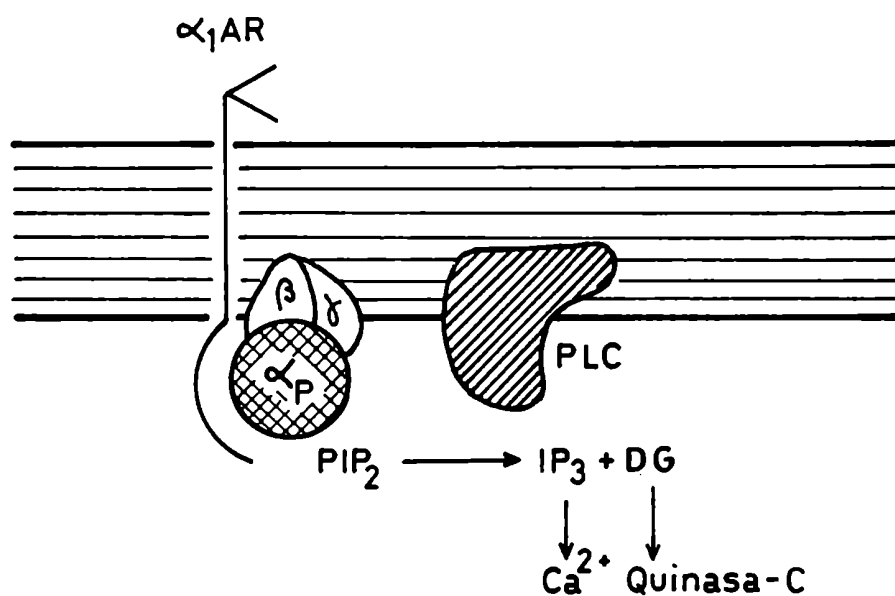


Figura 5. Estimulación de la PLC mediada por receptor α_1AR , receptor; $\alpha\beta\gamma$, proteína G; PLC, fosfolipasa C; PIP_2 , fosfatidil inositol 4,5-difosfato; IP_3 , inositol 1,4,5 trifosfato; DG, diacilglicerol.

También hay evidencias recientes donde se ve la posibilidad de que las proteínas G ejerzan un control sobre la función de canales iónicos (74).

Las proteínas G son heterotrímeros, con subunidades designadas α , β y γ en orden decreciente de masa. Las subunidades α difieren claramente dentro de los miembros de esta familia y, al

menos por el momento, definen la proteína G. Las subunidades β y γ probablemente sean compartidas entre algunas subunidades α para formar oligómeros específicos.

El porcentaje de identidad de secuencia entre las subunidades α varía entre 35 y 94% y tienen 82 aminoácidos invariantes (145). La mayoría de las regiones que presentan secuencias altamente conservadas se hallan cerca de las zonas que participan en la interacción con los nucleótidos de guanina.

Las bases de estas predicciones provienen de estudios biofísicos realizados con la estructura cristalina de la forma GDP del Ef-Tu (231) y trabajos genéticos aplicando mutaciones en proteínas Ras, que afectan las interacciones con los nucleótidos de guanina. Estas dos estrategias han aportado resultados complementarios y han permitido identificar cinco regiones de homología que son cruciales en la interacción con los nucleótidos de guanina. Son las llamadas A, C, E, G, e I, según la nomenclatura de Halliday (162). Regiones análogas se pueden encontrar en las proteínas G (274).

G_s α

G_s se definió funcionalmente por su capacidad de activar la adenilato ciclasa. En su purificación se encontró que era una mezcla de dos oligómeros que diferían en la subunidad α (Peso molecular aparente en geles SDS-poliacrilamida, 52000 y 45000), y que poseían subunidades β y γ indistinguibles (66,76). Se clonaron los cDNAs de cerebro bovino (77), adrenal bovina (78) y cerebro de rata (79). Se vio que las secuencias para estas dos variantes era idéntica y que diferían en la alteración de dos y la delección de 14 aminoácidos, por lo que se plantea que ambos provienen de un mismo gen, y sus mRNAs son producto de un *splicing* alternativo (74).

La proteína G_s fue purificada también utilizando cromatografía de afinidad de GTP-Sepharosa (80). Su papel estimulador se ha probado cuando se reconstituyó el sistema adenilato ciclasa en vesículas de fosfolípidos a partir de los componentes purificados, receptores β -adrenérgicos, G_s y la ciclasa (81). Su actividad regulatoria está determinada por la capacidad de la subunidad $G_{s\alpha}$ de unir e hidrolizar GTP. La toxina del cólera interrumpe la señal de transducción porque ADP-ribosila a $G_{s\alpha}$, inhibiendo de esta manera su actividad de GTPasa intrínseca.

Recientemente, se ha aislado y caracterizado el gen de la subunidad α de G_s humana, a partir de una biblioteca genómica humana, utilizando como sonda para detectarlo un cDNA de rata, y se vio que este gen es de alrededor de 20 Kb y está compuesto de 13 exones y 12 intrones (82).

Se sugiere también, que debido a la organización del gen, exón-intrón, existirían cuatro tipos de RNAs mensajeros, que ya fueron encontrados por Bray y col. (83), que derivan de un solo gen por el mecanismo que se conoce bajo el nombre de "splicing alternativo" a partir de un mRNA precursor. Esto explicaría por qué, varios autores encuentran más de una especie de cDNA cuando se pretende caracterizar las $G_{s\alpha}$.

$G_{i\alpha}$

La proteína $G_{i\alpha}$ fue visualizada por primera vez como un sustrato de 41 Kd para la ADP-ribosilación por la toxina *pertussis*. La proteína oligomérica G_i fue purificada de hígado de conejo (84,85) y eritrocitos humanos (86,87). Aunque la subunidad α de G_i es distinta a la de G_s , la subunidad β es aparentemente idéntica (88). También se detectó la subunidad γ (75).

Las propiedades funcionales atribuibles a G_i fueron deducidas por reconstitución de la proteína de hígado de conejo y las membranas de las células de linfoma S49 (89,90).

Se han purificado G_i de cerebro bovino (91,92) y de rata (93), pero existe heterogeneidad de sustrato para la toxina *per-tussis*.

Nukada y col. (94) purificaron la $G_{i\alpha}$ (α_{41}) de cerebro bovino y determinaron su secuencia aminoacídica por péptidos tripticos. Itoh y col. (79) aislaron un clon de cDNA de una biblioteca de glioma C6 de rata y encontraron que la secuencia de aminoácidos deducida difería en aproximadamente un 11% de la encontrada por Nukada *et al* (94).

Apárentemente, también las subunidades α_i presentan cierta heterogeneidad, y este hecho también se puede observar en cerebro humano, donde se han encontrado dos clones para la subunidad α de G_i (95).

Bourne y su grupo (96) construyeron la primera cadena α quimérica, que posee el extremo NH₂-terminal de α_i y el COOH-terminal de α_s , ambos murinos. Este cDNA de la subunidad α recombinante está clonado en un vector retroviral y con él transfectaron células S49 cyc⁻ (deficientes en ciclasa) y demostraron que, al responder el híbrido α_i/α_s a la estimulación de adenilato ciclasa vía el receptor adrenérgico, sería el dominio COOH-terminal de la subunidad α_s la que se acopla al receptor, para mediar esta respuesta estimuladora.

G_T α

G_T o transducina (T) es uno de los componentes mayoritarios de los discos de los segmentos externos de la retina y se purifica sin el uso de detergentes (97). La disponibilidad de anticuerpos contra la subunidad α de T y el conocimiento parcial de

su secuencia aminoacídica, ha permitido el clonado de DNAs copia por varios laboratorios (74). Se han elucidado dos secuencias que difieren aproximadamente en un 20% ($G_{\alpha 1}$, $G_{\alpha 2}$). Se cree que estas isoformas actuarían en los segmentos externos ($G_{\alpha 1}$) y en los conos ($G_{\alpha 2}$), cumpliendo roles semejantes.

En la Figura 6 se puede ver esquematizada, la transducción de las señales externas a través de las proteínas G y su posterior efecto sobre las proteínas efectoras.

Goa

Durante los intentos de purificar G_i de cerebro, Sternweis y Robishaw (91), encontraron una proteína que unía GTP y era sustrato de la toxina *pertussis*, y que poseía una subunidad α de peso molecular aparente 39000 y subunidades β y γ idénticas a aquéllas de G_s y G_i . A esta nueva proteína G se la llamó G_o (o = otra proteína G) y hay evidencias de que no es un producto de proteólisis de G_i . Itoh y col. (79) clonaron G_{oa} de cerebro de rata.

Aunque la función de G_o es desconocida, su existencia amplía el panorama de las funciones que tienen esta familia de proteínas.

Otras proteínas G

Se ha descubierto recientemente una proteína G_i llamada G_p , aislada de placenta humana, con un peso molecular aparente de 21000 (98). También se ha aislado una proteína similar a ésta de 25000 D de cerebro bovino (99). Estas proteínas unen GTP, pero es dudosa su ADP-ribosilación por toxina *pertussis* y tampoco se ha probado su capacidad de hidrolizar GTP.

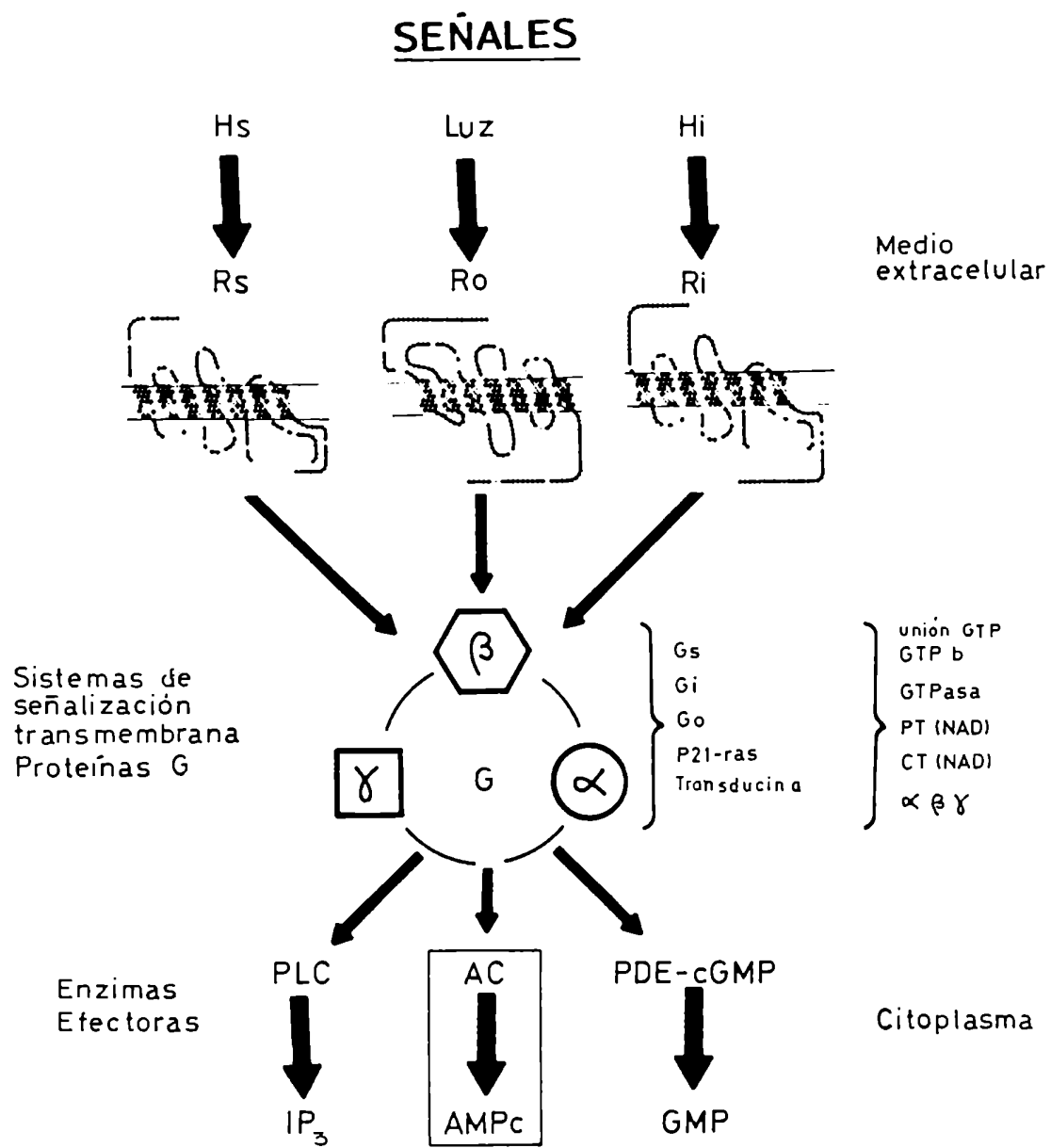


Figura 6. Esquema de transducción de señales

Existen otras proteínas que unen GTP como la proteína p21ras y su homóloga en *S. cerevisiae*, RAS2 que tiene actividad de GTPasa y se ADP-ribosila con la toxina del cólera. Esta última estaría implicada en la regulación de la adenilato ciclasa (100).

Subunidades β

La purificación de G_s , T y G_i ha revelado la presencia de polipéptidos de 35 KD similares, asociados a más de una subunidad α diferente. Clivajes proteolíticos de subunidades β aisladas de G_s , T y G_i dan mapas peptídicos idénticos (88,101). Varios antisueros anti-transducina no distinguen entre subunidades β provenientes de distintas proteínas G (102). Clones de cDNA aislados de genotecas de retina bovina e hígado humano, presentan idéntica secuencia de aminoácidos (103-105). Pero se sabe que existe cierto nivel de heterogeneidad de la subunidad β , ya que ésta puede ser resuelta en un doblete de 35 kD/36 kD (β_{35}/β_{36}) por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. Este doblete se encontró en subunidades β provenientes de G_s , T y G_i (81,91).

Recientemente se ha demostrado que las subunidades β_{35} y β_{36} , llamadas β_2 y β_1 respectivamente, están codificadas por dos genes diferentes (106). La relación que existe entre β_2 y β_1 se desconoce. Cohen y col. (94) sostienen que los genes β_2 y β_1 mapean en distintos cromosomas en el genoma humano.

Subunidades γ

Primeramente se reconoció la subunidad γ de G_t (85,107), pero su detección como un componente de G_s y G_i se retrasó, ya que esta proteína no se teñía fácilmente en geles de poliacrilamida. Se han clonado y secuenciado cDNAs de la subunidad γ de G_t (108,109); también se ha secuenciado la proteína (110).

Gr γ posee 74 residuos aminoacídicos ($M_r \approx 3400$), es muy hidrofílica y ácida. Anticuerpos contra Gr γ no reconocen subunidades γ de otras fuentes. Es probable que los bastones de la retina tengan distintas subunidades β y γ , mientras que las proteínas G, en células que expresan esencialmente todas las G $_s$, G $_i$ o varias G $_o$, compartan un complejo $\beta\gamma$ común.

De todas maneras, hay evidencias que en preparaciones de proteínas G de cerebro existen múltiples subunidades γ (91).

III.4. Mecanismo de regulación de la adenilato ciclasa mediada por receptor

Rodbell en el año 1970 (111) describió un modelo para el sistema adenilato ciclasa, compuesto por un discriminador hormonal o receptor, un transductor y un amplificador o unidad catalítica. El conjunto constituye la unidad de transferencia de información del sistema adenilato ciclasa (Figura 7).

La presencia de este transductor o proteína regulatoria, capaz de establecer un nexo entre la cara externa de la membrana y la subsecuente activación de la enzima, no tenía basamento experimental, hasta que poco después, Rodbell demostró el requerimiento de nucleótidos de guanina para la activación hormonal de la adenilato ciclasa (65). Estudios realizados empleando análogos no hidrolizables de GTP, tales como GPP(NH)P, GTP- γ -S, demostraron que la activación de la enzima se producía en ausencia de hormona (112,113).

Cassell y Selinger hallaron una actividad de GTPasa en membranas de eritrocito de pavo, estimulable por catecolaminas, e inhibible por toxina del cólera (114).

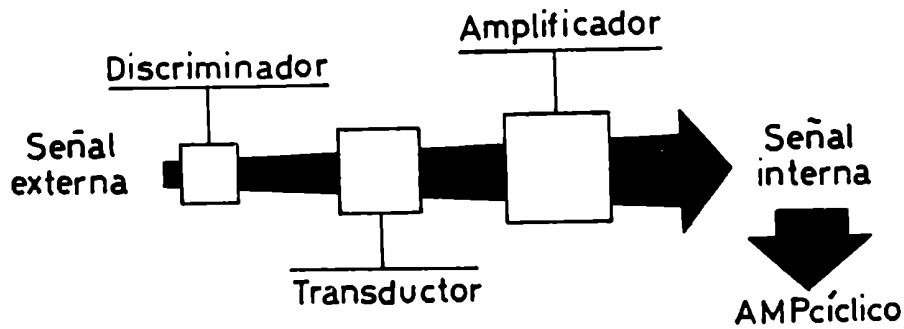


Figura 7. Unidad de transferencia de información del sistema adenilato ciclasa.

En base a sus hallazgos, los autores propusieron un modelo (Figura 8), según el cual el estado activo de la enzima es el complejo adenilato ciclasa GTP, la actividad de GTPasa disocia dicho complejo. La inhibición de la hidrólisis del GTP por la toxina del cólera, o el reemplazo de GTP por un análogo no hidrolizable, producirían una sustancial activación de la adenilato ciclasa por estabilización del complejo antedicho.

En el año 1977, Pfeuffer (80) logró purificar, por cromatografía de afinidad de GTP-Sepharosa, una proteína que aparecía parcialmente resuelta de la adenilato ciclasa. Esta proteína pudo ser reconstituída en membranas plasmáticas de linfoma S49 (cyc-).

Posteriormente, se demostró que estas células no tenían subunidad estimuladora de la adenilato ciclasa (115-117).

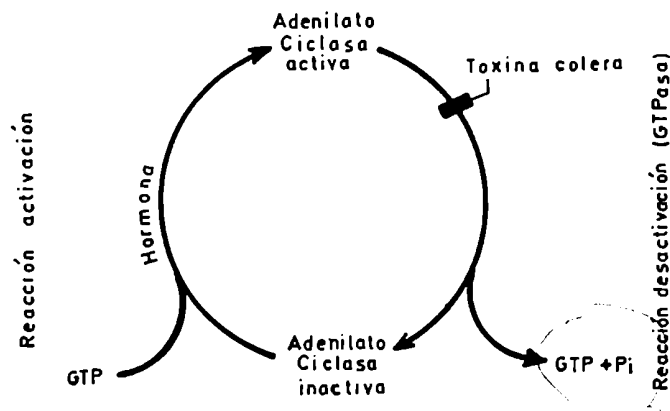


Figura 8. Modelo de la regulación de la actividad de la adenilato ciclasa. Cassel y Selinger (114).

Esta proteína llamada N o G/F se identificó como la subunidad estimuladora de la adenilato ciclasa.

Como se puede observar en la Figura 9, el agonista se une al receptor y el complejo HRN (hormona, receptor, proteína N), activa la proteína N, la cual requiere que se le una GTP para su estimulación. La actividad de GTPasa intrínseca de N, o la asociación de N con C, que también hidrolizaría el GTP, serían los mecanismos moleculares que se proponen para la desactivación del sistema (41).

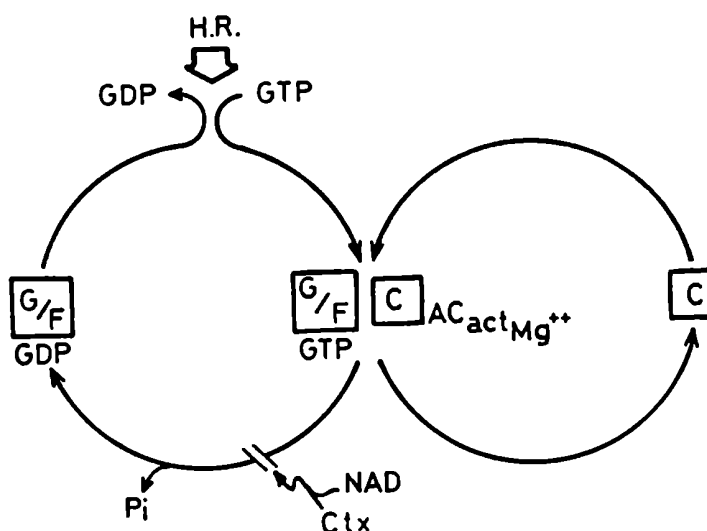


Figura 9. Esquema de regulación de la adenilato ciclasa (41).

A partir del descubrimiento de la proteína N_i (subunidad inhibitoria de la adenilato ciclasa por técnicas semejantes a las empleadas para N_s (proteína N) y su propiedad de ADP-ribosilarse con la toxina *pertussis* (84-87), el modelo de regulación de la enzima se pudo ampliar al esquema que se ve en la Figura 10.

A medida que los distintos componentes del sistema adenilato ciclasa fueron purificados y reconstituídos (ver Tabla 2), se obtuvo información respecto de la forma en que éstos interactuaban entre sí para llegar a un complejo sistema de regulación de la enzima (Figura 11).

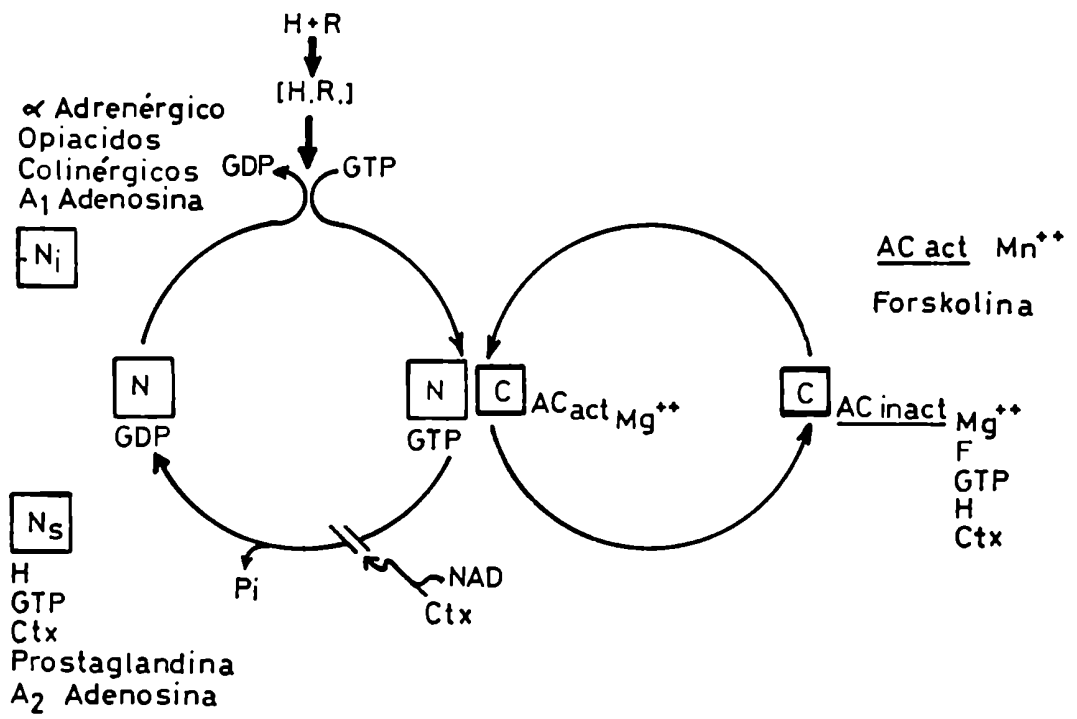


Figura 10. Esquema de regulación de la adenilato ciclasa.

Subunidad	Moléculas blanco	Referencia
α_s	Subunidad catalítica de la adenilato ciclasa	118
	Canales calcio	119
α_i	Subunidad catalítica de la adenilato ciclasa	120,121
	Rodopsina	122
	Fosfodiesterasa de AMP cíclico	123
	Canal K ⁺	124,125
α_o	Rodopsina	126
	Receptor muscarínico	127
	Canal K ⁺	128
$\beta\gamma$	Fosfolipasa A ₂	129
	Fosfodiesterasa de AMP cíclico	120
	Subunidad catalítica de la adenilato ciclasa	131-134

Tabla 2. Funciones de las subunidades α o $\beta\gamma$ aisladas. Se incluyen sólo reconstituciones con componentes puros o fragmentos de membrana (130).

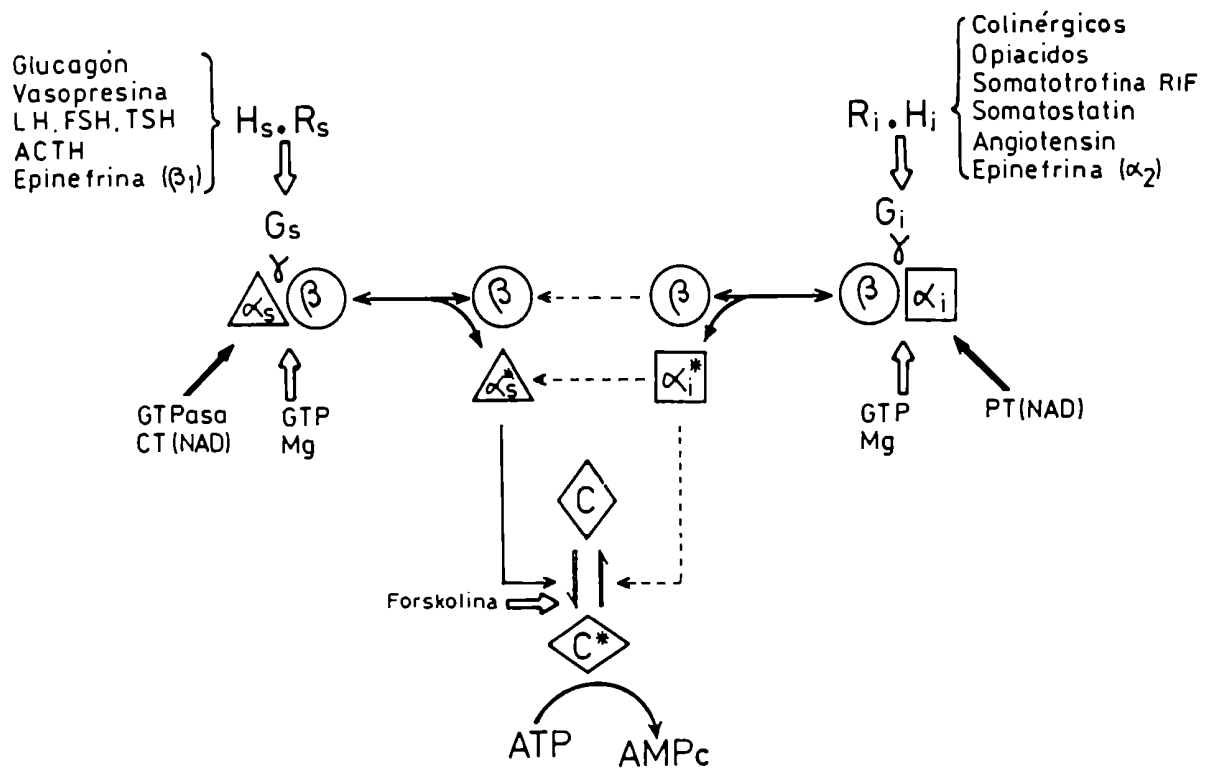


Figura 11. Sistema de Regulación de la adenilato ciclasa (36).

En el estado basal, las proteínas G están en su forma oligomérica, con el GDP unido fuertemente a G_s . Cuando el complejo hormona-receptor (H-R) interacciona con la proteína G, hay un cambio conformacional que lleva a la disociación del GDP. El complejo H-R-G es un intermediario presumiblemente estable, pero de vida media corta en presencia de concentraciones normalmente altas de GTP. La unión de GTP a $G_{s\alpha}$ causaría el desacople del complejo H-R-G y, además, reduciría la afinidad de $G_{s\alpha}$ (ahora unida a GTP) por el complejo $\beta\gamma$. El complejo $G_{s\alpha}$ -GTP activaría la adenilato ciclasa.

En lo que respecta a la inhibición del sistema, se ha observado que la activación de G_i por análogos no hidrolizables de GTP, lleva a la disociación de G_i en $G_{i\alpha}$ y $\beta\gamma$, que la inhibición depende de la presencia de G_s (90).

En base a los datos obtenidos, Gilman (74) propone que la activación hormonal de G_i , lleva a la disociación de sus subunidades, y el complejo $\beta\gamma$ liberado se uniría a $G_{s\alpha}$, inhibiendo de esta manera la adenilato ciclasa. Por lo tanto, el mecanismo de inhibición sería en realidad una desactivación.

Es importante señalar que en estudios de la inhibición hormonal de la adenilato ciclasa en células S49 (no tienen $G_{s\alpha}$), se ha observado un pequeño efecto inhibitorio de $G_{i\alpha}$ -GTP- γ -S (92), lo que ha llevado a algunos autores a suponer que la $G_{i\alpha}$ tendría un rol más directo en la inhibición de la adenilato ciclasa.

La desactivación de la proteína G, es decir la terminación de la señal, se debe a la actividad GTPasa dependiente de Mg^{2+} del complejo $G_{s\alpha}$ -GTP, lo cual llevaría a la reasociación de $G_{s\alpha}$ -GDP con $\beta\gamma$ para formar G_s -GDP, quedando, de esta manera, completo el ciclo.

IV. ADENILATO CICLASA EN EUCARIOTES INFERIORES

Los estudios de AMP cíclico y la adenilato ciclasa en eucariotes inferiores han permitido dilucidar mecanismos de regulación relacionados con el nucleótido, y también comprender mejor el comportamiento y las características moleculares de la enzima responsable de su síntesis.

A continuación se detallan algunos de los estudios realizados con ciertos organismos, que han recibido una atención especial en el conocimiento del sistema AMP cíclico.

Mucor rouxii es un hongo dimórfico que al ser crecido en condiciones aeróbicas, desarrolla forma micelar, mientras que en anaerobiosis adquiere características levaduriformes. Se encontró que cuando los cultivos pasan de una atmósfera anaeróbica a una aeróbica se produce una disminución de los niveles de AMP cíclico y una transición de levadura a la forma filamentosa, transición que no ocurre en presencia de dibutiril-AMP cíclico (133).

