

Tesis de Posgrado

Transducción de señales en agrobacterium

Martinetto, Horacio E.

1991

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

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

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

Cita tipo APA:

Martinetto, Horacio E.. (1991). Transducción de señales en agrobacterium. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2442_Martinetto.pdf

Cita tipo Chicago:

Martinetto, Horacio E.. "Transducción de señales en agrobacterium". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2442_Martinetto.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Rec. 1983-1984



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**TRANSDUCCION DE SEÑALES
EN AGROBACTERIUM**

AUTOR: HORACIO E. MARTINETTO

DIRECTORA: DRA. MIRTHA M. FLAWIA

LUGAR DE TRABAJO

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

**Tesis para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

*Tesis
2442
y. 2*

1991

A Raquel, Horacio y Fernando

A mis padres

A mi familia, mis amigos y
a todos los que fueron ángeles
pero sobre todo a
Buenaventura, Víctor y Ricardo

Cuando el niño era niño,
era el tiempo de preguntas como
¿Por qué estoy aquí
y por qué no allí?
¿Cuándo empezó el tiempo
y dónde termina el espacio?...

Cuando el niño era niño,
encima de cada montaña tenía
el anhelo de una montaña más alta
y en cada ciudad el anhelo
de una ciudad más grande,
y siempre es así todavía...

Cuando el niño era niño,
lanzó un palo como una lanza
contra el árbol
y hoy vibra allí todavía.

P. Handke - W. Wenders
"Las Alas del Deseo" (1986)

Y sin embargo se mueve,
y en ese sin embargo se resume
toda la cuestión. A pesar del
silencio que crece verticalmente;
sin embargo, sí, a pesar de las heridas
que puedan herirse y aún de los
muertos que seguirán muriendo,
sin embargo siempre, sí, *eppur*
si muove, sí.

Desiderio Arenas
"Oficio de tinieblas por Galileo
Galilei" (1984)

AGRADECIMIENTOS

A Mirtha Flawiá por sus enseñanzas, su entusiasmo y la libertad que me dio para desarrollar este trabajo.

A Héctor Torres por haber sido mi director de beca y por los gustos compartidos, en especial los oncogenes y el puchero.

A Jorge Muschietti por su participación fundamental en este trabajo, su ayuda, por las "maldades" cometidas a dúo y, sobre todo, por su amistad.

A Leo Erijman, miembro fundador y vértice insustituible del triángulo futbolero del Instituto, por todo.

A mis amigos Albertito Díaz Añel, digno sucesor, Norberto Malarini y Mariano Rodríguez, por todo lo que han hecho para ayudarme en innumerables ocasiones.

A Adriana Urman por su invalorable ayuda y su inagotable paciencia.

A Graciela Bianchini y Omar Coso, que compartieron conmigo todo este período e hicieron que todo resultara más fácil.

A los jóvenes del grupo ciclasa, Marisa Farber y Diego Fraidenraich por su cálida compañía.

A Malala Gómez, Rita Ulloa y Claudia Ochatt, con quienes compartí el 209 y a María Teresa Téllez-Iñón, por soportarme estoicamente.

A Danny Altschuler, Fernando Bravo, Betina Orman, Guillermo Taccioli, Mercedes Goin, Patricia Levy-Yeyati y Pablo Rabinowicz por todo lo que me brindaron.

A Gerardo Glikin por su buen humor y a Alejandro Mentaberry por charlas muy entretenidas, aunque no sepa apreciar el arte futbolístico.

A todos mis compañeros del INGEBI: Viviana Bernath, Andrés Muro, Carlitos Pesce, Anabella Srebrow, Alberto Kornblihtt, Alejandro Schijman, Martín Vázquez, Sonia Lafon, Enrique Mesri, Gabriela Levitus, Dan Kaplan, Alfredo Panebra, Nelson Dusseti, Mariano Levin, Sandra Ogueta, Nora Paños, Erich Grotewold, Ricardo Attar, Javier Cáceres, Facundo Batista, Alvaro Estevez, Norberto Judewicz, Luis Jiménez de Asúa, Tito Contreras, Leonor Acevedo, María Julia Alvarez, Alejandro Paladini, Gabriel Paissan, Rosana Celnik, Liliana Haim, Ximena Ares, Silvia Cabral, Florencia Rodríguez, Nené Parodi, Marta Judewicz, Luis Acosta, Irma Gelmi, Ana Pastini, Javier Paget, Daniel Capelutto, Gabriela Calamante, Pablo Zaltz, Laura Moratinos, Clarita Rubinstein y también a Belén Elgoyhen, Pablo Visconti y Marcelo Rubinstein.

A Luis Millara por sus excelentes fotografías.

A Claudio Vilariño, por los momentos compartidos en los inicios de esta etapa.

A Giannina Pasquini por darme la oportunidad de conocer el trabajo científico.

A Marcos Besio-Moreno, Patricia Setton y toda la gente de Química Biológica Patológica.

A mis queridísimos amigos Fernando, Marcela, Gustavo, Alejandra, Jorge, Silvia, Sergio y Silvia.

Finalmente, un agradecimiento muy especial para Raquel, Horacio, Fernando, mis padres y Ale por su apoyo incondicional y por su confianza absoluta en mí.

INDICE

Página

INTRODUCCION	1-89
CONSIDERACIONES GENERALES	2
TRANSDUCCION DE SEÑALES EN EUCARIOTES	3-19
Características generales.....	3
Transducción de señales mediada por receptores con actividad de quinasa de tirosina.....	5
Estructura.....	5
Mecanismos de activación y desensibilización.....	7
Procesos metabólicos regulados por receptores con actividad de quinasa de tirosina.....	8
Transducción de señales mediada por receptores acoplados a proteínas G.....	12
Estructura.....	14
Mecanismos de activación y desensibilización.....	15
Otros segundos mensajeros.....	16
Transmisión del mensaje al núcleo.....	17
TRANSDUCCION DE SEÑALES EN PROCARIOTES	20-30
Consideraciones generales.....	20
Quinasas de proteínas activadas por metabolitos.....	20
Mecanismos de acción.....	21
Funciones.....	21
Sistemas de dos componentes.....	22
Mecanismo de activación: Características del sistema.....	23
Distintos sistemas de dos componentes.....	24
Expresión de porinas.....	26
Sistema de fosfotransferasas dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS).....	28
Mecanismo de acción.....	28
Funciones mediadas por el PTS.....	29
Efectos regulatorios del PTS.....	30
CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA DE LAS GTPasas	31-37
Características generales.....	31
Ciclo del GTP.....	32
Regiones implicadas en la unión del nucleótido.....	36
PROTEINAS G	38-49
Características generales.....	38
Clasificación y función de las subunidades α	38
Características y funciones del complejo $\beta\gamma$	42
Relación estructura-función de las subunidades α	45
Organización de los sistemas de transducción mediados por proteínas G.....	48
PROTEINAS RAS	50-71
Consideraciones generales.....	50
Características de los genes ras.....	50
Estructura tridimensional de las proteínas ras.....	51
Propiedades bioquímicas. Unión e hidrólisis de GTP.....	55

Dominios funcionales.....	59
Dominio efector.....	60
Epitope reconocido por anticuerpos neutralizantes.....	62
Región de anclaje a membrana.....	62
Dominio hipervariable.....	66
Funciones en eucariotes superiores.....	66
Funciones en eucariotes inferiores.....	69
PROTEINAS RAS-RELACIONADAS.....	72-78
Características generales.....	72
Familia ras.....	73
Familia rho.....	74
Familia rab.....	75
ADENILIL CICLASA.....	79-84
Características generales.....	79
Adenilil ciclase en procariotes.....	79
Adenilil ciclase en eucariotes inferiores.....	80
Adenilil ciclase en eucariotes superiores.....	81
AGROBACTERIUM.....	85-89
Características generales.....	85
Transferencia del ADN-T.....	85
Transformación de células vegetales.....	87
OBJETIVOS.....	90
MATERIALES Y METODOS.....	92-123
AGROBACTERIUM.....	93-95
Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.....	93
Obtención de esferoplastos.....	94
Fraccionamiento subcelular.....	94
Solubilización de proteínas de membrana.....	95
ADENILIL CICLASA.....	96-103
Purificación parcial. Métodos cromatográficos.....	96
Cromatografía en columnas de DEAE-celulosa (cromatografía de intercambio iónico).....	96
Cromatografía en Ultrogel Aca34 (cromatografía de exclusión molecular).....	97
Determinación de los parámetros moleculares e hidrodinámicos.....	97
Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa.....	97
Filtración en geles.....	98
Cálculo de los parámetros moleculares e hidrodinámicos.....	98
Volumen específico parcial.....	98
Radio de Stokes.....	100
Peso molecular.....	101
Coeficiente friccional.....	101
Parámetros de las proteínas marcadoras.....	101
Ensayo de la actividad de la adenilil ciclase.....	102

PROTEINA DE LA FAMILIA RAS.....	104-119
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	104
Ensayos bioquímicos de identificación.....	106
Unión específica de [³⁵ S]GTP-γ-S.....	106
ADP ribosilación.....	107
Unión de α[³² P]GTP en geles por fotoafinidad.....	108
Técnicas inmunológicas.....	109
Inmunoprecipitación.....	109
<i>Immunoblot</i>	110
Marcado con [³⁵ S]Metionina.....	114
Marcado metabólico con [³⁵ S]Metionina.....	114
Fluorografía.....	115
Técnicas para identificar secuencias de ADN.....	115
Obtención de ADN total.....	115
Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	116
Electroforesis en geles de agarosa.....	116
<i>Southern blot</i>	117
Preparación de sondas radioactivas.....	118
Hibridación.....	118
PROCEDIMIENTOS ANALITICOS.....	119-122
Determinación de proteínas.....	119
Determinación de la posición de las proteínas marcadoras en los gradientes de sacarosa y en las columnas de Ultrogel Aca3.....	120
Obtención de membranas para controles positivos.....	120
Obtención de membranas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	120
Obtención de membranas de segmentos externos de bastones de retina bovina.....	121
Obtención de membranas de cerebro bovino.....	122
REACTIVOS.....	122-123
RESULTADOS Y DISCUSION.....	124-152
ADENILIL CICLASA DE <i>Agrobacterium</i>.....	125-182
Propiedades generales.....	125
Localización subcelular. Actividad en las distintas fases del cultivo.....	125
Propiedades cinéticas: efectores de enzimas eucarióticas.....	130
Comparación de las formas particulada y soluble.....	133
Purificación parcial de la adenilil ciclasa soluble de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	136
Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.....	136
Cromatografía preparativa en Ultrogel Aca34.....	137
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	138
Parámetros moleculares e hidrodinámicos de la adenilil ciclasa soluble de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	140
Filtración por geles.....	140
Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa.....	141

Efecto de posibles activadores de la adenilil ciclasa de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	143
Efecto de calmodulina.....	143
Efecto de compuestos vegetales de la familia de las syringonas.....	145
Efecto de nutrientes.....	146
Discusión.....	148
PROTEINAS DE TIPO RAS EN <i>Agrobacterium</i>	153-182
Detección de una proteína que une GTP en membranas de <i>Agrobacterium</i>	153
Detección de unión específica de [³⁵ S]GTPγS en membranas de <i>Agrobacterium</i>	153
Unión específica de α[³² P]GTP por fotoafinidad.....	154
ADP ribosilación.....	155
Immunoblots utilizando anticuerpos dirigidos contra epitopes de subunidades α y β de proteínas G.....	156
Caracterización inmunológica de la proteína.....	160
Inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo Y13-259....	160
Distribución subcelular y solubilización.....	162
Especificidad de la detección-Desplazamiento.....	166
Immunoblots utilizando anticuerpos pan-reactivos.....	167
Análisis bioquímico e inmunológico simultáneo.....	168
Identificación de secuencias de ADN homólogas a genes ras....	169
Southern blot.....	169
Efecto funcional del anticuerpo Y13-259.....	172
Efecto de Y13-259 sobre la unión de GTP.....	172
Estimación de la vida media de p21 de <i>Agrobacterium</i>	173
Marcación con [³⁵ S] metionina - Pulso y caza.....	173
Expresión de la proteína en distintos estadios del crecimiento bacteriano.....	175
Immunoblots utilizando muestras de distintas fases del cultivo.....	175
Discusión.....	176
 CONCLUSIONES	 183
 BIBLIOGRAFIA	 188

ABREVIATURAS

AMPc.....	adenosina 3'-5' monofosfato cíclico
ATP.....	adenosina 5' trifosfato
BSA.....	seroalbúmina bovina
Cam.....	calmodulina
DEAE.....	dietil aminoetil
D ₂ O.....	agua deuterada
DTT.....	ditiotreitól
EDTA.....	ácido etilén diamino tetracético
FGF.....	factor de crecimiento de fibroblastos
GDP.....	guanosina 5' difosfato
GMPc.....	guanosina 3'-5' monofosfato cíclico
GTP.....	guanosina 5' trifosfato
GTPγS.....	guanosina 5'-O-(3-tio trifosfato)
kDa.....	kilo Daltons
NAD.....	nicotinamida adenina dinucleótido
PM.....	peso molecular
ROS.....	segmentos externos de bastones de retina
SDS.....	dodecil sulfato de sodio
TEMED.....	N,N,N',N' tetrametil etilendiamina
TRIS.....	2-amino-2 hidroximetil-1,3 propanodiol

INTRODUCCION

CONSIDERACIONES GENERALES

Las células deben adaptarse al medio que las rodea y para responder en forma adecuada necesitan sensor en forma muy precisa su entorno. Para ello han desarrollado mecanismos que captan las señales del medio ambiente (luz, nutrientes, hormonas, factores de crecimiento), las procesan en forma discriminada y producen la respuesta apropiada. El conjunto de procesos involucrados constituyen los sistemas de transducción de señales.

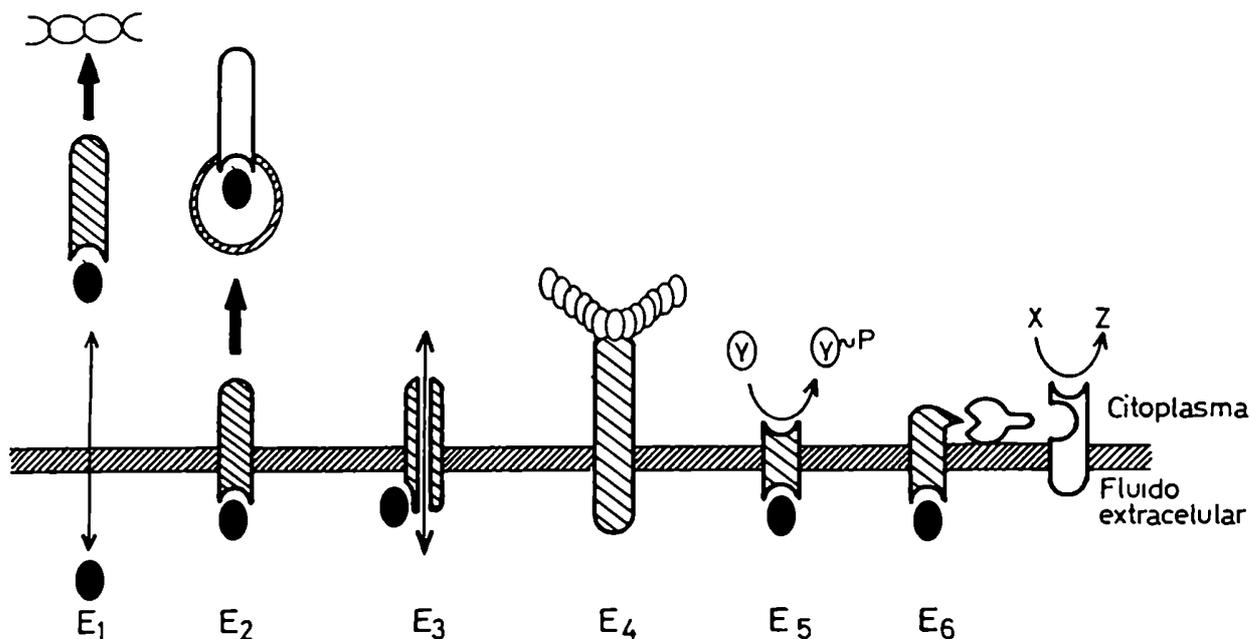
Estos sistemas aparecen en los organismos más rudimentarios y con la evolución han ido ganando en complejidad, pero se puede afirmar que se ha mantenido un principio básico de organización de los mismos.

TRANSDUCCION DE SEÑALES EN EUCARIOTES

Características generales

Al ser la membrana plasmática el punto de contacto de la célula con el exterior, es allí donde se produce la captación de las distintas señales y su discriminación que culmina en diferentes eventos bioquímicos.

Los organismos eucarióticos han desarrollado varias estrategias moleculares para la transducción de señales extracelulares a través de la membrana. Los diferentes mecanismos pueden dividirse en seis grupos, de acuerdo al esquema de la figura 1.



La primera clase (E₁) es la más sencilla y es utilizada por las hormonas esteroideas, que poseen una hidrofobicidad suficiente para atravesar la bicapa lipídica. En el citoplasma se unen a una proteína que actúa como receptor y que, además, es capaz de

translocarse al núcleo y pegarse al ADN. De esta forma, el receptor activa la transcripción de genes específicos y de ese modo se produce la respuesta celular (Beato, 1989). Otra estrategia (E2) implica la unión del ligando con un receptor que atraviesa la membrana y el complejo así formado se internaliza. Un ejemplo de este mecanismo es la captación de colesterol por la lipoproteína de baja densidad (LDL); el complejo formado se une al receptor de LDL y el conjunto se internaliza en forma de vesículas; en el citoplasma se libera el colesterol mientras que el receptor en general se recicla y la LDL se degrada en lisozomas (Brown *et al*, 1983).

Un mecanismo diferente (E3) se da en las sinapsis y placas neuromusculares; en esos casos, los neurotransmisores (acetil colina, ácido γ aminobutírico, etc.) se unen a una proteína transmembrana que actúa como canal iónico. Al unirse el ligando, el canal se abre rápidamente y permite el paso de iones que producen un cambio en el potencial eléctrico de la membrana (Barnard *et al*, 1987).

La cuarta estrategia (E4) involucra a los receptores de la familia de las integrinas. Estos receptores ligan proteínas de la matriz extracelular a microfilamentos del citoesqueleto, y regularían la forma de la célula, la movilidad, el pegado a la matriz extracelular y el crecimiento (Hynes, 1987).

Los mecanismos restantes son los que implican a receptores transmembrana que, al unirse al ligando, disparan una actividad enzimática de su región intracelular (E5), cuyo mejor ejemplo son los receptores con actividad de quinasa de tirosina y otros receptores (E6) que se acoplan a transductores llamados proteínas G para producir segundos mensajeros intracelulares que regulan la actividad de diferentes proteínas citoplasmáticas. Estos dos mecanismos involucran a miembros de la familia de las GTPasas como son

las proteínas ras en el primer caso y las proteínas G en el segundo; por ese motivo se describirán ambos mecanismos en forma más detallada.

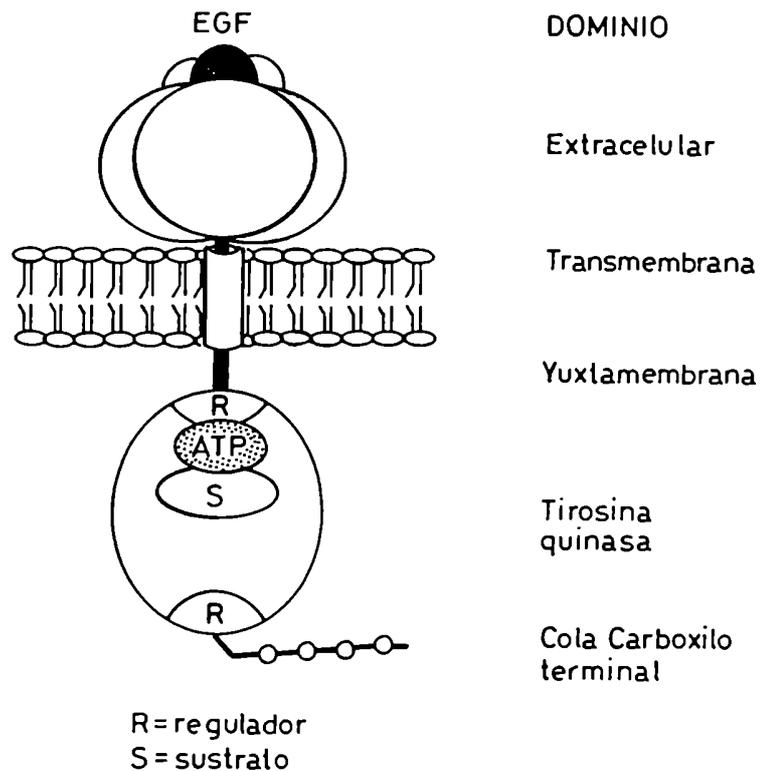
Transducción de señales mediada por receptores con actividad de quinasa de tirosina

Numerosos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), etc. y hormonas como la insulina, se ligan a receptores transmembrana que poseen actividad de quinasa de tirosina.

Estructura

Los receptores de esta familia poseen una topología común. Todos poseen un dominio extracelular glicosilado para unir el ligando, un dominio hidrofóbico único que atraviesa la membrana y un dominio citoplasmático que contiene una región catalítica con actividad de quinasa de tirosinas (Hanks *et al*, 1988; Yarden y Ullrich, 1988). Debido a su configuración, estos receptores pueden considerarse como enzimas alostéricas asociadas a la membrana (Ullrich y Schlessinger, 1990).

De este modo, la activación del receptor por unión de un ligando extracelular debe ser transmitida a través de la bicapa para activar las funciones del dominio intracitoplasmático. En la figura 2 se puede observar un esquema general de la estructura de estos receptores.



Sobre la base de la similitud de secuencias y características estructurales, estos receptores han sido clasificados en 4 subclases, cuyas características son las siguientes:

- Subclase I: Dos secuencias repetitivas, ricas en cisteína, en el dominio extracelular (receptor EGF)
- Subclase II: Heterotetrámeros $\alpha\beta_2$ ligados por puentes disulfuro con secuencias ricas en cisteína similares a la subclase I (receptor de insulina)
- Subclase III: Cinco repeticiones de tipo inmunoglobulina en el dominio extracelular y secuencias de inserción hidrofílicas en el dominio con actividad de quinasa

(receptor de PDGF, CSF-1 y C-kit)

Subclase IV: Similar a la subclase III pero con tres repeticiones de inmunoglobulina en lugar de cinco (receptor de FGF).

Mecanismos de activación y desensibilización

La activación de la función fosfotransferasa inducida por el ligando está mediada por oligomerización del receptor (Schlessinger, 1988; Williams, 1989). El cambio conformacional del dominio extracitoplasmático que sigue a la unión del ligando induce la oligomerización del receptor que estabiliza interacciones entre dominios intercitoplasmáticos adyacentes y lleva a la activación de la función mencionada. La oligomerización permite la transmisión de un cambio conformacional desde el dominio extracelular al intracelular, sin requerir cambios de posición en el dominio transmembrana. Los receptores oligomerizados poseen una elevada actividad de fosfotransferasa y una afinidad por el ligando aumentada (Yarden y Schlessinger, 1987).

El mecanismo de activación por dimerización puede ocurrir de tres formas diferentes:

- a) Ligandos monoméricos inducen la formación de dímeros
- b) Ligandos monoméricos se unen a receptores diméricos estabilizados por puentes disulfuro y producen un cambio conformacional en el complejo
- c) Ligandos diméricos inducen la formación del dímero

Una vez activados, los receptores son capaces de fosforilar tirosinas, de sustratos exógenos o de sus propias cadenas polipeptídicas (Ullrich y Schlessinger, 1990). La autofosforilación se produce en el dominio catalítico (receptor de PDGF)(Kazlauskas y Cooper, 1989), o en el extremo carboxilo terminal (receptor EGF)

(Margolis *et al*, 1989a). La autofosforilación eliminaría el efecto negativo que ejercen algunas secuencias de esas regiones, y permitiría así la interacción con sus sustratos (Honegger *et al*, 1988).

El extremo carboxilo terminal ejercería, por lo tanto, un control negativo sobre la actividad enzimática del receptor. Otra región donde se produce una modulación negativa de la actividad, es el dominio yuxtamembrana. En esta región, los receptores pueden ser fosforilados en serinas o treoninas por quinasas como la PKA o PKC. El receptor de EGF por ejemplo, es fosforilado por PKA en la treonina 654 que está ubicada en esta región (Yarden y Ullrich, 1988). Esta fosforilación tiene tres efectos: 1) Inhibe la actividad de quinasa de tirosina; 2) Disminuye la afinidad del receptor por su ligando; y 3) Promueve la internalización del receptor (Sibley *et al*, 1987). Este mecanismo es un *feed-back* negativo que ejerce el factor de crecimiento sobre su vía; además, serviría para la transmodulación de la actividad del receptor o regulación heteróloga, ya que otros factores de crecimiento, como PDGF, bombesina, etc., activan PKC y por ende, la fosforilación de esta región (Lin *et al*, 1986). De ese modo, los factores de crecimiento mencionados regularían negativamente al receptor de EGF.

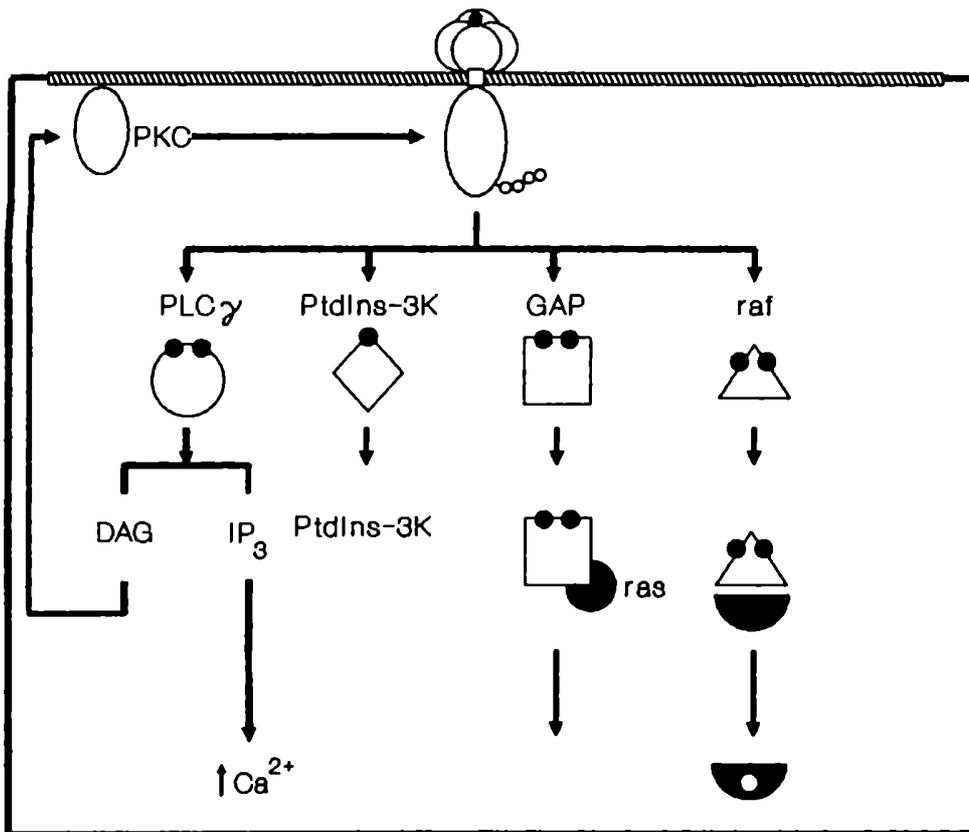
Procesos metabólicos regulados por receptores con actividad de quinasa de tirosina

Los factores de crecimiento disparan varias respuestas celulares como estimulación del intercambio de Na^+/H^+ , influjo de Ca^{2+} , activación de fosfolipasa C- γ y estimulación del transporte de glucosa y aminoácidos (Ullrich y Schlessinger, 1990). Es decir, la fosforilación de sustratos celulares junto con alteraciones en el contenido de iones de la célula, provee un estímulo interno para el crecimiento. Los eventos de fosforilación implican en un primer paso, la activación de la fosfolipasa C- γ por la actividad de

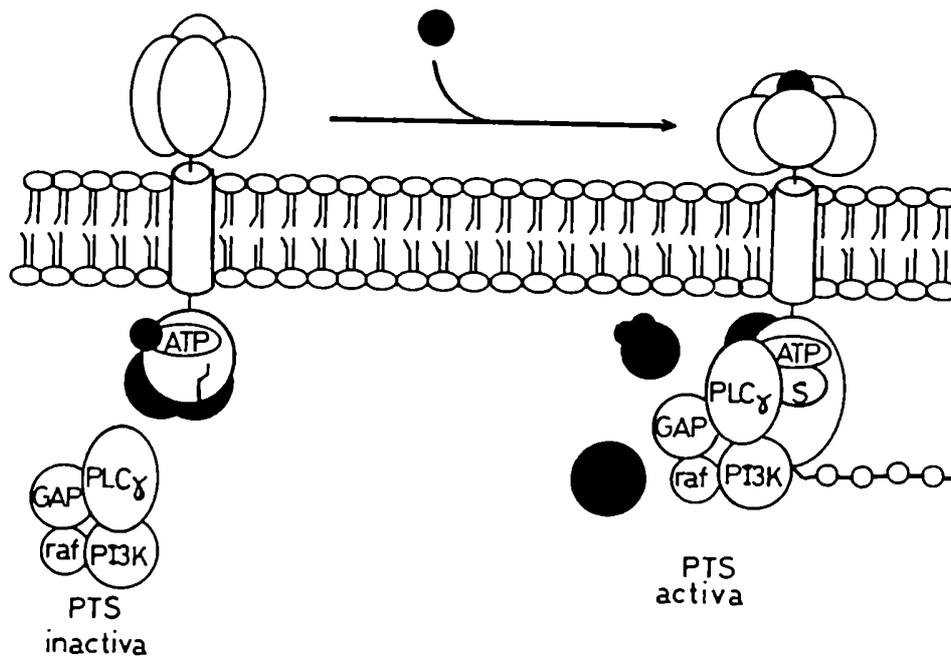
quinasa de tirosina del receptor (Margolis *et al*, 1989a). La fosfolipasa C- γ degrada fosfatidil inositol (PIP₂) generando inositol 1-4-5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (Nishizuka, 1988). Estos dos compuestos actúan como segundos mensajeros, es decir, compuestos intracelulares cuya concentración varía en respuesta a un estímulo externo (primer mensajero) y desencadenan las respuestas celulares a ese estímulo. El IP₃ permite la liberación de Ca²⁺ de compartimentos intracelulares y el diacilglicerol (DAG) activa a la proteína quinasa C (PKC) que fosforila serinas y treoninas y cumple el segundo paso de fosforilaciones en respuesta al estímulo externo.

