

Tesis de Posgrado

Aislamiento y caracterización de la quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico en el ascomicete *Saccobolus plantensis* : identificación de fosfodiesterasas solubles de nucleótidos cíclicos

Silberstein Cuña, Susana Iris

1990

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

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

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

Cita tipo APA:

Silberstein Cuña, Susana Iris. (1990). Aislamiento y caracterización de la quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico en el ascomicete *Saccobolus plantensis* : identificación de fosfodiesterasas solubles de nucleótidos cíclicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2379_SilbersteinCuna.pdf

Cita tipo Chicago:

Silberstein Cuña, Susana Iris. "Aislamiento y caracterización de la quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico en el ascomicete *Saccobolus plantensis* : identificación de fosfodiesterasas solubles de nucleótidos cíclicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2379_SilbersteinCuna.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA QUINASA DE
PROTEINA DEPENDIENTE DE AMPcíclico EN EL ASCOMICETE
Saccobolus platensis. IDENTIFICACION DE FOSFODIESTERASAS
SOLUBLES DE NUCLEOTIDOS CICLICOS

Susana Iris Silberstein Cuña

Director: María Leonor Cantore de Ezcurra

Lugar de Trabajo: Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA)

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

1990

2379
ej. 2

A Pedro Uman, junto a quien el respeto, la aceptación
del otro, la generosidad y el entusiasmo en la experiencia de
compartir se consolidan en el amor que nos une

y a Nadia, nuestra hija

Las palabras funcionan del modo siguiente. Primero el pensamiento. Si es consciente, formulado mediante palabras. Si no, si es una asociación corriente, el pensamiento no tiene palabras. Las palabras aparecen cuando una se distancia y observa. Entonces de la primera palabra brotan otras palabras e ideas , como una tormenta de relámpagos... Una palabra, luego una idea sugerida por la palabra (de dónde viene la palabra?) Piensas: La idea es mía ? De quién ? Haz que la primera palabra, expresión o idea se inmovilice para poder examinarla... Es un pensamiento oído en el aire ? De quién proviene?... Es esencial tener conciencia durante el momento en que el pensamiento viene a la mente, de lo contrario es un pensamiento perdido.

Estamos en lo mismo de siempre: si no sabes algo de antemano no puedes reconocerlo. Sólo se aprende una cosa cuando ya la has intuido de antemano. Es inútil contarte lo que desconoces.

Y También: toda actitud, emoción, pensamiento, tiene a su contrario bien puesto y a distancia,pero siempre presente.

Doris Lessing

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Leonor Cantore por la dedicación y la paciencia volcadas en la dirección de este trabajo, su ejemplo de responsabilidad, sus enseñanzas, y por la amistad compartida a lo largo de estos años.

A la Dra. Susana Passeron porque me dió la oportunidad de iniciarme en la investigación científica. Por sus enseñanzas y permanente apoyo.

A Miguel Galvagno y Andrés Muro por el invalorable aporte de su trabajo y el afecto con que rodearon las horas compartidas

A la Dra. Silvia Moreno porque con su entusiasmo e interés contribuyó enormemente a la realización de este trabajo.

A Cristina Paveto, Patricia Pardo, Claudia Tomes, Pedro Fernandez Murray, Claudia González, Marcelo Guthmann y demás compañeros del laboratorio, porque fue realmente un gusto trabajar en su compañía.

A la Sra. Alicia B. de Alcaraz y a la Srta. Noemí Arguello por el apoyo cotidiano y la esmerada asistencia técnica proporcionada.

A los integrantes de la Cátedra de Introducción a la Botánica

por el asesoramiento y la colaboración prestada permanentemente.

A los integrantes del Departamento de Química Biológica y del INGEBI por su desinteresada y generosa colaboración.

A Norberto Malarini por la confección de los gráficos con dedicación y buen humor.

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

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

A Pedro, por su continua ayuda, estímulo y confianza en mi tarea. A Nadia, por la paciencia con que cedió incontables horas para que este trabajo pudiera concretarse.

Finalmente agradezco a mi madre, a Lydia y a Jorge. En especial a mi hermana Nora por el inmenso valor de su solidaridad y su cariño.

y a las personas que me alentaron en los momentos difíciles, disfrutaron conmigo de los buenos, y me sostienen día a día con su energía y generosidad.

<u>INTRODUCCION</u>	1
I. EL AMPcíclico	1
I.1 METABOLISMO DEL AMPcíclico	1
I.2 FUNCION DEL AMPcíclico EN LOS PROCESOS BIOQUIMICOS CELULARES	2
I.3 MECANISMO DE ACCION DEL AMPcíclico	4 .
II. AMPcíclico Y LUZ EN <u>Saccobolus platensis</u> ANTECEDENTES	6
II.1 LA LUZ Y EL DESARROLLO DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS	6
II.2 EL AMPcíclico Y EL DESARROLLO DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS	9
III. LA FAMILIA DE LAS QUINASAS DE PROTEINA	12
III.1 QUINASA DE PROTEINA DEPENDIENTE DE AMPcíclico	13
III.1.a GENERALIDADES	13
III.1.b ISOENZIMAS	16
III.1.c PURIFICACION	18
III.1.c.i Subunidad regulatoria	19
III.1.c.ii Subunidad catalítica	19
III.1.c.iii Holoenzima	21
III.1.d SUBUNIDAD CATALITICA	22
III.1.d.i Estructura y organización de dominios funcionales	22

III.1.d.ii Heterogeneidad de la subunidad catalítica	28
III.1.e MECANISMO DE ACCION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA	30
III.1.e.i Reconocimiento del sustrato	30
III.1.e.ii Mecanismo de catálisis	31
III.1.f SUBUNIDAD REGULATORIA	32
III.1.f.i Estructura y organización de dominios funcionales	32
III.1.f.ii Heterogeneidad de la subunidad regulatoria	36
III.1.g INHIBICION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA	37
III.1.g.i Mecanismo de acción de la subunidad regulatoria	38
III.1.g.ii Mecanismo de acción del inhibidor termoestable	43
III.1.h HOLOENZIMAS DIMERICAS.COMONENTES REGULATORIOS MONOMERICOS	44
III.1.i QUINASAS DE PROTEINA DEPENDIENTES DE AMPcíclico EN EUCARIOTAS INFERIORES	47
III.1.j HOMOLOGIA Y EVOLUCION DE PROTEINAS LIGANTES DE NUCLEOTIDOS CICLICOS	49
IV. LAS FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS	52
IV.1 GENERALIDADES. CLASIFICACION	52
VI.1.a FOSFODIESTERASAS SENSIBLES A CALMODULINA	56
VI.1.b FOSFODIESTERASAS SENSIBLES A GMPcíclico	58

IV.1.d FOSFODIESTERASA DE GMPCICLICO SENSIBLE A RODOPSINA	59
IV.1.e FOSFODIESTERASAS DE AMPcíclico	60
IV.2 FOSFODIESTERASAS EN EUCARIOTAS INFERIORES	61
IV.3 LA DEGRADACION DE LOS NUCLEOTIDOS CICLICOS.FUNCION DE LAS FORMAS MULTIPLES DE FOSFODIESTERASA	64
<u>OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.....</u>	66
<u>MATERIALES Y METODOS.....</u>	67
1. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO	67
1.1 ORGANISMO Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA	67
1.2 CULTIVOS	68
2. PURIFICACION DE LA QUINASA DE PROTEINA DEPENDIENTE DE AMPcíclico	68
2.1 OBTENCION DE LA HOLOENZIMA	68
2.1.a PREPARACION DEL EXTRACTO SOLUBLE DE MICELIO	68
2.1.b CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DE-52	69
2.2 PURIFICACION PARCIAL DE LA SUBUNIDAD CATALITICA	69
2.3 PURIFICACION DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA	71
3. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTES	72
3.1 PREPARACION DE LOS GELES	72
3.2 PREPARACION DE LAS MUESTRAS Y CORRIDA	73

3.3 TEÑIDO DE LOS GELES	73
3.3.a TINCION CON COOMASSIE BLUE	73
3.3.b TINCION CON PLATA	74
4. PURIFICACION PARCIAL DE LAS ACTIVIDADES DE FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS	74
4.1 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DE-52	74
4.2 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE FOSFOCELULOSA	75
4.3 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHACRYL S-300	75
5. DETERMINACION DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS	76
5.1 ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA	76
5.2 FILTRACION EN GELES	77
5.2.a QUINASA DE PROTEINA DEPENDIENTE DE AMPcíclico	77
5.2.a.1 Filtración en Sephacryl S-300	77
5.2.a.2 Filtración en Sephadex G-150	78
5.2.b FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS	78
5.2.b.1 Filtración en Sephadex G-150	79
6. CALCULO DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS	79
6.1 RADIO DE STOKES	79
6.2 COEFICIENTE DE SEDIMENTACION	80
6.3 PESO MOLECULAR	81
6.4 COCIENTE FRICCIONAL	82

6.5 PARAMETROS DE LAS PROTEINAS MARCADORAS	82
7. ENSAYOS ENZIMATICOS	83
7.1 MEDICION DE ACTIVIDAD DE QUINASA DE PROTEINA	83
7.2 MEDICION DE CAPACIDAD LIGANTE DE AMPcíclico	84
7.3 MEDICION DE ACTIVIDAD PEPTIDASICA	85
7.4 MEDICION DE ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA	85
8. OTRAS TECNICAS	86
8.1 DETERMINACION DE LAS PROTEINAS MARCADORAS	86
8.2 DOSAJE DE PROTEINA	87
8.3 SINTESIS DE ATP[γ - ^{32}P]	87
8.4 SINTESIS DE KEMPTIDO - ^{32}P	87
8.5 MEDICION DE LA RADIOACTIVIDAD	88
9. REACTIVOS	89
<u>RESULTADOS Y DISCUSION.....</u>	91
I. ESTUDIO DE LA QUINASA DE PROTEINA DEPENDIENTE DE AMPcíclico EN <u>Saccobolus platensis</u>	91
I.1 EXTRACTOS SOLUBLES DE MICELIO	91
I.1.a CENTRIFUGACION DE LA FRACCION S-100 EN GRADIENTES DE SACAROSA	92
I.2 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DE-52	95

I.2.a CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA DE LAS FRACCIONES DE DE-52	98
I.2.b IDENTIFICACION DE UNA ACTIVIDAD ENMASCARANTE DE LA FOSFORILACION PUESTA EN EVIDENCIA EN LAS FRACCIONES DE DE-52	98
I.3 ANALISIS DE LA INTERACCION DE LOS COMPONENTES REGULATORIO Y CATALITICO EN GRADIENTES DE SACAROSA	105
I.3.a EFECTO DE LOS COMPONENTES DE LA MEZCLA DE INCUBACION DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD FOSFORILANTE	105
I.3.b EFECTO DE POLIAMINAS Y DE LA CONCENTRACION SALINA EN LA DISOCIACION DE LA HOLOENZIMA	109
I.4 MEDICION DE LA DEPENDENCIA DE AMPcíclico	111
I.5 EFECTO DE SALES	113
I.6 SEPARACION DE LAS SUBUNIDADES REGULATORIA Y CATALITICA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD; OBTENCION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA LIBRE	113
I.7 PURIFICACION PARCIAL Y PROPIEDADES CATALITICAS DE LA SUBUNIDAD C	117
I.7.a ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO	119
I.7.b Km PARA EL ATP Y EL KEMPTIDO	121
I.7.c EFECTO DEL PEPTIDO INHIBIDOR SOBRE LA ACTIVIDAD DE C	122
I.8 PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA	126
I.8.a PURIFICACION	126
I.8.b ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS	128
I.8.c CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA	130
I.8.d ESPECIFICIDAD DE UNION DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA AL AMPcíclico	133

I.8.e DISOCIACION DEL AMPcíclico [3H] UNIDO A LA SUBUNIDAD REGULATORIA	135
I.9 PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LA HOLOENZIMA Y SUS SUBUNIDADES	137
I.9.a DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE SEDIMENTACION	137
I.9.b DETERMINACION DE LOS RADIOS DE STOKES	139
I.9.c DETERMINACION DE LOS PESOS MOLECULARES	141
I.9.d DETERMINACION DE LOS COCIENTES FRICCIONALES	143
I.10 RECONSTITUCION DE LA HOLOENZIMA A PARTIR DE SUBUNIDADES AISLADAS	147
I.10.a RECONSTITUCION DE LA HOLOENZIMA DE <u>S.platensis</u>	147
I.10.b RECONSTITUCION DE UNA HOLOENZIMA HETEROLOGA	150
CONCLUSIONES.....	153
II. IDENTIFICACION DE DOS ACTIVIDADES DE FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS EN <u>Saccobolus platensis</u>	160
II.1 PURIFICACION PARCIAL DE LAS ISOENZIMAS	160
II.1.a CROMATOGRAFIA EN DE-52	160
II.1.b CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE FOSFOCELULOSA DEL PICO I DE DE-52	162
II.1.c CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHACRYL S-300 DEL PICO II DE DE-52	164
II.2 PROPIEDADES CATALITICAS DE LAS ENZIMAS I Y II	164
II.2.a Km PARA EL AMPcíclico Y EL GMPcíclico	166
II.2.b EFECTO DE METILXANTINAS	168

Indice

II.3 INACTIVACION TERMICA DE LAS ENZIMAS I Y II	170
II.4 PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LAS FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS	172
II.4.a DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE SEDIMENTACION	172
II.4.b DETERMINACION DE LOS RADIOS DE STOKES	174
II.4.c DETERMINACION DE LOS PESOS MOLECULARES	176
II.4.d DETERMINACION DE LOS COCIENTES FRICCIONALES	176
DISCUSION.....	177
<u>ABREVIATURAS Y SIMBOLOS</u>	180
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	182

I. EL AMPcíclico

I.1 METABOLISMO DEL AMPcíclico

La célula eucariótica es una entidad altamente regulable capaz de responder tanto a los cambios que se producen en el medio intracelular como a los estímulos externos. La mayor parte de esta regulación es mediada ya sea directa o indirectamente por cambios conformacionales de proteínas. El equilibrio entre los estados conformacionalmente activos e inactivos puede ser alterado mediante modificaciones alostéricas o covalentes; uno de los mecanismos más frecuentes de modificación covalente que regula la actividad de las proteínas es la fosforilación.

En el plano molecular los sistemas biológicos de respuesta a estímulos externos operan a través de moléculas mensajeras especiales (una hormona, o primer mensajero) que se ponen en contacto con receptores específicos situados en la membrana de la célula blanco. Esta interacción hormona-receptor, en los sistemas cuya respuesta es mediada por AMPcíclico, lleva a la activación de la adenilato ciclasa. Esta enzima, responsable de la síntesis de AMPcíclico, se activa a través de una proteína transductora que liga nucleótidos de guanosina y que se encuentra acoplada al receptor hormonal.

Como consecuencia de la activación de la adenilato ciclasa se produce un aumento de los niveles intracelulares de AMPcíclico, que actuando como segundo mensajero, transmite la información a la maquinaria celular.

El aumento de los niveles intracelulares del AMPcíclico conduce a la activación de las quinasas de proteína dependientes de este nucleótido y en consecuencia a la fosforilación de numerosas proteínas que participan en puntos clave de caminos metabólicos. El ciclo se revierte cuando las fosfodiesterasas de AMPcíclico disminuyen los niveles intracelulares de este metabolito y/o las fosfatasas defosforilan las proteínas volviendo el sistema al estado original.

Este sistema de regulación en cascada provee a la célula viva de un mecanismo de control potente, efectivo, eficiente y sensible debido a su potencial de amplificación (Shacter et al., 1988) y le otorga la posibilidad de respuesta ante las señales del medio a través de la modificación de sus funciones metabólicas.

I.2 FUNCION DEL AMPcíclico EN LOS PROCESOS BIOQUIMICOS CELULARES

El AMPcíclico es tal vez la molécula regulatoria más

importante que se haya estudiado debido a su distribución universal y a la diversidad de procesos que coordina. Desde el metabolismo del glucógeno en el hígado de mamíferos hasta la síntesis de numerosas enzimas específicas involucradas en el metabolismo energético de bacterias, una serie vastísima de procesos bioquímicos celulares están regidos por los niveles intracelulares del nucleótido cíclico.

A través del estudio de la participación del AMPcíclico en numerosos procesos (diferenciación y proliferación celular, síntesis de macromoléculas, neurotransmisión, producción de hormonas), se ha logrado ubicar el sitio específico de acción del nucleótido cíclico y aislar y caracterizar los componentes involucrados en la cascada regulatoria que conduce a la respuesta desencadenada en cada caso.

En los eucariotas superiores, los niveles intracelulares del AMPcíclico están bajo control hormonal. En los eucariotas inferiores, más aún en el caso de organismos unicelulares, no siempre se ha logrado determinar con exactitud qué parámetros controlan los niveles intracelulares del nucleótido.

En el caso particular de los hongos se ha observado que las variaciones de los niveles intracelulares de AMPcíclico

están relacionadas con una gran cantidad de eventos celulares. Eventos relacionados con el catabolismo de reservas carbonadas en Neurospora crassa (Téllez-Iñón et al., 1970), con el dimorfismo en varias especies de Mucor (Larsen y Sypherd, 1974; Cantore et al., 1983), con la germinación en Candida albicans (Egidy et al., 1989), con la formación de estructuras reproductivas en Coprinus macrorhizus y Schizophyllum commune (Uno e Ishikawa, 1973;Schwalb, 1974), con la agregación de las amebas en Dictyostelium discoideum (Gerish, 1987), con la proliferación celular en Saccharomyces cerevisiae (Dumont et al. 1989) son sólo algunos ejemplos de funciones celulares reguladas por el AMPcíclico en estos organismos.

I.3 MECANISMO DE ACCION DEL AMPcíclico

Como se dijo anteriormente, los cambios originados por la fosforilación y defosforilación de proteínas que participan en puntos clave de caminos metabólicos son el mecanismo principal por medio del cual se modulan las actividades celulares en respuesta a los estímulos que alteran los niveles de AMPcíclico en eucariotas. Dos grupos de enzimas son las responsables del grado de fosforilación de proteínas dependiente del nucleótido; las quinasas de proteína dependientes

de AMPcíclico y las fosfatasas de fosfoproteínas.

Los cambios en el metabolismo del glucógeno en hígado y músculo en respuesta al estímulo de adrenalina y glucagon ilustran el efecto de estas hormonas a través del AMPcíclico; el aumento de los niveles del nucleótido conduce al efecto fisiológico deseado -un incremento de azúcar en el torrente sanguíneo- por medio de dos caminos diferentes de fosforilación de proteínas, uno de las cuales reduce la síntesis de glucógeno y otro que estimula su degradación (Cohen, 1978).

El incremento de los niveles intracelulares de AMPcíclico también regula la expresión de numerosos genes eucariotas (Noguchi et al., 1978; Maurer, 1981; Lamers et al., 1982). Todos los genes regulados por el nucleótido que han sido aislados y caracterizados revelan una serie de características comunes: se expresan en tejidos que responden a hormonas, su tasa de transcripción es rápidamente alterada con los cambios en los niveles de AMPcíclico y las regiones promotoras poseen secuencias consenso responsables de la regulación por el nucleótido cíclico (Roesler et al., 1988). Una vasta serie de hallazgos recientes sugieren que eventos de fosforilación mediados por la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico modularía la expresión de dichos genes (Grove et al., 1987;

Yamamoto et al., 1988), aunque el mecanismo de estimulación específica de la transcripción en respuesta a los niveles del nucleótido cíclico no está aún del todo aclarado.

La agregación de las amebas de D.discoideum en respuesta al AMPcíclico es una de las pocas excepciones en las cuales la respuesta al AMPcíclico en un eucariota no es mediada directamente por la quinasa de proteína dependiente del nucleótido. El AMPcíclico actúa en este caso a través de la unión a un receptor presente en la superficie de la célula que es comparable en estructura al receptor β -adrenérgico y a la rodopsina (Klein et al., 1988).

En bacterias, el único mecanismo de acción conocido para el AMPcíclico es a través de la inducción y represión de genes específicos; el nucleótido cíclico se une a una proteína receptora y el complejo resultante interactúa con ciertas secuencias del ADN que modulan la transcripción.

II. AMPcíclico Y LUZ EN Saccobolus platensis. ANTECEDENTES.

II.1 LA LUZ Y EL DESARROLLO DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

S.platensis es un ascomycete coprófilo en el cual la producción de estructuras reproductivas es un proceso morfo-

genético dependiente de la luz.

Este hongo es capaz de formar apotecios con ascos maduros cuando se lo cultiva en condiciones de iluminación, siendo incapaz de producir estructuras sexuales cuando es crecido en oscuridad (Gamundí y Ranalli, 1969).

La fotodependencia de la producción de fructificaciones depende también del medio de cultivo utilizado, en particular de las diferentes combinaciones de fuentes de carbono y nitrógeno que componen los medios artificiales utilizados (Forchiassin, 1989). Diversos medios sólidos sintéticos (glucosa-urea, glucosa-asparragina) o semisintéticos (PF: papel de filtro-extracto de levadura) permiten la producción de apotecios fértiles únicamente en condiciones de iluminación. En medios sólidos menos favorables para el crecimiento del organismo (fructosa-urea, maltosa-urea, almidón-urea) la producción de apotecios se independiza de la luz, pudiendo llegar a ser mayor en oscuridad. En medio sintético líquido, el micelio vegetativo desarrolla abundantemente pero no es posible observar la formación de estructuras reproductivas.

En S.platensis, un amplio rango de intensidades de luz permite un buen nivel de fructificación. Esto estaría relacionado con el hábito natural de este organismo que en la naturaleza fructifica sobre estiércol de vaca o de caballo

expuesto al sol de manera inespecífica.

La eficiencia de la fotoinducción en la reproducción sexual en este hongo depende de la edad de la colonia, es decir, del grado de desarrollo que alcance el micelio en el cultivo. Fue determinado el momento del desarrollo del micelio en el cual la iluminación es efectiva para promover la formación de estructuras reproductivas, sometiendo al micelio crecido en oscuridad en medio sólido semisintético a pulsos de luz blanca a diferentes tiempos, durante un período de incubación de catorce días. Se observó que cultivos crecidos en oscuridad durante tres días o más permanecen sensibles al estímulo lumínico y es al quinto día de desarrollo cuando el micelio muestra el máximo de receptividad, medida como el porcentaje de apotecios producidos respecto del control crecido bajo iluminación continua (Galvagno et al, 1984). Este resultado podría indicar que el sistema fotorreceptor involucrado en el camino metabólico que conduce a la respuesta morfogénica se encuentra funcionando al máximo cuando el micelio alcanza este momento de desarrollo.

Un mínimo de una hora de luz es indispensable para obtener fructificaciones normales en medio PF (Forchiassin, 1989). En contraste con algunas especies en las cuales son

suficientes segundos de irradiación para inducir la fructificación, S.platensis requiere una considerable exposición a la luz para que tenga lugar la formación de estructuras reproductivas.

Al estudiar el efecto de distintas longitudes de onda se observó que tanto el porcentaje de fructificación como el tamaño de los apotecios están bajo el control de la luz: mientras que el número de apotecios producidos depende de la inducción promovida por UV cercano y en menor grado por luz azul, el diámetro de los apotecios es promovido principalmente por luz azul. El sistema pigmentario que absorbe en estos dos rangos del espectro está presente en todos los grupos de hongos en los cuales la producción de fructificaciones es fotodependiente, y aunque la naturaleza del fotorreceptor es aún motivo de controversias, el mismo sistema estaría involucrado en la fotorrecepción en S.platensis.

II.2 EL AMPcíclico Y EL DESARROLLO DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

La adición de dibutiril-AMPcíclico a cultivos de S.platensis en medio PF crecidos en oscuridad, provoca el mismo efecto que la luz, es decir, induce la formación de estructuras reproductivas normales (Galvagno et al, 1984).

Estos resultados indican que el efecto inductor de la luz sobre la producción de fructificaciones puede ser simulado por la presencia de AMPcíclico en el medio de cultivo del organismo desarrollado en oscuridad. El efecto máximo se obtiene con el agregado de dibutiril-AMPcíclico 4 mM al quinto día de desarrollo, lo cual coincide con el estado de desarrollo de micelio que es capaz de responder con mayor intensidad al estímulo lumínico. Esta coincidencia sugiere una estrecha relación entre el efecto de la luz y el del AMPcíclico en la formación de fructificaciones.

Otra evidencia a favor de la participación del AMPcíclico en el proceso de formación de estructuras reproductivas en este organismo se obtuvo mediante el agregado de inhibidores de la fosfodiesterasa de AMPcíclico en el medio de cultivo, lo cual equivale a aumentar los niveles intracelulares del nucleótido. El agregado de teofilina o 3-isobutil-1-metilxantina en el medio de cultivo del organismo desarrollado en oscuridad produce el mismo efecto que el AMPcíclico o la luz, esto es, induce la formación de estructuras reproductivas normales. El correlato bioquímico del efecto fisiológico del AMPcíclico en este hongo fue obtenido mediante la medición de las actividades de las enzimas adenilato ciclasa y fosfodiesterasa del nucleótido cíclico en extractos de micelio crecido

en ausencia y en presencia de luz; se encontró, como era de esperar, una actividad específica de adenilato ciclasa dos veces mayor en extractos de micelio crecido en condiciones de iluminación respecto de los extractos provenientes de micelio desarrollado en oscuridad y, por el contrario, la actividad específica de fosfodiesterasa de AMPcíclico resultó ser mayor en extractos de micelio crecido en oscuridad. La medición del contenido de AMPcíclico no arrojó diferencias significativas entre cultivos desarrollados en presencia o en ausencia de luz, pero es sabido que los niveles de AMPcíclico en hongos pueden variar muy rápidamente pudiendo ocurrir cambios drásticos en la concentración del nucleótido durante la cosecha y la preparación de las muestras. También es posible que el incremento de la concentración del nucleótido inducido por la luz sea un fenómeno transitorio que tiene lugar durante un período muy breve de tiempo. De ser así, los niveles de AMPcíclico medidos podrían no reflejar la concentración efectiva del nucleótido desencadenante de la respuesta morfogénica.

Los antecedentes mencionados hasta aquí sugieren que el AMPcíclico es un mediador endógeno de la formación de estructuras reproductivas en S.platensis. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual el AMPcíclico da lugar al proceso morfogénico en este organismo es aún totalmente desconocido.

III. LA FAMILIA DE LAS QUINASAS DE PROTEÍNA

La familia de enzimas que catalizan la fosforilación de proteínas, las quinasas de proteína, representan un grupo estructuralmente diverso de macromoléculas. Existen dos clases generales; aquellas que transfieren un grupo fosfato a los aminoácidos serina o treonina y aquellas que lo transfieren al aminoácido tirosina. A pesar de su diversidad estructural, todas las quinasas de proteína eucarióticas están evolutivamente relacionadas a través de un "core" catalítico conservado (Hanks et al., 1988; Taylor et al., 1988) indicando que todas ellas comparten al menos una serie de elementos comunes reflejados en su estructura secundaria y terciaria.

Las quinasas de proteína ejercen numerosos efectos regulatorios en las células y ellas en sí mismas son enzimas altamente reguladas. Son excepciones a esta regla las quinasas de proteína oncogénicas, variantes genéticamente alteradas de sus homólogas celulares normales, que han perdido su capacidad de regulación (Cooper, 1990).

La actividad de las quinasas de proteína es modulada a menudo por fosforilación, ya sea por mecanismos autocatalíti-

cos o por efecto de otras quinasas.

Los estudios comparativos de las secuencias de los miembros de la familia de las quinasas de proteína han demostrado que estas enzimas, a pesar de su considerable diversidad, han evolucionado al menos en parte a partir de un ancestro común. Las regiones de estas proteínas que no están involucradas en la función catalítica y que no guardan entre sí relaciones evolutivas evidentes, son las responsables de la localización subcelular así como de la regulación y activación de cada una de las diferentes quinasas de proteína que integran este variado grupo de macromoléculas regulatorias.

III.1 QUINASA DE PROTEINA DEPENDIENTE DE AMPcíclico

III.1.a GENERALIDADES

Dentro del grupo de las quinasas de proteína que fosforilan residuos serina o treonina, la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico es una de las enzimas más estudiadas y caracterizadas desde el punto de vista bioquímico y molecular.

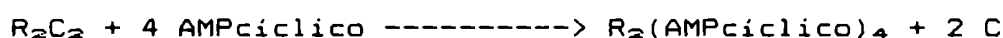
Las primeras investigaciones sobre las quinasas de proteínas dependientes de AMPcíclico datan de 1957 cuando a

través de los estudios del metabolismo del glucógeno en hígado, Rall y Sutherland descubrieron que el efecto activante de las hormonas peptídicas sobre la fosforilasa era mediado por una molécula pequeña y termoestable: el AMPcíclico (Rall et al., 1957). Años más tarde, el desarrollo del concepto de segundo mensajero permitió describir el papel que desempeña el nucleótido cíclico en la respuesta celular mediada por hormonas (Robinson et al., 1971).

En células eucariotas la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico es el principal y tal vez el único receptor intracelular del nucleótido cíclico. En eucariotas superiores la enzima tiene una estructura tetramérica formada por dos tipos de subunidades: una responsable de la actividad catalítica (C) que transfiere el fosfato γ del ATP a la proteína fosforilable y un componente regulatorio dimérico (R_2) que en ausencia de AMPcíclico se asocia a C para formar una holoenzima inactiva cuya composición es R_2C_2 (Beavo et al., 1975).

La activación por AMPcíclico de la holoenzima inactiva se logra a través de la disociación de R_2C_2 con liberación de un dímero de la subunidad regulatoria (R_2) y dos subunidades catalíticas activas (2 C). El dímero regulatorio posee 4 sitios de unión para el AMPcíclico, dos por cada monómero

de subunidad R (Builder et al., 1980). La unión del nucleótido al componente regulatorio de la holoenzima modifica la afinidad que éste tiene por C y se produce la disociación de la holoenzima según la siguiente ecuación (Krebs y Beavo, 1979):



La secuencia de eventos, y de hecho los eventos en sí, que conducen a la activación de la quinasa de proteínas no están aún totalmente desentrañados. A partir de evidencias cinéticas, varios grupos de investigación (Tsuzuki y Kiger, 1978; Builder et al., 1980; Pastori et al., 1981) han propuesto que la formación de un complejo ternario (R_2C_2 -AMPcíclico) ocurre como paso intermedio en la disociación de la holoenzima.

Trabajando con la holoenzima de corazón bovino reconstituida a partir de sus subunidades aisladas, se logró visualizar en geles de poliacrilamida no desnaturizantes una forma trimérica constituida por un dímero regulatorio y un monómero de la subunidad catalítica (Rangel-Aldao y Rosen, 1977). Más tarde, otro grupo de investigación (Connely et al., 1986) logró demostrar que este producto de reconstitución

contenía AMP cíclico en su estructura (R_2 -AMPcíclico-C). Cabe aclarar que la actividad fosfotransferasa de esta enzima era dependiente del agregado de AMPcíclico. Durante el desarrollo de un procedimiento de purificación de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico de corazón bovino (Cobb et al., 1987) se logró separar y caracterizar un complejo ternario formado por R y C, dependiente de AMPcíclico en la actividad fosfotransferasa, y con la mitad de sus sitios ocupados con AMPcíclico.

Se propone que el AMPcíclico se une "paso a paso" a los cuatro sitios del dímero regulatorio. La cinética de unión muestra cooperatividad positiva con constantes de Hill de 1,6 y 1,8 para la activación de la quinasa por AMPcíclico (Flockhart y Corbin, 1982). No está del todo claro el mecanismo exacto mediante el cual la unión del AMPcíclico provoca la activación de la holoenzima, pero sí se puede afirmar que los dos sitios de cada subunidad están implicados en la activación (Corbin et al., 1975; OGREID et al., 1983).

III.1.b ISOENZIMAS

La estructura tetramérica es común a los dos tipos principales de holoenzimas definidas operacionalmente de acuerdo

a la concentración salina a la cual eluyen de una columna de DEAE-celulosa: las de tipo I eluyen a una concentración menor o igual a 0,1 M de ClNa y las de tipo II lo hacen a una concentración salina mayor a 0,1 M (Corbin et al., 1975). Las diferencias estructurales y funcionales existentes entre ambas isoenzimas se deben exclusivamente a diferencias en sus respectivas subunidades regulatorias RI y RII (Taylor et al., 1988; Titani et al., 1984).

Las diferencias más notables entre los dos tipos de quinasa de proteínas pueden resumirse así:

1- En ausencia de ATP-Mg, la holoenzima de tipo I se disocia por la sola presencia de alta sal o de proteínas básicas (Miyamoto et al., 1973). Esa disociación se previene con ATP-Mg. La holoenzima de tipo II es relativamente resistente a la disociación inducida por altas concentraciones salinas (Glenney et al., 1988; Rossmann et al., 1974) y en general solamente es disociada por AMPcíclico en un proceso independiente de la presencia de ATP-Mg.

2- La holoenzima de tipo II posee varios residuos serina fosforilables en cada uno de los monómeros de la subunidad regulatoria: Ser-44 y Ser-77 son fosforilados por la glicógeno sintetasa quinasa (Hemmings et al., 1982); Ser-74 y Ser-76 por la caseína quinasa II (Carmichael et al.,

1982) y Ser-95 que es autofosforilado mediante una reacción intramolecular que no requiere disociación de la holoenzima (Hofmann et al., 1975; Erlichmann et al., 1976). Este sitio de autofosforilación es característico de la subunidad regulatoria de tipo II y la presencia de fosfato en este residuo resulta en la reducción de la velocidad de reasociación con C (Rangel-Aldao y Rosen, 1976). La isoenzima de tipo I no es capaz de sufrir autofosforilación aunque posee un sitio fosforilable in vivo cuya posición en la molécula no se conoce con exactitud y parece no tener ningún efecto sobre las propiedades de la holoenzima. Tiene también un sitio fosforilable in vitro por la quinasa de proteína dependiente de GMPcíclico (Geahlen y Krebs, 1980) cuya fosforilación conduce a la pérdida de la capacidad de inhibir a C (Geahlen et al., 1981).

3- La holoenzima de tipo I posee un sitio de ligado de alta afinidad para el ATP-Mg (Shoji et al., 1983).

4- Los dos tipos de subunidades regulatorias que caracterizan a las dos isoenzimas son antigénicamente diferentes y presentan distintas afinidades por la subunidad catalítica (Fleisher et al., 1976; Kapoor et al., 1979).

III.1.c PURIFICACION

III.1.c.i Subunidad regulatoria

A partir del desarrollo de la cromatografía de afinidad, la subunidad regulatoria de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico pudo ser fácilmente purificada a homogeneidad. Las subunidades regulatorias puras, sean de tipo I o II, se pueden obtener fácilmente utilizando AMPcíclico o análogos del mismo inmovilizados en agarosa (Ramsyer et al., 1974). RI o RII son recuperadas de la resina por elución con urea 8 M o con AMPcíclico. La elución con urea permite la recuperación de la subunidad regulatoria libre del nucleótido cíclico pero a menudo, luego de la remoción de la urea, la proteína obtenida presenta propiedades alteradas si se la compara con aquella obtenida por elución con AMPcíclico (Corbin y Rannels, 1981). A su vez, la elución con AMPcíclico preserva la estructura nativa de la proteína pero la remoción del nucleótido unido a R suele ser dificultosa y acarrear pérdidas importantes de actividad receptora (Corbin et al., 1978).

III.1.c.ii Subunidad catalítica

La subunidad catalítica ha sido purificada a partir de gran número de tejidos (Carlson et al., 1979). Los procedimientos de purificación más eficientes se basan en el hecho

de que la holoenzima y la subunidad regulatoria tienen un comportamiento diferente respecto del de C en resinas de intercambio iónico, y en que las subunidades se disocian específicamente en presencia de AMPcíclico o análogos del mismo (Reimann y Beham, 1983).

Existen dos procedimientos clásicos que permiten obtener a la subunidad catalítica con alto grado de pureza: uno de ellos consiste en tratar una preparación parcialmente purificada de holoenzima con AMPcíclico antes de ser cromatografiada en carboximetilcelulosa en la cual la subunidad C queda retenida y la subunidad R percola (Beavo et al., 1974; Bechtel et al., 1977). En el otro método la holoenzima retenida en DEAE-celulosa es tratada con AMPcíclico; la subunidad catalítica libre no es retenida por el intercambiador y percola en tanto que la subunidad regulatoria queda retenida (Reimann y Beham, 1983).

A medida que avanza el conocimiento de las propiedades de la subunidad catalítica otros métodos de purificación más rápidos y efectivos van incorporándose a los clásicamente utilizados. Recientemente se ha descrito un protocolo de purificación de la subunidad C por cromatografía de afinidad utilizando péptidos derivados del inhibidor termoestable de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico inmoviliza-

dos en Affi-Gel. La subunidad catalítica es recuperada de la resina por elución con L-arginina (Olsen y Uhler, 1989).

III.1.c.iii Holoenzima

La primer holoenzima parcialmente purificada fue informada por Walsh et al.(1968). Desde entonces, numerosas holoenzimas han sido purificadas a homogeneidad en varios laboratorios. La isoenzima de tipo I ha sido purificada a partir de tejidos de conejo (Beavo et al., 1974; Hofmann et al., 1975; Døskeland, 1978) y músculo esquelético porcino (Taylor et al., 1976; Taylor y Stafford, 1978).

La quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico de tipo I de músculo esquelético de conejo y la de tipo II de corazón bovino representan las isoenzimas prototipo y se las purifica a partir de los tejidos mencionados donde cada una de ellas es la isoenzima predominante.

Los procedimientos empleados en la purificación de holoenzimas utilizaron cromatografía en DEAE-celulosa, fraccionamiento con sulfato de amonio, técnicas de filtración molecular y HPLC.

La holoenzima suele ser preparada actualmente por combi-

nación de las subunidades regulatoria y catalítica purificadas por los métodos descritos previamente. No queda claro, sin embargo, si la holoenzima producida por la combinación de sus subunidades reproduce en todos los aspectos a la holoenzima nativa.