Cantore y col. (12) hallaron que la actividad de adenilato ciclasa disminuye durante las primeras horas de germinación, lo mismo que la actividad de la PDE de AMPc. El nivel de AMP cíclico llega a un mínimo en el estadio de células redondas y luego aumenta cuando el tubo germinal se alarga, hasta llegar a un *plateau*. En este período, la actividad de adenilato ciclasa aumenta.

Blastodiella emersonii es un hongo, cuyo ciclo sexual comienza con una célula flagelada sin pared celular (zoospora), que en condiciones apropiadas retrae su flagelo, sintetiza pared celular y forma un túbulo germinal (germinación), el cual origina un sistema rizoidal que crece en forma rápida (fase vegetativa). Al agotarse los nutrientes se interrumpe la fase vegetativa y se inicia la esporulación (134).

La actividad de adenilato ciclasa cambia durante el ciclo de vida. En la fase vegetativa es muy baja, aumentando considerablemente durante la esporulación. Paralelamente aumenta la actividad de fosfodiesterasa, es decir que los niveles de AMP cíclico permanecen constantes durante esta transición (135).

Durante la germinación, las actividades específicas de la adenilato ciclasa y de la fosfodiesterasa van disminuyendo gradualmente; no obstante, la desaparición de esta última es más brusca. Durante la primera fase de la germinación, la transición de zoospora a célula redonda, previa a la aparición del tubo germinal, los niveles de AMP cíclico aumentan en forma transiente (136). Jones y col. (137) pudieron inducir dicha diferenciación de las zoosporas con AMPc o inhibidores de la fosfodiesterasa. Estos resultados sugieren un papel activo del AMPc durante la morfogénesis de *B. emersonii*.

El ciclo de vida del *Dictyostelium discoideum* involucra una fase vegetativa unicelular ameboide y un cuerpo fructífero multicelular. En respuesta al agotamiento de los nutrientes, las células se agregan y forman un cuerpo de fructificación multicelular formado por dos tipos de células (138). La agregación se produce por quimiotaxis.

El primer quimio-atractor que se identificó fue el AMP cíclico (139), que también estimula la diferenciación. En las primeras horas de ayuno, las formas ameboides adquieren la capacidad de responder quimiotácticamente al AMPc y transmitir esta señal a sus vecinas, por síntesis y liberación oscilatoria de AMPc. Asociado a este evento, la adenilato ciclasa se activa en forma transiente, aumentando el AMP cíclico intracelular que se excreta a una velocidad proporcional a su concentración interna (140).

La adenilato ciclasa de *D. discoideum* es particulada y depende de $ATP_{Mg^{2+}}$ como sustrato, es estimulada por Mn^{2+} e inhibida por Ca^{2+} (37).

En *Paramecium tetraurelia*, tanto la orientación como la frecuencia de batido de las cilias está regulado por el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática (141).

Estudios con células permeabilizadas evidencian que el Ca^{2+} es el mediador de la depolarización-inversión de la dirección de nado de este protozoo (142). Trabajos recientes demuestran que el AMPc incrementa la frecuencia y también la orientación del batido de las cilias (143).

El paramecio posee una adenilato ciclasa que está localizada en las membranas ciliares (144), activa con ATPMg^{2+} como sustrato. Schultz *et al* (144) encuentran que el Ca^{2+} inhibe de forma no competitiva a la enzima respecto de ATPMg^{2+} y no es activada por calmodulina. En cambio, Gustin y Nelson (8) encuentran que a concentraciones micromolares de Ca^{2+} la adenilato ciclasa se estimula, y a concentraciones milimolares se inhibe. Además, encontraron que la enzima es inhibida por antagonistas de calmodulina, pero no demostraron la activación por este factor.

Willumsen *et al.* descubrieron la proteína monomérica p21ras, que une GTP (146) y su homóloga RAS2 en *Saccharomyces cerevisiae*, que activa la adenilato ciclasa (147). Se sugirió que las proteínas RAS podrían funcionar como proteínas G.

S. cerevisiae posee una adenilato ciclasa unida a membrana, sensible a GTP, que es similar en ciertos aspectos a la enzima de mamíferos. El GPP[NH]P es más efectivo que el GTP en la estimulación de la enzima, el Mn^{2+} estimula la actividad catalítica, no así el fluoruro y la toxina de cólera.

La subunidad catalítica se conoce como CYR1 o CDC35. La asociación de la adenilato ciclasa a la membrana sugiere que ésta responde a una proteína detectora o receptora que es estimulada por señales externas. Se postula que ésta sería el producto del gen CDC25 (93), aunque parece no ser un receptor clásico, ya que no está claro su putativo dominio transmembrana.

En la Figura 13 se puede ver un esquema del sistema adenilato ciclasa en *S. cerevisiae*. El gen de la enzima está clonado (148) y secuenciado (149).

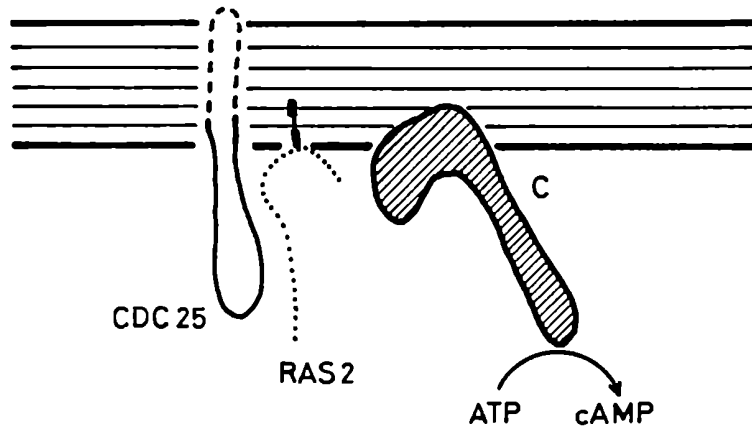


Figura 13. Esquema del sistema adenilato ciclasa en *Sacharomyces cerevisiae*.

El AMPc cumple al menos dos funciones en la regulación de esta levadura: como regulador negativo en la esporulación (150), y positivo en el comienzo del ciclo celular (151).

Los trabajos más importantes en cuanto a la participación del AMPc en la morfogénesis de *Neurospora crassa*, corresponden a los grupos de Scott (152,153) y de Torres (154,155). El primer grupo, utilizando una cepa mutante (Fr) de *N. crassa*, logró res-

taurar la morfología salvaje bajo condiciones de cultivo que hacían aumentar los niveles intracelulares de AMPc (153). Además, utilizando una cepa salvaje se logró producir mutantes morfológicas, fenotípicas, agregando al medio de cultivo sustancias que disminuían el nivel intracelular del nucleótido cíclico (152).

Torres y col. trabajaron con la mutante *crisp-1* de *N. crassa* y demostraron que los niveles de AMP cíclico son equivalentes al 0,5-1% de los encontrados en la cepa salvaje (154), y determinaron que el agregado de AMPc o dibutiril-AMPc al medio de cultivo de la mutante, revierte la morfología al fenotipo salvaje (155).

La adenilato ciclase de *N. crassa* está débilmente asociada a membrana, es dependiente de $ATPMn^{2+}$, insensible a fluoruro, GTP, GPP(NH)P (11,156,157) y es activable por Ca^{2+} -calmodulina en presencia de $ATPMg^{2+}$ como sustrato (34).

El *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Este parásito posee un ciclo de vida que involucra la alternancia de dos huéspedes, uno mamífero y un insecto hematófago que representa al vector. El *T. cruzi* presenta tres estadios definidos en su desarrollo: amastigote, estadio reproductivo intracelular; tripomastigote, estadio infectivo, es la forma libre en la circulación sanguínea; y epimastigote, forma multiplicativa en el lumen del insecto vector.

La adenilato ciclase de *T. cruzi* depende de $ATPMn^{2+}$ como sustrato, pero también responde a $ATPMg^{2+}$ y se encuentra en la fracción particulada. Es insensible a fluoruro, GPP(NH)P, forskolina y hormonas (22).

Otro punto interesante de destacar es que membranas de *T. cruzi* tratadas con N-etilmaleimida (NEM) pueden reconstituir con membranas de linfoma S49 (deficientes en G_s) y responder a fluoruro e isoproterenol (158). Esto implica que existiría una proteína regulatoria tipo G_s , que además se ADP-ribosila con toxina del cólera (158).

Es importante destacar que tanto *Trypanosoma cruzi* como *Neurospora crassa* parecen poseer una subunidad catalítica de adenilato ciclasa semejante a la de mamíferos, en cuanto a peso molecular, funcionamiento y regulación, ya que se han podido reconstituir en sistemas heterólogos. Membranas de hígado de rata o de eritrocitos de pavo, tratadas con N-etilmaleimida (que anula la actividad catalítica de éstos), se reconstituyeron con la subunidad catalítica de *T. cruzi* o de *N. crassa* (159-161), como se puede ver en la Figura 14.

Como resultado de esta interacción, el sistema reconstituido responde a los efectores comunes de la adenilato ciclasa de eucariotes superiores GPP(NH)P más isoproterenol, fluoruro, toxina del cólera, en presencia de $ATPMg^{2+}$ como sustrato.

V. ADENILATO CICLASA EN BACTERIAS

La existencia de adenilato ciclasa en bacterias fue primeramente puesta de manifiesto en *Brevibacterium liquefaciens* en 1967 (35). Esta enzima fue posteriormente purificada, alrededor de 4500 veces, y su peso molecular estimado en 92400 (36). Ide en 1971 (20) ha informado la existencia de adenilato ciclasa en *Micrococcus lysodeikticus*, *Arthrobacter globiformis*, *Corynebacterium equi*, *Nocardia erytropolis*, *Alcaligenes faecalis*, *Erwinia caratovora*. Se ha purificado también la adenilato ciclasa de *Streptococcus salivarius* (162).

Una de las ciclasas bacterianas más estudiadas es la de *Escherichia coli*, que fue documentada en 1969 (18,19). Yang y Epstein (31) han encontrado el 80% de la actividad enzimática en la fracción citoplasmática y han demostrado que la enzima asociada a membrana puede ser extraída sin el uso de detergentes y han

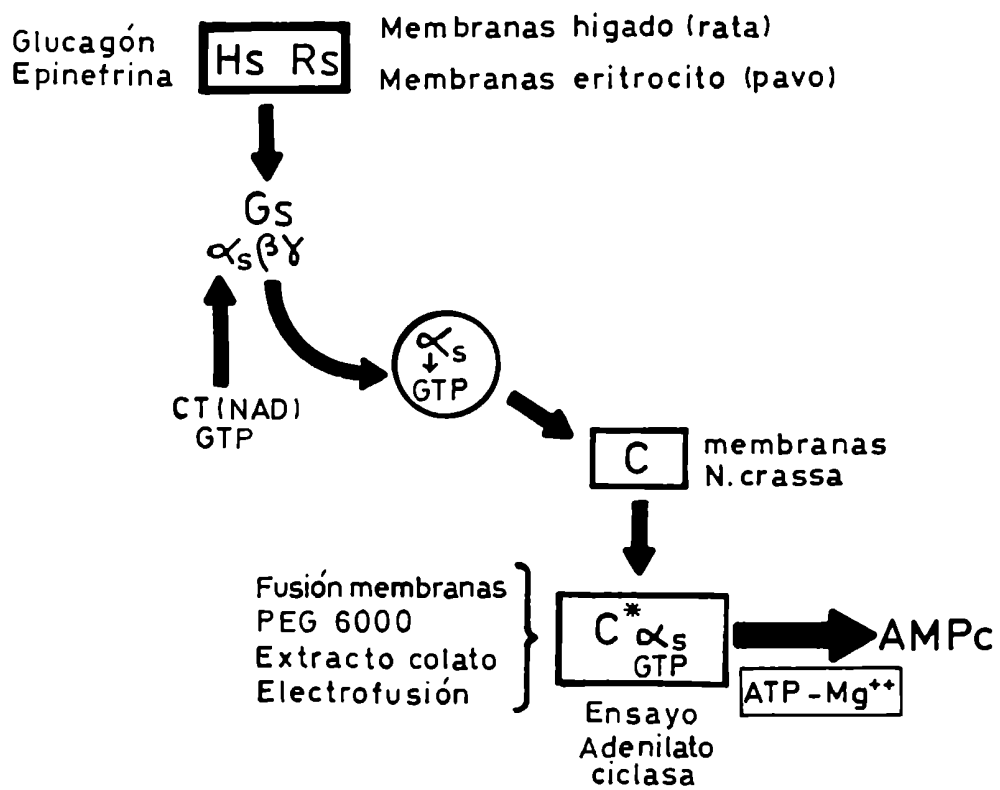


Figura 14. Esquema de reconstitución

determinado un peso molecular de 95000 por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa y 92000 por filtración en geles. Estos pesos moleculares concuerdan con el peso molecular calculado a partir de la secuencia nucleotídica completa del gen *cya*, 97542, correspondiente a 848 residuos aminoacídicos (163).

Se han realizado numerosos trabajos científicos tratando de elucidar los mecanismos por los cuales es regulada la expresión de la adenilato ciclasa de *Escherichia coli*.

La proteína receptora de AMPc (CAP o CRP) de *E. coli*, forma un complejo, CAP-AMPc, que es capaz de unirse al DNA para activar la transcripción de varios operones del metabolismo de ciertos azúcares, como arabinosa, maltosa, galactosa, etc. (164). Se ha observado repetidamente que mutantes *crp* (gen que codifica para CAP), que no producen CRP, incrementan los niveles de actividad de adenilato ciclasa y secretan AMPc al medio (165). También se sabe que la fosfodiesterasa es pobremente activa en *E. coli* (165).

Danchin y col. (167) han fusionado operones y proteínas por recombinación *in vitro*, tanto en el fago λ , como en plásmidos de bajo número de copias y directamente en el cromosoma en el locus *cya*. Estos autores proponen que el complejo CAP-AMPc ejerce un control negativo moderado en la expresión del gen *cya*. En concomitancia con una baja velocidad de crecimiento característica de las cepas *cya*⁻, estos autores han observado un considerable aumento de la expresión de la enzima. Este aumento en la síntesis de la adenilato ciclasa no parece depender de la presencia de CAP funcional; parecería estar controlada a nivel de la transcripción.

Varios autores han sugerido que un posible control de la actividad de la adenilato ciclasa se podría verificar a través del sistema de transporte de carbohidratos dependiente de fosfoenol piruvato (PTS). Este sistema transporta azúcares, como la

glucosa, fructosa, manosa, sorbitol, manitol, etc., al interior de la célula como derivados fosforilados a través del sistema PTS que utiliza la energía derivada del fosfoenol piruvato (PEP).

En la Figura 15 se puede observar un modelo para la regulación por el sistema PTS. Una proteína citoplasmática, enzima I, es fosforilada por el PEP y, a su vez, ésta fosforila a una pequeña proteína termoestable, también soluble, conocida como HPr. Estas dos proteínas no presentan especificidad de azúcar (168).

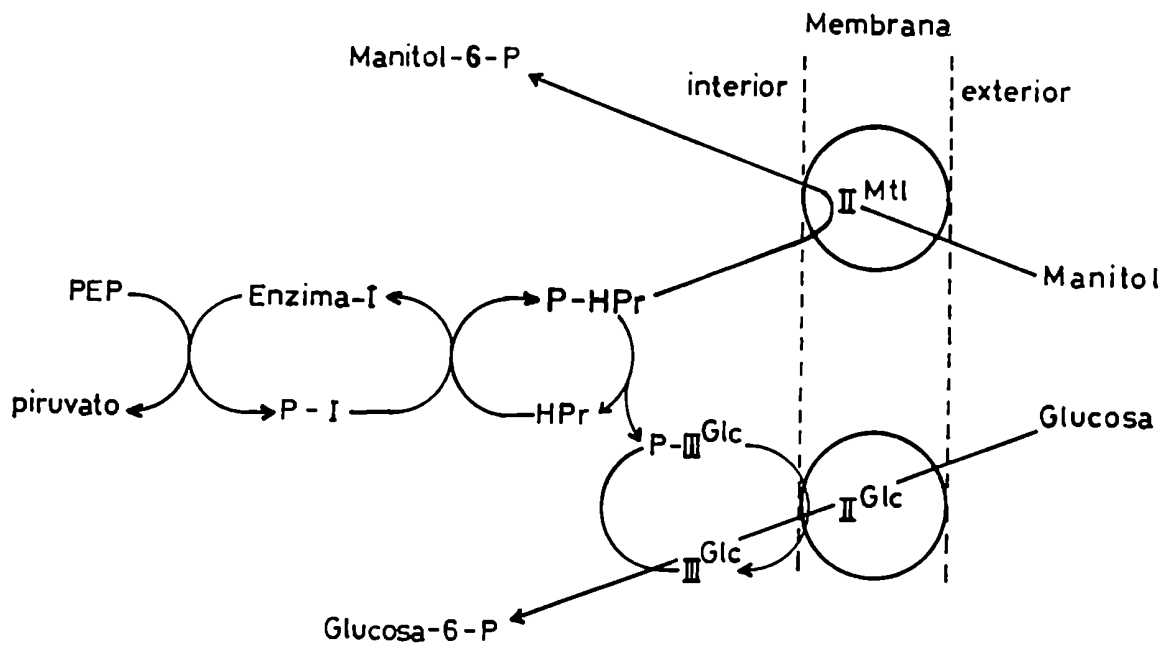


Figura 15. Sistema PTS

El transporte específico de carbohidratos requiere de otras dos proteínas unidas a membrana, la enzima II (E-II) y en algunos casos, la enzima III (E-III). Estas enzimas son específicas para cada azúcar. La E-III es fosforilada por $HPr \rightleftharpoons P$ y ésta $E-III \rightleftharpoons P$ a su vez, fosforila al azúcar que es transportado a través de la membrana por E-II. Se desconoce por el momento si la E-III activa directamente la ciclasa (posiblemente por fosforilación) o indirectamente por eliminación de su inhibidor (CAP) (168).

Existen otros factores que también podrían regular la actividad de la adenilato ciclasa, probablemente de manera indirecta. Estos incluyen el gradiente electroquímico de protones (169), y el 2-cetobutirato, un análogo del piruvato, que reacciona con $E-I \rightleftharpoons P$. En presencia de E-I, HPr, $E-III_{glu}$ y CAP, funcionales, la acumulación de 2-cetobutirato causa una drástica inhibición de la adenilato ciclasa (170,171).

Se pueden mencionar a Ditta y col. (172), que construyeron una biblioteca genómica de *Rhizobium meliloti* con un vector de amplio rango de huésped. Haciendo uso de esta biblioteca, Kiely y O'Gara (173) complementaron mutantes de *Escherichia coli* que tenían una deleción en *locus cya*, transformando a éstos con los plásmidos mencionados. Este procedimiento también fue seguido por el grupo de Koshland Jr. (174), pero en este caso, la biblioteca genómica correspondía a *Salmonella typhimurium* y estaba hecha en el fago λ_{gt4} . Este investigador ha encontrado un polipéptido de 81 Kd que complementa a mutantes *cya* y que presenta actividad de adenilato ciclasa.

Bordetella pertussis es un bacilo Gram-negativo, no invasivo. Es el agente etiológico de la tos convulsa. La bacteria produce un número de factores, los cuales se cree que juegan un papel importante en la patogénesis (175). Uno de estos factores es la adenilato ciclasa que se detectó por primera vez en prepa-

raciones crudas de la vacuna (176). Esta enzima que es excretada al medio extracelular (177), es sensible a calmodulina (178), y responde a $ATPMg^{2+}$ o a $ATPMn^{2+}$ como sustrato (177). Se ha estudiado la adenilato ciclasa asociada a la célula entera, y ésta responde a la estimulación por calmodulina.

El grupo de Wolff (179) ha estudiado de la enzima de *B. pertussis* y propone su localización como se ve en la Figura 16. El primer compartimiento donde se encuentra la enzima (A), es en el medio de cultivo que representa un 20% del total de la adenilato ciclasa. El resto está asociada a la célula y alrededor del 90% de ésta es sensible a tripsina. Una parte de esta enzima asociada a la célula puede ser medida con ATP 1 mM (B). El compartimiento C representa la adenilato ciclasa extracitoplasmática restante, exceptuando una pequeña proporción que puede ser medida a 20 mM de ATP, requiere ruptura celular para ser detectada. Finalmente, una pequeña parte, 7-9% del total de la enzima (D) es intracelular o bien, es insensible a tripsina.

El Ca^{2+} es un requerimiento obligatorio para la estimulación de la adenilato ciclasa de cerebro bovino, por calmodulina. El agregado de EGTA a la enzima bacteriana activada revierte este efecto (170). De hecho, la adenilato ciclasa de *B. pertussis* es estimulada por calmodulina en presencia o ausencia de Ca^{2+} (180).

Bacillus anthracis es el agente etiológico del ántrax, una enfermedad grave, frecuentemente fatal que afecta a muchos mamíferos, incluyendo a humanos. La virulencia de este bacilo incluye tres exotoxinas: el antígeno protector (PA), un factor edematoso (EF) y un factor letal (LF) y, además, una cápsula de ácido poli-D-glutámico. El EF ha sido identificado como una adenilato ciclasa dependiente de calmodulina (181,182).

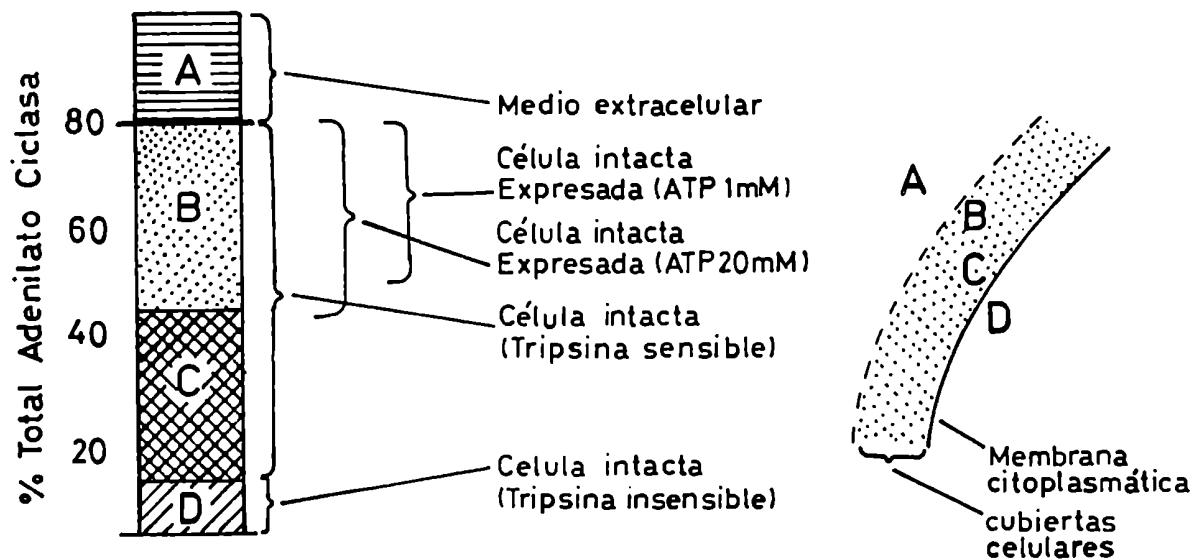


Figura 16. Localización de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* (179)

Cuando dicho factor se purificaba de sobrenadantes de cultivo de los bacilos, se detectaba actividad enzimática sólo en presencia de extractos celulares eucariotas, especialmente calmodulina. Esta actividad es inhibida por EGTA. Esta adenilato ciclasa invade las células eucariotas y, una vez en el citoplasma, es activada por la calmodulina presente, aumentando dramáticamente los niveles de AMPc (181).

La adenilato ciclasa de *B. anthracis* está clonada en *E. coli* y se ha podido expresar en esta bacteria (183).

VI. ADENILATO CICLASAS ESTIMULABLES POR Ca^{2+} -CALMODULINA

La calmodulina fue descubierta por Chueng (184) como una proteína activadora de la fosfodiesterasa (PDE) de nucleótidos cíclicos de cerebro bovino. Casi paralelamente, Kakiuchi y Yamasaki (185) descubrieron el papel del Ca^{2+} en el proceso de activación de la enzima.

Posteriormente, Teo y Wang (186) describieron la relación entre el Ca^{2+} y la calmodulina, y observaron que el verdadero activador era el complejo Ca^{2+} -calmodulina.

Esta proteína está ampliamente distribuída y no es específica de tejidos o especies. Está presente en todos los tejidos de vertebrados, siendo mayor su concentración en testículo y cerebro. Se la encontró también en invertebrados, protozoos, plantas superiores y semillas, en algas, musgos y hongos.

En 1981, Iwasa y col. (187) demostraron por primera vez, la existencia de un factor termoestable aislado de *Escherichia coli* con propiedades similares a la CaM. Este factor está asociado a una PDE dependiente de Ca^{2+} , en la fracción soluble de la bacteria, y activa a la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) de membrana de eritrocitos, y a la quinasa de la cadena liviana de la miosina a niveles comparables a la activación que produce la CaM de cerebro bovino y a la PDE de AMP cíclico de cerebro bovino.

A partir del descubrimiento de una proteína pequeña, acídica y capaz de unir Ca^{2+} en *Streptomyces erithraeus* (188), Swan y col. (189), aislaron, secuenciaron y dedujeron la estructura aminoacídica completa de esta proteína. Tiene cuatro sitios potenciales de unión a Ca^{2+} , pero su ubicación no corresponde exactamente a los sitios de la CaM de cerebro bovino. Esta proteína

tiene un alto porcentaje de aminoácidos cargados negativamente, pero la composición aminoacídica total es muy diferente y tampoco presenta homología interna entre las dos mitades.

También se reporta la existencia de una actividad tipo calmodulina en *Bacillus subtilis* (190). Activa la PDE de manera dosis dependiente, se une a columnas de Affigel-fenotiazina de forma Ca^{2+} dependiente, y es posible eluirla con EGTA y compite con CaM de cerebro en experimentos de radioinmunoensayo.

Se ha demostrado que la calmodulina activa otras enzimas además de la PDE de AMP cíclico; una de ellas es la adenilato ciclasa.

En la actualidad se conocen muchas adenilato ciclasa de mamíferos que son estimulables por CaM, como por ejemplo, las de cerebro (191), corazón (192), músculo liso (193), plaquetas (194), etc.

Algunas adenilato ciclasas presentan un comportamiento bifásico frente al Ca^{2+} . Esto es que a bajas concentraciones de Ca^{2+} , cuando únicamente están ocupados los sitios de unión a Ca^{2+} alta afinidad de la calmodulina, se activa la ciclasa y a altas concentraciones, cuando todos los sitios están ocupados, la calmodulina inhibe la ciclasa.

No sólo se han encontrado adenilato ciclasas de mamíferos estimulables por CaM, sino también *Neurospora crassa* (34), *Medicago sativa* (23), y en ciertas bacterias como *Bordetella pertussis* (178) y *Bacillus anthracis* (181,182).

VII. CYANOBACTERIASTaxonomía

Las algas verde-azuladas ocuparon una posición anómala en la biología. Fueron tratadas por los botánicos como una división (o clase) de algas, debido a que son fotoautótrofos que utilizan el agua como dador de electrones y, además, contienen dos fotopigmentos (clorofila a y β -caroteno), que son característicos de las fotosíntesis de plantas.

El problema de definir en términos positivos las propiedades que comparten las bacterias y las algas verde-azuladas, pudo ser resuelto cuando se elucidaron las diferencias fundamentales entre la organización celular de organismos procariotas y eucariotas (195). En vista de su estructura celular, las algas verde-azuladas son reconocidas actualmente como un grupo importante de bacterias, que se distinguen de otras bacterias fotosintéticas, por la naturaleza de sus pigmentos y por llevar a cabo fotosíntesis aeróbica. Este grupo se llama cianobacterias. La designación algas verde-azuladas es errónea, pero este nombre común, muchas veces, es hoy aún, utilizado.

Estas bacterias en la actualidad, tienen un potencial biotecnológico muy importante. Desde tiempos remotos, las cianobacterias han sido utilizadas como fuente de alimento en China, México y Africa (196).

En asociación simbiótica, *Anabaena-Azolla*, contribuyen significativamente a la fertilización del suelo, en las regiones donde se cultiva el arroz (197). Además de proveer nitrógeno, son capaces de estimular el crecimiento de las plantas. Se han realizado experimentos donde, al agregarse extractos de cianobacterias, se ha observado un aumento del crecimiento en tomates, ajíes, raíces de arroz y rabanitos (198).

Las ficobiliproteínas, que son colorantes fosforescentes, podrían ser utilizados en inmunoensayos (199), y se usan para dar color a los alimentos (199). En Japón, una industria ha desarrollado un extracto de cianobacterias que puede reemplazar al suero animal en el cultivo de líneas celulares humanas (192). También se las utiliza como fuente de arginina y aspártico (200).

Las cianobacterias constituyen uno de los más grandes subgrupos de procariotas Gram-negativos, y todas las examinadas sintetizan clorofila a y al menos tres ficobiliproteínas: ficocianina (λ máx 620 nm), aloficocianina (λ máx 650 nm) y aloficocianina B (λ 670 nm)(201).

De acuerdo a Stanier (201), las diferencias en estructura y desarrollo permite la clasificación de cianobacterias en cinco grandes subgrupos que se observan en la Tabla 4.

La Sección I está compuesta por organismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria o por gemación. Las células son esféricas, cilíndricas u ovals. Estas son las cianobacterias más simples y tienen su contrapartida en otros grupos importantes de bacterias Gram-negativas, unicelulares.

Los miembros de la Sección II se caracterizan porque presentan un tipo especial de reproducción, fisión múltiple, el cual no ha sido descrito en ningún otro grupo de procariotas. Todas comparten la propiedad de que la célula vegetativa, está envuelta por una capa fibrosa adicional recubriendo a la membrana externa. La fisión múltiple lleva a la formación de una pequeña célula esférica reproductiva, llamada baeocito, que es liberada por la ruptura de esa capa fibrosa de la célula parental.

La unidad de estructura en las cianobacterias de las Secciones III a IV es un filamento de células o tricoma. La elongación del tricoma está acompañada por un incremento en el número de las células, como resultado de divisiones celulares intercaladas, repetidas.