Sin embargo, la activación de la fosfolipasa C- γ por PDGF no se correlaciona con un aumento en la síntesis de ADN (Margolis *et al*, 1990); además, algunos receptores de factores de crecimiento como el CSF-1 no fosforilan a la PLC- γ para ejercer su función (Downing *et al*, 1989). Esto sugiere que la activación de la vía de los fosfoinosítidos no es el único mecanismo utilizado por los distintos factores de crecimiento. En los últimos tiempos, se han ido identificado sustratos de la actividad de quinasa de tirosina y dichos sustratos están relacionados con distintas vías de transducción de señales. Hay evidencias concretas de que la fosfatidil inositol 3 quinasa (Varticovski *et al*, 1989), GAP o proteína activadora de la actividad GTPásica de ras (Molloy *et al*, 1989) y el producto del proto-oncogen c-raf (Morrison *et al*, 1989) se fosforilan de esa forma. En la figura 3 se esquematizan los sustratos conocidos de la actividad de tirosina quinasa y las posibles vías activadas.

Como se ve, además del aumento de Ca²⁺ y la activación de PKC por la PLC- γ , se activa una quinasa de serinas y treoninas citoplasmáticas (c-raf), una enzima que participa en el ciclo de síntesis de fosfoinosítidos (fosfatidil inositol 3 quinasa) y una proteína que interacciona con las proteínas ras.



Además, se dispone de datos que indican que estos sustratos son componentes de un complejo preexistente con capacidad de activar diferentes vías y conducir a respuestas celulares pleiotrópicas (Margolis *et al*, 1989b). Existiría así una "partícula de transferencia de señales" (PTS) que, al activarse el receptor, permitiría la interacción de la misma con el propio receptor y con otros sustratos para activar las vías correspondientes. En forma esquemática el modelo es el que se observa en la figura 4.



Para la interacción del receptor con sus sustratos se requiere también a la proteínas codificadas por los genes ras, cuya descripción detallada se verá en otra sección de esta Introducción; numerosas evidencias sugieren que estas proteínas son el nexo entre los receptores y sus sustratos, aunque no se conoce el mecanismo por el cual actúan. Se sabe que mutantes de proteínas ras ($p21^{ras}$) son capaces de inducir la síntesis de ADN y transformación en ausencia de suero, es decir, de factores de crecimiento (Stacey y Kung, 1984). Además, la microinyección de anticuerpos anti $p21^{ras}$ neutralizantes inhibe el efecto de distintos factores de crecimiento (Mulcahy *et al*, 1985). Mediante el empleo de anticuerpos neutralizantes, se llegó a la conclusión de que $p21^{ras}$ actúa en un paso intermedio entre los receptores y quinasas de proteínas citoplasmáticas; la microinyección de esos anticuerpos inhibe el efecto de los productos de oncogenes como c-fms y c-fes, cuya estructura es igual a la de los receptores con activi-

dad de tirosina quinasa. En cambio, el efecto del anticuerpo puede ser superado sobre-expresando el producto de los oncogenes *c-mos* y *c-raf* que son quinasas citoplasmáticas (Smith *et al*, 1986). Además, en experimentos de este tipo se vio que al microinyectar anticuerpo anti p21 y PLC- γ hay transformación celular, pero si se microinyecta p21^{ras} con anticuerpos anti-PLC- γ ese efecto no se observa, por lo que p21^{ras} activaría a la PLC- γ (Smith *et al*, 1990). Por otro lado, ya existían datos previos que indican que p21^{ras} activa la hidrólisis de fosfatidil inositol (Lacal *et al*, 1987). Sin embargo, también se sabe que p21^{ras} tiene efectos transformantes aún cuando no está activada la PKC (Gauthier-Rouviere *et al*, 1990).

Todo esto sugiere que las p21^{ras} activan diferentes sistemas y se puede dividir su acción en dos vías, una dependiente de PKC y la otra independiente de esa enzima; la segunda vía supondría la activación de quinasas citoplasmáticas como *c-raf* y *c-mos*. Esta hipótesis es reforzada por el hecho de que los receptores de factores de crecimiento activan PKC para producir algunos efectos y para otros no.

Todo indica, entonces, que la cadena de eventos desatada por un factor de crecimiento implica la activación de su receptor, luego (por un mecanismo aún desconocido), la activación de p21^{ras} y en este punto se producen las bifurcaciones con la activación de mecanismos independientes o dependientes de PKC que concluyen en síntesis de ADN (proliferación) y/o transformación morfológica (diferenciación)(Marshall, 1991).

Transducción de señales mediada por receptores acoplados a proteínas G

Diferentes señales extracelulares como hormonas, neurotransmisores o la luz, ejercen sus efectos intracelulares por medio de receptores con estructuras relacionadas que se acoplan a proteínas

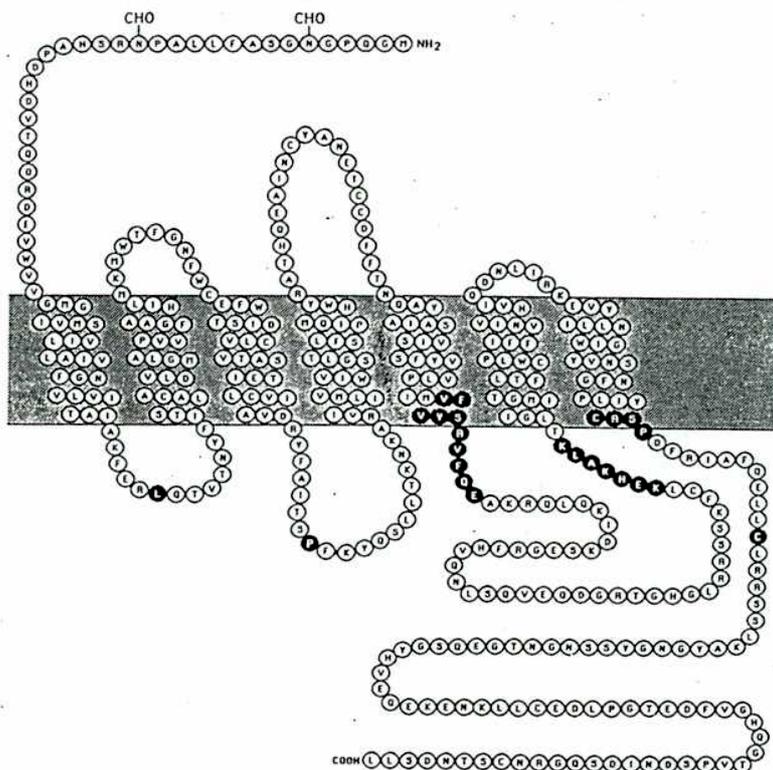
de la familia de las GTPasas, denominadas proteínas G. Estas proteínas actúan como transductores de la señal activando distintos efectores. En general, estos efectores actúan produciendo segundos mensajeros, aunque también hay proteínas G que regulan la actividad de canales iónicos. Como ya se vio, los segundos mensajeros son compuestos intracelulares que median los efectos de señales externas, actuando sobre numerosas proteínas y, de ese modo, coordinan la respuesta de la célula al mensajero extracelular o primer mensajero. Los segundos mensajeros más difundidos son el AMP cíclico, el Ca^{2+} y productos del metabolismo de los fosfoinosítidos. La producción de estos segundos mensajeros está mediada por proteínas G, aunque en el caso de los fosfoinosítidos y Ca^{2+} , las evidencias aún no son concluyentes y, además, el papel del transductor sería compartido con proteínas ras. En la tabla 1 se resumen los ligandos, receptores y efectores más importantes ligados a distintas proteínas G (Bourne y De Franco, 1989).

LIGANDO	TIPO DE RECEPTOR	PROTEINA G	EFEECTO
catecolaminas β adrenérgicas, glucagon, etc.	β adrenérgico	G_s	activación de adenilil ciclasa
aminas α_2 adrenérgicas, somatostatina, etc.	α_2 adrenérgico	G_i	inhibición de adenilil ciclasa, activación de fosfolipasa C y apertura de canales de K^+
desconocido	desconocido	G_o	desconocido
catecolaminas α_1 adrenérgicas, vasopresina, etc.	α_1 adrenérgico	G_x o G_p	activación de fosfolipasa C
fotones	rodopsina	transducina(G_t)	activación de fosfodiesterasa de GMP cíclico

Como se verá luego, hay una marcada conservación de estructura y función de las distintas proteínas G, por lo que no es sorprendente que los receptores acoplados a estas proteínas pertenezcan a una familia de proteínas relacionadas (Bourne y De Franco, 1989).

Estructura

Los distintos receptores de esta familia (resumidos en la tabla 1) muestran distinto grado de conservación de la secuencia aminoacídica, pero todos poseen una topología similar (Dohlman *et al*, 1987). Un diagrama esquemático de los mismos se aprecia en la figura 5.



Todos los miembros de esta familia parecen atravesar la membrana plasmática siete veces y tienen el amino terminal orientado hacia el espacio extracelular y el carboxilo terminal en el citoplasma. Esta estructura parece ser muy adecuada para transmitir la señal a la proteína G asociada que reside en la cara interna de la membrana plasmática, por medio de cambios conformacionales inducidos por el ligando (Lefkowitz y Caron, 1988). Los dominios transmembrana serían los encargados de unir el ligando. En el caso de la rodopsina, la proteína (opsina) tiene asociado 11 *cis*-retinal que cambia de conformación por efecto de la luz y cumpliría el efecto estérico del ligando y dicha molécula se asocia a la región transmembrana (Stryer, 1986).

Los *loops* intracitoplasmáticos o el carboxilo terminal serían, por su parte, las zonas de interacción con las proteínas G. Además, en el extremo carboxilo terminal se producen fosforilaciones que regulan la actividad del receptor.

Mecanismos de activación y desensibilización

Al activarse el receptor por unión del ligando específico, ocurren dos procesos. Uno es la activación de la proteína G asociada que, a su vez, activa al efector; al mismo tiempo, el receptor activado es fosforilado y este mecanismo permite su desensibilización. La desensibilización puede ser homóloga o heteróloga. En el primer caso, la activación de una vía promueve la fosforilación del receptor por enzimas específicas como la rodopsina quinasa (Wilden y Kuhn, 1982) o la quinasa del receptor β adrenérgico (Benovic *et al*, 1986), y esa fosforilación desactiva sólo a la propia vía; en el caso de la desensibilización heteróloga, la exposición de una célula a un agonista determinado, inhibe la respuesta a otros agonistas que actúan por medio de diferentes receptores, fosforilando dichos receptores. Estas fosforilaciones son llevadas a cabo por las quinasas de proteínas A y C, como se

ha demostrado para el receptor β adrenérgico (Sibley *et al*, 1987).

En algunos casos, la fosforilación del receptor permite la interacción con proteínas que compiten con la proteína G y, de esa forma, inactivan la vía de transducción. Esto se ha demostrado para la rodopsina, que al fosforilarse interacciona con una proteína llamada arrestina, que impide la activación de transducina (Wilden *et al*, 1986).

Finalmente, los receptores fosforilados son internalizados y, en general, luego de defosforilarse son reciclados.

Otros segundos mensajeros

Además del AMP cíclico y Ca^{2+} -fosfoinosítidos, existen otros segundos mensajeros como el GMP cíclico, metabolitos del ácido araquidónico y el pH citoplasmático.

El GMP cíclico está difundido en algunos tipos celulares solamente. Por un mecanismo similar al del AMP cíclico, media la relajación de músculo liso en respuesta al factor natriurético atrial y en células de la mucosa intestinal media la secreción de sales en respuesta a una exotoxina bacteriana (Waldman y Murad, 1987). Además, participa en el mecanismo de la visión (Stryer, 1986); en células de la retina en oscuridad, el GMP cíclico se une a canales de Na^+ manteniéndolos abiertos; al captarse la luz, se activa la rodopsina y vía transducina se activa la fosfodiesterasa de GMP cíclico que degrada al nucleótido y permite el cerrado de los canales de Na^+ con la consiguiente hiperpolarización de la membrana.

El ácido araquidónico es liberado por fosfolipasa A_2 o por fosfolipasa C y diacil glicerol lipasa a partir de fosfolípidos; por acción de diferentes enzimas (ciclooxigenasa, lipoxigenasa y epo-

xygenasa) es convertido en metabolitos que participan en mecanismos inter e intra celulares (Needleman *et al*, 1986); estos metabolitos participan en la estimulación de la liberación de insulina, en liberación de hormona lutinizante y en la regulación hormonal de canales de K^+ en neuronas sensoriales de *Aplysia*. Los receptores que activan la fosfolipasa A_2 actuarían vía proteínas G (Jelsema, 1987).

Por su parte, el pH citoplasmático parece actuar como segundo mensajero en varios tipos celulares. Por ejemplo, en fibroblastos, en respuesta a factores de crecimiento hay una rápida alcalinización del citoplasma de alrededor de 0,2 unidades de pH (Pouyssegur *et al*, 1984). El pH citoplasmático es regulado principalmente por el *antiporter* Na^+/K^+ y también por un *antiporter* de bicarbonato y, sobre ellos actúan la proteína quinasa C y otros componentes de mecanismos de transducción de señales (Vara y Rozengurt, 1985).

Transmisión del mensaje al núcleo

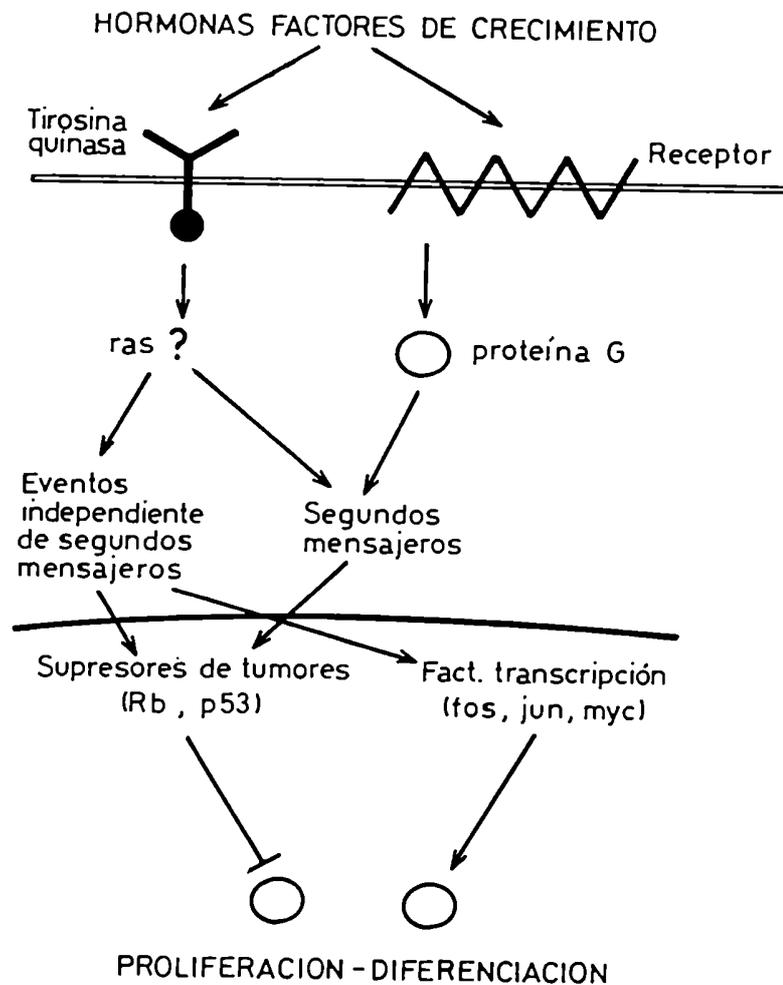
En forma frecuente, la estimulación de receptores resulta en una alteración de la transcripción de genes específicos. Esto se debe a que los segundos mensajeros o bien proteínas que actúan en alguna vía de transducción de señales, modulan la actividad de factores de transcripción.

Así, el AMP cíclico induce la expresión de numerosos genes y ese efecto es mediado por una proteína que se une a un consenso determinado en la región promotora de esos genes. Ese consenso se denomina CRE o elemento de respuesta a AMP cíclico (Montminy y Bilezikjian, 1987).

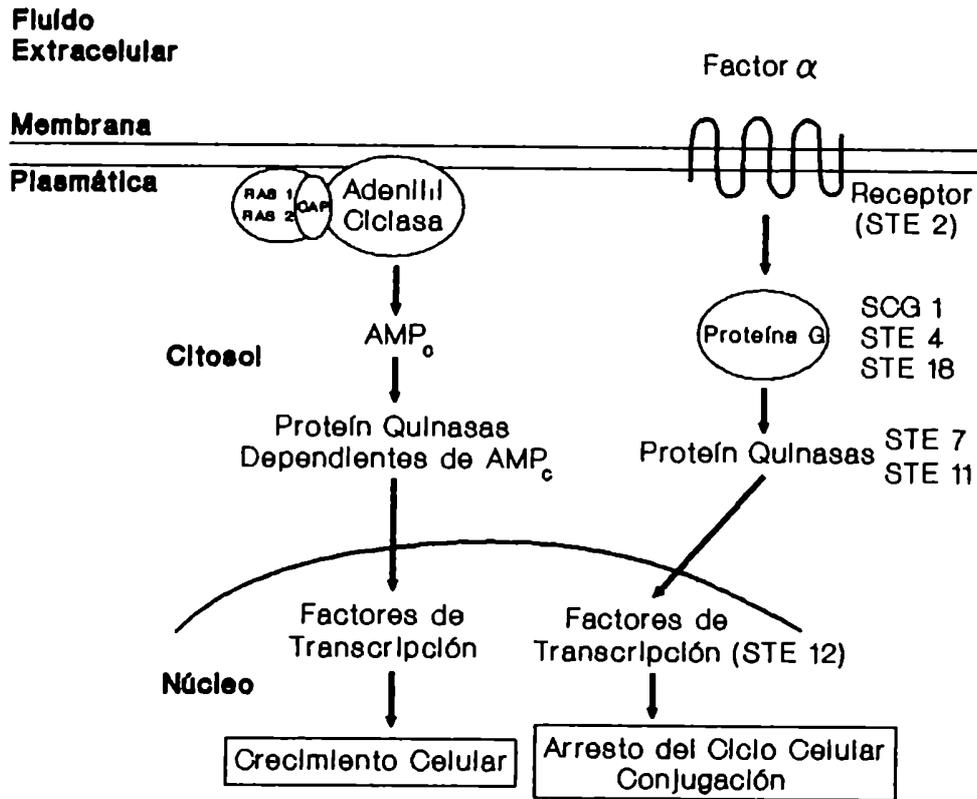
La activación de la PKC por ésteres de forbol también produce inducción de la expresión de genes; estos genes poseen un consenso denominado TRE que es reconocido por factores de transcripción

como AP-1 cuya actividad es regulada por PKC (Angel *et al*, 1987). El factor AP-1 es un dímero formado por los productos de los protooncogenes c-jun y c-fos.

De este modo entonces, las señales tanto para proliferación como para diferenciación celular, llegan al núcleo y producen su efecto. La figura 6 resume los mecanismos vistos.



En *Saccharomyces cerevisiae* el ciclo celular se regula por distintas vías y constituye un buen ejemplo para ilustrar esta sección, como se aprecia en la figura 7.



En respuesta a nutrientes, el sistema RAS-adenilil ciclasa produce AMP cíclico, y las quinasas de proteínas dependientes de dicho nucleótido activan factores de transcripción nucleares que producen el crecimiento celular (Broach, 1991). Por otro lado, para la reproducción sexual, las células α liberan la feromona α que es captada por células α por medio de un receptor (STE 2) que se conecta con una proteína G (codificada por los genes SCG1, STE4 y STE18) y este complejo activa quinasas de proteínas específicas (STE7, STE11); éstas activan un factor de transcripción (STE12) que actúa sobre distintos genes produciendo un arresto del crecimiento y los cambios morfológicos necesarios para el cruzamiento (Fields, 1990).

TRANSDUCCION DE SEÑALES EN PROCARIOTES

Consideraciones generales

Los procesos fisiológicos bacterianos de adaptación al entorno son mediados por segundos mensajeros y, en especial, por quinasas de proteínas o fosfotransferasas. La modificación post-traduccional de proteínas por fosforilación, ampliamente difundida en eucariotes, también cumple un papel central en organismos procarióticos (Saier *et al*, 1990).

Estas fosfotransferasas tienen características similares a las eucarióticas, pero también poseen propiedades únicas. Entre los mecanismos que regulan, se encuentran el metabolismo intermedio, el transporte de carbohidratos, la transcripción de genes y la diferenciación celular, como también procesos de virulencia, fijación de CO₂ fotosintético, etc. (Cozzone, 1988).

Se han encontrado tres mecanismos distintos de fosforilación de proteínas en bacterias (Saier *et al*, 1990). Ellos son:

- a) Quinasas de proteínas activadas por metabolitos
- b) Sistemas de sensor-regulador o de dos componentes
- c) Sistema de fosfotransferasas dependiente de fosfoenol piruvato (PTS)

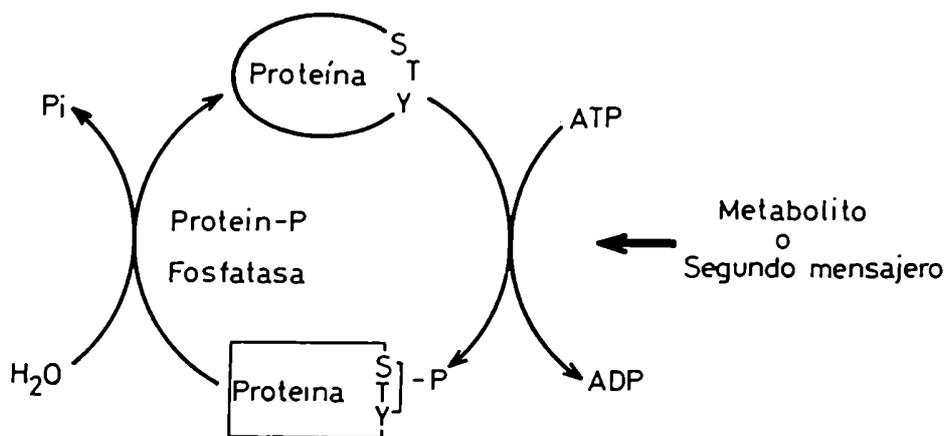
Quinasas de proteínas activadas por metabolitos

Este grupo incluye a miembros de la clásica familia de fosfotransferasas dependientes de ATP, que son semejantes a las caracterizadas en eucariotes. Estas enzimas fosforilan a sus sustratos en serina, treonina y tirosina (Reizer *et al*, 1988); incluso se han caracterizado algunas que son capaces de fosforilar proteínas de origen eucariótico (Chiang *et al*, 1989).

Mecanismos de acción

Si bien existen casos en que responden a segundos mensajeros, como AMPC o Ca^{2+} (Platt *et al*, 1988), en general son activadas en forma alostérica por metabolitos celulares (Groisman y Saier, 1990).

En la figura 8 se muestra un esquema del funcionamiento de estas quinasas.



Como se ve, la activación concluye por acción de una fosfatasa que actúa sobre la proteína que fue fosforilada. La actividad de fosfatasa puede deberse a una enzima distinta, o bien puede ser propiedad de la misma enzima (Saier *et al*, 1990).

Funciones

Las quinasas de esta familia mejor caracterizadas son las isocitrato de hidrogenasa quinasas de bacterias entéricas y las fosfotransferasas que fosforilan HPr, una proteína transportadora de fosfatos del PTS.

En el primer grupo se encuentra como sustrato la isocitrato de hidrogenasa. En *E. coli* se ha demostrado que su fosforilación reversible modula el flujo de carbono vía ciclo de ácidos tricarbóxicos y *shunt* del glioxalato (Wang y Koshland, 1982; Nimmo, 1984). Dentro de este grupo también es sustrato la citrato liasaligasa. En *Clostridium sphenoides* se ha demostrado que su fosforilación regula el metabolismo del citrato (Antranikian *et al*, 1985).

Las fosfotransferasas del segundo grupo fosforilan a HPr (Postma y Lengeler, 1985) y de ese modo producen una conexión entre dos sistemas de transducción de señales que emplean la transferencia de fosfatos como mecanismo de activación.

Sistemas de dos componentes

Muchas de las respuestas adaptativas en bacterias, que varían desde cambios transientes en la movilidad a reorganizaciones globales de la expresión génica y la morfología celular, son mediadas por los llamados sistemas regulatorios de dos componentes (Stock *et al*, 1989).

En su forma más simple, estos sistemas están formados por un receptor o sensor, que habitualmente está ubicado en la membrana interna, y un regulador que es una proteína citoplasmática con capacidad para unirse al ADN. La información captada por el sensor se transmite al regulador por fosforilación. Estos sistemas poseen en general más de dos componentes y, en algunos casos, como en quimiotaxis, la respuesta final no es la expresión de genes sino cambios en la rotación del flagelo. Además, en algunos casos, los sensores con actividad de quinasa de proteínas son citoplasmáticos y necesitan de otras proteínas de membrana que capten la señal.

Mecanismo de activación: Características del sistema

El mecanismo de activación de estas vías sigue los siguientes pasos: primero, el sensor capta la señal y, como consecuencia de ello, se autofosforila en un residuo histidina; luego, el sensor fosforilado interacciona con el regulador y le transfiere el fosfato a un residuo aspartato activándolo. Finalmente, el regulador fosforilado cumple su efecto, ya sea activar la transcripción de genes, cambiar el sentido de la movilidad, etc. (Bourret *et al*, 1989).

Este modelo de funcionamiento fue deducido a partir del análisis de las secuencias aminoacídicas de sensores y reguladores de distintos sistemas.

Los sensores tienen una secuencia variable en la región amino terminal que es la encargada de captar la señal específica y poseen en el carboxilo terminal una región conservada. Esta región tiene dominios conservados que aparecen en otras quinasas de proteínas y, además, en casi todos los casos, en esta región se encuentra el sitio de autofosforilación (Bourret *et al*, 1989).

Por su parte, los sensores presentan una región conservada en el amino terminal, mientras que la región carboxilo terminal es muy variable, y sería la zona encargada de producir el efecto final (Bourret *et al*, 1989).

El mecanismo postulado implica, entonces, la interacción proteína-proteína entre las regiones conservadas de cada componente. Es por ello que esas regiones han sido denominadas "transmisor" y "receptor", respectivamente (Kofoid y Parkinson, 1988).

La autofosforilación del sensor es una típica reacción de quinasas; en ella, se transfiere el fosfato γ del ATP al anillo imidazólico de una histidina. La fosfohistidina obtenida puede consi-

derarse un intermediario de alta energía que media la transferencia de un fosfato de un dador a un aceptor; esto es diferente a lo que ocurre con fosfoésteres como fosfoserina, fosfotreonina o fosfotirosina, que son más estables y sirven para modular velocidades de catálisis. La diferencia se debe a que la fosfohistidina posee una energía libre estándar de hidrólisis muy alta (Stock *et al*, 1989).

Los reguladores son fosforilados en un residuo aspartato que se encuentra en la región conservada y forma parte de un consenso que forma un bolsillo ácido que permite el ataque nucleofílico por parte del fosfato de la fosfohistidina (Stock *et al*, 1989). Debido a la alta energía libre de hidrólisis del fosfoaspartato, el regulador fosforilado es poco estable y eso sería aprovechado por estos sistemas para producir efectos transientes (Bourret *et al*, 1989).

Distintos sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes están ampliamente difundidos en los mecanismos regulatorios bacterianos. En la tabla 2 se detallan los más conocidos.

Como puede apreciarse, una única bacteria como por ejemplo, *E. coli*, posee varios sistemas regulatorios de dos componentes que le permiten adaptarse a diferentes estímulos externos. Si las señales se transmitiesen por medio de un segundo mensajero común, habría una gran probabilidad de interferencias.