III.1.d SUBUNIDAD CATALITICA

III.1.d.i Estructura y organización de dominios funcionales

La secuenciación de la subunidad catalítica de la quinaasa de proteína dependiente de AMPcíclico de corazón bovino indicó que dicha proteína consta de 350 residuos (Shoji et al., 1983) y permitió calcular un peso molecular de 40.862, incluyendo el grupo miristilo que bloquea su extremo amino-terminal y los grupos fosfato de los residuos Treo-197 y Ser-338. Se cree que la fosforilación en estos sitios tiene lugar mediante un mecanismo autocatalítico (Buhrow et al., 1983 ; Carpenter et al., 1978). Este peso molecular concuerda con el peso molecular cercano a 40.000 (Carlson et al., 1979) estimado a partir de electroforesis en geles con SDS, o por la combinación del coeficiente de sedimentación (3,5 S) y el radio de Stokes (2,7 nm) de la proteína purificada.

Por medio de modificaciones químicas de la molécula se

ha logrado definir el ordenamiento topográfico de las regiones funcionales de la subunidad catalítica. La región aminoterminal esta asociada al ligado del ATP, el sitio de unión del péptido sustrato y de catálisis está asociado a la región central de la molécula.

El mapeo del sitio de ligado del nucleótido utilizando análogos del ATP fue en principio la estrategia general que permitió conocer las regiones de la molécula que interactúan con el nucleótido (Hoppe et al., 1978). Zoller et al. (1981) presentaron la primer evidencia experimental definitiva que permitió identificar un aminoácido específico en el sitio del ligado del nucleótido. Este aminoácido, Lis-72, fue marcado por afinidad con el análogo del ATP p-fluorosulfonil benzoil 5'-adenosina (FSBA). Este compuesto, que contiene un grupo reactivo fluorosulfonil que semeja el fosfato γ del ATP, inhibe a la subunidad catalítica al unirse covalentemente al aminoácido mencionado. Más tarde se demostró que la subunidad catalítica modificada por FSBA no era capaz de ligar ATP-Mg ni ADP-Mg pero si AMP y adenosina, ubicando de este modo la la Lis-72 en la proximidad del fosfato β y/o γ del ATP (Bhatnagar et al., 1984).

Estrategias similares permitieron localizar el sitio de

unión del sustrato en la subunidad catalítica. El uso de péptidos sintéticos permitió establecer los requerimientos para el reconocimiento de los mismos como sustrato de la actividad fosfotransferasa. La subunidad catalítica transfiere el fosfato γ del ATP a los grupos oxhidrilo de residuos serina o treonina que están precedidos por dos aminoácidos básicos, habitualmente argininas (Bramson et al., 1984). El marcado de C por afinidad con análogos de péptidos sustrato con grupos reactivos capaces de establecer uniones covalentes, permitió identificar el residuo Cys-199 en el sitio de unión del péptido (Bramson et al., 1983).

Además del uso de péptidos análogos de sustrato para el marcado por afinidad del sitio de reconocimiento del péptido, se utilizaron reactivos grupo-específicos para detectar residuos funcionales del sitio de catálisis. La dependencia del pH que muestra la reacción de transferencia del fosfato indica que el mecanismo involucra la participación de un grupo carboxilo (Yoon y Cook, 1987). Buechler y Taylor (1988) identificaron al residuo Asp-184 mediante la modificación de la enzima con diciclohexil carbodiimida (DCCD). Este residuo es un buen candidato para ser considerado como el que aporta el grupo carboxilo que participa en la catálisis. El marcado diferencial de la subunidad catalítica en presencia o

en ausencia de sustratos con 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida (EDC) permitió identificar dos regiones importantes para el reconocimiento del péptido (Buechler y Taylor 1990). Una de ellas rodea al Glu-170 y la otra comprende un tracto de aminoácidos ácidos (residuos 328-334).

En general, si se considera a la familia de las quinasas de proteína en su conjunto, no es difícil pensar que las mismas características generales en cuanto al ligado del nucleótido y al mecanismo de catálisis deben haberse conservado. De hecho, el análisis cuidadoso y la comparación de las secuencias de las quinasas de proteína permite detectar regiones específicas altamente conservadas dentro de las cuales algunos residuos permanecen invariables. La subunidad catalítica de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico se ha transformado, entonces, en el armazón y modelo de estudio para el abordaje de la identificación de las estructuras y correlaciones funcionales presentes en el dominio catalítico común a todos los miembros de la familia de las quinasas de proteína.

La Figura A esquematiza la estructura de los dominios de la subunidad catalítica, e indica los residuos identificados mediante los estudios antes descriptos.

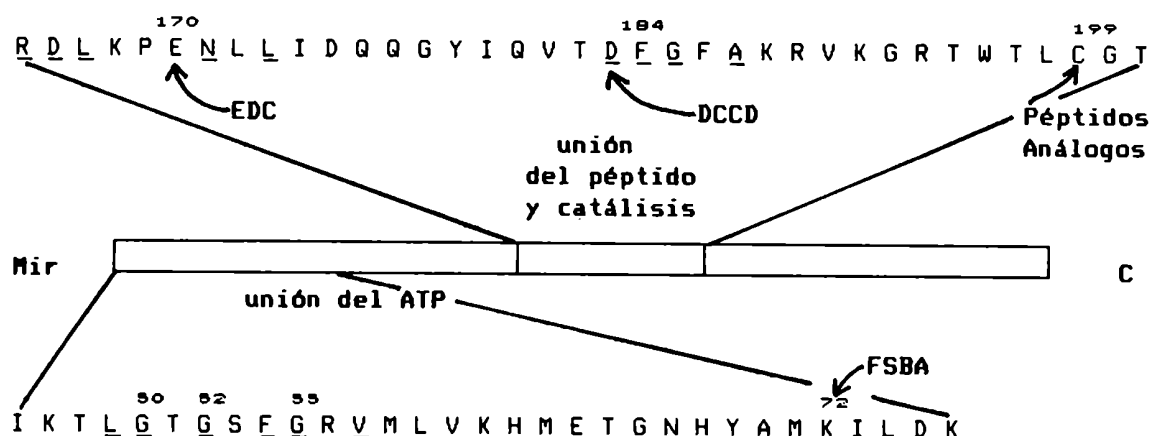


FIGURA A: Estructura general de los dominios de la subunidad catalítica. Los residuos altamente conservados en otras quinasas se indican con el subrayado. Los residuos identificados por modificaciones covalentes se señalan con flechas. Mir: miristilo; EDC: 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida; DCC: diciclohexil carbodiimida.

La Lis-72, que se piensa que participa en el ligado del ATP, está invariablemente presente en todas las quinasas de proteína. Toda modificación de este residuo ya sea por ligado covalente de compuestos (Kamps et al., 1984) o por mutagénesis dirigida (Snyder et al., 1985) conduce a la inactivación de todas las quinasas analizadas. Además de este residuo altamente conservado, es importante mencionar que en el dominio de unión del ATP-Mg de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico, al igual que en el de las otras quinasas de

proteína, está presente una triada de glicinas (Gli-50,52 y 55) que participarían en la unión del ATP formando un codo alrededor del nucleótido (Branden, 1980; Pai et al., 1989).

El Asp-184 es otro de los residuos invariables a través de toda la familia de las quinasas de proteína. Desde este punto de vista, es un buen candidato para cumplir un rol funcional importante. Este residuo se encuadra dentro de un subdominio que representa uno de los más conservados dentro del dominio catalítico (Hanks et al., 1988) y está presente en numerosas fosfotransferasas bacterianas que utilizan ATP como dador de grupos fosfato (Brenner, 1987).

El aminoácido Glu-170 identificado en el sitio de ligado del sustrato pertenece también a una trama general presente en las quinasas de proteína. La presencia de este grupo carboxilo está conservada en todas las quinasas de serina y treonina que requieren residuos básicos precediendo al sitio de fosforilación del sustrato, tales como la proteína quinasa C o la quinasa de la cadena liviana de la miosina. Este residuo está reemplazado por un aminoácido básico en las quinasas que requieren grupos acídicos precediendo al sitio de fosforilación, tales como la quinasa de caseína II o las quinasas de tirosina (Hanks et al., 1988; Hunter, 1987).

En cambio, la Cis-199 no es un residuo altamente conservado entre las diferentes quinasas de proteína. Es de esperar que un residuo involucrado en el reconocimiento del sustrato sea característico de la enzima analizada. Sin embargo, este aminoácido pertenece a un subdominio de gran interés ya que parece contener residuos conservados entre las quinasas de serina o treonina diferentes de aquellos conservados entre las quinasas de tirosina, y es responsable seguramente de la determinación de la especificidad del aminoácido fosforilable (Hanks et al., 1988).

III.1.d.ii Heterogeneidad de la subunidad catalítica

Las subunidades catalíticas de ambas isoenzimas son indistinguibles respecto de sus propiedades por un gran número de criterios. Poseen propiedades cromatográficas, químicas, físicas y catalíticas similares, y son capaces de reasociarse en forma cruzada con las subunidades regulatorias de tipo I y II (Carlson et al., 1979; Sudgen et al., 1976).

Sin embargo, varios investigadores han encontrado formas de la subunidad catalítica con diferentes puntos isoeléctricos provenientes de ambos tipos de holoenzimas (Sudgen et al., 1976; Kubler et al., 1979).

Recientemente se han descripto cuatro formas de subunidad catalítica en corazón bovino que difieren entre sí por sus puntos isoelectricos (Hotz et al., 1989 a). Las especies que se enfocan a pH 7,1 y 7,5 son separadas de la preparación homogénea de la enzima por cromatografía de intercambio iónico (Kinzel et al., 1987). La forma de punto isoelectrico 7,5 parece representar a la primer holoenzima secuenciada (Shoji et al., 1983).

Hasta el presente, dos isoformas de la subunidad catalítica llamadas C α y C β (Uhler y McKnight, 1987; Showers y Maurer, 1986) han sido clonadas. Estas dos variantes son un 90 % homólogas entre sí en cuanto a la secuencia de aminoácidos, presentan numerosas sustituciones conservativas y las diferencias de secuencia están presentes en la región aminoterminal de las moléculas (Hotz et al., 1989 b).

Las isoformas C α y C β , inicialmente halladas en rata, han sido descriptas en diferentes organismos y las diferencias existentes entre ambas parecen estar evolutivamente conservadas (Maldonado y Hanks, 1988).

La caracterización preliminar de las isoformas de C no mostró diferencias en las propiedades de ambas; presentaron Kms similares para el ATP y el kémtido, así como la misma

susceptibilidad a ser inhibidas por el inhibidor termoestable (Olsen y Uhler, 1989).

La diferencia más notable entre estas isoformas es su patrón de expresión específico de tejido. En general, subunidades de tipo α son de expresión constitutiva en los tejidos analizados, mientras que las subunidades de tipo β se expresan fundamentalmente en cerebro, siendo sus niveles muy bajos en tejido no neuronal (McKnight et al., 1988).

Ambas isoformas son capaces de interactuar con RI y RII. La holoenzima de corazón bovino (de tipo II) parece contener una mezcla de subunidades $C\alpha$ y $C\beta$ (Uhler et al., 1986).

Una posible diferencia funcional entre ambos tipos de subunidades catalíticas puede ser su especificidad de sustrato, aspecto que aún no ha sido aclarado.

III.1.e MECANISMO DE ACCION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA

III.1.e.i Reconocimiento del sustrato

La subunidad catalítica de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico tiene un amplio rango de especificidad de sustratos proteicos tanto in vitro como in vivo (Nimmo y

Cohen, 1977). Numerosos sustratos peptídicos sintéticos han sido usados para establecer las estructuras determinantes de la especificidad de reconocimiento de la actividad fosforilante. Para la mayoría de los sustratos estudiados, la estructura primaria parece ser el elemento dominante, ya que péptidos cortos que contengan la secuencia Arg-Arg-Xxx-Ser-Xxx tienen propiedades cinéticas (K_m s de orden micromolar, V_m de orden de micromol/min/mg) comparables a las correspondientes a las proteínas intactas (Kemp et al., 1977).

III.1.e.ii Mecanismo de catálisis

La unión de los péptidos sustrato al sitio activo de la subunidad catalítica provoca cambios conformacionales de la molécula de C; dichos cambios inducidos por la unión del sustrato requieren que el péptido a ser fosforilado posea la secuencia básica antes mencionada, el residuo seril-hidroxilo y la capacidad de adoptar la conformación adecuada (Reed et al., 1985). La estructura de los péptidos Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly (Képtido) y Arg-Arg-Ala-Ser-Leu, ha sido estudiada por RMN en presencia de C y Mn^{2+} y los resultados indican que estos péptidos adoptan conformaciones extendidas al unirse a la enzima (Rosenear et al., 1984). Dada la confor-

mación extendida y la importancia de las dos argininas, el sitio de reconocimiento del péptido en esta enzima debe comprender una porción muy amplia de la molécula.

El Mg-ATP es el sustrato metal-nucleótido preferido por la subunidad catalítica (Walsh y Krebs, 1973). Estudios de RMN utilizando análogos del ATP permitieron conocer la geometría que adopta el nucleótido al unirse al sitio activo (Flockhart et al., 1984). El análisis del mecanismo de reacción indica que la cinética del estado estacionario sigue un mecanismo ordenado en el cual el ATP-Mg se une primero, luego el péptido fosforilable y el cambio conformacional inducido por la unión permite que la catálisis tenga lugar. Finalmente, se liberan secuencialmente el péptido fosforilado y el ADP-Mg (Withehouse et al., 1983).

III.1.f SUBUNIDAD REGULATORIA

III.1.f.i Estructura y organización de dominios funcionales

Ambos tipos de subunidades regulatorias I y II poseen una estructura dimérica formada por dos monómeros iguales unidos entre sí por una zona cercana al aminoterminal (Reimann, 1986; Bubis et al., 1987). Las descripciones del

dímero en términos de radio axial y coeficiente friccional indican una estructura oblonga y asimétrica (Takio et al., 1982). Los pesos moleculares determinados a partir de la secuencia de aminoácidos dan un valor de 42 K para el monómero de RI (Titani et al., 1984) y de 45 K para el de RII (Takio et al., 1982). Los pesos moleculares obtenidos en geles suelen arrojar valores mayores de peso molecular para ambas proteínas. Esto puede deberse a la asimetría de las moléculas, a la modificación del extremo aminoterminal por acetilación y a la presencia de aminoácidos fosforilados.

La proteólisis controlada permitió establecer tres dominios funcionales en cada monómero (Potter y Taylor, 1980). La región aminoterminal, bloqueada en el extremo por un acetilo, posee el dominio de dimerización. Le sigue una zona rica en prolina y muy susceptible al ataque proteolítico llamada "región bisagra" que contiene la secuencia esencial para la interacción con C. Finalmente, una región carboxiterminal en la cual se encuentran los dos sitios de ligado de AMPcíclico (Figura B).

La región aminoterminal de la molécula presenta una gran variabilidad de secuencia entre las diferentes subunidades regulatorias analizadas (Titani et al., 1984; Takio et al., 1984). Las interacciones entre los dos monómeros están res-

tringidas a los primeros 40 aminoácidos (Potter et al., 1978; Rannels y Corbin, 1980). En la subunidad regulatoria de tipo I, los dos monómeros están unidos por dos puentes disulfuro (Zick y Taylor, 1982).

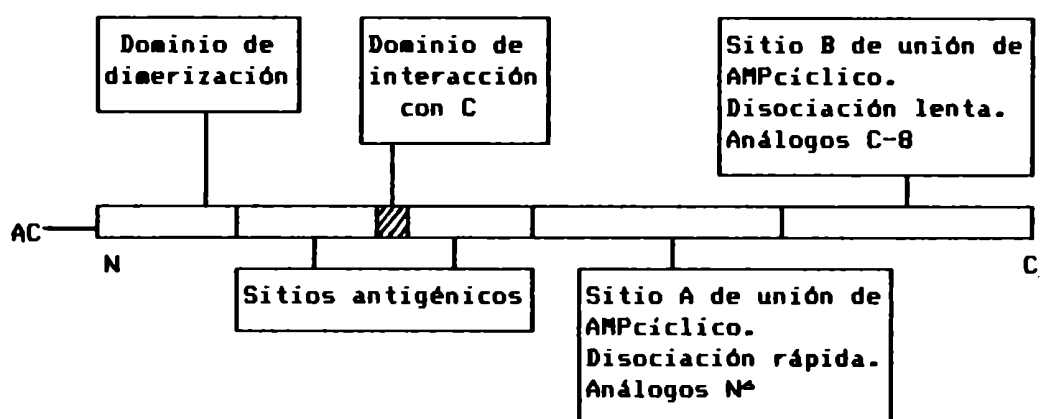


FIGURA B: Estructura general de los dominios de la subunidad regulatoria.

La mayoría de los sitios antigénicos de la subunidad regulatoria aislada y de la holoenzima se localizan en las regiones que flanquean a la región bisagra (Weldon y Taylor,

1985).

Los dos dominios de ligado del AMPcíclico están altamente conservados en todas las subunidades regulatorias. Cada monómero de la subunidad regulatoria I o II tiene dos clases diferentes de sitios de ligado de AMPcíclico; el uso de análogos del nucleótido cíclico permitió discriminar entre ambos (Beebe y Corbin, 1986). Los análogos sustituidos en N⁶ muestran preferencia de unión por el sitio A (referido como sitio 2 según otra nomenclatura) y los análogos sustituidos en C-8 se unen preferentemente al sitio B (sitio 1). Para ambas holoenzimas, el sitio 2 tiene una alta velocidad de disociación para el AMPcíclico mientras que el sitio 1 presenta una baja velocidad de disociación (Døskeland, 1978; Rannels y Corbin, 1980 y 1982; Corbin et al., 1982). Los análogos selectivos de sitios permitieron demostrar el sinergismo existente entre ambos sitios (Robinson-Steiner y Corbin, 1983; Beebe et al., 1984).

Excepto en los dominios de ligado del nucleótido, las secuencias de las regiones restantes de la molécula están menos conservadas (Robinson-Steiner et al., 1984) y ambas subunidades o sus respectivas holoenzimas pueden diferenciarse entre sí por características físicas, cinéticas e inmunológicas (Flockhart y Corbin, 1982).

III.1.f.ii Heterogeneidad de la subunidad regulatoria

Las similitudes de función de las subunidades regulatorias I y II se refleja en la alta homología de secuencia y en la conservada organización de los dominios de ambas proteínas. RI y RII son productos de distintos genes y las diferencias de secuencia se reflejan en las diferencias fisicoquímicas e inmunológicas que las caracterizan.

La existencia de formas heterogéneas (α y β) para ambos tipos de subunidades regulatorias (Nowak et al., 1987; Clegg et al., 1988; Jahnsen et al., 1986) y el hallazgo de diferencias de secuencia en segmentos cortos de las distintas isoformas (Robinson-Steiner et al., 1984.) sugieren que la secuencia primaria de la subunidad regulatoria ancestral no se ha conservado completamente a lo largo de la evolución.

En todas las variantes mencionadas se han conservado los principales dominios funcionales ya descriptos. La diferencia más notable entre las formas α y β de las subunidades regulatorias (al igual que lo que ocurre con las variantes de C) radica en su expresión específica de tejido. En general, las formas α se expresan constitutivamente en todos los tejidos analizados mientras que las formas β lo hacen en tejido neural. La variante RII β constituye una excepción, ya que es

inducible por FSH y estrógenos en células de la granulosa (Hedin et al., 1987) y también es expresada en tejido adiposo e hígado fetal.

La existencia de estas isoformas tal vez pueda ser explicada por su rol en la localización subcelular de las holoenzimas. La variante RI α es soluble en todas las células analizadas, en cambio las dos isoformas de RII se encuentran asociadas a membranas perinucleares, aparato de Golgi y microtúbulos y tal vez su función sea mantener anclada a la holoenzima hasta que la activación por AMPcíclico tenga lugar. RII β se une específicamente a una proteína de 75 KD que está presente en la membrana de las células de cerebro (Sarkar et al., 1984).

III.1.9 INHIBICION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA

Existen dos inhibidores fisiológicos de la actividad fosforilante de la subunidad catalítica. Uno de ellos es la subunidad regulatoria en ausencia de AMPcíclico y el otro es el inhibidor termoestable de la quinasa de proteína (Walsh et al., 1971). Aunque ambas proteínas son muy diferentes en estructura, hacen uso del mismo mecanismo para inhibir a C.

Para explicar el efecto inhibitorio de la subunidad

regulatoria, Jackie Corbin (1978) propuso el concepto de un dominio inhibitorio que es homólogo a y compite con, el sustrato proteico de la actividad catalítica. En efecto, este mecanismo parece ser general a todas las quinasas de proteína que, como ya se dijo, son enzimas altamente reguladas. Pero a diferencia de lo que ocurre con las demás quinasas de proteína, en la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico el componente regulatorio, capaz de actuar como un inhibidor competitivo del componente catalítico, está presente en una molécula diferente y disociable en vez de estar formando parte de la misma cadena polipeptídica.

III.1.g.i Mecanismo de acción de la subunidad regulatoria

Como ya se mencionó al describir las isoenzimas I y II, las diferencias entre ambas holoenzimas se deben exclusivamente a las diferencias estructurales de sus subunidades regulatorias. La subunidad regulatoria de tipo II es capaz de sufrir autofosforilación. El sitio de autofosforilación se sitúa en la porción aminoterminal de la cadena polipeptídica, específicamente en la región bisagra susceptible al ataque de numerosas proteasas. El hecho de que la subunidad regulatoria de tipo II pueda ser autofosforilada por medio de un mecanismo intramolecular que no requiere disociación de la holoenzima

ma (Potter y Taylor, 1979; Takio et al., 1984), fue el primer indicio de que la región bisagra ocupa el sitio de ligado del sustrato en la subunidad catalítica.

La región bisagra contiene dos residuos arginina al igual que los péptidos que son sustrato de la actividad de C. Para las subunidades regulatorias de tipo II, una serina se encuentra a continuación del motivo Arg-Arg-Xxx y en las subunidades de tipo I, este aminoácido está reemplazado por una alanina (Figura C).

En la región bisagra de RII, entonces, se encuentra un sitio de fosforilación, en cambio en la región bisagra de RI el reemplazo de serina por alanina en la secuencia Arg-Arg-X-Ser crea un sitio de pseudofosforilación debido a la ausencia del aminoácido fosforilable (Titani et al., 1984).

La subunidad regulatoria se comporta como un inhibidor competitivo frente a los péptidos sustrato de la actividad fosforilante de C ya que es capaz de ocupar el sitio de unión del péptido de la subunidad catalítica con una secuencia homóloga a la de los sustratos. Esta característica de la interacción entre las subunidades de la quinasa impide el acceso de los sustratos al sitio activo de la subunidad catalítica.

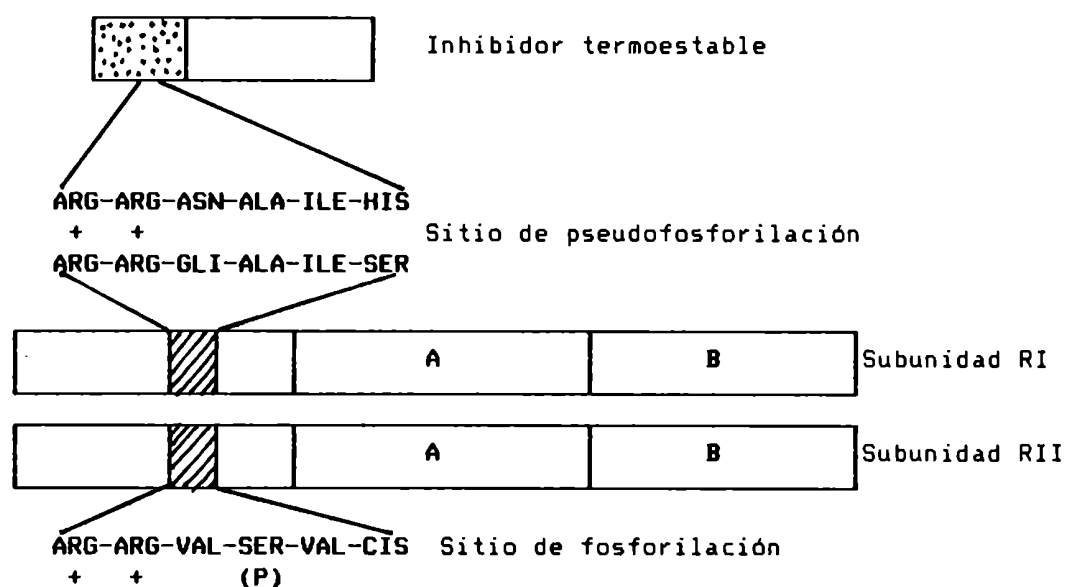


FIGURA C: Dominios inhibitorios de las subunidades regulatorias de tipo I y II y del inhibidor termoestable. Las secuencias de RI y RII que se indican comienzan en los residuos 94 y 92 respectivamente. : región bisagra. A y B: dominios de unión de AMPcíclico.

Numerosas evidencias confirman la importancia de la región bisagra de la subunidad regulatoria para que la interacción con C tenga lugar. La proteólisis controlada de las subunidades regulatorias permitió el mapeo del dominio de interacción con la subunidad catalítica. Cabe aclarar que la proteólisis de la región bisagra de la subunidad regulatoria implica en todos los casos la remoción de la región aminoter-

minal de la molécula y con ello, la remoción del dominio de dimerización de la subunidad regulatoria. La unidad funcional de estudio de la interacción de las subunidades regulatoria y catalítica, con este tipo de aproximaciones, es entonces el dímero RC, que, como se comenta más adelante, conserva las principales propiedades de la holoenzima tetramérica (Rannels et al., 1985).

La proteólisis controlada de la subunidad regulatoria de corazón porcino dió lugar a dos fragmentos carboxiterminales de la molécula de RII, que se diferencian en tres residuos; el mayor de ellos se originó por clivaje en Asp-91, inmediatamente antes de los dos residuos de arginina que preceden a la serina fosforilable. Este fragmento de la subunidad regulatoria conserva la capacidad de inhibir a C. Por otra parte, el fragmento menor originado por clivaje en Val-94, es incapaz de formar el complejo con la subunidad catalítica (Weldon y Taylor, 1985). Estos resultados indican que los residuos arginina son esenciales para la interacción entre ambas subunidades.

El estudio de mutantes con diferente grado de deleciones en la subunidad regulatoria permitió reunir mayor cantidad de evidencias a favor del modelo de interacción RC, permitiendo además analizar las estructuras esenciales partiendo del ex-

tremo carboxiterminal. Así, la subunidad regulatoria de tipo I que carece del segundo dominio de ligado de AMPcíclico (sitio B), mostró ser capaz de formar el complejo con la subunidad catalítica; este complejo fué disociado en presencia de AMPcíclico. Estos resultados permitieron establecer la mínima estructura necesaria para la interacción RC susceptible de ser disociada por AMPcíclico; un fragmento de la subunidad regulatoria que conserva, desde el aminoterminal, las dos argininas y el primer sitio de ligado de AMPcíclico (sitio A).

Cabe señalar, sin embargo, que la inhibición de la subunidad catalítica por la subunidad regulatoria no se basa únicamente en la interacción establecida a través del dominio inhibitorio de R y el sitio de ligado de sustrato de C. Los sustratos se unen a C con Kms de orden micromolar (Kemp et al., 1977), mientras que la Kd para R como inhibidor de C es 0,2 nM (Hofmann, 1980). Además, la subunidad regulatoria de tipo II desnaturalizada por calentamiento es reconocida como sustrato por la subunidad catalítica aunque es totalmente incapaz de inhibir su actividad (Flockhart et al., 1980). Es evidente que entre R y C deben existir otro tipo de interacciones que conduzcan al establecimiento del complejo. Levin et al. (1988) describieron que la sustitución del residuo

Tre-241 (fosforilado en la enzima de mamifero) por alanina en la subunidad catalítica de la quinasa de levaduras conduce a una dramática reducción de la afinidad por R in vitro y a la ausencia de regulación por AMPcíclico de la enzima in vivo. Recientemente, Levin y Zoller (1990), demostraron que el reemplazo por aspártico o glutámico de la Tre-241 puede simular el efecto de la fosfotreonina en esa posición y mantener la interacción entre R y C. Estos resultados indican que la asociación entre las subunidades regulatoria y catalítica requiere de un residuo cargado negativamente en la posición 241 de C, y los autores proponen que dicho residuo debe interactuar con un aminoácido cargado positivamente de la subunidad regulatoria, al que aún no se ha identificado.

III.1.g.ii Mecanismo de acción del inhibidor termoestable

Se han descripto numerosas isoformas del inhibidor termoestable de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico en tejidos de mamíferos (Walsh et al., 1961; McPherson et al., 1979). Aunque el rol fisiológico de este inhibidor no ha sido claramente establecido, se lo ha utilizado en numerosos estudios de mecanismo de acción de la quinasa.

El inhibidor termoestable de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico parece inhibir a la subunidad cata-

lítica por un mecanismo similar al descrito para la subunidad reguladora (Withehouse y Walsh, 1983). Al igual que la subunidad reguladora de tipo I, el inhibidor posee un sitio de pseudofosforilación (Figura C) y numerosos estudios indican que este sitio es esencial para que la inhibición de C tenga lugar (Cheng et al., 1986).

III.1.h HOLOENZIMAS DIMERICAS. COMPONENTES REGULATORIOS MONOMERICOS

En los organismos superiores y en la mayoría de los eucariotas inferiores las holoenzimas caracterizadas corresponden a la estructura tetramérica del tipo R_2C_2 . Sin embargo, se han detectado varias especies de quinasa con menos de 4 subunidades en diferentes tejidos animales y su existencia se atribuye a la degradación proteolítica de la holoenzima durante el proceso de extracción (Rubin et al., 1972; Corbin et al., 1972). La aparición espontánea de formas de holoenzima de tipo RC se ha descrito en numerosos sistemas (Hofmann et al. 1975; Vogel y Heinz, 1980; Rangel-Aldao y Rosen, 1977; Paveto et al., 1989). Se obtuvieron formas modificadas por proteólisis in vitro de la holoenzima de tipo I de músculo esquelético (Rannels et al., 1985) y de la de tipo II de corazón bovino (Reimann, 1986). En todos estos

casos, estas especies de quinasa se comportan como dímeros en gradientes de sacarosa y en filtración molecular.

Los estudios detallados de estas formas modificadas de holoenzima permitieron establecer la organización de los dominios de la subunidad regulatoria y los requerimientos para la interacción con C, aspectos que han sido detallados en los ítems III.1.f.i y III.1.g.i de esta Introducción. Se determinó que la proteólisis endógena o provocada in vitro ocurre preferencialmente en la región amino terminal de la subunidad regulatoria. La proteólisis de esa zona de la molécula genera una subunidad regulatoria que ha perdido el dominio de dimerización pero que puede conservar el dominio de interacción con C y los dos sitios de ligado del nucleótido. De esta manera, la subunidad regulatoria modificada conserva la capacidad de inhibir a la subunidad catalítica en ausencia de AMPcíclico. Rannels et al. (1985) confirmaron que la forma monomérica de la subunidad regulatoria de tipo I, capaz de formar una holoenzima de tipo RC, conserva las propiedades cinéticas de la subunidad regulatoria dimérica nativa que forma la holoenzima R_2C_2 .

Aunque la naturaleza dimérica de la subunidad regulatoria parece haberse conservado en la gran mayoría de las qui-

nasas de proteína dependientes de AMPcíclico estudiadas, la condición de dímero no parece ser necesaria para la formación del complejo con la subunidad catalítica, hecho que permite pensar en la existencia de formas nativas de holoenzimas de tipo RC. En D.discoideum la subunidad regulatoria de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico se aisló como monómero (Majerfeld et al., 1984) y los experimentos de reconstitución llevados a cabo con las subunidades catalítica y regulatoria purificadas permitieron proponer una estructura dimerica RC para la holoenzima de este organismo (de Gunzburg et al., 1984). Finalmente, el análisis de la secuencia del cADN que codifica para esta proteína permitió establecer que esta subunidad regulatoria presenta un alto grado de homología con las subunidades regulatorias de las quinasas de mamífero pero carece de los 70 residuos de la región amino terminal correspondiente al dominio de dimerización (Mutzel et al., 1987). La ausencia de la secuencia que codifica para el dominio que permite la asociación de los monómeros de R confirma la naturaleza monomérica del componente regulatorio y por lo tanto la estructura de tipo RC para la quinasa de este organismo.

III.1.1 QUINASAS DE PROTEINA DEPENDIENTES DE AMPcíclico EN EUCARIOTAS INFERIORES

Han sido descriptas actividades de quinasa dependiente de AMPcíclico en varios de estos organismos. La mayor parte de estas enzimas mostraron características funcionales similares a las descriptas para las quinasas de organismos superiores. La gran mayoría de las holoenzimas caracterizadas presentaron estructura tetramérica, con excepción de la quinasa de D.Discoideum.

En S.cerevisiae se describió una quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico comparable a la isoenzima de tipo II de mamífero (Hixson y Krebs, 1980). Estudios genéticos y bioquímicos demostraron que en las levaduras tres genes codifican para la subunidad catalítica de la enzima, y un único gen es responsable de la expresión de la subunidad regulatoria (Toda et al., 1987). El estudio de mutantes permitió obtener datos acerca de los requerimientos estructurales para la interacción de los componentes regulatorio y catalítico (Levin y Zoller, 1990).

En Trypanosoma cruzi se describió una quinasa dependiente de AMPcíclico cuya subunidad regulatoria es capaz de sufrir autofosforilación y es reconocida por anticuerpos contra

la subunidad regulatoria de tipo II de la quinasa de mamíferos (Ulloa et al., 1988).

En el hongo dimórfico Mucor rouxii la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico eluye de una columna de DEAE-celulosa como las holoenzimas de tipo II de eucariotas superiores (Moreno y Passeron, 1980). Presenta la peculiaridad de no disociarse por la sola presencia del nucleótido cíclico, requiriendo además el agregado del sustrato o de ClNa. El monómero de la subunidad regulatoria tiene un peso molecular notoriamente alto (75 K) (Pastori et al., 1985).

Quinasas de proteína similares a las de tipo I y II han sido descritas en el basidiomicete C.macrorhizus (Uno e Ishikawa, 1981). Estudios importantes han sido los de Trevillyan y Pall (1982) y Glikin et al.(1982) en N.crassa y los de Lopez Gomes et al. (1983) en Blastocladiella emersonii.

En las ciliias de Paramecium tetraurelia se describe una quinasa de tipo II, tetramérica, y se propone una estructura dimerica para la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico detectada en el citoplasma (Hochstrasser y Nelson, 1989) aunque aún no hay evidencias suficientes que permitan confir-

mar la estructura propuesta. En cambio, en el acrasial D.discoideum, por medio del clonado y análisis de la secuencia del gen de la subunidad regulatoria de la quinasa, pudo establecerse que la forma nativa de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico es un dímero de tipo RC (de Gunzburg et al., 1984; Mutzel et al., 1987).

III.1.j HOMOLOGIA Y EVOLUCION DE PROTEINAS LIGANTES DE NUCLEOTIDOS CICLICOS

Como se dijo anteriormente, la familia de las quinasas de proteína incluye un grupo amplio y diverso de macromoléculas que comparten una serie de características comunes relacionadas con su función catalítica. Los mecanismos de regulación y activación de las diferentes quinasas son característicos de la quinasa en cuestión y estas diferencias se reflejan en los dominios que no guardan entre sí relaciones evolutivas evidentes.

Desde el punto de vista evolutivo, actualmente se tiende a pensar que los componentes regulatorio y catalítico de las quinasas de proteína dependientes de AMPcíclico han evolucionado independientemente uno del otro; la subunidad catalítica posee los elementos comunes de la familia de las quinasas de

proteína y la subunidad regulatoria es uno de los miembros de la familia de las proteínas ligantes de AMPcíclico.

Dos quinasas de proteína comparten la propiedad de ser reguladas por nucleótidos cíclicos; la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico y la quinasa de proteína dependiente de GMPcíclico. No hay evidencias concretas de la existencia de quinasas de proteína dependientes de AMPcíclico en procariotas, pero estos organismos disponen de una proteína ligante de AMPcíclico: la proteína CRP (Seville et al., 1984; Brostrom et al., 1983).

La quinasa de proteína dependiente de GMPcíclico es un dímero formado por dos monómeros idénticos de 670 aminoácidos cada uno. Cada monómero contiene un dominio regulatorio amino terminal, con dos sitios homólogos de ligado de GMPcíclico, y un dominio catalítico carboxiterminal (Takio et al., 1984). La región aminoterminal contiene la secuencia responsable de la dimerización y un sitio de autofosforilación (Aitken et al., 1984; Hofmann y Flockerzi, 1983).

Lincoln y Corbin (1983) compararon las propiedades físicas y cinéticas así como la secuencia de aminoácidos de las quinasas de proteína dependientes de AMPcíclico y GMPcíclico y propusieron un modelo de homología estructural para

estas dos enzimas. Sugirieron que los dos sitios de ligado de los nucleótidos cíclicos de cada una de las dos quinasas habrían evolucionado por duplicación de genes (Flockhart y Corbin, 1982; Corbin y Døskeland, 1983; Rannels y Corbin, 1980). El alto grado de homología que presentan las secuencias regulatorias de ambas enzimas argumenta a favor de un ancestro común para ambas (Takio et al., 1984). La región que presenta menor homología corresponde a las secuencias de dimerización, lo que sugiere que en el extremo 5' de ambos componentes regulatorios han ocurrido diferentes rearrreglos génicos.

La proteína CRP es un dímero asimétrico (Pabo y Lewis, 1982) formado por dos monómeros idénticos. Cada uno de ellos lleva un dominio de ligado de AMPcíclico y un dominio carboxiterminal de unión al ADN que presenta gran homología estructural y de secuencia con los dominios de unión al ADN de represores virales y bacterianos (Anderson et al., 1981; Pabo y Lewis, 1982). El ligado de AMPcíclico a CRP muestra cooperatividad (Takahashi et al., 1980). En base a la estructura cristalina de esta proteína se diseñó un modelo general para el dominio de unión de nucleótidos cíclicos (Weber et al., 1987).