Unicelulares, células aisladas o formando agregados que se mantienen juntos por capas externas adicionales de pared celular	Reproducción por fisión binaria o gemación		Sección I
	Reproducción por fisión múltiple que da lugar a la formación de pequeñas hijas (baecyots), o por fisión múltiple y fisión binaria		Sección II
Filamentosas, poseen tricoma (cadena de células) que crece por división celular intercalada	Reproducción por ruptura al azar del tricoma, por formación del hormogonio y (secciones IV y V), a veces por germinación de acinetos	Tricoma siempre compuesto de células vegetativas	División en un solo plano Sección III
		En ausencia de fuente de nitrógeno combinado el tricoma contiene heterocistos; algunos producen acinetos	División en un solo plano Sección IV
			División en más de un plano Sección V

Tabla 4. Principales subgrupos de cianobacterias

La capa de péptido-glucano crece transversalmente, seguida por la membrana externa.

El tricoma vegetativo se encuentra muchas veces envuelto por una vaina tubular. Cuando la ruptura del tricoma ocurre con la vaina, la elongación posterior puede suceder en uno o ambos filamentos hijos, a través de la vaina, eventualmente dejándolos en posición angular. Esta configuración se conoce como bifurcación falsa.

Las cianobacterias filamentosas de las Secciones IV y V tienen la capacidad de diferenciarse, formando heterocistos, en ausencia de fuente de nitrógeno combinada. En algunos casos se produce el desarrollo de acinetos, cuando el cultivo se acerca a la fase estacionaria.

Dentro de la Sección IV se encuentra el género *Anabaena*. Todos los miembros de este género son autótrofos obligados. En las cepas que forman acinetos, siempre se desarrollan a partir de las células vegetativas adyacentes al heterocisto. La reproducción ocurre al azar, por fragmentación del tricoma vegetativo en cadenas más cortas e indistinguibles de las parentales; estos tricomas son móviles. La cepa *Anabaena sp* (PCC 7119) fue originalmente descrita como *Nostoc muscorum* (202), pero no posee las características del género *Nostoc* (ver Tabla 5). En la figura 17 se puede observar una fotografía de los filamentos de células vegetativas de *Anabaena sp* (PCC 7119).

Célula Vegetativa

Las células vegetativas de la mayoría de las cianobacterias tienen una estructura fina interna uniforme y características (Figura 18)

Tienen una pared similar a las bacterias Gram-negativas (203). Poseen una capa de péptido-glucano que está recubierta por una membrana externa, compuesta de proteínas y lipopolisacáridos (204). Más allá de la membrana externa, las cianobacterias presentan vainas o mucílagos formados por polisacáridos (205), que tienen varios grados de definición estructural. La membrana celular es usualmente simple (206).

Una parte considerable del protoplasto está ocupado por los componentes del aparato fotosintético, que está localizado en una serie de sacos aplanados, llamados tilacoidales (excepto en *Gleobacter*).

Reproducción por ruptura al azar del tricoma, y (en algunas) por germinación de acinetos, producen tricomas hijos indistinguibles del parental	Heterocistos, intercalados o terminales, posición de los acinetos (si hay), variable	Células vegetativas, esféricas ovoides o cilíndricas <i>Anabaena</i>
		Células vegetativas en forma de disco <i>Nodularina</i>
	Heterocistos terminales, se forman en ambos extremos del tricoma, acinetos siempre adyacentes al heterocisto	Células vegetativas isodiamétricas o cilíndricas <i>Cylindrospermum</i>
Reproducción como la descrita más arriba y también por formación de un tricoma distinguible del parental, por ausencia de heterocistos o por uno o más de los caracteres siguientes: tamaño menor de las células, gran motilidad, formación vacuolas	Homogonia con heterocisto terminal, en ambos extremos	Células vegetativas esféricas cilíndricas u ovoides, acinetos (si se producen), no se forman adyacentes al heterocisto y generalmente forman cadenas <i>Nostoc</i>
	Homogonia con heterocisto terminal en un solo extremo	Células vegetativas isodiamétricas o cilíndricas. Tricoma maduro está compuesto de células de ancho variable, heterocistos predominantemente intercalados <i>Scytonema</i>
		Células vegetativas en forma de disco, isodiamétricas o cilíndricas. Tricoma maduro cónico, tiene un heterocisto terminal <i>Calothrix</i>

Tabla 5. Cianobacterias filamentosas con heterocistos, que se dividen en un solo plano

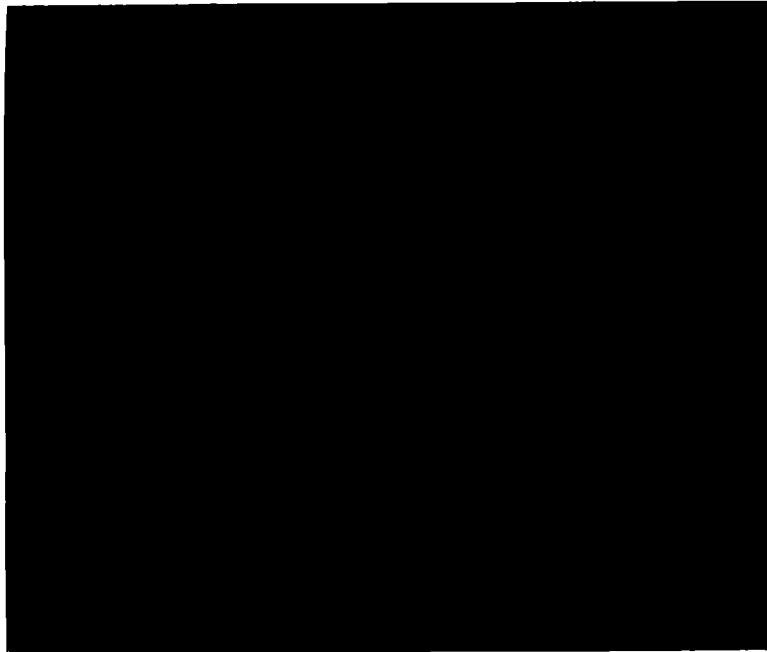


Figura 17. Filamentos de células vegetativas de *Anabaena sp.* (PCC 7119)

En estos sacos están localizados los pigmentos lipofílicos, clorofila a y carotenos (centros de reacción fotoquímicos), y la cadena de transporte de electrones fotosintética (206).

Una característica especial del aparato fotosintético de las cianobacterias (también de los cloroplastos de las rodofitas), es la localización extratilacoidal de las ficobiliproteínas (PBPs), que son los pigmentos principales de la antena. Las PBPs (las proteínas más abundantes en la célula), junto a ciertos polipéptidos incoloros que las unen, están localizadas en organelas llamadas ficobilisomas (207).

La unión de los ficobilisomas a la superficie del tilacoide es importante para obtener una alta eficiencia en la transferencia de energía al centro de reacción del fotosistema II

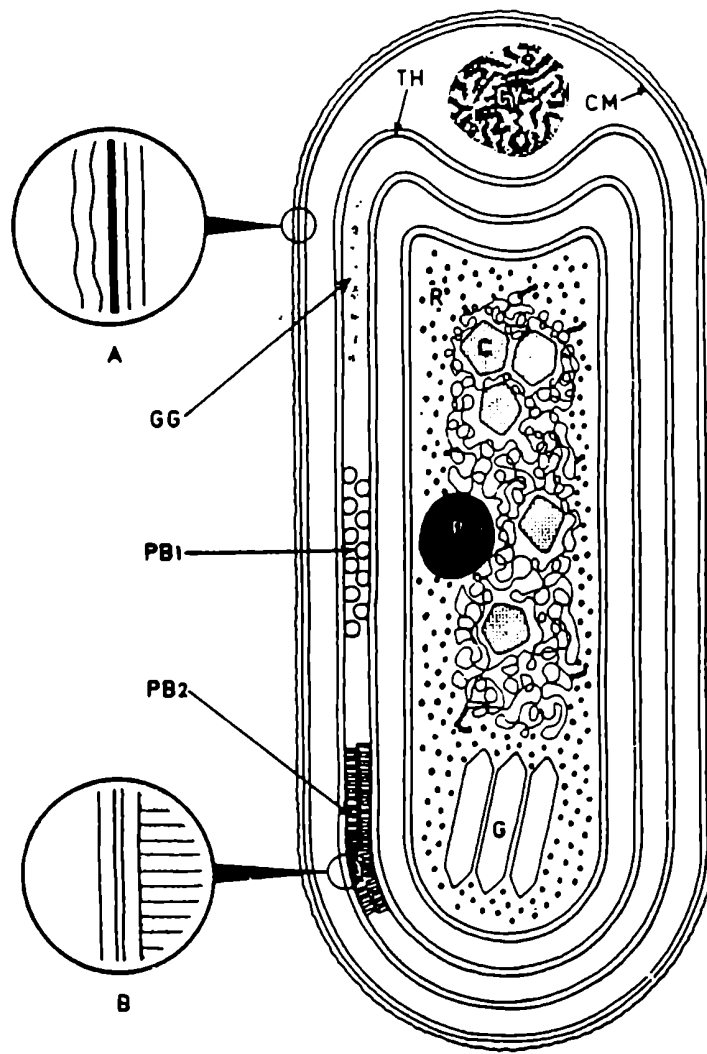


Figura 18. Esquema de una célula vegetativa. CM, membrana celular; TH, saco tilacoidal; PB1 y PB2, vistas central y lateral de dos hileras de ficobilisomas unidas a tilacoides adyacentes; GG, gránulos de glucógeno; CY, gránulos cianoficina; P, gránulos de polifosfato; R, ribosomas 70S; C, carboxisomas, rodeados por el nucleoplasma; G, vesículas gaseosas. Inserto A, vista ampliada de las cubiertas celulares (membrana externa, capa de peptidagluano y membrana celular). Inserto B, vista ampliada de parte del tilacoide, mostrando el par de membranas con los ficobilisomas unidos hacia una sola cara.

(208). Aunque la organización espacial de los sacos tilacoidales varía considerablemente dentro de este complejo grupo de organismos, el más simple consiste en un arreglo concéntrico de tilacoides y se encuentra en la mayoría de las cianobacterias unicelulares (209)(Figura 19). En otras, los tilacoides están enrollados sobre sí mismos.

Cuatro clases de inclusiones parecen estar universalmente presentes en las células vegetativas de todas las cianobacterias: **carboxisomas**, **gránulos de polifosfato**, de **glucógeno** y de **cianoficina**. Otras inclusiones presentes en algunas de ellas son las **vacuolas gaseosas** y los **gránulos de poli- β -hidroxibutirato** (206).

Los **carboxisomas** son cuerpos poliédricos que parecen contener de 12 a 15 polipéptidos, la ribulosabifosfato-carboxilasa/oxigenasa (RuBPC/O), la enzima principal en la fijación de CO₂, vía el ciclo de Calvin, y una glicoproteína (210).

Los **gránulos de polifosfato** son agregados esféricos de fosfatos lineales, de alto peso molecular. Proveen el fosfato necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos o como fuente potencial de energía para la síntesis de ATP (208).

Los cuerpos de **poliglucosa** son gránulos discretos localizados entre los tilacoides (211). Es la reserva principal de carbono. Consisten en unidades de poliglucosa altamente ramificadas, con cadenas externas cortas.

Los **gránulos de cianoficina** son la fuente de reserva orgánica nitrogenada que es sintetizada por, probablemente, todas las cianobacterias, pero no por otro grupo de organismos. La cianoficina es un polímero compuesto de sólo dos aminoácidos y su nombre bioquímico correcto es multi-L-arginil-poli-[L-aspártico] (212).

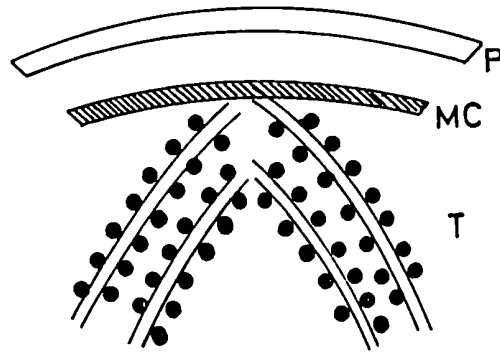


Figura 19. Esquema generalizado de la organización de las membranas en cianobacterias. P, pared celular; MC, membrana citoplasmática; T, sacos tilacoidales con los ficobilisomas unidos.

Muchas cianobacterias planctónicas poseen **vacuolas gaseosas** (213), que son organelas formadas por un conjunto de vesículas gaseosas, huecas. Tienen la propiedad de ser permeables a ciertos gases, pero no los contienen. Tienen capacidad de flotación, pero no está clara su función respecto de la protección de la luz. No presentan actividad metabólica. La pared de las vesículas gaseosas, usualmente mal llamada membrana, no contiene lípidos ni carbohidratos, está compuesta solamente de proteínas.

Se sabe muy poco acerca de la reserva de lípidos de las cianobacterias. Los gránulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB), un polímero único presente en bacterias, ha sido observado en algunas cianobacterias (208).

Heterocisto

Los heterocistos son células especializadas que se desarrollan a partir de las células vegetativas, cuando en el medio se agota la fuente de nitrógeno. Estas células funcionan como fábricas anaeróbicas donde fijan N_2 atmosférico bajo condiciones externas aeróbicas (214)(Figura 20).

Cómo provee el heterocisto un medio ambiente anaeróbico para proteger a la nitrogenasa?. Estructuralmente reduce la entrada de gases y otros metabolitos, sintetizando una cubierta de tres capas, externa a la pared de la célula vegetativa. Se reorganiza el aparato fotosintético, no se produce más O_2 (se inhibe el fotosistema II, PSII), pero se sigue sintetizando ATP a partir del fotosistema I (PSI). Aparentemente, hay otros sistemas enzimáticos por los cuales se elimina el O_2 . Se establecen bombas, que en las uniones con las células vegetativas vecinas, transportan eficientemente las fuentes de carbono necesarias para la nitrogenasa.

Morfológicamente, el heterocisto difiere de la célula vegetativa. El *septum* que lo separa de ella tiene un diámetro menor a la tercera parte del que separa a las células vegetativas entre sí (215). De las tres capas de las cuales está rodeado, la más externa se denomina *capa fibrosa* (215). La intermedia, llamada *homogénea*, contiene un polisacárido de gran longitud, con cadenas laterales cortas. De esta manera, una red de oligosacáridos rodea al heterocisto, esta *capa homogénea* es completa, excepto hacia

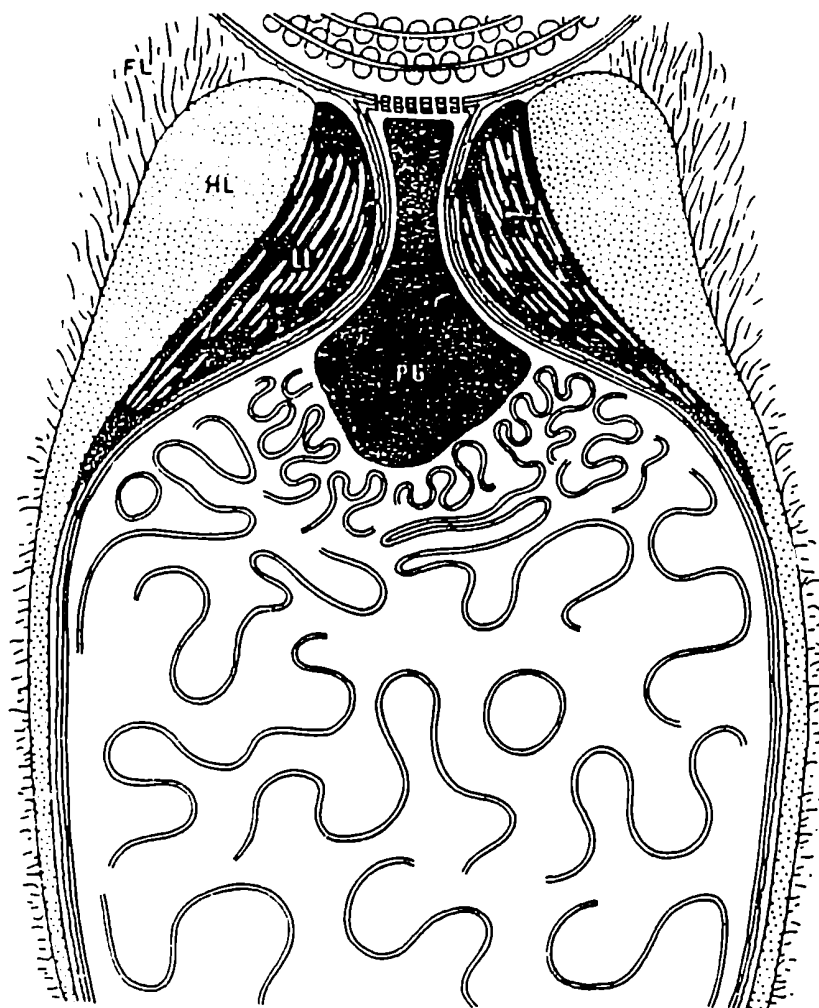


Figura 20. Esquema de parte de un heterocisto maduro que muestra la conexión polar con una célula vegetativa adyacente. GP, gránulo polar cianoficina; FL, capa fibrosa; HL, capa homogénea; LL, capa laminar.

los polos de la célula que es penetrada por el *septum* que contiene los microplasmodesmos (perforaciones que atraviesan el *septum*).

Lo mismo sucede con la capa interna, laminar. Esta capa es la menos usual respecto a su composición química, ya que está formada enteramente por glicolípidos, sólo encontrados en los heterocistos (217,218).

Los heterocistos terminales poseen un gránulo polar de cianoficina, mientras que los que están intercalados poseen dos (214).

Los heterocistos se forman a intervalos regulares en los filamentos de *Anabaena* y *Nostoc*. No todas las células vegetativas dan lugar a un heterocisto (214) y el patrón normal de su formación está genéticamente determinado (218), aunque puede estar fenotípicamente alterado en presencia de 7-azatriptofano (análogo del triptofano) que estimula la diferenciación (219). Algunas cepas de *Anabaena* no son sensibles a este análogo (220).

Cuando la diferenciación se ha iniciado, este patrón está precisamente determinado por el espaciamiento de células precursoras llamadas *preheterocistos*, que pueden *desdiferenciarse* (215). Cuando el heterocisto madura, pierde la capacidad de reproducirse. Los heterocistos maduros mantienen un contenido significativo de clorofila a, pero pierden las PBSs. La destrucción de las PBSs ocurre en todas las células del filamento (221), en especial ficocianina (208), pero una vez que la nitrogenasa (la enzima que fija N₂ atmosférico) se activa, se resintetizan en las células vegetativas.

La degradación parece ser causada por una proteasa, cuyos sustratos preferidos son las PBSs (222). Los heterocistos pierden la capacidad de fijar CO₂ y esto ha sido demostrado ya que no se observa actividad de RuBPC/O (214), hecho que se correlaciona con la ausencia de carboxisomas (206).

Está bien establecido que en el heterocisto se ha perdido la actividad fotosintética normal, ya que no produce O_2 (223). Pero en presencia de luz, la nitrogenasa necesita grandes cantidades de ATP para su actividad. Este nucleótido le es provisto por el heterocisto a través de la fotofosforilación cíclica (224).

Además de ATP se requiere un bajo potencial reductor para la fijación de N_2 . Este no puede ser generado fotoquímicamente; debe ser adquirido directamente de las células vegetativas adyacentes o generado enzimáticamente dentro del heterocisto, a expensas de un sustrato oxidable (un azúcar o azúcar-fosfato).

Se ha demostrado mediante experimentos autoradiográficos que el ^{14}C inicialmente asimilado como $^{14}CO_2$ en las células vegetativas es transferido intracelularmente al heterocisto (214, 223). Además, se ha visto en experimentos utilizando $^{13}N_2$ (224), el nitrógeno fijado, aparece rápidamente en forma de glutamina y es exportado.

Para poder sintetizar glutamina, el heterocisto debe haber obtenido previamente α -cetoglutarato (o algún precursor metabólico) de la célula vegetativa (206,225). En la Figura 21 se puede ver un modelo del flujo de carbono y nitrógeno entre el heterocisto y la célula vegetativa.

Acineto

La diferenciación del acineto está acompañada por la formación de una cubierta gruesa, de varias capas, frecuentemente pigmentada, que se desarrolla alrededor de la pared preexistente de la célula vegetativa. Generalmente la célula se alarga considerablemente y cambia de forma. Cuando el acineto está madurando, es unicelular, pero cuando germina da origen a cadenas cortas de

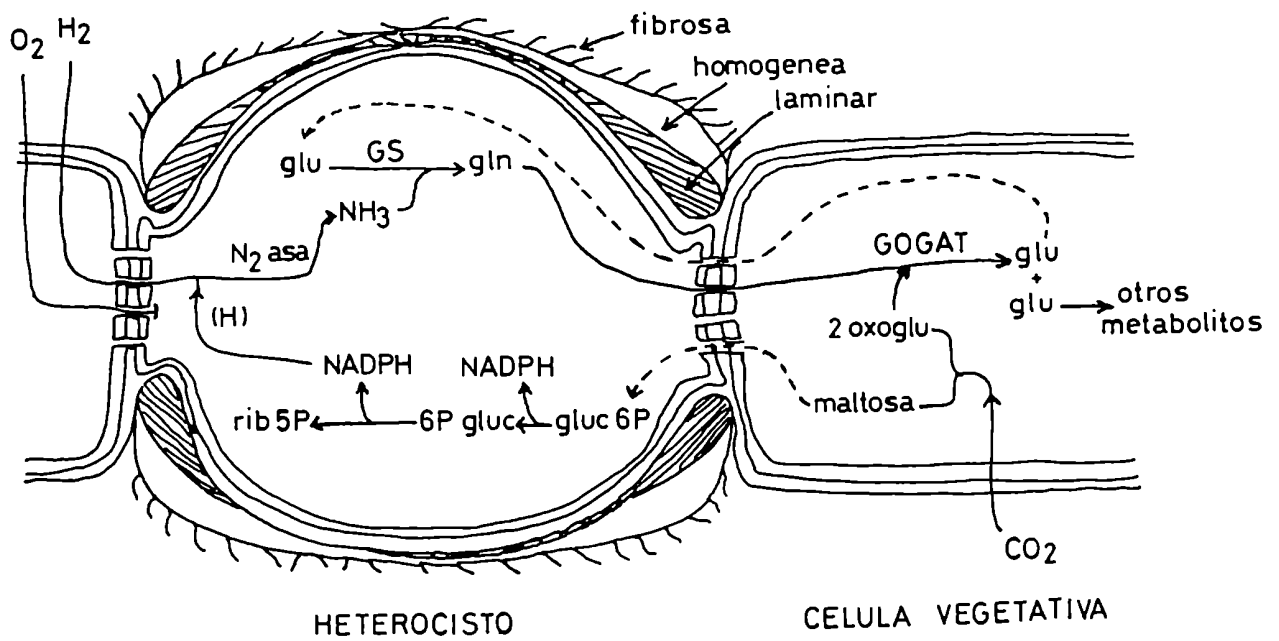


Figura 21. Modelo del flujo de carbono y nitrógeno entre un heterocisto y una célula vegetativa. Enzimas: N_2asa , nitrogenasa; GS , glutamina sintetasa; $GOGAT$, glutamina-oxo-glutarato amidotransferasa; $NADPH$, probablemente reduce una ferredoxina. Las capas (fibrosa, homogénea y laminar) limitan la difusión de N_2 , CO_2 y O_2 . Los cuerpos polares están omitidos.

células (206). El alargamiento de la célula que lleva a la formación del acineto, comienza durante la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria de crecimiento.

Metabolismo

Las cianobacterias son fotótrofos aeróbicos. Realizan fotosíntesis con producción de O₂, a excepción de algunas como *Oscillatoria limnetica*, que es capaz de utilizar, bajo ciertas condiciones, sulfuro como aceptor de electrones (225).

A expensas de nutrientes inorgánicos, la fotosíntesis produce los compuestos orgánicos primarios que luego son utilizados en las vías biosintéticas.

Algunas cianobacterias marinas requieren vitamina B₁₂ (226) para su crecimiento. Con excepción a ésta, no se ha demostrado la necesidad de otro tipo de factor de crecimiento orgánico.

En la oscuridad, las cianobacterias presentan metabolismo respiratorio, el cual está sujeto a inhibición en presencia de luz (206).

La mayoría de estas bacterias son autótrofas obligadas, pero algunas son facultativas y pueden crecer a expensas de un limitado rango de azúcares (228).

El camino primario de asimilación del CO₂ es el ciclo reductivo de las pentosas (209). El principal material de reserva es el glucógeno, que se acumula en los períodos de luz.

En oscuridad, el metabolismo respiratorio se realiza a expensas de este glucógeno acumulado. La conversión de glucógeno a glucosa-6-fosfato es seguida por la oxidación de este azúcar-fosfato a través del ciclo de las pentosas.

La respiración endógena está acompañada de síntesis de ATP y el NADP participa en la cadena respiratoria de transferencia de electrones.

Las cianobacterias poseen el ciclo de los ácidos tricarbóxicos incompleto, no sintetizan α -cetoglutarato deshidrogenasa (229). Por lo tanto, las enzimas restantes de este ciclo, que son sintetizadas por estas bacterias (229,230), desempeñan papeles biosintéticos, por ejemplo, en la formación de aminoácidos pertenecientes a la familia del glutamato, a partir de α -cetoglutarato (229).

Las cianobacterias son capaces de fijar CO₂ vía el ciclo de Calvin, cuyas enzimas principales son la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBPC/O) y la fosforribulosa quinasa (PRK)(232). Hay evidencias que sugieren que *Anacystis nidulans* incorporan CO₂ vía glutamato, aspartato, alanina y fosfoenol piruvato (PEP), indicando que existen vías alternativas al ciclo de Calvin, en la fijación de CO₂(232). *Nostoc muscorum* y *Synechococcus sp*, incorporan hasta un 20% de CO₂ en un compuesto llamado citrulina (233).

La asimilación de nitrato y amonio ha sido demostrada en cianobacterias. El amonio se asimila a través de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintetasa (GOGAT); también se han encontrado alanina deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa y aspartato deshidrogenasa (197).

Se han reportado la existencia de nitrato y nitrito reductasas para *Synechococcus an* y *A. cylindrica* (196).

OBJETIVOS

Desde el punto de vista evolutivo, como se ve esquematizado en la Figura 22, la adenilato ciclasa se encuentra en todos los niveles de la escala biológica.

En el reino animal, la enzima presenta las subunidades catalítica y regulatorias; en cambio en el reino vegetal sólo tiene la subunidad catalítica.

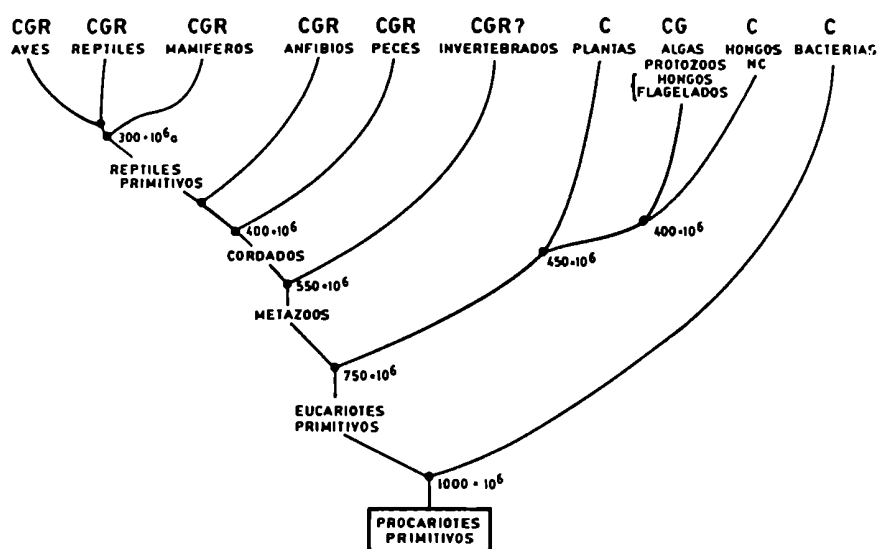


Figura 22: Distribución de la adenilato ciclasa a lo largo de la escala evolutiva.

En eucariotas inferiores, se observa solamente la presencia del componente catalítico, exceptuando algunos casos que poseen un componente G rudimentario. Las bacterias sólo poseen la subunidad catalítica.

Las plantas son organismos fotosintéticos, y como se dijo anteriormente, la adenilato ciclasa de *Medicago sativa* (23), es una enzima soluble y regulable por Ca^{2+} -calmodulina. *R. meliloti* fija N_2 atmosférico en simbiosis con alfalfa, tiene actividad de ciclasa.

Teniendo en cuenta que *Anabaena sp* es una bacteria que presenta las dos características, fotosintetiza con producción de O_2 y fija N_2 atmosférico en vida libre, es de interés comparar el sistema adenilato ciclasa de esta bacteria con alfalfa y *R. meliloti*.

Un punto muy interesante que permite vincular los vegetales con las cianobacterias, es la teoría endosimbiótica (234), esquematizada en la Figura 23, que postula que las ciano- y las cloroxibacterias serían los ancestros de los plástidos de las células de algas y de las plantas.

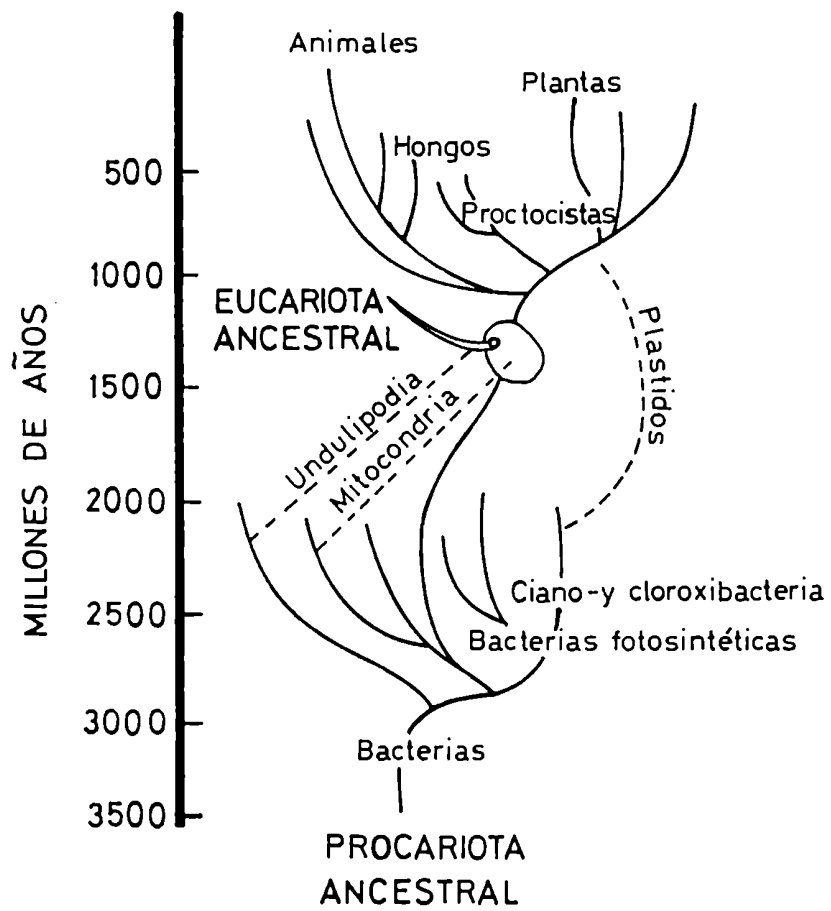


Figura 23: Diagrama esquemático de la teoría endosimbiótica (234)

MATERIALES Y METODOS

I. ANABAENA sp

I.1. Cepa utilizada y condiciones de cultivo

La cepa utilizada para los experimentos de purificación y caracterización de la adenilato ciclasa y calmodulina fue *Anabaena sp* PCC 7119 (ATCC 29151), tipo salvaje.