ESPECIE	SENSOR		REGULADOR		FUNCION
	Proteína	Localización	Proteína	Transcripción	
<i>E. coli-S. typhimurium</i>	Che A	citoplasma	Che B Che Y	NO NO	Quimiotaxis
<i>Rhizobium meliloti</i>	Ntr B	citoplasma	Ntr C	SI	Asimilación de N ₂
<i>Escherichia coli</i>	Env Z	membrana	Omp R	SI	Expresión de porinas
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Vir A	membrana	Vir G	SI	Transformación de plantas
<i>Escherichia coli</i>	Pho M Pho R	membrana ? membrana ?	Pho P	SI	Asimilación de fosfatos
<i>Rhizobium meliloti</i>	Fix L	membrana ?	Fix J	SI	Fijación de N ₂
<i>Bacillus subtilis</i>	Deg S	citoplasma ?	Deg U	SI	Enzimas degradativas
<i>Bacillus subtilis</i>	Kin A	membrana	Spo OA Spo OF Spo OB	SI NO NO	Esporulación

Es por ello que los sistemas de transferencia de fosfatos entre el sensor y el regulador son ventajosos, ya que permiten utilizar un mecanismo común que cuenta con las necesarias diferencias para asegurar la especificidad de cada señal y su efecto (Stock, 1987). Sin embargo, hay similitudes suficientes como para que haya interacción entre miembros de distintas vías en condiciones anormales (Ninfa *et al*, 1988), habiéndose demostrado fosforilaciones de reguladores por sensores de otros sistemas *in vitro*. Además, esto también podría ocurrir *in vivo*; hay casos en los que el fenotipo de una célula que tiene una mutación en un sensor

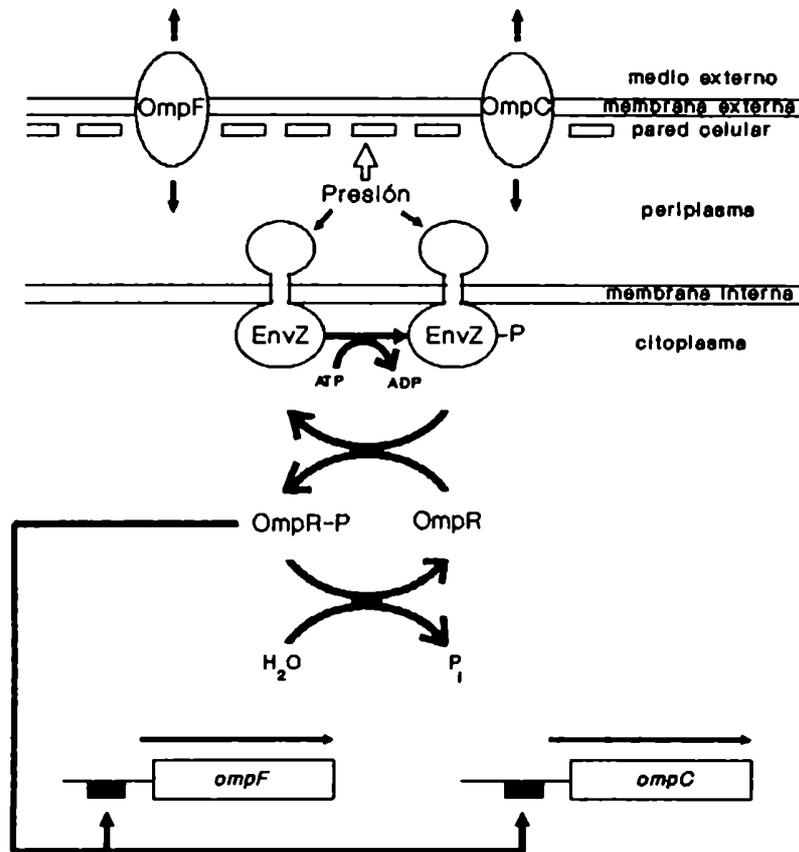
puede interpretarse como el resultado de un bajo nivel de interconexión entre pares de sensorregulador inapropiados (Ronson *et al*, 1987).

Expresión de porinas

Un ejemplo clásico de sistema de dos componentes es el del sistema que regula la expresión de porinas en *E. coli*.

Las células de *E. coli* están compuestas por dos compartimentos, periplasma y citoplasma, delimitados por la membrana externa y la pared celular, por un lado, y por la membrana interna, por otro (Stock *et al*, 1989). El complejo membrana externa-pared celular es rígido y permite soportar la presión osmótica del medio; posee además, canales formados por homotrímeros de porina que permiten el intercambio con el entorno (Nikaido y Vaara, 1985). Las dos porinas principales de *E. coli* son los productos de los genes OmpF y OmpC; los niveles de estas porinas están regulados en respuesta a varios parámetros ambientales, como osmolaridad del medio, temperatura, fuentes de carbono, etc. (Lugtenberg *et al*, 1976). La regulación es llevada a cabo a nivel transcripcional por dos genes que forman el locus OmpB y son los denominados OmpR y EnvZ (Hall y Silhavy, 1981).

En la figura 9 se detalla el funcionamiento del sistema.



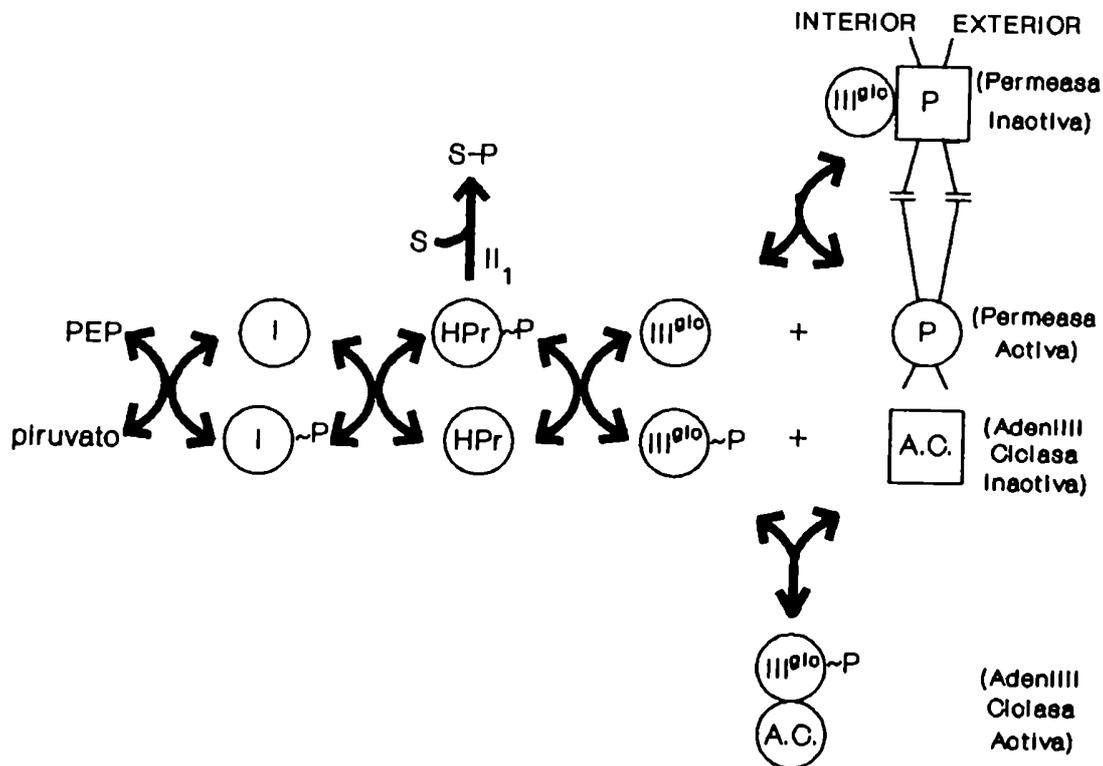
La proteína EnvZ es una proteína intrínseca de membrana que es capaz de sentir la presión del espacio periplasmático. Cumpliendo con su papel de sensor, se autofosforila en histidina y transfiere el fosfato a un aspartato de la proteína OmpR. Esta proteína fosforilada activa la transcripción de los genes que codifican para las proteínas OmpF y OmpC.

Sistema de fosfotransferasas dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS)

Este sistema se basa en la transferencia de un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) a una serie de proteínas que permiten la translocación de determinados carbohidratos, su fosforilación y la respuesta quimiotáctica correspondiente (Saier *et al*, 1990).

Mecanismo de acción

La cadena del PTS comprende habitualmente cuatro proteínas: HPr y la enzima I que son proteínas solubles encargadas del acoplamiento energético, y las enzimas II y III que se unen a membranas y son específicas para cada azúcar (Saier, 1989). Las fosforilaciones se producen en residuos histidina (Potsma y Lengeler, 1985). En la figura 10 se puede observar un modelo del mecanismo del PTS.



En *E. coli* y otras bacterias entéricas, la enzima III actúa como efector alostérico regulando la actividad de permeasas de carbohidratos, enzimas catabólicas, adenilil ciclasa y, probablemente, de reguladores transcripcionales. En bacterias Gram positivas, el PTS regula enzimas catabólicas y permeasas de carbohidratos por una fosforilación directa (Saier *et al*, 1990).

Además, algunos operones sufren la fosforilación directa de anti-terminadores transcripcionales, como es el caso de *E. coli* y *B. subtilis* (Amster-Choder *et al*, 1989).

Funciones mediadas por el PTS

Una de las funciones primordiales del PTS es la captación de carbohidratos específicos. Esta clase de transporte ocurre en forma de sistema vectorial que cataliza la translocación de los sustratos a través de la membrana. Además, al mismo tiempo que se produce su translocación, los carbohidratos son fosforilados por un proceso vectorial dependiente de PEP. De este modo, en el interior de la célula no hay carbohidratos libres (Potsma y Lengeler, 1985). Existe cooperatividad entre la unión del sustrato en la cara externa de la membrana y la unión de la enzima III (o la enzima II) en la cara interna, y esto representa un verdadero sistema de transducción de señales, ya que una limitada cantidad de la enzima permite la regulación alostérica de numerosos sistemas (Saier, 1989).

Además, estos carbohidratos tienen un efecto quimiotáctico sobre la bacteria. Esta señal no se transduce por medio del sistema cheA-cheY, sino que implica a las enzimas II o III del PTS (Lengeler *et al*, 1981). Debido a esto, la quimiorrecepción está muy ligada al proceso de translocación y fosforilación. La fosforilación reversible de estas enzimas es la señal para activar la vía

quimiotáctica. No se sabe si estas enzimas interactúan directamente con algún componente del sistema quimiotáctico cheA-cheY o ejercen su efecto por algún factor difusible.

Efectos regulatorios del PTS

El sistema PTS regula también la captación y el catabolismo; los efectos del PTS sobre estos procesos son conocidos como exclusión del inductor y represión catabólica.

En ausencia de sustratos del PTS, la transferencia de fosfatos desde el PEP se detiene en la enzima III; esta enzima fosforilada activa a la adenilil ciclasa y las permeasas para azúcares que no se transportan por el PTS están activas. En presencia de un sustrato del PTS, la enzima III transfiere el fosfato a dicho sustrato, por lo que no es capaz de activar la adenilil ciclasa. Además, la enzima defosforilada se une a las permeasas y las inactiva.

La inactivación de las permeasas es el fenómeno conocido como exclusión del inductor; la síntesis de las enzimas que catabolizan carbohidratos que no se transportan por el PTS es disparada por el AMPc de modo que, al disminuir el nivel de este nucleótido, disminuye la síntesis de esas enzimas, constituyendo el fenómeno denominado represión catabólica (Saier, 1989).

CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA DE LAS GTPasas

Características generales

Las proteínas que pertenecen a esta familia se distinguen por un diseño estructural y un mecanismo de activación comunes. Cada miembro constituye un *switch* preciso que cambia su afinidad por otras macromoléculas. La activación se produce por unión de GTP y la inactivación por hidrólisis del GTP a GDP; este mecanismo versátil permite a las distintas GTPasas amplificar señales transmembrana, dirigir la síntesis y translocación de proteínas, guiar el tráfico vesicular a través del citoplasma y controlar la proliferación y diferenciación de células animales.

Como blancos de mutaciones y toxinas microbianas, las GTPasas cumplen papeles importantes en la patogénesis del cáncer y de enfermedades infecciosas.

Las características enumeradas, hacen de las GTPasas un claro ejemplo del curso de la evolución que ha permitido obtener diversidad funcional a partir de un mecanismo y una estructura conservados (Bourne *et al*, 1990).

Los miembros más importantes de la familia son:

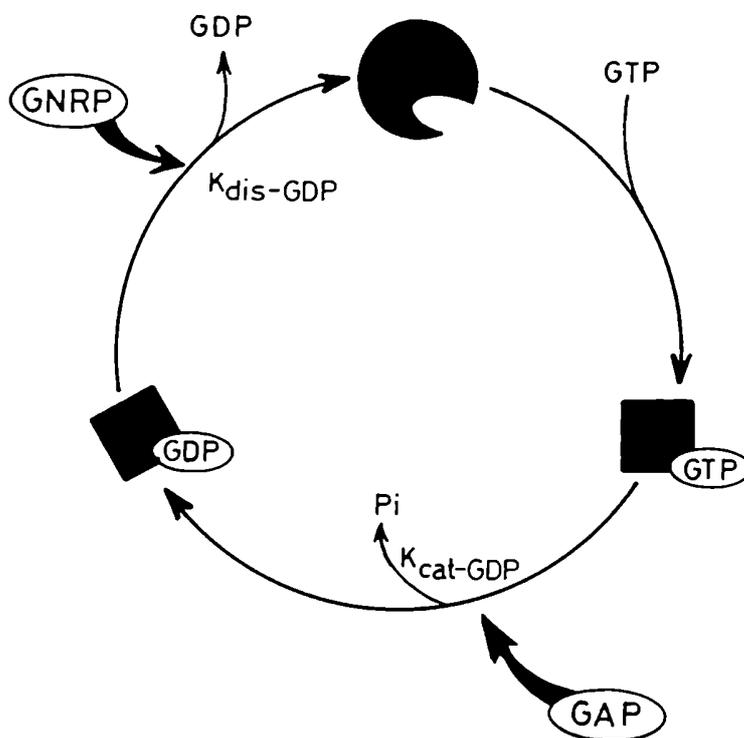
- 1) Los productos de los oncogenes y protooncogenes ras y proteínas relacionadas
- 2) GTPasas que participan en la síntesis ribosomal de proteínas cuyo ejemplo clásico es el factor de elongación bacteriano EF-Tu
- 3) Las subunidades α de las proteínas G, heterotrimeros que participan en la transducción de diversas señales.

El término GTPasa es el que mejor define a esta familia, ya que hace hincapié en la actividad bioquímica crucial de estas proteínas y, por lo tanto, ha sido acuñado recientemente (Bourne *et al*,

1990), dejándose de lado otras definiciones como proteínas que unen GTP. Con esta definición, se diferencia claramente a esta familia de otras proteínas, como por ejemplo, guanilil ciclasa o tubulina, cuyos mecanismos de acción y activación son diferentes.

Ciclo del GTP

El ciclo de las GTPasas, que se muestra en la figura 11, incluye tres estados conformacionales de la proteína. La liberación del GDP unido convierte al estado "inactivo" de la proteína en un estado "vacío" transiente. Bajo las condiciones normales del citoplasma, el GTP tiene mayor probabilidad de unirse que el GDP (por la diferencia en la concentración de uno y otro), y luego de este evento la proteína adquiere la conformación "activa" que por hidrólisis del GTP revierte a la forma inactiva.



La irreversibilidad de la hidrólisis del GTP hace que el ciclo sea unidireccional. La funcionalidad está dada por las diferentes capacidades para interactuar con macromoléculas específicas.

Para la mayoría de las GTPasas, la fracción de moléculas en la forma "activa" depende de las velocidades relativas de dos reacciones: a) disociación del GDP y b) hidrólisis del GTP. Esas velocidades están definidas, respectivamente, por dos constantes de velocidad, $K_{dis}.GDP$ y $K_{cat}.GTP$. La relación entre las formas unidas a GTP y GDP es:

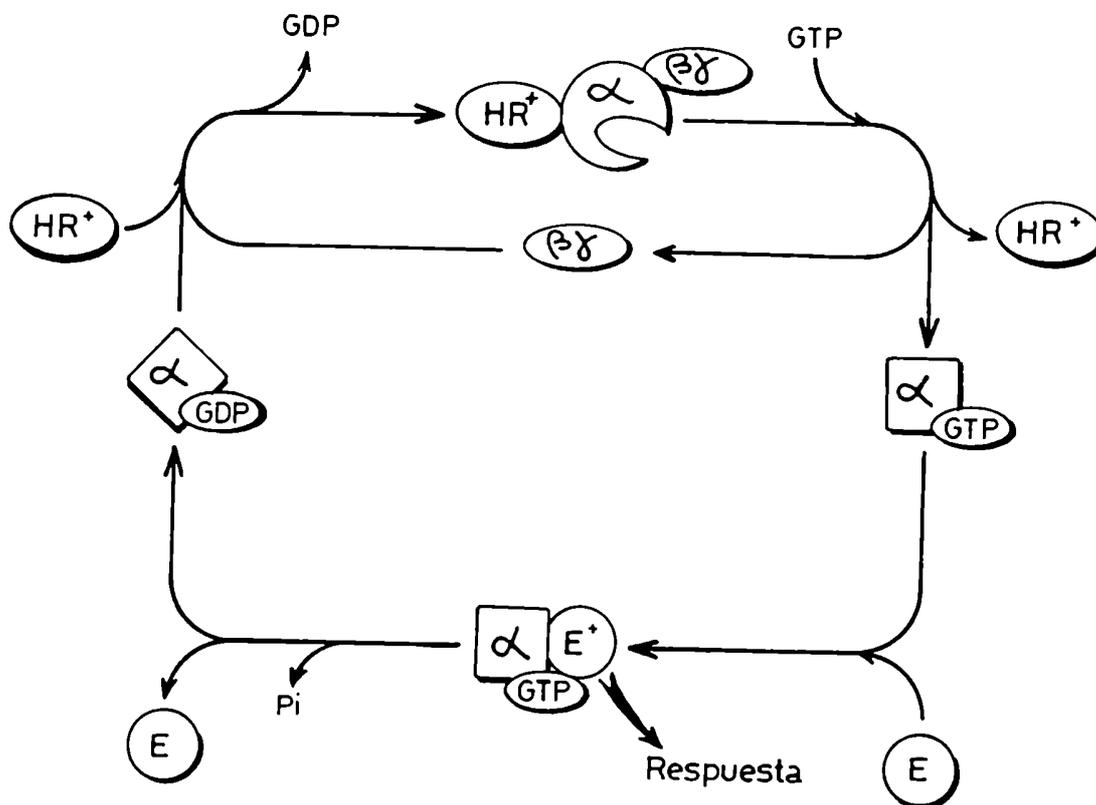
$$\frac{GTP_{asa}.GTP}{GTP_{asa}.GDP} = \frac{K_{dis}.GDP}{K_{cat}.GTP}$$

En casi todos los casos, estas constantes de velocidad son reguladas por proteínas específicas. Aquéllas que aumentan $K_{dis}.GDP$ se llaman proteínas intercambiadoras de nucleótidos (GNRPs), mientras que las que aumentan $K_{cat}.GTP$ se denominan proteínas activadoras de la GTPasa (GAPs)(Bourne *et al*, 1991).

Utilizando los ejemplos del factor de elongación bacteriano tu (EF-Tu) y de las proteínas G, se puede observar claramente las diferentes funciones que cumple el ciclo de las GTPasas. El ciclo del EF-Tu está esquematizado en la figura 12.

Una proteína intercambiadora de nucleótidos, EF-Ts, se une a la forma inactiva de EF-Tu y promueve la disociación de GDP. Luego, EF-Tu unido a GTP se disocia de EF-Ts y se une al aminoacil ARN de transferencia (ARNt) para formar un complejo que se une al ribosoma programado. La hidrólisis del GTP, promovida por el ribosoma, que actúa como GAP, sirve para controlar y mejorar la fidelidad de la traducción. Este proceso se conoce como prueba de lectura cinética y compara la duración de la interacción codón-anticodón con el tiempo requerido para la hidrólisis del GTP. En

Las proteínas G por su parte, utilizan el mecanismo para transducir señales a través de la membrana y su ciclo se esquematiza en la figura 13.



El receptor actúa como GNRP promoviendo la disociación del GDP de la subunidad α ; la unión del GTP produce la disociación del trímero $\alpha\beta\gamma$ del receptor y la separación de α -GTP del complejo $\beta\gamma$. El complejo α -GTP interactúa con el efector activándolo y la interacción termina por hidrólisis del GTP por una actividad GTPasa propia de la subunidad α . El complejo α -GTP se une a $\beta\gamma$ para reponer el estado "inactivo" de la proteína.

La actividad GTPasa está controlada en forma diferente en estos dos casos ya que hay requerimientos distintos para amplificar señales y para la lectura de prueba. En el caso del EF-Tu, el mecanismo requiere que la interacción con el ribosoma acelere por un factor mayor a 10^5 la K_{cat} .GTP intrínseca, que es muy baja; la actividad GTPásica actúa como un cronómetro y debe ser muy precisa para garantizar la eficiencia y la fidelidad de la traducción. Por eso el complejo EF.Tu activo-aminoacil ARNt tiene una duración determinada y por eso también, la hidrólisis del GTP debe ser tan estrictamente condicional y depender del ribosoma.

En el caso de las proteínas G, los requerimientos no son tan estrictos. La amplificación de la señal se produce usando una K_{cat} .GTP fija y esta actividad es propia de la proteína. La hidrólisis de GTP es mucho más lenta que en el caso del EF-Tu. Esta velocidad de hidrólisis de GTP es lo suficientemente lenta para amplificar la señal (ya que permite la interacción con más de una molécula del efector), y es lo suficientemente rápida para terminar con la transmisión del mensaje de modo de mantener las condiciones fisiológicas óptimas (Bourne *et al*, 1990).

Regiones implicadas en la unión del nucleótido

Se han identificado cinco regiones implicadas en la unión del nucleótido en distintos miembros de la familia (Halliday, 1984). Estas regiones, en especial las primeras cuatro, están muy conservadas y se les ha denominado ACEGI, contando desde el extremo amino terminal. El consenso A es GXXXXGK; el E amino de la lisina junto con hidrógenos de grupos amídicos de la cadena principal de varios aminoácidos forman puentes de hidrógeno con los fosfatos α y β .

La región C está definida por el consenso DXXG; el aspartato se une al Mg^{2+} a través de una molécula de agua, mientras que el protón amídico de la glicina forma un puente de hidrógeno con el fosfato γ .

La secuencia consenso E es una región muy hidrofóbica que precede a la región G. Esta región tiene la secuencia característica NKXD y participa en la unión de la guanina; la asparagina forma un puente de hidrógeno con el C8 de la base y el aspártico hace lo propio con el NH_2 de la posición 2 del anillo. La lisina forma puentes de hidrógeno con carbonilos de G y K del consenso A estabilizando la unión de la base.

La región I está definida en la familia ras por la secuencia TSA; la alanina está en contacto con la base y, dado que ese es el único punto de contacto, es posible que por eso sea difícil encontrar sus equivalentes en el resto de la familia. Sus homólogos serían la región TSAL (171-174) de EF-Tu y TCAVDT (366-371) en subunidades α de proteínas G.

PROTEINAS G

Características generales

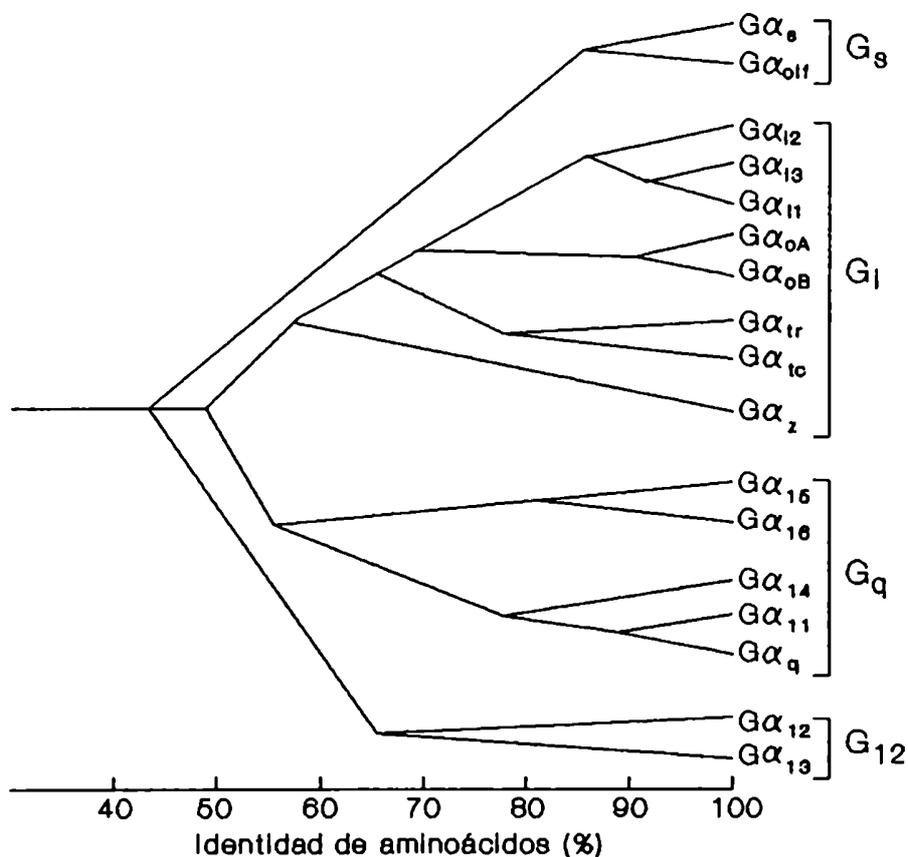
Las proteínas G son trímeros formados por subunidades α y el complejo $\beta\gamma$. Las subunidades α se caracterizan por un PM que oscila entre 39 y 54 kDa, y al producirse la activación se disocian del complejo $\beta\gamma$. Funcionalmente, el complejo $\beta\gamma$ es una unidad, aunque está formado por dos péptidos: la subunidad β con PM de 35-36 kDa y la subunidad γ cuyo PM se halla entre 8 y 10 kDa (Gilman, 1987).

Estos trímeros confieren al proceso de transducción de la señal dos características fundamentales: direccionalidad y amplificación (Heideman y Bourne, 1990). La direccionalidad está dada por la actividad GTPasa como ya se vio. Como consecuencia de dicha actividad, la reactivación requiere que haya una nueva interacción con el receptor, lo que diferencia este procesos del alosterismo. Existe una barrera de energía que impide la disociación espontánea del nucleótido, ya sea en la forma di o trifosfato. La amplificación ocurre por dos mecanismos: primero, la activación de un único receptor permite la activación de un número mucho mayor de proteínas G; segundo, cada subunidad α tiene una vida media en el estado activado que le permite interactuar con varias moléculas del efector.

Clasificación y función de las subunidades α

Gracias a las técnicas de clonado y secuenciación, se han identificado numerosas subunidades α en todos los organismos eucarióticos. Hay más de 30 miembros de esta familia clonados, y al alinearlos se observa que hay alrededor de un 20% de aminoácidos invariables (Lochrie y Simon, 1988), que son los implicados en la unión del nucleótido. Además, la conservación entre las distintas especies es muy alta. En base a la homología de la secuencia ami-

noacídica, en mamíferos se puede clasificar a las subunidades α en 4 grupos, según el detalle que se observa en la figura 14 (Simon *et al*, 1991).



La clase G_s presenta a α_s y α_{olf} . Ambas activan a la adenilil ciclase pero α_{olf} está restringida a tejidos neuronales específicos y su función sería participar en la transducción de señales olfatorias (Jones y Reed, 1989). α_s es ADP ribosilable por la toxina

de *Vibrio cholerae* (CT) (Northup *et al*, 1980), y también es capaz de activar canales de Ca^{2+} (Brown y Birnbaumer, 1988; Mattera *et al*, 1989).

La clase G_i tiene los siguientes miembros: α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} , α_{oa} , α_{ob} , α_{tc} , α_{tr} y α_z . Todas estas subunidades α , excepto α_z , son ADP ribosiladas por toxina de *Bordetella pertussis* (PT). Las tres α_i son muy homólogas entre sí y su función es inactivar a la adenilil ciclasa (Bokoch *et al*, 1984) y activar canales de K^+ atriales (Yatani *et al*, 1988). Las dos α_o abundan en cerebro (Asano *et al*, 1987). Si bien no se sabe con exactitud qué funciones cumplen, distintos experimentos indican que actuarían en los siguientes procesos: acople de receptores quimioattractantes y fosfolipasa C (Kikuchi *et al*, 1986), activar canales de Ca^{2+} (Hescheler *et al*, 1987) y de K^+ (Van Dongen *et al*, 1988), y acople con receptor adrenérgico α_2 (Cerione *et al*, 1986). Las α_t forman parte de la transducina de conos (c) y bastones (r), activan la fosfodiesterasa de GMP cíclico de la retina permitiendo que ocurra el fenómeno de la visión (Stryer, 1986). Ambas son ADP ribosilables por C.T. y P.T. La subunidad α_z tiene semejanzas con la familia α_i pero tiene rasgos propios: además de no ser modificable por P.T., presenta muy baja velocidad de intercambio y de hidrólisis de GTP (Casey *et al*, 1990). Se ha postulado que podría regular PLC (Cockroft, 1987), e inhibir canales de K^+ por acción de sustancia P (Nakajima *et al*, 1988).

La familia G_q incluye a α_q , α_{11} , α_{14} , α_{15} y α_{16} . Las dos primeras tienen alta homología y están ampliamente difundidas en distintos tejidos (Strathmann y Simon, 1990); difieren en la región de interacción con $\beta\gamma$, por lo que generarían señales con diferentes constantes de tiempo y diferentes especificidades de receptor (Simon *et al*, 1991). Las tres formas restantes están restringidas a algunos tejidos solamente y cumplirían funciones similares. El papel preponderante de esta familia es activar fosfolipasa C y

son insensibles a PT (Smrcka *et al*, 1991). Dado que se ha detectado efecto de esta toxina sobre la actividad de la enzima mencionada, se ha postulado la existencia de otra proteína G, sensible a PT que activaría PLC (Ohta *et al*, 1985) denominada G_{PLC}. Esto implica que algunas isoformas de PLC se activarían por proteínas G sensibles a PT, otras por proteínas G insensibles a dicha toxina y otras que responderían a p21^{ras}.

La clase G₁₂ está formada por α_{12} y α_{13} ; ambas son ubicuas y serían resistentes a PT (Parks y Weischaus, 1991). Aún no se conoce las funciones que cumplen.