Los sitios de unión del AMPcíclico de la subunidad regu-

latoria de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico fueron localizados mediante el marcado por fotoafinidad con análogos del nucleótido y por la proteólisis limitada de la molécula (Flockhart y Corbin, 1982; Kerlavage y Taylor, 1980). El análisis de la secuencia de aminoácidos (Titani et al., 1984; Takio et al., 1984) confirmó no sólo la duplicación génica propuesta para el origen evolutivo de los dos sitios sino también la estrecha relación entre los dominios de unión de AMPcíclico de la subunidad regulatoria, de la proteína CRP, y de los dominios de unión del nucleótido de la quinasa de proteína dependiente de GMPcíclico (Weber et al., 1989). Los aminoácidos asociados a la unión del fosfato cíclico y de la ribosa en CRP - Arg-82 y Glu-72 - se encuentran conservados en las posiciones 200 y 209 de las moléculas de RI, RII y de la quinasa de proteína dependiente de GMPcíclico. La conservación de estos residuos confirma la validez del modelo basado en la estructura de CRP como armazón general de los dominios de ligado de nucleótidos cíclicos.

IV. LAS FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS

IV.1 GENERALIDADES. CLASIFICACION.

En 1971, Thompson y Appleman describieron la existencia de formas moleculares múltiples de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, enzima responsable de la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos 3',5'-monofosfato para dar los correspondientes nucleótidos 5'-monofosfato. Inicialmente descrita en cerebro, los estudios posteriores indicaron que una amplia variedad de formas moleculares de esta actividad están presentes en las células de todos los tejidos y organismos analizados: en hígado (Yamamoto et al., 1984), músculo liso (Thompson et al., 1979; Lugnier et al., 1986), plaquetas (Weishaar et al., 1986), monocitos (Thompson et al., 1980), adipocitos (Elks et al., 1983).

Las diferentes formas de fosfodiesterasa varían considerablemente en cuanto a la especificidad de sustrato (AMPcíclico y/o GMPcíclico), características cinéticas, sensibilidad a reguladores alostéricos, respuesta a inhibidores y a numerosos agentes farmacológicos. Para un mismo sistema, los métodos de fraccionamiento utilizados influyen notoriamente en el número de formas moleculares puestas en evidencia (Van Inwegen et al., 1976). La aparición de algunas de esas formas de fosfodiesterasa puede deberse también a proteólisis endógena de la molécula original (Epstein et al., 1978, Sakay et al., 1978), a la formación de agregados

(Naridrasorasak et al., 1982), a fenómenos de fosforilación y defosforilación (Weber y Appleman, 1982).

Se desarrollaron gran variedad de procedimientos con la finalidad de aislar y clasificar las diferentes enzimas responsables de la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos. La cromatografía de intercambio iónico fue utilizada con éxito para detectar las formas múltiples de esta actividad en numerosos sistemas (Thompson et al., 1979). Los primeros intentos de identificación y caracterización de estas enzimas se basaron en la posición de elución en cromatografías de DEAE-celulosa. Este sistema resultó inadecuado debido a las dificultades en la comparación de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios. Tampoco resultó satisfactorio un sistema de clasificación de las diferentes enzimas en base a su especificidad de sustrato (AMPcíclico o GMPcíclico) ya que muchas formas de fosfodiesterasa son capaces de hidrolizar ambos nucleótidos con eficiencias comparables. Un sistema de clasificación que contempla la especificidad de sustrato, las propiedades cinéticas y las características regulatorias de estas enzimas las agrupa en cuatro categorías principales:

Tipo I: Fosfodiesterasas sensibles a calmodulina: Incluye a las enzimas también llamadas de alta K_m " o de " baja afi-

nidad ", de tipo mixto, es decir que hidrolizan AMPcíclico y GMPcíclico. Su actividad es estimulada en presencia de Ca^{++} -calmodulina.

Tipo II: Fosfodiesterasas sensibles a GMPcíclico: Incluye diesterasas de tipo mixto. Su actividad es estimulada por GMPcíclico.

Tipo III: Fosfodiesterasa de GMPcíclico sensible a rodopsina: fosfodiesterasa activada por luz presente en los bastoncillos de la retina.

Tipo IV: Fosfodiesterasas de AMPcíclico: también llamadas de alta afinidad o de baja K_m ". Incluye enzimas que hidrolizan específicamente AMPcíclico.

Teniendo en cuenta este esquema de clasificación de las actividades de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, la inclusión de una forma enzimática dentro de alguno de los cuatro tipos mencionados implica el estudio de la especificidad de sustrato así como la sensibilidad de la enzima en cuestión a efectores tales como el GMPcíclico o el complejo Ca^{++} -calmodulina. La falta de respuesta a un efector en una fracción enzimática de alguno de los pasos de purificación de la enzima a caracterizar no refleja necesariamente la ausencia de respuesta en la enzima nativa; muchas de las fosfo-

diesterasas son altamente sensibles a proteólisis y a menudo los productos de proteólisis endógena o generada en el proceso de extracción son completamente activos pero insensibles a efectores (Tucker et al., 1981; Miki et al., 1975). Así mismo, fosfodiesterasas de AMPcíclico estimulables por GMPcíclico suelen identificarse por el efecto de este último sobre la actividad degradante del AMPcíclico. La presencia simultánea de otras fosfodiesterasas en el sistema puede eclipsar el efecto estimulante del GMPcíclico por el aumento de la actividad basal hidrolítica de AMPcíclico o por la degradación del activador alostérico. Las dificultades en el estudio de las propiedades y en la caracterización de las distintas formas de fosfodiesterasa complican severamente la inclusión de una enzima particular en alguno de los grupos antes mencionados.

VI.1.a FOSFODIESTERASAS SENSIBLES A CALMODULINA

Este grupo incluye a la primer enzima descrita, la fosfodiesterasa de nucleótido cíclico de alta K_m activada por Ca^{++} -calmodulina (Butcher y Sutherland, 1962) que ha sido purificada a partir de cerebro (Cheung, 1970; Kincaid et al., 1981) y de corazón bovino (La Porte et al., 1979). La particularidad de esta forma enzimática citosólica es la de

ser activada cerca de diez veces por el complejo Ca^{++} -calmodulina; la proteólisis limitada la convierte en formas totalmente activadas, independientes de la presencia del complejo activador (Tucker et al., 1981).

La enzima de cerebro es fosforilada in vitro por la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico (Sharma et al., 1980): la enzima incorpora dos moléculas de fosfato por molécula de fosfodiesterasa. No se han detectado modificaciones de la actividad enzimática por efecto de la fosforilación ni se ha demostrado que ésta tenga lugar in vivo. Ambos nucleótidos cíclicos son sustrato de esta enzima, con valores de K_m aproximadamente 10 μM para el GMPcíclico y 200 μM para el AMP cíclico.

Los estudios inmunológicos han mostrado que anticuerpos preparados contra la enzima de corazón reaccionan contra la enzima de cerebro (Hansen y Beavo, 1982). Los pesos moleculares determinados por electroforesis en geles con SDS son de 61 K para la forma de cerebro y de 59 K para la de corazón.

Se ha descrito una tercer enzima, la fosfodiesterasa de AMPcíclico de baja K_m de membranas de hígado y corazón de pollo (Smoake et al., 1981; Purvis et al., 1981) que responde también a la estimulación del complejo Ca^{++} -calmoduli-

na, pero que no es reconocida por anticuerpos contra las fosfodiesterasas estimulables por calmodulina de cerebro o corazón.

VI.1.b FOSFODIESTERASAS SENSIBLES A GMPcíclico

Todas estas formas enzimáticas unen GMPcíclico con alta afinidad en un sitio aparentemente distinto del sitio del sustrato. Se incluyen en este grupo a la fosfodiesterasa estimulada por GMPcíclico de adrenales y corazón y a la de plaquetas y pulmón.

El peso molecular de la fosfodiesterasa purificada de glándula adrenal y corazón bovino, calculado a partir de electroforesis en geles con SDS, es de 105 K. En ausencia de SDS, la banda que corresponde a la enzima es de 240 K y el coeficiente de sedimentación de esta forma es de 8,8 S (Martins et al., 1982). La enzima cataliza la hidrólisis de AMPcíclico y GMPcíclico con valores de K_m de 40 μM y 10 μM respectivamente. Los estudios cinéticos muestran cooperatividad positiva para la hidrólisis de ambos nucleótidos (Terasaki y Appleman, 1975). Niveles subsaturantes de GMPcíclico, activador alostérico de la enzima, estimulan la hidrólisis de AMPcíclico cuando la concentración de este último es menor

que la saturación (Beavo et al., 1971).

La fosfodiesterasa de plaquetas hidroliza casi exclusivamente GMPcíclico, presentando además sitios de unión a GMP cíclico distintos de los sitios catalíticos (Coquil et al., 1980).

La fosfodiesterasa de pulmón, que parece ser idéntica a la de plaquetas, comparte con la quinasa de proteína dependiente de GMPcíclico la categoría de receptoras del nucleótido cíclico en ese tejido (Francis et al., 1980).

IV.1.d FOSFODIESTERASA DE de GMPcíclico SENSIBLE A RODOPSINA

La fosfodiesterasa de GMPcíclico de los bastoncillos de la retina está formada por tres subunidades: α de 88 K, β de 84 K y τ de 11 K (Baehr et al., 1979). La subunidad τ es responsable de la inhibición de la actividad y la tripsinización de la misma da lugar a la activación de la enzima (Hurley y Stryer, 1982).

La actividad de la fosfodiesterasa de la retina está bajo el control de la rodopsina. La rodopsina activada por la luz activa a la fosfodiesterasa mediante un mecanismo análogo la activación de la adenilato ciclasa mediada por hormonas.

GTP y una proteína de la membrana que pertenece a la familia de las proteínas ligantes de GTP, la transducina, son los elementos necesarios para la transducción de la señal luminosa dentro de la célula y que resulta en la activación de la fosfodiesterasa (Stryer et al., 1981).

La rodopsina activada por la luz permite la formación del complejo transducina-GTP capaz de activar a la fosfodiesterasa mediante un mecanismo que no está del todo aclarado pero que implica la anulación del efecto inhibitorio de la subunidad τ de la enzima. La activación se revierte mediante la conversión del GTP a GDP por la actividad GTPásica de la transducina (Fung et al., 1981).

Esta fosfodiesterasa ha sido purificada de retina bovina y de retinas de anfibios (Miki et al., 1975; Baehr et al., 1979). La enzima hidroliza únicamente GMPcíclico y al igual que las enzimas de corazón y pulmón, posee sitios de unión de GMPcíclico de alta afinidad y distintos del sitio catalítico (Stryer, 1986).

IV.1.e FOSFODIESTERASAS DE AMPcíclico

Este grupo incluye a las fosfodiesterasas asociadas a membranas, de baja K_m , con marcada preferencia por el AMPcíclico.

clico al que hidrolizan con K_m del orden μM . Esta actividad es insensible a Ca^{++} -calmodulina y se regula por la concentración de sustrato en forma cooperativa negativa (Marchmont et al., 1981).

Las fosfodiesterasas de AMPcíclico de alta afinidad han sido divididas en dos subtipos: uno incluye a las enzimas inhibibles por GMPcíclico y el otro a aquellas actividades insensibles al GMPcíclico (Yamamoto et al., 1984; Reeves et al., 1987). La enzima de corazón, sensible a la inhibición por fármacos cardiotónicos (Harrison et al., 1986), pertenece a la forma inhibible por GMPcíclico. En el riñón la forma insensible al nucleótido parece ser la mayoritaria.

La fosfodiesterasa de baja K_m de membranas de hígado y de tejido adiposo (Francis y Kono, 1982) se estimula en presencia de dosis fisiológicas de insulina. La enzima de hígado se fosforila por acción de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico y esta fosforilación guarda una relación estrecha con el aumento de su actividad por efecto de la insulina (Marchmont y Houslay, 1980).

IV.2 FOSFODIESTERASAS EN EUCARIOTAS INFERIORES

La enzima que degrada los nucleótidos cíclicos ha sido

estudiada en numerosos eucariotas inferiores y la presencia de más de una forma de fosfodiesterasa ha sido descripta en varios de estos organismos; en la mayoría de los casos resulta difícil asimilar a estas enzimas a alguno de los tipos descriptos para eucariotas superiores.

En N.crassa se han descripto varias actividades solubles de fosfodiesterasa, resolviéndose dos formas; una capaz de hidrolizar AMPcíclico y GMPcíclico y otra fundamentalmente activa sobre GMPcíclico. Cada uno de estos tipos se presentan como formas agregadas interconvertibles entre sí (Téllez-Iñón et al., 1982); la forma mixta es de alta afinidad para los dos sustratos y se regula por calmodulina (Téllez-Iñón et al., 1985).

El acrasial D.discoideum presenta dos clases de actividades de fosfodiesterasa: una de ellas hidroliza AMPcíclico y GMPcíclico con velocidades similares; estas enzimas están localizadas en la fracción soluble, sobre la superficie celular y una de ellas es excretada al medio extracelular (Riedel y Gerish, 1971; Orlow et al., 1981); la actividad de esta última es modulada por la cosecreción de una proteína inhibidora (Dicou y Brachet, 1979). La segunda clase de enzimas hidroliza solamente GMPcíclico y su localización es intracelular (Bulgakov y Van Haastert, 1982). La fosfodiesterasa de

GMPcíclico de este organismo se estimula con bajas concentraciones del nucleótido y el uso de derivados de GMPcíclico permitió detectar dos tipos de sitios para el nucleótido en la proteína; un sitio catalítico y un sitio de activación (Kesbeke et al., 1985).

Las fosfodiesterasas de S.cerevisiae han sido exhaustivamente estudiadas. Estas levaduras mostraron tener al menos dos fosfodiesterasas de AMPcíclico. La actividad de una de ellas es independiente del agregado de cationes divalentes, no se inhibe con EDTA y presenta baja afinidad por el sustrato (Fujimoto et al., 1974). La otra enzima es de alta afinidad y su actividad es dependiente de Mg^{++} . Esta proteína contiene zn^{++} fuertemente unido en su estructura (Londesborough y Suoranta, 1983). Los genes que codifican para ambos tipos de fosfodiesterasas han sido clonados y secuenciados (Sass et al., 1986; Nikawa et al., 1987).

En el hongo dimórfico M.rouxii se describió una fosfodiesterasa soluble de alta afinidad, específica para la hidrólisis de AMPcíclico. Esta enzima es activada reversiblemente por fosforilación dependiente de AMPcíclico e irreversiblemente por proteólisis limitada (Galvagno et al., 1979; Moreno et al., 1982). Esta actividad se presenta como dos

formas; una que puede ser activada por los mecanismos antes mencionados y otra insensible a los mismos, derivada de la forma sensible (Kerner et al., 1984). La fosforilación o la proteólisis incrementan la V_m de la enzima sin modificar el valor de la K_m (Tomes et al., 1988-89).

IV.3 LA DEGRADACION DE LOS NUCLEOTIDOS CICLICOS. FUNCION DE LAS FORMAS MULTIPLES DE FOSFODIESTERASA

El estudio de las actividades de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos presenta un interés particular ya que la reacción que cataliza constituye la primera etapa del catabolismo de los nucleótidos cíclicos. Numerosos estudios han demostrado que la fosfodiesterasa tiene una importancia comparable a la de la adenilato ciclasa en la determinación de los niveles intracelulares de AMPcíclico en los sistemas en los cuales este segundo mensajero dirige diferentes respuestas celulares (Erneux et al., 1980; Reynolds, 1982).

Muchos tejidos contienen varias formas distintas de fosfodiesterasas no interconvertibles, particuladas o citosólicas. Las múltiples formas muestran a menudo una expresión regulada durante los ciclos de crecimiento (Lad et al., 1984; Neuman, 1983). Numerosos estudios sugieren que varias formas

múltiples de fosfodiesterasa son entidades moleculares diferentes (Takemoto et al., 1982).

La existencia de múltiples formas de fosfodiesterasa, que varían en cuanto a la especificidad de sustrato, características cinéticas, distribución subcelular y respuesta a efectores alostéricos, también sugiere que la regulación de la comunicación intracelular que utiliza la vía de los nucleótidos cíclicos ocurre tanto a nivel de la síntesis de estos últimos como a nivel de su degradación. El papel a cumplir por las diferentes isoenzimas depende de la forma en que cada una de ellas puede ser individualmente regulada. La distribución diferencial de las distintas formas de fosfodiesterasa en los diferentes tejidos, así como la identificación de subclases funcionales de estas moléculas, indican el alto grado de flexibilidad potencial de la célula en respuesta a los estímulos ambientales.

OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

Los antecedentes mencionados en el ítem II de la Introducción demuestran la participación del AMPcíclico en el proceso fotomorfogenético que conduce a la formación de estructuras reproductivas en el ascomicete Saccobolus platensis.

Con la finalidad de profundizar en el estudio bioquímico y molecular tendiente a dilucidar los mecanismos mediante los cuales el AMPcíclico ejerce su acción como mediador endógeno de la respuesta a la luz en este organismo, se encaró el estudio de las enzimas relacionadas con el nucleótido cíclico:

- Quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico: su existencia y propiedades.
- Fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos: su identificación y caracterización.

1. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO

1.1 ORGANISMO Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA

Se utilizó la cepa C-1205 de Saccobolus platensis aislada y caracterizada por Gamundí y Ranalli, 1969.

La cepa se conservó en cajas de Petri conteniendo un disco de papel Whatman Nº 1 como fuente de carbono y 10 ml de una solución que contenía 3 g de extracto de levadura y 20 g de agar por litro de agua destilada (medio PF). Debido a la pérdida de fertilidad que presenta este organismo, como toda ascobolácea, con el paso del tiempo y los sucesivos repiques, se llevó a cabo periódicamente el rejuvenecimiento del cultivo de acuerdo al método descrito por Forchiassin (1989). Brevemente, el organismo se cultivó en cajas de Petri conteniendo estiércol tindalizado y al madurar los apotecios las ascosporas se cosecharon colocando a modo de tapa una caja de Petri con agar-agua. La germinación de las ascosporas se indujo por tratamiento alcalino en las cajas de agar-agua, luego se incubaron a 37 °C durante 48-72 horas hasta la aparición de las hifas que se transfirieron a picos de flauta con medio PF.

1.2 CULTIVOS

El micelio utilizado en el trabajo se cultivó en frascos Erlenmeyer de 4 litros que contenían 2 litros de medio líquido sintético con glucosa y asparragina como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente (Groisman et al., 1981). El inóculo consistió en tarugos de agar-micelio sacados de las cajas de Petri con medio PF. El organismo se cultivó aeróbicamente en presencia de luz y con agitación continua (200 rpm), a 24 °C durante 4 o 5 días. El micelio se cosechó por filtración al vacío, se lavó con abundante agua destilada fría, se molió en mortero de porcelana con nitrógeno líquido, y se guardó a -70 °C hasta el momento de ser usado.

2. PURIFICACION DE LA QUINASA DE PROTEINA DEPENDIENTE DE AMPcíclico

2.1 OBTENCION DE LA HOLOENZIMA

2.1.a PREPARACION DEL EXTRACTO SOLUBLE DE MICELIO. Todas las operaciones se realizaron a 4 °C. El polvo de micelio se suspendió en tres volúmenes de solución conteniendo buffer Tris HCl 20 mM pH:8; β -mercaptoetanol 1,5 mM; EDTA 1 mM; PMSF 0,4 mM; EGTA 5 mM; antipaina 3 μ g/ml; azida sódica 1 mM (so-

lución A). La mezcla se homogeneizó en un homogenizador Ultra-Turrax T25 a la máxima velocidad (dos golpes de 30 segundos cada uno) y se dejó 45 minutos en agitación suave con barra magnética. Al cabo de este tiempo el homogenado se centrifugó a 105.000 x g durante 90 minutos. El sobrenadante constituyó la fracción S-100.

2.1.b CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DE-52. Se sembraron 120 ml de la fracción S-100 (3 mg/ml de proteína) proveniente de 40 g de micelio en una columna de DE-52 (1,2 x 14 cm) equilibrada en solución A. La columna se lavó con dos volúmenes de la misma solución y la proteína retenida se eluyó con un gradiente lineal de ClK de 0 a 0,3 M preparado en solución A (volumen total del gradiente: 400 ml). Se recogieron fracciones de 4 ml y se midió capacidad ligante de AMPcíclico y actividad de quinasa de proteína en alícuotas apropiadas de cada fracción. Aquellas fracciones que presentaron actividad de quinasa de protamina y proteína ligante de AMPcíclico se reunieron y se utilizaron como fuente de holoenzima (fracción de DE-52).

2.2 PURIFICACION PARCIAL DE LA SUBUNIDAD CATALITICA

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE AMPcíclico-AGAROSA: Una alícuota

de la fracción de DE-52 (aproximadamente la sexta parte del total) se concentró por precipitación con $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ sólido al 80% de saturación. El pellet se resuspendió en solución A, se dializó contra la misma solución, se clarificó por centrifugación, y la holoenzima presente en la preparación se disoció en sus subunidades regulatoria y catalítica por pasaje a través de una columna de N6-amino-AMPcíclico-agarosa (1 ml de resina) previamente equilibrada en solución A. La columna se lavó con 10 ml de la misma solución y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Se dosó proteína y se midió capacidad ligante de AMPcíclico y actividad fosforilante en alícuotas apropiadas de cada fracción. La proteína ligante de AMPcíclico quedó retenida en la columna y la actividad fosforilante percoló de la misma. Las fracciones que presentaron actividad de quinasa y que eluyeron después del grueso de la proteína fueron reunidas, concentradas a través de una membrana de Amicon CS 15 y utilizadas como fuente de subunidad catalítica.

CROMATOGRAFIA EN MINICOLUMNA DE DE-52: 1 ml de la fracción concentrada de la subunidad catalítica obtenida de AMPcíclico-agarosa se llevó a 5 ml con una solución que contuvo los mismos componentes de la solución A excepto que el tampón utilizado fue Tris HCl pH 7,4 (solución B). La preparación

se concentró utilizando una membrana de Amicon CS 15 hasta un volumen de 1 ml. Esta operación (dilución y concentración) se repitió dos veces con la finalidad de cambiar la solución de la preparación (solución A) por la solución B. La preparación así obtenida (0,74 mg/ml de proteína) se sembró en una columna de 0,8 ml de DE-52 equilibrada con solución B. La minicolumna se lavó con dos volúmenes de la misma solución (0 mM de ClK) y luego con dos volúmenes de soluciones de concentraciones crecientes de ClK preparado en solución B (50, 100, 150 y 200 mM ClK). Se recogieron fracciones de 0,8 ml del percolado y los lavados y se midió actividad fosfotransferasa con kémtido como sustrato en alícuotas apropiadas de cada fracción.

2.3 PURIFICACION DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE AMPcíclico-AGAROSA: La fracción de DE-52 se sembró en una columna de N6-amino-AMPcíclico - agarosa (1 ml de resina) previamente equilibrada con solución A conteniendo ClK 150 mM. La columna se lavó con 10 ml de la solución de equilibrio y luego con 10 ml de la misma solución conteniendo ClK 1 M. A continuación se desarmó la columna y la proteína ligante de AMPcíclico se eluyó incubando la resina con 2 ml de solución A conteniendo AMPcíclico

5 mM y albúmina sérica bovina 1 mg/ml, durante 90 minutos a 30°C con agitación ocasional. Al cabo de este tiempo, la suspensión se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. El procedimiento de elución se repitió dos veces más sobre la resina recuperada. Cuando la preparación habría de utilizarse para electroforesis en geles, se eliminó la albúmina de la solución de elución. Los sobrenadantes se reunieron y se dializaron contra solución A con el agregado de carbón activado. La capacidad ligante de AMPcíclico se ensayó a intervalos de 12 horas durante 72 horas de diálisis; la máxima capacidad de ligado de AMPcíclico de la preparación se obtuvo a las 36 horas, periodos más largos de diálisis dieron lugar a pérdidas progresivas en la capacidad de ligado del nucleótido. La proteína dializada se concentró utilizando una membrana de Amicon CS 15 y se utilizó como fuente de subunidad regulatoria.

3. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTES

3.1 PREPARACION DE LOS GELES

La electroforesis se desarrolló en geles planos verticales de 1,5 mm de espesor con una concentración de acrilamida

más bisacrilamida del 6 %, preparados de acuerdo a las instrucciones de Dunbar (1987).

3.2 PREPARACION DE LAS MUESTRAS Y CORRIDA

Antes de ser sometidas a electroforesis, las muestras fueron calentadas 2 minutos a 100°C con el agregado de un volumen de mezcla desnaturalizante (buffer Tris HCl 50 mM pH: 6,8 SDS 2%; β -mercaptoetanol 5%; glicerol 10% y azul de bromofenol 0,002% P/V). La corrida se llevó a cabo a temperatura ambiente a una intensidad de corriente de 30 mA durante 3 horas aproximadamente. Los marcadores de peso molecular preteñidos utilizados para la calibración de los geles fueron: α_2 -macroglobulina (180 kD), β -galactosidasa (116 kD), fructosa-6-fosfato quinasa (84 kD), piruvato quinasa (58 kD), fumarasa (48,5 kD), láctico deshidrogenasa (36,5 kD) y triosafofosfato isomerasa (26,6 kD).

3.3 TEÑIDO DE LOS GELES

3.3.a TINCION CON COOMASSIE BLUE. Se utilizó una solución de Coomassie blue R 250 0,03% P/V, metanol 40% y ácido acético 10% que se puso en contacto con el gel durante 12 horas aproximadamente. El desteñido se llevó a cabo con la misma

solución pero sin colorante.

3.3.b TINCION CON PLATA. Se llevó a cabo de acuerdo a la técnica de Merril et al. (1983).

Los geles se fotografiaron dentro de las 24 horas de concluído el proceso de tinción.

4. PURIFICACION PARCIAL DE LAS ACTIVIDADES DE FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS

4.1 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DE-52 : Se sembraron 125 ml de la fracción S-100 preparada tal como se describió en el ítem 2.1.a, proveniente de 50 g de micelio en una columna de DE-52 (1,2 x 14 cm) equilibrada en solución A. La columna se lavó con dos volúmenes de la misma solución y la proteína retenida se eluyó con un gradiente lineal de ClK de 0 a 0,7 M preparado en solución A (volumen total del gradiente: 500 ml). Se recogieron fracciones de 5 ml y se midió proteína y actividad de fosfodiesterasa en alícuotas apropiadas de cada fracción. Se obtuvieron dos picos de actividad que fueron designados arbitrariamente Pico I (actividad fosfodiesterásica presente en el percolado) y Pico II (actividad fosfodiesterásica que eluyó a una concentración de ClK 0,15 M). Las fracciones activas correspondientes a cada pico se reunieron

y constituyeron los Picos I y II de DE-52.

4.2 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE FOSFOCELULOSA: Se sembraron 90 ml del Pico I (1,3 mg/ml de proteína) obtenido de la columna de DE-52 en una columna de fosfocelulosa (1 x 13 cm) equilibrada en solución A. La columna se lavó con dos volúmenes de la misma solución y la proteína retenida se eluyó con un gradiente lineal de ClK de 0 a 0,7 M preparado en solución A (volumen total del gradiente: 200 ml). Se recogieron fracciones de 2 ml y se midió proteína y actividad de fosfodiesterasa en alícuotas apropiadas de cada fracción. Las fracciones activas se reunieron y constituyeron el Pico I de fosfocelulosa.

4.3 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHACRYL S-300 : 75 ml del Pico II obtenido de DE-52 se concentraron por precipitación con sulfato de amonio sólido hasta 80 % de saturación. El precipitado se resuspendió en solución A , se dializó contra la misma solución y se clarificó por centrifugación. La solución resultante (5 mg/ml de proteína) se sembró en una columna de Sephacryl S-300 (relación altura a diámetro de alrededor de 40) equilibrada en solución A conteniendo ClK 40 mM. El volumen de muestra sembrada estuvo entre el 1 y el 2 % del volumen de resina empaquetada. La columna se desarrolló

con la misma solución de equilibrio a un flujo de un volumen de columna cada 16 horas. Se recogieron fracciones de un centésimo del volumen de la columna y en cada una de ellas se dosó proteína y actividad fosfodiesterásica. Las fracciones activas se reunieron y constituyeron el Pico II de Sephacryl S-300.

5. DETERMINACION DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS

5.1 ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA

Se utilizaron gradientes lineales de sacarosa de 5 a 20% en solución A que contenían albúmina sérica bovina a una concentración de 1 mg/ml y las adiciones que se indican al pie de cada figura. Cuando la preparación habría de utilizarse para electroforesis en geles, se eliminó la albúmina de las soluciones. Los gradientes se construyeron depositando sucesivas capas de 0,65 ml cada una de soluciones de sacarosa de concentración 20; 17,5; 15; 12,5; 10; 7,5 y 5% respectivamente, se dejaron 2 horas a temperatura ambiente, y al cabo de este tiempo se pasaron a un baño de hielo. Inmediatamente se sembraron 0,2 ml de la mezcla que contenía la preparación enzimática y las proteínas marcadoras. La centrifugación se

llevó a cabo a 4°C a las velocidades y tiempos que se indican al pie de cada figura. Al terminar la corrida se recolectaron fracciones de 0,2 ml haciendo sifón desde el fondo del tubo. En alícuotas de cada fracción se realizaron los ensayos enzimáticos que se indican. Los marcadores de coeficiente de sedimentación utilizados fueron: fosfatasa alcalina, peroxidasa y citocromo C.

5.2 FILTRACION EN GELES

5.2.a QUINASA DE PROTEINA DEPENDIENTE DE AMPcíclico

5.2.a.1 Filtración en Sephacryl S-300

Las fracciones reunidas de DE-52 se concentraron por precipitación con $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ sólido hasta el 80% de saturación. El precipitado se resuspendió en solución A, se dializó contra la misma solución y se clarificó por centrifugación. La solución resultante, de aproximadamente 5 mg/ml de proteína, se sembró en una columna de Sephacryl S-300 (relación altura a diámetro de 40) equilibrada en solución A conteniendo ClK 40 mM. El volumen de muestra sembrada estuvo entre el 1 y el 2% del volumen de resina empaquetada. La columna se desarrolló con la misma solución de equilibrio a un flujo de un volumen de columna cada 12 horas. Se recogieron fracciones

Materiales y Métodos

de un centésimo del volumen de la columna y en cada una se dosó actividad fosfotransferasa y capacidad ligante de AMPcíclico. El volumen de exclusión se determinó con Azul de Dextrano. Las proteínas marcadoras utilizadas fueron: citocromo C, peroxidasa y albúmina sérica bovina.

5.2.a.2 Filtración en Sephadex G-150

La actividad fosforilante obtenida en el percolado de la columna de AMPcíclico-agarosa se concentró utilizando una membrana de Amicon CS 15. La fracción así concentrada se sembró en una columna de Sephadex G-150 (relación altura a diámetro de 40) equilibrada en solución A conteniendo ClK 40 mM. Se mantuvo una relación de un volumen de muestra cada cien volúmenes de resina empaquetada. La cromatografía se desarrolló con la misma solución de equilibrio a un flujo de un volumen de columna cada 18 horas. Se recogieron fracciones de un centésimo del volumen de la columna y en alícuotas apropiadas se dosó actividad fosfotransferasa. La determinación del volumen de exclusión se llevó a cabo con Azul de Dextrano. Las proteínas marcadoras utilizadas fueron las mismas descriptas en el ítem 5.2.a.1.

5.2.b FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS

5.2.b.1 Filtración en Sephadex G-150

Alicuotas apropiadas de los Picos I y II de DE-52 se concentraron por precipitación con sulfato de amonio sólido hasta 80 % de saturación. El precipitado se resuspendió en solución A, se dializó contra la misma solución y se clarificó por centrifugación. La solución resultante, de aproximadamente 4 mg/ml de proteína, se sembró en una columna de Sephadex G-150 (relación altura a diámetro de alrededor de 40) equilibrada en solución A conteniendo ClNa 20 mM. El volumen de muestra sembrada estuvo entre el 1 y el 2 % del volumen de resina empaquetada. La columna se desarrolló con la misma solución de equilibrio a un flujo de un volumen de columna cada 16 horas. Se recogieron fracciones de un centésimo del volumen de la columna y en alícuotas apropiadas de cada una de ellas se midió actividad fosfodiesterásica. El volumen de exclusión se determinó con Azul de Dextrano. Las proteínas marcadoras utilizadas fueron las mismas descritas en el ítem 5.2.a.1.

6. CALCULO DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS

6.1 RADIO DE STOKES

Para estimar el radio de Stokes de la holoenzima y de la

subunidad regulatoria se utilizaron los datos de elución de la columna de Sephacryl S-300.

Para estimar el radio de Stokes de la subunidad catalítica se utilizaron los datos de elución de la columna de Sephadex G-150.

Para estimar el radio de Stokes de las fosfodiesterasas se utilizaron los datos de elución de la columna de Sephadex G-150.

En todos los casos los valores se obtuvieron gráficamente, según el método de Laurent y Killander (1964), representando ($-\log K_{av}$) $^{1/2}$ versus el radio de Stokes de las proteínas marcadoras. El K_{av} se define como la relación:

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

donde V_e = volumen de elución de la proteína
 V_o = volumen de exclusión
 V_t = volumen total de la resina

6.2 COEFICIENTE DE SEDIMENTACION

El coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) de la holoenzima de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico, los de sus subunidades y los de las fosfodiesterasas, se obtuvieron

ron a partir de los datos de sedimentación en gradientes de sacarosa.

De la relación lineal obtenida al graficar la distancia recorrida por las proteínas marcadoras desde la superficie del gradiente en función de sus respectivos S, se obtuvo por interpolación en la recta el valor del coeficiente de sedimentación buscado (Martín y Ames, 1961).

6.3 PESO MOLECULAR

El peso molecular de la holoenzima de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico y de sus subunidades, así como el de las fosfodiesterasas, fue calculado de acuerdo al método de Siegel y Monty (1966).

Se aplicó la fórmula:

$$PM = \frac{6 \pi N h_{20,w}}{(1-v) f_{20,w}} \cdot S_{20,w}$$

N = número de Avogadro

h = viscosidad del agua a 20 °C

a = radio de Stokes

S = coeficiente de sedimentación

v = volumen específico parcial (0,74 cm³/g)

ρ = densidad del agua a 20 °C

6.4 COCIENTE FRICCIONAL

Para calcular los cocientes friccionales f/f° se utilizó el método de Siegel y Monty, 1966. Se aplicó la fórmula :

$$f/f^\circ = a \left[\frac{4 \pi h N}{3 v \rho PM} \right]^{1/3}$$

6.5 PARAMETROS DE LAS PROTEINAS MARCADORAS

Los parámetros de las proteínas marcadoras utilizadas en los gradientes de sacarosa y en la filtración molecular se resumen en la siguiente tabla:

Proteína	Coeficiente de Sedimentación	Radio de Stokes	Peso molecular
	$S_{20,w}$	a (nm)	K
Citocromo C	1,7	1,8	12,4
Peroxidasa	3,5	3,04	39,8
Albúmina sérica bovina		3,55	67
Fosfatasa alcalina	6,3	2,93	80

Los valores del radio de Stokes (a) se obtuvieron de la

fórmula $a = k T / 6 \pi \eta_{20,w} D_{20,w}$ (Haga et al, 1977).
utilizando los valores de coeficiente de difusión corregidos
($D_{20,w}$) tabulados (Cecil y Ogston, 1951; Garen y Levinthal,
1960), donde k es la constante de Boltzman, $\eta_{20,w}$ es la
viscosidad del agua a 20 °C y T es 293 °K.

7. ENSAYOS ENZIMATICOS

7.1 MEDICION DE ACTIVIDAD DE QUINASA DE PROTEINA

Para la medición de actividad quinasa de proteína en
ausencia o en presencia de AMPcíclico se utilizó una mezcla
de incubación compuesta por buffer Tris HCl 50 mM pH:7,3;
Cl₂Mg 10 mM; β-mercaptoetanol 2 mM; albúmina sérica bovina
1 mg/ml; ATP[γ-³²P] 0,1 mM (200-800 cpm/pmol) y el sustrato
aceptor del grupo fosfato, en un volumen final de 50 µl. Las
concentraciones de los sustratos utilizados fueron para el
kémtido (heptapéptido sintético cuya secuencia corresponde
al sitio fosforilable de la piruvato kinasa; Leu-Arg-Arg-Ala-
Ser-Leu-Gli), 128 µM y para la protamina, 1,5 mg/ml. Para
los ensayos en presencia de AMPcíclico, la concentración del
nucleótido en la mezcla de incubación fue 40 µM. Las incuba-
ciones se llevaron a cabo durante 15 minutos a 30 °C. La
reacción se detuvo sembrando 30 µl de la mezcla de incubación

en papeles de fosfocelulosa de 1 x 1 cm que se lavaron por inmersión en solución de ácido fosfórico 75 mM tres veces consecutivas agitando suavemente durante diez minutos cada vez y una última vez con etanol 96 %. Los papeles se secaron con corriente de aire caliente y la radiactividad de los mismos se determinó usando solución centelladora de tolueno. En todos los casos las mediciones de actividad enzimática se realizaron en condiciones de linealidad con el tiempo y con la concentración de enzima. Una unidad de actividad quinásica se definió como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 pmol de ^{32}P en el kémtido en 15 minutos.

7.2 MEDICION DE CAPACIDAD LIGANTE DE AMPcíclico

La capacidad ligante de AMPcíclico se midió por el método de filtración en membranas de nitrocelulosa. Las mezclas de incubación conteniendo buffer Tris HCl 14 mM pH:7,5; Cl_2Mg 0,7 mM; β -mercaptoetanol 1,4 mM, ClNa 600 mM y AMPcíclico[^3H] 210 nM (140.000 cpm aproximadamente) y la preparación enzimática, en un volumen final de 70 μl , se incubaron durante 15 minutos a 30 °C. Aliquotas de 60 μl de las mezclas de reacción se filtraron al vacío por membranas de nitrocelulosa. Las membranas se lavaron con 10 ml de buffer Tris HCl 20 mM pH:7,3, se secaron en estufa y la radiactividad de las

mismas se midió en solución centelladora de tolueno.