Las células se cultivaron bajo iluminación continua, con agitación y burbujeo de una mezcla gaseosa de N₂:CO₂ (98%:2%) según se describió en (235). El medio de cultivo estaba compuesto de: NaCl (0,12 g/l); KNO₃ (2,02 g/l); MgSO₄. 7H₂O (0,12 g/l); CaCl₂. 2H₂O (15 mg/l) EDTA (88 mg/l); FeSO₄. 7H₂O (55 mg/l); NaCO₃H (42 mg/l); K₂PO₄H.3H₂O (0,46 g/l) y 1 ml de una solución de micronutrientes de la siguiente composición: BO₃H₃ (2,86 g/l); MnCl₂.4H₂O (1,81 g/l); ZnSO₄.7H₂O (0,22 g/l); CuSO₄.5H₂O (79 mg/l); Na₂MoO₄. 2H₂O (1,26 g/l) NaVO₃ (24 mg/l); CoCl₂.6H₂O (40 mg/l).

Los cultivos que fueron utilizados para el estudio de los efectos de la luz sobre la adenilato ciclasa se sincronizaron previamente, introduciendo dos períodos de oscuridad de 16 hs, previos a la iluminación constante (236).

Para la purificación de la adenilato ciclasa las bacterias se cosecharon en la fase estacionaria tardía de crecimiento (21 días de cultivo) y en fase exponencial para la obtención del factor con actividad calmodulínica. Los cultivos se centrifugaron a 10.000xg durante 10 min a 4°C y las células se lavaron con buffer PIPES 25 mM pH 6,5 conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM. El sedimento de cianobacterias se conservó a -70°C hasta su uso.

I.2. Fraccionamiento subcelular

El sedimento correspondiente a 1 g) (peso húmedo) de cultivo congelado a -70°C , se resuspendió en 4 ml buffer PIPES 25 mM pH 6,5, glicerol 5%, 2-mercaptoetanol 1 mM, PMSF 5 mM, apotrini-na 25 U/ml (buffer C) y se sonicó en un Ultrasonic Processor W-385 Heat Systems-Ultrasonics Inc., por períodos de 15 seg con intervalos de 1 min a 200 W. El homogenato así obtenido se centrifugó a $1000\times g$ durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se centrifugó a $10.000\times g$ durante 10 min a 4°C ; a su vez, esta fracción se centrifugó a $105.000\times g$ durante 120 min a 4°C . A este último sobrenadante se lo denominó S105 y constituye la fracción soluble de la preparación de células bacterianas, a partir de la cual, se realizaron los sucesivos pasos de purificación de la adenilato ciclasa y de la "calmodulina". El precipitado obtenido del último paso de centrifugación se denominó P105.

II. PURIFICACION DE ADENILATO CICLASA

II.1. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa

Se sembraron 27 ml de la fracción S105 (17,6 mg de proteína/ml) en una columna de DEAE-celulosa (10x1,3 cm) previamente equilibrada con buffer C. La columna fue lavada con 100 ml de la solución buffer y eluida con un gradiente lineal de NaCl, en el mismo buffer, donde la concentración salina se incrementó de 0 a 0,5 M. El volumen total del gradiente fue de 300 ml. Se recogieron fracciones de 5 ml, a una velocidad de 4 ml/min. Las fracciones con actividad de adenilato ciclasa se juntaron y constituyeron la preparación DEAE1.

II.2. Cromatografía en columna de Hexilamino-sepharosa

La preparación DEAE1 (10 ml, 1,05 mg de proteína/ml), sin dializar, fue sembrada en una columna de hexilamino-sepharosa (8,5x0,9 cm), previamente equilibrada con buffer C, conteniendo NaCl 0,25 M. La columna se lavó con 150 ml del mismo buffer y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl, donde la concentración salina fue de 0,25 a 0,50 M. El volumen total del gradiente fue de 250 ml y se recogieron fracciones de 2,5 ml a una velocidad de 0,5 ml/min.

Las fracciones que presentaron la mayor actividad de adenilato ciclasa se combinaron constituyendo lo que se llamó preparación hexilamino-sepharosa.

Esta preparación fue concentrada en un equipo "Speed Vac" marca Savant, y luego desalada según lo descrito en el apartado X.3 de Materiales y Métodos.

II.3. Cromatografía en Ultrogel AcA34

La preparación hexilamino-sepharosa, concentrada y desalada fue sembrada (6,0 ml, 0,15 mg proteína/ml) en una columna preparativa de Ultrogel AcA34 (77,5x1,3 cm).

La columna fue previamente equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, NaCl 0,15 M. Las fracciones que presentaron mayor actividad específica de ciclasa se concentraron y desalaron según el apartado X.3 de Materiales y Métodos y esta preparación se denominó fracción Ultrogel.

III. DETERMINACION DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LA ADENILATO CICLASA

III.1. Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa

Se prepararon gradientes de 5 a 20% (P/V) de sacarosa, hechos en agua u óxido de deuterio (D₂O) conteniendo TRIS-HCl 50 mM, pH 7,4, 2-mercaptoetanol 1 mM, EDTA 0,5 mM y NaCl 0,15 M. Los gradientes se formaron en tubos de acetato de celulosa correspondientes al rotor Beckman SW40. En ellos fueron sembrados 0,3 ml de una mezcla que contenía la preparación enzimática correspondiente (Preparación DEAE1 0,32 mg de proteína) y las siguientes proteínas marcadoras: β -galactosidasa (*Escherichia coli*), 0,05 mg/ml; catalasa (hígado bovino), 0,1 mg/ml; malato deshidrogenasa (corazón porcino), 0,01 mg/ml; lactato deshidrogenasa (músculo de conejo), 0,03 mg/ml y citocromo C (corazón de caballo), 2 mg/ml.

Las centrifugaciones fueron realizadas a 40.000 rpm durante 18 hs, a 2°C. Al finalizar la corrida, se recogieron fracciones de 0,2 ml, succionando desde el fondo del tubo con una cánula conectada a una bomba peristáltica, a una velocidad de 0,5 ml/min.

III.2. Filtración en geles

La filtración se realizó en una columna de Ultrogel AcA34 (60-140 μ m) de dimensiones alcalíticas (45x0,75 cm) equilibrada con buffer PIPES 25 mM pH 6,5, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM y NaCl 0,15 M. La muestra sembrada fue la preparación DEAE1 de cianobacterias (1,5 ml, 1,05 mg de proteína por ml). La columna se eluyó con el mismo buffer, a una velocidad de 0,5 ml/min y la

temperatura se mantuvo a 4°C. Se recogieron fracciones de 1,0 ml. Las proteínas marcadoras fueron añadidas a la muestra, como se ha indicado en la sección III.1, en las mismas concentraciones.

Se consideró como volumen de exclusión de la columna, al volumen de elución de una solución de azul de dextrano, y como volumen total al volumen al cual se eluye una solución de CoCl_2 1 M.

IV. CALCULO DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS

IV.1. Volumen específico parcial

El método usado fue desarrollado por Clarke (237) y Meunier *et al.* (238) para determinar el volumen específico parcial de complejos de proteína-detergente. Dicho método se basa en el análisis de los coeficientes de sedimentación en gradientes de densidad hechos en H_2O y D_2O , según el procedimiento descrito por Edelstein y Schachman (239) y basado en el cambio en el coeficiente de sedimentación producido por el aumento de densidad de la solución por el uso de D_2O , cuando la cantidad de detergente unido es conocida.

De acuerdo con el trabajo de Martin y Ames (240), la distancia r_i recorrida desde el origen por cualquier macromolécula sometida a ultracentrifugación en un medio i ($i=H$ para H_2O e $i=D$ para D_2O) es:

$$r_i = k_i S_{20,w} (1 - \bar{v} \rho_i) \quad (1)$$

donde k_i es una constante en un medio, a una dada densidad para cualquier macromolécula con el mismo volumen específico parcial; $S_{20,w}$ es el coeficiente de sedimentación de la macromo-

lécua determinado en agua a 20°C; \bar{V} es el volumen específico parcial y ρ_i es la densidad del medio i . Dado que la densidad ρ_i aumenta linealmente a lo largo del gradiente de sacarosa, se hace una estimación promedio de ese parámetro tomando como valor $r_i/2$. Bajo estas condiciones, el error en ρ_i es menor que el 0,5%. Entonces, dados dos gradientes de sacarosa realizados en H₂O y en D₂O, resulta:

$$\frac{r_H}{r_D} = \frac{k_H(1-\bar{V})\rho_H}{k_D(1-\bar{V})\rho_D} \quad (2)$$

Siendo entonces:

$$\bar{V} = \frac{r_H k_D - r_D k_H}{r_H k_D \rho_D - r_D k_H \rho_H} \quad (3)$$

Dividiendo al numerador y al denominador del segundo término de la igualdad (3) por $r_D k_H$, resulta:

$$\bar{V} = \frac{\frac{r_H k_D}{r_D k_H} - 1}{\frac{r_H k_D \rho_D}{r_D k_H} - \rho_H} \quad (4)$$

Por otro lado, la ecuación (2) puede plantearse así:

$$\frac{r_{HkD}}{r_{DkH}} = \frac{(1 - \bar{V} \rho_H)}{(1 - \bar{V} \rho_D)} \quad (5)$$

y según la ecuación de Svedberg:

$$\frac{(1 - \bar{V} \rho_H)}{(1 - \bar{V} \rho_D)} = \frac{S_H \eta_H}{S_D \eta_D} \quad (6)$$

donde S_H y S_D son los coeficientes de sedimentación aparentes determinados experimentalmente en H_2O y D_2O , respectivamente, y η_H y η_D las viscosidades de las soluciones en H_2O y D_2O , respectivamente, en la zona en que se ubica la macromolécula analizada.

De las ecuaciones (4), (5) y (6), es entonces:

$$\bar{V} = \frac{\frac{S_H \eta_H}{S_D \eta_D} - 1}{\frac{S_H \eta_H}{S_D \eta_D} \rho_D - \rho_H} \quad (7)$$

La ecuación (7) fue utilizada para calcular el \bar{V} de la adenilato ciclasa. S_H , S_D , η_H y η_D fueron obtenidos a partir de la comparación de la movilidad de la adenilato ciclasa con respecto a la de las proteínas marcadoras utilizadas, en los gradientes de sacarosa en H_2O y D_2O , y cuyos valores numéricos serán presentados en el capítulo "Resultados y Discusión".

Las densidades ρ_D y ρ_H fueron determinadas por gravimetría, utilizando una micropipeta de 50 μ l.

IV.2. Radio de Stokes

El valor del radio de Stokes (a) fue obtenido a partir del perfil de las filtraciones en geles. El valor fue estimado de un gráfico de a vs V_e/V_0 (volumen de elución normalizado respecto del volumen de exclusión), obtenido con las proteínas marcadoras de parámetros moleculares conocidos.

IV.3. Peso molecular

El peso molecular de la adenilato ciclasa fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (241):

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

siendo N el número de Avogadro; $\eta_{20,w}$, viscosidad del agua a 20°C (1,100.10⁻²g/cm seg); a , radio de Stokes; $S_{20,w}$, coeficiente de sedimentación a 20°C en agua; \bar{V} , volumen específico parcial; $\rho_{20,w}$, densidad del agua a 20°C (0,9888 cm³/g).

IV.4. Coefficiente friccional

El coeficiente friccional fue calculado utilizando los parámetros moleculares previamente obtenidos (\bar{V} , a , M) de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

Siendo f el coeficiente de fricción de la proteína y f_0 el coeficiente de fricción de la proteína esférica y anhidra de igual masa.

IV.5. Parámetros de las proteínas marcadoras

En la Tabla 6 se resumen los parámetros moleculares de las proteínas marcadoras utilizadas en las centrifugaciones en gradientes de sacarosa y en las filtraciones en geles. La tabla se confeccionó en base a los datos reunidos por Haga *et al* (242).

Proteína	Coeficiente de Sedimentación	Volumen Específico Parcial	Radio de Stokes	Peso Molecular
	$S_{20,w}(S)$	$V(\text{mg/ml})$	$a(\text{nm})$	M
β -galactosidasa	15,93	0,76	6,84	520.000
Catalasa	11,3	0,73	5,21	247.000
Lactato deshidrogenasa	7,3	0,74	4,75	142.000
Malato deshidrogenasa	4,32	0,74	3,69	70.000
Citocromo C	1,71	0,73	1,87	13.300

Tabla 6. Parámetros moleculares e hidrodinámicos de las proteínas marcadoras

V. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

V.1. Sistema desnaturalizante y recuperación de la enzima (243-245)

En este caso se usaron minigeles. Las dimensiones del gel separador fueron: 5 cm de alto x 1,5 mm de espesor y su composición fue: acrilamida, 10% (P/V); bisacrilamida 0,5% (P/V); SDS 0,1%, buffer TRIS-HCl 0,375 M pH 8,8; TEMED 0,033% (V/V) y persulfato de amonio (PSA), 2 mg/ml. Las dimensiones del gel concentrador fueron: 1 cm de alto x 1 mm de espesor, y su composición: acrilamida 5% (P/V); bisacrilamida 0,1% (P/V); SDS 0,1% (P/V); buffer TRIS-HCl 0,125 M pH 6,8; TEMED 0,07% (V/V) y PSA 2 mg/ml.

Antes de ser sometidas a electroforesis, las muestras se desalaron según el apartado X.3. de Materiales y Métodos y se concentraron contra una solución de sacarosa 2 M en TRIS-HCl 10 mM pH 7,4.

Las alícuotas de las muestras concentradas (10 a 30 μ l) tratadas con 10 a 30 μ l de la mezcla desnaturalizante de la siguiente composición: SDS 2% (V/V); buffer TRIS-HCl 0,06 M pH 6,8 y azul de bromofenol 0,02 mg/ml, se incubaron a 37°C durante 15 min, y luego se sembraron en los geles. La electroforesis se realizó a una intensidad de corriente constante de 20 mA, durante 4 a 5 hs. El buffer de corrida utilizado fue TRIS-glicina 50 mM pH 8, SDS 0,1% (P/V)

Las proteínas utilizadas para la calibración de los pesos moleculares fueron: miosina (205000); β -galactosidasa (116000); fosforilasa B (97400); ovoalbúmina (45000); anhidrasa carbónica (29000).

VI. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA

La composición de la mezcla de incubación fue la siguiente: solución buffer TRIS-HCl 50 mM, pH 7,5; 3-isobutil-1 metil xantina 0,2 mM; AMPc 1 mM; MnCl₂ 2,5 mM; [³²P] ATP 1 mM (con una actividad específica que varía entre 100 y 600 cpm por pmol); fosfocreatina 2 mM, creatina quinasa 0,2 mg/ml y fracción enzimática (50 a 200 µg de proteína). El volumen total fue de 0,1 ml y las incubaciones fueron realizadas a 37°C durante 3 a 10 minutos. La reacción fue detenida por el agregado de 0,1 ml de una solución que contiene ATP 40 mM y [³H] AMP cíclico 12,5 mM (actividad específica 3.800 cpm por µmol) y por calentamiento de 3 minutos en un baño de agua hirviendo (246).

El AMP cíclico formado fue purificado siguiendo el procedimiento de cromatografía secuencial en columnas de Dowex 50W-X4 y alúmina descrito por Salomon *et al* (247). La base del método consiste en separar el AMP cíclico radioactivo de los fosfatos y nucleótidos radioactivos o no (ATP, ADP, AMP, PPi, Pi) a través de una resina intercambiadora de cationes (Dowex 50W-X4), donde los H⁺ de la resina se intercambian con los -NH₂⁺ de la adenina de los nucleótidos. El AMP cíclico es el único compuesto parcialmente retenido por la resina, pues su carga positiva (adenosina) no es totalmente contrarrestada por la única carga negativa del grupo fosfato. Luego del pasaje por la resina Dowex 50W-X4, el AMP cíclico fue adicionalmente purificado en una columna de alúmina, que retiene a todos los compuestos fosforilados aún presentes, excepto el AMP cíclico que no se retiene a pH neutro.

Los pasos de la purificación del AMP cíclico se detallan a continuación:

Una vez detenida la reacción, se agregó 1 ml de H₂O a la muestra y se sembró en una columna de resina Dowex AG 50W-X4 (200-400 mesh) forma H⁺ de 4 cm de largo por 0,5 cm de diámetro

interno. Después del pasaje de la muestra, se lavó con 5 ml de H₂O en dos etapas, una de 1 ml y otra de 4 ml, descartándose los eluidos.

Luego se pasaron 6 ml de H₂O, recogiendo el eluido directamente sobre una columna de alúmina neutra (3 cm x 0,5 cm) previamente equilibrada con buffer Imidazol-HCl 0,1 M, pH = 7,5. Una vez pasados los 6 ml por la columna de alúmina, y habiéndose desechado el eluido correspondiente, se lavó esta columna con 1 ml de buffer Imidazol-HCl y luego con 4 ml del mismo buffer, recogiendo el eluido en frascos de centelleo líquido. La radioactividad se midió según el método de Bray (248), añadiendo a los frascos 13,5 ml de la mezcla centelleadora (naftaleno-dioxano).

Las lecturas de radioactividad se realizaron en un contador de centelleo líquido marca Beckman LS 1801. Se utilizaron los siguientes parámetros: para ³H (el AMPc tritiado agregado al finalizar la incubación permite calcular el % de recuperación del AMP cíclico después del pasaje por las columnas) con ventana entre 0 y 200; y para ³²P, ventana entre 500 y 1000. Las recuperaciones usualmente oscilaron entre un 50 y un 80%.

VII. ADENILATO CICLASA DE ANABAENA SP (PCC 7119): OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (249)

VII.1. Esquema de inmunización

Se emplearon ratones Balb/c de seis semanas de edad. Los ratones recibieron, por inyección intraperitoneal 100 µl de la preparación DEAE1, concentrada y desalada, de adenilato ciclase de *Anabaena sp* (PCC 7119), 89 µg de proteína (343 pmoles/min por mg proteína) mezclada con 100 µl de adyuvante completo de Freund. A los 20 días, se aplica una nueva dosis de esta misma prepara-

ción. Cinco días más tarde, se efectúa un sangrado y a los ratones que presentan buen título de anticuerpo se los inyecta, quince días más tarde, con la misma preparación de adenilato ciclasa, esta vez con adyuvante incompleto de Freund. A los tres días, los animales se sacrifican para efectuar la fusión.

VII.2. Procedimiento de fusión y cultivo

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se introducen en una solución de desinfectante. Se sacan los bazos, se los coloca en un tubo cónico y se los lava dos veces con 10 ml de medio 1: RPMI, GIBCO (10,0 mg/ml), NaCO_3H (2 mg/ml), piruvato de sodio (91 mg/ml), glucosa (3 g/l), glutamina (0,29 mg/ml). Luego se lo coloca en una caja de petri que contiene 5 ml de medio 1 y se elimina el tejido adiposo. Una vez realizada esta operación se los coloca sobre un tamiz metálico y se los disgrega con el émbolo de una jeringa plástica descartable sobre una placa de Petri, que contiene 5 ml de medio 1. Seguidamente se lava el tamiz sobre la placa de Petri con 2 ml de medio 1. Una vez finalizada esta operación, los 7 ml de la suspensión ($6,5 \times 10^7$ cél., 96% viables) se transfieren a un tubo plástico con el extremo inferior cónico, se deja enfriar 10 min en hielo, y se centrifuga 10 min a 800 rpm, se descarta el sobrenadante.

A esta suspensión se agregaron $1,1 \times 10^8$ cel. de mieloma X63 (94% viables, 8 ml), previamente lavadas con medio 1 y se centrifuga 10 min a 800 rpm. Se descarta el sobrenadante y las células sedimentadas se colocan a 37°C y se les agrega, lentamente, 1 ml PEG 50%. A continuación se agregan 2 ml de medio 1 en 2 min y luego 7 ml del mismo medio en 3 min. Se centrifuga 10 min a 800 rpm y luego se resuspende en 78 ml de medio 2 (medio 1 con penicilina (100 U/ml), estreptomocina (0,1 mg/ml), Nistatina (50 $\mu\text{g/ml}$) y suero fetal bovino 10%).

Las células se siembran en cajas de cultivo 96 "multiplacas" (10^5 cél por pozo, 100 μ l) y se mantienen a 37°C en una estufa con atmósfera de aire y CO₂ 5%.

A las 2 hs se agregan 100 μ l de medio HAT (medio 2 conteniendo 0,014 mg/ml de hipoxantina, 0,0038 mg/ml timidina y 0,0018 aminopterina). A los 7 días se renueva el medio HAT de las multiplacas y luego cada tres días hasta la visualización de híbridos.

El clonado de los híbridos se realiza por dilución límite (12). Los clones positivos (productores de anticuerpos capaces de inhibir la adenilato ciclasa) se diluyen en medio HT (medio HAT sin aminopterina) de tal manera que queden 5; 1 y 0,1 células por pozo de la "multiplaca". A las multiplacas se les agrega previamente 10^5 cél de bazo por pozo (células alimentadoras). Los híbridos se mantienen cambiándoles el medio cada tres días.

VII.3. Determinación de anticuerpos en el medio de cultivo de hibridomas

Para determinar la presencia de anticuerpos en los medios de cultivo de hibridomas, se utilizó el sistema "VECTASTAIN", Vector Laboratories (IgG ratón, peroxidasa).

Se procedió de la siguiente manera: en multiplacas para enzimo-inmunoensayo se siembra el antígeno (preparación DEAE1, concentrada y desalada), 80 μ l (5 μ g de proteína), disueltos en NaCO₃H 50 mM, pH 9,6. Se deja toda la noche a 4°C. Se enjuaga dos veces con PBS (NaCl 0,15 M, Na₂PO₄H 8 mM, KPO₄H₂ 1,5 mM). Se bloquea con 200 μ l BSA 0,1% (seroalbúmina bovina). Se agregan 70 μ l del medio de cultivo de hibridomas. Se incuba 1 h a temperatura ambiente y se enjuaga dos veces con PBS. Se agregan 80 μ l de antiIgG de ratón biotinilado y se incuba 30 min a temperatura ambiente. Se enjuaga dos veces.

Se agregan 80 μ l del reactivo ABC VECTASTAIN (Avidina DH, peroxidasa biotinilada). Se enjuaga cinco veces con PBS. Se agregan 100 μ l de sustrato (0,4 mg/ml 0-fenilendiamina en citrato de sodio 0,1 M pH 4,5); luego se agregan de 3 a 5 μ l de H₂O₂ 30%. Se incuba 10 min a temperatura ambiente en oscuridad.

La reacción se detiene por el agregado de 100 μ l de H₂SO₄ 1 M. La aparición de color amarillo es indicativa de la presencia de anticuerpos en el medio de cultivo de los hibridomas.

VII.4. Determinación de anticuerpos específicos de adenilato ciclasa

La presencia de anticuerpos específicos para adenilato ciclasa se determinó de la siguiente manera: la preparación DEAE1 (50 μ l; 1,05 mg proteína/ml) se preincubó con 50 μ l de cada uno de los medios de cultivo que presentó anticuerpos (ver apartado anterior), durante 4 hs en baño de hielo y con agitación. Seguidamente, se determina la actividad de adenilato ciclasa en presencia de Mn²⁺, como se especifica en el apartado VI de Materiales y Métodos.

De esta manera se seleccionan los medios que presentan efectos inhibitorios sobre actividad enzimática.

VIII. PURIFICACION DE UN FACTOR SEMEJANTE A CALMODULINA

VIII.1. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa

El modulador se purificó de acuerdo al método de Barazi y Clarke (250), modificado en nuestro laboratorio.

La fracción S105 (28 ml, 50,2 mg proteína/ml) se sembró en una columna de DEAE-celulosa (10,5x1,3 cm), previamente equilibrada con buffer PIPES 25 mM pH 6,5, 2-mercaptoetanol 1 mM. La columna se lavó con 100 ml del buffer y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0-0,5 M en el mismo buffer. El volumen total del gradiente fue de 500 ml y se recogieron fracciones de 10 ml a una velocidad de 2,5 ml/min.

Las fracciones que contenían calmodulina se combinaron, denominándose a éstas, preparación DEAE2.

VIII.2. Cromatografía de afinidad en columna de Phenyl-sepharosa

Este paso de purificación está basado en el trabajo de Gopalakrshina y Anderson (251).

La preparación DEAE2 se calentó 10 min en baño de agua a 100°C, luego se enfrió en hielo y se centrifugó 10 min a 3000 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente, se dializó contra buffer TRIS-HCl 50 mM pH 7,4, 2-mercaptoetanol y se ajustó la concentración de Ca²⁺ a 5 mM. Esta preparación (60 ml, 0,6 mg proteína/ml) se sembró en una columna de Phenyl-Sepharosa (10x0,8 cm) equilibrada con buffer TRIS-HCl 50 mM pH 7,4, 2-mercaptoetanol 1 mM y CaCl₂ 0,1 mM.

La columna se lavó primero con 30 ml de este buffer y, posteriormente, con 36 ml de la misma solución conteniendo 0,5 M NaCl, hasta desaparición de absorbancia a 280 nm. La columna se

eluyó con 35 ml de buffer TRIS-HCl 50 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, EGTA 1 mM. Se recogieron fracciones de 1 ml con un flujo de 0,25 ml/min.

IX. DETECCION DE CALMODULINA

El ensayo de calmodulina se realizó midiendo la activación producida sobre la fosfodiesterasa de AMP cíclico, de cerebro bovino dependiente de calmodulina.

La mezcla de incubación contenía: TRIS-HCl 40 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 25 μM, albúmina bovina 1 mg/ml, [³H]-AMP cíclico 200 μM (actividad específica 100 cpm/mmol), preparación de fosfodiesterasa de cerebro bovino (2 mg proteína/ml) y la fracción calentada correspondiente. El volumen final de reacción fue 0,1 ml. Las incubaciones se realizaron a 30°C durante 10 min. La reacción se detuvo calentando en baño de agua a 100°C durante 1 min 30 s.

La segunda incubación se realizó agregando 40 μl de fosfodiesterasa de veneno de serpiente (*King cobra*, 2 mg/ml) durante 30 min a 30°C. Esta reacción se detuvo agregando 20 μl de una solución que contenía EDTA 50 mM y adenosina 5 mM. La adenosina marcada se separó por el agregado de una suspensión (1 ml) que contenía resina Dowex AG1-X4 (200 a 400 mesh, 33% (V/V) y etanol 30%. Las muestras se centrifugaron 5 min a 3000 rpm y una alícuota de 0,5 ml de los sobrenadantes se contó con 3 ml de una mezcla centelleadora de omnifluor 0,4% (P/V) y Tritón X100 30% (V/V), en tolueno. La radioactividad se midió en un contador de centelleo Beckman LS1801, utilizando un programa con lecturas para ³H.

X. FOSFODIESTERASA DE AMP CICLICO (PDE)

X.1. Purificación parcial de la PDE de cerebro bovino

A partir de cerebro bovino se purificó parcialmente la PDE por dos pasos de cromatografía en DEAE-celulosa, de acuerdo al método de Téllez-Iñón *et al* (252). La actividad enzimática que eluye en un único pico alrededor de 0,1 M de NaCl se concentró y se guardó a -70°C en glicerol 10%.

X.2. Ensayo de la actividad de la PDE de ANABAENA sp (PCC7119)

La actividad enzimática se midió de acuerdo al método descrito por Thomson y Appleman (253), con las modificaciones introducidas por Londesborough (254). La mezcla de incubación contenía: TRIS-HCl 40 mM pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, [³H]-AMP cíclico 1 μM (actividad específica 600 cpm/pmol) (255).

El ensayo se realizó de la misma manera que en el apartado IX de Materiales y Métodos.

XI. PROCEDIMIENTOS ANALITICOS

XI.1. Determinación de proteínas

Se realizó por el método de Lowry y col. (256), utilizando sero-albúmina bovina cristalina como patrón. La cuantificación de proteínas en las fracciones obtenidas en la columna de hexilamino-sepharosa se efectuó siguiendo la absorbancia a 280 nm/260 nm, y en las fracciones de la columna de Phenyl-sepharosa la determinación de proteínas se realizó midiendo la absorbancia a 280 nm.

XI.2. Determinación de la posición de las proteínas marcadoras en los gradientes de sacarosa y en las columnas de Ultragel AcA34

Citocromo C: fue medido por su absorción en la banda de Soret (410 nm).

Malato deshidrogenasa: su actividad se midió por el consumo de NADH, en presencia de oxalacetato, siguiendo la desaparición de su absorbancia a 340 nm según lo descrito en el Manual de enzimas de Worthington (257).

Lactato deshidrogenasa: su actividad se determinó por el consumo de NADH, en presencia de piruvato, del mismo modo que para la malato deshidrogenasa.

Catalasa: la actividad fue medida siguiendo la desaparición de H₂O₂, por la conversión de ioduro a iodo, de acuerdo al método de Terenzi *et al* (258).

β -galactosidasa: se determinó su actividad utilizando O-nitrofenil- β -D-galacto-piranosido como sustrato, siguiendo el método descrito en el manual de Worthington (257).

XI.3. Desalado de muestras proteicas

Para este tratamiento se utilizó Sephadex G-50 (poro fino). Se armó una pequeña columna de 10 ml (lecho de gel), en una jeringa y se centrifugó, agregando el buffer donde se quiere obtener la muestra, durante 3 min a 3000 rpm. Luego se sembró la muestra (1 ml) y se centrifugó nuevamente a 3000 rpm durante 3 min.

XII. REACTIVOS

DEAE-celulosa (DE-52) proveniente de Whatman Chemical Inc. (Clifton, New Jersey, U.S.A.)