Además, por distintos experimentos se ha postulado que debe existir G_s, una proteína G asociada a la exocitosis; actuaría activando PLC o produciendo algún otro segundo mensajero para producir el efecto (Barrowman *et al*, 1986), pero aún no se ha confirmado su existencia.

Además de mamíferos, se ha detectado la existencia de proteínas G en plantas. Por ensayos bioquímicos e inmunológicos se detectó una proteína G en hojas de alfalfa que estaría vinculada a fitocromo (Muschietti *et al*, 1991). Por otro lado, en *Arabidopsis thaliana* se clonó una subunidad α (GPA₁) que tiene un 73% de homología con α_{13} (Ma *et al*, 1990).

Además, se han identificado proteínas G en eucariotes inferiores que mantienen las características halladas en organismos superiores. En *Saccharomyces cerevisiae*, se encontraron dos subunidades α denominadas SCG₁ y SCG₂ (Dietzel y Kurjan, 1987; Nakafuku *et al*, 1988). Como se vio en otra sección, participan en la respuesta a feromonas.

En *Dictyostelium discoideum* se clonaron dos genes que codifican para subunidades α : α_1 y α_2 (Devreotes, 1989). Estarían acopladas a receptores guimiotácticos participando en los fenómenos de agregación celular y diferenciación (Firtel *et al*, 1989).

También se ha detectado en *Trypanosoma cruzi* la presencia de al menos una proteína G. Esto se logró por medio de técnicas bioquímicas e inmunológicas (Coso *et al*, 1991) y por reconstituciones heterólogas (Eisenschlos *et al*, 1986a).

También se han reportado subunidades α en *Caenorhabditis elegans* (Lochrie *et al*, 1991) y en *Drosophila melanogaster* (Quan *et al*, 1989).

En general, las subunidades α de eucariotes inferiores tienen entre un 60 y un 75% de homología con sus equivalentes en mamíferos, lo que indica una alta conservación durante la evolución para mantener la función de estas proteínas.

Características y funciones del complejo $\beta\gamma$

En mamíferos se han encontrado cuatro isotipos de subunidades β (Levine *et al*, 1990; Simon *et al*, 1991). Comparten más del 80% de homología y cada isotipo presenta una secuencia aminoacídica idéntica en distintos organismos, hecho que estaría indicando una conservación de la función. De las cuatro isoformas, tres están ampliamente difundidas en los distintos tejidos, mientras que la variante β_4 es abundante en cerebro y pulmón.

La subunidad γ ha presentado dificultades para su estudio, ya que se tiñe poco y es difícil de localizar en geles (Hildebrandt *et al*, 1984). Por técnicas electroforéticas, inmunológicas y de secuenciación de proteínas, se demostró su diversidad (Roof *et al*, 1985; Hildebrandt *et al*, 1985). Se han detectado dos isotipos en

retina (Van Dop *et al*, 1984; Fukada *et al*, 1989), y al menos otros cuatro en otros tejidos (Giulian y Graham, 1988; Gautam *et al*, 1989).

Las subunidades γ presentan la secuencia C-A-A-X (donde C es cisteína, A un aminoácido alifático y X cualquier aminoácido), en la región carboxilo terminal. Esta región es idéntica a la que aparece en proteínas ras, laminas nucleares, factor a de *mating* de levaduras, etc. (Rine y Kim, 1990). Esta secuencia ha sido denominada *CAAX box* y en los ejemplos citados permite que las proteínas sufran una serie de modificaciones post-traduccionales y se asocien a membranas. Se ha demostrado que las subunidades γ sufren esas modificaciones (Fukada *et al*, 1990), excepto γ_1 de retina. En ese tejido, el complejo $\beta\gamma_2$ aumenta la unión de GTP a α_t 30 veces más que $\beta\gamma_1$ y que α_t .GDP tiene mucho más afinidad por $\beta\gamma_2$ (Ohguro *et al*, 1990). Todo esto indicaría que, en este caso, las modificaciones post-traduccionales en la secuencia C-A-A-X estarían relacionadas con la interacción entre el complejo $\beta\gamma$ (que sería activo sólo al ser modificado) y α_t y no con el anclaje a membranas como se había postulado (Fukada *et al*, 1990).

La función más conocida del complejo $\beta\gamma$ es atenuar la acción de las subunidades α (Neer *et al*, 1987; Cerione *et al*, 1987). Sin embargo, se han detectado otras funciones para este complejo. Dado que el intercambio de nucleótidos en la subunidad α se produce en forma eficiente sólo en presencia del receptor activado y de $\beta\gamma$, y que la adición de $\beta\gamma$ libre a α_i o α_o acelera el intercambio aunque en presencia de receptor el intercambio aumenta aún más (Higashijima *et al*, 1987), se ha postulado que $\beta\gamma$ cumpliría el papel de intercambiador, mientras que el receptor regularía la función de $\beta\gamma$ (Heideman y Bourne, 1990).

Además, se han reportado efectos directos de $\beta\gamma$ sobre efectores. Así, se reportó que $\beta\gamma$ activa a la fosfolipasa A₂ de retina para producir ácido araquidónico y que α_t inhibe dicho efecto (Jelsema

y Axelrod, 1987). También se vio que $\beta\gamma$ activa canales de K^+ de corazón en concentraciones nanomolares (Logothetis *et al*, 1987), aunque el mismo efecto se observó utilizando concentraciones picomolares de α_i (Codina *et al*, 1987).

Estos resultados desataron polémicas entre los laboratorios involucrados. Sin embargo, por análisis genéticos de *Saccharomyces cerevisiae* se demostró que el mecanismo de recepción de la señal provocada por feromonas, ya visto en secciones anteriores, requiere que las subunidades β y γ producidas por los genes STE4 y STE18 sean funcionales. Más aún, deleciones en el gen que codifica para la subunidad α (SCG1) potencian el efecto de la feromona (Whiteway *et al*, 1989). Esto indica que el complejo $\beta\gamma$ es el encargado de activar al efector y la subunidad α jugaría un papel inhibitorio.

Por lo tanto, el complejo $\beta\gamma$ cumpliría las siguientes funciones:

- a) Estabilizar la interacción de las subunidades α con los receptores, tal vez induciendo la formación de complejos apropiados con cinéticas de activación específicas
- b) Modular los efectos de las subunidades α activadas
- c) Regular, al menos indirectamente, la actividad de canales y fosfolipasas

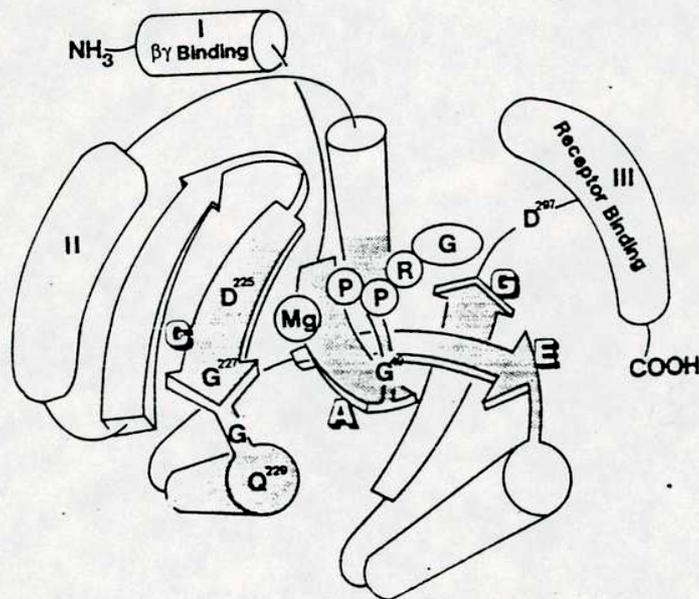
La diversidad de las subunidades β y γ , las modificaciones que sufren las últimas, la interacción con distintas subunidades α , sugieren que el complejo $\beta\gamma$ es importante en el establecimiento de asociaciones específicas con receptores y en la integración de diversas vías mediadas por proteínas G.

Relación estructura-función de las subunidades α

La comparación de regiones conservadas de la secuencia de subunidades α con otras GTPasas, la construcción de quimeras, la modificación por toxinas bacterianas y ensayos de mutagénesis dirigida, han permitido postular una estructura tridimensional de estas proteínas y detectar las regiones funcionalmente importantes.

Tomando como base las secuencias consenso de Halliday (Halliday, 1984) se alinearon las secuencias de subunidades α con las del EF-Tu y p21^{ras} y se obtuvo una secuencia " α promedio" (Masters *et al*, 1986). Además, teniendo en cuenta la estructura tridimensional del EF-Tu (Jurnak, 1985) se postuló la estructura para la subunidad " α promedio" que se muestra en la figura 15.

Al hacer la predicción de la estructura basándose en la obtenida para p21^{ras} (deVos *et al*, 1988), se obtuvo un resultado idéntico (Holbrook y Kim, 1989).



nilil ciclasa, siendo esenciales los residuos 325-336 (Osawa *et al*, 1990b).

El extremo amino terminal es la zona de contacto con el complejo $\beta\gamma$. La proteólisis de este extremo impide la unión de la subunidad α con $\beta\gamma$ (Neer *et al*, 1988).

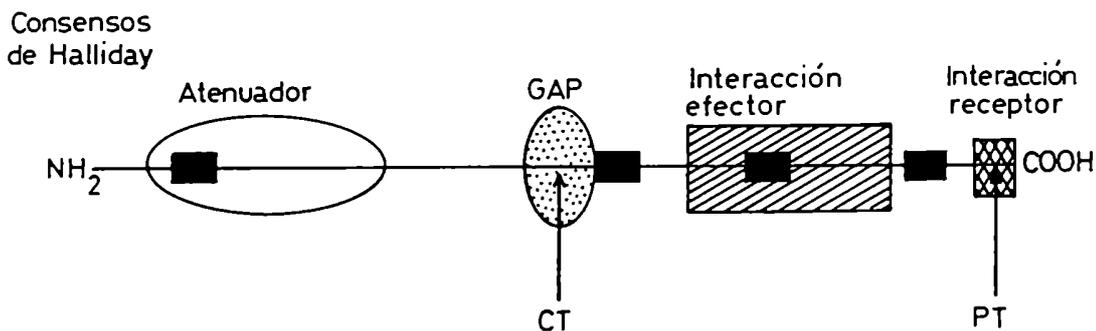
'La región de contacto con los receptores se encuentra en el extremo carboxilo terminal, tal como se deduce de varias evidencias:

La ADP ribosilación por toxina *pertussis* (PT) se produce en una cisteína ubicada 4 aminoácidos antes del extremo carboxilo terminal y su efecto es bloquear la respuesta a los receptores activados (West *et al*, 1985)

Anticuerpos dirigidos contra el carboxilo terminal bloquean la interacción con receptores (Cerione *et al*, 1988)

Se determinó por medio de quimeras que el carboxilo terminal es el responsable de la especificidad de la interacción con el receptor (Masters *et al*, 1988)

Teniendo en cuenta todos estos datos, se ha postulado el modelo que se observa en la figura 17 con los dominios funcionales de las subunidades α (Osawa *et al*, 1990b).



Como se ve, se puede considerar a estas subunidades como dos mitades; una de ellas, la que contiene el amino terminal con una función atenuadora y la otra, que posee el carboxilo terminal con una función activadora.

Finalmente, si se considera la organización espacial de la proteína, se ve que los extremos deben ubicarse muy cerca uno del otro. Esto concuerda con el efecto de $\beta\gamma$ sobre la interacción receptor-subunidad α . Además, otro dato que refuerza este modelo es el requerimiento del complejo $\beta\gamma$, que interactúa con el amino terminal, para el efecto de la toxina *pertussis* que actúa sobre el carboxilo terminal (Tsai *et al*, 1984). También se requiere que ambos extremos sean funcionales para el efecto de la toxina de cólera (Osawa *et al*, 1990b). Por lo tanto, desde el punto de vista tridimensional, se puede considerar a las subunidades α como un núcleo que tiene la capacidad de unir el nucleótido y propiedades efectoras y atenuadoras, y cuya función es regulada por los dos extremos.

Organización de los sistemas de transducción mediados por proteínas G

En un mismo tipo de células hay varias subunidades α distintas y, dada la intercambiabilidad de los complejos $\beta\gamma$, existe la posibilidad de varias combinaciones de subunidades. Estas relaciones combinatoriales podrían regular la interacción del receptor con la proteína G y la cinética de activación de la respuesta (Simon *et al*, 1991). También se ha postulado que existiría una compartimentalización de los diferentes trímeros (Strittmatter *et al*, 1990). Además, los distintos complejos $\beta\gamma$ tienen afinidad diferencial con las diferentes subunidades α (Casey *et al*, 1989b).

Todo esto contribuye a que se formen complicados circuitos de transducción de señales con capacidad para interactuar entre sí. Esta sería una explicación para la multifuncionalidad de las sub-

unidades α ; cada una de ellas es capaz de activar distintos efectores (canales, adenilil ciclase, etc.), y podrían servir como núcleo de coordinación de diferentes vías.

La posibilidad de interconexión requiere la existencia de mecanismos de control. Uno de ellos parece ser un mecanismo de control por *feed back* mediado por fosforilaciones. Este tipo de mecanismo ha sido observado en *Dictyostelium discoideum* (Stone y Reed, 1990). Incluso se ha reportado la interacción de proteínas G con ras (Yatani *et al*, 1990).

A partir de estos datos puede deducirse el papel fundamental que cumplen estas proteínas en la coordinación e integración de información.

PROTEINAS RAS

Consideraciones generales

Las proteínas ras son miembros de la familia de las GTPasas (Barbacid, 1987), que se distinguen de las subunidades α de proteínas G por las siguientes características:

- No interaccionan con subunidades $\beta\gamma$
- No son ADP ribosilables por toxinas de *cólera* o *pertussis*
- Su peso molecular oscila entre 21000 y 24000

La última característica las diferencia también de los factores de iniciación y elongación de la síntesis proteica, ya que mientras las proteínas ras tienen alrededor de 200 aminoácidos, los factores citados tienen entre 400 y 900.

Las proteínas ras parecen ser muy ubicuas en eucariotes y se las puede encontrar en forma proto-oncogénica u oncogénica. Esta última es capaz de transformar no sólo líneas celulares sino que se la ha encontrado en tumores de diversos órganos. Debido a esto, estas proteínas han sido estudiadas intensamente en los últimos años.

Características de los genes ras

Los genes ras fueron identificados como los responsables de la transformación mediada por cepas del virus de sarcoma de rata y de allí proviene su nombre: **Rat Sarcoma**. Se han detectado cuatro retrovirus que contienen genes ras: H-MSV (Harvey, 1964), K-MSV (Kirstein y Mayer, 1967), BALB-MSV (Aaronson y Barbacid, 1978) y Rasheed-MSV (Rasheed *et al*, 1978). Estos genes han sido clonados y secuenciados (Dhar *et al*, 1982; Tsuchida *et al*, 1982; Rasheed *et al*, 1983; Reddy *et al*, 1985).

En mamíferos se han hallado tres genes ras: H-ras1, K-ras2 y N-ras. Este último es el único que no ha sido transducido por retrovirus y se lo aisló de una línea celular de neuroblastoma (Shimizu *et al*, 1983). Además, se detectaron dos pseudogenes: N-ras2 y K-ras1 (Barbacid, 1987).

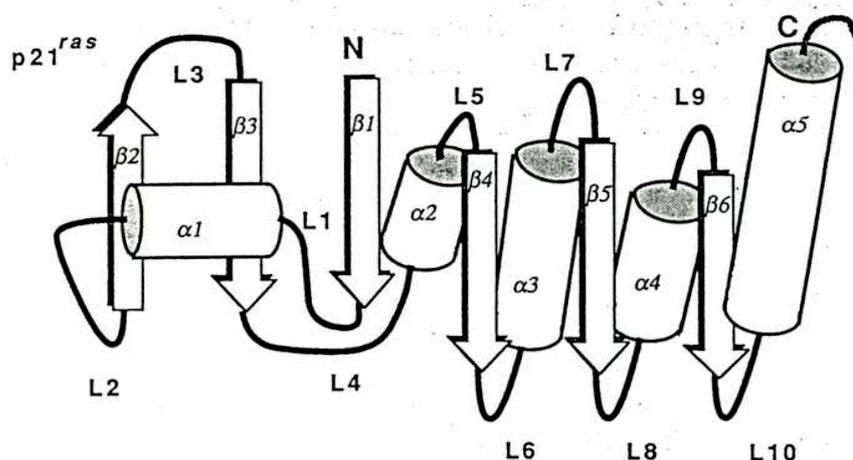
La región codificante comprende cuatro exones salvo K-ras2 que tiene dos formas alternativas para el exón 4 y produce dos proteínas isomorfas de 188 y 189 aminoácidos (Barbacid, 1987). Presentan además, un quinto exón en la región 5' no codificante (Ishii *et al*, 1985). Los exones están muy conservados, lo que sugiere que existió un gen ancestral común, mientras que los intrones son muy divergentes, por lo que las longitudes son diferentes.

Los promotores no presentan las secuencias TATA y CAAT que aparecen en la mayoría de los genes eucarióticos; presentan, en cambio, zonas ricas en GC que probablemente son reconocidas por el factor spl, característico de genes de mantenimiento celular (Ishii *et al*, 1986).

Estructura tridimensional de las proteínas ras

A partir de la obtención de la estructura cristalina del EF-Tu (Jurnak, 1985; McCormick *et al*, 1985), se esbozaron modelos para la estructura tridimensional de las proteínas ras. Para ello se aprovechó la existencia de secuencias conservadas que participan en la unión del nucleótido y estos modelos demostraron ser acertados cuando se logró cristalizar al producto de c-H-ras unido a GDP (DeVos *et al*, 1988).

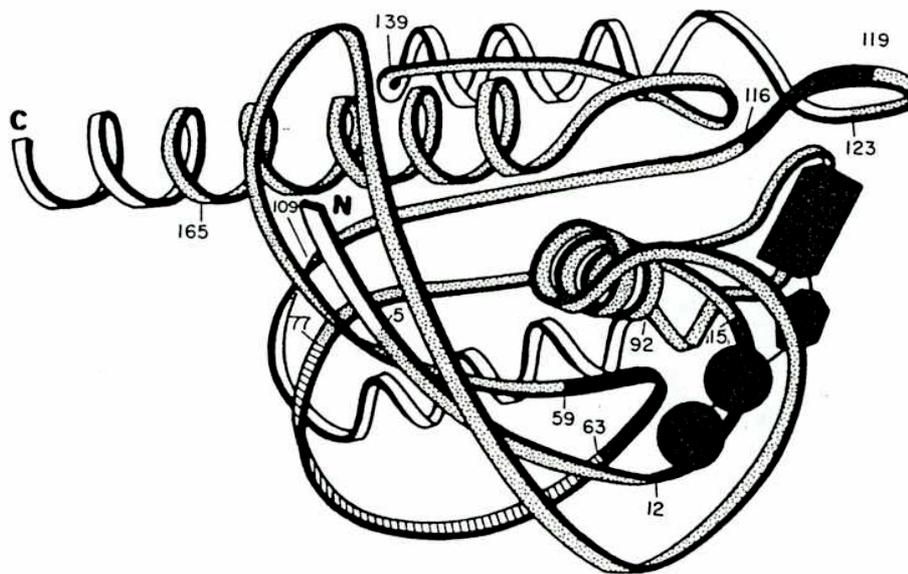
El dominio catalítico constituye una unidad formada por una hoja β enrollada en el centro, que está rodeada por α hélices. En la figura 18 se observa un diagrama con la estructura topológica de la proteína.



La proteína está formada por seis cadenas β ubicadas en forma paralela, excepto la $\beta 2$ que es anti-paralela, y por cinco α hélices. Estos dos tipos de cadenas están conectados por diez *loops*.

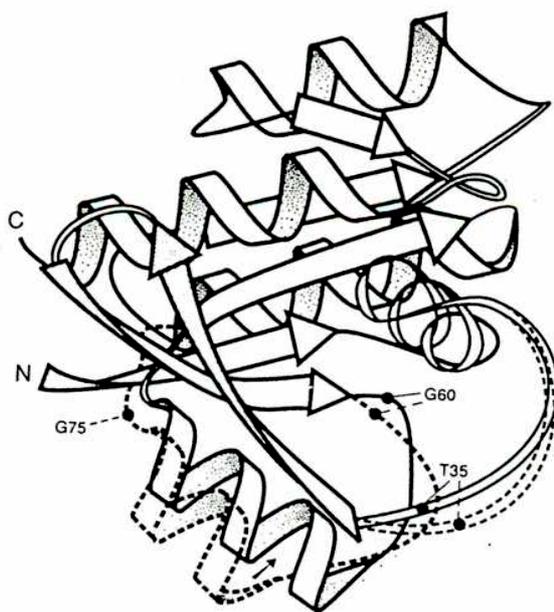
La estructura cristalina fue obtenida a una resolución de 2,7 A. Con esta resolución fue posible trazar el esqueleto polipeptídico y, además, aproximar la orientación del átomo $C\beta$ y distinguir algunas cadenas laterales de aminoácidos. El esqueleto polipeptídico obtenido es el que se muestra en la figura 19.

En el esquema de la figura 19 se observa que el nucleótido interacciona con una especie de "bolsillo" formado por los *loops* L1, L2, L7 y L9. En estos *loops* se ubican los aminoácidos de las secuencias A (unión de fosfatos), C (unión del Mg^{2+}) y G (unión de la base). Estas secuencias (fragmentos 12-15, 59-63 y 116-119) están remarcadas en el esquema, ya que las mutaciones por sustitución responsables de la activación oncogénica ocurren en ellas.



También se cristalizó una mutante oncogénica de c-Hras unida a GDP (Tong *et al*, 1989) en la que hay una sustitución de valina por glicina en la posición 12. Esto permitió comparar las estructuras tridimensionales de una forma proto-oncogénica con una oncogénica. La estructura general de la proteína transformante es muy similar a la de la normal; sólo se advierten diferencias en los *loops* L1, L2, L3 y L4 en la mitad amino terminal de la molécula: las mayores diferencias se producen en la región comprendida entre los aminoácidos 9 y 18 y, fundamentalmente, se deben a la pérdida de dos puentes de hidrógeno de los residuos 12 y 13 con el β -fosfato. Esto parece alterar la orientación de dicho fosfato que redundaría en una alteración de la velocidad de hidrólisis del GTP.

Finalmente, también se logró cristalizar proteínas ras unidas a análogos no hidrolizables de GTP, es decir que la proteína se cristalizó en su conformación activa. La cristalización se obtuvo originalmente a una resolución de 2,6 Å (Pai *et al*, 1989) y luego se la mejoró hasta lograr una resolución de 1,35 Å (Pai *et al*, 1990; Milburn *et al*, 1990). Las diferencias estructurales que se producen al intercambiar GDP por GTP se observan en las regiones que están en contacto con el γ fosfato e implican a la treonina 35 y la glicina 60 en especial, y también a la glicina 10 y la alanina 11. Todo esto resulta en dos regiones que muestran cambios conformacionales notorios entre un estado y otro (Jurnak *et al*, 1990). Una abarca la región comprendida entre los aminoácidos 30 y 38, y la otra envuelve al fragmento que se extiende entre los residuos 60 y 76. La figura 20 muestra las diferencias entre ambas estructuras.



Ambas regiones aparecen en la superficie de la molécula y son vecinas. Todo esto hace que sean sitios potenciales de interacción con otras proteínas (Milburn *et al*, 1990). Teniendo en cuenta la posición del carboxilo terminal que es la región que se une a la membrana, el fragmento 60-76 queda orientado precisamente hacia la membrana, mientras que la otra región que presenta cambios conformacionales queda orientada hacia el citoplasma. Por lo tanto, el mecanismo de activación de la proteína supondría la interacción con alguna proteína de membrana o asociada a ella, que facilite el intercambio de GDP por GTP por medio de un cambio conformacional en esa zona que luego se transmitiría a la otra región para producir un nuevo cambio conformacional que permita la interacción con algún efector citoplasmático.

Propiedades bioquímicas. Unión e hidrólisis de GTP

Como ya se ha visto, las proteínas ras pertenecen a la familia de las GTPasas y poseen, por lo tanto, la propiedad de unir e hidrolizar GTP.

In vitro, proteínas ras purificadas exhiben bajas velocidades de disociación de GDP e hidrólisis de GTP (John *et al*, 1988; Neal *et al*, 1988), lo que implica la existencia de proteínas que catalizan el intercambio de nucleótidos (GNRPs) y de proteínas que estimulan la actividad GTPásica (GAPs). Las mutaciones oncogénicas pueden afectar cualquiera de estas dos fases del proceso de activación de las p21^{ras}. Se ha demostrado la existencia de mutantes con capacidad de interactuar con GAP pero que impiden el aumento de K_{catGTP} por dicha proteína (Sato *et al*, 1987; McCormick, 1989b) y se las ha encontrado en tumores humanos. Otra clase de mutantes exhiben un aumento de la $K_{dis.GDP}$ que redundaría en una mayor proporción de la forma unida a GTP (Walter *et al*, 1986; Feig

y Cooper, 1988). Si bien no se hallaron mutantes de esta clase en tumores, se ha comprobado su capacidad de transformar líneas celulares.

Se ha identificado en mamíferos proteínas que favorecen el intercambio de GDP por GTP, denominadas GDS (West *et al*, 1990; Wolfman y Macara, 1990; Downward *et al*, 1990), y también se reportó la existencia de una proteína llamada GDI que desfavorece dicho intercambio (Fukumoto *et al*, 1990). En *S. cerevisiae* se ha hallado también una proteína que actúa como GDS; dicha proteína es el producto del gen CDC 25 y se la ha identificado por experimentos genéticos (Powers *et al*, 1989) y bioquímicos (Jones *et al*, 1991). En *Schizosaccharomyces pombe*, el producto del gen Ste 6 tiene homología con CDC 25 y cumpliría la misma función (Hughes *et al*, 1990). También se ha encontrado en *S. cerevisiae* una proteína que actúa como GDI y es el producto del gen MSI 1 (Ruggieri *et al*, 1989).

Estas proteínas producirían al interactuar con p21^{ras} un cambio conformacional que permite el intercambio de nucleótidos que espontáneamente ocurre muy lentamente. La velocidad de hidrólisis del GTP unido, también es baja en ausencia de proteínas estimulantes y esto se ha podido explicar analizando la estructura cristalina de la proteína. La glutamina 61 sería, a través de su oxígeno carbamílico, la encargada de activar una molécula de agua que produce el ataque nucleofílico sobre el γ fosfato (Pai *et al*, 1990). Existen otras evidencias que le asignan a esa glutamina un papel clave en la actividad GTPásica endógena:

- a) Está muy conservada en las proteínas "ras-relacionadas", excepto en los productos de los genes rap (Pizon *et al*, 1988; Kitayama *et al*, 1989)
- b) Las proteínas rap tienen treonina en la posición 61 y su actividad GTPásica es menor a la de las proteínas ras (Frech *et al*, 1990).

- c) La sustitución de la glutamina 61 por cualquier otro aminoácido reduce la actividad GTPásica de p21^{ras} e impide su activación por GAP (Der *et al*, 1986; Vogel *et al*, 1988).

La baja actividad GTPásica podría explicarse por el hecho de que esta glutamina podría tener diferentes orientaciones y sólo una de ellas sería capaz de activar la molécula de agua (Bourne *et al*, 1991). Según esta explicación, la función de la proteína que estimula la GTPasa (GAP) sería estabilizar la conformación en la forma más favorable para que ocurra la hidrólisis del GTP. Comparando con G α , se observa que la glutamina 61 equivale a la glutamina 227, que es importante para la actividad GTPásica. El otro residuo importante, como ya se vio, es la arginina 201. La posición equivalente en p21^{ras} es la de la tirosina 32. Esta tirosina cambia de orientación al unirse al GTP, pero difiere mucho de una glutamina, por lo que es probable que sirva para interactuar con GAP que aportaría la función restante, ya que posee una arginina equivalente a la 201, que podría estabilizar la orientación de la glutamina.

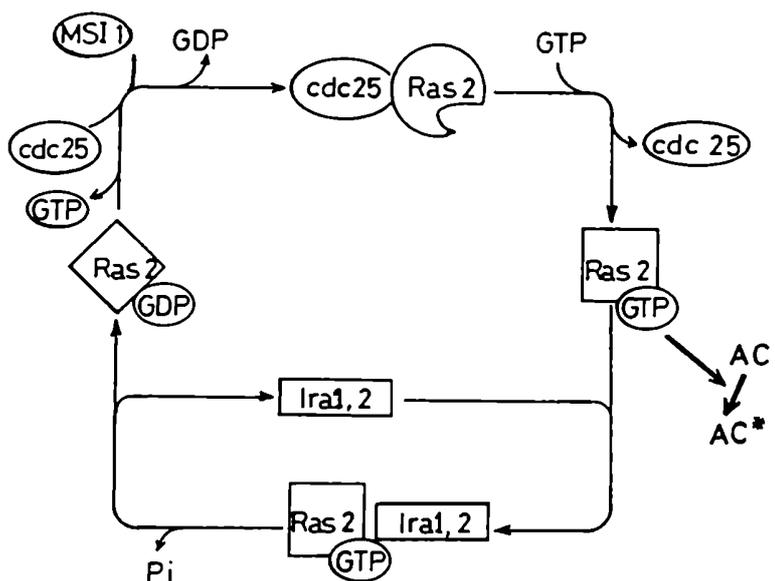
La proteína activadora de la GTPasa de p21^{ras} ha sido denominada GAP (McCormick, 1990). Se la detectó en el citosol de ovocitos de *Xenopus* (Trahey y McCormick, 1987), y luego en cerebro bovino (Gibbs *et al*, 1988). El gen responsable fue clonado (Trahey *et al*, 1988; Vogel *et al*, 1988), y se determinó que hay dos formas de la proteína: el tipo I, que es una proteína de 125 kDa que se expresa en todos los tejidos y el tipo II, que tiene 95 kDa y se obtiene por *splicing* alternativo (Trahey *et al*, 1988), y ha sido detectada en placenta (Halenbeck *et al*, 1990). GAP es una proteína citosólica pero cuando hay estimulación por factores de crecimiento como PDGF se fosforila y se transloca a la membrana (Molloy *et al*, 1989; Kaplan *et al*, 1990). Se advierten dos regiones estructurales en la proteína: una región carboxilo terminal que es suficiente para estimular la actividad GTPasa de p21^{ras}

(Marshall *et al*, 1989) y una región amino terminal que presenta secuencias SH2 y SH3. Estas son secuencias regulatorias que aparecen en quinasas de tirosina que no son receptores (*src*, *fps*, *abl*, etc.), en fosfolipasa C- γ y en el oncogen *crk* (Koch *et al*, 1991), y cuya función sería permitir la interacción de las proteínas portadoras de estos consensos.