7.3 MEDICION DE ACTIVIDAD PEPTIDASICA

La actividad peptidásica se midió utilizando kemptido- ^{32}P como sustrato en una mezcla de reacción que contenía buffer Bis Tris Propano HCl 50 mM pH: 8,2; kemptido- ^{32}P 30 μM y la enzima en un volumen final de 50 μl . Las incubaciones se llevaron a cabo durante 15 minutos a 30 °C y la reacción se detuvo con el agregado de 20 μl de ácido fosfórico 75 mM. 50 μl de la mezcla de reacción se sembraron sobre papel de fosfocelulosa y los papeles se procesaron como se describe para el ensayo de quinasa de proteína. La radiactividad remanente en los papeles se midió en solución centelladora de tolueno. En todos los casos las mediciones de actividad enzimática se llevaron a cabo en condiciones de linealidad con el tiempo y con la concentración de enzima.

7.4 MEDICION DE ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA

La actividad de fosfodiesterasa de AMPcíclico y GMPcíclico se midió según el método en dos pasos de Thompson y Appleman (1971). La mezcla de incubación constó de: buffer Tris-HCl 20 mM pH: 7,4; β -mercaptoetanol 2 mM; AMPcíclico [^3H] 500 μM o GMPcíclico[^3H] 300 μM (130.000 cpm aproximadamente)

y la preparación enzimática, en un volumen final de 0,1 ml. Las incubaciones se realizaron a 30 °C durante 15 minutos. La reacción se detuvo por calentamiento a 100 °C durante 1 minuto. Después de enfriar se agregaron 25 µg de veneno de serpiente (Ophiophagus hannah) y se incubó a 30 °C durante 15 minutos. La reacción se detuvo con el agregado de 1,1 ml de una suspensión de resina de intercambio aniónico Dowex-1 (1:3 de resina en metanol 50 % V/V). Luego de centrifugar los tubos se tomaron 0,5 ml del sobrenadante cuya radiactividad se determinó en mezcla centelleadora de Tritón X-100 -Tolueno. En todos los casos las mediciones de actividad enzimática se realizaron en condiciones de linealidad con el tiempo y con la concentración de enzima. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 pmol de AMPcíclico o GMPcíclico por minuto en las condiciones del ensayo estándar.

8. OTRAS TECNICAS

8.1 DETERMINACION DE LAS PROTEINAS MARCADORAS

Citocromo C: Se valoró midiendo la absorbancia a 410 nM.

Peroxidasa: Se siguió la técnica descrita en el manual de

Worthington (1972) midiendo el color desarrollado por la oxidación de la o-dianisidina luego de la descomposición enzimática del H_2O_2 .

Albumina sérica bovina: Se valoró midiendo la absorbancia a 280 nM.

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

8.2 DOSAJE DE PROTEINA

La proteína se valoró por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina sérica bovina como patrón.

8.3 SINTESIS DE ATP [γ - ^{32}P]

La síntesis de ATP[γ - ^{32}P] se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento de Johnson y Walseth (1979) y las modificaciones introducidas por Gupta et al (1982).

8.4 SINTESIS DE KEMPTIDO - ^{32}P

El kémptido fue fosforilado en una mezcla de reacción que contenía ATP[γ - ^{32}P] 250 μ M (200-400 cpm/pmol); buffer

Tris HCl 50 mM pH:7,4; Cl_2Mg 10 mM; β -mercaptoetanol 2mM; 650 unidades de subunidad catalítica de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico y kémtido 100 μM en un volumen final de 5 ml. Después de la incubación de 1 hora a 30 °C la reacción se detuvo por calentamiento a 100°C durante 3 minutos. El ATP[γ - ^{32}P] remanente se separó por cromatografía de intercambio iónico. La mezcla de reacción se hizo 10 mM en ácido acético y se sembró en una columna de 5 ml de AG 1 x 8 equilibrada en ácido acético 10 mM. El ATP[γ - ^{32}P] quedó retenido en la columna y el fosfokémtido se eluyó con la misma solución de equilibrio siendo su recuperación cuantitativa. Se eliminó el ácido acético del eluido por evaporación a presión reducida y lavados sucesivos con agua destilada. La radiactividad específica del ^{32}P incorporado al kémtido se considera igual a la del ATP[γ - ^{32}P] utilizado. La fosforilación varió entre el 90 y el 100%.

8.5 MEDICION DE LA RADIATIVIDAD

La medición de las muestras radiactivas se llevó a cabo en un contador de centelleo líquido utilizando solución centelleadora de tolueno. La composición de la mezcla centelleadora fué: 0,1 g de dimetil POPOP (1,4 - bis 2 (4-metil-5-fenil oxazolil benceno)) y 4 g de PPO (2,5-difeniloxazol

en 1 litro de tolueno. Para la medición de la radiactividad en soluciones acuosas (ensayo de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos) se utilizó una mezcla de solución centelleadora de Tritón X-100 - Tolueno (1:3 V/V).

9. REACTIVOS

El AMPcíclico[^3H] (actividad específica 20 Ci/mmol) fue provisto por American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis MO).

El ácido ortofosfórico[^{32}P] en solución clorhídrica utilizado para la síntesis del ATP[γ - ^{32}P] y el GMPcíclico[^3H] (actividad específica 38 Ci/mmol) se obtuvieron de New England Nuclear.

Los siguientes reactivos fueron provistos por Sigma Chemical Co.: citocromo C, albúmina sérica bovina, las enzimas marcadoras, los marcadores de pesos moleculares preteñidos, ATP, AMPcíclico, kémptido, protamina, isokémptido (Arg-Arg-Lis-Ala-Ser-Gli-Pro), las diferentes fracciones de histonas, antipaina, PMSF, AMPcíclico-agarosa (con el AMPcíclico ligado a la resina por el C₆ a través de un brazo espaciador de 6 átomos de carbono), resina Dowex 1, fosfocelulosa, Sephadex G-150, Sephacryl S-300, las subunidades regulatoria y catalítica de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíc-

Materiales y Métodos

clico de corazón bovino, veneno de serpiente (Ophiophagus hannah), teofilina, isobutil-metilxantina.

El isoképtido (Arg-Lis-Arg-Ser-Arg-Ala-Glu) fue provisto por Penninsula Lab.

El papel de fosfocelulosa P-81 y la resina DE-52 (DEAE-celulosa) fueron marca Whatman. Las membranas de nitrocelu-
losa fueron de Schleicher y Schüell.

Los reactivos de grado electroforético fueron de marca Biorad.

El péptido inhibidor sintético HSI (5-22)-amida (Hodges y Merrifield, 1975) fue gentilmente proporcionado por la Dra. Silvia Moreno.

El resto de los reactivos utilizados fue de grado analítico.

I. ESTUDIO DE LA QUINASA DE PROTEÍNA DEPENDIENTE DE AMPcíclico EN *Saccobolus platensis*

I.1 EXTRACTOS SOLUBLES DE MICELIO

Se comenzó el estudio de la quinasa de proteínas dependiente de AMPcíclico con la medición de la actividad fosforilante y de la capacidad ligante de AMPcíclico en extractos solubles de micelio (S-100) preparados de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

Fue posible detectar proteína ligante de AMPcíclico en los extractos solubles, en cambio, la presencia de altos niveles de fosforilación endógena y la falta de linealidad observada con el agregado de cantidades mayores de extracto dificultaron la medición de la actividad quinásica en la fracción S-100. La falta de linealidad en los ensayos de actividad fosforilante se debió, principalmente, a la presencia en el S-100 de una potente peptidasa que interfiere en el ensayo de fosforilación del sustrato específico de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico. Como se comentará más adelante, esta peptidasa es capaz de hidrolizar a gran velocidad el sustrato sintético utilizado (kémtido) así como el producto de fosforilación (kémtido-P).

En consecuencia, los estudios en esta etapa se limitaron

a la medición de proteína ligante de AMPcíclico. Como se comenta en el ítem I.8 en el que se describe la purificación de la subunidad regulatoria, la capacidad ligante de AMPcíclico detectable en la fracción S-100 rindió cuenta de más del 90 % de la capacidad ligante recuperada luego del primer paso de purificación (Tabla 3).

I.1.a CENTRIFUGACION DE LA FRACCION S-100 EN GRADIENTES DE SACAROSA

Cuando se analizaron en gradientes de sacarosa alícuotas de la fracción S-100, se obtuvieron los perfiles de actividad fosforilante y proteína ligante de AMPcíclico que se muestran en la Figura 1. Como puede verse, la actividad fosforilante y la proteína ligante de AMPcíclico cosedimentaron como un único pico simétrico con una velocidad intermedia entre los marcadores peroxidasa y fosfatasa alcalina. La cosedimentación de las actividades medidas en un pico de 4,5 S hace presuponer que esta especie es una forma de holoenzima. La actividad fosfotransferasa mostró ser totalmente dependiente del sustrato agregado (protamina o kémtido) en todas las fracciones del gradiente. Se observa además un pico de capacidad ligante de AMPcíclico que sedimentó con una velocidad intermedia respecto de los marcadores peroxidasa y citocromo

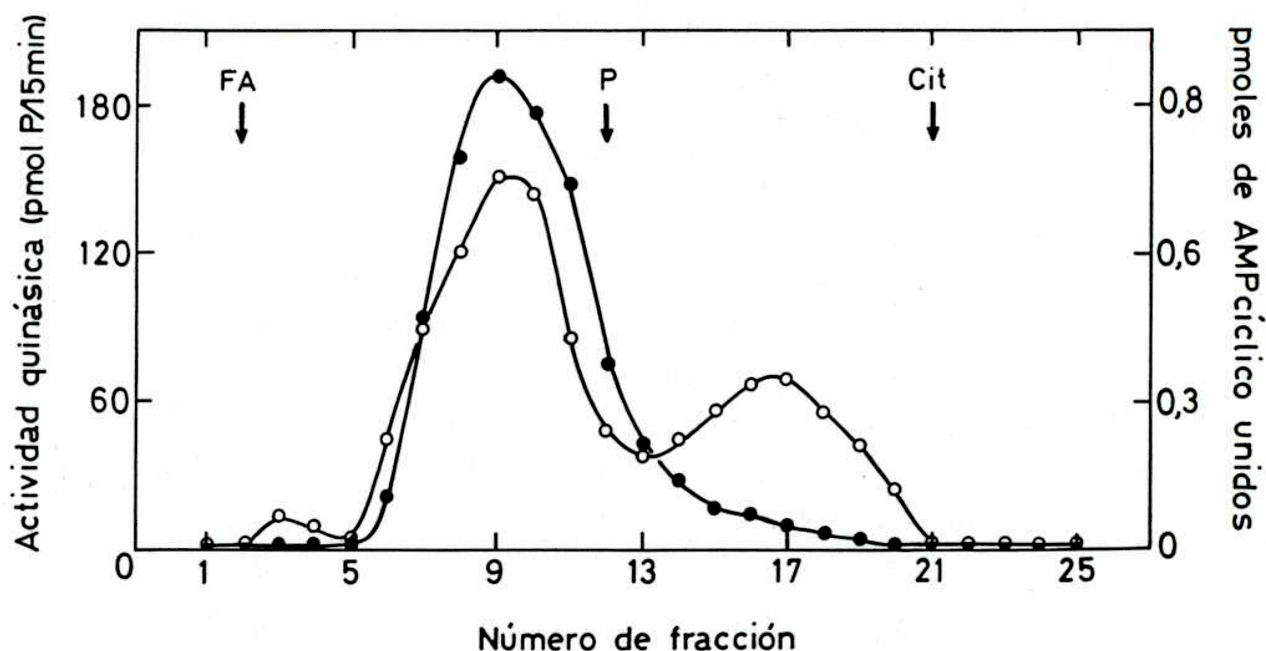


FIGURA 1: Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de la fracción S-100. Una alícuota de la fracción S-100 se centrifugó en un gradiente preparado como se indica en Materiales y Métodos. La centrifugación se llevó a cabo a 48.000 rpm durante 16 horas. En alícuotas apropiadas de cada fracción se midió actividad de quinasa en presencia de AMPcíclico con kémtido como sustrato (●) y capacidad ligante de AMPcíclico (○). Las flechas indican la posición de las proteínas marcadoras: P: peroxidasa, FA: fosfatasa alcalina, Cit: citocromo C.

C. Este pico, variable en proporción de una preparación a otra, corresponde a proteína ligante libre.

La dependencia de AMPcíclico de la actividad fosforilante fué variable en diferentes preparaciones. En algunas ocasiones pudo observarse una estimulación de 3 o 4 veces de la actividad fosfotransferasa con el agregado de AMPcíclico en el ensayo de fosforilación llevado a cabo con las fracciones del gradiente. Sin embargo, en la mayoría de las preparaciones analizadas la actividad de quinasa fué totalmente independiente del nucleótido cíclico. Las preparaciones enzimáticas activables por AMPcíclico que se obtuvieron en algunas ocasiones mostraron en los gradientes el mismo coeficiente de sedimentación (4,5 S) que la holoenzima cuya actividad fosforilante fue totalmente independiente de AMPcíclico.

Cabe señalar a esta altura de la descripción de los resultados que el valor de coeficiente de sedimentación obtenido para la especie molecular identificada en los extractos solubles (4,5 S) sugiere fuertemente una estructura dimérica para esta probable holoenzima. Este dato, junto con los valores de los parámetros moleculares e hidrodinámicos obtenidos a lo largo del estudio para esta actividad de quinasa en S.platensis y los descriptos en la literatura para otras quinasas de proteína dependientes de AMPcíclico se reúnen y

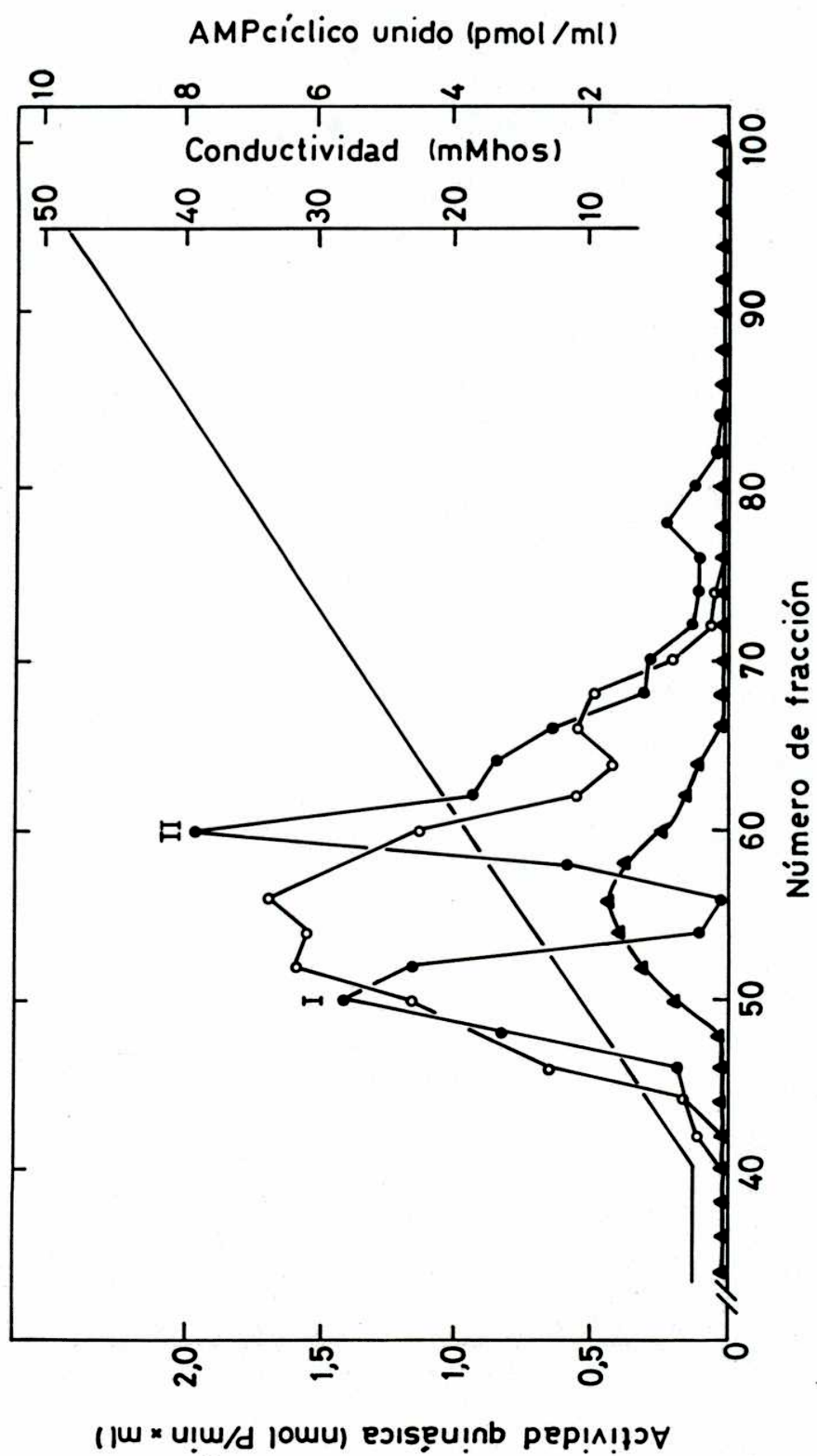
discuten en términos del análisis de la estructura de la enzima bajo el ítem I.9 de Resultados y Discusión.

Con la intención de investigar la existencia de especies moleculares que cosedimentaran en los gradientes con coeficientes mayores, tales como los informados para holoenzimas tetraméricas, se analizaron extractos de micelio cosechado en estadios tempranos de desarrollo, extractos preparados en presencia de inhibidores de proteasas y preparaciones realizadas con soluciones de diferentes pHs (6,5 - 8). En ningún caso se obtuvieron cambios en el perfil de sedimentación ni en la dependencia de la actividad fosforilante por el agregado de AMP cíclico (resultados no mostrados y Figura 1).

I.2 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DE-52

Se midió actividad de quinasa y capacidad ligante de AMPcíclico en extractos solubles de micelio (S-100) fraccionados en una columna de DE-52.

Como puede observarse en la Figura 2, el perfil de elución de la actividad de quinasa medida con kemptido como sustrato presentó dos picos (señalados como I y II) que eluyeron a una concentración de ClK de 120 y 200 mM respectivamente. El agregado de AMPcíclico en el ensayo de las fracciones



de la columna no mostró un efecto estimulador de la actividad fosforilante de ninguno de los dos picos.

El máximo de capacidad ligante de AMPcíclico, que eluye de la columna a una concentración de ClK de 150 mM, es en realidad, por los resultados que se mostrarán más adelante, el verdadero marcador del pico de actividad fosfotransferasa.

Es dable destacar que el perfil de actividad de quinasa medida con kémtido como sustrato en la columna de DE-52 fue reproducible y la aparición de dos picos de actividad fosforilante interrumpidos por una zona en la cual no se detecta actividad se repitió sistemáticamente en todos los extractos fraccionados por cromatografía en DE-52.

Cuando se midió actividad de quinasa en las fracciones de la columna utilizando protamina como sustrato aceptor de fosfato, el perfil de actividad fosfotransferasa obtenido fue notoriamente diferente al observado con kémtido. Se obtuvo un único pico de actividad fosforilante abarcando los dos picos detectados con kémtido y que coincidió con el perfil de capacidad ligante de AMPcíclico. La relación de actividad de quinasa de protamina a proteína ligante de AMPcíclico en las fracciones del pico fue constante, indicando que ambas actividades residen en una única especie molecular. La

actividad fosforilante de protamina tampoco se estimuló con el agregado de AMPcíclico en el ensayo.

I.2.a CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA DE LAS FRACCIONES DE DE-52

En la Figura 3 se muestra el perfil de actividad fosforilante y capacidad ligante de AMPcíclico obtenido al centrifugar en gradientes de sacarosa alícuotas de la reunión de las fracciones que presentaron actividad de quinasa de protamina en la columna de DE-52.

Puede observarse que, tal como ocurre con la fracción S-100, la actividad fosforilante y la proteína ligante de AMPcíclico obtenidas de DE-52 cosedimentaron en los gradientes como un único pico simétrico de 4,5 S.

I.2.b IDENTIFICACION DE UNA ACTIVIDAD ENMASCARANTE DE LA FOSFORILACION PUESTA EN EVIDENCIA EN LAS FRACCIONES DE DE-52

La elución de dos picos de actividad de quinasa medida con kémtido como sustrato en las fracciones de la columna de DE-52 no refleja la presencia de diferentes especies moleculares. En efecto, el análisis de las fracciones 50, 56 y 60 (ver Figura 2) por centrifugación en gradientes de sacarosa

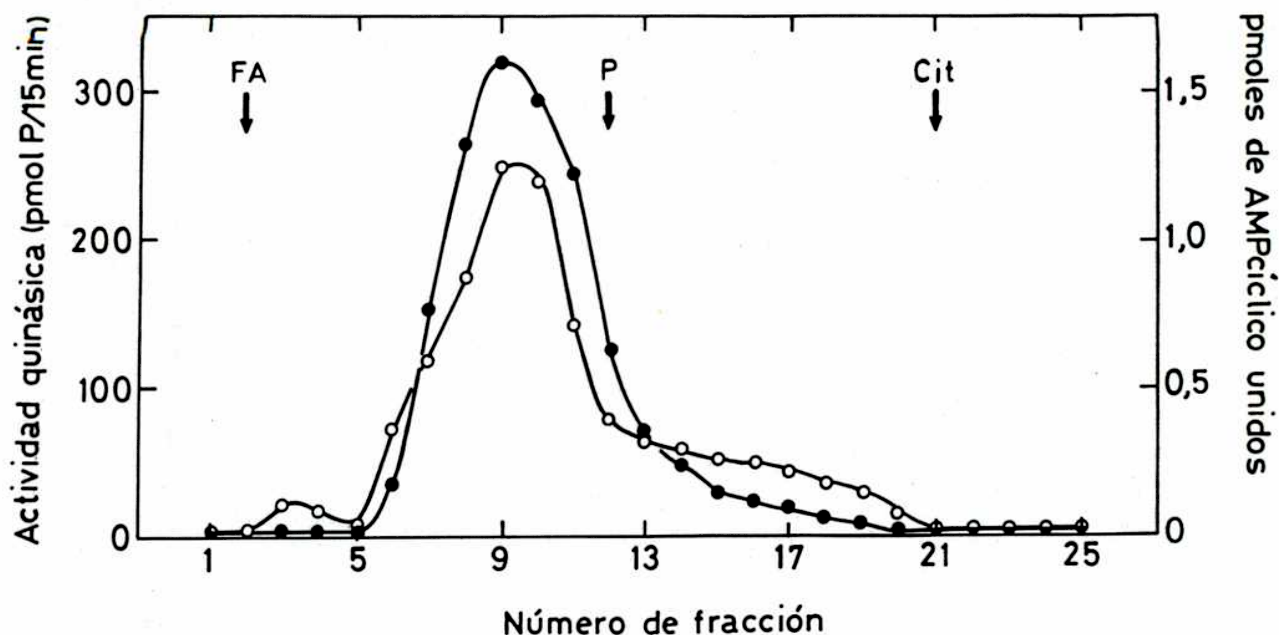


FIGURA 3: Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de la fracción de DE-52. Una alícuota de la fracción de DE-52 se centrifugó en un gradiente preparado como se indica en Materiales y Métodos. La centrifugación se llevó a cabo a 48.000 rpm durante 16 horas. En alícuotas apropiadas de cada fracción se midió actividad de quinasa en presencia de AMPcíclico con képtido como sustrato (●) y capacidad ligante de AMPcíclico (○). Las flechas indican la posición de las proteínas marcadoras: P: peroxidasa, FA: fosfatasa alcalina, Cit: citocromo C.



permitió observar perfiles de actividad fosfotransferasa y de capacidad ligante de AMP cíclico idénticos a los mostrados en la Figura 3. Merece destacarse que la actividad fosfotransferasa recuperada en los picos de los gradientes fue 10 a 20 veces mayor que la actividad detectada en las fracciones antes de la siembra. En particular, la fracción 56 que corresponde a la zona del perfil de DE-52 en la cual la actividad quinásica medida con kémtido es nula, mostró en el gradiente un pico de actividad fosforilante cuyo máximo superó a los de los picos obtenidos con las fracciones 50 y 60 (resultados no mostrados).

Estos resultados indican que, muy probablemente, en los gradientes de sacarosa se separa algún factor que dificulta e incluso llega a impedir la detección de la actividad fosfotransferasa en ciertas fracciones de DE-52.

Se analizó la capacidad de las fracciones de un gradiente de sacarosa de enmascarar la actividad fosfotransferasa de la holoenzima obtenida del mismo gradiente. Para ello, se centrifugó en un gradiente de sacarosa una alícuota de la reunión de las fracciones que no mostraron actividad fosfotransferasa con kémtido como sustrato en la columna de DE-52 y se midió actividad fosforilante con kémtido como sustrato en cada una de las fracciones obtenidas. La fracción del gra-

diente correspondiente al pico de actividad fosfotransferasa. se utilizó como fuente de holoenzima y su actividad fosforilante de kémtido se midió en presencia de una cantidad fija de cada una de las fracciones del mismo gradiente. Como puede observarse en el diagrama de la Figura 4, el agregado de alícuotas de las fracciones correspondientes a proteínas de mayor coeficiente de sedimentación que el de la holoenzima produjo una brusca caída de la actividad fosfotransferasa. Este resultado confirma la existencia de un factor capaz de enmascarar la actividad fosforilante medible con kémtido y que dicho factor se separa en los gradientes de sacarosa.

Se llevaron a cabo una serie de estudios que permitieron dilucidar la naturaleza de la actividad responsable del enmascaramiento de la actividad fosforilante presente en las fracciones de la columna de DE-52. A continuación se resumen los resultados obtenidos.

a) La caída de actividad de quinasa no pudo ser explicada por hidrólisis de AMPcíclico debido a la presencia de fosfodiesterasa de AMPcíclico en las fracciones de la columna. Se midió actividad de fosfodiesterasa de AMP cíclico en las condiciones del ensayo de fosforilación y prácticamente no se detectó hidrólisis del nucleótido. Por otra parte, el perfil

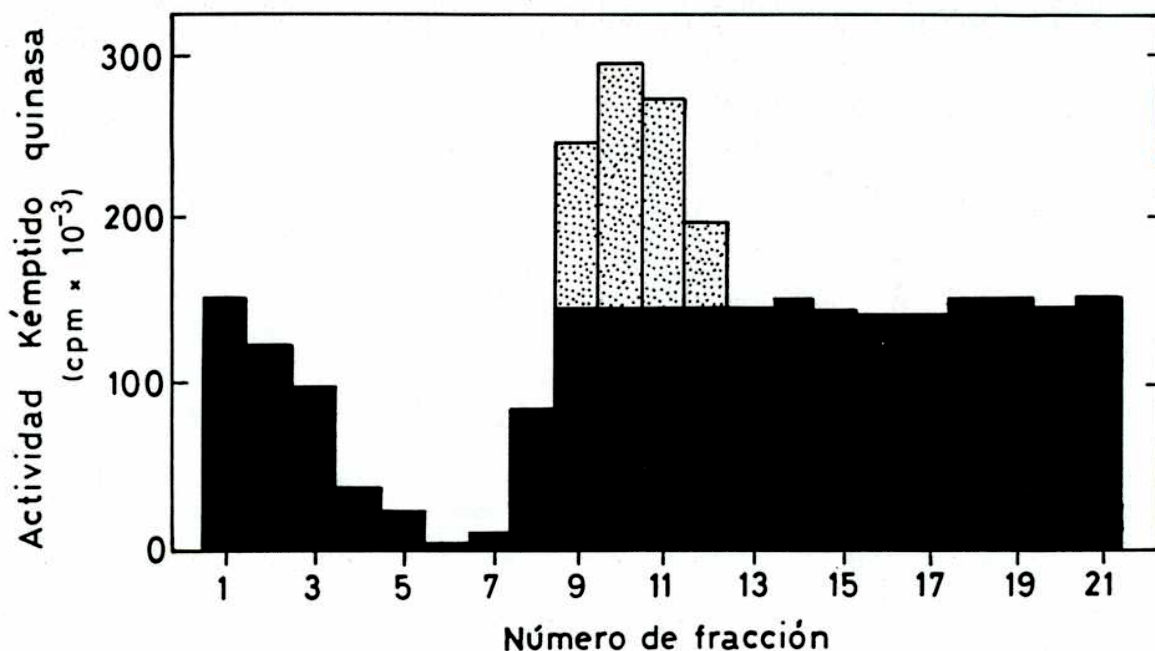


FIGURA 4: Enmascaramiento de la actividad fosforilante de la holoenzima por las fracciones de un gradiente de sacarosa. La actividad fosfotransferasa de la holoenzima obtenida de un gradiente de sacarosa se midió con kémpido como sustrato, en presencia de AMPcíclico y con el agregado de una cantidad fija de cada una de las fracciones del mismo gradiente. Actividad kémpido quinasa (■); incremento debido a la actividad fosforilante aportada por las fracciones del gradiente (▨).

Resultados y Discusión

de actividad fosforilante de la columna de DE-52 no se modificó por el agregado de teofilina (inhibidor de las fosfodiesterasas de S.platensis) en el ensayo de fosforilación del kémtido llevado a cabo en las fracciones de la columna. Cabe recordar, además, que la quinasa no mostró dependencia absoluta del nucleótido cíclico en ninguna de las preparaciones analizadas.

b) Se investigó la presencia de ATPasas como probables responsables de la desaparición de actividad fosforilante, y si bien se detectó hidrólisis de ATP, ésta fue sólo parcial siendo la concentración remanente suficiente como para mantener una actividad de quinasa elevada.

c) Se utilizó kémtido- ^{32}P como sustrato para medir la capacidad del supuesto inhibidor de actuar como fosfatasa. No se observó liberación de P_i radiactivo a la fase orgánica después de formar el complejo fosfomolibdico con molibdato de amonio en medio ácido. Tampoco fue posible inhibir la actividad enmascarante de la fosforilación con fosfato inorgánico ni con fluoruro de sodio hasta concentraciones 50 mM (inhibidores universales de fosfatasas de fosfoproteínas).

d) Finalmente, el análisis electroforético de los productos obtenidos al incubar el kémtido- ^{32}P en presencia del

factor enmascarante de la fosforilación, permitió determinar que la actividad que interfiere en el ensayo de quinasa es una potente peptidasa.

En nuestro laboratorio se llevó a cabo el aislamiento y caracterización de esta actividad aminopeptidásica de S.platensis (Fernández Murray et al., 1990). Se observó que esta enzima es capaz de hidrolizar al kémtido y al fosfo-kémtido secuencialmente a partir del extremo aminoterminal. La comparación de las susceptibilidades del kémtido y el fosfokémtido a ser hidrolizados por la acción de esta enzima indicó que el primero es rápida y completamente degradado a sus aminoácidos constituyentes, en tanto que el kémtido-P rinde un producto principal de degradación (Ala -Ser (P) - Leu - Gli) que sugiere que la actividad de la enzima se bloquea severamente por la presencia de la serina fosforilada.

Cabe señalar que en el ensayo de actividad de quinasa con kémtido como sustrato utilizado a lo largo de este trabajo (Roskosky, 1983), el producto de fosforilación de la quinasa (Leu - Arg - Arg - Ala - Ser (P)- Leu - Gli) se adsorbe cuantitativamente sobre papeles de fosfocelulosa debido a que posee una carga neta 3+ a pH ácido. La cantidad de radiactividad retenida en fosfocelulosa en esas condiciones es la medida de la fosforilación del sustrato alcanzada. Produc-

tos radioactivos con cargas menores de 3+, es decir, aquellos que carezcan al menos de alguna de las argininas, no serán retenidos en fosfocelulosa (Fernández Murray et al., 1989).

La presencia, entonces, de una aminopeptidasa que hidroliza tanto el kémtido como el kémtido-P de la manera antes descrita, impide la medición de actividad de quinasa con kémtido ya que consume el sustrato utilizado en el ensayo y degrada el producto de fosforilación que se pudiera haber formado, de manera tal que el digesto resultante no es retenido en fosfocelulosa.

1.3 ANALISIS DE LA INTERACCION DE LOS COMPONENTES REGULATORIO Y CATALITICO EN GRADIENTES DE SACAROSA

1.3.a EFECTO DE LOS COMPONENTES DE LA MEZCLA DE INCUBACION DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD FOSFORILANTE

Como se dijo anteriormente al analizar las Figuras 1 y 3, la actividad fosfotransferasa y la capacidad ligante de AMPcíclico cosedimentan en un único pico de 4,5 S lo cual sugiere la presencia de una holoenzima.

Con el fin de analizar la interacción entre la proteína ligante de AMPcíclico y la actividad fosforilante que cose-

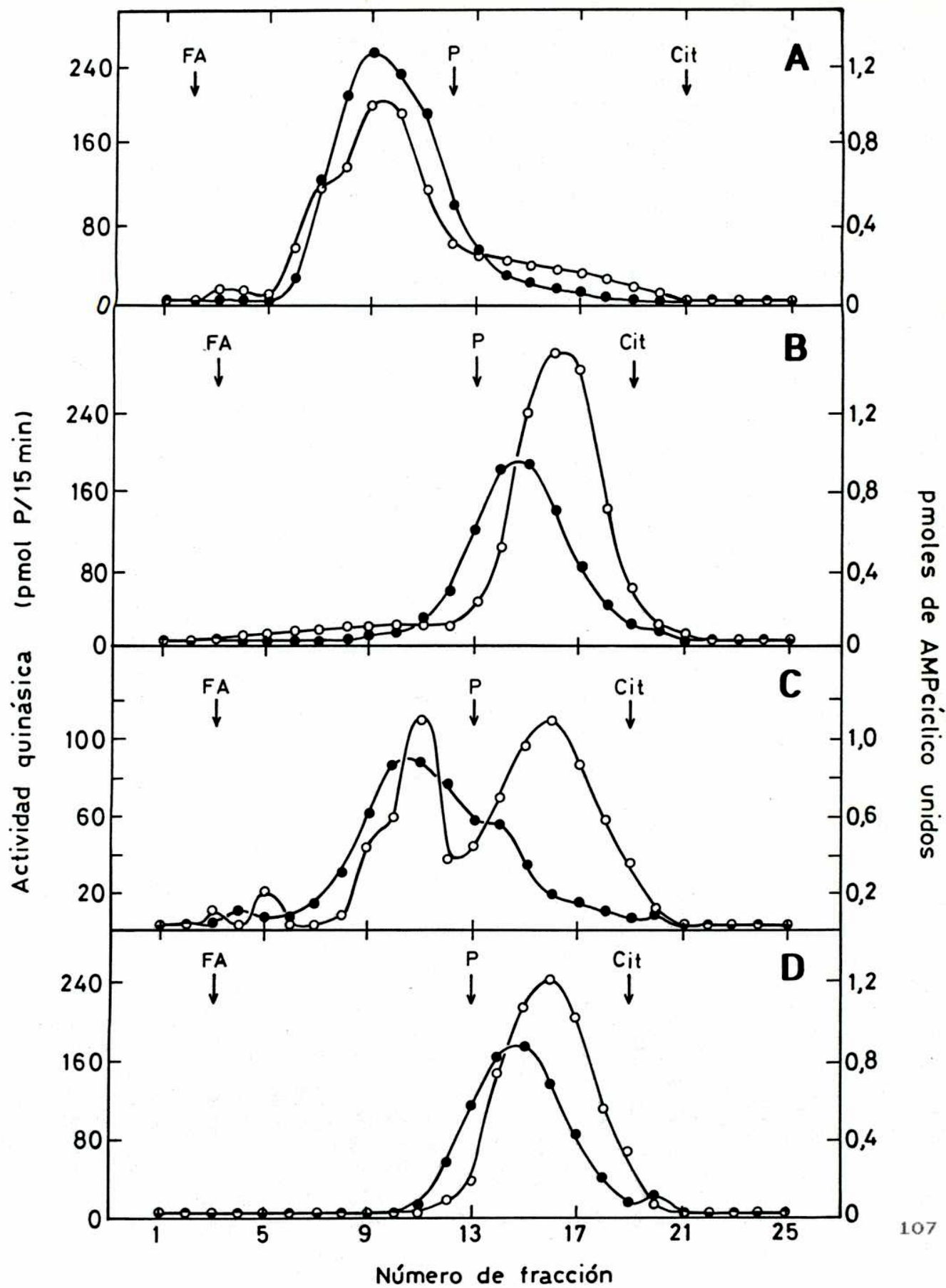
Resultados y Discusión

dimentaron en los gradientes, alícuotas de la reunión de las fracciones de DE-52 fueron sometidas a distintos tratamientos antes de ser analizadas por centrifugación en gradientes de sacarosa. Todas las preincubaciones se llevaron a cabo durante 5 minutos a 30 °C.

Cuando la preparación enzimática se preincubó con solución A o con solución A más el agregado de ATP 100 μ M y Cl_2Mg 10 mM , el análisis en gradientes de sacarosa que contenían los mismos componentes de la mezcla de preincubación mostró un perfil similar al de las Figuras 1 y 3 (Figura 5 panel A).

Cuando la preparación de DE-52 se preincubó con $\text{AMPc}[^3\text{H}]$ 2 μ M y se sembró en un gradiente equilibrado con $\text{AMPc}[^3\text{H}]$, la proteína ligante de AMPcíclico y la actividad fosforilante se comportaron como dos entidades independientes con coeficientes de sedimentación menores (Figura 5 panel B). Este resultado indica que la incubación previa en presencia de AMP cíclico produjo la disociación de la holoenzima en sus componentes regulatorio y catalítico, los cuales sedimentaron en el gradiente como dos picos simétricos con coeficientes de 2,8 S y 3,2 S respectivamente.

La reasociación de los componentes regulatorio y catalí-



Resultados y Discusión

tico de la holoenzima pudo ser observada cuando la preparación preincubada con AMPcíclico se centrifugó en un gradiente sin AMPcíclico (Figura 5 panel C).

El perfil de actividad fosforilante y capacidad ligante de AMPcíclico que pone en evidencia la disociación de la holoenzima, pudo ser observado también cuando la preparación enzimática se preincubó en presencia de ATP 100 μ M, Cl_2Mg 10 mM y kémtido 5 μ M y se sembró en un gradiente equilibrado con los componentes de la mezcla de preincubación (Figura 5 panel D). El reemplazo de kémtido 5 μ M por protamina a una concentración 0,4 mg/ml tuvo el mismo efecto disociante y se obtuvo el mismo perfil de la Figura 5 panel D (resultado no mostrado).