Phenyl-Sepharosa (4B), de Pharmacia Fine Chemicals (Suecia)

PIPES, Tris-Base, MIX, BSA, catalasa de hígado de ternera, citocromo C de corazón de caballo, malato deshidrogenasa de corazón porcino, β -galactosidasa de *Escherichia coli*, clorpromazina, trifluoroperazina, hipoxantina, timidina, aminopterina, ATP, AMPc, adenosina, NAD⁺, NADH₂, PMSF, EGTA, PDE de veneno de serpiente (King cobra), 2H₂O, de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, U.S.A.)

Aprotinina (Trasylol) de Bayer (Leverkusen, Alemania)

Ultrogel AcA34 de LKB-Produkter (Bromma, Suecia)

Sacarosa (Schwartz-Mann, Orangeburg, Nueva York, U.S.A.)

Alúmina neutra, PEG 6000, de Merk (Darmstadt, Alemania)

Resinas de intercambio iónico AG-50 W-X4 y AG1-X4 (200 a 400 mesh) provenientes de Bio-Rad (Richmond, California, U.S.A.)

Creatina quinasa de músculo de conejo y lactato deshidrogenasa de Boehringer (Mannheim, Alemania)

[α -³²-P]ATP, [³H]AMPc, de New England Nuclear

El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. ADENILATO CICLASA DE ANABAENA sp (PCC 7119)

I.1. Localización subcelular

Las cianobacterias son procariotes autotróficos capaces de realizar fotosíntesis y de fijar nitrógeno. Estos dos tipos de mecanismos, bioquímicamente incompatibles, pueden llevarse a cabo por estar temporal o espacialmente separados en dos estructuras celulares diferentes: la fotosíntesis en las células vegetativas y la fijación de nitrógeno en los heterocistos. Presentan por lo tanto, un excelente modelo para estudiar la diferenciación celular y las señales dependientes de AMP cíclico involucradas en las diferentes respuestas.

Con el fin de analizar la posible participación de "segundo mensajero" en este proceso de diferenciación se comenzó con el estudio de las características del sistema adenilato ciclasa. El primer enfoque experimental estuvo destinado a la localización subcelular de la adenilato ciclasa. Para ello, se realizó un fraccionamiento subcelular de un homogenato de *Anabaena sp* (PCC 7119), mediante una centrifugación diferencial (apartado I, Materiales y Métodos). Los resultados de este experimento se encuentran en la Tabla 7.

De los datos incluidos en la Tabla 7, puede concluirse que la fracción con mayor actividad (total y específica) es el sobrenadante de 105.000xg (S105). Sin embargo, se encontró una cantidad considerable de enzima en el sedimento de 1.000xg. Esta fracción corresponde a células enteras y paredes celulares. La presencia de actividad en esta fracción podría deberse a una ruptura incompleta. Cuando la homogeneización se realizó en presencia de inhibidores de proteasas como el PMSF 5 mM y apotrinina (25 U/ml), se observó que la localización subcelular de la adenilato ciclasa era la misma, y que su presencia en la fracción ci-

Resultados y Discusión

INHIBIDOR DE PROTEINAS	FRACCION	VOLUMEN	PROTEINA	ACTIVIDAD DE ADENILATO CICLASA	
				TOTAL	ESPECIFICA
		ml	mg	pmoles/ min	pmoles/min/ mg prot
NO	homogenato	26,0	62,4	4600	73,7
	1000g(sedimento)	2,5	4,9	158	32,2
	10000g(sedimento)	2,5	3,9	83	21,3
	105000g(sedimento)	2,5	9,4	55	5,8
	105000g(sobrenadante)	25,5	45,4	4960	109,0
PMSF (5 mM)	homogenato	26,0	72,8	15160	208,2
	1000g(sedimento)	2,5	7,8	1220	156,4
	10000g(sedimento)	2,5	4,15	240	57,9
	105000g(sedimento)	2,5	9,0	214	23,8
	105000g(sobrenadante)	25,5	39,5	16040	406,1
Aprotinina (25 U/ml)	homogenato	26,0	71,9	15077	209,7
	1000g(sedimento)	2,5	6,5	783	120,5
	10000g(sedimento)	2,5	4,1	230	56,1
	105000g(sedimento)	2,5	9,3	165	17,7
	105000g(sobrenadante)	25,5	40,7	16665	409,4

Tabla 7. Distribución de la actividad de adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119) y efecto de inhibidores de proteasas en la localización.

toplasmática no era debida a un producto de proteólisis, pero su actividad enzimática era considerablemente mayor que la obtenida en ausencia de los inhibidores y esto podría deberse a la presencia de proteasas muy activas.

Como se sabe, *Anabaena* es un género de cianobacterias que forma heterocistos a partir de las células vegetativas. El patrón proteico para ambos tipos de células es muy diferente. La degradación de proteínas, aparentemente, es la fuente de aminoácidos para la síntesis de proteínas específicas del heterocisto. Las bacterias del género *Anabaena* poseen proteasas estimuladas por Ca^{2+} . Se ha purificado esta clase de proteasa en *Anabaena variabilis* (ATCC 29413) que es inhibible por PMSF (259). Estos datos contribuyen a sustentar los resultados obtenidos en la Tabla 7.

Se puede concluir entonces, que la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119) es una enzima de localización citoplasmática.

Se investigó también la variación de la actividad de la enzima en los distintos estadios del cultivo. Para ello, se hizo una curva de crecimiento, obteniéndose el gráfico que se ve en la Figura 24.

También se determinó la actividad de adenilato ciclasa en cada uno de los puntos obtenidos de la Figura 24; estos resultados pueden observarse en la Figura 25.

Durante la fase exponencial de crecimiento la actividad enzimática aumenta de manera cíclica, hecho atribuible a que el AMP cíclico regularía ciertos aspectos de la división celular (260). En la fase estacionaria, la actividad enzimática continúa aumentando, pero en forma lineal.

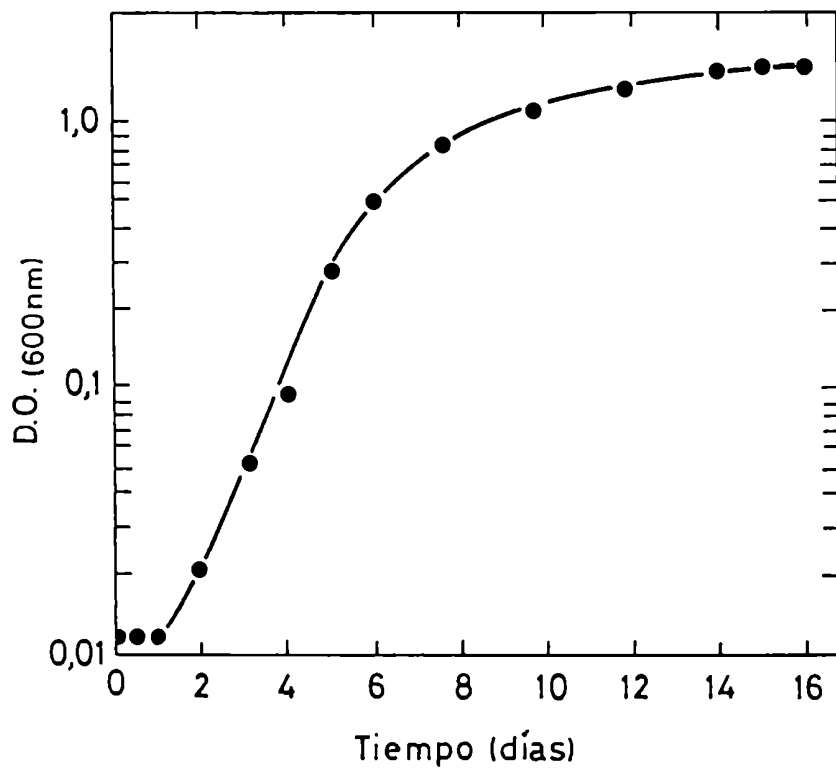


Figura 24. Curva de crecimiento de *Anabaena sp* (PCC 7119).

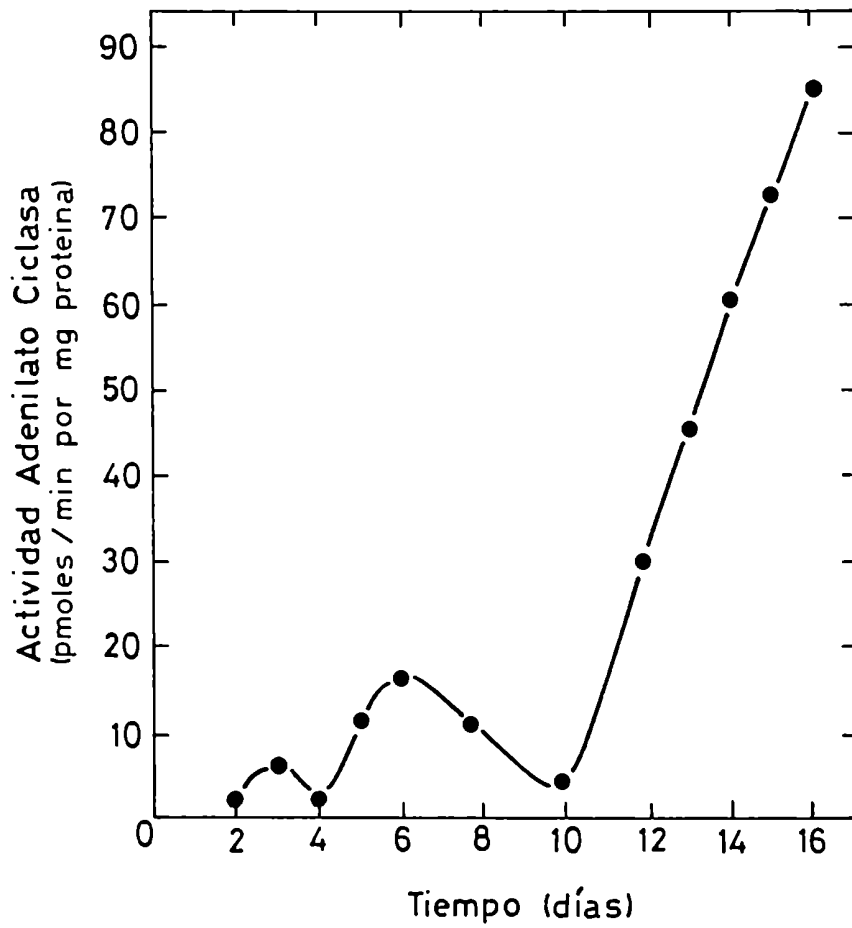


Figura 25. Actividad de adenilato ciclasa a lo largo del ciclo de vida de *Anabaena sp* (PCC 7119). La fracción enzimática utilizada fue un S105, ATP 0,5 mM, Mn^{2+} 0,5 mM.

I.2. Propiedades cinéticas de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119)

Para determinar las concentraciones óptimas de ATP y catión que requiere la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119), se determinó primero la concentración de proteína adecuada y el tiempo de incubación del ensayo; estos resultados se pueden observar en las Figuras 26 y 27.

En la Figura 26 se puede observar que la actividad enzimática es proporcional a la cantidad de proteína utilizada, hasta 0,35 mg por ensayo. Además, la actividad enzimática es lineal respecto del tiempo hasta los 10 min de incubación (Figura 27). A partir de estos datos, se utilizaron 0,35 mg de proteína como fracción proteica y 5 min como tiempo de incubación para determinar las concentraciones de ATP y catión óptimas. Para ello, se midió la actividad de adenilato ciclasa variando la concentración de catión a una concentración fija del nucleótido y, a su vez, modificando la concentración de ATP manteniendo fija la de catión.

Como se puede observar en la Figura 28, la actividad enzimática en presencia de Mg^{2+} es despreciable; por lo tanto, se utilizó Mn^{2+} como catión para determinar las condiciones adecuadas de trabajo. La concentración óptima de Mn^{2+} fue 2,5 mM y con respecto al ATP, ésta fue 1 mM.

Por otra parte, se detectó una modesta activación cuando las mezclas de reacción fueron suplementadas con activadores conocidos de ciclasas eucarióticas como, fluoruro, GTP, GMPP(NH)P o forskolina (Tabla 8). Por otro lado no se detectó activación al preincubar o ensayar las preparaciones enzimáticas en presencia de toxina del cólera (pretratada o no con ditiotreitól), en presencia o ausencia de NAD.

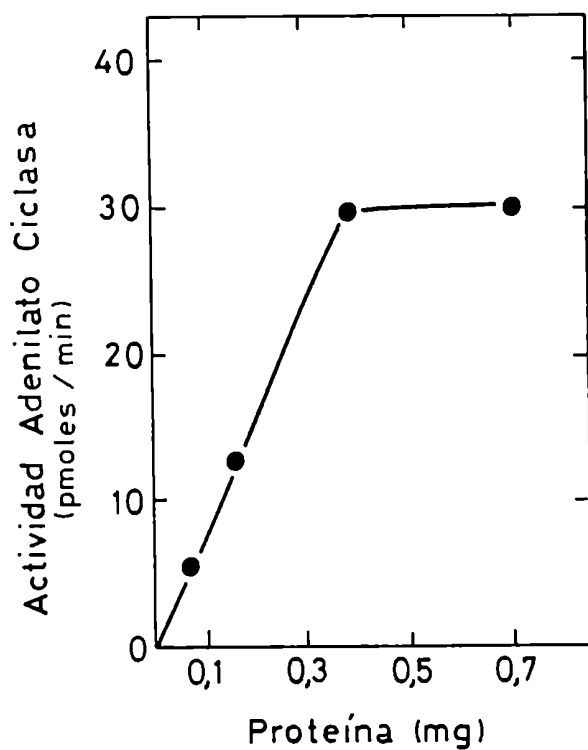


Figura 26. Actividad adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119) en función de la cantidad de proteína. La fracción enzimática utilizada fue un S105, ATP 0,5 mM, Mn^{2+} 2,5 mM.

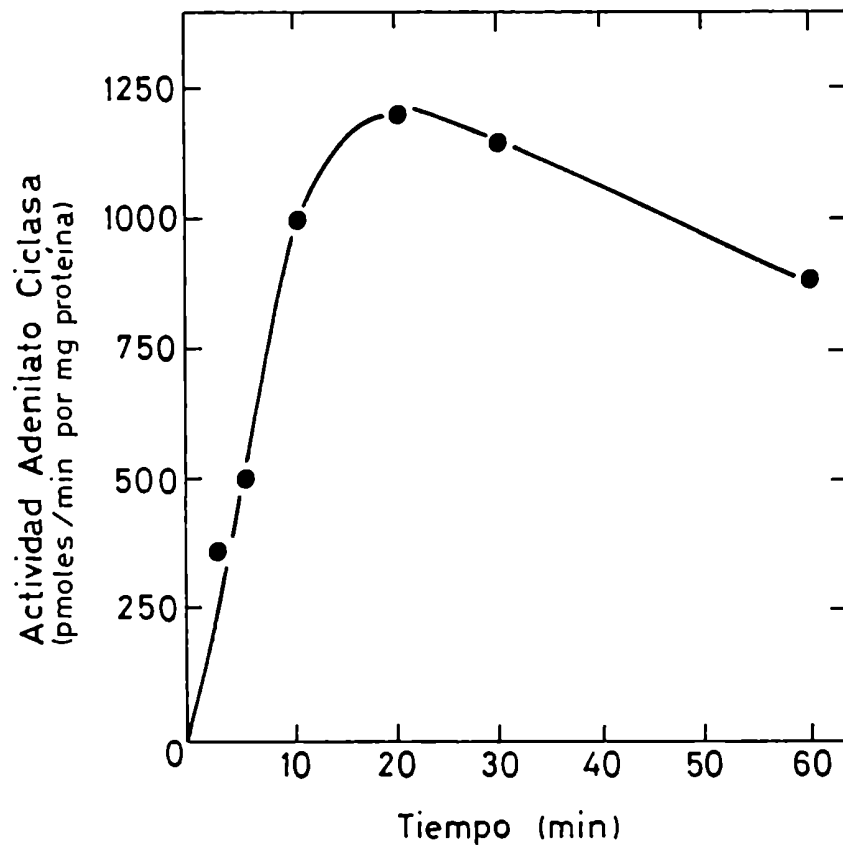


Figura 27. Actividad de adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119) en función del tiempo. La fracción enzimática utilizada fue un S105 (0,35 mg proteína), ATP 0,5 mM, Mn^{2+} 2,5 mM.

Agregados	Actividad adenilato ciclasa
	(pmoles/min por mg proteína)
Mg 1 mM	0,55
Mg 1 mM + NaF 10 mM	0,60
Mg 1 mM + GPP(NH)P 10 μ M	0,86
Mg 1 mM + GTP 10 μ M	0,77
Mg 1 mM + Forskolina 0,05 mg/ml	0,91

Tabla 8. Efecto de activadores de ciclasas eucarióticas sobre la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119). La fracción enzimática utilizada fue la preparación DEAE1 (65 μ g de proteína)

Todos estos datos indicaron que la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* se asemejaría a una típica protociclase, similar a *Neurospora crassa* (34), *Mucor rouxii* (12), *Trypanosoma cruzi* (22), *Testis* (14), *Blastocladiella emersonii* (38,261).

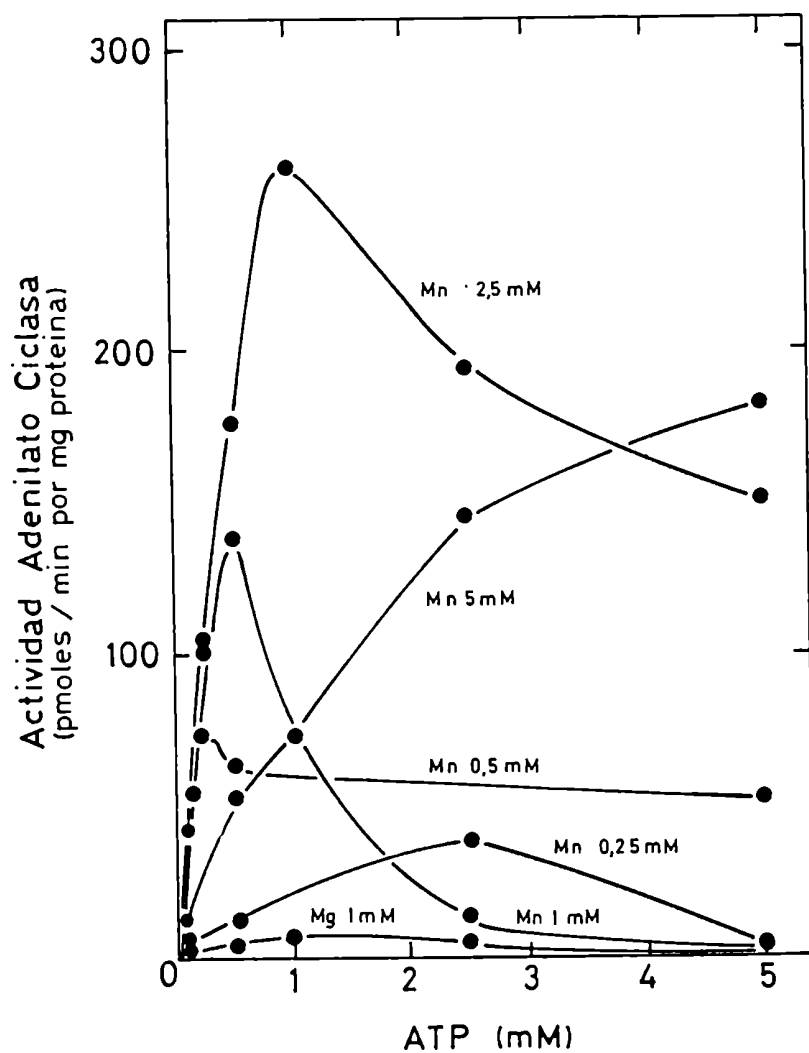


Figura 28. Actividad de adenilato ciclasa *Anabaena sp* (PCC 7119) en función de la concentración de ATP a diferentes concentraciones de catión. La fracción enzimática utilizada fue un S105 (0,35 mg proteína); tiempo de incubación, 5 min.

II. PURIFICACION DE LA ADENILATO CICLASA DE ANABAENA sp (PCC 7119)

II.1. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa

El primer paso de purificación consistió en una cromatografía en columna de DEAE-celulosa de un S105. Los detalles experimentales de este procedimiento fueron descritos en la sección II.1 de Materiales y Métodos. En la Figura 29 se muestra el perfil cromatográfico. La actividad enzimática eluyó en un único pico a una concentración aproximada de NaCl de 0,25 M. No se detectó actividad enzimática en las fracciones correspondientes al lavado. En cuanto al perfil de elución de la proteína, éste mostró un máximo que se elimina de la columna con el lavado, en dicha fracción se encuentran la mayor parte de los pigmentos de la antena, las ficobiliproteínas.

Es importante destacar que la actividad específica del S105 es alrededor de 10 veces mayor que la obtenida, en las mismas condiciones que se detallan en la Figura 28, y esto se debe a que el cultivo es cosechó el día 21 (ver Figura 24).

La adenilato ciclasa eluyó de la columna de DEAE con una actividad específica de 143 nmoles AMPc/min por mg de proteína. Este valor es aproximadamente 40 veces mayor que el correspondiente sobrenadante S105.

Adicionalmente se estudió la actividad de fosfodiesterasa de AMP cíclico en las distintas fracciones de la columna. Esta enzima eluye a una concentración de NaCl cercana a 0,2 M (resultados no mostrados). También se estudió la presencia de un factor semejante a calmodulina, pero ésta fue baja y eluía a una concentración de NaCl 0,3 M.

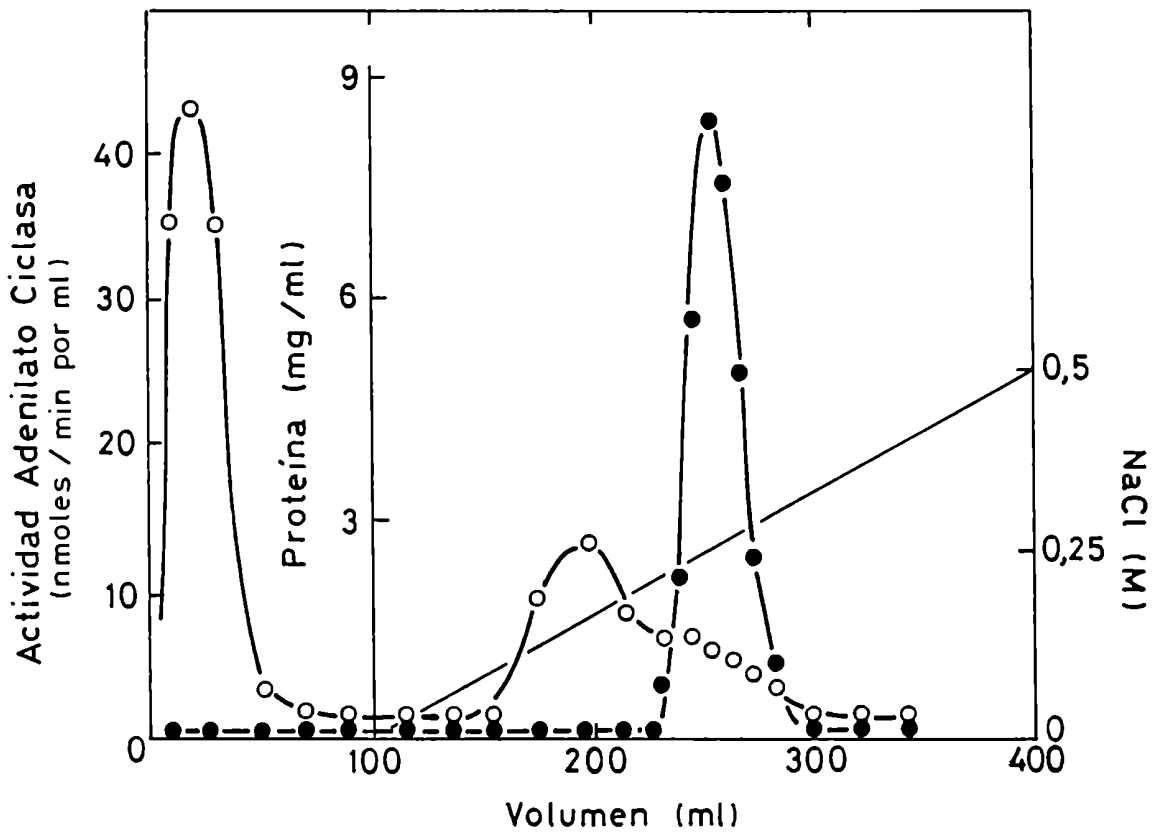


Figura 29. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de un S105 de *Anabaena sp* (PCC 7119). (●), actividad de adenilato ciclasa; (○), proteína. La enzima se purificó a partir de un cultivo de 21 días (ver Figura 24).

II.2. Cromatografía en columna de hexilamina-sepharosa

La preparación DEAE1 fue sembrada en una columna de hexilamino-sepharosa, como fue descrito en el apartado II.2 de Materiales y Métodos. La Figura 30 muestra el perfil de elución correspondiente.

Como se puede observar, la enzima no queda retenida en la columna, sino que eluye con el lavado de la misma. Esto se debe a que no se ha eliminado el NaCl de la preparación DEAE1. Cabe mencionar que cuando la muestra es dializada, la enzima es retenida en la columna. Sin embargo durante la diálisis la actividad enzimática disminuye marcadamente.

En este caso, la actividad específica recuperada es de 820 nmoles AMP cíclico/min por mg proteína es alrededor de 6 veces más que la obtenida en la preparación DEAE1.

II.3. Cromatografía preparativa en Ultrogel Aca34

Con el objeto de obtener un grado de purificación mayor, la preparación hexilamino-sepharosa (combinación de las fracciones con mayor actividad de ciclasa del paso cromatográfico anterior), se concentró, desaló (ver apartado XI.3 de Materiales y Métodos) y se sembró en una columna de Ultrogel Aca34, preparativa. El perfil de la misma puede observarse en la Figura 31. Como puede observarse, la enzima eluye en un solo pico.

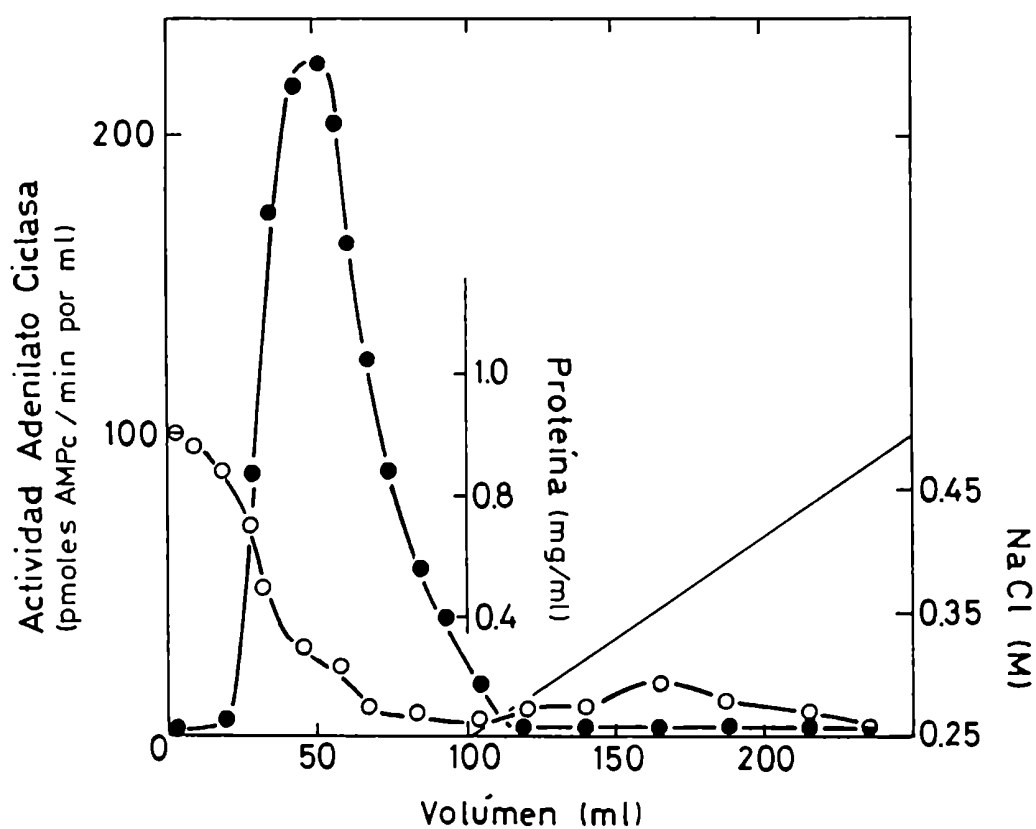


Figura 30. Cromatografía de hexilamino-sepharosa la preparación DEAE1 de *Anabaena sp* (PCC 7119): (●) actividad de adenilato ciclasa; (○) proteína.