También se han identificado proteínas similares a GAP en eucariotes inferiores. *S. cerevisiae* presenta las proteínas IRA 1 e IRA 2 (Tanaka *et al*, 1989; 1990) que cumplirían la función de GAP. GAP de mamíferos es capaz de reemplazar la función de estas proteínas en levaduras mutantes (Ballester *et al*, 1989).

Los datos analizados muestran claramente que GAP actúa como regulador negativo de p21^{ras}. Más aún, la sobreexpresión de GAP suprime la transformación neoplásica inducida por una p21^{ras} activada (Zhang *et al*, 1990).

Tomando como ejemplo a *S. cerevisiae*, donde se ha identificado el mayor número de proteínas que interaccionan con ras, el ciclo de activación de estas proteínas seguirá el modelo que se observa en la figura 21.



Dominios funcionales

Las proteínas ras presentan varios dominios funcionales. Además de las regiones ACEGI, que como ya se vio, participan en la unión del nucleótido, se han reconocido cuatro dominios más, que son importantes desde el punto de vista funcional:

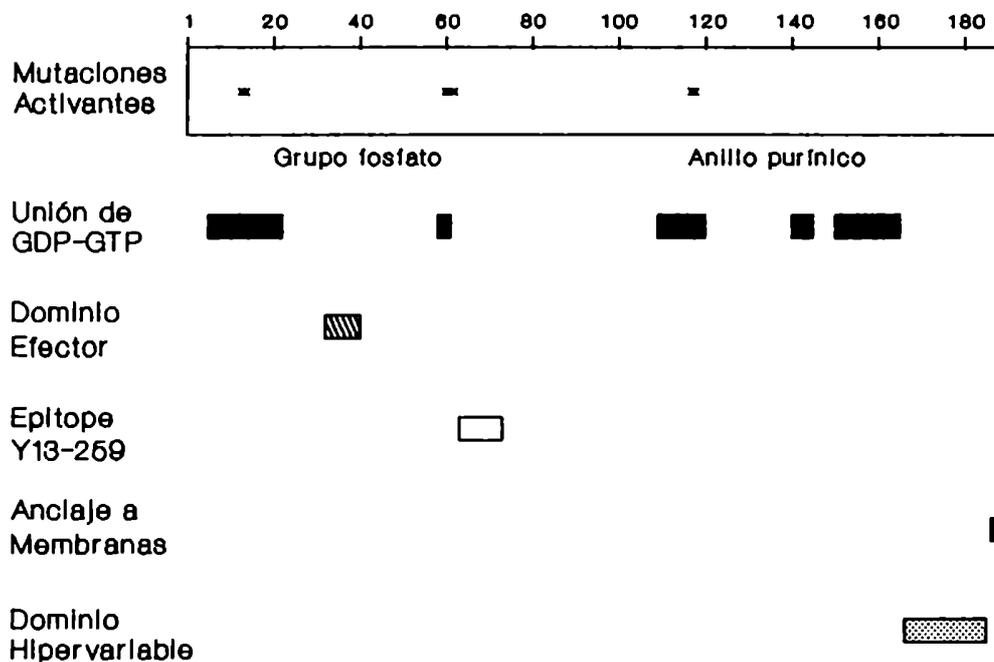
Dominio efector

Epitope reconocido por anticuerpos neutralizantes

Región de anclaje a membrana

Dominio hipervariable

En la figura 22 se presenta un esquema de los dominios funcionales de las proteínas ras.

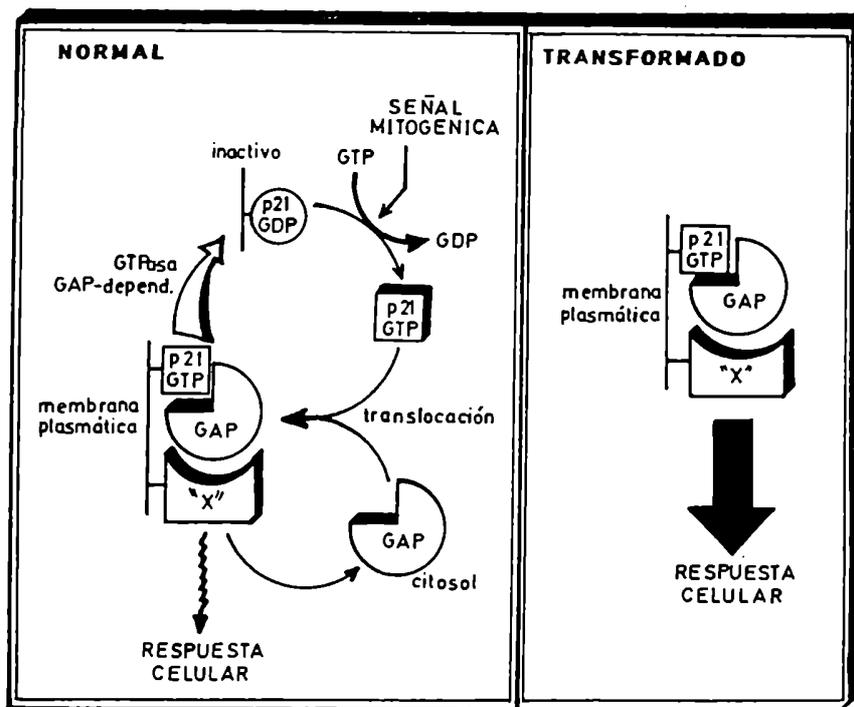


Dominio efector

Por medio de ensayos de mutagénesis dirigida, se determinó que sustituciones en la región comprendida entre los aminoácidos 32 y 40 son capaces de eliminar la capacidad transformante (Sigal *et al*, 1986). En base a esto, esta región ha sido llamada dominio efector. Además, esta región es una de las dos que presentan cambios conformacionales importantes cuando se produce el intercambio de nucleótidos, tal como se dedujo de la estructura cristalina de la proteína (Milburn *et al*, 1990). Este hecho, tal como se vio, refuerza la hipótesis de una función efectora para este dominio.

Un hecho interesante es que las mutaciones que eliminan la capacidad transformante también impiden el efecto de GAP sobre la actividad GTPásica (Adari *et al*, 1988; Calés *et al*, 1988). Mutaciones que no afectan la actividad biológica de p21^{ras} tampoco afectan la actividad de GAP. Esto llevó a postular que GAP, como un posible efector de p21^{ras}, además de su papel de regulador negativo (Sigal, 1988; McCormick, 1989b). Otra evidencia más directa de esta posible función de GAP es el hecho de que p21^{ras} unida a GTP impide el acople de una proteína G al receptor de acetilcolina, y que anticuerpos anti-GAP inhiben este efecto (Yatahi *et al*, 1990). El modelo que postula a GAP cumpliendo la doble función de efector y regulador de p21^{ras}, se esquematiza en la figura 23.

Al unirse a GTP, p21^{ras} es capaz de asociarse a GAP y favorece la translocación de esta última a la membrana. El complejo formado permite continuar la transferencia de información hacia el interior de la célula vía GAP y, además, como GAP estimula la GTPasa, se produce la desensibilización del sistema. En el caso de una forma oncogénica de p21^{ras}, el complejo ras-GAP se forma, pero GAP es incapaz de producir la desensibilización, por lo que la vía queda activada en forma constitutiva.



Si este modelo es el correcto, deberían hallarse mutantes de GAP incapaces de activar la GTPasa, pero con el resto de sus propiedades normales. Estas mutantes serían oncogénicas. En ese sentido, es importante destacar que el gen NF1, responsable de la neurofibromatosis de tipo I cuando está mutado, presenta una región de 360 aminoácidos que es muy similar en secuencia a la región catalítica de GAP y, más aún, un fragmento de 1500 aminoácidos que contiene a los 360 citados, presenta gran homología con los productos de los genes IRA1 e IRA2 de levaduras (Xu *et al*, 1990; Buchberg *et al*, 1990). Actualmente, se está investigando la posibilidad de que los neurofibromas sean el resultado de la incapacidad de la proteína NF1 de estimular la GTPasa de p21ras o de alguna proteína de esta familia.

Los datos que surgen del estudio de la proteína NF1 podrían con-

firmar el modelo propuesto para GAP y proteínas similares.

Epitope reconocido por anticuerpos neutralizantes

El anticuerpo Y13-259 (Furth *et al*, 1982) es un monoclonal hecho en rata que ha sido muy útil en la caracterización de las proteínas ras.

Este anticuerpo tiene como característica principal, la capacidad de neutralizar el efecto transformante de p21^{ras} (Mulcahy *et al*, 1985). Esto ocurre porque el anticuerpo impide el intercambio de nucleótidos (Hattori *et al*, 1987).

Este hecho sugiere que el anticuerpo al pegarse impide la acción de las proteínas intercambiadoras de nucleótidos (GNRPs). Esto se confirmó con la estructura cristalina de la proteína ya que la región de pegado del anticuerpo, que es la comprendida entre los aminoácidos 63 y 76 (Lacal *et al*, 1986a), es la segunda región que muestra cambios conformacionales apreciables al producirse el intercambio de GDP por GTP.

Región de anclaje a membrana

Las proteínas ras se sintetizan en el citoplasma en ribosomas libres y, luego de sufrir varias modificaciones post-traduccionales, se localizan en la cara interna de la membrana plasmática (Lowy y Willumsen, 1989). Esta localización subcelular es crítica para su actividad biológica (Barbacid, 1987), y entre las modificaciones post-traduccionales se encuentra la adición de lípidos. Estos lípidos permiten el anclaje a la membrana, ya que las proteínas ras no presentan dominios hidrofóbicos capaces de cumplir esa función.

Por mutagénesis dirigida, se detectó que la cisteína 186 es requerida en forma absoluta para el pegado a membrana y para la incorporación de palmitato a la proteína (Willumsen *et al*, 1984).

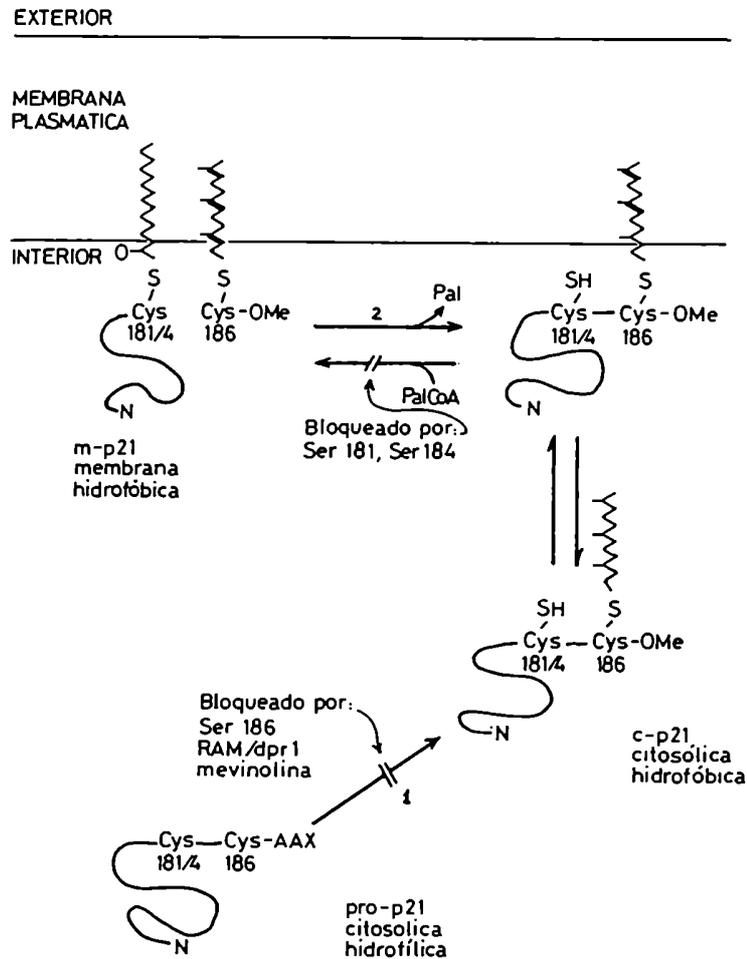
De acuerdo a este resultado, se postuló que la adición de palmitato a esa cisteína permite el pegado a la membrana. Sin embargo, hay muchas objeciones a este modelo:

- a) La asociación de ras a la membrana es estable, mientras que la unión de palmitato a la proteína no lo es (Maggee *et al*, 1987).
- b) Una fracción importante de las proteínas ras unidas a membrana no están palmitoiladas (Buss y Sefton, 1986).
- c) La proteína K-ras(B) posee la cisteína 186 y se asocia a membranas en forma estable aunque no es capaz de incorporar palmitato (Hancock *et al*, 1989).

La respuesta se obtuvo por comparación con el procesamiento post-traducciona del factor a de *mating* de levaduras. Se había detectado una mutación en un gen llamado RAM1 (Powers *et al*, 1986) o DPR1 (Fujiyama *et al*, 1987) que impedía el correcto procesamiento tanto del factor a como de las proteínas RAS 1 y RAS 2. Por lo tanto, el producto de ese gen es necesario para un paso común en el procesamiento de esas proteínas. Analizando la secuencia de ambas proteínas, se vio que poseen un consenso carboxilo terminal similar formado por una cisteína (186 en p21^{ras}), dos aminoácidos alifáticos y un aminoácido más; este consenso ha sido denominado "CAAX-box". Por lo tanto, este consenso permitiría a estas proteínas interactuar con una maquinaria de procesamiento común (Schafer *et al*, 1989; Gutiérrez *et al*, 1989).

Al dilucidarse los pasos de procesamiento del factor a (Anderegg *et al*, 1988), se tuvo un modelo para investigar el procesamiento de las proteínas ras. Así, se llegó a la conclusión de que el procesamiento ocurre en dos pasos. En el primero, se pega un grupo isoprenilo a la cisteína 186, se remueven los aminoácidos posteriores y se carboximetila la cisteína (Casey *et al*, 1989a; Han-

cock *et al*, 1989; Schafer *et al*, 1989), mientras que en el segundo, se palmitoilan cisteínas vecinas a las 186 (Hancock *et al*, 1989) como las cisteínas 181 y 184. El mecanismo de procesamiento puede ejemplificarse como se observa en la figura 24.



El precursor hidrofílico sufre el primer paso de procesamiento y gana en hidrofobicidad pudiendo pegarse a la membrana en forma débil. La sustitución de la cisteína 186 o mutaciones en el gen RAM1/DPR1 bloquean este paso. Se ha demostrado la existencia de carboxipeptidasas (Hancock *et al*, 1991) y carboximetil transfera-

sas (Clarke *et al*, 1988). También se ha identificado una isoprenil transferasa soluble (Riess *et al*, 1990; Schaber *et al*, 1990), y se determinó que el residuo que se une a la cisteína 186 es un farnesilo (Casey *et al*, 1989a). Los grupos isoprenilo derivan de la vía del mevalonato (Goldstein y Brown, 1990; Rilling *et al*, 1990), y se ha comprobado que inhibidores de esa vía, como lovostatina o mevinolina (DeFeo-Jones *et al*, 1991; Schafer *et al*, 1989) impiden el anclaje de las proteínas a la membrana.

En el segundo paso, la proteína ras en membrana puede unir palmitato en forma reversible en cisteínas vecinas a la 186. Este paso permite que la proteína adquiera mayor avidéz por la membrana. Este paso podría servir, entonces, para regular la actividad biológica de la proteína (Lowry y Willumsen, 1989).

Analizando las secuencias carboxilo terminal de las p21ras de mamíferos, se advierte que en Kras(A), en lugar de cisteínas vecinas a la posición 186 hay un dominio polibásico (figura 25).

Nras	G	P	G	C	M	S	C	K	C	V	L	S
Nras	T	N	G	C	M	G	L	P	C	V	V	M
Kras(A)	P	G	C	F	K	I	K	K	C	I	I	M
Kras(B)	K	K	K	K	S	L	T	K	C	V	I	M
	178		180	181			184		186			189

La proteína Kras(B) no incorpora palmítico y se une en forma estable a la membrana. Se ha comprobado que el domino polibásico es necesario para que el anclaje sea efectivo (Hancock *et al*, 1990).

Este tipo de procesamiento también se ha comprobado en eucariotes inferiores como *S. cerevisiae* (Deschenes *et al*, 1989; Glomset *et al*, 1990; Hrycyna *et al*, 1991). El hecho de que el anclaje a membrana de las proteínas ras puede ser bloqueado por compuestos que inhiben la vía del mevalonato, llevó a que se postulara por primera vez un posible tratamiento farmacológico de tumores provoca-

dos por ras (Schafer *et al*, 1989; Rine y Kim, 1990). Sin embargo, el carácter citotóxico de esos compuestos y la diversidad de vías que afectan, dificulta su aplicación (Lowry y Willumsen, 1989).

Dominio hipervariable

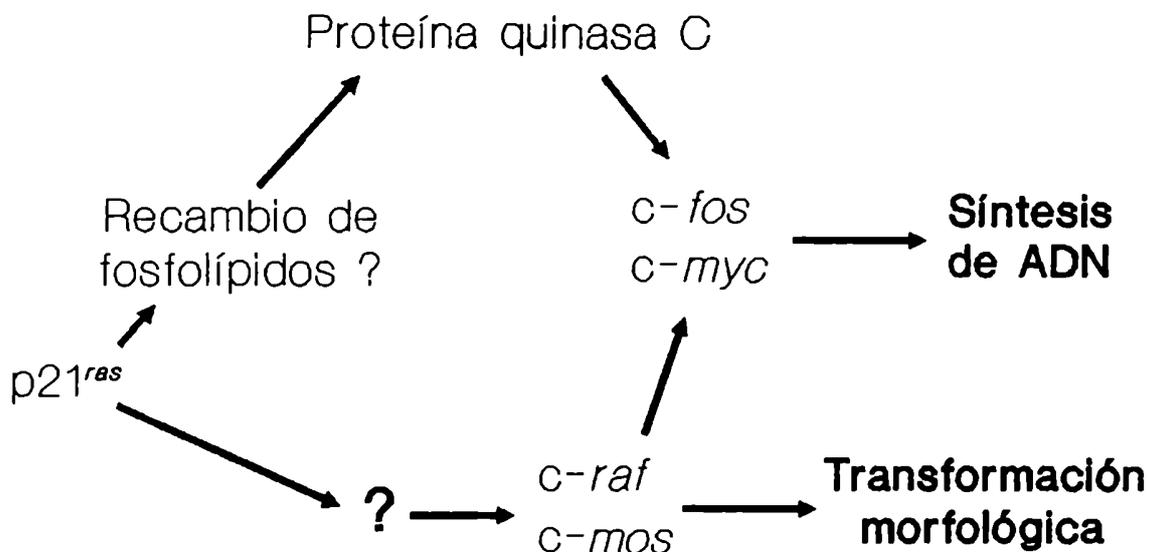
En la región carboxilo terminal, exceptuando la "CAAX box", las proteínas ras presentan una alta divergencia en la secuencia aminoacídica. Esta región se extiende entre los aminoácidos 166 y 185, y distintos estudios de mutagénesis dirigida y deleciones (Lacal *et al*, 1986b; Willumsen *et al*, 1985), han demostrado que no es requerida para ninguna de las propiedades bioquímicas de estas proteínas (unión de nucleótidos, actividad GTPásica, capacidad transformante).

Estos datos han llevado a postular que esta región estaría involucrada en la interacción proteína-proteína y conferiría propiedades funcionales diferentes a los distintos miembros de la familia.

Funciones en eucariotes superiores

Como se vio en las primeras secciones de esta Introducción, varias vías de transducción de señales en eucariotes superiores pueden ser bloqueadas por efecto de anticuerpos que neutralizan la actividad biológica de las proteínas ras. Esto llevó a postular que ras es una molécula regulatoria clave que vincula a los receptores de factores de crecimiento con sus vías de transducción de señales (Hall, 1990a). Más aún, se ha determinado que ras regula vías dependientes e independientes de PKC (Marshall, 1991) y que hay colaboraciones transformantes entre ras y oncogenes nucleares (Ruley, 1990). Un ejemplo concreto es que se ha demostrado que eventos de fosforilación de c-jun que tienen un efecto estimulador dependen de ras (Binetruy *et al*, 1991). En base a estos datos, se pueden graficar las funciones de las proteínas ras

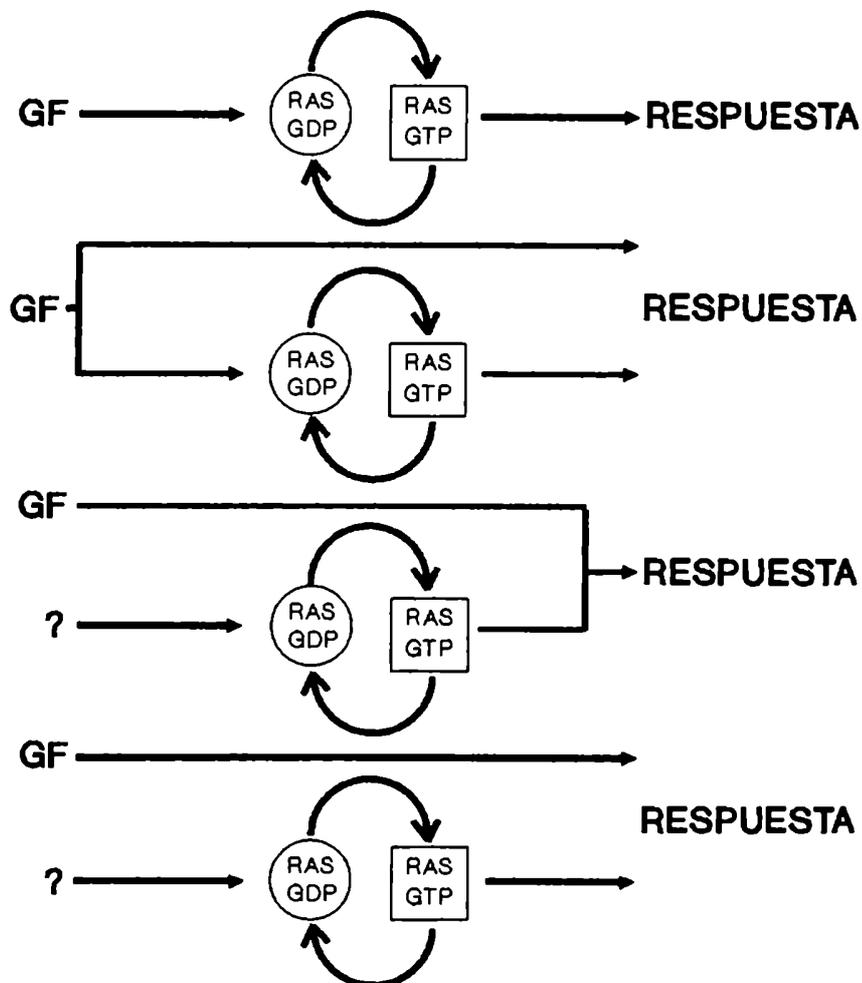
como se observa en la figura 26.



Sin embargo, el mecanismo por el cual se produce el vínculo entre factores de crecimiento y ras permanece sin dilucidar. Basándose en la similitud estructural de $p21^{ras}$ y $G\alpha$, se ha considerado a las primeras como transductoras de señales (Barbacid, 1987) y existen cuatro mecanismos de acción posibles para que actúen de ese modo.

El efecto transformante de las formas oncogénicas de $p21^{ras}$ induciría a postular a la primer variante que se muestra en la figura 27, como el mecanismo real. Sin embargo, dado que el efecto de los factores de crecimiento (GF) conduce a la estimulación de la PLC- γ , de $c-raf$ y la PI-3 quinasa, es más probable que alguna de las tres variantes restantes sea la correcta. Así, además de estos efectos conocidos, los GF podrían activar, vía ras, un camino metabólico aún desconocido (variante b), o bien ras es activada

por otras señales y luego contribuye a la vía metabólica de los GF (variante c) o activa una nueva vía que actúa sinérgicamente con la del GF (variante d).



Como ya se vio, GAP interactúa con receptores de factores de crecimiento, es fosforilada por ellos y ha sido propuesta como el efector de ras. GAP podría ser, entonces, el nexa entre ras y

esos factores, dando como resultado alguno de los mecanismos propuestos. De todos modos, no se sabe aún si GAP es realmente dicho nexos y, si así lo fuera, en qué forma actúa. Dado que GAP interactúa con otras dos proteínas, llamadas p⁶² y p¹⁹⁰ (Gibbs *et al*, 1990; Moran *et al*, 1991), cuando se caracterice a estas proteínas quizás se aclare el panorama.

Sin embargo, dado que a nivel estructural las proteínas ras presentan mayor homología en la región de unión de nucleótidos con EF-Tu que con proteínas G (Bourne *et al*, 1990; Bourne *et al*, 1991), se ha propuesto recientemente que el mecanismo de acción podría asemejarse al del factor mencionado (Chardin, 1991). Las proteínas ras tendrían como función, entonces, controlar la formación de complejos macromoleculares en la membrana en vez de actuar como transductores. Un mecanismo de este tipo es el que utilizan las proteínas de la familia rab, que tienen una muy alta homología de secuencia con ras, para controlar el tráfico vesicular (Bourne, 1988), tal como se detallará en la próxima sección.

Es un hecho que la segregación lateral de ciertos componentes de la membrana es importante para la transducción de señales. Algunas enzimas que generan segundos mensajeros, como la fosfolipasa A₂ se localizan preferentemente en rugosidades de la superficie celular que representan una pequeña fracción de la membrana (Bargi *et al*, 1988). Precisamente, el modelo basado en EF-Tu postula que ras controlaría algunos aspectos de la segregación lateral de componentes de la membrana que participan en la transducción de señales. Se han reportado experimentos que demuestran la interacción de proteínas ras-relacionadas con receptores, como es el caso de rho con rodopsina (Wieland *et al*, 1990).

Funciones en eucariotes inferiores

Se ha reportado la existencia de genes ras y de sus productos en varios eucariotes inferiores. Como ya se ha visto en esta Intro-

ducción, en *Saccharomyces cerevisiae* se ha demostrado que existen dos genes ras, RAS1 y RAS2 (DeFeo-Jones *et al*, 1983), y que al menos una de sus funciones es activar la adenilil ciclasa (Toda *et al*, 1985). Las proteínas RAS1 y RAS2 tienen un PM de 40000 y 47000, respectivamente, y sufren las modificaciones post-traduccionales vistas para sus homólogos de mamíferos. Como ya se vio, se han identificado intercambiadores de nucleótidos y proteínas de tipo GAP (Broach, 1991).

Las proteínas RAS sensan el estado nutricional y lo conectan con el ciclo celular. Su efecto permite la germinación de esporas y la viabilidad y proliferación celulares (Kataoka *et al*, 1985a). Para estos efectos, activan la adenilil ciclasa, utilizando como intermediario una proteína de 70 kDa llamada CAP que se asocia a esa enzima (Field *et al*, 1990; Fedor-Chaiken *et al*, 1990). Esta proteína explica por qué proteínas ras de mamíferos son capaces de reemplazar a las de levaduras para producir AMP cíclico cuando en mamíferos esto no ocurre (Kataoka *et al*, 1985a). El hecho de que dobles mutantes de RAS1 y RAS2 no sean viables, y mutantes que no producen AMPc sí lo son, indica que estas proteínas cumplen otras funciones (Kataoka *et al*, 1985b).

Se ha detectado un gen ras en *Saccharomyces pombe* que codifica para una proteína de 219 aminoácidos (Fukui *et al*, 1986). La función estaría relacionada con procesos diferenciativos (Nadin-Davis *et al*, 1986).

También se detectó en *Aplysia* un gen ras, y su producto estaría vinculado también a la diferenciación (Swanson *et al*, 1986).

Se han identificado tres genes ras en *Drosophila melanogaster*: DRas1 (Neuman-Silverberg *et al*, 1984), DRas2 (Mazer *et al*, 1985) y DRas3 (Schejter y Shilo, 1985), y sus productos parecen participar en procesos diferenciativos (Segel y Shilo, 1986).

Se han identificado dos genes ras en *Dyctiostelium discoideum* (Reymond *et al*, 1985; Robbins *et al*, 1989). Dd Ras1 participaría en procesos de proliferación celular (Weeks *et al*, 1987), activando la vía de los fosfoinosítidos (Smell *et al*, 1986). El producto del segundo gen (Dd RasG) se expresa al comienzo de la diferenciación, por lo que podría cumplir alguna función en ese estadio (Robbins *et al*, 1989).

En *Neurospora crassa* se ha clonado un gen ras que codifica para una proteína de 213 aminoácidos cuyo PM es de 24000; en el mismo trabajo se detectó el ARN mensajero correspondiente que es de 2,5 kb (Altschuler *et al*, 1990).

En *Caenorhabditis elegans*, el producto del gen let 60 codifica para una proteína ras (Greenwald y Broach, 1990). La función que cumple esta proteína es clave para el desarrollo de los rasgos vulvales de este metazoo (Han y Sternberg, 1990), y controlaría el mecanismo por el cual, frente a una señal inductiva, algunas células adquieren funciones vulvales y el resto hipodermales. Una mutación inactivadora de let 60 produce una capa de células hipodermales y una mutación activante produce un fenotipo llamado "multivulva".