Cabe señalar que todas las preparaciones de holoenzima sometidas a los distintos tratamientos que se describen y analizadas por centrifugación en gradientes de sacarosa se comportaron de la manera descripta independientemente del grado de activación por AMPcíclico que presentarán originalmente.

I.3.b EFECTO DE POLIAMINAS Y DE LA CONCENTRACION SALINA EN LA DISOCIACION DE LA HOLOENZIMA

Es conocida la propiedad de ciertas quinasas dependientes de AMPcíclico, en particular las de tipo I, de ser disociadas por la sola presencia de proteínas básicas (Miyamoto et al, 1971) o de ClNa (Corbin et al, 1975; Palmer et al, 1980).

Dada la característica de la holoenzima de *Saccobolus* de disociarse en presencia de kémtido o protamina, sustratos básicos que, como se muestra más adelante, resultan ser los aceptores de fosfato preferidos por esta quinasa, interesó estudiar el efecto de poliaminas -policationes naturales- en la disociación de la enzima.

Se analizaron los perfiles de sedimentación en gradientes de sacarosa de la enzima obtenida de DE-52 preincubada en presencia de poliaminas (espermidina o espermina). En la Figura 6 se muestra el perfil de actividad fosforilante obtenido con la holoenzima preincubada 5 minutos a 30 °C en presencia de espermidina 0,1 M y centrifugada en un gradiente equilibrado con la misma concentración de espermidina de la mezcla de preincubación. La presencia de un pico de actividad fosforilante con coeficiente de sedimentación de 4,5 S indicó

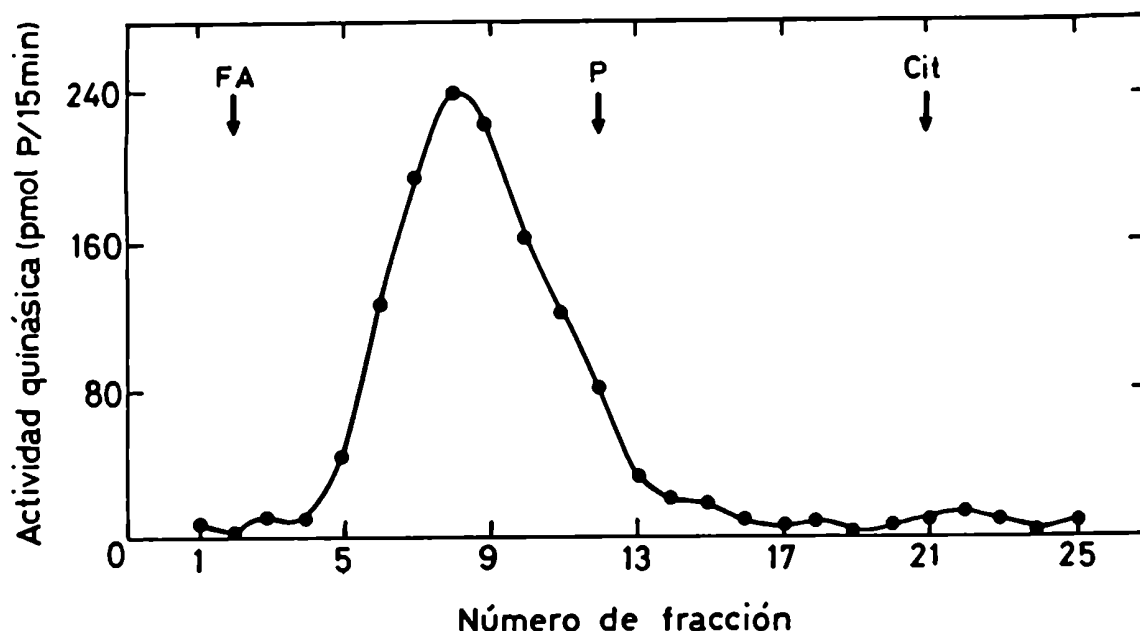


FIGURA 6: Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de la fracción de DE-52 preincubada en presencia de espermidina. Una alícuota de la fracción de DE-52 se preincubó durante 5 minutos a 30 °C en presencia de espermidina 0,1 M y se sembró en un gradiente de sacarosa preparado en solución A con el agregado de espermidina 0,1 M. La centrifugación se llevó a cabo a 48.000 rpm durante 18 horas. En alícuotas apropiadas de cada fracción se ensayó actividad de kinasa con kémtido como sustrato y en presencia de AMPcíclico. Las flechas indican la posición de las proteínas marcadoras: P: peroxidasa, FA: fosfatasa alcalina, Cit: citocromo C.

que la holoenzima no sufrió disociación. El mismo resultado se obtuvo con espermina (resultados no mostrados).

Se analizó también el efecto del ClNa en la disociación de la holoenzima. Una alícuota de la preparación obtenida de DE-52 se preincubó durante 5 minutos a 30°C con ClNa 0,5 M y se centrifugó en un gradiente que contenía la misma concentración de sal presente en la mezcla de preincubación. Se obtuvo el mismo perfil de actividad fosforilante de la Figura 6, indicando que la holoenzima de *Saccobolus* no es capaz de disociarse en presencia de sal.

I.4 MEDICION DE LA DEPENDENCIA DE AMPcíclico

El hecho de que la holoenzima de *S.platensis* sea completamente disociada en presencia de sus sustratos explica la imposibilidad de medir la dependencia de AMP cíclico de la actividad fosfotransferasa en las condiciones del ensayo estándar (ver Materiales y Métodos) y permite suponer que la activación de la holoenzima podría ser observada a tiempos cortos de incubación. En efecto, cuando la actividad fosfotransferasa de la holoenzima obtenida de un gradiente de sacarosa se midió a distintos tiempos y en presencia o en ausencia de AMPcíclico, pudo detectarse la activación producida

Resultados y Discusión

TABLA 1: Efecto del tiempo de incubación en la disociación de la holoenzima por kémptido

Tiempo de incubación	Actividad fosfotransferasa		
minutos	pmoles de P incorporados		
	- AMPc	+ AMPc	+AMPc/-AMPc
0,5	50	146	2,9
1	115	252	2,2
2	570	700	1,2
5	1057	1200	1,1
10	1740	1905	1,1
15	2800	2850	1,0

Se utilizó como fuente de quinasa de proteína la holoenzima obtenida a partir de un gradiente de sacarosa (pico de 4,5 S). Una alícuota de la preparación correspondiente a la cantidad necesaria para 15 ensayos individuales se preincubó con o sin el agregado de AMPcíclico 2 μ M durante 5 minutos a 30 °C. La reacción se inició con el agregado del resto de los componentes hasta completar las 15 dosis del ensayo estándar descrito en Materiales y Métodos. Las muestras fueron procesadas a los tiempos indicados.

por el nucleótido. Como puede observarse en la Tabla 1, con 0,5 minutos de incubación , la relación de actividades (+AMPcíclico/-AMPcíclico) fue de alrededor de 3 y disminuyó progresivamente con tiempos de incubación prolongados. A los 15 minutos de incubación (condiciones del ensayo estándar)

la actividad fosfotransferasa de la holoenzima medida en ausencia de AMPcíclico alcanzó un valor similar al obtenido en el ensayo llevado a cabo en presencia del nucleótido.

I.5 EFECTO DE SALES

Es conocido el notable efecto inhibitorio del ClNa sobre la actividad de las quinasas de proteína (Reimann et al, 1971; Corbin et al, 1972).

Se midió el efecto de concentraciones salinas sobre la actividad fosfotransferasa de la holoenzima obtenida de DE-52 llevando a cabo el ensayo de fosforilación con kémtido como sustrato en presencia de concentraciones crecientes de ClNa. Como puede verse en la Figura 7, la actividad fosfotransferasa decayó rápidamente con el agregado de ClNa 0,05 M y se inhibió en un 90% con concentración 0,5 M.

I.6 SEPARACION DE LAS SUBUNIDADES REGULATORIA Y CATALITICA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD: OBTENCION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA LIBRE

En la Figura 8 se observa el perfil de la cromatografía en columna de AMPcíclico-agarosa de la preparación de holoenzima obtenida de DE-52.

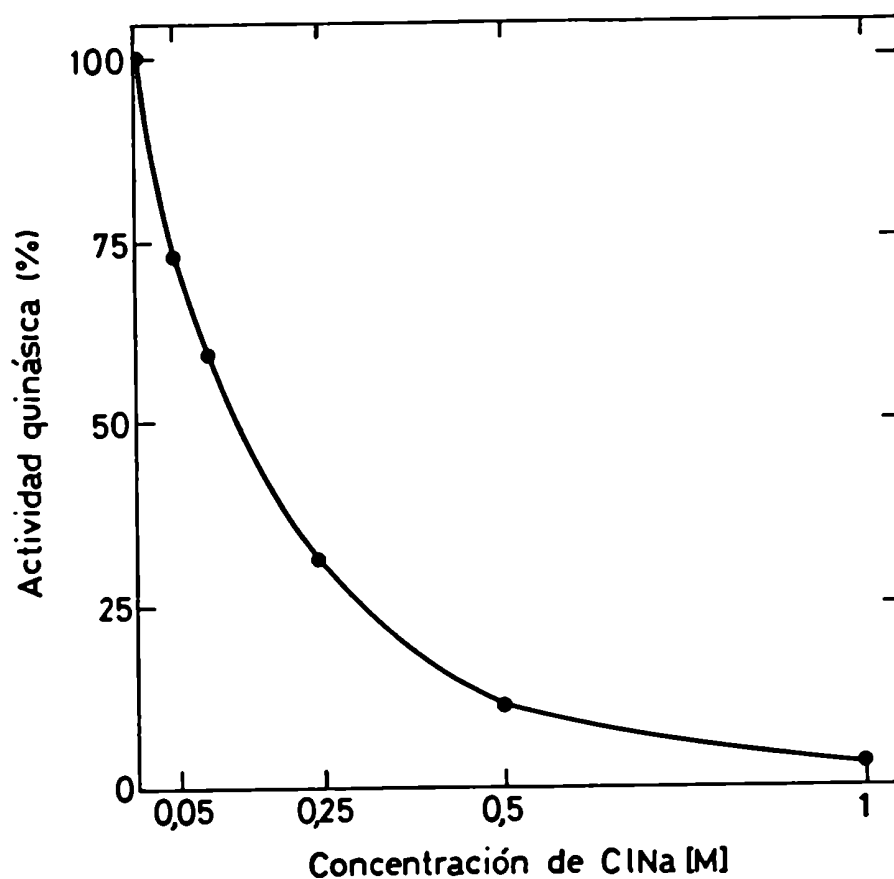
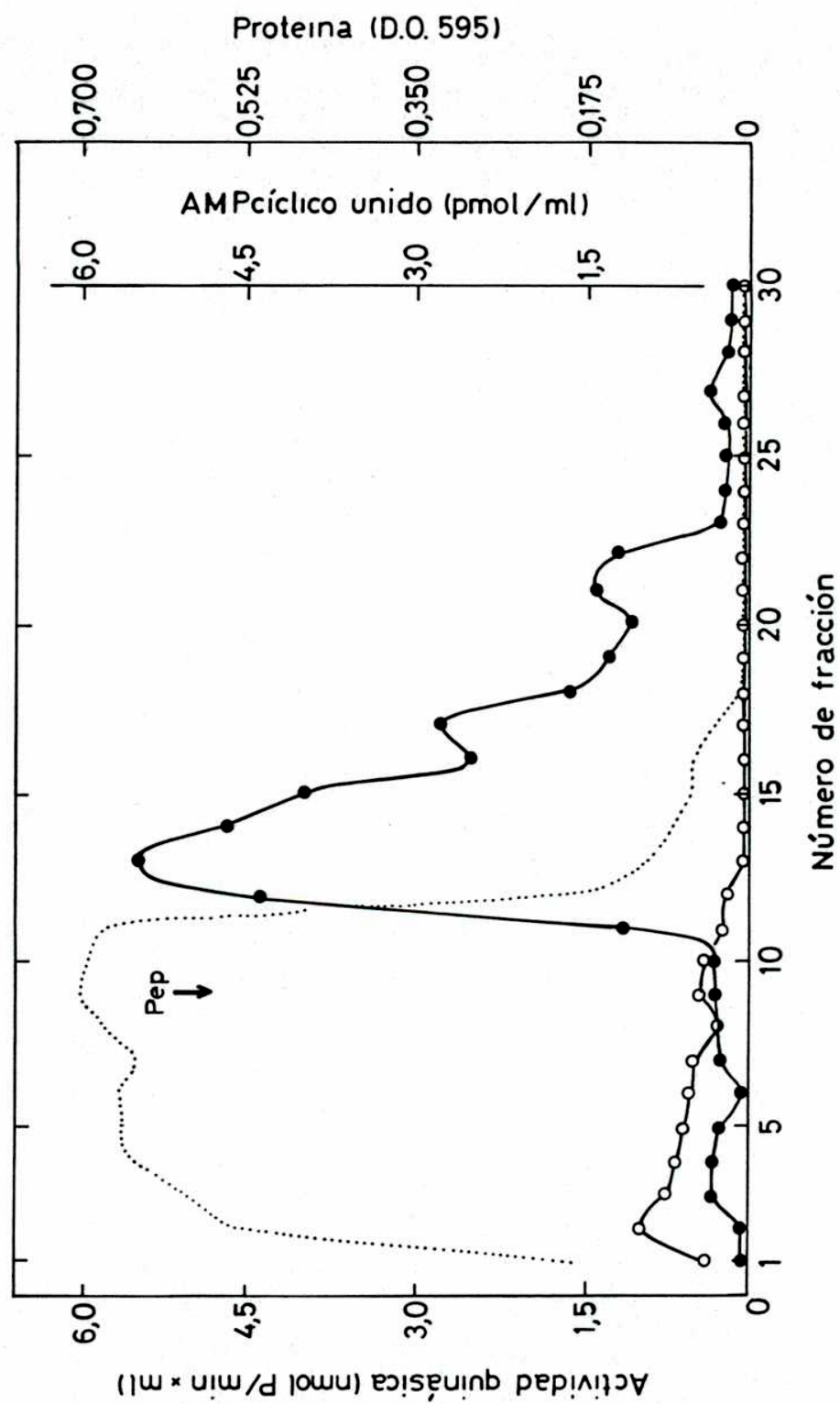


FIGURA 7: Efecto de la concentración salina sobre la actividad fosfotransferasa de la holoenzima. La actividad fosforilante de la preparación de holoenzima obtenida de DE-52 se ensayó en presencia de concentraciones crecientes de ClNa. El ensayo se llevó a cabo en presencia de AMPcíclico, utilizando képtido como sustrato.



Resultados y Discusión

Como se puede observar, la subunidad catalítica percoló de la columna notoriamente desfasada del grueso de la proteína. La actividad fosfotransferasa recuperada representó aproximadamente el 30% de la actividad fosforilante sembrada en la columna. En las primeras fracciones se observa que percoló proteína ligante de AMPcíclico desfasada de la actividad quinásica. La capacidad ligante detectada en las fracciones del percolado, variable en cantidad de preparación en preparación, nunca superó el 10 % de la proteína ligante de AMPcíclico sembrada; el 90 % restante quedó retenido en la columna.

De esta manera se obtuvo una preparación de subunidad catalítica libre de subunidad regulatoria que, conservada a 4 °C, mantuvo estable su actividad fosfotransferasa durante varios días.

Si bien hubo una neta separación del grueso de la proteína, la purificación calculada resultó ser sólo de 10 veces, probablemente debido a la pérdida importante de actividad fosforilante en este paso de purificación.

I.7 PURIFICACION PARCIAL Y PROPIEDADES CATALITICAS DE LA SUBUNIDAD C

Se llevaron a cabo una serie de intentos tendientes a obtener una preparación de la subunidad catalítica de mayor grado de purificación partiendo de la reunión de las fracciones obtenidas del percolado de la columna de AMPcíclico-agarosa.

Dado que la mayoría de las subunidades catalíticas libres percolan de las columnas de intercambio aniónico debido al carácter catiónico que presentan a pHs cercanos a 7, esta propiedad permite separarlas de las proteínas que la acompañan que quedarán retenidas en el intercambiador. La actividad fosforilante obtenida de la reunión de las fracciones activas del percolado de AMPcíclico-agarosa se sembró en una minicolumna de DE-52, desarrollándose la cromatografía como se describe en Materiales y Métodos.

Como puede verse en el diagrama de la Figura 9, a diferencia de la mayoría de las subunidades catalíticas descritas, la actividad fosforilante quedó retenida en la columna indicando el carácter aniónico de la subunidad catalítica libre. El mismo resultado se obtuvo al desarrollarse la cromatografía a pH 6,5 con una solución que contenía los mismos

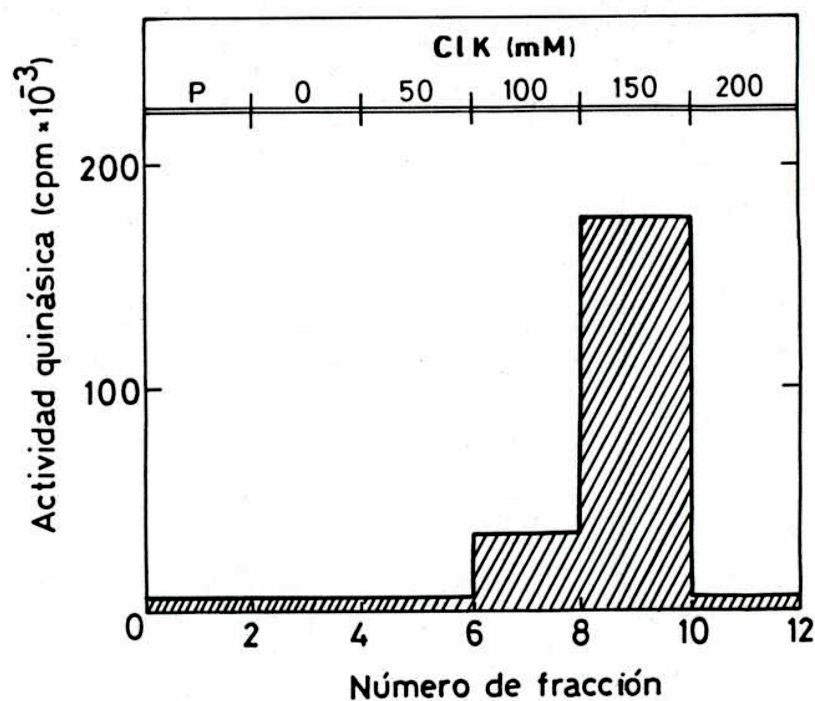


FIGURA 9: Elución de la actividad fosforilante obtenida del percolado de AMPcíclico-agarosa cromatografiada en minicolumna de DE-52. La cromatografía se desarrolló como se describe en Materiales y Métodos. Las barras señalan las fracciones correspondientes al percolado (P) y a los lavados con soluciones de concentraciones crecientes de ClK.

componentes de la solución A (ver Materiales y Métodos) excepto que el tampón utilizado fue fosfato 50 mM pH 6,5 (resultados no mostrados).

Se intentó la purificación de la subunidad catalítica obtenida del percolado de AMPcíclico-agarosa a través de una minicolumna de hidroxil-apatita equilibrada y desarrollada con una solución que contenía los mismos componentes de la solución A (ver Materiales y Métodos) excepto que el tampón utilizado fue fosfato 50 mM pH 6,5. El método tampoco resultó adecuado ya que la actividad fosforilante percoló de la columna junto con la proteína acompañante (resultados no mostrados).

La actividad fosfotransferasa obtenida del percolado de la columna de AMPcíclico-agarosa concentrada como se indica en Materiales y Métodos se utilizó como fuente de subunidad catalítica en los ensayos que se describen a continuación.

I.7.a ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO

Con el objeto de conocer la especificidad de sustrato de la subunidad catalítica, la actividad fosfotransferasa se ensayó sobre diferentes proteínas y péptidos que han mostrado ser sustratos clásicos de las quinasas de proteína dependen-

tes de AMPcíclico.

TABLA 2: Especificidad de sustrato de la subunidad catalítica

Sustrato agregado	Concentración	Actividad quinásica
	mg/ml	pmol/min
ninguno	---	< 2,7
Kéemptido	0,1	270
Isokéemptido ^a	0,4	47
Isokéemptido ^b	0,4	18
Protamina	1,5	80
Histona II S ^c	1,5	< 2,7
Histona VII S	1,5	< 2,7
Histona IV S	2	4
Histona VIII S	1,5	2
Histona VI S	2	< 2,7
Caseína	5	< 2,7
Fosvitina	5	< 2,7

La subunidad catalítica obtenida del percolado de la columna de AMPcíclico-agarosa se utilizó como fuente de enzima y la actividad fosfotransferasa se midió como se describe en Materiales y Métodos. Los sustratos se ensayaron a las concentraciones indicadas.

a: Arg-Lis-Arg-Ser-Arg-Ala-Glu

b: Arg-Arg-Lis-Ala-Ser-Gli-Pro

c: las histonas se nombran de acuerdo a la nomenclatura de Sigma.

Al igual que la mayoría de las quinasas de proteína dependientes de AMPcíclico de eucariotas superiores (Talmadge et al, 1975; Kumon et al, 1972) e inferiores (Moreno y Passeron, 1980; Ulloa et al, 1988), la subunidad catalítica de Saccobolus mostró preferencia por sustratos básicos.

Como puede verse en la Tabla 2, el orden de preferencia por los sustratos fue: kéemptido >> protamina > isokéemptidos. Sin embargo, merece destacarse que siendo las histonas excelentes aceptores de fosfato para las quinasas de proteína dependientes de AMPcíclico, ninguna de las fracciones de histonas ensayadas resultó ser sustrato de esta actividad fosfo-transferasa.

Como era de esperar para la subunidad catalítica de una quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico, sustratos clásicos de quinasas independientes de AMPcíclico tales como caseína y fosvitina no mostraron ser fosforilados por esta actividad.

I.7.b Km PARA EL ATP Y EL KEMPTIDO

Para el cálculo del valor de la Km para el ATP, se incubaron alícuotas de la preparación de subunidad catalítica en presencia de concentraciones crecientes de ATP, manteniéndose

fijas las concentraciones de Mg^{++} y de képtido en 10 mM y 128 μM respectivamente.

Para el cálculo del valor de la K_m para el képtido, la preparación enzimática se incubó con concentraciones crecientes de képtido, manteniéndose fijas las concentraciones de Mg^{++} y de ATP en 10 mM y 0,1 mM respectivamente.

En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos al aplicar el tratamiento de Lineweaver - Burk a los datos de velocidades iniciales en función de las distintas concentraciones de sustrato (ATP y képtido) con el objeto de calcular los parámetros cinéticos de la subunidad catalítica libre. Las K_m calculadas para el ATP y el képtido fueron 40 μM y 50 μM respectivamente. Estos valores son similares a los descritos en la literatura para quinasas de proteína dependientes de AMPcíclico de eucariotas superiores (Lincoln y Corbin, 1977) e inferiores (Moreno y Passeron, 1982; Pastori et al, 1985; Flotow y Wheldrake, 1987).

I.7.c EFECTO DEL PEPTIDO INHIBIDOR SOBRE LA ACTIVIDAD DE C

Para confirmar la identificación de la subunidad catalítica como componente de una quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico, se estudió su sensibilidad a un péptido sinté-

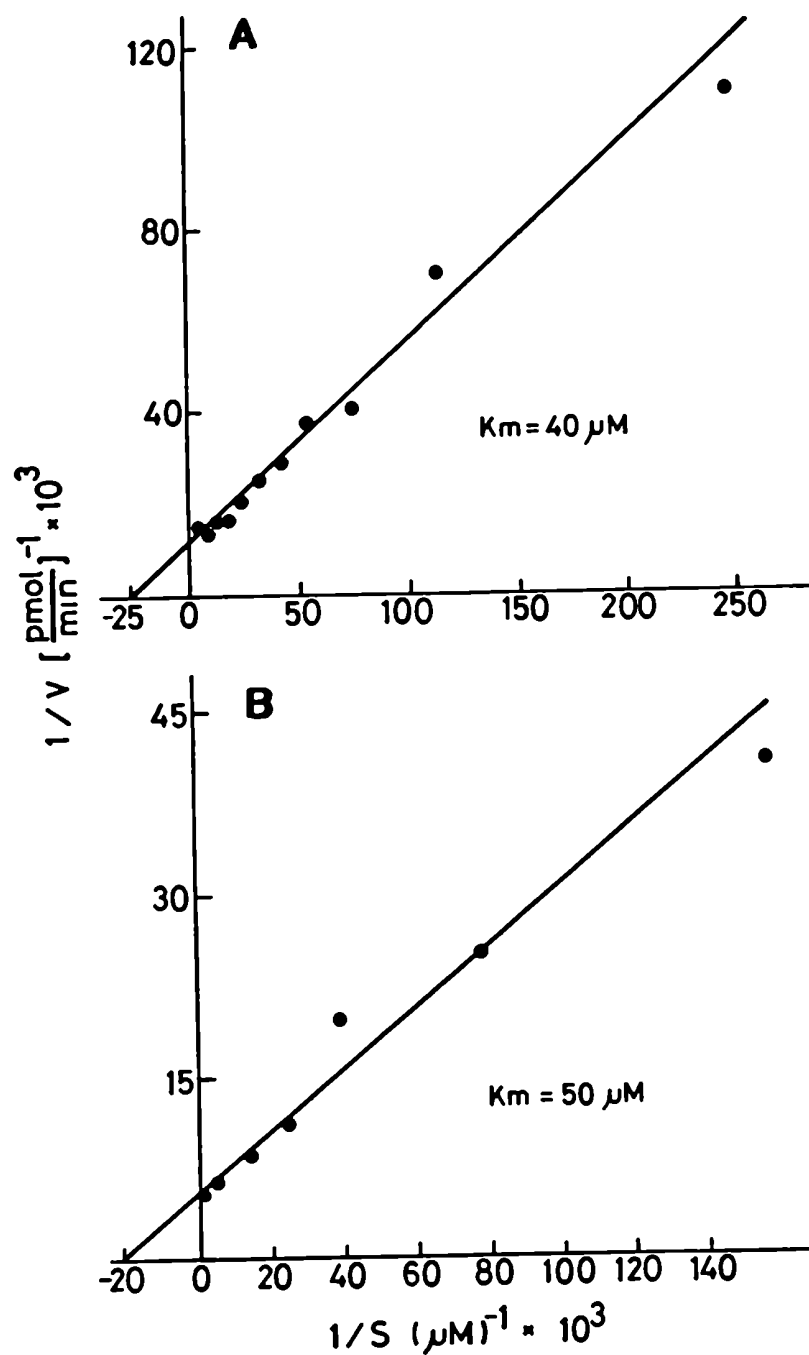


FIGURA 10: Gráfico de dobles recíprocas de velocidad como función de la concentración de sustrato para la subunidad catalítica libre. Panel A: ATP. Panel B: kemptido. La subunidad catalítica libre obtenida del percolado de la columna de AMPcíclico-agarosa se utilizó como fuente de enzima.

Resultados y Discusión

tico (Hodges y Merrifield, 1975) derivado del inhibidor termoestable de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico de mamíferos (Walsh et al, 1968).

Se ha demostrado que el inhibidor termoestable o los péptidos derivados del mismo, se comportan como inhibidores competitivos de las quinasas de proteína dependientes de AMPcíclico al unirse a la subunidad catalítica libre (Ashby y Walsh, 1973).

En la Figura 11 se comparan los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la actividad fosfotransferasa de la subunidad catalítica de la quinasa de *Saccobolus* y de la subunidad catalítica de la enzima de corazón bovino por efecto del péptido inhibidor. Como puede observarse, la actividad fosforilante de la subunidad catalítica de *S.platensis* se inhibió en un 50 % con una concentración de péptido inhibidor un orden de magnitud mayor que la necesaria para obtener el mismo efecto sobre la subunidad catalítica de corazón bovino, pero para ambas enzimas se alcanzó la inhibición total.

Estos resultados indican que, aunque la subunidad catalítica de la enzima de corazón bovino es considerablemente más sensible al péptido inhibidor que la subunidad catalítica de la quinasa de *Saccobolus*, ésta última se comportó en

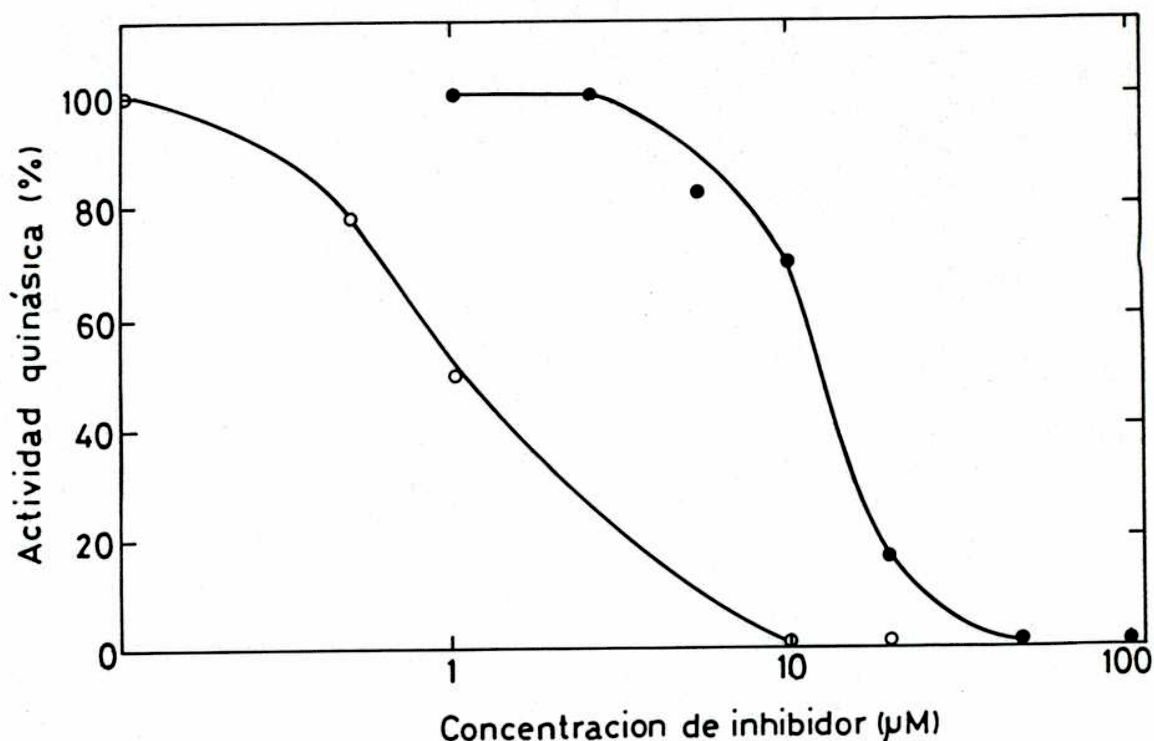


FIGURA 11: Efecto del péptido inhibidor sobre la actividad fosforilante de la subunidad catalítica aislada de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico de *S. platensis* y de corazón bovino. Aliquotas apropiadas de la preparación de subunidad catalítica de la quinasa de *Saccobolus* obtenida del percolado de AMPcíclico-agarosa (●) y de una preparación comercial de la subunidad catalítica de la quinasa de corazón bovino (○) se incubaron 5 minutos a 30 °C en presencia de las concentraciones indicadas del inhibidor; la actividad fosforilante de las muestras se midió utilizando kémtido como sustrato. Los resultados se expresan como porcentajes de las actividades respectivas en ausencia del inhibidor (se utilizaron 125 unidades de subunidad catalítica de ambas fuentes).

presencia del péptido inhibidor, como era de esperar para el componente catalítico de una quinasa dependiente de AMP cíclico.

I.8 PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA

I.8.a PURIFICACION

La Tabla 3 resume los pasos de purificación llevados a cabo de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, para la obtención de la subunidad regulatoria de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico de S.platensis.

TABLA 3: Purificación de la subunidad regulatoria

	Vol.	Proteína	AMPc unido	Actividad específica	Rendimiento
	ml	mg	pmoles	pmol/mg	%
S-100	120	300	840	2,8	100
Fracción de DE-52	60	60	800	13,3	95
Eluido de AMPc-agarosa	4,5	0,08	330	4125	37,5

Los detalles experimentales de los pasos de purificación y el ensayo estándar de capacidad ligante de AMPcíclico se indicaron en Materiales y Métodos.

Resultados y Discusión

Como puede observarse, en la fracción de DE-52 se recuperó el 95% de la proteína ligante de AMPcíclico presente en la fracción S-100.

Como se describió en detalle en el ítem I.6, la cromatografía en columna de AMPcíclico-agarosa de la fracción de DE-52 dió lugar a la disociación de la holoenzima en sus subunidades regulatoria y catalítica. La subunidad catalítica fue recuperada en el percolado y el 90% de la capacidad ligante de AMPcíclico sembrada fue retenida por la resina.

La cromatografía en columna de AMPcíclico-agarosa fue el paso más significativo en la purificación de la proteína ligante de AMPcíclico; luego de 36 horas de diálisis para eliminar el AMPcíclico presente en la preparación de subunidad regulatoria eluída de la resina, (ver Materiales y Métodos) se recuperó cerca del 40 % de la capacidad ligante de AMPcíclico presente en el extracto soluble. La purificación calculada para la subunidad regulatoria resultó ser de aproximadamente 1500 veces. Esta preparación de proteína ligante de AMPcíclico se utilizó en los ensayos que se describen a continuación.

I.8.b ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS

La Figura 12 muestra la fotografía del gel en el que se corrió la preparación de la subunidad regulatoria obtenida de la columna de AMPcíclico-agarosa dializada y concentrada como se describe en Materiales y Métodos.

Como se observa en la Figura, se detectó una única banda de proteína con movilidad intermedia respecto de los marcadores fumarasa y piruvato quinasa. El peso molecular correspondiente a esta banda es de 54.000. No se observaron bandas adicionales aún cuando el revelado de la proteína del gel se sensibilizó por tinción con plata (resultado no mostrado).

La presencia de una única banda de proteína permite suponer que la proteína ligante de AMPcíclico de *Saccobolus* ha sido purificada a homogeneidad. El hecho de no haberse detectado bandas de proteína de pesos moleculares menores de 54 K sugiere que con el protocolo de purificación empleado se evitó la degradación proteolítica de la proteína ligante de AMP cíclico. A pesar de no haberse detectado más que una única banda de proteína en la preparación purificada y que el peso molecular de la misma es similar al informado para monómeros de RII y de subunidades regulatorias de levaduras, la posibilidad de que la proteína obtenida sea en sí misma una forma

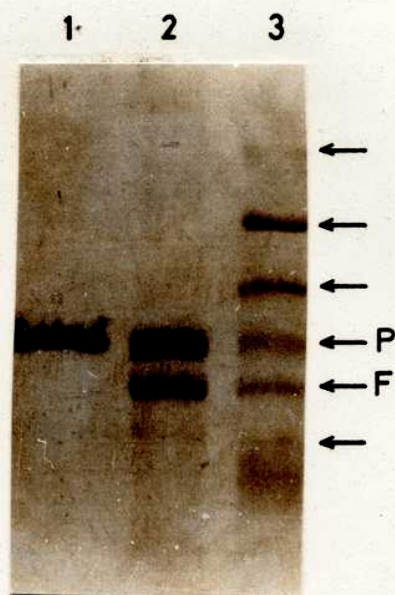


FIGURA 12: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de la proteína ligante de AMPcíclico obtenida de AMPcíclico-agarosa. La muestra que contenía 40 μ g de proteína se corrió en un gel en las condiciones descritas en Materiales y Métodos y se reveló con Coomassie blue. Carril 1: proteína ligante de AMPcíclico. Carril 2: proteínas marcadoras; F: fumarasa, P: piruvato quinasa. Carril 3: proteínas marcadoras. Las flechas señalan la posición de las proteínas marcadoras de pesos moleculares (180 K; 116 K; 84 K; 58 K; 48,5 K; 36,5 K).

proteolizada de la subunidad regulatoria de la quinasa de *Saccobolus* no puede ser definitivamente descartada.

La degradación proteolítica de las subunidades regulatorias durante los procedimientos de extracción y purificación es un evento frecuente y ampliamente descrito. Han sido aislados productos de proteólisis de subunidades regulatorias de tipo I o II que, habiendo perdido la capacidad de formar dímeros conservan la capacidad de ligado de AMPcíclico (Potter y Taylor, 1980). Los estudios de las subunidades regulatorias de hongos han mostrado numerosas evidencias acerca de la rápida proteólisis parcial que pueden sufrir estas proteínas en los extractos crudos (Hyxson y Krebs, 1980; López Gomes et al, 1983); dicha proteólisis es a menudo detectada por la presencia en geles desnaturalizantes de bandas de proteína de pesos moleculares menores al de la banda principal que supuestamente corresponde a la subunidad regulatoria intacta.

I.8.c CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA

Para confirmar que la proteína recuperada de la columna de AMPcíclico-agarosa era la proteína ligante de AMPcíclico, alícuotas de la preparación purificada se analizaron en gradientes de sacarosa.