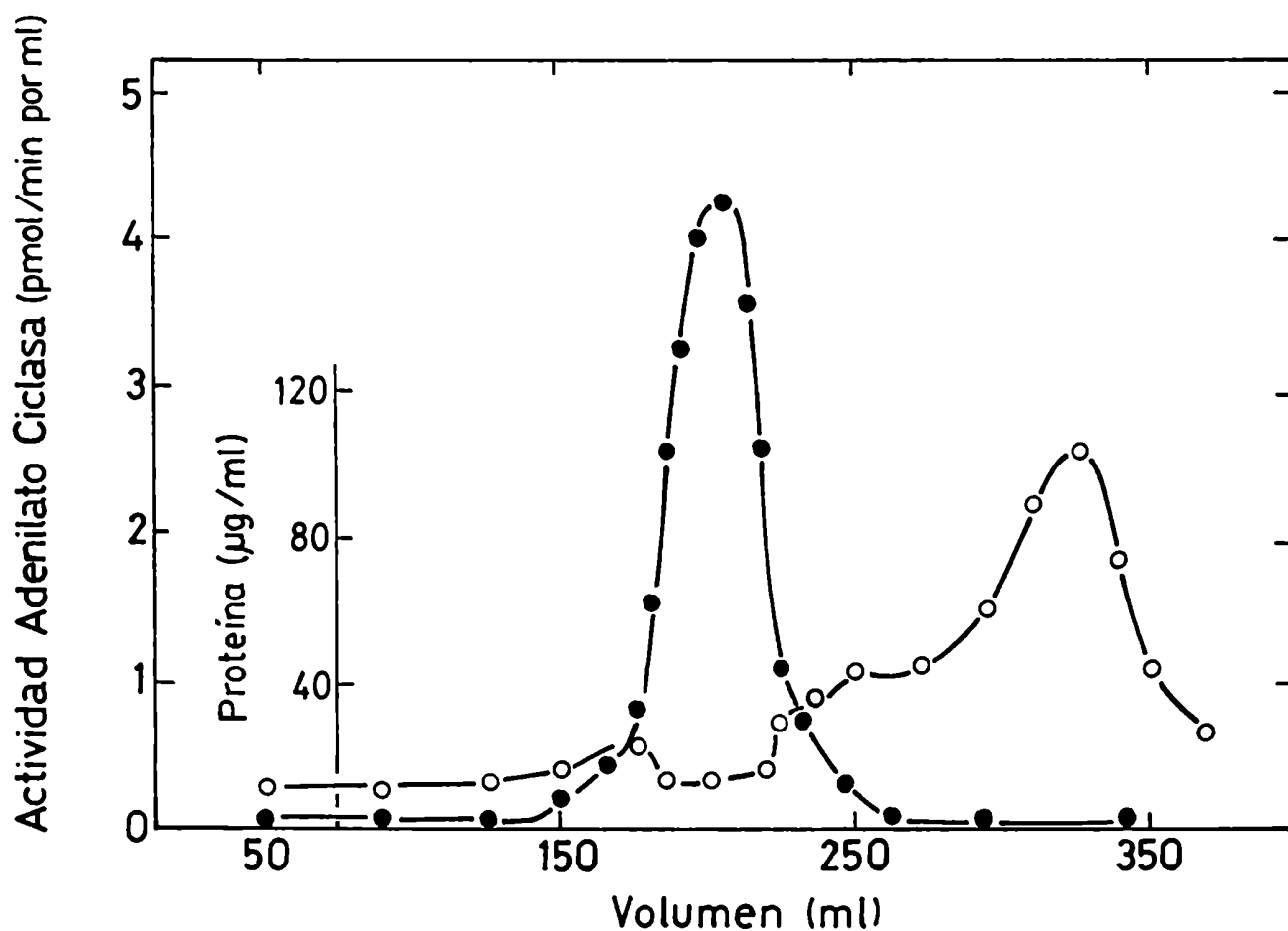


Figura 31. Cromatografía preparativa en columna de Ultrogel AcA34 de una preparación de hexilamina-sepharosa de *Anabaena sp* (PCC 7119): (●), actividad de adenilato ciclasa; (○), proteína.

II.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Una alícuota de la preparación Ultrogel, obtenida según el apartado anterior (30 μ l, aproximadamente 50 μ g de proteína) fue sometida a una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS 10 % (P/V). El resultado de la tinción del gel puede observarse en la Figura 32. Luego de la corrida electroforética, también se recuperó la actividad enzimática del gel, según se describió en la sección V.1 de Materiales y Métodos. Los resultados pueden observarse en la Figura 33.

La actividad enzimática recuperada del gel de poliacrilamida es muy baja (4,5 pmoles/min por ml). De los resultados expuestos en las Figuras 32 y 33 la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* posee un peso molecular aparente de 60000 para la banda polipeptídica que presenta actividad enzimática.

En la Tabla 9 se muestran los datos de purificación de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119). La dificultad principal que surge en la purificación de esta enzima es su inactivación rápida e irreversible (14,22). La misma se puede reducir muy poco con el agregado de 2-mercaptoetanol, glicerol o sacarosa hasta en un 20 %, a las soluciones buffer. Sin el agregado de glicerol (5 %) no se podría llegar más allá del paso de purificación de cromatografía en columna de DEAE-celulosa.

Con respecto a la purificación, se puede observar que en el primer paso (DEAE-celulosa), es alrededor de 40 veces, valor que es más alto que los que se obtienen normalmente en este tipo de cromatografías.

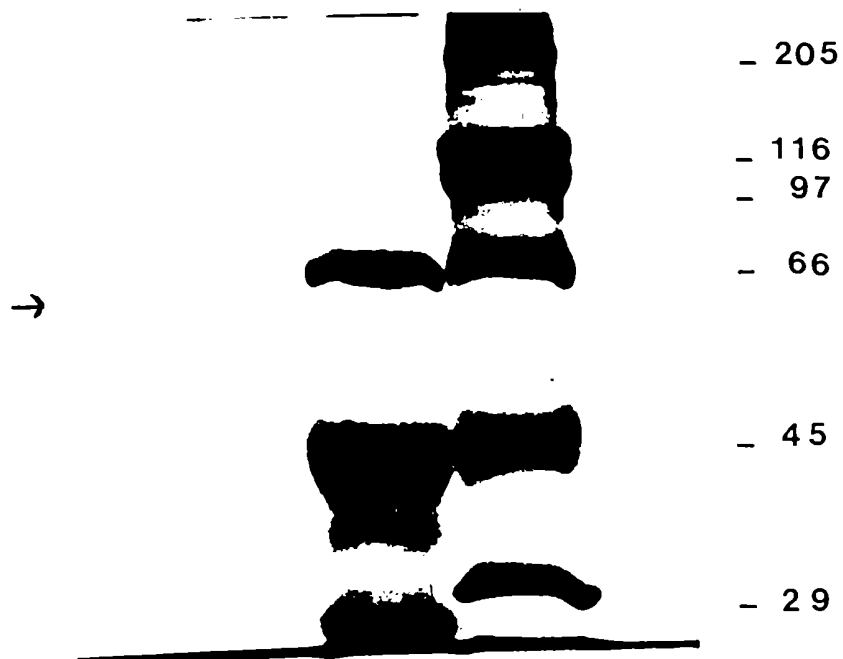


Figura 32. Electroforesis en gel SDS-poliacrilamida 10 % (P/V). Proteínas marcadoras: M, miosina; β -gal, β -galactosidasa; Phb, fosforilasa b; BSA, seroalbúmina bovina; OVA, ovoalbúmina; C, anhidrasa carbónica.

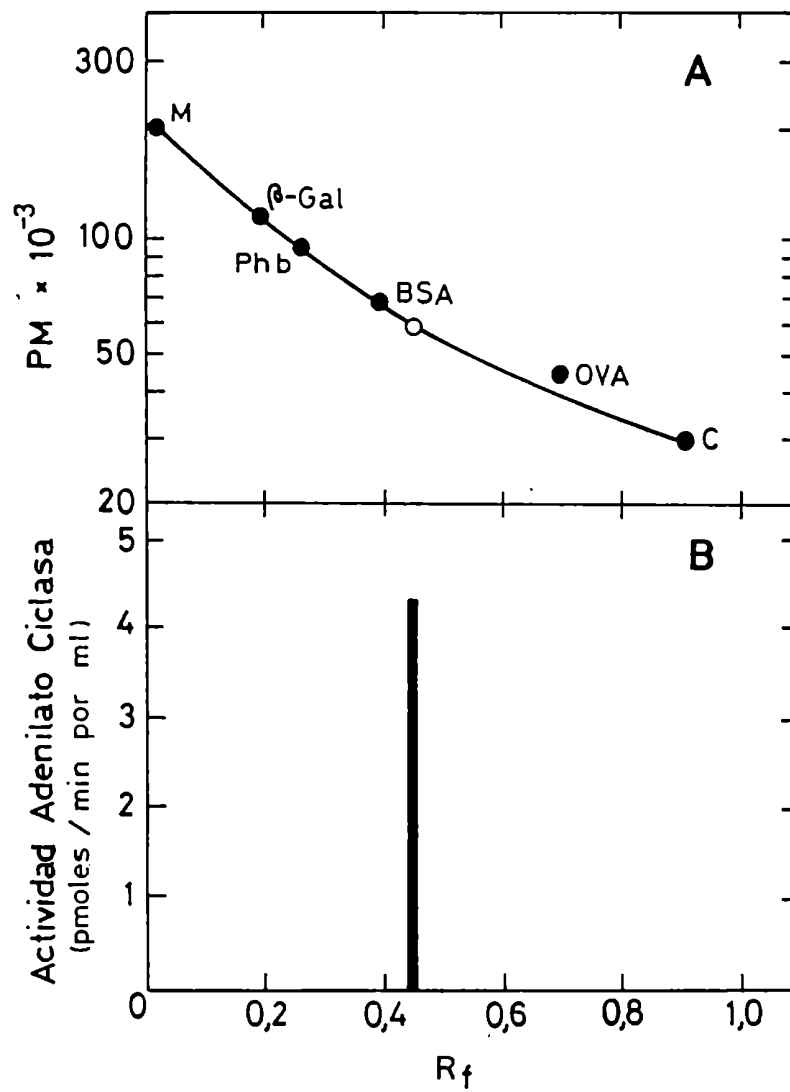


Figura 33. A, Curva de calibración de pesos moleculares de las proteínas marcadoras (●) y de adenilato ciclasa (○) obtenidas del gel PAGE-SDS 10 % (P/V) de la Figura 32. B, Localización de la actividad enzimática de adenilato ciclasa del PAGE-SDS 10 %.

FRACCION	PROTEINA (mg)	ACTIVIDAD TOTAL (nmoles/min) %	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmoles/min por mg prot)	PURIFICACION
<u>S105</u>	476	1800	100	3,8
<u>Preparación DEAE1</u>	10,5	1500	83	143
<u>Preparación hexilamino- sepharosa</u>	0,9	739	41	820
<u>Preparación Ultrogel</u>	0,05	285	16	5700

Tabla 9. Purificación de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119)

Teniendo en cuenta la pérdida de actividad enzimática, se estimó que luego del último paso, la purificación sería del orden de 1500 veces. La cantidad de proteína obtenida fue del orden de los 50 μ g, teniendo en cuenta que la enzima no se obtuvo en forma homogénea se puede estimar que la adenilato ciclasa representaría

menos del 0,01% de la proteína soluble. Es evidente que esta enzima es una proteína minoritaria en *Anabaena sp*, hecho que caracteriza a la mayoría de las ciclasas.

La electroforesis en geles de poliacrilamida reveló la existencia de una banda de 60 KD, asociada a la actividad de adenilato ciclasa (Figuras 32 y 33). En la Figura 32 pueden observarse dos bandas de mayor peso molecular. Dichas bandas no presentaron actividad enzimática y serían contaminantes.

Aunque la purificación se ha estimado en 1500 veces, la enzima no se purificó a homogeneidad. Para poder hacerlo se ha intentado la preparación de anticuerpos monoclonales contra la adenilato ciclasa. A pesar de haber obtenido híbridos en las placas de fusión que inhibieron la actividad de la adenilato ciclasa, en aproximadamente un 5%, luego de haberse realizado el clonado de dichos híbridos, no se volvió a obtener inhibición de la actividad enzimática.

Existen muy pocos trabajos en la literatura científica que describan intentos exitosos en la purificación de la adenilato ciclasa. Kornblihtt *et al* (14) han obtenido muy buenos resultados en la purificación de la enzima de testículo de rata; lo mismo ocurre en el trabajo de Reig Macia y col. (262) con la purificación de la adenilato ciclasa de *Neurospora crassa*. Quizás el único trabajo completo hasta el presente sea la purificación a homogeneidad de la ciclasa soluble del procariota *Brevibacterium liquefaciens* llevado a cabo por Takai *et al* (36). Siguiendo procedimientos convencionales como precipitación ácida, precipitación con sulfato de amonio, y cromatografías en columna de hidroxilopatita, DEAE-sephadex, y Sephadex G200, los autores lograron purificar la enzima 4500 veces, con un rendimiento del 10 %. La enzima homogénea fue cristalizada y presentó un peso molecular de 92400, que estaba constituida por dos subunidades de 46000. Tam-

bién determinaron la composición de aminoácidos de la enzima purificada, y comprobaron la presencia de un alto porcentaje de aminoácidos ácidos e hidrofóbicos y la ausencia total de cisteína.

En lo que respecta a organismos eucariotas, sólo existe un trabajo en la literatura que informa haber purificado una actividad de ciclasa (cerebro bovino) a homogeneidad (263). Los autores, Stellwagen y Baker, utilizaron una cromatografía de afinidad azul-dextrano-sepharosa, seguida de una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. Utilizando sólo estos dos pasos, lograron una purificación de 250 veces con un rendimiento del 20%. Parece poco probable que con una purificación de sólo 250 se obtenga una ciclasa en estado homogéneo, sobre todo teniendo en cuenta que en la mayoría de los tejidos analizados la ciclasa constituye una proporción extremadamente baja de la proteína total de la célula. En el segundo paso de purificación, la enzima eluye de una columna de DEAE-celulosa equilibrada a pH=8 a una concentración de NaCl de 0,9 M. Este hecho parece bastante inusual si se tiene en cuenta que la ciclasa de testículo de rata (14), *Neurospora crassa* (262), corazón canino (264), hígado de rata (265), *Fasciola hepática* (266), *Brevibacterium liquefaciens* (76), *Medicago sativa* (23), y la de *Anabaena sp* eluyen de columnas de DEAE-celulosa equilibradas a pH cerca de la neutralidad a concentraciones de NaCl comprendidas entre 0,2 y 0,3 M.

Además, se puede señalar que la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119) purificada tiene una actividad específica dos órdenes mayor que todas las purificadas hasta el momento.

III. PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LA ADENILATO CICLASA DE ANABAENA sp (PCC 7119)

III.1. Filtración por geles

La Figura 34 muestra el perfil de elución de una preparación DEAE1 de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* cromatografiada en una columna analítica de Ultrogel AcA34. Las flechas indican la posición de los picos de las proteínas marcadoras. La enzima eluyó a una relación V/V_0 de 1,6, correspondiente a un radio de Stokes de 6,0 nm.

III.2. Ultracentrifugaciones en gradientes de sacarosa

Con el objeto de conocer el coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) y el volumen específico parcial (V) de la enzima, se realizaron centrifugaciones en gradientes de sacarosa en H_2O y en 2H_2O . Los resultados son los que se muestran en la Figura 35.

Tanto en H_2O como en 2H_2O , la adenilato ciclasa sedimentó generando un pico asimétrico. El experimento mostrado en la Figura 35 corresponde a gradientes sembrados con una preparación DEAE1. En la Figura 35 inserta se graficó la distancia recorrida por cada proteína marcadora (r), en función de los coeficientes de sedimentación (s) correspondientes.

Dicha curva de calibración muestra que la posición de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* respecto de las proteínas marcadoras es la misma (constante de sedimentación, 6,0 S). Este hecho indica que la ciclasa posee el mismo valor de volumen específico parcial (V) que las proteínas globulares, es decir 0,74 ml/g.

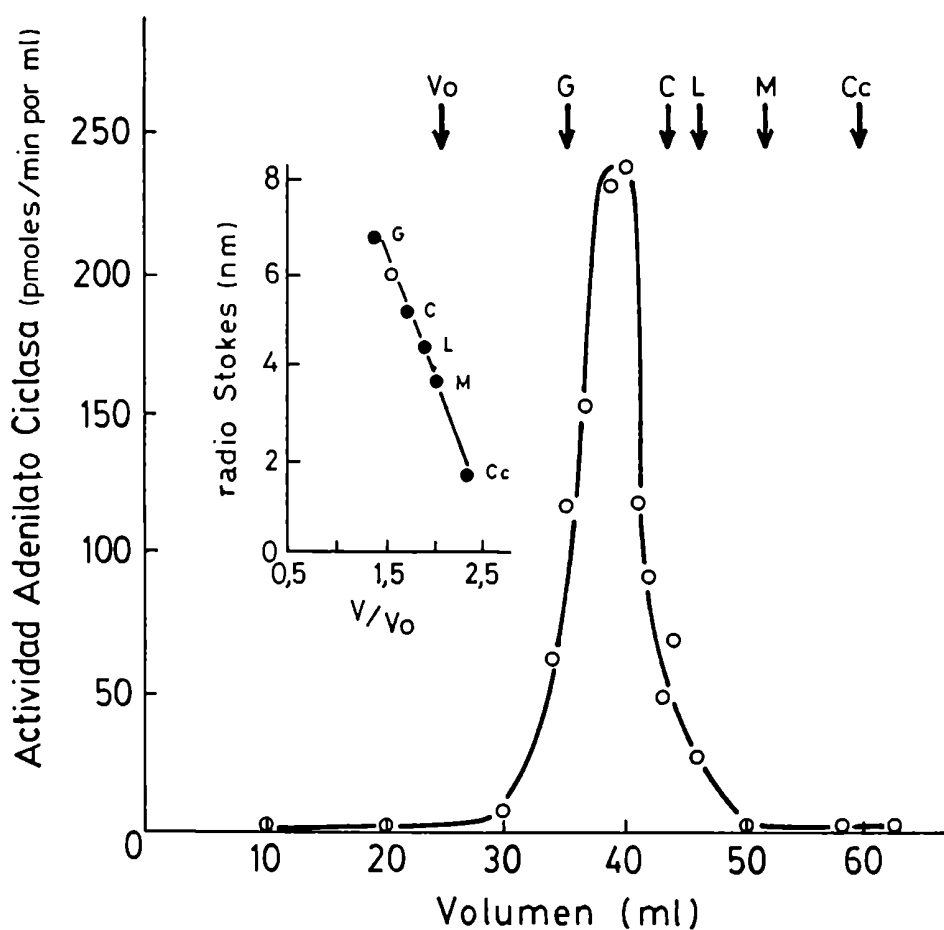


Figura 34. Cromatografía en columna analítica de Ultrogel AcA34 de una preparación de DEAE1 de *Anabaena sp* (PCC 7119). El gráfico incluido muestra la relación entre V/V_o y los radios de Stokes para las diferentes proteínas marcadoras (●) y para la ciclase (○). V_o , volumen de exclusión; G, β -galactosidasa; C, catalasa; L, lactato deshidrogenasa; M, malato deshidrogenasa; C_c , citocromo C; V_T , volumen total.

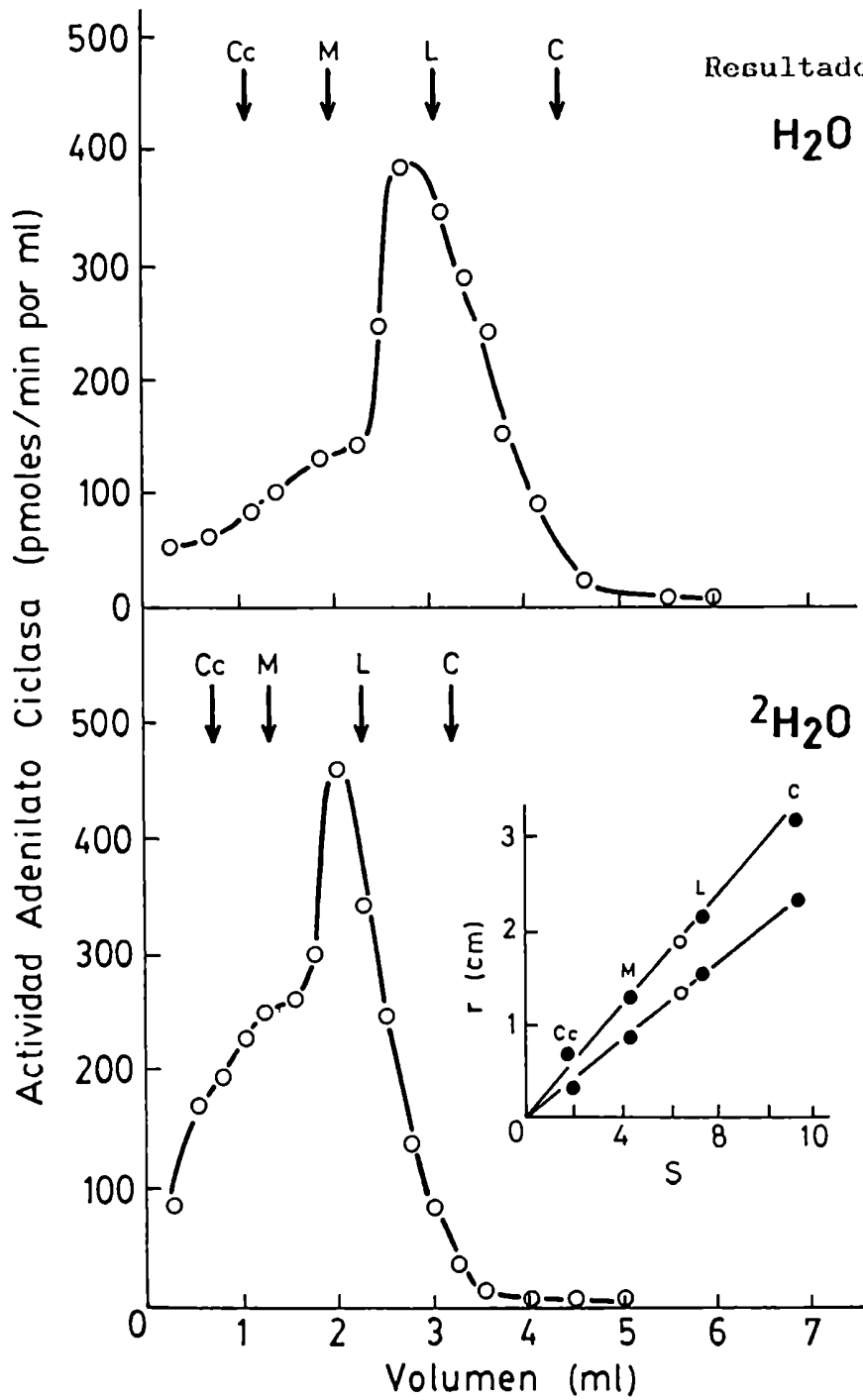


Figura 35. Centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa de una preparación DEAE de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119). Los gradientes fueron hechos en H_2O o en 2H_2O . En el inserto se graficó la movilidad en función de las constantes de sedimentación para las proteínas marcadoras (●) y la adenilato ciclasa. Las abreviaturas utilizadas son iguales a las de la figura anterior.

Este valor es característico de estas proteínas encontradas en fracciones solubles y carentes de sustancias lipídicas asociadas.

Conociendo los valores del radio de Stokes, el coeficiente de sedimentación y el volumen específico parcial de la enzima, es factible estimar su peso molecular relativo utilizando la fórmula planteada en la sección IV.3 de Materiales y Métodos. El valor hallado es de 183400. Además, se calculó un coeficiente friccional de 1,59 para la enzima, usando la fórmula del apartado IV.4 de Materiales y Métodos. La Tabla 9 resume los parámetros moleculares e hidrodinámicos de esta adenilato ciclasa.

Los resultados corresponden a tres experimentos diferentes realizados con distintas preparaciones enzimáticas.

PARAMETRO	VALOR
$S_{20,w}$ (S)	6,4 ± 0,2
a (nm)	6,0 ± 0,2
v (ml/g)	0,74
PM	183400
f/fo	1,59

Tabla 10. Parámetros moleculares e hidrodinámicos de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119). S, coeficiente de sedimentación; a, radio de Stokes; V, volumen específico parcial; f/fo, coeficiente friccional.

Resultados y Discusión

En la tabla 11 se muestran los parámetros hidrodinámicos y moleculares de distintas adenilato ciclasas solubles de distintos organismos.

Se puede comprobar que existe una marcada diferencia entre las ciclasas solubles que se citan en la tabla 11 y la de *Anabaena sp*, exceptuando la de *Rhizobium meliloti* y *Neurospora crassa*, a las cuales se asemeja.

Los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* son similares a las enzimas de eucariotes superiores asociadas a membranas. El hecho de que la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* mostrara una banda correspondiente a 60000 y que la enzima nativa posea un peso molecular de 183400, sugiere que esta enzima sea una proteína oligomérica.

Tejido	Testículo soluble	<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	<i>B. liquefaciens</i>	<i>Rhizobium meliloti</i> (soluble)	<i>N. crassa</i>	<i>Anabaena sp</i>
Referencia	Kornblihtt (14)	Carricarte (23)	Takai (76)	Carricarte (32)	Reig (267)	Bianchini (271)
PM	74000	84000	92400	140000	200000	183400
S _{2,v} (s)	4,3	4,1	4,5	6,3	6,2	6,4
Radio Stokes (nm)	3,9	4,4	4,9	4,8	7,3	6,0
V (ml/g)	0,74	0,74	0,73	0,74	0,74	0,74
f/fo	1,4	1,54	1,6	1,39	1,64	1,59

Tabla 11. Parámetros moleculares e hidrodinámicos de distintas adenilato ciclasas.

El valor obtenido del coeficiente friccional (f/f_0) 1,59 permite decir que esta enzima se aleja de la esfericidad, ya que dicho valor es mayor que la unidad.

IV. PURIFICACION DE UNA PROTEINA SIMILAR A CALMODULINA

IV.1. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa

Por cromatografía en DEAE celulosa del S105, como se describió en la sección VIII.1 de Materiales y Métodos, se obtuvo una fracción que estimula la fosfodiesterasa de cerebro bovino dependiente de Ca^{2+} -calmodulina. El ensayo de su actividad se efectuó en las fracciones de la columna, previamente calentadas a $100^{\circ}C$ durante 10 min sobre la PDE de AMP cíclico de cerebro bovino (ver apartado IX de Materiales y Métodos).

Como se observa en la Figura 36, el factor eluye en un solo pico a alrededor de 0,3 M de NaCl. Las fracciones que presentaron mayor actividad tipo calmodulina se combinaron denominando a éstas preparación DEAE2.

IV.2. Cromatografía de afinidad en columna de Phenyl-sepharosa

La preparación DEAE2 previamente calentada a $100^{\circ}C$, centrifugada y ajustada a 5 mM $CaCl_2$ (Materiales y Métodos, VII.2) fue sembrada en una columna de Phenyl-sepharosa. La Figura 37 muestra el perfil de elución. Como se puede observar, la actividad "calmodulina" eluyó en un solo pico, luego del agregado de EGTA 1 mM. Las fracciones de mayor actividad se dializaron y luego se concentraron por ultrafiltración en Amicon UM-10. Esta preparación así obtenida se utilizó para los estudios de regulación de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119).

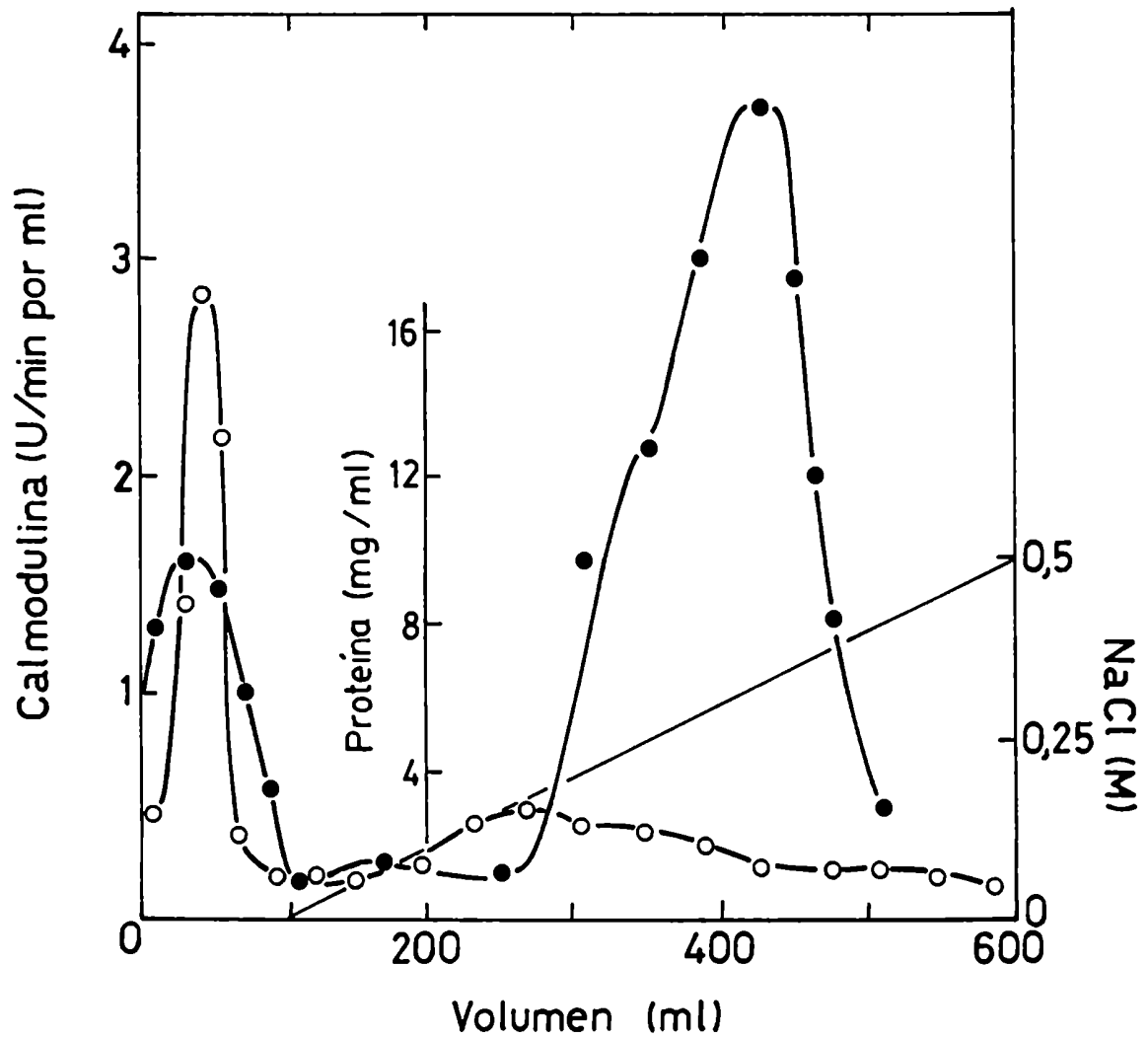


Figura 36. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de un S105 de *Anabaena sp* (PCC 7119). (●), actividad calmodulina (U, 1 unidad se define como el equivalente al incremento de 1 nmol de $5'$ AMP/min); (○), proteína.