Por análisis genéticos se sabía que, antes de let 60 actuaba el producto del gen let 23, probablemente recibiendo la señal inductiva. Recientemente se ha clonado dicho gen y se determinó que su producto es una quinasa de tirosina perteneciente a la subfamilia del receptor de EGF (Aroian *et al*, 1990). Este hecho confirma el nexo entre ras y receptores, y hace que *C. elegans* sea un modelo interesante para adquirir nuevos conocimientos sobre ras.

PROTEINAS RAS-RELACIONADAS

Características generales

Puede considerarse que las proteínas ras pertenecen a una superfamilia, también llamada ras, dentro de la cual hay tres familias, según el grado de homología que presentan: la familia ras, la familia rho y la familia rab. Cada una de estas familias puede dividirse a su vez, en subfamilias (Downward, 1990).

En la actualidad, tal como muestra la tabla 3, se conocen alrededor de 40 miembros de esta superfamilia (Hall, 1990b), tanto en mamíferos como también en eucariotes inferiores.

Familia ras		Familia rho		Familia rab	
Mamíferos	Otros	Mamíferos	Otros	Mamíferos	Otros
Ha-ras	sc Ras1	rho A	Sc RHO 1	rab 1A	Sc YPT1
Ki-ras(A y B)	sc Ras2	rho B	Sc RHO 2	rab 1B	Sc SEC4
N-ras	sp Ras	rho C		rab 2	Dd sas1
	Dm Ras1			rab 3A	Dd sas2
	Dd Ras	rac 1	Sc CDC 42	rab 3B	Sp YPT3
	Dd RasG	rac 2		rab 4	
	Nc ras			rab 5	
rap 1A	Dm Ras3	G25 K		rab 6	
rap 1B	Sc Ras1			rab 7	
rap 2				BRL-ras	
R-ras	Dm Ras2				
ral A					
ral B					

Familia ras

Dentro de esta familia, además de la subfamilia ras que ya ha sido descrita en la sección anterior, se encuentran las subfamilias rap, ral y R-ras. Estas subfamilias presentan alrededor de un 50-60% de homología con las proteínas ras; los dominios de unión de nucleótidos y el dominio efector están altamente conservados. Estas proteínas presentan CAAX-box y sufren un procesamiento post-traducciona similar a las p21^{ras} aunque, por ejemplo, rap 1A es isoprenilada por un residuo geranyl-geranilo en vez de farnesilo (Buss *et al*, 1991). Se han identificado además, intercambiadores de nucleótidos y GAPs para algunos miembros de estas tres subfamilias (Chardín, 1991).

A pesar de la homología en el dominio efector, ninguna de estas proteínas tiene capacidad transformante. Por el contrario, rap 1A es capaz de revertir el efecto transformante de ras cuando está sobreexpresada (Kitayama *et al*, 1989). Se ha postulado que rap 1A competiría con ras por GAP y ejercería su efecto de ese modo. Se ha comprobado que GAP interacciona con rap 1A sin activar su GTPasa (Hata *et al*, 1990), pero como hay una GAP específica para rap 1A, el modelo de acción aún no está aclarado. Podría existir una vía antagónica a la de ras donde actuaría rap 1A.

Por otro lado, se ha demostrado que rap 1B es sustrato de la quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico (Fischer y White, 1987); además, en plaquetas, se asocia al citoesqueleto (Fischer *et al*, 1990).

En cuanto a R-ras y ral, no se conocen sus funciones. En *S. cerevisiae* se ha encontrado un homólogo de rap 1 denominado RSR 1 cuya función estaría vinculada a la organización del proceso de crecimiento (Bender y Pringle, 1989).

Familia rho

Los miembros de esta familia presentan alrededor de un 30% de homología con las p21ras. A diferencia del resto de la superfamilia ras, las proteínas rho presentan variaciones en los dominios de unión de nucleótido (Chardin, 1991) que consisten en inserciones de 12 aminoácidos; como la región hipervariable es más corta, su PM se mantiene alrededor de 22000.

Todas las proteínas rho presentan el consenso CAAX en el extremo carboxilo terminal y se supone que son activas en la membrana, aunque en algunos casos se las ha detectado en el citoplasma (Toki *et al*, 1989).

Las propiedades bioquímicas, hidrólisis de GTP e intercambio de nucleótidos, son similares a las de las proteínas ras en cuanto a sus constantes de velocidad. Además, se ha identificado una proteína rho-GAP (Garret *et al*, 1989), como así también proteínas que actúan como GDI y GDS (Downward, 1990).

Las proteínas rho y ral tienen la particularidad de ser sustratos de la exoenzima C3 de la toxina botulínica (Sekine *et al*, 1989); esta exoenzima permite la incorporación de ADPribosa en la asparagina 41, ubicada en el dominio efector sin que se afecte la actividad de rho-GAP (Paterson *et al*, 1990).

La microinyección de proteína rho activada en células de mamíferos produce rápidos y profundos cambios en la morfología celular (Paterson *et al*, 1990), lo que sugiere que las proteínas rho actúan controlando algunos aspectos de la organización del citoesqueleto. Esto se confirma por el hecho de que la microinyección de la subunidad C3 de la toxina botulínica produce la disolución de filamentos de actina (Chardin *et al*, 1989). Estos resultados

no aclaran la función de rho-GAP ya que la ADP ribosilación afecta la actividad biológica de rho, pero no la hidrólisis de GTP por GAP.

La sobreexpresión de rho A en fibroblastos resulta en un fenotipo parcialmente transformado con reducida dependencia respecto del suero y mayor velocidad de crecimiento (Avraham y Weinberg, 1989). De todos modos, con estos datos es prematuro aún considerar a las proteínas rho como oncogenes.

Se han identificado además, homólogos de estas proteínas en *S. cerevisiae*. Por análisis genéticos se determinó que RHO 1 es esencial y que mutaciones activantes inhiben la esporulación (Madaule *et al*, 1987).

Familia rab

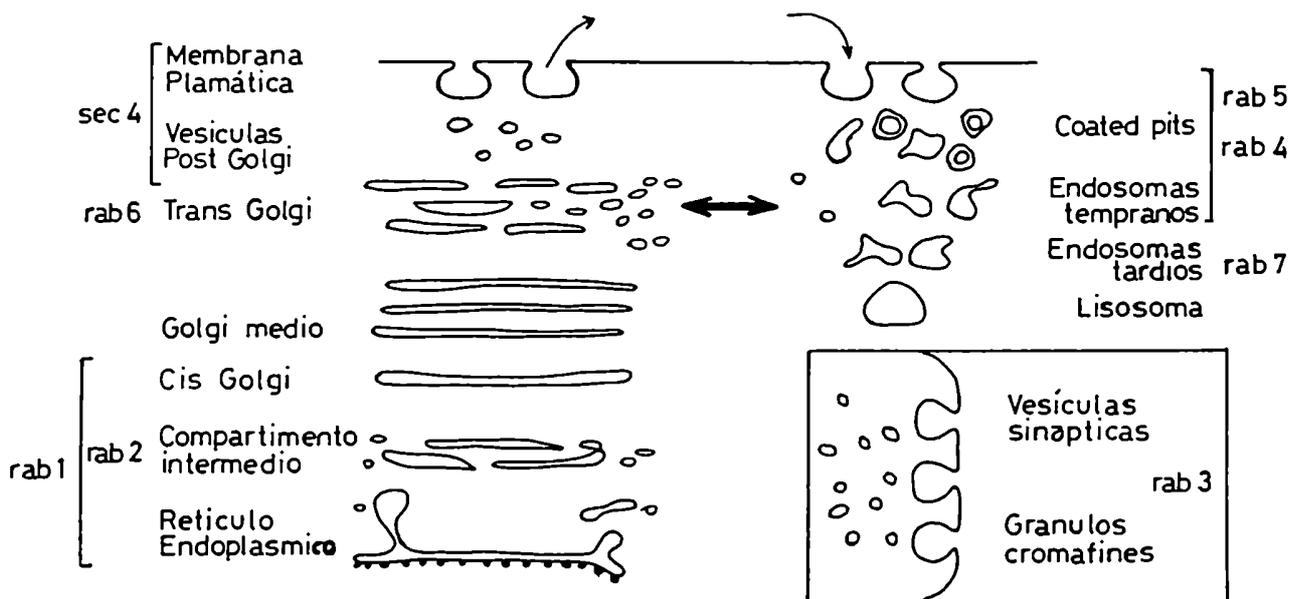
Los primeros miembros de esta familia, YPT 1 y SEC 4, fueron identificados en *S. cerevisiae*; luego se hallaron sus homólogos en mamíferos. Presentan alrededor de un 35% de homología con las p21^{ras} y los dominios de unión de nucleótido están altamente conservados. Presentan cinéticas de intercambio de nucleótidos y de hidrólisis de GTP similares a ras (Downward, 1990). Se han identificado GAPs para varias proteínas rab (Chardin, 1991) y también una proteína GDI para rab 3A (Matsui *et al*, 1990) y una GDS para rab 3B (Shoji *et al*, 1989).

Una característica particular de esta familia es que no presentan "CAAX-box" en el extremo carboxilo terminal (Schafer *et al*, 1989). Mientras las familias ras y rho presentan ese consenso, en esta familia se observan las siguientes variantes (figura 28).

G G C C	rab1-rab2-YPT 1
X C C	rab9-rab10-sec 4
X C X C	rab3-rab4-rab6-rab7
C A A X	ras-rho

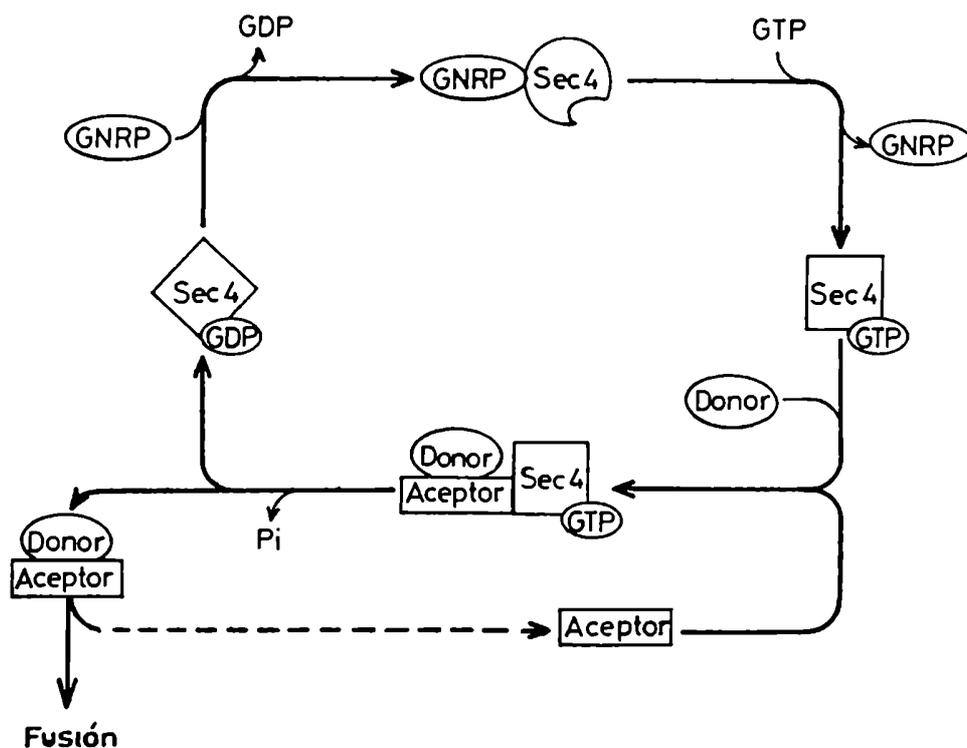
Si bien no se sabe qué modificaciones post-traduccionales ocurren, se sabe que el carboxilo terminal es esencial para el anclaje en membranas (Walworth *et al*, 1989). Además, se ha identificado el gen BET 2 en *S. cerevisiae*, cuyo producto es esencial para que SEC 4 e YPT 1 se localicen en la membrana (Rossi *et al*, 1991). Este gen es homólogo al gen RAM 1 (o DPR 1) que, como se vio, codifica para una prenil transferasa, por lo que se supone que estas proteínas podrían isoprenilarse.

Los datos acerca de la función de estas proteínas surgieron de análisis genéticos de *S. cerevisiae*. Así, se descubrió que mutantes con trastornos en las vías secretorias tenían afectado el gen de SEC 4 (Salminen y Novick, 1987; Goud *et al*, 1988) o el de YPT 1 (Segev *et al*, 1988). Además, en un sistema libre de células se demostró que el transporte de proteínas entre distintos compartimentos de Golgi depende de GTP y es inhibido por GTPγS y por un factor citosólico (Melançon *et al*, 1987). Estos datos implican una función asociada al transporte vesicular para las proteínas rab. Analizando la localización subcelular de estas proteínas (figura 29), se puede apreciar que se relacionan con estructuras vinculadas a la secreción o a la endocitosis, lo que confirma los datos anteriores (Chardin, 1991).



La única evidencia de que en mamíferos cumplen la misma función, son experimentos en los que péptidos sintéticos del dominio efector inhiben el transporte *in vitro* (Plutner *et al*, 1990).

En base a los datos genéticos y bioquímicos, se postuló que estas proteínas son responsables de la translocación unidireccional de las vesículas secretorias, siguiendo el mecanismo de acción del EF-Tu (Bourne *et al*, 1988). La figura 30 muestra el modelo propuesto.



Según este modelo, las proteínas rab estarían en el citosol y al unir GTP se pegarían a la membrana de la vesícula secretoria madura y permitiría la fusión con la membrana de la etapa siguiente y luego de la hidrólisis del GTP volvería al citosol.

El modelo explica la inhibición por GTP γ S, ya que la inhibición de la GTPasa impide la continuidad del ciclo. Surgen dudas debido a que estas proteínas están asociadas en su mayor parte a la membrana. Cuando se conozcan mejor sus modificaciones y anclaje a membrana se podrá corroborar el modelo, ya que debería existir un mecanismo muy preciso de control de la unión a la membrana. Esto podría explicar las diferencias en el consenso carboxilo terminal que muestran estas proteínas.

ADENILIL CICLASA

Características generales

Los nucleótidos cíclicos y, en especial el AMP cíclico (AMPc), cumplen un papel esencial controlando muchas de las funciones celulares. Desde su descubrimiento (Sutherland y Rall, 1957), el AMPc y la enzima encargada de su síntesis, la adenilil ciclase, han sido ampliamente estudiados. Este sistema de transducción de señales está muy conservado a lo largo de la evolución, encontrándose desde bacterias hasta vertebrados, lo que está demostrando su importancia.

En bacterias y en algunos eucariotes inferiores, las adenilil ciclasas utilizan ATP-Mn²⁺ como sustrato y se denominan protociclasas. En eucariotes superiores y algunos inferiores, se asocian a GTPasas que actúan como componentes regulatorios. En estos casos, utilizan como sustrato ATP-Mg²⁺ y responden a efectores como GTP, fluoruro y forskolina. Estas adenilil ciclasas son llamadas holo-ciclasas.

Adenilil ciclase en procariotes

En bacterias, la adenilil ciclase tiene las características de las protociclasas. Su distribución subcelular varía de un organismo a otro, pudiendo aparecer asociada a membranas, en el citosol o en ambas fracciones.

En *E. coli*, el AMPc se une a una proteína receptora llamada CAP, y el complejo formado activa la transcripción de varios operones relacionados al metabolismo de azúcares (Ullmann y Danchin, 1983).

Como se ha visto en otra sección de esta Introducción, la adenilil ciclase es regulada por el sistema PTS de transporte de azúcares. Es decir que, por varios caminos, el AMPc se produce en

respuesta a la presencia de determinados nutrientes en el medio. Otros factores podrían regular a la adenilil ciclasa en forma indirecta, como el gradiente electroquímico de protones (Peterkofsky, 1981) o el 2-cetobutirato (Daniel *et al*, 1984; Danchin *et al*, 1984).

Una función diferente de la adenilil ciclasa se ha detectado en *Bordetella pertussis* y en *Bacillus anthracis* (Masure *et al*, 1987). En estos casos, la enzima es secretada junto con otros factores y cumple un papel en la patogénesis producida por estas bacterias por aumentar los niveles intracelulares de AMPc de las células infectadas. Estas bacterias producen tos convulsa y ántrax, respectivamente. Estas adenilil ciclasas utilizan como sustrato tanto al ATP-Mn²⁺ como al ATP-Mg²⁺ y son reguladas por Ca²⁺-calmodulina (Wolff *et al*, 1980).

Adenilil ciclasa en eucariotes inferiores

La adenilil ciclasa presenta, en eucariotes inferiores, características intermedias, entre las de bacterias y eucariotes superiores. Así, aparecen en algunos casos asociadas a GTPasas y en otros tienen las características de protociclasas.

En *Mucor rouxii*, el nivel de AMPc aumenta cuando se alarga el tubo germinal (Cantore *et al*, 1980) y cuando se pasa de una atmósfera anaeróbica a una aeróbica, se produce una transición de levadura a forma filamentosa con disminución de los niveles de AMPc (Paveto *et al*, 1975).

Otro hongo muy estudiado es *Neurospora crassa*. La adenilil ciclasa que presenta está unida a membranas en forma débil, depende de ATP-Mn²⁺, no responde a GTP (Flawiá y Torres, 1972a; Flawiá y Torres, 1972b; Flawiá y Torres, 1972c), y es activable por Ca²⁺-calmodulina (Reig *et al*, 1984). Por experimentos de reconstitución homóloga, se ha demostrado que la adenilil ciclasa de *N.*

crassa tiene características similares a las de eucariotes superiores, ya que en esos experimentos al acoplarla a receptores y proteínas G, como rodopsina y transducina, se comporta como una holociclase (Muschiatti *et al*, 1989).

Otros eucariotes inferiores, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Dicystelium discoideum* y *Trypanosoma cruzi*, presentan adenilil ciclasas que se comportan como holociclasas. Las características observadas en *S. cerevisiae* se deben a que la adenilil ciclase, como se vio en una sección anterior, está acoplada a la proteína CAP y a RAS2.

El ciclo de vida de *D. discoideum* presenta una fase vegetativa unicelular y, frente al agotamiento de nutrientes, se produce un agregado celular por quimiotaxis para formar un cuerpo de fructificación. El AMPc actúa como quimioattractante (Konijiu *et al*, 1967) y también estimula la diferenciación. En condiciones de ayuno, la adenilil ciclase se activa en forma transiente, aumentando el AMPc intracelular y su excreción para actuar como atraccante (Klein *et al*, 1977). La adenilil ciclase actúa como holociclase (Jenssens y Van Haastert, 1987) y, como ya se vio, está acoplada a proteínas G.

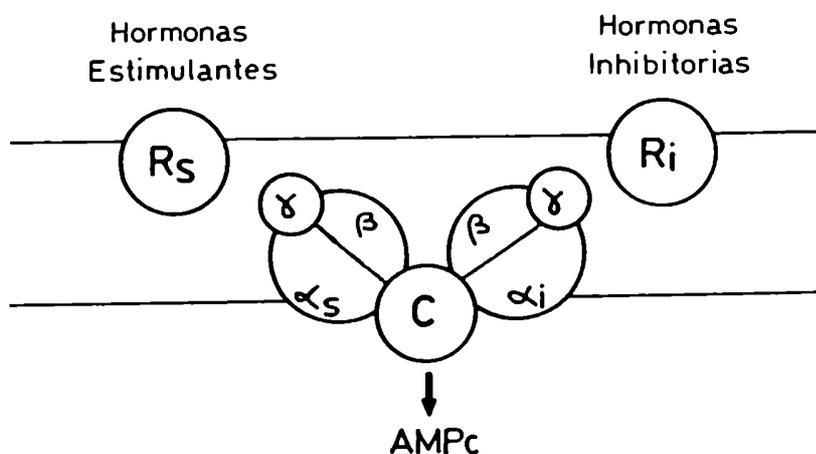
Por su parte, *T. cruzi* presenta una adenilil ciclase asociada a membranas que utiliza como sustrato tanto al ATP-Mn²⁺ como al ATP-Mg²⁺ (Torruella *et al*, 1986; Eisenschlos *et al*, 1986b); además, su actividad estaría regulada por proteínas G (Eisenschlos *et al*, 1986a; Coso *et al*, 1991). Su función estaría relacionada con procesos diferenciativos (Fraidenraich *et al*, 1991; comunicación personal).

Adenilil ciclase en eucariotes superiores

Las adenilil ciclasas de eucariotes superiores son las holociclasas por excelencia. Son proteínas intrínsecas de membrana, utili-

zan ATP-Mn^{2+} o ATP-Mg^{2+} como sustrato y están acopladas a proteínas G, lo que les confiere sensibilidad a efectores como GTP, fluoruro y forskolina. Las adenilil ciclasas de alfalfa (Carriarte *et al*, 1988) y la de túbulos seminíferos (Kornblihtt *et al*, 1981) constituyen excepciones, ya que son solubles y no se asocian con proteínas G.

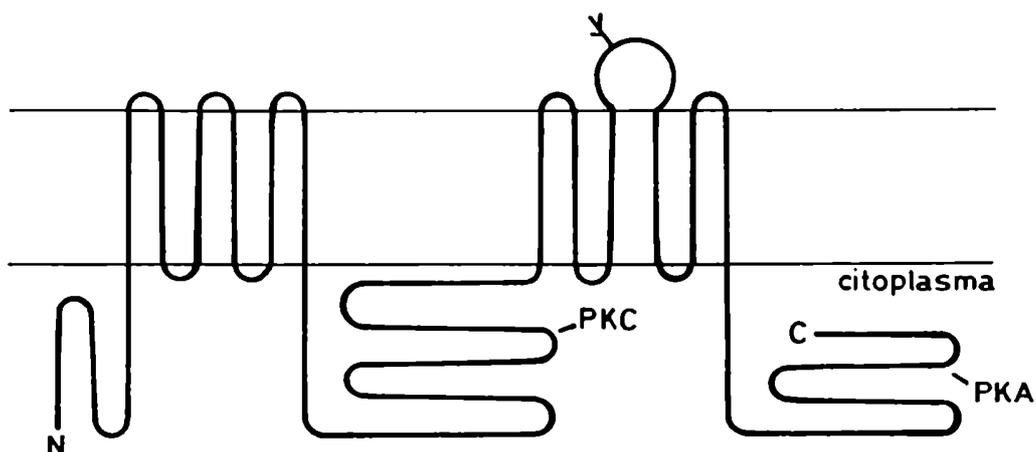
En estos organismos, la adenilil ciclasa es estimulada por diversas hormonas como glucagón, TSH, ACTH, epinefrina, etc. (Rodbell *et al*, 1970) y para ello requiere GTP (Rodbell *et al*, 1971a; Rodbell *et al*, 1971b). Esto se debe a que la enzima está asociada a proteínas G. De esta forma, la adenilil ciclasa se asocia a receptores estimulatorios (R_s) por medio de G_s (Hildebrandt *et al*, 1983) y a receptores inhibitorios por medio de G_i (Hildebrandt *et al*, 1984). El modelo de regulación de la adenilil ciclasa es el que se observa en la figura 31.



La activación mediada por G_s se debe a una interacción directa de α_s con la adenilil ciclasa (Gilman, 1987); en cambio, el mecanis-

mo inhibitorio regulado por G_i es muy controvertido. Se ha propuesto que el complejo $\beta\gamma$ proveniente de la disociación de G_i se uniría a α_s y, de ese modo, se produciría la inhibición (Katada *et al*, 1984a; Katada *et al*, 1984b). Por otro lado, se propuso que existe una interacción directa de α_i con la adenilil ciclasa (Hildebrandt *et al*, 1984; Codina *et al*, 1984). Al parecer, ambos mecanismos ocurren y además existe una interacción directa de $\beta\gamma$ con la adenilil ciclasa (Katada *et al*, 1986).

La adenilil ciclasa de cerebro bovino ha sido clonada y se dispone de su secuencia aminoacídica. La proteína presenta dos dominios hidrofóbicos agrupados en dos regiones de 6 segmentos cada una, separadas por dos dominios citoplasmáticos donde se produce la unión del nucleótido y donde residiría la actividad catalítica. Presenta, además, regiones consenso para la fosforilación por PKC y PKA. Topológicamente, la adenilil ciclasa se asemeja a proteínas de membrana que actúan como transportadoras o canales iónicos, lo que llevó a postular, aunque no se demostró, que los dominios transmembrana podrían participar en la exportación de AMPc (Kuprinski *et al*, 1989). En la figura 32 se puede observar un esquema de la estructura postulada.



Los dominios citoplasmáticos presentan una homología del 28% entre sí y, al comparar su secuencia con la de otras ciclasas, se observa que estos dominios presentan mayor homología con el dominio catalítico de la guanilil ciclasa que con la adenilil ciclasa de levaduras (Green, 1989). La guanilil ciclasa presenta un dominio extracelular que actúa como receptor, un dominio transmembrana y dos dominios citoplasmáticos, uno es el catalítico y el otro presenta homología con quinasas de proteínas (Chinkers *et al*, 1989). La similitud en los dominios catalíticos de ambas ciclasas es considerable, aunque el significado fisiológico de esta homología no se conoce.

AGROBACTERIUM

Características generales

Agrobacterium, junto a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, pertenece a la familia *Rhizobiaceae*. Los miembros de esta familia tienen forma de bastón, son anaeróbicos, no forman endosporas y son móviles. Estas bacterias Gram negativas tienen como propiedad particular el ser habitantes del suelo e interactúan con plantas. Esta interacción permite en algunos casos que las plantas fijen nitrógeno atmosférico, como ocurre con el género *Rhizobium* y en otros la producción de enfermedades tumorales en la planta como sucede con *Agrobacterium* (Manual Bergey, 1984).

El género *Agrobacterium* está formado por dos especies: *A. tumefaciens*, que produce el tumor de agalla o *crown-gall* y *A. rhizogenes*, que produce proliferación de raíces o *hairy-root disease* (Zambryski *et al*, 1989).

La lesión provocada en las plantas por *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes* se produce por transferencia de materiales genéticos desde los megaplásmidos de la bacteria, Ti o Ri según la especie, al genoma vegetal, constituyendo un caso de transformación natural por lo que este proceso ha sido estudiado exhaustivamente, aunque aún no se lo conoce en su totalidad.

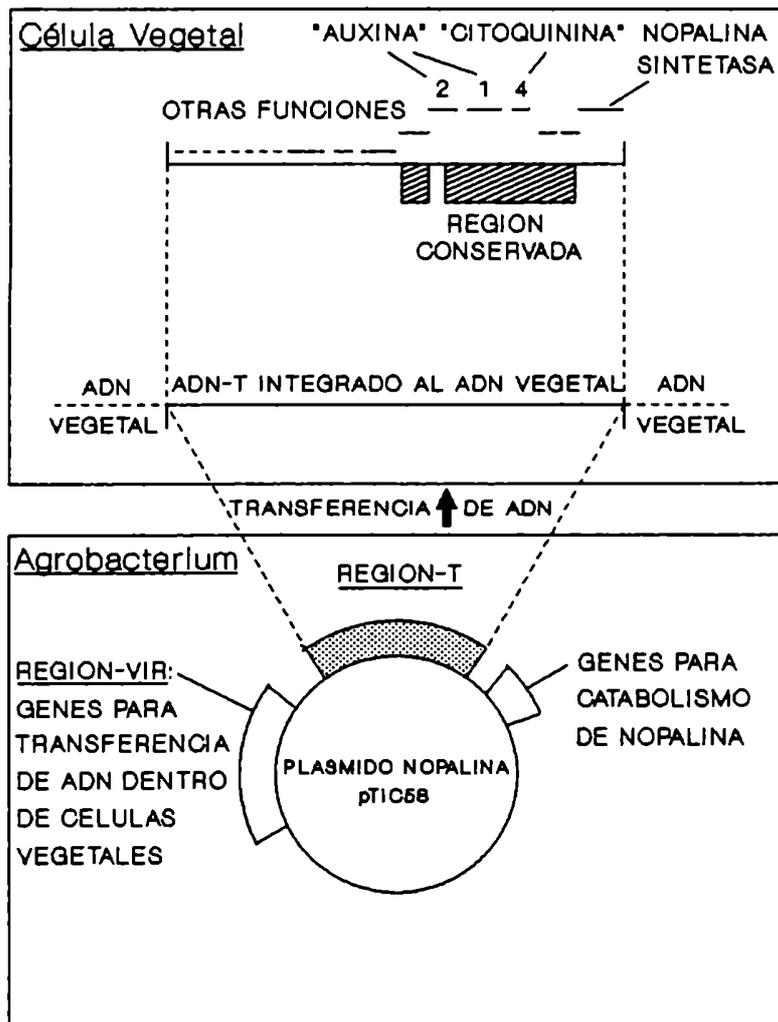
Transferencia del ADN-T

Agrobacterium tiene tres componentes genéticos que permiten la transformación de células vegetales (Zambryski *et al*, 1989):

- a) La región móvil T (ADN-T), codificada en plásmidos, que es la que se integra al genoma vegetal pero, a diferencia de los transposones, no codifica las proteínas encargadas de la transferencia.

- b) La región de virulencia (vir) que aporta los elementos necesarios para la transferencia y está codificada en plásmidos.
- c) Cuatro regiones cromosómicas, cuyos productos están implicados en la adhesión de las bacterias a la célula vegetal.

El proceso de integración de ADN bacteriano en el genoma vegetal se produce tal como se esquematiza en la figura 33.



Todo el proceso puede considerarse como la adaptación de dos mecanismos diferentes ya existentes en la naturaleza: primero, la transferencia de ADN de la bacteria al citoplasma vegetal tiene claras analogías con la conjugación bacteriana, mientras que el paso posterior, la integración del ADN al genoma, se asemeja más a reacciones virales (Stachel y Zambryski, 1986).