Resultados y Discusión

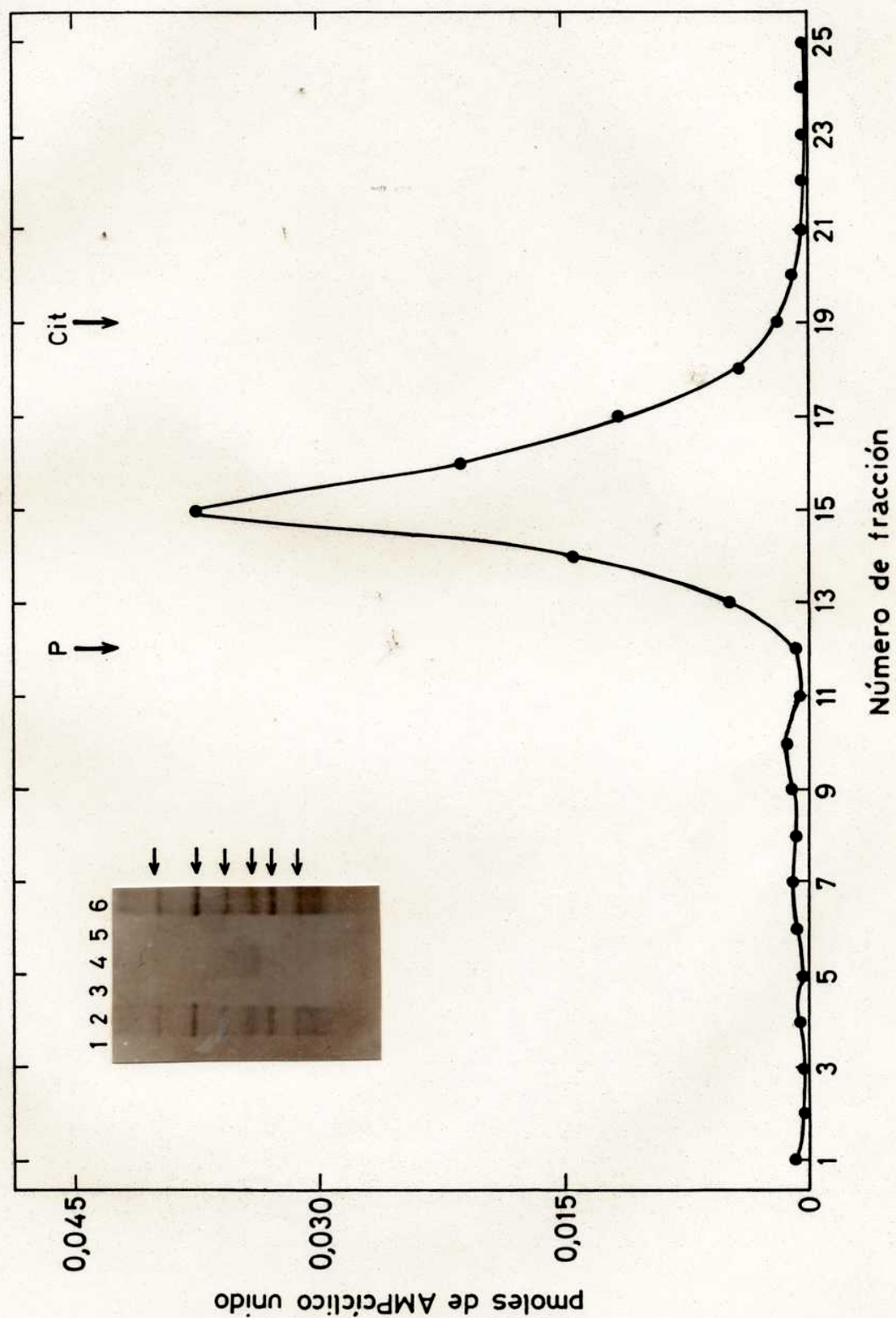
Como puede verse en la Figura 13, la proteína ligante de AMPcíclico sedimentó como un único pico agudo y simétrico correspondiente a un coeficiente de sedimentación de 2,8 S. El coeficiente de sedimentación de la proteína ligante de AMPcíclico purificada fue idéntico al obtenido para la subunidad regulatoria proveniente de la holoenzima previamente disociada en presencia de AMPcíclico, cuyo perfil en gradientes de sacarosa se mostró en la Figura 5 panel B.

Para confirmar que la banda de peso molecular 54.000 detectada en el gel de la Figura 12 corresponde a la proteína ligante de AMPcíclico detectada en el gradiente de la fracción purificada, las fracciones del gradiente se reunieron y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

Como puede observarse en el inserto de la Figura 13, se detectó una única banda de 54 kD en el carril correspondiente a la reunión de las fracciones del pico de proteína ligante de AMPcíclico. No se detectaron bandas adicionales en ese carril ni se detectó proteína alguna en los carriles correspondientes a la reunión de las fracciones vecinas al pico del gradiente.

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS de

FIGURA 13: Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de la proteína ligante de AMPcíclico purificada. Una alícuota de la preparación de proteína ligante de AMPcíclico obtenida del eluido de la columna de AMPcíclico-agarosa (10 µg de proteína) se centrifugó en un gradiente preparado como se indica en Materiales y Métodos. La centrifugación se llevó a cabo a 48.000 rpm durante 19 horas. En alícuotas apropiadas de cada fracción se midió capacidad ligante de AMPcíclico. Las flechas indican la posición de las proteínas marcadoras: P: peroxidasa, Cit: citocromo C. **INSERTO: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las fracciones del gradiente.** Las fracciones del gradiente de sacarosa de la figura se reunieron como se indica en los carriles 1, 3, 4 y 5, se dializaron exhaustivamente contra agua deionizada, se liofilizaron y se resuspendieron en 20 µl de agua deionizada. Las muestras así preparadas se desnaturalizaron y se corrieron en el gel como se describe en Materiales y Métodos. La proteína del gel se reveló por tinción con plata. Carril 1: fracciones 1 a 6; Carril 2: proteínas marcadoras; Carril 3: fracciones 7 a 12; Carril 4: fracciones 13 a 18; Carril 5: fracciones 19 a 24; Carril 6: proteínas marcadoras. Las flechas señalan la posición de las proteínas marcadoras cuyos pesos moleculares se indican al pie de la Fig.12.



la preparación de subunidad regulatoria obtenida de AMPcíclico-agarosa (Figura 12) permitió suponer que la proteína ligante de AMPcíclico había sido purificada a homogeneidad. El gel cuya fotografía se muestra en el inserto de la Figura 13 confirma la pureza de la preparación de subunidad regulatoria y permite asignar la banda de 54 KD al pico de capacidad ligante de AMPcíclico que sedimentó en el gradiente con un coeficiente de 2,8 S. Estos resultados confirman que la proteína de peso molecular 54 K es la subunidad regulatoria de la quinasas de proteína dependiente de AMPcíclico de S.platensis.

I.8.d ESPECIFICIDAD DE UNION DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA AL AMPcíclico

Se estudió la capacidad de diferentes compuestos de competir con el AMPcíclico en el ensayo de capacidad ligante de la subunidad regulatoria purificada. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Como puede observarse, a concentración 1 μ M sólo AMPcíclico, 8-azido-AMPcíclico y GMPcíclico mostraron ser capaces de competir con el ligado de AMPcíclico[3 H] 0,1 μ M del ensayo siendo el AMPcíclico el competidor más efectivo. A concentraciones hasta 10.000 veces mayores a la del AMPcíclico[3 H] del ensayo, ATP, GTP, 5'AMP y adenosina se comportaron como

competidores inefectivos.

TABLA 4: Especificidad de la unión al AMPcíclico de la subunidad regulatoria.

Agregados	Concentración	AMPcíclico[3 H] unido a la proteína ^a
	μ m	%
ninguno		100
AMPcíclico	10^{-2}	82
	10^{-1}	55
	1	15
8-Azido-AMPcíclico	10^{-1}	80
	1	62
	10	23
GMPcíclico	1	84
	10	62
	10^2	30
ATP	10	100
	10^2	98
	10^3	98
GTP	10	100
	10^2	100
	10^3	99
5' AMP	10	100
	10^2	98
	10^3	95
Adenosina	10	99
	10^2	98
	10^3	95

El ensayo de capacidad ligante se llevó a cabo en las condiciones del ensayo descrito en Materiales y Métodos con el agregado de los compuestos a las concentraciones indicadas.
a: subunidad regulatoria purificada (eluido de la columna de AMPcíclico-agarosa).

Estos resultados son similares a los informados en estudios de especificidad de unión al AMPcíclico de subunidades regulatorias de las quinasas de mamíferos (Hixson y Krebs, 1980) y de hongos (Trevillyan y Pall, 1982; de Gunzburg y Veron, 1982) e indican que la unión al AMPcíclico de la subunidad regulatoria de Saccobolus es altamente específica.

I.8.e DISOCIACION DEL AMPcíclico[³H] UNIDO A LA SUBUNIDAD REGULATORIA

Se llevó a cabo el análisis de la cinética de disociación del AMPcíclico unido a la subunidad regulatoria aislada con la finalidad de detectar, como en la mayoría de las subunidades regulatorias estudiadas, la existencia de sitios diferentes para el ligado de AMPcíclico.

Los resultados que se muestran en la Figura 14 ponen en evidencia una cinética de disociación bifásica que indica la existencia de dos sitios diferentes para la unión del AMPcíclico en la subunidad regulatoria de la quinasa de Saccobolus. Las constantes de velocidad de disociación y vida media, calculadas de acuerdo a Rannels y Corbin (1983) fueron 0,07 min⁻¹ y 9,9 min para el sitio lento; 0,23 min⁻¹ y 3 min para el sitio rápido.

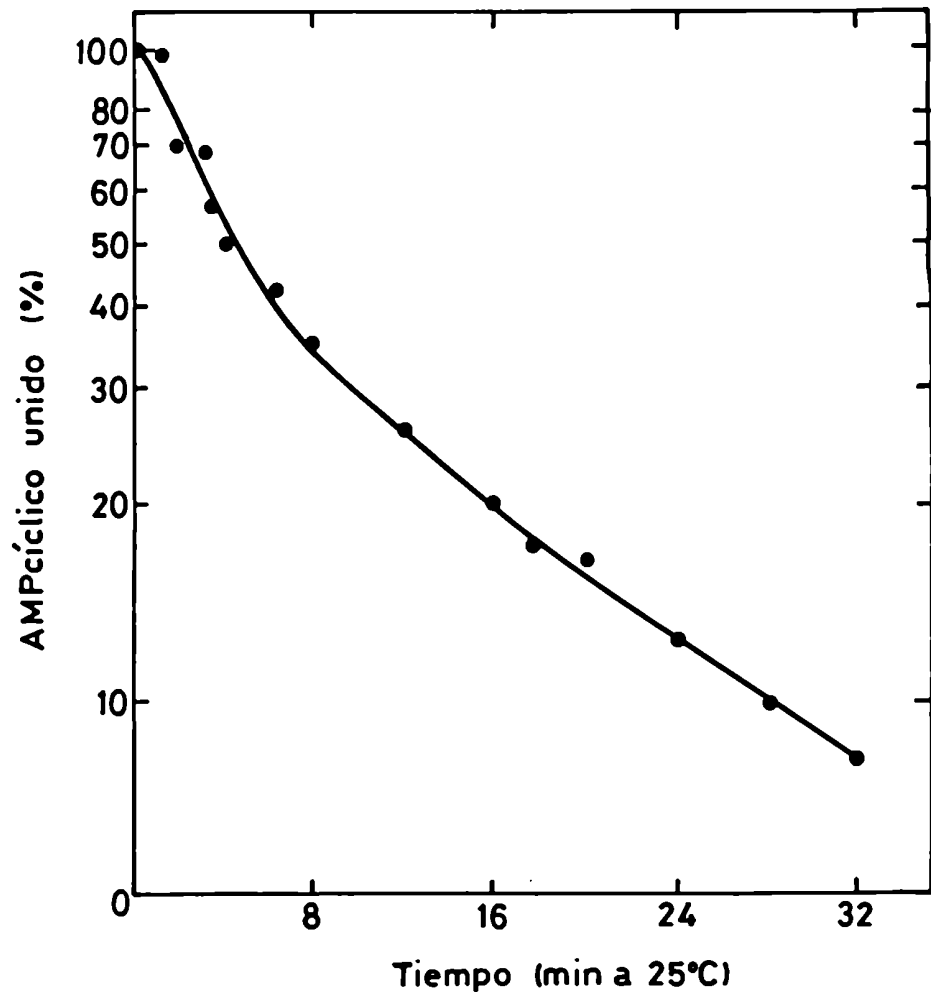


FIGURA 14: Disociación del AMPcíclico[3 H] unido a la subunidad reguladora de la quinasa de *S. platensis*. Una alícuota de la preparación purificada de la subunidad reguladora obtenida de la columna de AMPcíclico-agarosa, correspondiente a la cantidad necesaria para 30 ensayos individuales de capacidad ligante, se incubó en un volumen final de 2,1 ml durante 60 minutos a 25°C en las condiciones del ensayo estándar. La disociación del AMPcíclico[3 H] unido se midió a los tiempos indicados en alícuotas de 60 μ l luego del agregado de AMPcíclico no marcado 50 μ M. El 100 % de ligado de AMPcíclico corresponde a 0,3 pmoles.

I.9 PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LA HOLOENZIMA Y SUS SUBUNIDADES

Para el cálculo de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la holoenzima y sus subunidades se utilizaron los datos de los coeficientes de sedimentación y radios de Stokes obtenidos por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa y filtración en geles respectivamente.

I.9.a DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE SEDIMENTACION

Los coeficientes de sedimentación ($S_{20,w}$) de la holoenzima y sus subunidades se obtuvieron a partir de los datos de sedimentación en los gradientes de sacarosa ya descritos en el ítem I.3 (Figura 5, paneles A y B). De la relación lineal obtenida al graficar la distancia recorrida por las proteínas marcadoras desde la superficie del gradiente en función de sus respectivos S, se obtuvieron por interpolación en la recta los coeficientes de sedimentación de la holoenzima (Figura 15 panel A) y de sus subunidades (Figura 15 panel B).

El valor del coeficiente de sedimentación calculado para la holoenzima fue de 4,5 S y de 2,8 S y 3,2 S para las subunidades regulatoria y catalítica respectivamente.

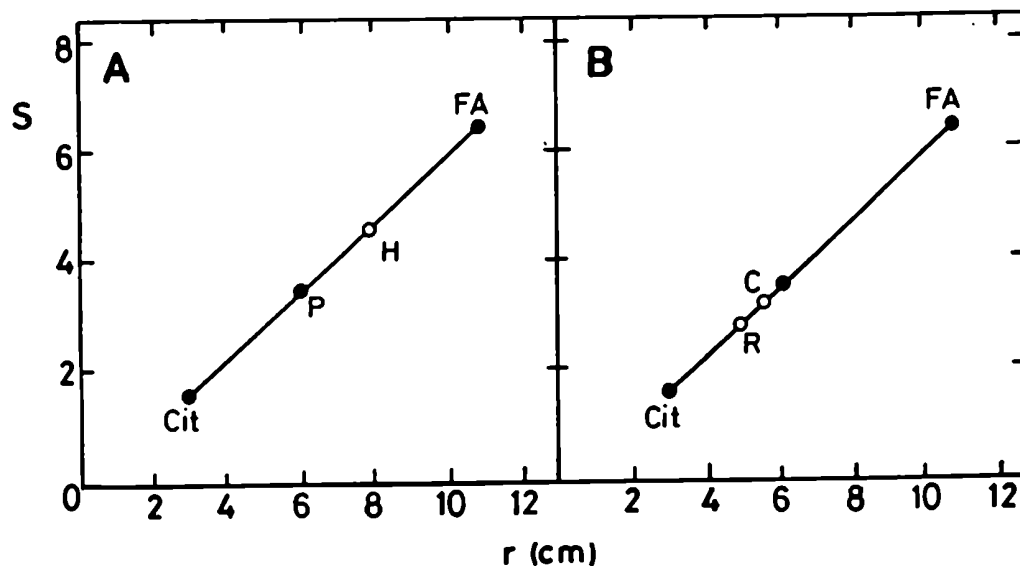


FIGURA 15: Relación entre los coeficientes de sedimentación y las distancias recorridas por la holoenzima o sus subunidades libres y las proteínas marcadoras. Panel A: para la holoenzima nativa. El perfil del gradiente de sacarosa a partir del cual se construyó el gráfico se muestra en la Figura 5 panel A. Panel B: para la holoenzima disociada. El perfil del gradiente de sacarosa a partir del cual se construyó el gráfico se muestra en la Figura 5 panel B. P: peroxidasa; FA: fosfatasa alcalina; Cit: citocromo C; H: holoenzima; C: subunidad catalítica; R: subunidad regulatoria.

I.9.b DETERMINACION DE LOS RADIOS DE STOKES

Para la determinación del radio de Stokes de la holoenzima y de la subunidad regulatoria se utilizaron los datos de elución de la columna de Sephacryl S-300 en la que se cromatografió la fracción de DE-52 concentrada como se describió en Materiales y Métodos. En la Figura 16 se muestran los perfiles de actividad fosfotransferasa (medida con kémptido como sustrato) y de proteína ligante de AMPcíclico obtenidos, así como la posición de las proteínas marcadoras indicadas con flechas. Como puede observarse, la actividad fosforilante acompañada por proteína ligante de AMPcíclico se recuperó en un único pico que eluyó entre los marcadores albúmina sérica bovina y peroxidasa. El perfil de proteína ligante de AMPcíclico mostró un segundo pico en la posición de elución del marcador peroxidasa. Este pico corresponde a subunidad regulatoria libre.

El inserto en la Figura 16 muestra la relación entre $(-\log K_{av})^{1/2}$ y el radio de Stokes de las proteínas marcadoras. Por interpolación se obtuvieron los siguientes valores de radio de Stokes: 3,5 nm para la holoenzima y 3,2 nm para la subunidad regulatoria.

Para la determinación del radio de Stokes de la subuni-

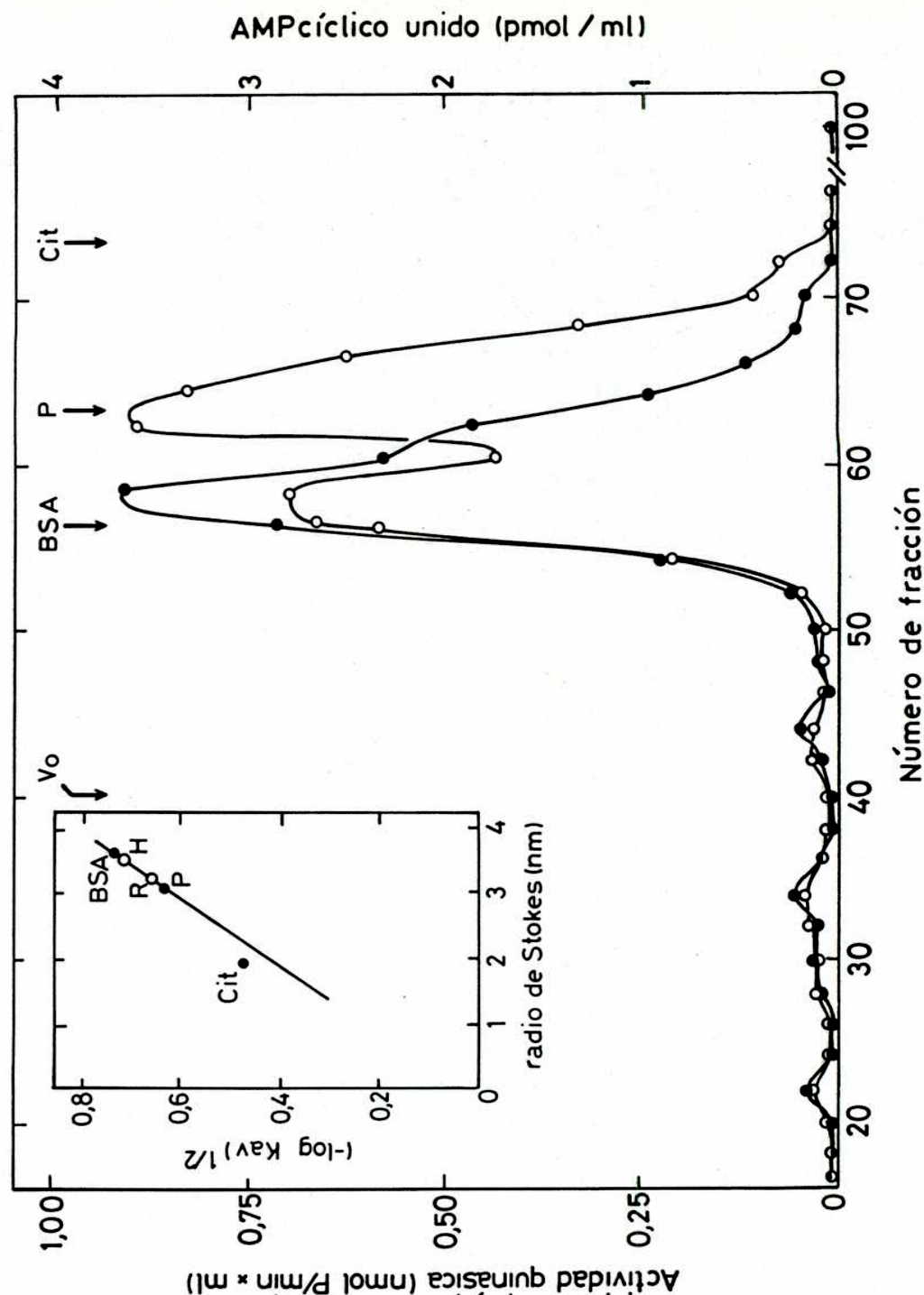


FIGURA 16: Filtración en columna de Sephacryl S-300 de la fracción de DE-52. La cromatografía se desarrolló como se describe en Materiales y Métodos. En alícuotas apropiadas de cada fracción se midió actividad de quinasa en presencia de AMPcíclico con kémtido como sustrato (●) y capacidad ligante de AMPcíclico (○). V_o : volumen de exclusión. Las flechas indican la posición de elución de las proteínas marcadoras: BSA: albúmina bovina sérica, P: peroxidasa, C: citocromo C. Los marcadores fueron cromatografiados en un experimento independiente. El gráfico inserto muestra la relación de $(-\log K_{av})^{1/2}$ con el radio de Stokes de las proteínas marcadoras. H: holoenzima, R: subunidad regulatoria. Otros detalles experimentales se indican en Materiales y Métodos.

dad catalítica se utilizaron los datos de elución de la columna de Sephadex G-150 en la que se cromatografió una alícuota de la actividad fosforilante obtenida del percolado de AMPcíclico-agarosa concentrada como se describe en Materiales y Métodos. En la Figura 17 se muestra el perfil de actividad de kémptido quinasa y la posición de las proteínas marcadoras indicada con flechas. Como puede observarse, la actividad fosforilante se recuperó en un único pico que eluyó entre los marcadores peroxidasa y citocromo C.

El inserto en la Figura 17 muestra la relación entre $(-\log K_{av})^{1/2}$ y el radio de Stokes de las proteínas marcadoras. Por interpolación se obtuvo un valor de radio de Stokes para la subunidad catalítica de 2,7 nm.

1.9.c DETERMINACION DE LOS PESOS MOLECULARES

Una vez conocidos los coeficientes de sedimentación y los radios de Stokes de la holoenzima y sus subunidades, suponiendo un volúmen específico parcial semejante al de las proteínas globulares solubles (0,74 ml/g), se estimaron los pesos moleculares utilizando la ecuación planteada en la sección 6.3 de Materiales y Métodos. Los pesos moleculares calculados fueron: 78 K para la holoenzima, 46 K para la subunidad regulatoria y 41 K para la subunidad catalítica.

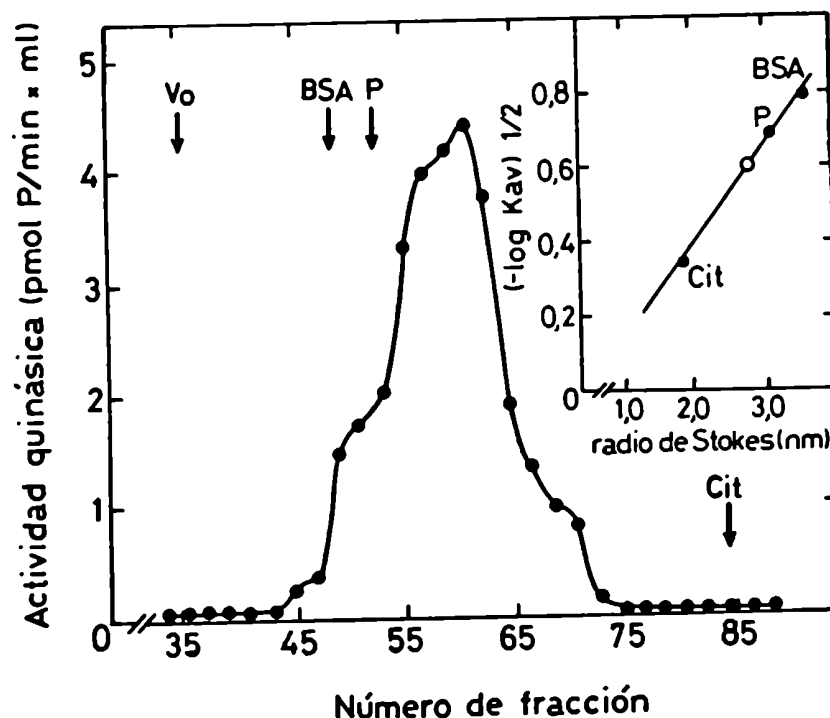


FIGURA 17: Filtración en columna de Sephadex G-150 de la subunidad catalítica obtenida de AMPcíclico-agarosa. La cromatografía se desarrolló como se describe en Materiales y Métodos. En alicuotas apropiadas de cada fracción se midió actividad de quinasa con kémptido como sustrato. Vo: volumen de exclusión. Las flechas indican la posición de elución de las proteínas marcadoras: BSA: albúmina sérica bovina, P: peroxidasa, Cit: citocromo C. Los marcadores fueron cromatografiados en un experimento independiente. El gráfico inserto muestra la relación de $(-\log K_{av})^{1/2}$ con el radio de Stokes de las proteínas marcadoras. Otros detalles experimentales se indican en Materiales y Métodos.

I.9.d DETERMINACION DE LOS COCIENTES FRICCIONALES

Con los valores de los pesos moleculares y de los radios de Stokes se calcularon los valores de los cocientes friccionales f/f_0 aplicando la fórmula planteada en la sección 6.4 de Materiales y Métodos.

Los valores obtenidos fueron: 1,23 para la holoenzima, 1,35 para la subunidad regulatoria y 1,18 para la subunidad catalítica.

En la Tabla 5 se resumen los valores de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la holoenzima y sus subunidades.

TABLA 5: Parámetros moleculares e hidrodinámicos de la holoenzima y de sus subunidades

	C ^a	R ^b	H ^c
$S_{20,w}$ (S)	3,2	2,8	4,5
radio de Stokes (nm)	2,7	3,2	3,5
Peso Molecular	41 K	46 K	78 K
f/f_0	1,18	1,35	1,23

a: subunidad catalítica

b: subunidad regulatoria

c: holoenzima

Resultados y Discusión

Los datos correspondientes a los pesos moleculares y coeficientes de sedimentación descritos en la literatura para la mayoría de las quinasas de proteína dependientes de AMPcíclico de eucariotas superiores oscilan alrededor de 160 K para el peso molecular y entre 6,5 y 7,3 S para el coeficiente de sedimentación (Gill y Garren, 1971; Reimann et al, 1971). Como ya se describió en la Introducción, estos valores corresponden a holoenzimas cuya estructura polimérica es del tipo R_2C_2 , es decir que están formadas por dos subunidades catalíticas y un dímero regulatorio. También se mencionó que especies díméricas del tipo RC han sido aisladas y descritas en varios sistemas; la mayoría de estas formas moleculares representan el producto de proteólisis (endógena o provocada in vitro) de la holoenzima tetramérica original (Rannels et al, 1985; Paveto et al, 1989). Sin embargo, en el acrasial D.discoideum se demostró que la holoenzima dímica de tipo RC corresponde a la forma nativa de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico de este organismo (Mutzel et al, 1987). Los valores del coeficiente de sedimentación para las formas díméricas oscilan alrededor de 4,7 S.

Los valores de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la subunidad catalítica de la quinasa de proteína de-

Resultados y Discusión

pendiente de AMPcíclico de *Saccobolus* son similares a los hallados para las subunidades catalíticas de enzimas de eucariotas superiores (Flockhart y Corbin, 1982).

Los valores de coeficiente de sedimentación y peso molecular obtenidos para la subunidad regulatoria de la enzima de *Saccobolus* son comparables a los informados para subunidades regulatorias monoméricas. Sin embargo, existe discrepancia entre el valor del peso molecular de la subunidad regulatoria calculado por medio de la combinación del radio de Stokes y del coeficiente de sedimentación (46 K) y el estimado en geles de poliacrilamida con SDS (54 K). La subunidad regulatoria de la quinasa de *S.platensis* tendría un peso molecular comparable al informado para los monómeros de subunidades regulatorias dimericas (de Gunzburg y Veron, 1982; Hixson y Krebs, 1980; Powers y Pall, 1980; Uno e Ishikawa, 1981).

Los datos de peso molecular (78 K) y de coeficiente de sedimentación (4,5 S) obtenidos para la holoenzima permiten proponer una estructura dimerica formada por una subunidad catalítica y un monómero regulatorio (tipo RC) para la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico de *S.platensis*. Resultados comentados anteriormente apoyan esta hipótesis:

i) El análisis en gradientes de sacarosa de preparaciones de micelio cosechado en estadios tempranos de desarrollo, ex-

tractos preparados en presencia de inhibidores de proteasas o a diferentes pHs, mostraron invariablemente como única especie la forma de 4,5 S, no habiéndose obtenido en ninguna de las diferentes preparaciones analizadas especies con coeficientes de sedimentación mayores. ii) Las preparaciones de holoenzima ligeramente activables por AMPcíclico en las condiciones del ensayo estándar, obtenidas en algunas ocasiones, sedimentaron en los gradientes de sacarosa en la misma posición que la holoenzima activa en ausencia de AMPcíclico (4,5 S), sugiriendo que la falta de dependencia del nucleótido observada en la mayoría de las preparaciones no sería debida a una proteólisis importante de la molécula original. Cabe aclarar que no puede descartarse totalmente mediante este análisis que un mínimo grado de proteólisis sea responsable de la pérdida de la capacidad de la enzima de ser activada por AMPcíclico.

En resumen, los resultados obtenidos impiden postular una estructura tetramérica para la holoenzima de S.platensis, aunque la identificación de esta forma dimérica como la forma nativa de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico de este organismo, puede considerarse tentativa hasta que se obtenga mayor información sobre la naturaleza de la interacción de las subunidades que la componen.

I.10 RECONSTITUCION DE LA HOLOENZIMA A PARTIR DE SUBUNIDADES AISLADAS

Las subunidades regulatorias y catalíticas aisladas pueden identificarse como componentes de una quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico mediante su capacidad de reasociarse para formar la holoenzima correspondiente. Esta reasociación se puede detectar mediante la inhibición de la actividad fosforilante de la subunidad catalítica por el agregado de subunidad regulatoria; esta inhibición es revertida con el agregado de AMPcíclico.

Para los experimentos que se describen a continuación se utilizaron los componentes regulatorio y catalítico de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico de S.platensis obtenidos de la columna de AMPcíclico-agarosa como se describe en Materiales y Métodos.

I.10.a RECONSTITUCION DE LA HOLOENZIMA DE S.platensis

La reconstitución de la holoenzima de S.platensis a partir de sus subunidades aisladas planteó el problema de la imposibilidad de medir la reasociación a través de la inhibición de la actividad fosfotransferasa. En efecto, como se mostró en el ítem I.3.a, la holoenzima de *Saccobolus* tiene la

inusual propiedad de disociarse completamente en presencia de sustrato aún a concentraciones muy bajas ($5\text{ }\mu\text{M}$) y por lo tanto la interacción de sus subunidades no se puede evidenciar como la inhibición de la actividad catalítica en el ensayo estándar (Figura 19, panel B). Este hecho hizo que se tratara de analizar alguna modificación estructural en lugar de un cambio en la actividad enzimática para poner en evidencia la formación de una holoenzima.

La interacción de las subunidades regulatoria y catalítica separadas previamente por cromatografía en columna de AMPcíclico-agarosa pudo ser demostrada mediante el análisis de los perfiles de sedimentación de la actividad fosfotransferasa cuando se centrifugó en gradientes de sacarosa una mezcla de reconstitución de ambas subunidades.

La Figura 18, panel A muestra el perfil de sedimentación de la subunidad catalítica obtenida de AMPcíclico-agarosa como un único pico de 3,2 S. Cuando este componente catalítico aislado se combinó con un gran exceso de subunidad regulatoria purificada, se dializó y sembró en un gradiente de sacarosa, la reasociación de ambos componentes pudo ser visualizada por la aparición de un pico de actividad fosfotransferasa en la posición de la holoenzima(Figura 18 panel B y Fig.5)

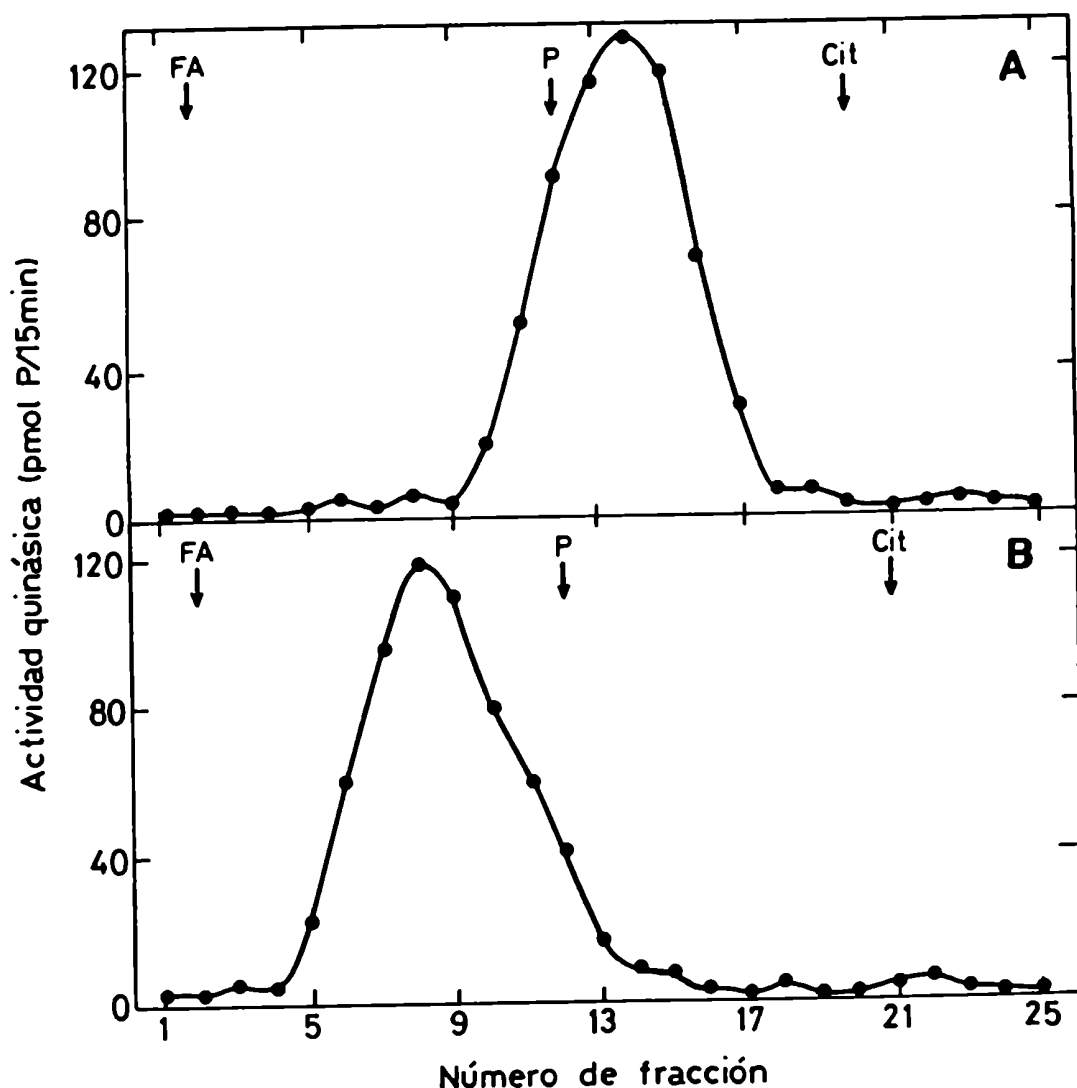


FIGURA 18: Análisis en gradientes de sacarosa de la interacción de la subunidad regulatoria con la subunidad catalítica parcialmente purificada. Panel A: perfil de sedimentación de la subunidad catalítica obtenida del percolado de la columna de AMPcíclico-agarosa. Panel B: perfil de sedimentación de la holoenzima reconstituida. Aliquotas de la subunidad catalítica obtenida del percolado de la columna de AMPcíclico-agarosa se combinaron con un gran exceso (más de 100 veces) de subunidad regulatoria purificada. El exceso se calculó a partir de la relación de capacidad ligante de AMPcíclico a actividad fosforilante presente en la holoenzima tomada como unidad. La mezcla de reconstitución se dializó contra solución A conteniendo carbón activado para remover el AMPcíclico remanente en la preparación de la subunidad regulatoria, se mezcló con los marcadores de coeficiente de sedimentación y se sembró en gradientes de sacarosa preparados como se detalla en Materiales y Métodos. La centrifugación se llevó a cabo a 48.000 rpm durante 16 horas. En alícuotas apropiadas de cada fracción se midió actividad fosforilante con kémtido como sustrato. Las flechas indican la posición de las proteínas marcadoras: P: peroxidasa, FA: fosfatasa alcalina, Cit: citocromo C.

Resultados y Discusión

La redisociación por AMPcíclico o por sustrato de la holoenzima reconstituida se evidenció por el corrimiento de la posición del pico de actividad fosforilante de 4,5 S a 3,2 S en un gradiente de sacarosa, después de incubar la preparación reasociada en las condiciones descriptas en el ítem I.3 (resultados no mostrados).

Estos resultados permiten concluir que los componentes regulatorio y catalítico aislados son capaces de reasociarse dando lugar a la aparición de una holoenzima que puede ser redisociada en las mismas condiciones que la holoenzima original.

I.10.b RECONSTITUCION DE UNA HOLOENZIMA HETEROLOGA

Con la finalidad de comparar los componentes regulatorio y catalítico de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico de S.platensis con los componentes de otras quinasas conocidas, se llevaron a cabo experimentos de reconstitución de una holoenzima heteróloga utilizando subunidades regulatoria y catalítica provenientes de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico de corazón bovino.

La subunidad catalítica de de la quinasa de *Saccobolus* obtenida de la columna de AMPcíclico-agarosa y la subunidad

catalítica de la enzima de corazón bovino (preparación comercial) se preincubaron en presencia de cantidades crecientes de subunidad regulatoria de la quinasa de corazón bovino (preparación comercial), midiéndose luego la actividad fosforilante de las mezclas de reconstitución.