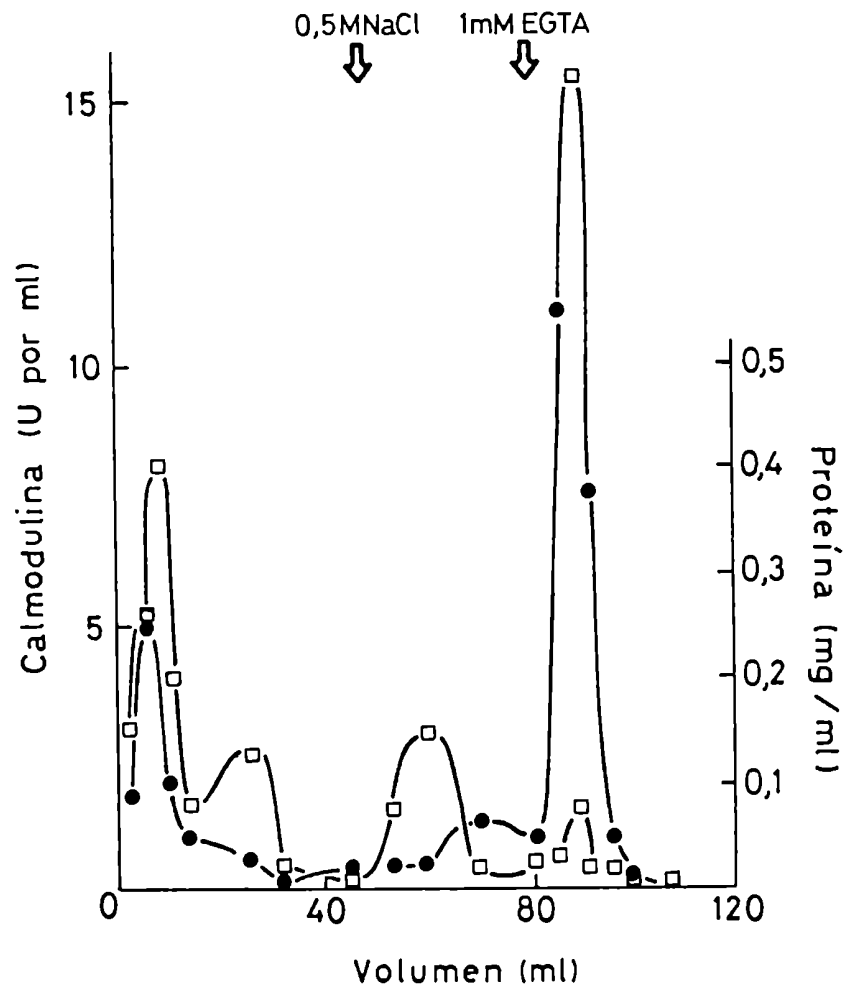


Figura 37. Cromatografía en columna de Phenyl-sepharosa de una preparación DEAE2. (●), actividad calmodulina (U, 1 unidad se define como el equivalente al incremento de 1 nmol de $5'$ AMP/min); (□), Proteína.

De todo lo expuesto, la existencia de una sustancia en *Anabaena sp* con propiedades de calmodulina se apoya en las siguientes evidencias:

- El factor es termoestable y es capaz de activar la fosfodiesterasa de AMP cíclico de cerebro bovino, dependiente de Ca^{2+} -calmodulina.
- La proteína es retenida en una columna de DEAE-celulosa, lo que implica su comportamiento ácido (Figura 36).
- La proteína es retenida por columnas de afinidad de phenyl-sepharosa en presencia de Ca^{2+} y es posible eluirla por el agregado de EGTA (Figura 37).

V. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE ADENILATO CICLASA DE ANABAENA sp (PCC 7119)

V.1. Activación por calmodulina

El primer efecto observado del factor semejante a calmodulina de *Anabaena sp*, fue la activación de la fosfodiesterasa de AMP cíclico de cerebro bovino activable por Ca^{2+} -calmodulina. Esta propiedad se utilizó para seguir la localización del factor durante el proceso de purificación. Con este dato experimental, sumado a los antecedentes existentes en la literatura científica sobre la modulación de algunas adenilato ciclasas por calmodulina, se ensayó el efecto de la calmodulina de cerebro bovino y del factor de *Anabaena sp* (preparación phenyl-sepharosa, sección VIII.2 de Materiales y Métodos) sobre la actividad de la adenila-

to ciclasa de la bacteria medida en presencia de ATPMg^{2+} como sustrato.

En primer término se determinaron las concentraciones óptimas de Ca^{2+} y Mg^{2+} para obtener la mayor activación de la enzima.

En la Figura 38 se puede ver que aún en ausencia de Ca^{2+} hay activación por calmodulina. Esto puede deberse a la existencia de bajas concentraciones de Ca^{2+} en las soluciones buffer empleadas (272).

Además, se observa que al aumentar la concentración de Ca^{2+} , el nivel de activación disminuye. Se efectuaron entonces, curvas de la actividad enzimática variando la concentración de Mg^{2+} y en cada una de ellas se mantuvo fija la concentración de Ca^{2+} en 0, 5, 10, 25 o 50 μM . Estos resultados se observan en la Figura 39, donde en presencia de Ca^{2+} 10 μM se obtiene una activación máxima en presencia de Mg^{2+} 1 mM.

Luego de haber determinado las concentraciones óptimas de Ca^{2+} y Mg^{2+} para la activación de la adenilato ciclasa, se estudió la enzima en función de concentraciones variables de calmodulina de cerebro bovino. Los resultados se muestran en la Figura 40. La activación de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* depende de la concentración de calmodulina, es saturable y la mitad de la estimulación máxima se alcanza con 12 $\mu\text{g/ml}$ del modulador.

Como ya se ha demostrado, la actividad de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* es mucho más elevada con Mn^{2+} -ATP como sustrato y bajo estas condiciones, el agregado de calmodulina de cerebro bovino no modifica la actividad enzimática (Tabla 12).

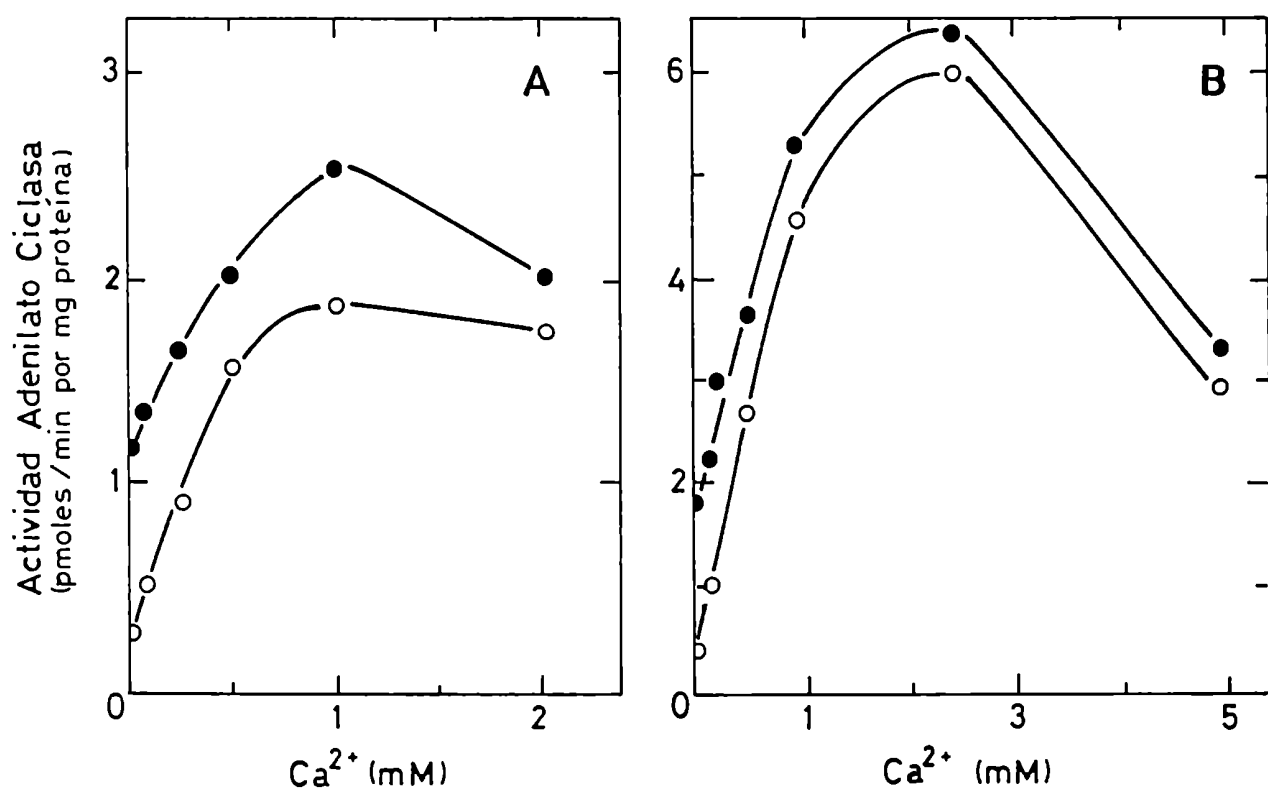


Figura 38. Activación de la actividad de adenilato ciclasa de *Anabaena sp.* (PCC 7119) en presencia de calmodulina de cerebro bovino (50 μ g/ml) ATP 0,5 mM; fracción enzimática, preparación DEAE1 (55 μ g proteína). A, $MgCl_2$ 1,0 mM; B, $MgCl_2$ 2,5 mM; (O), sin calmodulina; (●) con calmodulina.

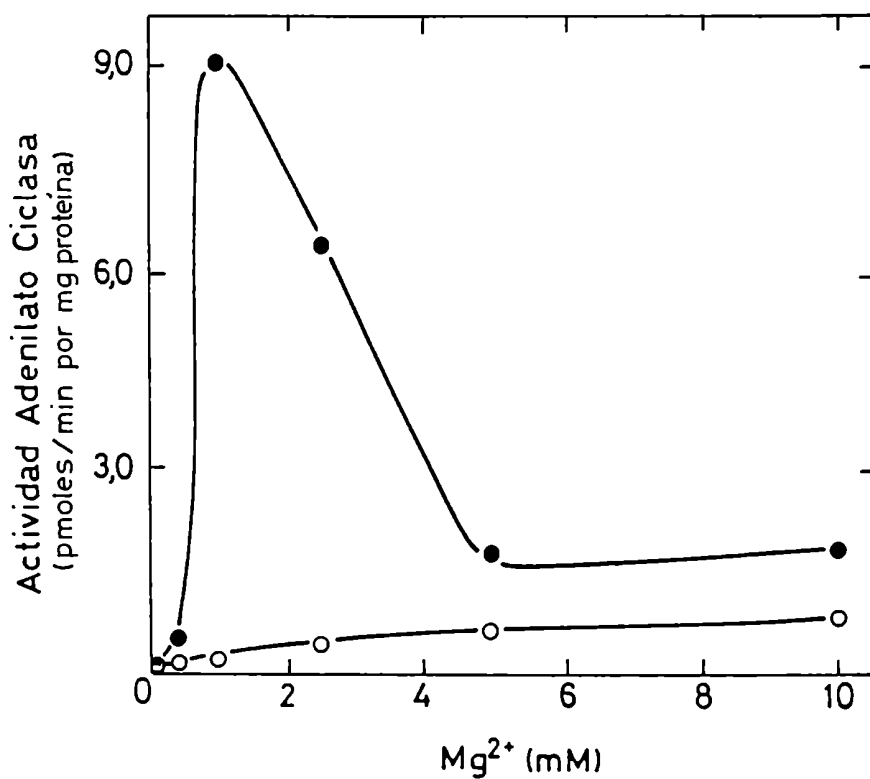


Figura 39. Activación de adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119) por calmodulina de cerebro bovino (50 $\mu\text{g/ml}$). La mezcla de reacción contiene CaCl_2 10 μM . Fracción enzimática, preparación DEAE1 (55 μg proteína); (O) sin calmodulina; (●) con calmodulina.

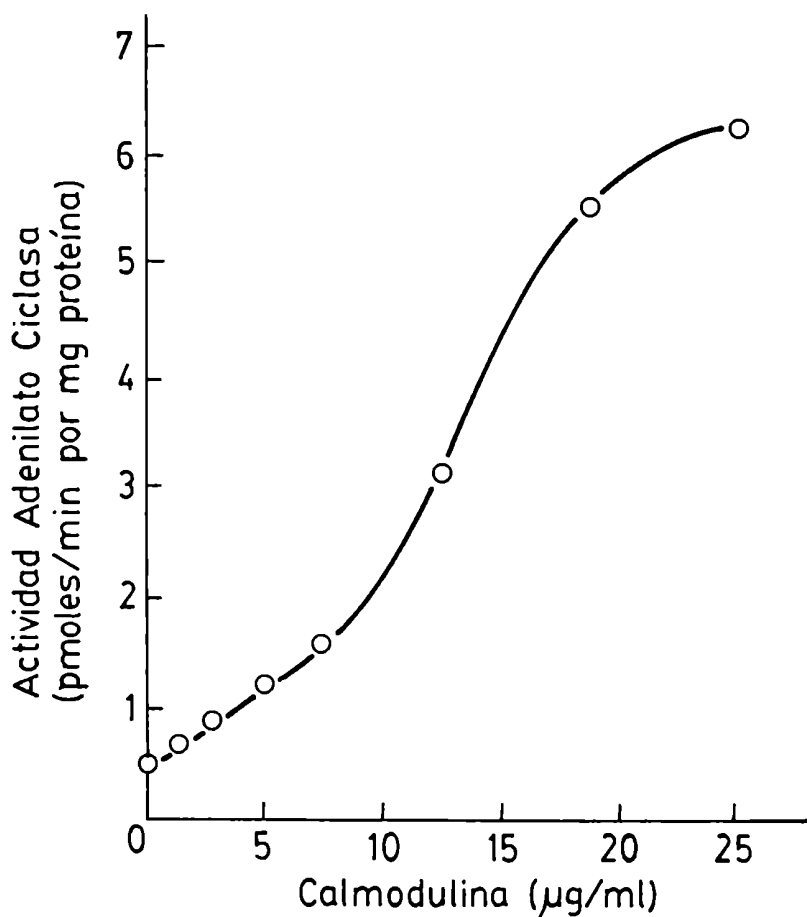


Figura 40. Activación de adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119) por calmodulina de cerebro bovino. La mezcla de incubación contiene CaCl_2 10 μM ; MgCl_2 1 mM, ATP 0,5 mM. La fracción enzimática utilizada fue la preparación DEAE1 (48 μg proteína)

Agregados	Actividad adenilato ciclasa (nmoles/min por mg proteína)
---	133
CaM cerebro bovino	142
CaM hojas espinaca	146

Tabla 12. Actividad de adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119) medidas en presencia de $MnCl_2$ 2,5 mM y ATP 1 mM. La fracción enzimática utilizada fue la preparación DEAE1 (65 μg proteína), 25 $\mu g/ml$ calmodulina de cerebro bovino, 100 $\mu g/ml$ calmodulina espinaca.

Tomando como base el comportamiento de las ciclasas eucarióticas, en presencia de quelantes de Ca^{2+} o de drogas derivadas de la fenotiazina, se debería revertir el efecto de activación que produce la calmodulina sobre la enzima en estudio (7). En las Figuras 41 y 42 se muestran los resultados obtenidos con EGTA, clorpromazina y trifluoperazina sobre la actividad enzimática de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* en condiciones óptimas de activación por calmodulina. Los datos indican que tanto el EGTA como la clorpromazina y la trifluoperazina bloquean la activación de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp*, producida por Ca^{2+} -calmodulina.

Las concentraciones de clorpromazina y trifluoperazina que bloquean el 50 % de la activación máxima fue de 30 μM y 150 μM , respectivamente.

La concentración de clorpromazina necesaria para la inhibición de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* fue similar a la requerida para bloquear la estimulación de la PDE de AMP cíclico de *N. crassa* (270) y tres veces menor que la necesaria para la PDE de *T. cruzi* (252).

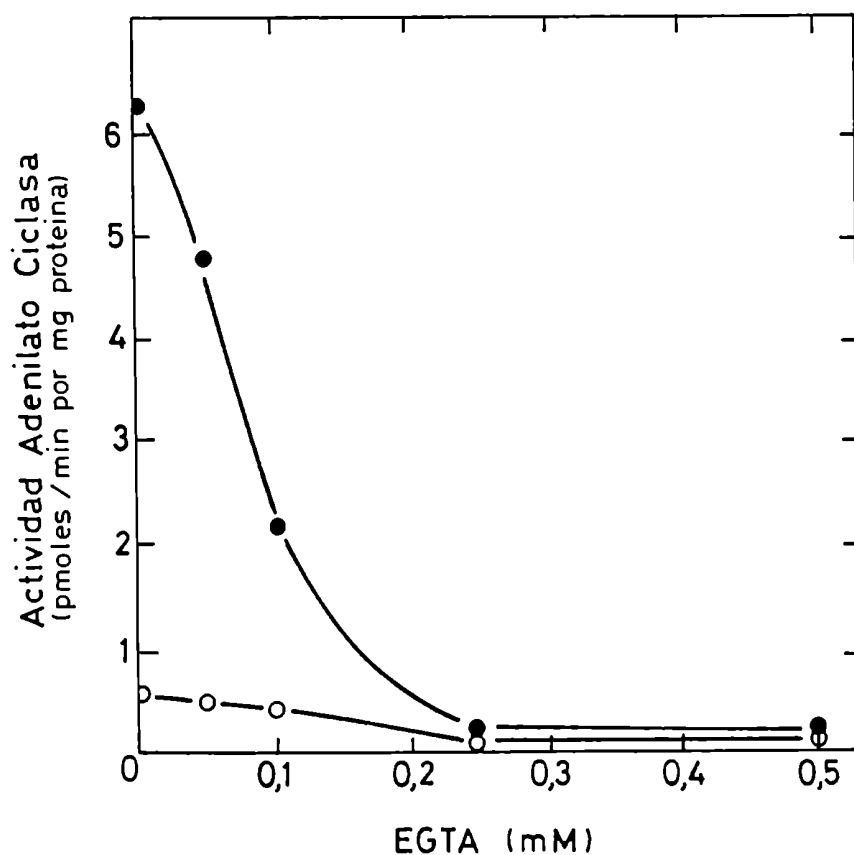


Figura 41. Actividad de adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119) en función de la concentración de EGTA. La fracción enzimática utilizada fue la preparación DEAE1 (48 μg proteína); Mg^{2+} 1 mM; Ca^{2+} 10 μM ; (○), sin calmodulina cerebro bovino; (●), calmodulina cerebro bovino 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

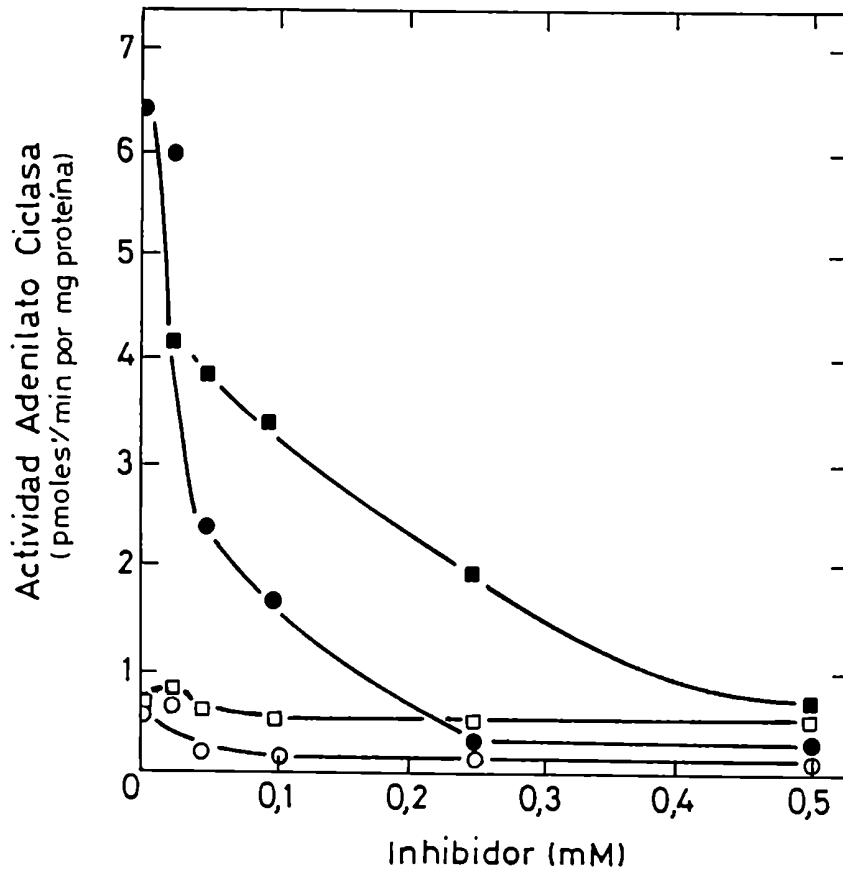


Figura 42. Actividad de la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119) en función de derivados fenotiazínicos. La fracción enzimática utilizada fue la preparación DEAE1 (48 μ g proteína); Mg^{2+} 1 mM; Ca^{2+} 10 μ M; (O), sin calmodulina cerebro bovino, clorpromazina; (□), sin calmodulina cerebro bovino, trifluoperazina; (●), calmodulina cerebro bovino (25 μ g/ml), clorpromazina; (■), calmodulina cerebro bovino (25 μ g/ml), trifluoperazina.

Resultados y Discusión

Los resultados de las Figuras 41 y 42 se resumieron en la Tabla 13.

Agregados	(pmoles/min/mg prot)	Actividad adenilato ciclasa
Ninguno		0,30±0,03
10 µM Ca ²⁺		0,59±0,08
10 µM Ca ²⁺ + 0,25 mM EGTA		0,05±0,01
10 µM Ca ²⁺ + 0,10 mM trifluoperazina		0,20±0,09
10 µM Ca ²⁺ + 0,25 mM clorpromazina		0,30±0,08
10 µM Ca ²⁺ + 25 µg/ml calmodulina cerebro		6,38±0,40
10 µM Ca ²⁺ + 25 µg/ml calmodulina cerebro (SIGMA)		2,21±0,07
10 µM Ca ²⁺ + 100 µg/ml calmodulina espinaca		1.23±0.05
10 µM Ca ²⁺ + 25 µg/ml calmodulina cerebro + 0,25 mM EGTA		0,05±0,01
10 µM Ca ²⁺ + 25 µg/ml calmodulina cerebro + 0,50 mM trifluoperazina		0,41±0,01
10 µM Ca ²⁺ + 25 µg/ml calmodulina cerebro + 0,25 mM clorpromazina		0,30±0,09

Tabla 13. Efectos de calmodulina, EGTA y derivados fenotiazínicos sobre la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119). La fracción enzimática utilizada fue la preparación DEAE1 (48 µg proteína).

Además de la activación producida por calmodulina de cerebro bovino, la actividad enzimática fue estimulada por calmodulina de hojas de espinaca (Tabla 13) y por el factor semejante a calmodulina purificado de *Anabaena sp* (apartado VIII de Materiales y Métodos), Tabla 14. Los resultados muestran que la estimulación de la enzima por el factor de *Anabaena sp* es bloqueada por EGTA y los derivados fenotiazínicos.

Chueng (7) ha señalado ciertos criterios para determinar si una reacción enzimática es regulada por Ca^{2+} -calmodulina.

- 1- El tejido o la célula debe contener una concentración suficiente de calmodulina.
- 2- La eliminación de calmodulina del sistema debe modificar la actividad enzimática y el sistema en estas condiciones debe responder al agregado de calmodulina exógena.
- 3- Los quelantes de Ca^{2+} (EGTA) deben revertir la activación por calmodulina de la enzima.
- 4- En presencia de drogas derivadas de la fenotiazina, la calmodulina es biológicamente inactiva. Estas sustancias inhiben la activación de la enzima, pero no la actividad basal de la misma.
- 5- La acción de la calmodulina debe ser revertida, al menos en teoría, por su anticuerpo. En la práctica, por lo menos para el caso de la fosfodiesterasa, este criterio no es satisfactorio ya que la constante de disociación de la CaM-PDE está en el rango de 10^{-8} a 10^{-9} y la afinidad ag-ab es 10^{-6} , por lo tanto el anticuerpo podría no revertir la acción de la calmodulina.

Agregados	Actividad adenilato ciclasa (pmoles/min/mg prot)
Ninguno	0,16±0,03
10 µM Ca ²⁺	0,30±0,08
10 µM Ca ²⁺ + 0,25 mM EGTA	0,03±0,01
10 µM Ca ²⁺ + 0,25 mM clorpromazina	0,20±0,03
10 µM Ca ²⁺ + 0,5 mM trifluoperazina	0,40±0,07
10 µM Ca ²⁺ + 450 µg/ml "actividad calmodulínica"	2,25±0,07
10 µM Ca ²⁺ + 450 µg/ml "actividad calmodulínica" + 0,25 mM EGTA	0,07±0,01
10 µM Ca ²⁺ + 450 µg/ml "actividad calmodulínica" + 0,25 mM clorpromazina	0,30±0,03
10 µM Ca ²⁺ + 450 µg/ml "actividad calmodulínica" + 0,50 mM trifluoperazina	0,68±0,02

Tabla 14. Efectos de la "actividad calmodulina" de *Anabaena sp*, EGTA9, y derivados fenotiazínicos sobre la adenilato ciclasa de *Anabaena sp* (PCC 7119). La fracción enzimática utilizada fue una preparación DEAE1 (48 µg proteína).

Los resultados presentados indican que la adenilato ciclase de *Anabaena sp* cumple con los requisitos enunciados del 1 al 4, no habiendo sido estudiado el requisito 5, por lo que se puede concluir que la enzima es regulable por Ca^{2+} y calmodulina.

La existencia de proteínas similares a calmodulina, cuyas funciones son aún desconocidas, han sido descritas para *Escherichia coli* (187), *Bacillus subtilis* (190) y *Streptomyces erythraeus* (189). La *Bordetella pertussis* y el *Bacillus anthracis* secretan además una adenilato ciclase que es sensible a calmodulina y que penetra en las células animales (177,178,182), como parte de la acción tóxica de estos bacilos. En el caso de *B. pertussis*, la bacteria no posee calmodulina (148). Por otro lado, utilizando el método de radioinmunoensayo con ^{125}I -calmodulina de testículo, en la cianobacteria *Oscillatoria limnetica* se describió un factor tipo calmodulina (268).

En esta tesis se demuestra la presencia, en *Anabaena sp* (PCC 7119) de un factor semejante a calmodulina. Este sistema "adenilato ciclase-calmodulina" procariota es sorprendentemente similar a los descritos en eucariotas inferiores y superiores (23, 34,40). La calmodulina de cerebro o de espinaca puede reemplazar al modulador bacteriano en la activación de la ciclase de *Anabaena sp* y, a su vez, este modulador puede activar la PDE de cerebro bovino.

Esto significa que *Anabaena sp* es el único caso de organismo procariote donde el factor calmodulínico regula una actividad enzimática de la propia bacteria, en este caso la adenilato ciclase.

Si tomamos en cuenta la teoría endosimbiótica (234) que postula que las ciano y las cloroxibacterias serían los ancestros de los plástidos de las células vegetales y de las algas, y como han demostrado Carricarte *et al* (23) que la adenilato ciclase de *Medicago sativa* (alfalfa) también es regulada por la acción de

Ca²⁺-calmodulina (cerebro y hojas de espinaca), se podría concluir que lo demostrado en este apartado provee el primer antecedente evolutivo donde el Ca²⁺ estaría implicado en los niveles de AMP cíclico.

VI. CONCLUSIONES

La adenilato ciclasa de *Anabaena sp.* (PCC 7119) es una enzima de localización citoplasmática. Responde a $ATPMn^{2+}$ y a $ATPMg^{2+}$ como sustratos. Presenta una modesta activación en presencia de los clásicos reguladores de las ciclasas eucarióticas como GTP, GMPP(NH)P y forskolina.

La enzima se purificó alrededor de 1500 veces. Se determinaron sus parámetros moleculares, cuyos valores son: coeficiente de sedimentación, 6,4 S; radio de Stokes 6,0 nm; volumen específico parcial 0,74 ml/g; Peso Molecular, 183400 y coeficiente friccional, 1,59. Estos parámetros son similares a los encontrados en adenilato ciclasas de eucariotes superiores.

La enzima de *Anabaena sp.* es activada por el complejo Ca^{2+} -calmodulina (cerebro bovina), en presencia de $ATPMg^{2+}$ como sustrato.

En *Anabaena sp.* se ha probado la existencia de un factor con propiedades de calmodulina, que se sustenta en los siguientes datos experimentales: es estable al calor, activa la PDE de AMP cíclico de cerebro bovino, presenta un comportamiento ácido, es retenida en columnas de afinidad de phenyl-sepharosa en presencia de Ca^{2+} y se eluye por el agregado de EGTA.

Esta actividad calmodulina estimula la adenilato ciclasa de la bacteria en presencia de Ca^{2+} y $ATPMg^{2+}$ como sustrato. Esta activación es revertida en presencia de EGTA y derivados fenotiazínicos.

Es importante recalcar que *Anabaena sp.* es el primer organismo procariota cuya adenilato ciclasa es regulable por una actividad calmodulínica endógena.

De esta manera se pueden vincular a las cianobacterias, que datan desde hace más de 2500 millones de años, y los eucariotes superiores, en especial las plantas (500 millones de años), respecto de la activación con calmodulina.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Sutherland, E.W. y Rall, T.W. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3608.
- 2 Rall, T.W. y Sutherland, E.W. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 1065-1076.
- 3 Cook, W.H.; Lipkin, D. y Markham, R. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3607-1308.
- 4 Lipkin, D.; Cook, W. y Markham, R. (1959) *J. Am. Chem. Soc.* 81, 6198-6203.
- 5 Rall, T.W.; Sutherland, E.W. y Berthet, J. (1957) *J. Biol. Chem.* 224, 463-475.
- 6 Robinson, G.A.; Butcher, R.W. y Sutherland, E.W. (1968) *Ann. Rev. Biochem.* 37, 149-174.
- 7 Chueng, W.Y. (1980) *Science* 207, 19-27.
- 8 Gustin, M.C. y Nelson, D.L. (1987) *Biochem. J.* 246, 337-345.
- 9 Pastan, I. y Adhya, S. (1976) *Bacteriol. Rev.* 40, 527-551.
- 10 Pastan, I. y Perlman, R.I. (1970) *Science* 169, 339-344.
- 11 Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6873-6879.
- 12 Cantore, M.L.; Galvagno, M.A. y Passeron, S. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 199, 312-320.