Para que una planta sea susceptible a *Agrobacterium*, debe estar herida; en ese caso, las células involucradas producen compuestos fenólicos de bajo peso molecular, como la acetosyringona o hidroxi-acetosyringona, que actúan como inductores de los genes vir. Estos genes, a diferencia de los cromosomales, no son constitutivos. Para captar la señal vegetal actúan los productos de virA y virG, que actúan como sensor y regulador, respectivamente, constituyendo un auténtico sistema de dos componentes que se activa por fosforilación (Jin et al, 1990). El producto de VirG fosforilado activa la transcripción del resto de los genes vir; los productos de VirD₁ y VirD₂ codifican para endonucleasas y participan en la transferencia junto a los productos de VirE₂, VirB y VirC, aunque no se sabe qué función cumplen estos últimos. Además, antes de la transferencia la bacteria se adhiere a la célula vegetal y, para ello intervienen los productos de los cuatro loci genómicos citados: chvA y chvB que sintetizan y excretan β -1,2-glucano, cel que sintetiza fibrillas de celulosa y att que afecta a proteínas de la superficie celular (Zambrycki et al, 1989).

Transformación de células vegetales

El material genético transferido contiene dos tipos de genes: los genes "onc", cuyos productos determinan el efecto tumoral, y genes encargados de la síntesis y catabolismo de opinas. Estos compuestos, conjugados de azúcares o aminoácidos, sirven como mediadores químicos de parasitismo, favoreciendo la supervivencia y propagación de la bacteria portadora de plásmidos Ti o Ri. La

utilización de metabolitos vegetales para producir compuestos que la bacteria puede utilizar selectivamente, constituye una ventaja competitiva para el microorganismo.

Es decir, que las formas tradicionales de interacción entre bacterias y plantas, por las que las primeras obtienen de las segundas compuestos orgánicos para crecer, ha evolucionado en *Agrobacterium* a una forma más sofisticada y la combinación de genes que controlan el crecimiento (genes "onc") con los que controlan la síntesis de opinas en un fragmento de ADN transferible (ADN-T) asegura que las células vegetales que producen opinas proliferen activamente (Zambryski *et al*, 1989).

El crecimiento tumoral producido por *A. tumefaciens* se debe a la actividad de tres genes "onc": los genes 1 (iaaM), 2 (iaaH) y 4 (iptZ)(Weiler y Schröder, 1987). El gen 1 codifica para una triptofano 2-mono-oxigenasa que convierte triptofano en indol-3-acetamina y el gen 2 produce a partir de este sustrato ácido indol-3-acético (IAA) por su actividad de aminohidrolasa. El ácido indol-3-acético es una auxina, es decir una fitohormona.

El gen 4, por su parte, codifica para una isopentenil transferasa que convierte 5'AMP e isopentenilfosfato en una citoquinina activa. Las citoquininas forman otro grupo de hormonas vegetales.

La expresión cooperativa de estos tres genes conduce a una producción desregulada de fitohormonas que va a inducir la proliferación neoplásica de las células transformadas y de las células vecinas.

Por otra parte, la región ADN-T de los plásmidos Ri codifica aparentemente para diferentes mecanismos que individualmente inducen proliferación de raíces en algunas plantas y actúan concertadamente para producir ese efecto en otros tejidos vegetales. Uno de los mecanismos implica genes que codifican para auxinas análogos

a los genes *iaaM* e *iaaH* de plásmidos Ti. El otro mecanismo no implicaría síntesis de hormonas, sino que afectaría la vía de transducción de señales de las hormonas vegetales, aunque los datos aún son muy pocos (Zambryski *et al*, 1989).

OBJETIVOS

Si bien siempre se consideró a los mecanismos de transducción de señales procarióticas como procesos que no guardan relación con los que aparecen en organismos eucarióticos, los avances que se han logrado en ambas áreas de estudio están demostrando que, en realidad, se puede considerar que los mecanismos eucarióticos se organizan en una forma similar a la observada en bacterias aunque son, por supuesto, muchísimo más complejos.

Por lo tanto, los avances que se logren en procariotes pueden ser de suma utilidad para desentrañar modelos más refinados, como son los eucarióticos.

Siguiendo este criterio, se decidió analizar los mecanismos de transducción de señales en *Agrobacterium*, que es un género bacteriano importante para el estudio por los efectos que produce en plantas y por las posibilidades biotecnológicas que brinda.

En esta Tesis se presenta la caracterización de dos sistemas transductores muy difundidos, como son la adenilil ciclasa por un lado, y una GTPasa por otro; en este caso se trata de una proteína de tipo ras, siendo la primera vez que se reporta una proteína de esta familia en bacterias.

MATERIALES Y METODOS

AGROBACTERIUM

Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Se utilizaron las cepas A4 de *Agrobacterium rhizogenes* y A348 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Ambas especies se cultivaron en el medio MYA que tiene la siguiente composición:

manitol	8	g/l
extracto de levadura	5	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	g/l
casaminoácidos	0,5	g/l
NaCl	5	g/l

teniendo la solución un pH de 6,6. Los cultivos se realizaron a 28°C con agitación en Erlenmeyers con un volumen de medio equivalente a aproximadamente el 25% de la capacidad total. Para cultivar *A. rhizogenes*, se agregaron los siguientes antibióticos: Spectinomina (0,5 mg/ml) y Rifampicina (0,1 mg/ml), mientras que para *A. tumefaciens* se utilizó cloranfenicol (0,02 mg/ml). En el caso de *A. rhizogenes*, los cultivos se protegieron de la luz, dado que la rifampicina es fotosensible.

Las cepas se conservaron en cajas de Petri conteniendo el medio y los antibióticos adecuados, suplementados con agar 1,5% cultivadas a 28°C hasta observar crecimiento y luego conservadas a 4°C por períodos no mayores a un mes. Para el mantenimiento a largo plazo se utilizaron cultivos frescos en medio líquido suplementado con glicerol 20% y se congelaron a -70°C.

Los cultivos utilizados para estudiar la adenilil ciclasa se cosecharon a las 48 horas. Para analizar la proteína de tipo ras, se utilizaron cultivos en fase estacionaria tardía (72-96 horas).

Para la cosecha, los cultivos se centrifugaron a 10000xg durante 10 minutos a 4°C y el sedimento obtenido se congeló a -70°C hasta su uso.

Obtención de esferoplastos

Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en

sacarosa	20% P/P
<i>buffer</i> Tris-ClH	30 mM
pH 8	
EDTA	10 mM

Se utilizó 10 ml de *buffer* para un sedimento proveniente de 200 ml de cultivo. Una vez resuspendido por completo, se agregó lisozima (0,1 mg/ml) y luego de disolverla se incubó a 4°C durante 45 minutos, invirtiendo los tubos periódicamente con suavidad. Finalmente se centrifugó a 10000 xg durante 30 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante.

Fraccionamiento subcelular

Los esferoplastos se resuspendieron en sacarosa 20% P/P en

<i>buffer</i> Tris-ClH	30 mM
pH 8	
EDTA	3 mM
MgCl ₂	10 mM

y se agregó DNAsaI (0,05 mg/ml).

Se agitó para homogeneizar y luego se realizaron cinco ciclos de sonicación de 30 segundos cada uno con intervalos de 45 segundos en un Ultrasonic Processor W385 Heat Systems-Ultrasonics Inc. Luego se centrifugó a 3000 xg durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se sometió a ultracentrifugación. Previamente

se diluyó cinco veces agregando *buffer* sin sacarosa y luego se centrifugó a 105000 xg durante 3 horas a 4°C. El sobrenadante obtenido contenía la fracción citosólica y el sedimento la fracción de membranas totales. Para separar membranas internas y externas, el sedimento se resuspendió en sacarosa 20% en Tris-ClH 30 mM, pH 8,2 y se sembró sobre un gradiente discontinuo de sacarosa disuelta en el mismo *buffer* (10 ml de sacarosa 55% P/P más 10 ml de sacarosa 44% P/P). Se centrifugó a 68000 xg durante 16 horas a 4°C, obteniéndose las membranas internas en la interfase superior y las membranas externas en la interfase inferior. Cada interfase se centrifugó luego a 105000 xg durante 4 horas a 4°C para obtener un sedimento con la fracción de membranas deseada.

Solubilización de proteínas de membrana

Para solubilizar las proteínas unidas a membranas, el sedimento conteniendo la fracción de proteínas totales fue resuspendido en

<i>buffer</i> Tris-ClH	50 mM
pH 7,4	
glicerol	5% V/V
2-mercaptoetanol	1 mM
aprotinina	25 UI/ml

Se agregó colato de sodio hasta una concentración final de 0,5 M. Si el extracto se iba a sembrar en una columna de DEAE-celulosa, se omitió el agregado de NaCl.

Una vez resuspendido el sedimento, se agitó con agitador magnético a 4°C durante 1 hora y luego se centrifugó a 105000 xg durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante obtenido constituye la fracción de proteínas de membrana solubilizadas.

ADENILIL CICLASA

Purificación parcial. Métodos cromatográficos

Cromatografía en columnas de DEAE-celulosa (cromatografía de intercambio iónico)

Se sembraron 105 ml de fracción citosólica (37,8 mg de proteína) en una columna de DEAE-celulosa de aproximadamente 15 ml de capacidad previamente equilibrada con *buffer* A:

Tris-ClH 50 mM	50 mM
pH 7,4	
glicerol	5% V/V
2-mercaptoetanol	1 mM
aprotinina	25 u/ml

Se lavó la columna con 100 ml de *buffer* A y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl en el mismo *buffer*, incrementándose la concentración salina de 0 a 0,5 M. El volumen total del gradiente fue de 100 ml; se recogieron fracciones de 5 ml a una velocidad de 0,5 ml/min. Las fracciones con actividad de adenilil ciclasa se juntaron y constituyeron la preparación DEAE.

Para analizar la adenilil ciclasa unida a membranas, también se hizo un paso de purificación utilizando una columna de DEAE-celulosa. Se sembró en la columna el extracto obtenido al tratar la fracción de membranas totales con colato de sodio (1% P/V)(20 ml, 30 mg de proteína/ml) y se procedió como se describe en este punto.

Cromatografía en Ultrogel AcA34 (cromatografía de exclusión molecular)

La preparación DEAE fue dializada contra Tris-ClH 10 mM a 4°C durante 12 horas y luego concentrada contra una solución de sacarosa 2 M en Tris-ClH 10 mM, pH 7,4.

La fracción obtenida (0,8 ml, 0,226 mg de proteína) fue sembrada en una columna preparativa de Ultrogel AcA34 (45x0,75 cm). La columna se equilibró previamente con *buffer* A, al que se le agregó NaCl 0,15 M. Se eluyó con el mismo *buffer* recogiendo 50 fracciones de 1 ml cada una a un flujo de 0,5 ml/min.

Determinación de los parámetros moleculares e hidrodinámicos

Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa

Se prepararon gradientes de 5 a 20% P/V de sacarosa en agua u óxido de deuterio (D₂O) conteniendo

Tris-ClH	50 mM
pH 7,4	
2-mercaptoetanol	1 mM
EDTA	0,5 mM
NaCl	0,15 M

Los gradientes se armaron en tubos de acetato de celulosa correspondientes al rotor Beckman SW40. En ellos se sembró la preparación DEAE de fracción citosólica (0,4 ml; 0,55 mg de proteína/ml) y las siguientes proteínas marcadoras:

catalasa (hígado bovino)	0,1 mg/ml
malato dehidrogenasa (corazón porcino)	0,01 mg/ml
lactato dehidrogenasa (músculo de conejo)	0,03 mg/ml
citocromo C (corazón de caballo)	2 mg/ml

Se centrifugó a 100000 xg durante 18 horas a 4°C. Al finalizar la corrida se recogieron fracciones de 0,3 ml, succionando desde el fondo del tubo con una cánula conectada a una bomba peristáltica a una velocidad de 0,25 ml/min.

Filtración en geles

Se utilizó una columna analítica de Ultrogel AcA34 (30x0,75 cm) equilibrada con *buffer* A conteniendo NaCl 0,15 M. Se sembró la preparación DEAE obtenida de la fracción citosólica (0,5 ml, 0,55 mg prot/mol) y se eluyó a 4°C con el mismo *buffer* a un flujo de 0,5 l/min recogiéndose fracciones de 0,8 ml.

Se agregó a la muestra las proteínas marcadoras tal como se describió en el punto anterior.

Cálculo de los parámetros moleculares e hidrodinámicos

Volumen específico parcial

El método utilizado es el que desarrollaron Clarke (1970) y Meunier *et al* (1972) para determinar el volumen específico parcial de complejos proteína-detergente. Dicho método se basa en el análisis de los coeficientes de sedimentación en gradientes de densidad hechos en H₂O y D₂O, según el procedimiento descrito por Edelstein y Schachman (1967), cuyo fundamento es el cambio en el coeficiente de sedimentación producido por el aumento de densidad de la solución por el uso de D₂O cuando la cantidad de detergente unido es conocida.

De acuerdo a Martin y Ames, la distancia r_i recorrida desde el origen por cualquier macromolécula sometida a ultracentrifugación en un medio i ($i=4$ para H₂O; $i=H$ para D₂O) es:

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

donde K_i es una constante en un medio, a una dada densidad para cualquier macromolécula con el mismo volumen específico parcial; $S_{20,w}$ es el coeficiente de sedimentación de la macromolécula determinado en H_2O a $20^\circ C$; \bar{v} es el volumen específico parcial, y ρ_i es la densidad del medio i (Martin y Ames, 1961). Dado que la densidad ρ_i aumenta linealmente a lo largo del gradiente de sacarosa, se hace una estimación promedio de ese parámetro tomando como valor $r_i/2$. Bajo estas condiciones, el error en ρ_i es menor que el 0,5%. Entonces, dados dos gradientes de sacarosa realizados en H_2O y D_2O , resulta:

$$\frac{r_H}{r_D} = \frac{K_H(1-\bar{v}\rho_H)}{K_D(1-\bar{v}\rho_D)} \quad (2)$$

siendo entonces

$$\bar{v} = \frac{r_H K_D - r_D K_H}{r_H K_D \rho_D - r_D K_H \rho_H} \quad (3)$$

Si se divide al numerador y al denominador del segundo término de la igualdad (3) por $r_D K_H$, resulta:

$$\bar{v} = \frac{\frac{r_H K_D}{r_D K_H} - 1}{\frac{r_H K_D \rho_D}{r_D K_H} - H} \quad (4)$$

Por otro lado, la ecuación (2) puede expresarse del siguiente modo:

$$\frac{r_D K_H}{r_H K_H} = \frac{(1 - \bar{v}\rho_H)}{(1 - \bar{v}\rho_D)} \quad (5)$$

y según la ecuación de Svedberg:

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

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

De las ecuaciones (4), (5) y (6), se deduce que:

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

La ecuación (7) se utilizó para calcular el volumen específico parcial de la adenilil ciclasa. Los valores de S_H , S_D , η_H y η_D fueron obtenidos comparando la movilidad de la adenilil ciclasa con respecto a la de las proteínas marcadoras utilizadas en ambos gradientes, y cuyos valores numéricos se presentan en Resultados y Discusión.

Las densidades ρ_D y ρ_H fueron determinadas por gravimetría, utilizando una micropipeta de 0,05 ml.

Radio de Stokes

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

Peso molecular

El peso molecular de la adenilil ciclasa fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación, según Siegel y Monty (1966):

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

siendo N, número de Avogadro; $\eta_{20,w}$, viscosidad del agua a 20°C (1,100 10⁻² g/cm.seg); a, radio de Stokes; S_{20,w}, coeficiente de sedimentación a 20°C en H₂O; \bar{v} , volumen específico parcial.

Coefficiente friccional

El coeficiente friccional se calculó utilizando los parámetros moleculares obtenidos previamente (\bar{v} , a, M) de acuerdo a la siguiente ecuación:

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

siendo f el coeficiente de fricción de la proteína y f₀ el coeficiente de fricción de la proteína esférica y anhidra de igual masa.

Parámetros de las proteínas marcadoras

En la tabla 4 se resumen los parámetros moleculares de las proteínas marcadoras utilizadas en las centrifugaciones en gradientes de sacarosa y en las filtraciones en geles. La tabla se confeccionó en base a los datos reunidos por Haga (Haga *et al*, 1977).

Proteína	Coefficiente de sedimentación	Vol. esp. parcial	Radio de Stokes	Peso Molecular
catalasa	11,3	0,73	5,21	247000
lactato dehidrogenasa	7,3	0,74	4,75	142000
malato dehidrogenasa	4,32	0,74	3,69	70000
citocromo C	1,71	0,73	1,87	13300

Ensayo de la actividad de la adenilil ciclasa

El método utilizado fue el desarrollado por Rodbell (1967) con las modificaciones de Salomon *et al* (1974).

Se incubaron 50 μ l de fuente enzimática con 50 μ l de una mezcla de reacción que tiene la siguiente composición:

Buffer Tris-ClH 500 mM pH 7,4	10 μ l
3-isotubil 1-metilxantina 2 mM-AMPC 10 mM	10 μ l
fosfocreatina 20 mM-creatina quinasa 2 mg/ml	10 μ l
cación divalente (MnCl ₂ o MgCl ₂ 25 mM	10 μ l
α^{32} -ATP 5 mM (activ.específ. 50-200 cpm/pmol)	10 μ l

Se incubó 10 minutos a 37°C y se detuvo la reacción 0,1 ml de una solución que tiene la siguiente composición:

ATP	40 mM
³ H-AMPC	12,5 mM

Luego se calentó 3 minutos a 100°C.

El AMPC formado se purificó de acuerdo al procedimiento de cromatografía secuencial desarrollado por Salomon (1979). Este método se basa en la separación del AMPC radioactivo de los fosfatos y

nucleótidos radioactivos o no (ATP, ADP, AMP, PPI, Pi) a través de una resina intercambiadora de cationes (Dowex AG50W-X4, forma H⁺), donde los protones de la resina se intercambian con los grupos -NH₂⁺ de la adenina de los nucleótidos. El AMPc es el único compuesto parcialmente retenido por la resina, pues su carga positiva (adenosina) no es contrarrestada por completo por la única carga negativa del grupo fosfato. Luego del pasaje por la resina Dowex AG50W-X4, el AMPc obtenido es purificado adicionalmente en una columna de alúmina neutra, que retiene a los compuestos fosforilados aún presentes, excepto el AMPc que no se retiene a pH neutro.

El esquema de la cromatografía secuencial es el siguiente: se agrega 1 ml de H₂O en el tubo de reacción y se siembra sobre la columna de Dowex AG50W-X4 (4x0,5 cm) descartándose el eluido. Se agregan 4 ml de H₂O sobre la columna de Dowex, descartándose el eluido. Se agregan 6 ml de H₂O sobre la columna de Dowex, recogiendo sobre columnas de alúmina neutra (3x0,5 cm).

Se agrega 1 ml de Imidazol ClH 0,1 M, pH 7,5 sobre columna de alúmina, descartándose el eluido. Se agregan 4 ml de Imidazol ClH 0,1 M, pH 7,6 sobre columna de alúmina, recogiendo en viales de centelleo líquido. La radioactividad se midió según el método de Bray (1960), agregando a los viales 13,5 ml de solución centelleadora (naftaleno-dioxano).

Las lecturas de radioactividad se realizaron en un contador de centelleo líquido marca Beckman LS1801. Los parámetros utilizados fueron los siguientes: para ³H (el AMPc tritiado agregado al finalizar la incubación permite calcular el porcentaje de recuperación del AMPc después de la purificación cromatográfica) se usó una ventana de 0 a 200 y para ³²P la ventana usada fue de 500 a 1000. Las recuperaciones obtenidas habitualmente fueron del orden del 50% al 80%.

PROTEINA DE LA FAMILIA RAS

Electroforesis en geles de poliacrilamida

El método utilizado para geles de poliacrilamida desnaturalizantes fue el de Laemmli (1970).

Se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS, de 10x12x1,5 mm de las siguientes características:

gel separador: 10 ml 12% acrilamida, pH 8,8
gel concentrador: 5 ml 5% acrilamida, pH 6,8

Los geles se prepararon de acuerdo al siguiente esquema:

	Separador	Concentrador
Acrilamida + Bis Acrilamida (30:1)	4 ml	0,83 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,05 ml
Tris-ClH 1,5 M, pH 8,8	2,5 ml	-
Tris-ClH 1,0 M, pH 6,8	-	0,63 ml
H ₂ O	3,3 ml	3,4 ml
TEMED	4 µl	5 µl
S ₂ O ₈ (NH ₄) ₂	10 mg	5 mg

Todas las muestras fueron tratadas con un volumen de *buffer* de craqueo 2x.

SDS 2% (v/v)
2-mercaptoetanol 2% (v/v)
Tris 50 mM glicina 400 mM, pH 8
azul bromofenol 0,02% (p/v) durante 3 minutos a 100°C y luego sembradas en gel.

El *buffer* utilizado para la corrida tenía la siguiente composición:

Tris	3,03 g/l
glicina	14,4 g/l
SDS	0,1% y la electroforesis se

efectuó a una corriente constante de 15 mA para el gel concentrado y de 25 mA para el separador.

En las corridas electroforéticas se utilizaron como marcadores de peso molecular las siguientes proteínas:

a)	triosafosfato isomerasa	26.600 D
	lactato hidrogenasa	36.500 D
	fumarasa	48.500 D
	piruvato quinasa	58.000 D
	fructosa-6-fosfato quinasa	84.000 D
	β -galactosidasa	116.000 D
	α 2-macroglobulina	180.000 D
b)	α -lactoalbúmina	14.200 D
	inhibidor de tripsina de soja	20.100 D
	tripsinógeno	24.000 D
	anhidrasa carbónica	29.000 D
	gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa	36.000 D
	ovoalbúmina	45.000 D
	seroalbúmina bovina	66.000 D

La primera mezcla estaba formada por proteína preteñidas.

En los casos en que fue necesario, los geles se tiñeron con la siguiente solución:

metanol	45% (v/v)
ácido acético	10% (v/v)
Coomasie Brilliant blue R-250	0,2% (p/v) durante

una hora y luego se los decoloró con una solución metanol-ácido acético-agua (40:10:50) durante 4 horas.

Para los ensayos de ADP-ribosilación con [³²P]NAD y unión de α[³²P]GTP, los geles, una vez teñidos y decolorados, fueron secados y expuestos con pantalla intensificadora a -70°C por períodos que variaron entre 12 y 72 horas.

Ensayos bioquímicos de identificación

Unión específica de [³⁵S]GTP-γ-S

El método que se utilizó es el de Northup (Northup *et al*, 1982) modificado por Waldo (Waldo *et al*, 1987).

Se incubaron 0,1 ml de muestra (100-150 μg de proteína por ensayo) con 0,08 ml de *buffer* de reacción

Tris-ClH	20 mM, pH 8
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
NaCl	100 mM
Lubrol PX	0,1% (v/v) y la reacción se

inició agregando 0,02 ml de la siguiente solución:

[³⁵ S]GTPγ-S	10 mM (300000 cpm/ensayo)
MgCl ₂	10 mM
Lubrol PX	0,1% (v/v) durante 60 minu-

tos a 30°C.

La reacción se detuvo agregando 2 ml de *buffer stop* frío:

Tris-ClH	20 mM, pH 8
NaCl	100 mM
MgCl ₂	25 µM
Na ₃ PO ₄	1 mM y se filtró inmedia-

tamente a través de discos de nitrocelulosa (BA85 Schleicher and Schuell).

Cada filtro se lavó 5 veces con 2 ml de *buffer stop* frío y luego se secaron en estufa a 75°C durante 15 minutos. Los filtros se colocaron en viales plásticos, se les agregó 1 ml de la solución centelleadora (Tolueno-Omnifluor) y la radioactividad se detectó en un contador de centelleo líquido marca Beckman LS1801 utilizando ventana abierta, ya que no había mezcla de isótopos.

ADP ribosilación

Se utilizó una modificación de los métodos de Goldsmith *et al* (1988) y Casey *et al* (1989b).

Para determinar la incorporación de ADP ribosa a proteínas catalizadas por toxinas de *Vibrio cholerae* y *Bordetella pertussis* se incubaron 40 µl de membranas resuspendidas en el siguiente *buffer*:

Tris-ClH, pH 8	50 mM
EDTA	1 mM
DTT	2 mM
timidina	10 mM
Lubrol PX	0,1% v/v con 5 µl de toxinas
<i>cólera</i>	10 µg/ml
<i>pertussis</i>	5 µg/ml previamente activa-

das en una solución de DTT 10 mM durante 30 minutos a 30°C iniciándose la reacción al agregar 5 µl de la siguiente solución:

[³² P]NAD	1 μM (4.10 ⁸ cpm/ensayo)
ATP	1 mM

Se incubó 40 minutos a 30°C y se detuvo la reacción por agregado de un volumen de *buffer* de craqueo 2x; se calentó 3 minutos a 100°C y luego se sembraron las muestras en el gel. Para determinar especificidad de la reacción, se agregó NAD 100 μM para desplazar la marca radioactiva incorporada.

Unión de α[³²P]GTP en geles por fotoafinidad

Se utilizó el método de Linse *et al* (1988) que permite la incorporación de α[³²P]GTP a proteínas capaces de unir dicho nucleótido en forma covalente por fotoafinidad.

Se resuspendieron las membranas en *buffer* Tris-ClH 20 mM, pH 8 y se les agregó:

MgCl ₂	1 mM
DTT	1 mM
ATP	1 mM
α[³² P]GTP	4.10 ⁷ cpm/ensayo/3000 Ci/mmol

en un volumen de 0,05 ml.

Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se irradiaron las muestras con luz UV (254 nm lámpara de Hg HBO 100W/2, Osram) a una distancia de 10 cm durante 10 minutos. La reacción se detuvo agregando un volumen de *buffer* de craqueo 2x y se sembraron en un gel. Luego se fijó el gel, se lavó con solución fijadora suplementada con PO₄H₃ 1 mM, se secó y se expuso a -70°C durante 72 horas. Dado que con el lavado no se eliminaba todo el nucleótido unido al gel inespecíficamente, se optó luego por transferir las proteínas del gel a nitrocelulosa y exponer el filtro en las mismas condiciones que el gel seco. Se logró de este modo disminuir sensiblemente el "ruido" de fondo.

Para la transferencia se utilizó el método de difusión. Para ello se colocó nitrocelulosa a ambos lados del gel y luego dos hojas de papel Whatmann 3MM a cada lado, y el conjunto se sumergió en un recipiente con *buffer* fosfato 25 mM, pH 6,5 y se agregó un peso de 4 Kg; de este modo se obtuvo una transferencia bidireccional por capilaridad.

Técnicas inmunológicas

Inmunoprecipitación

Se utilizó el método descrito por Harlow y Lane (1988).

Se obtuvieron esferoplastos de un sedimento de *A. rhizogenes* proveniente de 100 ml de cultivo y dichos esferoplastos se resuspendieron en

<i>buffer</i> Tris-ClH	50 mM, pH 7,4
glicerol	5% (v/v)
2-mercaptoetanol	1 mM
SDS	2% y se sonicó (5 ciclos de

30 segundos cada uno con intervalos de 30 segundos), se calentó 1 minuto a 100°C y se centrifugó a 10000 xg durante 10 minutos. El sobrenadante se utilizó para la inmunoprecipitación.

Como paso previo se clarificó el homogenato. Este paso permitió eliminar cualquier producto presente en el homogenato que pudiera reaccionar con el segundo anticuerpo (conejo anti-rata) o con la proteína A. Para ello se incubó una alícuota de 1 ml de homogenato (15 mg de proteínas) con suero de conejo anti-rata (dilución 1:200) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Luego se agregó 0,5 ml de proteína A-Sepharosa 10% (v/v) y se incubó 1 hora con agitación. Se centrifugó 5 minutos a 10000 xg y el sobrenadante obtenido es el homogenato clarificado.

El homogenato clarificado se dividió en dos alícuotas que se diluyeron a 1 ml de volumen final con *buffer*, de modo que la solución tenga la siguiente composición:

Tris-ClH	50 mM, pH 7,4
NaCl	0,15 M
SDS	1% (v/v)
Tritón X100	1% (v/v)
NP40	0,5% (v/v)(solución de detergente)

Una de las alícuotas se incubó con el anticuerpo Y13-259 (Furth *et al*, 1982) que es un monoclonal anti p21 de rata, en dilución 1:100 durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Luego se agregó suero de conejo anti-rata en dilución 1:100 a cada muestra y se incubó 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Finalmente, el complejo antígeno-anticuerpo se precipitó por agregado de proteína A-Sepharosa (10% v/v). Luego de 1 hora a temperatura ambiente con agitación, se centrifugó 5 minutos a 10000 xg. El sedimento obtenido se lavó 4 veces con 1 ml de solución de detergentes y, finalmente, se lo resuspendió en 50 μ l de *buffer* de craqueo 2x. Se calentó 10 minutos a 85°C, se centrifugó 5 minutos a 10000 xg y el sobrenadante se sembró en un gel de poli-acrilamida.

Immunoblot

a) Electrotransferencia

La transferencia se llevó a cabo colocando la membrana de nitro-celulosa en contacto directo con el gel. El "sandwich" formado se colocó en un campo eléctrico que permitió el pasaje de las proteínas a la membrana.