Como puede verse en la Figura 19, panel A, el componente catalítico de la quinasa de *Saccobolus* interactuó con la subunidad regulatoria de la enzima de corazón de manera tal que la actividad fosfotransferasa se inhibió completamente a la misma concentración de subunidad regulatoria necesaria para inactivar el componente catalítico homólogo. Ambas inhibiciones fueron revertidas por el agregado de AMPcíclico.

Este resultado indica que existe suficiente homología estructural entre la subunidad catalítica de la enzima de mamífero y la de *S.platensis* , ya que esta última puede asociarse con la subunidad regulatoria de la quinasa de corazón para formar una holoenzima inactiva, siendo la inhibición de la actividad fosforilante revertida por AMPcíclico.

En cambio, la subunidad regulatoria purificada de la enzima de *S.platensis* fué incapaz de inhibir al componente catalítico de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico de corazón bovino (Figura 19, panel B).

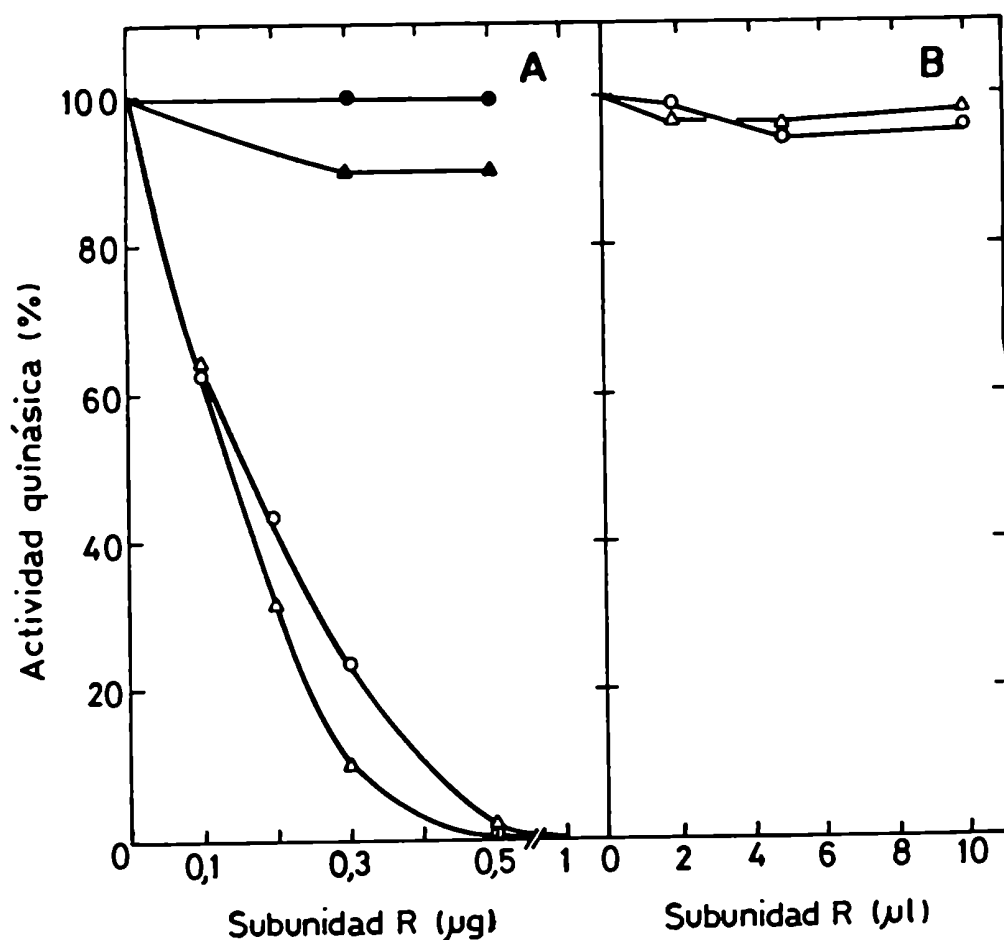


FIGURA 19: Ensayos de reconstitución de la holoenzima a partir de las subunidades aisladas. Panel A: interacción de la subunidad catalítica de la quinasa de corazón bovino (Δ) y de la subunidad catalítica de la enzima de *S. platensis* (●) con la subunidad regulatoria de la quinasa de corazón bovino. Panel B: interacción de la subunidad catalítica de la enzima de corazón bovino (Δ) y de la subunidad catalítica de la quinasa de *S. platensis* (○) con la subunidad regulatoria de la enzima de *S. platensis*. Alícuotas apropiadas del percolado de la columna de AMPcíclico-agarosa (subunidad catalítica de *Saccobolus*) o de la subunidad catalítica de corazón bovino (preparación comercial), se incubaron con cantidades crecientes de subunidad regulatoria de corazón bovino (preparación comercial) o de subunidad regulatoria de *Saccobolus* obtenida de la columna de AMPcíclico-agarosa. La incubación se llevó a cabo durante 5 minutos a 30 °C, con (● Δ) o sin (○ Δ) el agregado de AMPcíclico 20 μM. Al término de la incubación, se ensayó actividad fosforilante con kémtido como sustrato. Los resultados se expresan como porcentajes de las actividades de los controles en ausencia de subunidad regulatoria (se utilizaron 125 unidades de subunidad catalítica de ambas fuentes).

Resultados y Discusión

Las características de las subunidades catalítica y regulatoria de la quinasa de S.platensis puestas en evidencia en los experimentos de reconstitución analizados, permiten suponer que es en la subunidad regulatoria, incapaz de inhibir a las subunidades catalíticas aisladas, donde reside la causa de la peculiar interacción entre las subunidades de esta holoenzima.

CONCLUSIONES

Los resultados descriptos demuestran la existencia de una quinasa de proteína dependiente de AMP cíclico en el ascomicete Saccobolus platensis. Se llevó a cabo el aislamiento y caracterización de la holoenzima y de sus componentes regulatorio y catalítico. La subunidad regulatoria de la enzima fue purificada a homogeneidad.

Las evidencias reunidas a lo largo de este trabajo permiten destacar la peculiar interacción de las subunidades que componen la quinasa de Saccobolus. Esta característica de la enzima hizo que la identificación de la misma como una quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico, no pudiera ser llevada a cabo a través del clásico abordaje de la demostración de la estimulación directa de la actividad fosforilante en

presencia del nucleótido cíclico, y que fuera necesario evidenciar la interacción de sus subunidades mediante el análisis en gradientes de sacarosa de las modificaciones estructurales que sufren dichos componentes al asociarse o disociarse en diferentes situaciones.

El peso molecular obtenido para la holoenzima caracterizada en este trabajo fué de 78 K; el hecho de no haber encontrado especies de mayor tamaño en ninguna de las condiciones ensayadas, permite proponer una estructura dimérica de tipo RC para la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico de S.platensis.

El análisis de los perfiles de sedimentación en gradientes de sacarosa de la holoenzima previamente sometida a diferentes tratamientos indicó que la misma se disocia completamente en presencia de AMPcíclico al igual que en presencia de los dos mejores sustratos de su actividad fosforilante; kémtido y protamina. El hecho de que la holoenzima no sea capaz de ser disociada por ClNa o poliaminas indica que no es únicamente la carga positiva de las moléculas lo que provoca la disociación; se puede especular que el efecto disociante de kémtido y protamina está de alguna manera asociado a su carácter de sustratos de la actividad fosfotransferasa. Esta

disociación por la presencia de sustratos a muy baja concentración, aún en presencia de ATP-Mg⁺⁺, indica que la interacción de los componentes regulatorio y catalítico es notoriamente diferente a la de otras quinasas estudiadas.

Las subunidades catalítica y regulatoria aisladas fueron sometidas a una serie de estudios tendientes a su identificación como componentes clásicos de una quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico.

Las propiedades físicas y cinéticas de la subunidad catalítica son similares a las descriptas para los componentes catalíticos de las quinasas de proteína dependientes de AMPcíclico de mamíferos; el peso molecular estimado para esta proteína (41 K) es similar al informado para la mayoría de las subunidades catalíticas estudiadas y la preferencia por sustratos básicos es también característica de este tipo de actividad quinásica.

Los experimentos de reconstitución llevados a cabo con la subunidad regulatoria de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico de corazón bovino indican que la homología estructural existente entre las subunidades catalíticas de ambos orígenes debe ser lo suficientemente importante como para permitir la interacción de las subunidades heterólogas.

Cabe señalar que la inhibición total de la actividad fosfo-transferasa de los componentes catalíticos de las quinasas de corazón bovino y de *Saccobolus* se logró con la misma cantidad de subunidad regulatoria de la enzima de corazón.

La similitud estructural entre las subunidades catalíticas de la quinasa de *S.platensis* y de corazón bovino fue confirmada también con los resultados obtenidos en el experimento de inhibición de la actividad fosforilante por el péptido sintético correspondiente al inhibidor termoestable de la quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico. Si bien la afinidad de la subunidad catalítica de la enzima de *Saccobolus* por el péptido inhibidor fue notoriamente menor que la evidenciada por la subunidad catalítica de la quinasa de mamífero, en ambos casos se obtuvo inhibición total de la actividad fosforilante.

La proteína ligante de AMPcíclico fué purificada a homogeneidad aparente en sólo dos pasos, incluyendo cromatografía de afinidad. El procedimiento de purificación dió lugar a un enriquecimiento de la preparación de subunidad regulatoria de más de 1000 veces, con un rendimiento cercano al 40 %.

Las propiedades de la proteína ligante de AMPcíclico que surgen de estos estudios aportan evidencias suficientes para

afirmar que la misma corresponde a la subunidad regulatoria de una quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico; la capacidad ligante de AMPcíclico cosedimenta con la actividad fosforilante en gradientes de sacarosa y coeluye con la misma en la columna de DE-52; su capacidad de unión al AMPcíclico es altamente específica y muestra, al igual que la mayoría de las subunidades regulatorias estudiadas, la presencia de dos tipos de sitios para el ligado del nucleótido.

El peso molecular de la subunidad regulatoria es similar al informado para los monómeros de subunidades regulatorias de eucariotas superiores e inferiores. En tanto que la mayoría de las subunidades regulatorias descritas son dímeros, los datos sugieren que la subunidad regulatoria de S.platensis sería monomérica al igual que la descrita en el acrasial D.discoideum.

La subunidad regulatoria de la enzima de S.platensis fue incapaz de inhibir tanto a la subunidad catalítica homóloga como a la subunidad catalítica de la quinasa de corazón bovino. Sin embargo, la existencia de interacción molecular entre las subunidades aisladas de la holoenzima de *Saccobolus* fue evidenciada en experimentos en los cuales la reconstitución se investigó en términos de variación de los perfiles de se-

dimentación de la subunidad catalítica al ser incubada en presencia de la subunidad regulatoria. Si se acepta que la subunidad catalítica no presenta ningún indicio de comportamiento anómalo en los experimentos de reconstitución e inhibición, se puede especular con la existencia, en la molécula de la subunidad regulatoria, de alguna alteración estructural responsable de la débil interacción de R y C, susceptible de ser perturbada por la presencia de bajas concentraciones de sustrato.

Los pasos futuros a seguir en el estudio de esta quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico deberán estar orientados a demostrar que la forma nativa de la holoenzima de S.platensis es el dímero de tipo RC. Una posible aproximación al problema será la confirmación definitiva de la estructura de la subunidad regulatoria a través de la detección de la misma en extractos crudos mediante técnicas inmunológicas y de marcación por fotoafinidad. Además, el estudio molecular de la subunidad regulatoria permitirá confirmar, desde el punto de vista estructural, aspectos funcionales relacionados con las características de la interacción de las subunidades que conforman la holoenzima.

La existencia de una quinasa de proteína dependiente de AMPcíclico en S.platensis , así como la presencia de activi-

dades fosfodiesterásicas de nucleótidos cíclicos en los extractos solubles de micelio (ítem II de Resultados y Discusión), sugiere que los mecanismos regulatorios mediados por AMPcíclico y el metabolismo del mismo en este eucariota inferior serían similares a los descritos en organismos superiores.

II. IDENTIFICACION DE DOS ACTIVIDADES DE FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS EN *Saccobolus platensis*

II.1 PURIFICACION PARCIAL DE LAS ISOENZIMAS

II.1.a CROMATOGRAFIA EN DE-52

En la Figura 20 se muestra un perfil típico de elución de la actividad de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de la fracción S-100 cromatografiada en una columna de DE-52.

Como puede observarse, se obtuvieron dos picos bien definidos: uno, al que se llamó Pico I, que no es retenido por la columna, y el otro, Pico II, que eluye de la columna a una concentración de ClK 0,15 M aproximadamente. Ambos mostraron tener capacidad de hidrolizar AMPcíclico y GMPcíclico.

Aunque las proporciones relativas de ambos picos variaron ligeramente de una preparación a otra, el perfil de las dos actividades resultó reproducible en todas las preparaciones analizadas.

Con el propósito de descartar la posibilidad de que la sobrecarga de la columna fuera la causa de la aparición de un pico de actividad fosfodiesterásica en el percolado, se re-cromatografió el Pico I en una segunda columna de DE-52. Toda la actividad volvió a percolar de la misma, lo cual descartó el posible artificio de la sobrecarga e indicó que es

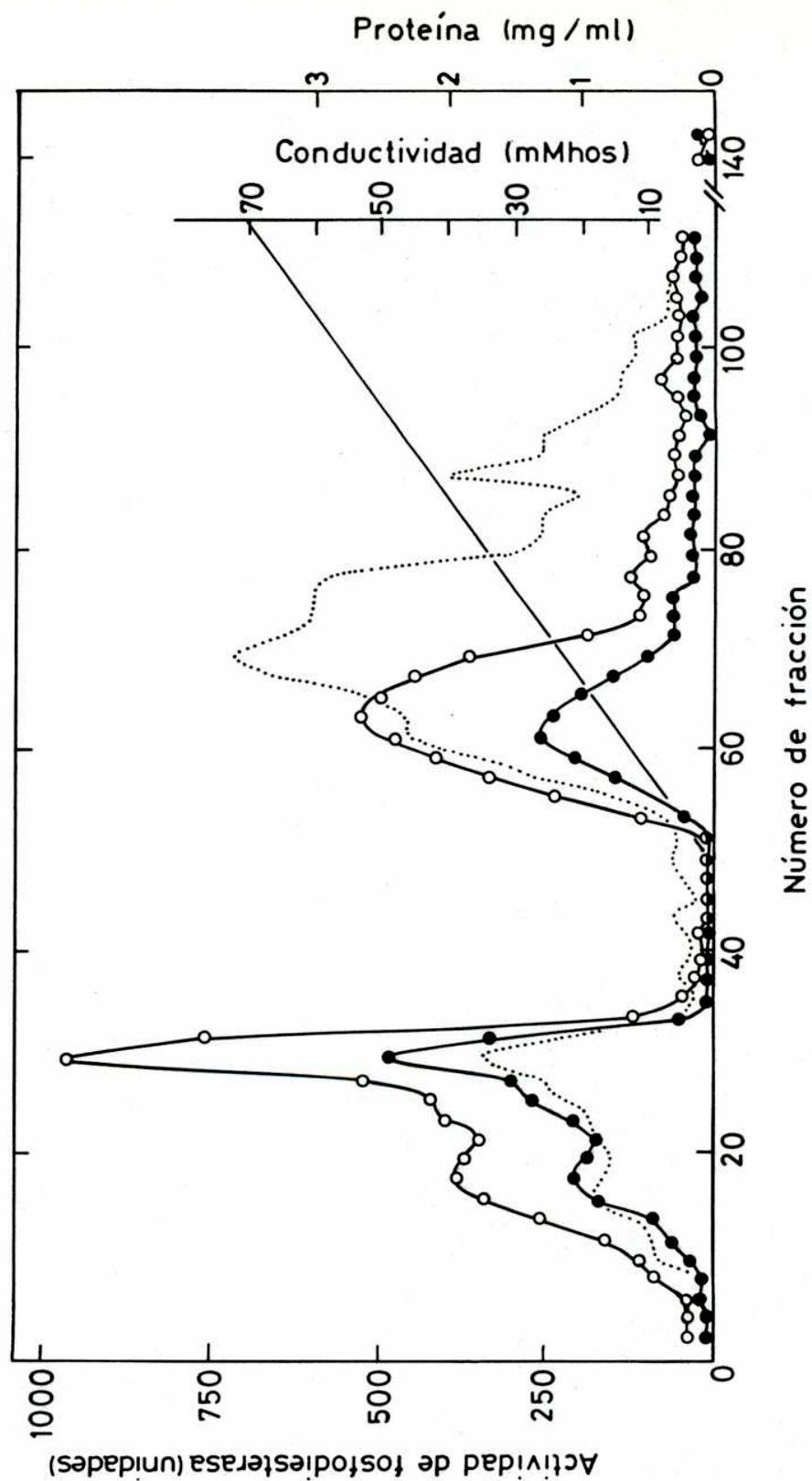


FIGURA 20: Cromatografía en columna de DE-52 de la fracción S-100. La cromatografía se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Fosfodiesterasa de AMPcíclico (○); fosfodiesterasa de GMPcíclico (●); proteína (.....).

el balance de cargas de la proteína al pH de operación de la columna el responsable de este comportamiento (ver ítem II.1.b).

El Pico II recromatografiado en una segunda columna de DE-52 volvió a quedar retenido en la misma y se eluyó al aplicar el gradiente salino; asimismo, en las condiciones que se describen en el ítem siguiente y en Materiales y Métodos, este pico no es retenido por una columna de fosfoCelulosa.

Extractos de micelio cosechado en diferentes estadios de desarrollo y/o preparados en ausencia de inhibidores de proteasas no mostraron diferencias en el perfil de la columna de DE-52.

II.1.b CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE FOSFOCELULOSA DEL PICO I DE DE-52

En la Figura 21 se muestra el perfil de elución de la actividad fosfodiesterásica del Pico I obtenido de DE-52, cromatografiado en una columna de fosfoCelulosa.

Como puede observarse, la actividad fosfodiesterásica de AMPcíclico y GMPcíclico se retuvo en la columna confirmando el caracter catiónico de esta especie molecular y eluyó como un único pico agudo a una concentración de ClK de aproximada-

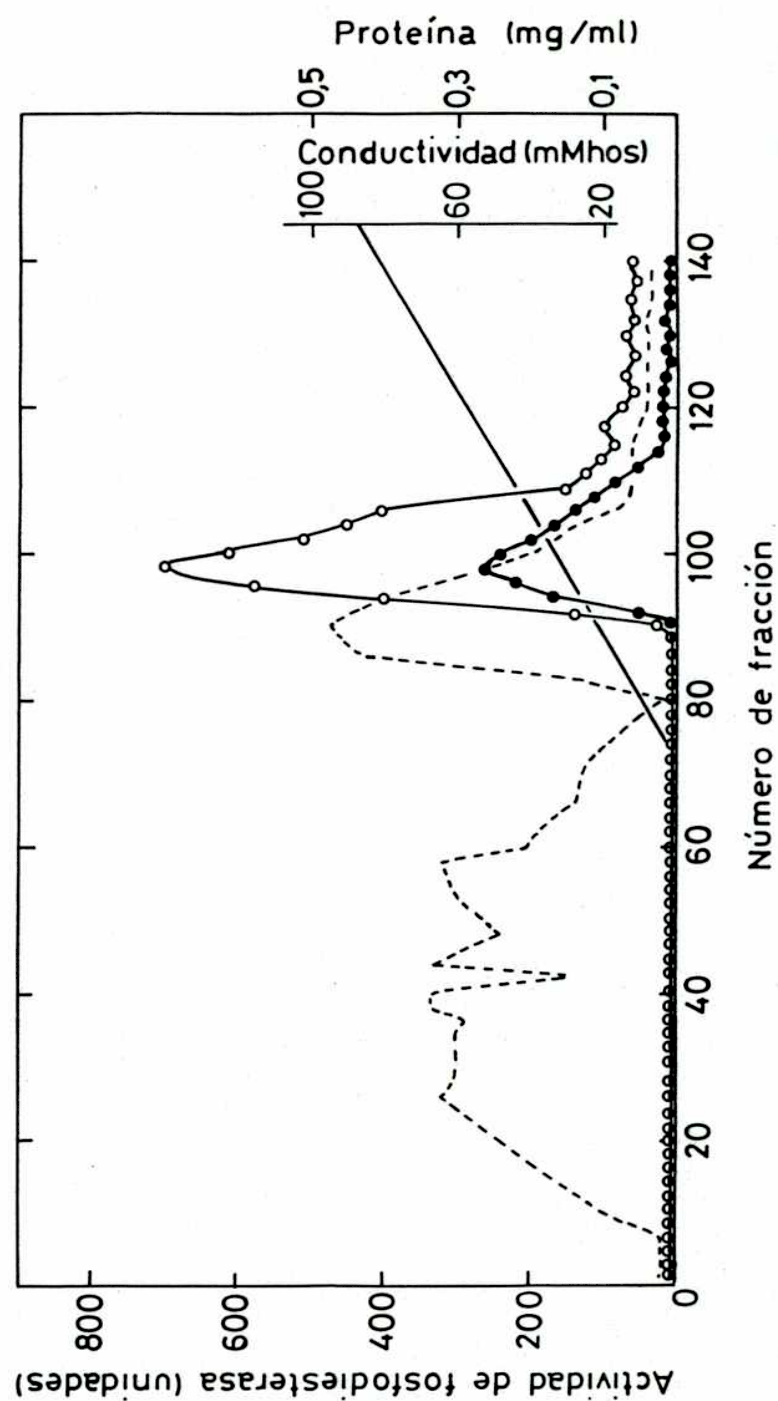


FIGURA 21: Cromatografía en columna de fosfocelulosa del Pico I de DE-52. La cromatografía se desarrolló como se describe en Materiales y Métodos. Fosfodiesterasa de AMPcíclico (○); fosfodiesterasa de GMPcíclico (●); proteína (---).

mente 0,35 M.

En esta etapa, la actividad específica del Pico I ya sea ensayada con AMPcíclico o GMPcíclico como sustrato fue unas diez veces mayor que la de la fracción S-100 suponiendo que las proporciones de los Picos I y II en dicha fracción son similares.

II.1.c CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHACRYL S-300 DEL PICO II DE DE-52

En la Figura 22 se observa el perfil de elución de la actividad fosfodiesterásica presente en el Pico II obtenido de DE-52, cromatografiado en una columna de Sephacryl S-300.

Como puede verse, la actividad de fosfodiesterasa se recuperó en un solo pico agudo que se separó de una fracción importante del grueso de las proteínas acompañantes. De la observación de la Figura 22 podría esperarse un aumento apreciable de la actividad específica; sin embargo la purificación obtenida fue nula debido a la importante pérdida de actividad (aproximadamente 70 %) sufrida en esta etapa.

II.2 PROPIEDADES CATALITICAS DE LAS ENZIMAS I Y II

Como se dijo anteriormente, ambas enzimas pertenecen a

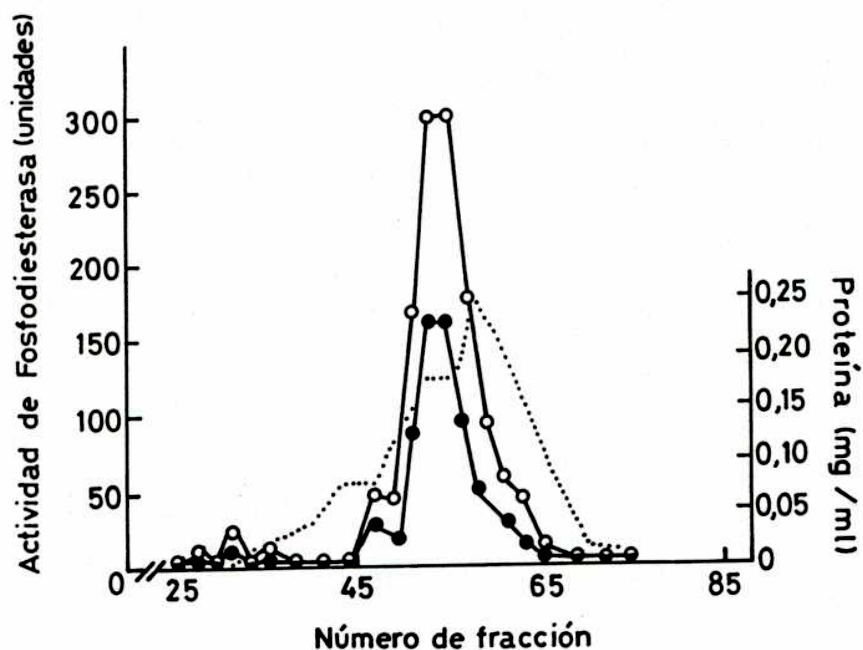


FIGURA 22: Cromatografía en columna de Sephacryl S-300 del Pico II de DE-52. La cromatografía se desarrolló como se describe en Materiales y Métodos. El ensayo de actividad enzimática en las fracciones de la columna se realizó a una concentración de AMPcíclico $50 \mu\text{M}$ y de GMPcíclico $10 \mu\text{M}$ con el objeto de sensibilizar los ensayos. Fosfodiesterasa de AMPcíclico (○); fosfodiesterasa de GMPcíclico (●); proteína (.....).

las fosfodiesterasas de tipo mixto, es decir, que son capaces de hidrolizar tanto AMPcíclico como GMPcíclico.

A diferencia de la mayoría de las fosfodiesterasas de eucariotas que muestran dependencia absoluta de metales, estas enzimas no mostraron requerir cationes divalentes Mn^{++} o Mg^{++} para su actividad, no fueron inhibidas por EDTA ni activadas por Ca^{++} -calmodulina o por GMPcíclico (resultados no mostrados).

II.2.a Km PARA EL AMPcíclico Y EL GMPcíclico

Para el cálculo del valor de la K_m para el AMPcíclico y para el GMPcíclico, se incubaron alícuotas de las preparaciones de la enzima I (fracción de fosfocelulosa) y de la enzima II (fracción de Sephacryl S-300) en presencia de concentraciones crecientes de AMPcíclico o GMPcíclico.

En la Figura 23 se muestran los gráficos obtenidos al aplicar el tratamiento de Lineweaver - Burk a los datos de velocidad inicial en función de distintas concentraciones de sustrato (AMPcíclico y GMPcíclico) con el objeto de calcular el valor de los parámetros cinéticos de la enzima I. Con la enzima II se obtuvieron resultados similares (no mostrados).

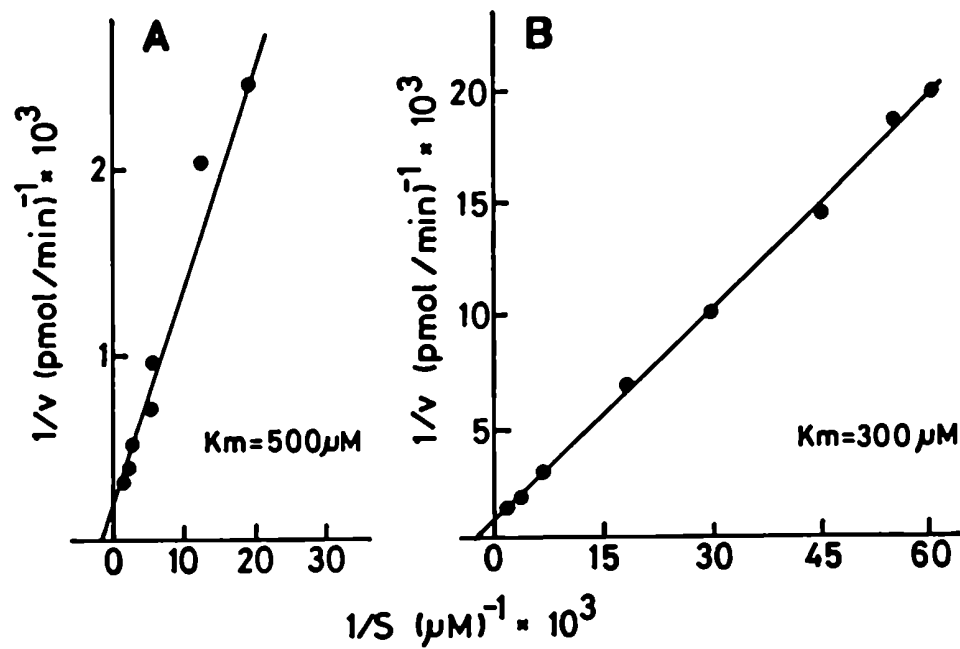


FIGURA 23: Gráfico de dobles recíprocas de velocidad como función de la concentración de nucleótidos cíclicos para la enzima I. Panel A: Para el AMPcíclico. Panel B: Para el GMP cíclico. El Pico I de fosfocelulosa se utilizó como fuente de enzima.

Las K_m calculadas para ambas enzimas resultaron ser similares y para los dos nucleótidos del mismo orden (500 μM para el AMPcíclico y 300 μM para el GMPcíclico) e indican que estas enzimas pertenecen al grupo de las fosfodiesterasas que poseen baja afinidad para los sustratos.

II.2.b EFFECTO DE METILXANTINAS

Se estudió el efecto de inhibidores clásicos de las fosfodiesterasas, tales como las metilxantinas, sobre la actividad de las enzimas I y II.

En la Figura 24 se muestra el efecto inhibitorio del agregado de concentraciones crecientes de teofilina y 1-metil-3-isobutilxantina sobre la actividad de la enzima I. Con la enzima II (fracción de Sephacryl S-300) se obtuvieron resultados similares (no mostrados) indicando que ambas enzimas fueron fuertemente inhibidas por las metilxantinas.

Estos resultados obtenidos in vitro concuerdan con otros obtenidos in vivo : como se mencionó en la Introducción, la adición de metilxantinas en el medio de cultivo de S.platensis produce un efecto similar al agregado de AMPcíclico sobre la producción de apotecios (Galvagno et al., 1984) y confirman que el efecto de las metilxantinas -el

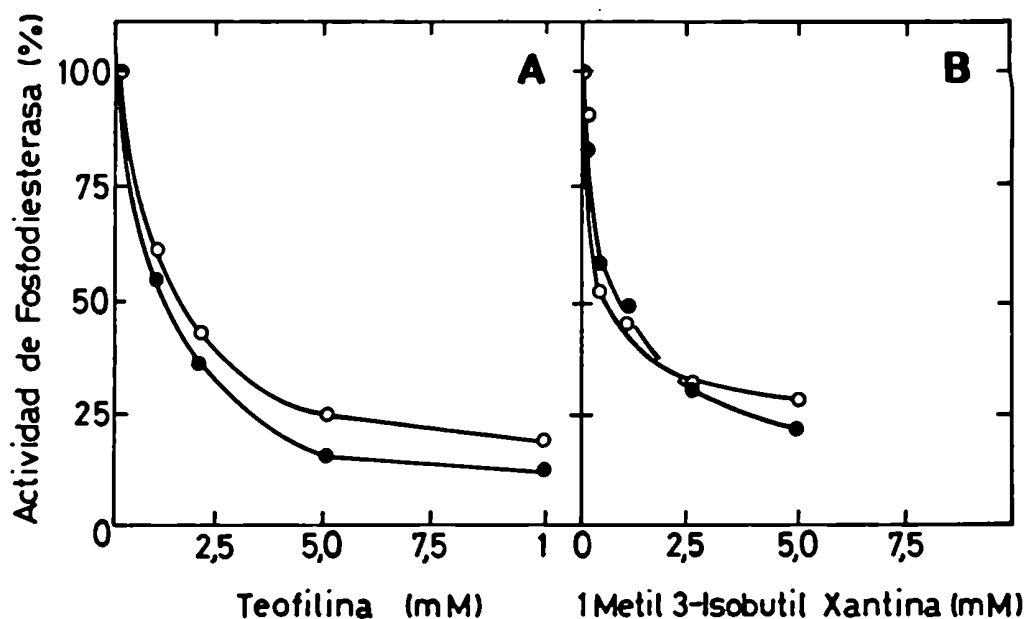


FIGURA 24: Efecto de las metilxantinas sobre la actividad de fosfodiesterasa de la enzima I. La actividad fosfodiesterasa del Pico I de fosfocelulosa, se midió con AMPcíclico (●) y GMP cíclico (○) en presencia de concentraciones crecientes de teofilina (Panel A) o 1 metil 3-isobutil xantina (Panel B). Los resultados se expresaron como porcentajes de las actividades en ausencia de metilxantinas.

incremento de la concentración de AMPcíclico intracelular- tiene lugar a través de la inhibición de las fosfodiesterasas.

II.3 INACTIVACION TERMICA DE LAS ENZIMAS I Y II

En la Figura 25 se muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad fosfodiesterásica de nucleótidos cíclicos de la enzima I.

Como puede observarse, la actividad enzimática disminuyó notablemente con la temperatura; la preincubación de la enzima durante 10 minutos a 80 °C permitió detectar una actividad residual de sólo un 17 % respecto del valor control. Para cada temperatura de tratamiento de la enzima, la disminución de la actividad diesterasa de AMPcíclico fue similar a la disminución de actividad diesterasa de GMPcíclico.

Cuando se realizó este mismo estudio para la enzima II, la pérdida de la capacidad de hidrolizar AMPcíclico también se acompañó perfectamente con la pérdida de la capacidad de hidrolizar GMPcíclico y la inactivación siguió el mismo perfil observado para la enzima I (resultados no mostrados).

Estos resultados sugieren que, tanto para la enzima I

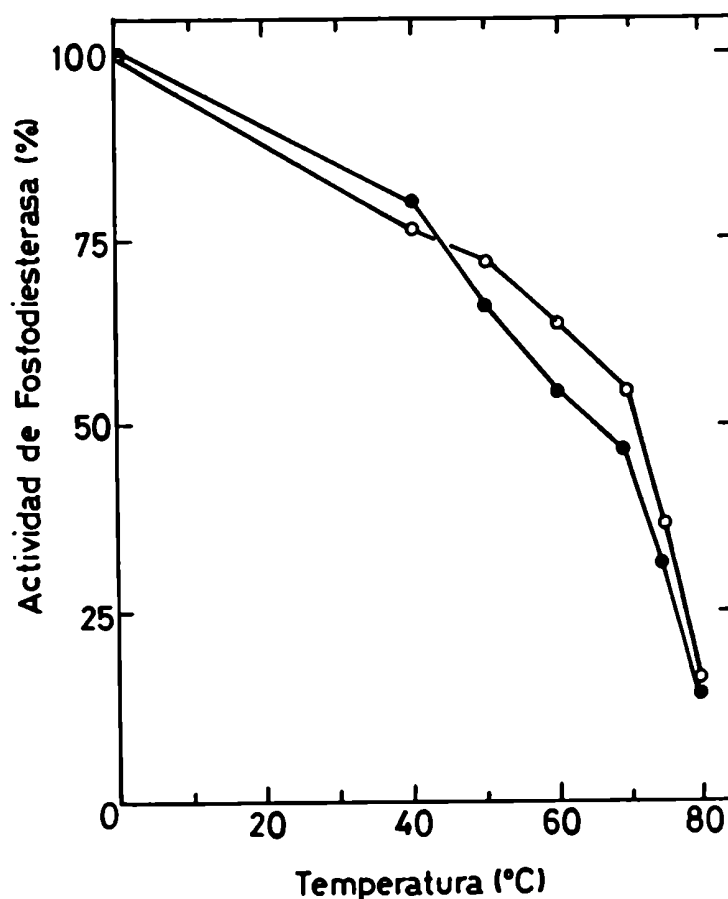


FIGURA 25: Efecto de la temperatura sobre la actividad de fosfodiesterasa de la enzima I. La fracción del Pico I de fosfoelulosa se utilizó como fuente de enzima. Se midió actividad de fosfodiesterasa de AMPcíclico (●) y GMPcíclico (●) en alicuotas apropiadas de la preparación enzimática previamente sometidas durante 10 minutos a las temperaturas que se indican. Los resultados se expresaron como porcentajes de las actividades de la enzima que no recibió tratamiento térmico.

como para la enzima II, la capacidad de hidrolizar ambos nucleótidos cíclicos residiría en una única proteína dado que las cinéticas de inactivación térmica de las dos actividades (hidrólisis de AMPcíclico y GMPcíclico) son idénticas.

II.4 PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LAS FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS

Para el cálculo de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de las enzimas I y II se utilizaron los datos de los coeficientes de sedimentación y radios de Stokes obtenidos por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa y filtración en geles respectivamente.

II.4.a DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE SEDIMENTACION

Los coeficientes de sedimentación ($S_{20,w}$) de las enzimas I y II se obtuvieron a partir de los datos de sedimentación en gradientes de sacarosa.