- 13 Londesborough, J.C. y Nurminen, T. (1972) *Acta Chem. Scand.* **26**, 3396-3398.
- 14 Kornblihtt, A.R.; Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1981) *Biochem.* **20**, 1262-1267.
- 15 Ross, E.M. y Gilman, A.G. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 533-564.
- 16 Torres, H.N. (1980) *Endocrinología Molecular*, Ed.El Ateneo, Buenos Aires, cap. 7, pp. 75.
- 17 Hirata, M. y Hayaishi, O. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21**, 361-365.
- 18 Ide, M. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 42-46.
- 19 Tao, M. y Lipman, F. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **63**, 86-92.
- 20 Ide, M. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **144**, 262-268.
- 21 Chlapowski, F.J. y Büttcher, R.W. (1973) *Biochem. Biophys. Acta* **309**, 138.
- 22 Torruella, M.; Flawiá, M.M.; Eisenschlos, C.; Molina y Vedia, L.; Rubinstein, C.P. y Torres, H.N. (1986) *Biochem. J.* **234**, 145-150.
- 23 Carricarte, V.C.; Bianchini, G.M.; Muschietti, J.P.; Téllez-Iñón, M.T.; Peticari, A. y Torres, H.N. (1988) *Biochem. J.* **249**, 807-811.
- 24 Jost, J.P. y Rickenberg, H.V. (1971) *Ann. Rev. Biochem.* **40**, 741-771.

- 25 Bar, H.P. y Hetcher, O. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63, 350.
- 26 Davoren, P.R. y Sutherland, E.W. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 3016.
- 27 Ravinowitz, M.; Desalles, L.; Meisler, J. y Lorand, J. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 97,29.
- 28 De Robertis, E.; Rodriguez de Lores, A., Alberici, M.; Butcher, R.W. y Sutherland, E.W. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 3487.
- 29 Chase, L.R. y Aubarch, G.D. (1968) *Science* 159, 545.
- 30 Pohl, S.L.; Birnbaumer, L. y Rodbell, M. (1969) *Science* 164, 566.
- 31 Yang, J.K. y Epstein, W. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 3750-3758.
- 32 Khandelwal, R.L. y Hamilton, I.R. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 3297-3304.
- 33 Hewlett, E.L. y Wolff, J. (1976) *J. Bacteriol.* 127, 890-898.
- 34 Reig Macia, J.A.; Téllez-Iñón, M.T.; Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1984) *Biochem. J.* 221, 541-543.
- 35 Hirata, M. y Hayaishi, O. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 1-11.
- 36 Takai, K.; Kurashima, V.; Suzuki-Hori, C.; Okamoto, H. y Hayaishi, O. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 1965-1972.

- 37 Janssens, P.M.W. y Van Haastert, P.J.M. (1987) *Microbiol. Rev.* 51, 396-413.
- 38 Lopes-Gomes, S. y Da Costa Maia, J.C. (1979) *Biochem. Biophys. Acta* 567, 257-264.
- 39 Cantore, M.L. y Passeron, S. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 219, 1-11.
- 40 Kassis, S. y Kindler, S.H. (1975) *Biochem. Biophys. Acta* 391, 513.
- 41 Lefkowitz, R.J.; Stadel, J.M. y Caron, M.G. (1983) *Ann. Rev. Biochem.* 52, 159-186.
- 42 Gilman, A.G. (1984) *Ce ll* 36, 577-579.
- 43 Limbird, L.E. (1988) *FASEB J.* 2, 2686-2695.
- 44 Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1973) *FEBS Lett.* 30, 74.
- 45 Wessling-Resnick, M.; Kelleher, D.J.; Weiss, E.R. y Johnson, G.L. (1987) *TIBS* 12, 473-477.
- 46 Stiles, G.L.; Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1984) *Physiol. Rev.* 64, 661-743.
- 47 Klein, W. (1984) *Curr. Top. Cell. Reg.* 24, 129-144.
- 48 Shorr, R.G.L.; Heald, S.L.; Jeffs, P.W.; Lavin, T.N.; Strosacker, M.W. *et al.* (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 79, 2778-2782.
- 49 Shorr, R.G.L.; Lefkowitz, R.J. y Caron, M. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5820-5826.

- 50 Shorr, R.G.L.; Strohsacker, M.W.; Lavin, T.N.; Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 12341-12350.
- 51 Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. (1987) *Recent. Prog. Horm. Res.* **43**, 469-497.
- 52 Sibley, D.R.; Benovic, J.L.; Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1987) *Cell* **48**, 913-922.
- 53 Dixon, R.A.F.; Kobilka, B.K.; Strader, D.J.; Benovic, J. L.; Dohlman, H.G.; Frielle, T.; Balanowski, M.A.; Bennet, C.D.; Rands, E.; Diehl, R.E. *et al.* (1986) *Nature* **321**, 75-79.
- 54 Kobilka, B.K.; Dixon, R.A.F.; Frielli, T.; Dohlman, H.G.; Bolanoswski, M.A.; Sigal, I.S.; Yang-Feng, T.L.; Francke, U.; Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 46-50.
- 55 Kobilka, B.K.; Frielle, T.; Dohlman, H.G.; Bolanowski, M. A.; Dixon, R.A.F.; Keller, P.; Caron, M.G. y Lefkowitz, R. J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 7321-7327.
- 56 Frielle, T.; Collins, S.; Daniel, K.; Caron, M.G.; Lefkowitz, R.J. y Kobilka, B.K. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7920-7924.
- 57 Kobilka, B.K.; Matsui, H.; Kobilka, T.S.; Yang-Feng, T.L.; Francke, U.; Caron, M.G.; Lefkowitz, R.J. y Regan, J.W. (1987) *Science* **238**, 650-656.

- 58 Yarden, Y.; Rodriguez, H.; Wong, S.K.F.; Brandt, D.R.; May, D.C.; Burnier, J.; Harkins, R.N.; Chen, E.Y.; Ramachandran, J.; Ullrich, A. y Ross, E.M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 6795-6799.
- 59 Stryer, L. (1986) *Ann. Rev. Neurosci.* 9, 87-119.
- 60 Lancet, D. y Pace, U. (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 63-66.
- 61 Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 4993-4996.
- 62 Seamon, K. y Daly, J.W. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 9799-9801.
- 63 Pfeuffer, T. y Metzger, H. (1982) *FEBS Lett.* 146, 369-375.
- 64 Smigel, M.D. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 1976-1986.
- 65 Rodbell, M.; Birnbaumer, L.; Pohl, S.L. y Kraus, H.M.J. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1877-1882.
- 66 Northup, J.K.; Sternweis, P.C.; Smigel, M.D.; Schleifer, L. S.; Ross, E.M. y Gilman, A.G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 6516-6520.
- 67 Gill, D.M. y Meren, R. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 3050-3054.
- 68 Cassel, D. y Pfeuffer, T. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 2669-2673.
- 69 Moss, J. y Vaughan, M. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2455-2457.

- 70 Katada, T. y Ui, M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 7210-7216.
- 71 Katada, T. y Ui, M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 3129-3133.
- 72 Scharamm, M. y Selinger, Z. (1984) *Science* **225**, 1350-13566.
- 73 Berridge, M.J. (1984) *Biochem. J.* **220**, 345-360.
- 74 Gilman, A.G. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 615-649.
- 75 Enna, S.J. y Karbon, E.W. (1987) *TIPS* **8**, 21-24.
- 76 Sternweis, P.C.; Northup, J.K.; Smigel, M.D. y Gilman, A.G. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 11517-11526.
- 77 Harris, B.A.; Robishaw, J.D.; Risinger, R. y Birnbaumer, L. (1985) *Science* **229**, 1274-1277.
- 78 Robishaw, J.D.; Russell, D.W.; Harris, B.A.; Smigel, M.D. y Gilman, A.G. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 1251-1255.
- 79 Itoh, H.; Kozasa, T.; Nagata, S.; Nakamura, S.; Katada, T.; Ui, M.; Iwai, S.; Ohtsuka, E.; Kawasaki, H.; Suzuki, K. y Kaziro, Y. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 3776-3780.
- 80 Pfeuffer, J. (1987) *J. Biol. Chem.* **252**, 7224-7234.
- 81 May, D.C.; Ross, E.M.; Gilman, A.G. y Smigel, M.D. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 15829-15833.

- 82 Kozasa, T.; Itoh, H.; Tsukamoto, T.; y Kaziro, Y. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 2081-2085.
- 83 Bray, P.; Carter, A.; Smions, C.; Guo, V.; Puckett, C.; Kamholz, J.; Spiegel, A. y Nirember, M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 8893-8897.
- 84 Bokoch, G.M.; Katada, T.; Northup, J.K.; Hewlett, E.L. y Gilman, A.G. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2072-2075.
- 85 Bokoch, G.M.; Katada, T.; Northup, J.K.; Ui, M. y Gilman, A.G. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3560-3567.
- 86 Codina, J.; Hildebrandt, J.; Iyengar, R.; Birnbaumer, L.; Sekura, R.D. y Manclark, C.R. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 4276-4280.
- 87 Codina, J.; Hildebrandt, J.D.; Sekura, R.D.; Birnbaumer, M.; Bryan, J. *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 5871-5886.
- 88 Marning, D.R. y Gilman, A.G. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 7059-7063.
- 89 Katada, T.; Northup, J.K.; Bokoch, G.M.; Ui, M. y Gilman, A.G. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3578-3585.
- 90 Katada, T.; Bokoch, G.M.; Smigel, M.D.; Ui, M. y Gilman, A. G. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3586-3595.
- 91 Sternweis, P.C. y Robishaw, J.D. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 13806-13813.
- 92 Neuer, E.J.; Lok, J.M. y Wolf, L.G. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 14222-14229.

- 93 Katada, T.; Oinuma, M.; Ui, M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 3182-3191.
- 94 Nukada, T.; Tanabe, T.; Takahashi, H.; Noda, M.; Haga, K. *et al.* (1986) *FEBS Lett.* 197, 305-310.
- 95 Bray, P.; Carter, A.; Guo, V.; Puckett, C.; Kamholz, J.; Spiegel, A. y Nirenberg, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5115-5119.
- 96 Masters, S.B.; Sullivan, K.A.; Miller, R.T.; Beiderman, B.; López, N.G.; Ramachaudrau, J. y Bourne, H.R. (1988) *Science* 241, 448-451.
- 97 Khun, H. (1980) *Nature* 283, 587-589.
- 98 Evans, T.; Brown, M.L.; Fraser, E.D. y Northup, J.K. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 7052-7059.
- 99 Waldo, G.L.; Evans, T.; Fraser, E.D.; Northup, J.K.; Martin, M.W. y Harden, T.K. (1987) *Biochem. J.* 246, 431-439.
- 100 Levitzki, A. (1988) *TIBS* 13, 298-301.
- 101 Hildebrant, J.D.; Codina, J.; Rosenthal, W.; Birnbaumer, L.; Neer, E.J.; Yanazaki, A. y Bitensky, M.W. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14867-14872.
- 102 Gierschik, P.; Codina, J.; Simons, C.; Birnbaumer, L. y Spiegel, A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 727-731.

- 103 Sugimoto, K.; Nukada, T.; Tanake, T.; Takahashi, H.; Noda, M.; Minamino, N.; Kangawa, K.; Matsuo, K.; Hirose, H.; Inayama, S. y Numa, S. (1985) *FEBS Lett.* **191**, 235-240.
- 104 Fiong, H.K.W.; Hurley, J.B.; Hopkins, R.S.; Miake-Lye, R.; Johnson, M.S.; Doolittle, R.F. y Simon, M.I. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 2162-2166.
- 105 Codina, J.; Stengel, D.; Wood, S.L.C. y Birnbaumer, L. (1986) *FEBS Lett.* **207**, 187-190.
- 106 Amatruda III, T.T.; Gautam, N.; Fong, H.K.W.; Northup, J.K. y Simon, M.I. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5008-5011.
- 107 Hildebrandt, J.D.; Codina, J.; Risinger, R. y Birnbaumer, L. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 2039-2042.
- 108 Hurley, J.B.; Fong, H.K.W.; Teplow, D.B.; Dryer, W.J. y Simon, M.I. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 6948-6952.
- 109 Yatsunami, K.; Pandya, B.V.; Ofrian, D.D. y Khorana, H.G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 1936-1940.
- 110 Ovchinnikov, Y.A.; Lipkin, V.M.; Shuvaeva, T.M.; Bagachuk, A.P. y Shemyakin, V.V. (1985) *FEBS Lett.* **179**, 107-110.
- 111 Rodbell, M. y Conaliffe, P. (1970) "The role of adenyl cyclase and cyclic AMP in biological systems". J.E. Fogarty. International Center Proceeding N° 4, p. 59. Ed. T.W. Rall.
- 112 Spiegel, A.M.; Brown, E.; Fedak, S.A.; Woodard, C.J. y Aurbach, G.D. (1976) *J. Cyclic Nucleotide Res.* **2**, 47.

- 113 Bennet, V. y Cuatrecasas, P. (1976) *J. Membr. Biol.* 27, 207.
- 114 Cassel, D. y Selinger, Z. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 74, 3307-3311.
- 115 Ross, E.M. y Gilman, A.G. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 74, 3715-3719.
- 116 Ross, E.M. y Gilman, A.G. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6966-6969.
- 117 Ross, E.M.; Howlett, A.C.; Ferguson, K.M. y Gilman, A.G. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 6401-6412.
- 118 Smigel, M. y col. (1984) *Adv. Cyclic Nucl. Prot. Phosphoryl. Res.* 17, 1-18.
- 119 Yatani, A.; Codina, J.; Imoto, Y.; Reeves, J.P.; Birnbaumer, L. y Brown, A.M. (1987) *Science* 238, 1288-1291.
- 120 Katada, T.; Oinuma, M. y Ui, M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 5215-5221.
- 121 Katada, T.; Oinuma, M.; Kusakebe, K. y Ui, M. (1987) *FEBS Lett.* 213, 353-358.
- 122 Kanaho, Y.; Tsai, S.; Adamik, R.; Hewlett, E.L.; Moss, J. y Vaughan, M. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 7378-7381.
- 123 Asano, T.; Ogasawara, N.; Kitajina, S. y Saou, M. (1986) *FEBS Lett.* 203, 135-138.
- 124 Codina, J.; Yatani, A.; Grenet, D.; Brown, A.M. y Birnbaumer, L. (1987) *Science* 236, 442-445.

- 125 Logothetis, D.E.; Kim, D.H.; Northup, J.; Neer, E.J. y Clapham, D.E. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (en prensa).
- 126 Tsai, S.C.; Adanik, R.; Kanako, Y.; Halpern, J.L. y Moss, J. (1987) *Biochem.* 26, 4728-4733.
- 127 Florio, V.A. y Sterneveis, P.C. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 3477-3483.
- 128 Jelsema, C.L. y Axelrod, J. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 3623-3627.
- 129 Northup, J.K.; Smigel, M.D.; Sternweis, P.C. y Gilman, A.G. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11369-11372.
- 130 Hescheler, J.; Rosenthal, W.; Trautwein, W. y Schultz, G. (1987) *Nature* 356, 445-447.
- 131 Cerione, R.A. *et al.* (1987) *Biochem.* 26, 1485-1491.
- 132 Katada, T.; Kusakabe, K.; Oinuma, M. y Ui, M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 11897-11900.
- 133 Paveto, C.; Epstein, A. y Passeron, S. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 169, 449-457.
- 134 Lovett, J.S. (1975) *Bacteriol. Rev.* 39, 345.
- 135 Gomes, S.L.; Mennucci, L. y Da Costa Maia, J.C. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 541, 190-198.
- 136 Vale, V.L.; Gomes, S.L.; Da Costa Maia, J.C. y Mennucci, L. (1976) *FEBS Lett.* 67, 182-190.

- 137 Gomes, S.L.; Mennucci, L. y Da Costa Maia, J.C. (1980) *Cell. Differ.* 9, 169.
- 138 Loomis, W.F. (1972) *Nature New Biol.* 240, 6-9.
- 139 Koniju, T.M.; Vander Meene, J.G.C.; Bonner, J.T. y Barkley, D.S. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58, 1152-1154.
- 140 Klein, C.; Brachet, P. y Darmon, M. (1977) *FEBS Lett.* 76, 145-147.
- 141 Kung, C. y Saimi, Y. (1982) *Ann. Rev. Physiol.* 44, 519-534.
- 142 Naitoh, Y. y Kaneko, H. (1973) *J. Exp. Biol.* 58, 657-676.
- 143 Hennessey, T.; Machemer, H. y Nelson, D.L. (1985) *Eur. J. Cell Biol.* 36, 153-156.
- 144 Schultz, J.E.; Uhl, D.G. y Klumff, S. (1987) *Biochem. J.* 246, 187-192.
- 145 Lipman, D.J. y Pearson, W.R. (1985) *Science* 227, 1435-1441.
- 146 Willumsen, B.M.; Norris, K.; Papageorge, A.; Hubbert, N.L. y Lowy, D.R. (1984) *EMBO J.* 3, 2581-2588.
- 147 Brock, D.; Sami, N.; Fasano, O.; Fujiyama, A.; Tamanoi, F.; Northup, J. y Wigler, M. (1985) *Cell* 41, 763-769.
- 148 Casperson, G.F.; Walker, N. y Bourne, H. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 5060-5063.
- 149 Kataoka, T.; Broek, D. y Wigler, M. (1985) *Cell* 43, 493-505.

- 150 Matsumoto, K.; Uno, I. y Ishikawa, T. (1983) *Cell* 32, 417-423.
- 151 Matsumoto, K.; Uno, I. y Ishakawa, T. (1983) *Exp. Cell. Res.* 146, 151-161.
- 152 Scott, W.D. y Solomon, B. (1975) *J. Bacteriol.* 122, 454-463.
- 153 Scott, W.D. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2995-2999.
- 154 Terenzi, H.F.; Flawiá, M.M.; Téllez-Iñón, M.T. y Torres, H. N. (1976) *J. Bacterio.* 126, 91-99.
- 155 Terenzi, H.F.; Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 990-996.
- 156 Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6880-6883.
- 157 Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1972) *Biochem. Biophys. Acta* 289, 428-432.
- 158 Eisenchlos, C.D.; Paladini, A.A.; Molina y Vedia, L.; Torres, H.N. y Flawiá, M.M. (1986) *Biochem. J.* 237, 913-917.
- 159 Flawiá, M.m.; Kornblihtt, A.R.; Reig, J.A.; Torruella, M. y Torres, H.N. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 8255-8259.
- 160 Rosenberg, G.B. y Pall, M.L. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 221, 254-260.

- 161 Eisenschlos, C.; Flawiá, M.M.; Torruella, M. y Torres, H.N. (1986) *Biochem. J.* 236, 185-191.
- 162 Halliday, K.R.; (193-1984) *J. Cyclic Protein Phosphorylation Res.* 9, 435-448.
- 163 Aiba, H.; Mori, K.; Tanaka, M.; Ooi, T.; Roy, A. y Danchin, A. (1984) *NAR* 12, 9427-9440.
- 164 Ullmann, A. y Danchin, A. (1983) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 15, 1-53.
- 165 Matin, A. y Matin, M.K. (1982) *J. of Bacteriol.* 149, 801-807.
- 166 Alper, M.D. y Ames, B.N. (1975) *J. Bacteriol.* 144, 205-209.
- 167 Roy, A.; Glaser, P. y Danchin, A. (1988) *J. of Gen. Microbiol.* 134, 359-367.
- 168 Postma, P.W. y Lengeler, J.W. (1985) *Microbiol. Rev.* 49, 232-269.
- 169 Peterkofsky, A. (1981) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 14, 215-228.
- 170 Daniel, J.; Joseph, E. y Danchin, A. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 193, 467-472.
- 171 Danchin, A.; Dondon, L. y Daniel, J. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 193, 473-478.
- 172 Ditta, G.; Stanfield, S.; Corbin, D. y Helinski, D.R. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 7347-7351.

- 173 Kiely, B. y O'Gara, F. (1983) *Mol. Gen. Genet.* 192, 230-234.
- 174 Wang, J.Y.J.; Clegg, D.O. y Koshland Jr., D.E. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4684-4688.
- 175 Morse, S.I. (1976) *Adv. Appl. Microbiol.* 21, 9-26.
- 176 Wolff, J. y Cook, G.H. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 350-355.
- 177 Hewlett, E. y Wolff, J. (1976) *J. of Bacteriol.* 127, 890-898.
- 178 Wolff, J.; Cook, G.H.; Goldhammer, A.R. y Berkowitz, S.A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 3840-3844.
- 179 Hewlett, E.L.; Urban, M.A.; Manclark, C.R. y Wolff, J. (1976) *Biochem.* 73, 1926-1930.
- 180 Masure, H.R.; Shattuck, R.L. y Storm, D.R. (1987) *Microbiol. Rev.* 51, 60-65.
- 181 Leppla, S.H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 3162-3166.
- 182 Leppla, S.H. (1984) *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 17, 189-198.
- 183 Mock, M.; Labruyère, E.; Glaser, P.; Dauchim, A. y Ullmann, A. (1988) *Gene* 64, 277-284.
- 184 Chueng, W.Y. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 533-538.

- 185 Kakiuchi, S. y Yamasaki, R. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1104-1110.
- 186 Teo, T.S. y Wang, J.H. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 5950-5955.
- 187 Juvasa, Y.; Jonemitsu, K.; Matsui, K.; Fukunaga, K. y Miyamoto, E. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98, 656-660.
- 188 Leadly, P.F.; Roberts, G. y Walker, J.E. (1984) *FEBS Lett.* 178, 157-160.
- 189 Swan, D.G.; Hale, R.S.; Dhillon, N. y Leadly, P.F. (1987) *Nature* 329, 84-85.
- 190 Fray, I.J.; Villa, L.; Kuehn, G.D. y Hageman, J.H. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134, 212-217.
- 191 Piasecik, M.T.; Wisler, P.L.; Johnson, C.L. y Potter, J.D. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4176-4181.
- 192 Panchenko, M.P. y Tkachuk, V.A. (1984) *FEBS Lett.* 174, 50-53.
- 193 Piasecik, M.T.; Babich, M. y Rush, M.E. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 10913-10918.
- 194 Resnik, T.J.; Stucki, S.; Grigorian, G.Y.; Zschauer, A. y Buhler, F.R. (1986) *Eur. J. Biochem.* 154, 451-456.
- 195 Stanier, R.Y.; Kunisawa, R.; Mandel, M. y Cohen-Bazire, G. (1971) *Bacteriol. Rev.* 35, 171-205.

- 196 Lom, N.W. y Glick, B.R. (1985) *Biotech. Adv.* 3, 195-208.
- 197 Stewart, W.D.P. (1980) *Ann. Rev. Microbiol.* 34, 497-536.
- 198 Metting, B. y Pyne, J.W. (1986) *Enzyme Microb. Technol.* 8, 386-394.
- 199 Curtin, M.E. (1985) *Biotechnology* 3, 34-37.
- 200 Benemann, J.R.; Tillett, D.M. y Weissman, J.C. (1987) *TIB-TECH* 5, 47-53.
- 201 Rippka, R.; Derueller, J.; Waterbury, J.B.; Herdman, M. y Stanier, R.Y. (1979) *J. of Gen. Microbiol.* 111, 1-61.
- 202 Adolph, K.W. y Haselkorn, R. (1971) *Virology* 46, 200-208.
- 203 Allen, M.M. (1968) *J. Bacteriol.* 96, 842-852.
- 204 Weckesser, J.; Katz, A.; Drews, G.; Mayer, H. y Fromme, I. (1974) *J. of Bacteriol* 120, 672-678.
- 205 Doolittle, W.F. (1979) *Adv. Microbiol. Physiol.* 20, 1-102.
- 206 Stanier, R.Y. y Cohen-Bazire, G.C. (1977) *Ann. Rev. Microbiol.* 31, 225-274.
- 207 Tandeau de Marsac, N. y Cohen-Bazire, G. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 1635-1639.
- 208 Allen, M.M. (1984) *Ann. Rev. Microbiol.* 38, 1-25.
- 209 Gibson, J. (1984) *Ann. Rev. Microbiol.* 38, 138-159.
- 210 Codd, G.A. y Mardsen, E.M. (1984) *Biol. Rev.* 59, 389-422.

- 211 Cuao, L. y Bowen, C.C. (1971) *J. Bacteriol.* 105, 331-338.
- 212 Simon, R.D. y Weathers, P. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 420, 165-176.
- 213 Walsky, H.E. (1975) *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 26, 427-439.
- 214 Haselkorn, R. (1978) *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 29, 319-344.
- 215 Wilcox, M.; Mitchison, G.J. y Smith, R.J. (1973) *J. Cell Sci.* 13, 637-649.
- 216 Winhenbach, F.; Wolk, C.P. y Jost, M. (1972) *Planta* 107, 69-80.
- 217 Lambein, F. y Wolk, C.P. (1973) *Biochem.* 12, 791-798.
- 218 Wilcox, M.; Mitchison, G.J. y Smith, R.J. (1975) *Arch. Microbiol.* 103, 219-223.
- 219 Mitchison, G.J. y Wilcox, M. (1973) *Nature New. Biol.* 246, 229-233.
- 220 Cheihsiang, C.; Van Baalen, C. y Tabita, F.R. (1987) *J. Bacteriol.* 169, 1114-1119.
- 221 Neilson, A.; Rippka, R. y Kunisawa, R. (1971) *Arch. Microbiol.* 76, 139-150.
- 222 Wood, N.B. y Haselkorn, R. (1977) *Fed. Proc.* 36, 886.
- 223 Wolk, C.P. (1968) *J. Bacteriol.* 96, 2138-2143.
- 224 Fleming, H. y Haselkorn, R. (1974) *Cell* 3, 159-170.

- 225 Wolk, C.P.; Thomas, J.; Shaffer, P.W.; Austin, S.M. y Galonsky, A. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 5027-5034.
- 226 Padan, E. (1979) *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 30, 27-40.
- 227 Waterbury, T.B. y Stanier, R.Y. (1977) *Bacteriol. Rev.*
- 228 Pelroy, R.A. y Bassham, J.A. (1972) *Arch. Microbiol.* 86, 25-38.
- 229 Smith, A.J.; London, J. y Stanier, R.Y. (1967) *J. Bacteriol.* 94, 972-983.
- 230 Pearce, J. y Carr, N.G. (1969) *J. Gen. Microbiol.* 55, 371-378.
- 231 Jurnak, F. (1985) *Science* 230, 32-36.
- 232 Tabita, F.R. (1988) *Microbiol. Rev.* 52, 155-189.
- 233 Linko, P.; Holm-Hansen, O.; Bassham, J.A. y Calvin, M. (1957) *J. Exp. Bot.* 8, 147-156.
- 234 Margulis, L. (1981) *Symbiosis in Cell Evolution*. Ed. W.H. Freeman & Co.
- 235 Allen, M.B. y Arnon, D.I. (1955) *Plant Physiol.* 81, 366-372.
- 236 *Progress in Photosynthesis Research 1987*. Martinus Nijhoff Publishers. Vol. II, 649-652.
- 237 Clark, S. (1976) *J. Biol. Chem.* 250, 5459-5469.
- 238 Meunier, J.C.; Olsen, R.W. y Chaugeaux, J.P. (1972) *FEBS Lett* 24, 63-68.

- 239 Edelstein, S.J. y Schachman, H.K. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 306-311.
- 240 Martin, R.G. y Ames, B.N. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1372-1379.
- 241 Siegel, L.M. y Monty, K.J. (1966) *Biochem. Biophys. Acta* 112, 346-362.
- 242 Haga, T.; Haga, K. y Gilman, A.G. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5776-5782.
- 243 Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685.
- 244 Weber, K. y Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- 245 Manrow, R.E. y Dottin, R.P. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 730-734.
- 246 Rodbell, M. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 5744-5750.
- 247 Salomon, Y.; Londos, C. y Rodbell, M. (1974) *Anal. Biochem.* 58, 541-548.
- 248 Bray, C. (1960) *Anal. Biochem.* 1, 279-285.
- 249 Goding, J.W. (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice.* Academic Press, Inc., London.
- 250 Bazari, W.L. y Clarke, M. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 3598-3603.
- 251 Gapalakrishna, R. y Anderson, W.B. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 830-836.

- 252 Téllez-Iñón, M.T.; Ulloa, R.M.; Torruella, M. y Torres, H. N. (1985) *Mol. Biochem. Parasitology* 17, 143-153.
- 253 Thompson, W.J. y Appleman, M.M. (1971) *Biochem.* 10, 311-316.
- 254 Londesborough, J. (1976) *Anal. Biochem.* 71, 623-628.
- 255 Téllez-Iñón, M.T.; Glikin, G.C. y Torres, H.N. (1982) *Biochem. J.* 203, 611-616.
- 256 Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.j.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 257 Worthington Enzyme Manual (1972). Worthington Biochemical Corporation, pp. 7-12, Free-hold.
- 258 Terenzi, H.F.; Roselino, E. y Passeron, S. (1971) *Eur. J. Biochem.* 18, 342-350.
- 259 Lokau, W.; Massalsky, B. y Dirmeier, A. (1988) *Eur. J. Biochem.* 172, 433-438.
- 260 D'Ari, R.; Jaffé, A.; Boulac, P. y Robin, A. (1988) *J. of Bacteriol.* 170, 65-70.
- 261 Lopes-Gomes, S.; Menucci, I. y Da Costa Maia, J.C. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 541, 190-198.
- 262 Reig Macia, J.A.; Kornblihtt, A.R.; Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1982) *Biochem. J.* 207, 43-49.
- 263 Stellwagen, E. y Baker, B. (1976) *Nature* 261, 719.

- 264 Homcy, C.; Wrenn, S. y Haber, E. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 59.
- 265 Swizlocki, N.I.; Magnuson, T. y Tierney, J. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 157.
- 266 Northup, J.K.; Renart, M.F.; Grove, J.R. y Mansour, T.E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 11861.
- 267 Carricarte, V. Tesis Doctoral.
- 268 Kerson, G.W.; Miernyk, J.A. y Budd, K. (1984) *Plant. Physiol.* 75, 222-224.
- 269 Heideman, W.; Wierman, B.M. y Storm, D.R. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 1462-1465.
- 270 Téllez-Iñón, M.T.; Ulloa, R.M.; Glikin, G.C. y Torres, H.N. (1985) *Biochem. J.* 232, 425-430.
- 271 Bianchini, G.M.; Pastini, A.C.; Muschiatti, J.P.; Téllez-Iñón, M.T.; Carricarte, V.C.; Torres, H.N. y Flawiá, M.M. "Adenylate Cyclase Activity in Cyanobacteria". Enviado a publicación.
- 272 Crouch, T.H. y Klee, C.B. (1980) *Biochem.* 19, 3692-3698.
- 273 Lochrie, M.A. y Simon, M.I. (1988) *Biochem.* 27, 4957-4965.