En la Figura 26 se muestra el perfil de sedimentación de la actividad fosfodiesterásica de la enzima I (fracción de fosfocelulosa), así como la posición de las proteínas marcadoras indicadas por flechas. Como puede observarse, la enzima sedimentó como un único pico simétrico con una velocidad in-

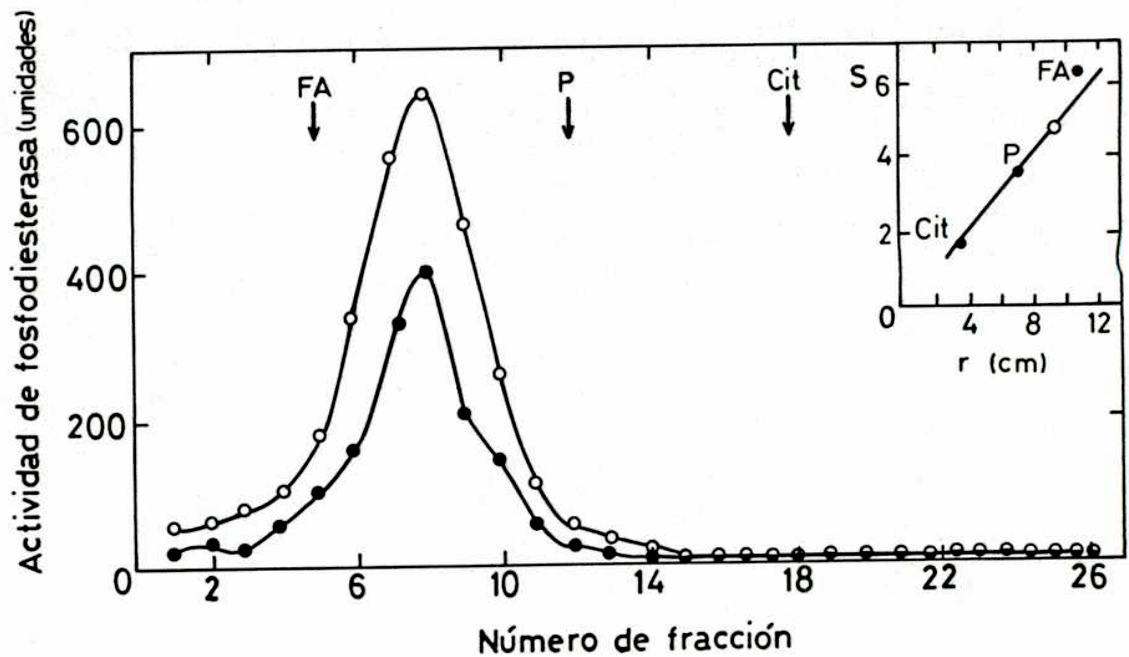


FIGURA 26: Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de la enzima I. Una alícuota del Pico I de fosfocelulosa se centrifugó en un gradiente preparado como se indica en Materiales y Métodos. La centrifugación se llevó a cabo a 46.000 rpm durante 16 horas. En alícuotas apropiadas de cada fracción se midió actividad fosfodiesterásica de AMPcíclico (○) y de GMPcíclico (●). Las flechas indican la posición de las proteínas marcadoras. El gráfico inserto muestra la relación entre los coeficientes de sedimentación y las distancias recorridas desde la siembra por la enzima y por las proteínas marcadoras. FA: fosfatasa alcalina, P: peroxidasa, Cit: citocromo C.

termedia con respecto a las de los marcadores fosfatasa alcalina y peroxidasa.

De la relación lineal obtenida al graficar la distancia recorrida por las proteínas marcadoras desde la superficie del gradiente en función de sus respectivos S (inserto de la Figura 26), se obtuvo por interpolación en la recta el coeficiente de sedimentación de la enzima que resultó ser de 4,7 S .

Un valor similar de coeficiente de sedimentación (4,7 S) se obtuvo para la enzima II analizada en las mismas condiciones descritas anteriormente para la enzima I (resultados no mostrados).

II.4.b DETERMINACION DE LOS RADIOS DE STOKES

Para la determinación de los radios de Stokes de las enzimas I y II se utilizaron los datos de elución de la columna de Sephadex G-150 en la que se cromatografiaron los Picos I y II de DE-52 concentrados como se describe en Materiales y Métodos.

En la Figura 27 se muestra el perfil de actividad fosfodiésterásica obtenido para la enzima I, así como la posición de las proteínas marcadoras indicadas por flechas.

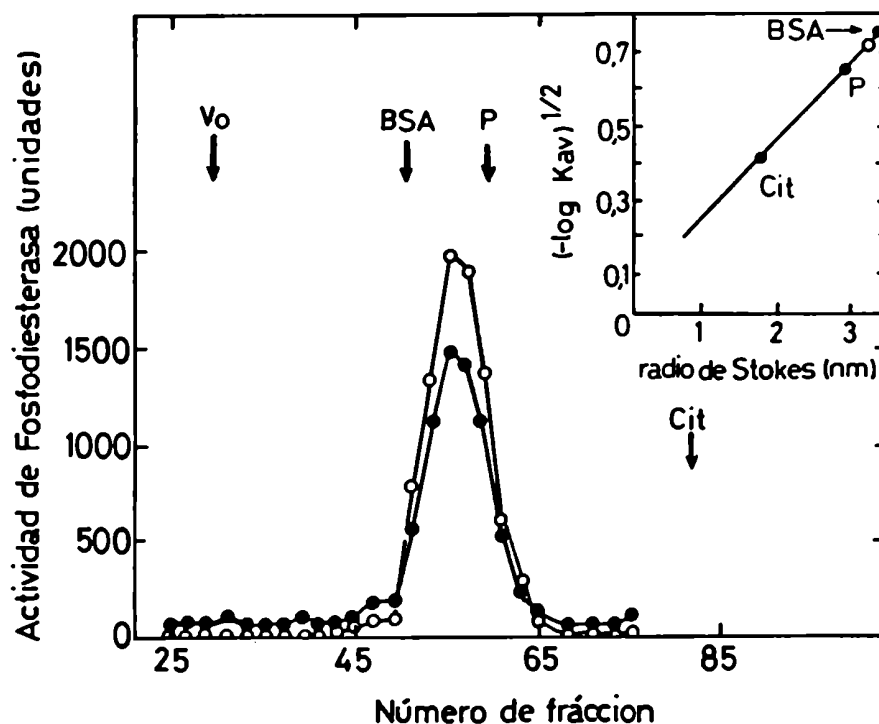


FIGURA 27: Filtración en columna de Sephadex G-150 del Pico I de DE-52. La cromatografía se desarrolló como se describe en Materiales y Métodos. En alícuotas apropiadas de cada fracción se midió actividad fosfodiesterásica de AMPcíclico (○) y de GMPcíclico (●). V_0 : volumen de exclusión. Las flechas indican la posición de las proteínas marcadoras. BSA: albúmina sérica bovina, P: peroxidasa, Cit: citocromo C. Los marcadores fueron cromatografiados en un experimento independiente. El gráfico inserto muestra la relación de $(-\log K_{av})^{1/2}$ con el radio de Stokes de las proteínas marcadoras. Otros detalles experimentales se indican en Materiales y Métodos.

Resultados y Discusión

Como puede observarse, la actividad de fosfodiesterasa se recuperó en un único pico agudo que eluyó entre los marcadores albúmina sérica bovina y peroxidasa. En el inserto de la Figura 27 se muestra la relación entre $(- \log K_{av})^{1/2}$ y el radio de Stokes de las proteínas marcadoras. Por interpolación se obtuvo un valor de radio de Stokes de 3,4 nm.

Cuando se cromatografió la enzima II en una columna de Sephadex G-150 en las mismas condiciones descriptas, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos para la enzima I.

II.4.c DETERMINACION DE LOS PESOS MOLECULARES

Una vez conocidos los coeficientes de sedimentación y los radios de Stokes de las enzimas I y II, suponiendo el volumen específico parcial semejante al de las proteínas globulares solubles (0,74 ml/g), se estimaron los pesos moleculares utilizando la ecuación planteada en la sección 6.3 de Materiales y Métodos. El peso molecular calculado para ambas enzimas fue de 65 K.

II.4.d DETERMINACION DE LOS COCIENTES FRICCIONALES

Con los valores de los pesos moleculares y de los radios

Resultados y Discusión

de Stokes se calcularon los valores de los cocientes friccionales f/f_0 aplicando la fórmula planteada en la sección 6.4 de Materiales y Métodos.

El valor obtenido para ambas enzimas fue de 1,27.

La Tabla 6 resume los parámetros moleculares e hidrodinámicos de las enzimas I y II.

TABLA 6: Parámetros moleculares e hidrodinámicos de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

$S_{20,w}$ (S)	4,7
radio de Stokes (nM)	3,4
Peso molecular	65 K
f/f_0	1,27

DISCUSION

La existencia de un alto grado de polimorfismo en las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos ha sido informada para enzimas de mamíferos y de eucariotas inferiores (Strada y Thompson, 1978; Londesborough y Suoranta, 1983; Téllez-Iñón et al., 1982). Las isoformas de esta enzima pueden diferir en sus propiedades cinéticas, especificidad de sustrato, mo-

dulación por efectores; en algunos casos se han podido establecer diferencias estructurales entre las distintas formas que permitieron especular acerca de la interrelación de las mismas y el posible rol metabólico que su interconversión in vivo podría tener en el organismo estudiado (Marchmont y Houslay, 1980; Ball et al., 1980).

Los resultados obtenidos en S.platensis indican que en la fracción soluble de micelio existen dos formas de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos diferenciables por su comportamiento cromatográfico en columnas de intercambio iónico. Ambas actividades son de tipo mixto, es decir que hidrolizan tanto AMPcíclico como GMPcíclico y tienen baja afinidad para los dos sustratos.

El análisis de la cinética de inactivación térmica indicó para las dos isoenzimas idéntica disminución de la actividad enzimática para ambos sustratos, comportamiento que permite suponer que la actividad enzimática responsable de la hidrólisis del AMPcíclico y del GMPcíclico reside en una única proteína.

El análisis en conjunto de las propiedades de las dos enzimas encontradas indica que se trata de dos proteínas muy similares y la única característica que permitió distinguirlas (su comportamiento cromatográfico) sugiere que las di-

Resultados y Discusión

ferencias entre ambas podrían surgir de modificaciones tales como fosforilación y/o proteólisis parcial; este tipo de modificaciones ya han sido descritas como causales de la heterogeneidad molecular de las fosfodiesterasas de varios organismos, entre ellos algunos hongos (Kerner et al., 1984), aunque no siempre se ha dilucidado el significado metabólico de la aparición de formas múltiples.

En el sistema de Saccobolus, las dificultades encontradas para avanzar en la purificación de las dos formas de fosfodiesterasa debido a la marcada inactivación que sufren ambas enzimas ha impedido por el momento, profundizar en el análisis de la posible interrelación de las dos isoenzimas, su real existencia in vivo y su verdadero significado metabólico o regulatorio en relación con las condiciones de iluminación del cultivo del organismo.



ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

5'AMP	5' adenosina monofosfato
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	5' adenosina difosfato
AMPcíclico, AMPc	3'-5'adenosina monofosfato cíclico
ATP	5' adenosina trifosfato
ATPasas	adenosina trifosfatasas
C, subunidad C	subunidad catalítica
cADN	ADN copia
cpm	cuentas por minuto
D.O.	densidad óptica
DEAE	dietil-aminoetil
EDTA	etilendiamino tetraacetato
EGTA	etilenglicol-bis (β -aminoetil éter) N,N'tetracético
GMPcíclico	3'-5' guanosina monofosfato cíclico
GTP	5'guanosina trifosfato
K _m	constante de Michaelis de la enzima para el sustrato
mM	milimolar
nm	nanometro
nM	nanomolar
nmol	nanomol
P _i	ortofosfato libre

pmol	picomol
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro
R, subunidad R	subunidad regulatoria
RMN	resonancia magnética nuclear
rpm	revoluciones por minuto
S-100	sobrenadante de 105.000 x g
SDS	dodecil sulfato sódico
TRIS	2-amino-2(hidroximetil)1,3propanodiol
V _m	velocidad máxima de la reacción enzimática
µg	microgramo
µl	microlitro
µmol	micromol

BIBLIOGRAFIA

- Aitken, A., Hemmings, B.A. y Hofmann, F. (1984) Biochim. Biophys. Acta 790, 219
- Anderson, W.F., Ohlendorf, D.H., Takeda, Y. y Mattheus, B. (1981) Nature 290, 754
- Ashby, C. y Walsh, D. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1255
- Baehr, W., Devlin, M.J. y Applebury, M.L. (1979) J. Biol. Chem. 254, 11669
- Ball, E., Seth, P. y Sanwal, B. (1980) J. Biol. Chem. 255, 2962
- Beavo, J.A., Hardman, J. y Sutherland, E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3841
- Beavo, J.A., Bechtel, P.J. y Krebs, E.G. (1974) en Methods in Enzymology (Hardman, J.G. y O'Malley, B.W., Eds.) vol. 38 C, pág.299, Academic Press, NY
- Beavo, J.A., Bechtel, P.J. y Krebs, E.G. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 241
- Bechtel, P.J., Beavo, J.A. y Krebs, E.G. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2691
- Beebe, S.J., Holloway, R., Rannels, S.R. y Corbin, J.D. (1984) J. Biol. Chem. 219, 3539
- Beebe, S.J. y Corbin, J.D. (1986) en The Enzymes; Control by Phosphorylation, Parte A (Boyer, P.D. y Krebs, E.G., Eds.) Vol. XVII, pág. 43-111, Academic Press, NY.
- Bhatnagar, D., Hartle, F.T., Roskosky, Jr.R., Lessor, R.A. y Leonard, N.J. (1984) Biochemistry 23, 4350
- Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248
- Bramson, H.N., Thomas, N., Matsueda, R., Nelson, N.C., Taylor, S.S. y Kaiser, E.T. (1983) J. Biol. Chem. 257 , 10575

Bibliografía

- Bramson, H.N., Kaiser, E.T. y Mildvan, A.S. (1984) CRC Crit. Rev. Biochem. 15, 93
- Branden, C.I. (1980) Q. Rev. Biochem. 13, 317
- Brenner, S. (1987) Nature 329, 21
- Brostrom, C.O., Corbin, J.D., King, C.A. y Krebs, E.G.(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2444
- Bubis, J., Vedvick, T.S. y Taylor, S.S. (1987) J. Biol. Chem. 262, 14961
- Buechler, J.A. y Taylor, S.S. (1988) Biochemistry 27, 7356
- Buechler, J.A. y Taylor, S.S. (1990) Biochemistry 29, 1937
- Buhrow, S.A., Cohen, S., Garbers, D.L. y Staros, J.V.(1983) J. Biol. Chem. 258, 7824
- Builder, S.E., Beavo, J. y Krebs, E. (1980) J. Biol. Chem. 255, 3514
- Bulgakov, R. y Van Haastert, P.J.M. (1982) Biochim. Biophys. Acta 756, 56
- Butcher, R. y Sutherland, E. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1244
- Cantore, M.L., Galvagno, M.A. y Passeron, S. (1983) Cell. Biol. Int. Rep. 7, 947
- Carlson, G.M., Bechtel, P.J. y Graves, D.J. (1979) Adv. in Enzymol. 50, 41
- Carmichael, D.F., Geahlen, R.L., Allen, S.M. y Krebs, E.G. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10440
- Carpenter, G., King, L.E.Jr. y Cohen, S. (1978) Nature 273, 409
- Cecil, R. y Ogston, A. (1951) Biochem. J. 49, 105
- Cheng, H., Kemp, B.E., Pearson, R.B., Smith, A.J., Misconi, L., Van Patten, S.M. y Walsh, D.A. (1986) J. Biol. Chem. 261, 989

Bibliografía

- Cheung, W. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. **38**, 533
- Clegg, C.H., Cadd, G.G. y McKnight, G.S. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 3703
- Cobb, C.E., Beth, A.H. y Corbin, J. D. (1987) J. Biol. Chem. **262**, 16566
- Cohen, P. (1978) Curr. Top. Cell. Regul. **14**, 117
- Connelly, P.A., Hastings, T.G. y Reimann, E.M. (1986) J. Biol. Chem. **261**, 2325
- Cooper, J.A. (1990) CRC Crit. Rev. Biochem. p.85
- Coquil, J., Frank, D., Wells, J., Dupuis, M. y Hamet, P. (1980) Biochim. Biophys. Acta **631**, 148
- Corbin, J.D., Brostrom, C.O., King, C.A. y Krebs, E.G. (1972) J. Biol. Chem. **247**, 7790
- Corbin, J.D., Stanley, L.K. y Park, C.R. (1975) J. Biol. Chem. **250**, 218
- Corbin, J.D., Sudgen, P.H., West, L., Flockhart, D.A., Lincoln, T.M. y Mac Carthy (1978) J. Biol. Chem. **253**, 3997
- Corbin, J.D. y Rannels, S.R. (1981) J. Biol. Chem. **256**, 11671
- Corbin, J.D., Rannels, S.R., Flockhart, D.A., Robinson-Steiner, A.M., Tigani, M.C., Døskeland, S.O., Suva, R. y Miller, J.P. (1982) Eur. J. Biochem. **125**, 259
- Corbin, J.D. y Døskeland, S.O. (1983) J. Biol. Chem. **258**, 11391
- de Gunzburg, J. y Veron, M. (1982) EMBO J. **1**, 1063
- de Gunzburg, J., Part, D., Guiso, N. y Veron, M. (1984) Biochemistry **23**, 3805
- Dicou, E. y Brachet, P. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. **90**, 1321
- Døskeland, S.O. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. **83**, 542

Bibliografía

- Dumont, J.E., Jauniaux, J.C. y Roger, P.P. (1989) Trends Biochem. Sci. 14, 67
- Dunbar, B.S. (1987) Two dimensional electrophoresis and Immunological Techniques, Plenum, New York
- Egidy, G., Paveto, M.C., Passeron, S. y Galvagno, M.A. (1989) Exp. Mycol. 13, 428
- Elks, M.L., Manganiello, V.C. y Vaughan, M. (1983) J. Biol. Chem. 258, 8582
- Epstein, P., Pledger, W., Gardner, E., Stancel, G., Thompson, W. y Strada, S. (1978) Biochim. Biophys. Acta 527, 442
- Erlichman, J., Rosenfeld, R. y Rosen O.M. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3375
- Erneux, C., Boeynaems, J. y Dumont, J. (1980) Biochem. J. 192, 241
- Fernández Murray, P., Silberstein, S., Cantore, M.L. y Passeron, S. (1989) Anal. Biochem. 179, 56
- Fernández Murray, P., Silberstein, S., Muro, A., Cantore, M.L. y Passeron, S. (1990) Manuscrito enviado a la revista Archives of Biochemistry and Biophysics.
- Fleisher, N., Rosen, O.M. y Reichlin, M. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 54
- Flockhart, D.A., Watterson, D.M. y Corbin, J.D. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4435
- Flockhart, D.A. y Corbin, J.D. (1982) CRC Crit. Rev. Biochem. 12, 133
- Flockhart, D.A., Freist, W., Hoppe, J., Lincoln, T.M. y Corbin, J.D. (1984) Eur. J. Biochem. 140, 289
- Flotow, H. y Wheldrake, J.F. (1987) Mol. Cell. Biochem. 78, 141
- Forchiassin, F. (1989) Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires

- Francis, S., Lincoln, T. y Corbin, J.D. (1980) J. Biol. Chem. **255**, 620
- Francis, S.H. y Kono, T. (1982) Mol. Cell. Biochem. **42**, 109
- Fujimoto, M., Ichikawa, A. y Tomita, K. (1974) Arch. Biochem. Biophys. **161**, 54
- Fung, B.K., Hurley, J.B. y Stryer, L. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 152
- Galvagno, M.A., Moreno, S., Cantore, M.L. y Passeron, S. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. **89**, 779
- Galvagno, M.A., Forchiassin, F., Cantore, M.L. y Passeron, S. (1984) Exp. Mycol. **8**, 334
- Gamundí, I.J. y Ranalli, M.E. (1969) Nova Edwigia **17**, 383
- Garen, A. y Levinthal, C. (1960) Biochim. Biophys. Acta **38**, 470
- Geahlen, R.L. y Krebs, E.G. (1980) J. Biol. Chem. **255**, 9375
- Geahlen, R.L., Allen, S.M. y Krebs, E.G. (1981) J. Biol. Chem. **256**, 4536
- Gerish, G. (1987) Ann. Rev. Biochem. **56**, 853
- Gill, G.N. y Garren, L.D. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68**, 786
- Glenney, J.R., Jr., Che, W.S., Lazar, C.S., Walton, G.M. y Gill, G.N. (1988) Cell **52**, 675
- Glikin, G.C., Judewicz, N.D. y Torres, H.N. (1982) Mol. Cell. Biochem. **46**, 121
- Groisman, J.F., Forchiassin, F., Ranalli, M.E. y Lederkremer, R. (1981) Exp. Mycol. **5**, 253
- Grove, J.R., Price, D.J., Goodman, H.M. y Avruch, J. (1987) Science **238**, 530
- Gupta, R.C., Vijayaraj Reddy, M. y Randerath, K. (1982) Carcinogenesis **3**, 1081

Bibliografía

- Haga, T., Haga, K. y Gilman, A. (1977) J. Biol. Chem. 252, 577
- Hansen, R. y Beavo, J. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2788
- Hansk, S.K., Quinn, A.M. y Hunter, T. (1988) Science 241, 41
- Harrison, S.A., Reifsnnyder, D.H., Gallis, D., Cadd, G.G. y Beavo, J.A. (1986) Molec. Pharmac. 29, 506
- Hedin, L., McKnight, G.S., Lifka, J., Durica, J.M. y Richards, J.S. (1987) Endocrinology 120, 1928
- Hemmings, B.A., Hitken, A., Cohen, P., Rymond, M. y Hofmann, F. (1982) Eur. J. Biochem. 127, 473
- Hixson, C.S. y Krebs, E.G. (1980) J. Biol. Chem. 255, 2137
- Hochstrasser, M. y Nelson, D.L. (1989) J. Biol. Chem. 264, 14510
- Hodges, R. y Merrifield, R. (1975) Anal. Biochem. 65, 241
- Hofmann, F., Beavo, J.A., Bechtel, P.J. y Krebs, E.G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 7795
- Hofmann, F. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1559
- Hofmann, F. y Flockerzi, V. (1983) Eur. J. Biochem. 130, 599
- Hofmann, F., Gensheimer, H.P. y Gobel, C. (1985) FEBS Lett. 164, 350
- Hoppe, J., Freist, W., Marutzky, R y Shaltiel, S. (1978) Eur. J. Biochem. 90, 427
- Hotz, A., Konig, N., Taniguchi, H., Chrivia, J.C. y Kinzel, V. (1989 a) Biochem. Biophys. Res. Commun. 160, 596
- Hotz, A., Konig, N., Kretschmer, J., Maier, G., Ponstingl, H. y Kinzel, V. (1989 b) FEBS Lett. 256, 115
- Hunter, T. (1987) Cell 49, 1

- Hurley, J.B. y Stryer, L. (1982) J. Biol. Chem. 257, 11094
- Jahnsen, T., Hedin, I., Kidd, V.J., Beattie, W.G., Lohmann, S.M., Walter, U., Durica, J., Schulz, E., Schiltz, E., Browner, M., Laurence, C.B., Ratoosh, S.L. y Richards, J.S. (1986) J. Biol. Chem. 261, 12352
- Johnson, R.A. y Walseth, T.F. (1979) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 10, 135
- Kamps, M.P., Taylor, S.S. y Sefton, B.M. (1984) Nature 310, 589
- Kapoor, C.L., Beavo, J.A. y Steiner, A.L. (1979) J. Biol. Chem. 254, 12427
- Kemp, B.E., Graves, D.J., Benjamini, E. y Krebs, E.G. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4888
- Kerlavage, A.R. y Taylor, S.S. (1980) J. Biol. Chem. 225, 8483
- Kerner, N., Moreno, S. y Passeron, S. (1984) Biochem. J. 219, 293
- Kesbeke, F., Baraniak, J., Bulgakov, R., Jastorff, B., Morr, M., Petridis, G., Stec, W.J., Seela, F. y Van Haastert, J.M. (1985) Eur. J. Biochem. 151, 179
- Kincaid, R., Manganiello, V. y Vaughn, M. (1981) J. Biol. Chem. 256, 11345
- Kinzel, V., Hotz, A., Konig, N., Gagelmann, M., Pyerin, W., Reed, J. Kubler, D., Hofmann, F., Obst, C., Gensheimer, H.P., Goldblatt, D. y Shaltiel, S. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 253, 341
- Klein, P.S., Sun, T.J., Saxe, C.L.III, Kimmel, A.R., Johnson, R.L. y Devreotes, P.N. (1988) Science 24, 1467
- Krebs, E.G. y Beavo, J.A. (1979) Annu. Rev. Biochem. 48, 923
- Kubler, D., Gagelman, M., Pyerin, W. y Kinzel, V. (1979) Hoppe-seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1421

Bibliografía

- Kumon, A., Nishiyama, K., Yamamura, H. y Nishizuka, Y. (1972) J. Biol. Chem. **247**, 3726
- Lad, P., Blazquez, E., Lin, M. y Leffert, H. (1984) Arch. Biochem. Biophys. **232**, 679
- Lamers, W.H., Hanson, R.W. y Meisner, H.M. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 5137
- Laporte, D., Ioscano, W. y Storm, D. (1979) Biochemistry **18**, 2820
- Larsen, A.D. y Sypherd, P.S. (1974) J. Bacteriol. **117**, 432
- Laurent, T. y Killander, J. (1964) J. Chromatog. **14**, 317
- Lee, D.C., Carmichael, D.R., Krebs, E.G. y McKnight, G.S. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 3608
- Levin, L.R., Kuret, J., Johnson, K.E., Powers, S., Cameron, S., Michaeli, T., Wigler, M. y Zoller, M.J. (1988) Science **240**, 68
- Levin, L.R. y Zoller, M.J. (1990) Mol. Cell. Biol. **10**, 1066
- Lincoln, T.M. y Corbin, J.D. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 3239
- Lincoln, T.M. y Corbin, J.D. (1983) Adv. Cycl. Nucl. Res. **15**, 139
- Londesborough, J. y Suoranta, K. (1983) J. Biol. Chem. **258**, 2966
- López Gomes, S., Juliani, M.H., da Costa Maia, J.C. y Rangel-Aldao, R. (1983) J. Biol. Chem. **258**, 6972
- Lugnier, C., Schoeffter, A., Le Bec, A., Strouthou, E. y Stoclet, J.C. (1986) Biochem. Pharmacol. **35**, 787
- Majerfeld, I.H., Leichtling, B.H., Meligeni, J.A., Spitz, E. y Rickenberg, H.V. (1984). J. Biol. Chem. **259**, 654
- Maldonado, F y Hanks, S.K. (1988) Nucleic Acid Res. **16**, 8189
- Marchmont, R. y Houslay, M. (1980) Nature **286**, 904

Bibliografía

- Marchmont, R., Ayad, S. y Houslay, M. (1981) Biochem. J. 195, 645
- Martin, R.G. y Ames, B.N. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1372
- Martins, T., Mumby, M. y Beavo, J. (1982) J. Biol. Chem. 257, 1973
- Maurer, R.A. (1981) Nature (London) 294, 94
- McKnight, G.S., Uhler, M.D., Clegg, C., Correll, L.A. y Cadd, G.G. (1988) en Methods in Enzymology (Corbin, J.D. y Johnson, R.A., Eds.) Vol.159, pág. 299, Academic Press, San Diego
- McPherson, J.M., Withehouse, S. y Walsh, D.A. (1979) Biochemistry 18, 4835
- Merril, C.B., Goldman, D. y Van Heuren, M.L. (1983) en Methods in Enzymology (Corbin, J. y Hardman, J.D., Eds.) Vol.96, pág.230, Academic Press, San Diego
- Miki, N., Baraban, J.M., Keirns, J.J., Boice, J.J. y Bitensky, M.W. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6320
- Miyamoto, E., Petzold, G., Kuo, J. y Greengard, P. (1973) J. Biol. Chem. 248, 179
- Moreno, S. y Passeron, S. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 199, 321
- Moreno, S., Galvagno, M.A. y Passeron, S. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 214, 573
- Mutzel, R., Lacombe, M.L., Simon, M.N., de Gunzburg, J. y Veron, M. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6
- Narindrasorasak, S., Tan, L., Seth, P. y Sanwall, W. (1982) J. Biol. Chem. 257, 4618
- Neuman, T. (1983) Experientia 39, 96
- Nikawa, J., Sass, P. y Wigler, M. (1987) Mol. Cell. Biol. 7 3629
- Nimmo, H.G. y Cohen, P. (1977) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 8, 145

Bibliografía

- Noguchi, T., Diesterhaft, M. y Granner, D. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1332
- Nowak, I., Seipel, K., Schwarz, M., Jans, D.A. y Hemmings, B.A. (1987) Eur. J. Biochem. 167, 27
- Ogreid, D., Døskeland, S.O. y Miller, J. (1983) J. Biol. Chem. 258, 1041
- Olsen, S.R. y Uhler, M.D. (1989) J. Biol. Chem. 264, 18662
- Orlow, S.J. , Shapiro, R.I., Frnke, J. y Kessin, R.H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 7620
- Pabo, C. y Lewis, M. (1982) Nature (London) 298, 443
- Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K.C., John, J. y Wittinghofer, A. (1989) Nature 341, 209
- Palmer, W.L., McPherson, J.M. y Walsh, D.A. (1980) J. Biol. Chem. 255, 2663
- Pastori, R., Kerner, N., Moreno, S. y Passeron, S. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 663
- Pastori, R., Moreno, S. y Passeron, S. (1985) Mol. Cell Biochem. 69, 55
- Paveto, C., Passeron, S., Corbin, J.D. y Moreno, S. (1989) Eur. J. Biochem. 179, 429
- Potter, R.L., Stafford, P.H. y Taylor, S.S. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 190, 174
- Potter, R.L. y Taylor, S.S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 9000
- Potter, R.L. y Taylor, S.S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 9706
- Powers, P.A. y Pall, M.L. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 701
- Purvis, K., Olsen, A. y Hansson, V. (1981) J. Biol. Chem. 256, 11434
- Rall, T., Sutherland, E. y Berthet, L. (1957) J. Biol. Chem. 224, 463

Bibliografía

- Ramsyer, J., Kaslow, H.R. y Gill, G.N. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 813
- Rangel-Aldao, R. y Rosen, O.M. (1976) J. Biol. Chem. 251, 7526
- Rangel-Aldao, R. y Rosen, O.M. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7140
- Rannels, S.R. y Corbin, J.D. (1980) J. Cyclic Nucleotide Res. 6, 203
- Rannels, S.R. y Corbin, J.D. (1982) J. Biol. Chem. 257, 5482
- Rannels, S.R. y Corbin, J.D. (1983) en Methods in Enzymology (Corbin, J.D. y Hardman, J.G., Eds) Vol. 99, pág.168, Academic Press, San Diego
- Rannels, S.R., Cobb, C.E., Landiss, L.R. y Corbin, J.D. (1985) J. Biol. Chem. 260, 3423
- Reed, J., Kinzel, V., Kemp, B.E., Cheng, H.G. y Walsh, D.A. (1985) Biochemistry 24, 2967
- Reeves, M.L., Leigh, B.K. y England, P.J. (1987) Biochem. J. 241, 535
- Reimann, E.M., Walsh, D. y Krebs, E.G. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1986
- Reimann, E.M. y Beham, R.A. (1983) en Methods in Enzymology (Corbin, J.D. y Hardman, J.G., Eds.) Vol. 99, Pág.51, Academic Press, San Diego
- Reimann, E.M. (1986) Biochemistry, 25, 119
- Reynolds, C. (1982) Biochem. J. 202, 125
- Riedel, V. y Gerish, G. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 119
- Robinson, G., Butcher, R. y Sutherland, E. (1971) En Cyclic AMP, Academic Press, NY
- Robinson-Steiner, A.M. y Corbin, J.D. (1983) J. Biol. Chem. 258, 1032

Bibliografía

- Robinson-Steiner, A.M., Beebe, S.J., Rannels, S.R. y Corbin, J.D. (1984) J. Biol. Chem. 259, 10596
- Roesler, W.J., Vandenbark, G.R. y Hanson, R.W. (1988) J. Biol. Chem. 263, 9063
- Roseneau, P.R., Fry, D.C., Mildvan, A.S., Doughty, M., O'Brian, C. y Kaiser, E.T. (1984) Biochemistry 23, 3161
- Rossmann, M.G., Moras, D. y Olsen, K. (1974) Nature 250, 194
- Rubin, C.S., Erlichman, J. y Rosen, O.M. (1972) J. Biol. Chem. 247, 36
- Sakai, T., Makino, H. y Tanaka, R. (1978) Biochim. Biophys. Acta 522, 477
- Sarkar, D., Erlichman, J. y Rubin, C.S. (1984) J. Biol. Chem. 259, 9840
- Sass, P., Field, J., Nikawa, J., Toda, T. y Wigler, M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9303
- Schwalb, M.N. (1974) Arch. Microbiol. 96, 17
- Seville, M., England, P.J. y Hoobrok, J.J. (1984) Biochem. J. 217, 633
- Shacter, E., Stadtman, E.R. y Jurgensen, S.R. (1988) en Methods in Enzimology (Corbin, J.D. y Johnson, R.A., Eds.) Vol. 159 pág.3, Academic press, San Diego.
- Sharma, R.K., Wang, T.H., Wirch, E. y Wang, J.H. (1980) J. Biol. Chem. 255, 5
- Shoji, S., Ericson, L.H., Walsh, K.A., Fischer, E.H. y Titani, K (1983) Biochemistry 22, 3702
- Showers, M.O. y Maurer, R.A. (1986) J. Biol. Chem. 261, 16288
- Siegel, L. y Monty, K. (1966) Biochim. Biophys. Acta 112, 346
- Smoake, J., Johnson, L. y Peake, G. (1981) Arch. Biochem. Biophys. 206, 331

Bibliografía

- Snyder, M.A., Bishop, J.M., McGrath, J.P. y Levinson, A.D.
(1985) Mol. Cell. Biol 5, 1772
- Strada, S. y Thompson, W. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide
Res. 9, 265
- Stryer, L., Hurley, J.B. y Fung, B.K. (1981) Trends
Biochem. Sci. 6, 254
- Stryer, L. (1986) Ann. Rev. Neurosci. 9, 87
- Sudgen, P.H., Holladay, L.A., Reimann, E.M. y Corbin, J.D.
(1976) Biochem. J. 159, 409
- Takahashi, M., Blazy, B. y Bandras, A. (1980) Biochemistry
19, 5124
- Takemoto, D., Hansen, J., Takemoto, L. y Houslay, M. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 14597
- Takio, K., Smith, S.B., Krebs, E.G., Walsh, K.A. y Titani, K.
(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2544
- Takio, K., Smith, S.B., Krebs, E.G., Walsh, K.A. y Titani, K.
(1984) Biochemistry 23, 4200
- Talmadge, K., Bechtel, E., Salonkangas, A., Huber, P.,
Jungmann, R. y Eppenberger, U. (1975) Eur. J. Biochem. 60,
621
- Taylor, S.S., Lee, C., Swain, L. y Stafford, P.H. (1976)
Anal. Biochem. 76, 45
- Taylor, S.S. y Stafford, P.H. (1978) J. Biol. Chem. 253,
2284
- Taylor, S.S., Bubis, J., Toner-Webb, J., Saraswat, L.D.,
First, E.A., Buechler, J.A., Knighton, D.R. y Sowadski, J.
(1988) FASEB J. 2, 2677
- Téllez-Iñón, M.T. y Torres, H.N. (1970) Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 66, 459
- Téllez-Iñón, M.T., Glikin, G.C. y Torres, H.N. (1982)
Biochem. J. 203, 611

- Téllez-Iñón, M.T., Ulloa, R.M., Glikin, G.C. y Torres, H.N.
(1985) Biochem. J. 232, 425
- Terasaki, W. y Appleman, M. (1975) Metabolism 24, 311
- Thompson, W. y Appleman, M. (1971) Biochemistry 10, 311
- Thompson, W., Terasaki, W.L., Epstein, P.M. y Strada, S.J.
(1979) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 10, 69
- Thompson, W., Ross, C.P., Strada, S.J., Hersh, E.M. y Lavis,
V.R. (1980) Cancer Res. 40, 1955
- Titani, K., Sasagawa, T., Ericson, L.H., Kumar, S., Smith,
S.B., Krebs, E.G. y Walsh, K.A. (1984) Biochemistry 23,
4193
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J.D.,
McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E.G. y Wigler, M. (1987)
Mol. Cell. Biol. 7, 1371
- Tomes, C., Kerner, N., Moreno, S. y Passeron, S. (1988-89)
Second Messengers and Phosphoproteins 12, 289
- Trevillyan, J.M. y Pall, M.L. (1982) J. Biol. Chem. 257,
3978
- Tsuzuki, J. y Kiger, J.A. (1978) Biochem. J. 17, 2961
- Tucker, M., Robinson, J. y Stellwagen, E. (1981) J. Biol.
Chem. 256, 9051
- Uhler, M.D. , Chrivia, J.C. y McKnight, G.S. (1986) J.
Biol. Chem. 261, 15360
- Uhler, M.D. y McKnight, G.S. (1987) J. Biol. chem. 261,
16288
- Ulloa, R.M., Mesri, E., Esteva, M., Torres, H.N. y Téllez-
Iñón, M.T. (1988) Biochem. J. 255, 319
- Uno, I. y Ishikawa, T. (1973) J. Bacteriol. 3, 1249
- Uno, I. y Ishikawa, T. (1981) J. Biochem. 89, 1275
- Van Inwegen, R., Pledger, W., Strada, S. y Thompson, W.
(1976) Arch. Biochem. Biophys. 175, 700

Bibliografia

- Vogel, M. y Heinz, F. (1980) FEBS Lett. 122, 223
- Walsh, D., Perkins, J. y Krebs, E. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3763
- Walsh, D., Ashby, C., Gonzalez, C., Calkins, D., Fischer, E. y Krebs, E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1977
- Walsh, D. y Krebs, E.G. (1973) The Enzymes 8, 555
- Weber, H. y Appleman M. (1982) J. Biol. chem. 257, 5339
- Weber, I.T., Steitz, T.A., Bubis, J. y Taylor, S.S. (1987) Biochemistry 26, 343
- Weber, I.T., Shabb, J.B. y Corbin, J.D. (1989) Biochemistry 28, 6122
- Weishaar, R.E., Burrows, S.D., Kobylarz, D.C., Quade, M. M. y Evans, D.B. (1986) Biochem. Pharmacol. 35, 787
- Weldon, S.L. y Taylor, S.S. (1985) J. Biol. Chem. 260, 4203
- Withehouse, S. y Walsh, D. (1983) J. Biol. Chem. 258, 3682
- Withehouse, S., Feramisco, J.R., Casnellie, J.E., Krebs, E.G. y Walsh, D. A. (1983) J. Biol. Chem. 258, 3693
- Worthington Enzyme Manual (1972) Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey
- Yamamoto, T., Lieberman, F., Osborne, J.C., Manganiello, V.C., Vaughan, M. y Hidaka, H. (1984) Biochemistry 23, 670
- Yamamoto, K.K., Gonzalez, G.A., Biggs, W.H. III, Montminy, M.R. (1988) Nature 334, 494
- Yoon, M.Y. y Cook, P.F. (1987) Biochemistry 26, 4118
- Zick, S. y Taylor, S.S. (1982) J. Biol. Chem. 257, 2287
- Zoller, M.N., Nelson, N.C. y Taylor, S.S. (1981) J. Biol. chem. 256, 10387