Se utilizaron los siguientes *buffers*:

Buffer catódico:	Tris pH 9,4	25 mM
	ácido γ amino-n-hexanoico	40 mM
	metanol	20% (v/v)
Buffer anódico 1:	Tris pH 10,4	300 mM
	metanol	20% (v/v)
Buffer anódico 2:	Tris pH 10,4	25 mM
	metanol	20% (v/v)

Se colocaron 6 capas de papel Whatmann 3MM humedecidas en *buffer* anódico 1 sobre el ánodo; luego se colocaron 3 capas del mismo papel embebidas en *buffer* anódico 2. Sobre ellas se colocó la nitrocelulosa y luego el gel. Luego se agregaron 6 capas de papel Whatmann humedecidas en el *buffer* catódico. Finalmente, se colocó el grafito catódico. Luego del agregado de cada elemento (papel, nitrocelulosa, gel) del "sandwich", se procedió a eliminar las burbujas para evitar problemas en la transferencia. Se conectó el aparato a una fuente de poder, realizándose la transferencia a una intensidad constante de 0,8 mA/cm² de gel durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para determinar la eficiencia de la transferencia y para ubicar los marcadores de peso molecular cuando no eran preteñidos, se tiñó la nitrocelulosa luego de la transferencia con una solución de Rojo Ponceau S 0,5% (p/v) en ácido acético 1% (v/v). Antes de la detección con el anticuerpo el colorante se eliminó lavando la nitrocelulosa con agua.

b) Bloqueo

Realizada la transferencia, se bloqueó la membrana de nitrocelulosa para evitar la adsorción inespecífica de los distintos reactivos. Para ello, se sumergió la membrana en la solución de bloqueo constituida de la siguiente forma:

leche descremada 5% (p/v)
 glicina 2% (p/v)
 lisado de *E. coli* 0,5% (v/v) en *buffer* TBS 1X
 cuya composición es:

Tris-ClH, pH 8 25 mM
 NaCl 0,9% (p/v). Se incubó 30
 minutos a temperatura ambiente, con agitación.

c) Adición de anticuerpos

Para la detección del antígeno (proteínas G o p21^{ras}) se utilizaron distintos anticuerpos, cuyo detalle se observa en la tabla 5.

ANTICUERPO	ANTIGENO		DILUCION	SEGUNDO
	RECONOCIDO	HECHO EN		ANTICUERPO
Y13-259	p21 ^{ras}	rata	1:100	cabra anti-rata AP
pan Ab1	p21 ^{ras}	ratón	1:100	cabra anti-ratón AP
pan Ab2	p21 ^{ras}	ratón	1:100	cabra anti-ratón AP
RM 1	α_s	conejo	1:300] cabra anti conejo biotinilado
9192	α_c	conejo	1:300	
9190	α_i	conejo	1:300	
SW ₁	β	conejo	1:300	

Los anticuerpos se prepararon en solución bloqueante adicionada con Tween 20 0,05% (v/v).

Se eliminó la solución de bloqueo y la membrana se sumergió en la solución que contenía el primer anticuerpo incubándose 90 minutos a temperatura ambiente con agitación. Luego se hicieron 4 lavados

de 5 minutos cada uno con *buffer* TBS 1x adicionado con Tween 20 0,05% (v/v). Luego se incubó 1 hora con el segundo anticuerpo; el anticuerpo correspondiente se preparó en la misma solución que el primer anticuerpo, adicionándose suero normal de cabra 1% (v/v). Luego se hicieron 4 lavados de 5 minutos cada uno con TBS 1x-Tween 20 0,05%. Cuando se utilizó un segundo anticuerpo biotinilado, se incubó 1 hora con solución de avidina-biotina (Vectastain kit) acoplada a fosfatasa alcalina preparada según instrucciones del fabricante.

Finalmente se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBX 1x tanto para sueros biotinilados como para sueros acoplados directamente a fosfatasa alcalina.

d) Detección

La membrana se lavó 2 veces durante 5 minutos con el siguiente *buffer*:

Tris-ClH, pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM (<i>buffer</i> fosfatasa)

para equilibrar la membrana en el pH adecuado y luego se agregó la solución reveladora. Los sustratos utilizados fueron:

Bromo-cloro-indoil-fosfato (BCIP)	60 mg/ml en dimetil formamida 100%
Nitro blue tetrazolium (NBT)	50 mg/ml en dimetil formamida 70%

La solución se preparó agregando 66 μ l de NBT y 33 μ l de BCIP a 10 ml de *buffer* fosfatasa. Se incubó el filtro con esta solución por períodos de 5 minutos (para anticuerpos biotinilados) o de 20

minutos (para los otros anticuerpos), en oscuridad. La reacción se detuvo colocando las membranas en una solución diluída de EDTA.

Marcado con [³⁵S]Metionina

Marcado metabólico con [³⁵S]Metionina

Se utilizó el método descrito por Harlow y Lane (1988).

Se creció un cultivo de 5 ml en medio MYA durante una noche. Luego se diluyó 1:10 en medio mínimo M9 que tiene la siguiente composición:

Na ₂ HPO ₄	0,6% (P/V)	
KH ₂ PO ₄	0,3% (P/V)	
NaCl	0,5% (P/V)	
NH ₄ Cl	0,1% (P/V)	y luego

de autoclavar y enfriar se le agregaron las siguientes soluciones estériles:

MgSO ₄ 1 M	2 ml/l	
Sacarosa 20% ((P/V)	10 ml/l	
CaCl ₂ 1 M	0,1 ml/l	y se ajustó el pH

en 7,4.

Se incubó 3 horas a 30°C hasta alcanzar una D.O. de 0,5 y en ese momento se hizo la marcación. Para ello se agregó 100 µCi de [³⁵S]Metionina (1200 Ci/mmol) y se incubó durante 30 minutos a 30°C. La mitad del cultivo se cosechó (pulso) y la otra mitad se resuspendió en medio mínimo sin radioactivo y se incubó 2 horas a 30°C (caza) luego de los cuales se cosechó.

El sedimento obtenido se resuspendió en 0,1-0,2 ml de *buffer* TEN, cuya composición es la siguiente:

Tris-ClH, pH 8	5	mM
EDTA	0,5	mM
NaCl	5	mM

Digestión del ADN con enzimas de restricción

Los ensayos de restricción se realizaron utilizando 10 µg de ADN (estimado por comparación de la banda con bandas de ADN de masa conocida en minigeles de agarosa). El protocolo utilizado tiene el siguiente esquema:

ADN	25 µl (10 µg)
<i>buffer</i> H	10 µl
enzima	1 µl (50 U)
H ₂ O	64 µl

siendo el volumen final de 0,1 ml. Se utilizaron las enzimas BamHI, PstI y EcoRI. Cuando se cortó con dos enzimas, se agregó 1 µl de cada una y 63 µl de H₂O. La composición del *buffer* H es la siguiente:

Tris-ClH, pH 7,5	10	mM
MgCl ₂	10	mM
NaCl	100	mM
DTT	1	mM

Las incubaciones se llevaron a cabo durante 4 horas a 37°C.

Electroforesis en geles de agarosa

Concluida la reacción de restricción, el ADN digerido se precipitó con 2 volúmenes de etanol 96% (V/V) a -70°C y se resuspendió en 20 µl de *buffer* TE 50:2 (Tris-ClH, pH 8 50 mM, EDTA 2 mM) y se le agregó 5 µl de *buffer* de siembra 5x cuya composición es:

glicerol	50% (V/V)
TBE 5x	
azul de bromofenol	1% (P/V)

Las muestras se sembraron en geles de agarosa 0,8% (P/V) en *buffer*TBE cuya composición es:

Tris-borato	89 mM
ácido bórico	89 mM
EDTA	2 mM

y se agregó bromuro de etidio (0,5 µg/ml). El *buffer* de corrida utilizado fue TBE. La corrida se llevó a cabo a un campo de 5-10 V/cm a temperatura ambiente.

Los geles fueron fotografiados a través de un transiluminador de luz UV de 300 nm, utilizando una cámara Polaroid MP-4 con filtro rojo (RPC4) con película Polaroid 667.

Como marcadores de tamaño se utilizó el marcador λADN-HdIII(bp): 23130-9416-6557-4361-2322-2027-564-125.

Southern blot

Se utilizó el método descrito por Southern (1975).

Luego de la corrida electroforética, el gel se trató con HCl 0,2 N durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de la hidrólisis ácida, se desnaturalizó el ADN tratándolo con NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, se equilibró haciendo 4 lavados de 30 minutos cada uno con NH₄ acetato 1 M, NaOH 0,02 M a temperatura ambiente.

Como membrana se utilizó Hybond. Antes de ponerla en contacto con el gel, se la trató durante 5 minutos con *buffer* SSC 2x cuya composición es:

NaCl	0,3 N
citrate de sodio	0,03 N

Finalmente se realizó la transferencia por capilaridad, usando *buffer* SSC 6x, durante 16 horas. Luego de la transferencia el filtro se lavó 30 segundos con NaOH 0,4 N y luego 15 minutos con Tris-ClH, pH 7,5 200 mM, SSC 2x. Finalmente se lo iluminó con luz UV (300 nm) durante 5 minutos para fijar el ADN al filtro.

Preparación de sondas radioactivas

Se utilizó el método de *random multi-priming*. Para ello se usó el kit de Amersham (RPN 1600Z).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 μ l utilizando 50 ng de ADN. El ADN se hirvió durante 3 minutos y luego se agregaron los componentes del kit (*primer*, dNTPs, *buffer* y enzima polimerizante), según instrucciones del fabricante y, finalmente, se agregó el nucleótido radioactivo (α [32 P]dNTP, 3000 Ci/mmol). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 6 horas. La sonda marcada se aisló por doble precipitación con 1/2 volumen de NH₄ acetato 7,5 M y 2 volúmenes de etanol 96% (V/V) a -70°C. Finalmente se resuspendió en 0,2 ml de H₂O y se hirvió durante 3 minutos.

Hibridación

Las membranas se ubicaron en bolsitas a las cuales se les agregó la solución de hibridación:

SSC	5X	
formamida	25% (V/V)	
SDS	1% (P/V)	
Denhardt	2X	
ADN esperma de salmón	100 μ g/ml	
Dextran sulfato	10% (P/V)	en H ₂ O

siendo el volumen final de 10 ml. La composición de la solución de Denhardt 1X es la siguiente:

BSA	0,02% (P/V)
Ficoll	0,02% (P/V)
Polivinilpirrolidona	0,02% (P/V)

Se realizó una prehibridación a 42°C durante dos horas y luego se inyectó la sonda radioactiva. Se incubó a 42°C durante 12-16 horas con agitación.

Concluida la reacción, los filtros fueron lavados con solución de lavado:

SSC	0,6X	
SDS	0,5% (P/V)	4 veces

durante 30 minutos cada vez. Finalmente, las membranas fueron expuestas con película radiográfica AGFA (CURIX RP1) con pantalla intensificadora a -70°C durante 48 horas.

PROCEDIMIENTOS ANALITICOS

Determinación de proteínas

Se utilizó el método de Lowry *et al* (1951) utilizando sero-albúmina bovina (BSA) cristalina como patrón. Para cuantificar proteínas en distintos pasos de purificación, se midió la absorbancia a 280 nm/260 nm calculándose la concentración proteica según el método de Peterson (1983).

$$\text{concentración (mg/ml)} = (1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$$

Determinación de la posición de las proteínas marcadoras en los gradientes de sacarosa y en las columnas de Ultrogel AcA34

Citocromo C: fue detectado por su absorbancia a 410 nm.

Malato Dehidrogenasa: se determinó su actividad por el consumo de NADH, en presencia de oxalacetato, siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm según el método del manual de enzimas de Worthington (1972).

Lactato Dehidrogenasa: su actividad se determinó por el consumo de NADH en presencia de piruvato, en forma similar a la malato dehidrogenasa.

Catalasa: la actividad fue medida siguiendo el consumo de H₂O₂ por conversión de yoduro a yodo, según el método de Terenzi *et al* (1971).

Obtención de membranas para controles positivos

Obtención de membranas de *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizó el método descrito por Toda *et al* (1985) con modificaciones menores. Se utilizó la cepa X-2180 βa, gentilmente cedida por el Dr. Juan José Miret del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar". Se creció un cultivo de 25 ml en medio YPD cuya composición es:

extracto de levadura	1% (P/V)	
peptona	2% (P/V)	
dextrosa	2% (P/V)	durante

una noche. Se cosechó por centrifugación y luego se prepararon esferoplastos. Para ello se los resuspendió en un *buffer* con la siguiente composición:

sorbitol	1 M	
buffer citrato pH 5,8	0,1 M	
EDTA	10 mM	y se agre-

gó 0,6 ml de glucosidasa incubándose 30 minutos a 37°C. Se centrifugó 10 minutos a 10000 xg y los esferoplastos se resuspendieron en el siguiente *buffer*:

Tris-ClH, pH 7,4	50 mM	
glicerol	5% (V/V)	
2-mercaptoetanol	1 mM	
MgCl ₂	10 mM	y se agre-

gó DNasaI (0,05 mg/ml) y se lisó con 5 ciclos de sonicado de 30 segundos cada uno con intervalos de 30 segundos. Se centrifugó 15 minutos a 3000 xg y el sobrenadante se ultracentrifugó a 105000 xg durante 1 hora. El sedimento obtenido contenía la fracción de membranas.

Obtención de membranas de segmentos externos de bastones de retina bovina (ROS)

El método que se utilizó es una modificación del de Papermaster y Dreyer (1974).

Se tomaron 60 ojos de vacas adultas decapitadas en el día. Se separó la parte anterior del ojo (iris, cristalino) de la parte posterior (retina, coroides, nervio óptico) y se eliminó el humor vítreo. Se extrajo la retina cuidadosamente, se cortó el nervio óptico y se la colocó en un tubo de centrifuga (10 retinas por tubo). Se agregó 10 ml del siguiente *buffer*:

Tris-ClH, pH 7,4	5 mM	
sacarosa	40% (P/V)	
NaCl	65 mM	
MgCl ₂	2 mM	y se homo-

geneizó por Vortex durante 1 minuto. Este paso permitió liberar

los bastones del resto del tejido y separar el segmento externo (ROS) del interno (RIS). Se centrifugó a 2000 xg durante 4 minutos y se juntó con los sobrenadantes filtrándolos a través de una red de nylon de 54 μ m. A los filtrados se les agregó el doble de volumen de *buffer* Tris-ClH 50 mM, pH 7,4-MgCl₂ 1 mM y se centrifugó a 12000 xg durante 40 minutos.

Los sedimentos obtenidos se resuspendieron en el mismo *buffer* suplementado con sacarosa 0,77 M y se sembraron sobre un gradiente discontinuo de sacarosa 0,84 M, 1,00 M y 1,14 M y se centrifugaron a 60000 xg durante 30 minutos (Rotor SW28).

La interfase 0,84 M-1,00 M contenía la fracción de ROS pura y se tomó con cuidado con pipeta Pasteur. Se centrifugó a 1500 xg durante 30 minutos y luego se hicieron 2 lavados para eliminar la sacarosa. Los precipitados de ROS obtenidos se guardaron a -70°C hasta su uso. Todos los pasos descriptos se llevaron a cabo bajo luz roja difusa.

Obtención de membranas de cerebro bovino

Los cerebros se homogeneizaron en NaHCO₃ 1 mM utilizando un homogeneizador Ultraturrax. Cumplido este paso, se centrifugó 15 minutos a 3000 xg y el sobrenadante se ultracentrifugó a 105000 xg durante una hora. El precipitado obtenido contenía la fracción de membranas de cerebro bovino.

REACTIVOS

DEAE-celulosa (DE-52) de Whatman Chemical Inc. (Clifton, NJ, USA)

Ultrogel AcA34 de LKB-Producter (Bromma, Suecia)

Alúmina neutra de MERK (Darmstadt, Alemania)

Resina Dowex AG50 W-X4 (200-400 mesh), acrilamida, bisacrilamida

de Bio-Rad (Richmond, CA, USA)

Material radioactivo de NEN-Dupont (Delaware, USA)

Aprotinina de Bayer (Liverkusen, Alemania)

Tris-base, MIX, BSA, catalasa de hígado de ternera, citocromo C de corazón de caballo, malato dehidrogenasas de corazón porcino, lactato dehidrogenasa de músculo de conejo, spectinomycin, rifampicina, cloranfenicol, lisozima, DNasaI, óxido de deuterio, fosfocreatina, creatina quinasa, ATP, AMP cíclico, marcadores de PM de proteínas, glicina, toxinas bacterianas, GTP, GTP γ S, Lubrol PX, proteína A-Sepharosa, NBT, BCIP de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

Enzimas de restricción y sus *buffers* de boehringer (Manheim, Alemania)

Anticuerpos anti p21^{ras} de Oncogene Science Inc. (NY, USA)

El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

RESULTADOS Y DISCUSION

ADENILIL CICLASA DE *Agrobacterium*

Propiedades generales

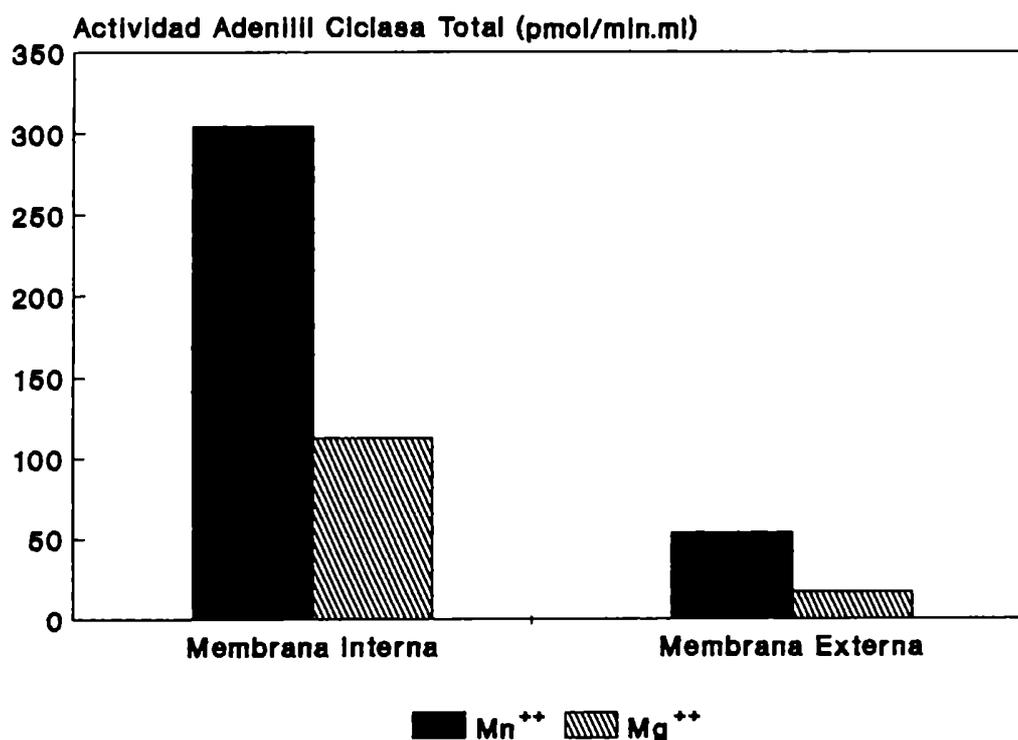
Localización subcelular. Actividad en las distintas fases del cultivo

Como primer paso en el estudio de los mecanismos de transducción de señales ambientales en *Agrobacterium*, se decidió caracterizar la adenilil ciclasa de esta bacteria, ya que constituye un sistema ampliamente difundido en la Naturaleza.

En primer lugar, se analizó la distribución subcelular que presenta la enzima. Para ello se realizó un fraccionamiento subcelular según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. En la tabla 6 se resumen los datos obtenidos con un cultivo de 48 horas.

AGREGADOS AL BUFFER	FRACCION	ACTIVIDAD TOTAL ($\mu\text{mol}/\text{min}$)		ACTIVIDAD ESPECIFICA ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg prot}$)	
		Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺
	Homogenato	12790,7	683,6	790,1	42,0
Ninguno	Sedimento 5000 g	3815,2	200,7	230,5	12,9
	Sedimento 105000 g	4540,5	479,9	277,2	29,3
	Sobrenadante 105000 g	4417,9	-	441,5	-
	Homogenato	12820,3	670,8	800,8	43,3
NaCl 0,5 M	Sedimento 5000 g	3800,0	203,9	216,7	12,5
	Sedimento 105000 g	2720,3	282,6	152,4	18,3
	Sobrenadante 105000 g	6188,8	-	1054,1	-
Lubrol PX 1%	Homogenato	12706,8	680,3	803,3	42,7
	Sedimento 5000 g	3773,8	202,3	215,7	13,0
	Sedimento 105000 g	2960,3	310,1	160,8	18,7
NaCl 0,5 M	Sobrenadante 105000 g	6007,2	-	894,5	-

Como se observa en la tabla 6, la enzima se encontró presente prácticamente en igual proporción tanto en la fracción citosólica como en la fracción particulada. En el sedimento de 5000 g apareció una actividad enzimática considerable, y dado que en esa fracción se obtienen células enteras y restos de pared celular, esa actividad indicaría una ruptura incompleta de las bacterias. Asimismo, al separar las membranas internas de las externas, la actividad se recuperó prácticamente en su totalidad en la primer fracción, tal como se observa en la figura 34.



La distribución subcelular observada sugiere que la proteína puede estar asociada a la membrana en forma débil. Este tipo de aso-

ciación se elimina por altas concentraciones salinas y el resultado obtenido al agregar al homogenato NaCl 0,5 M confirma esta aseveración ya que el 69% de la actividad enzimática se recuperó en la fracción soluble; al tratar con un detergente (Lubrol PX 1% v/v) y con NaCl 0,5 M se obtuvo una distribución análoga de la actividad enzimática.

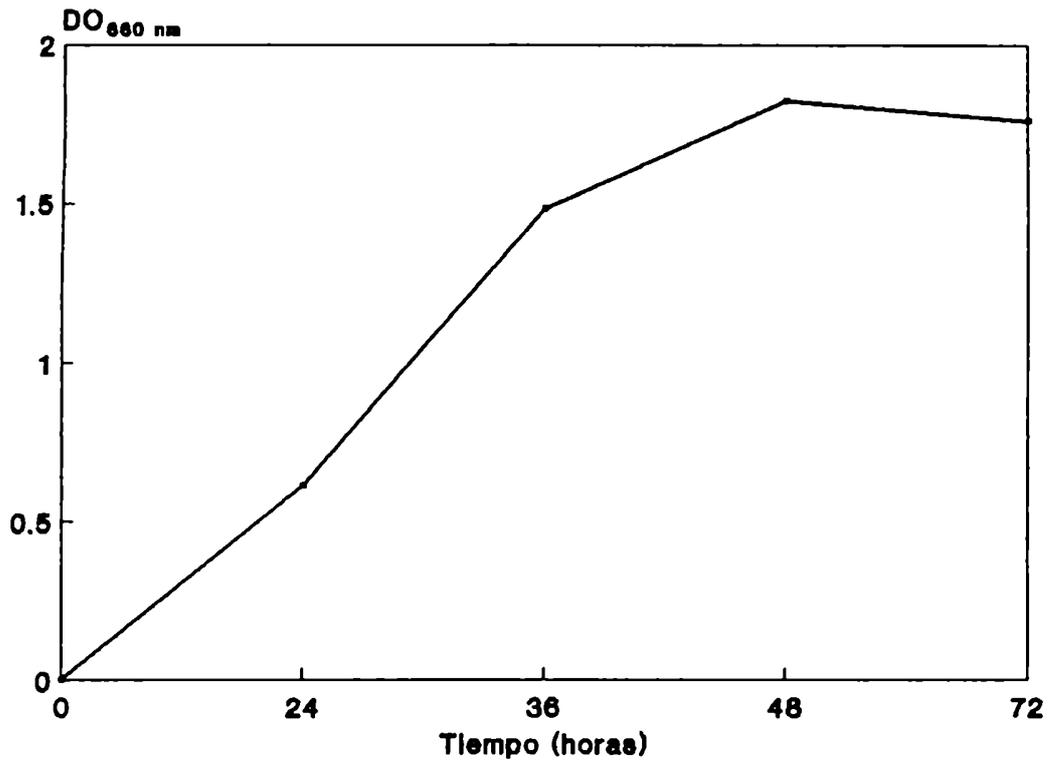
También se determinó que en membranas, la enzima fue capaz de utilizar Mg^{2+} -ATP como sustrato además de Mn^{2+} -ATP. Este comportamiento se perdió al tratar con sales o detergentes, sugiriendo que algún componente de la membrana es requerido para dicha propiedad.

A. tumefaciens presenta una adenilil ciclasa con las mismas características de localización y solubilización que la de *A. rhizogenes*. Como con *A. rhizogenes* se obtuvieron actividades específicas mayores, la caracterización de la adenilil ciclasa se realizó utilizando la cepa A4 de *A. rhizogenes*.

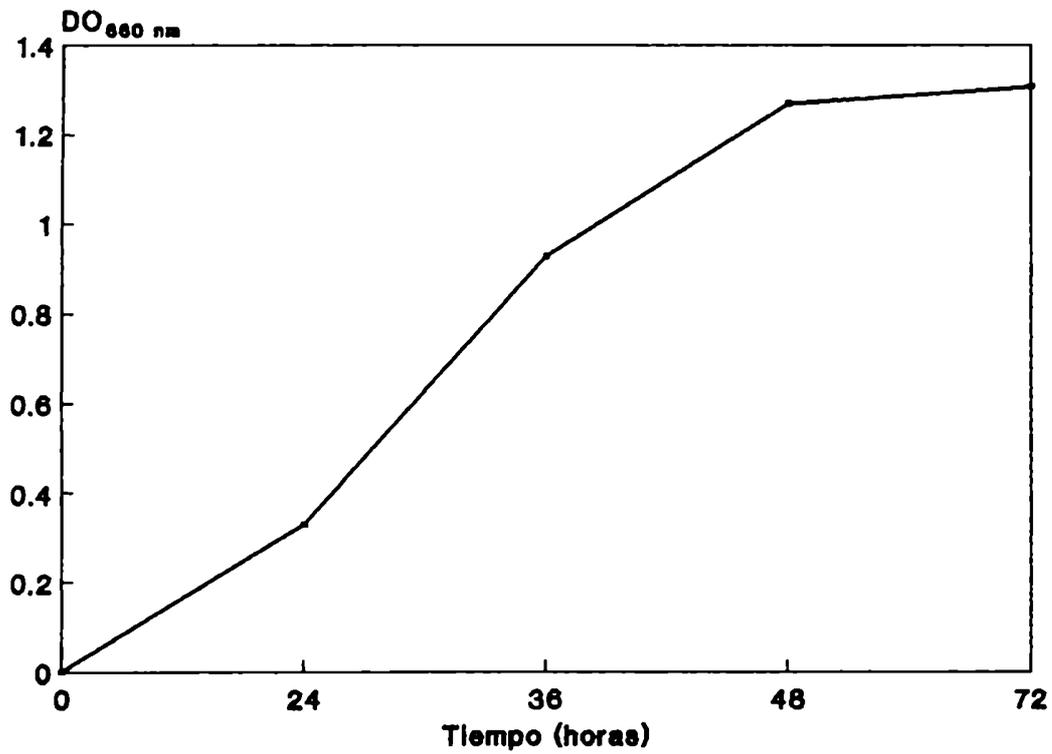
Posteriormente se investigó la variación de la actividad de la enzima en distintas etapas del crecimiento de la bacteria. Para ello, previamente se hicieron curvas de crecimiento de *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens*, obteniéndose los resultados que se muestran a continuación (figuras 35 y 36).

Se observa que la fase exponencial llegó hasta las 48 horas, punto en el que se logró el máximo crecimiento. Luego, el número de bacterias decayó mínimamente y se mantuvo constante, constituyendo la fase estacionaria.

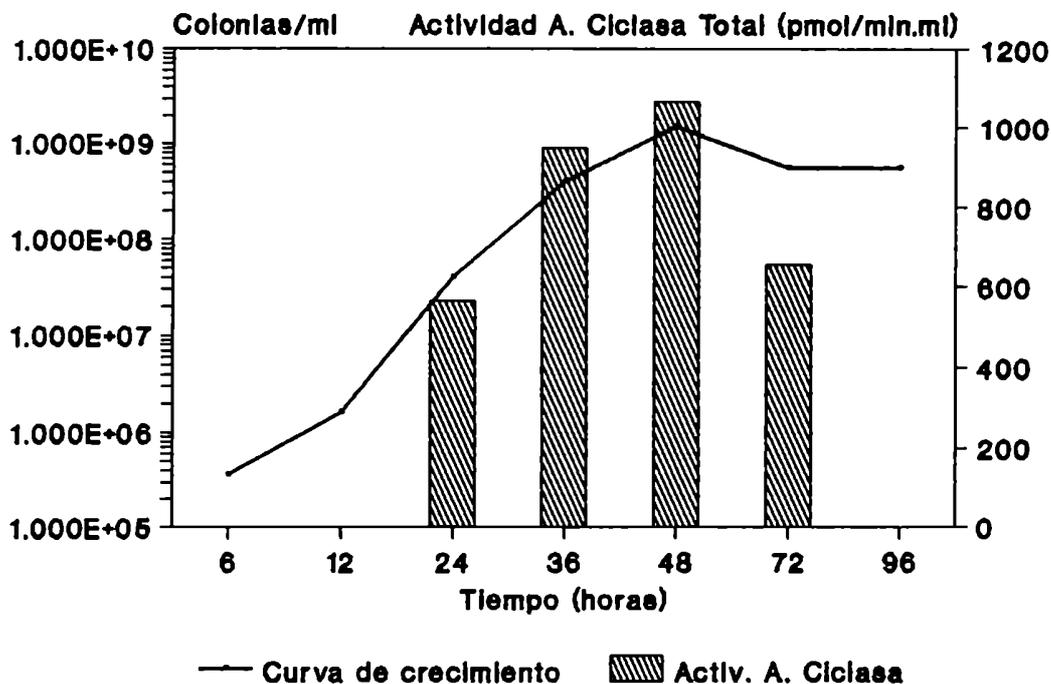
Curva de crecimiento de *A. rhizogenes*



Curva de crecimiento de *A. tumefaciens*

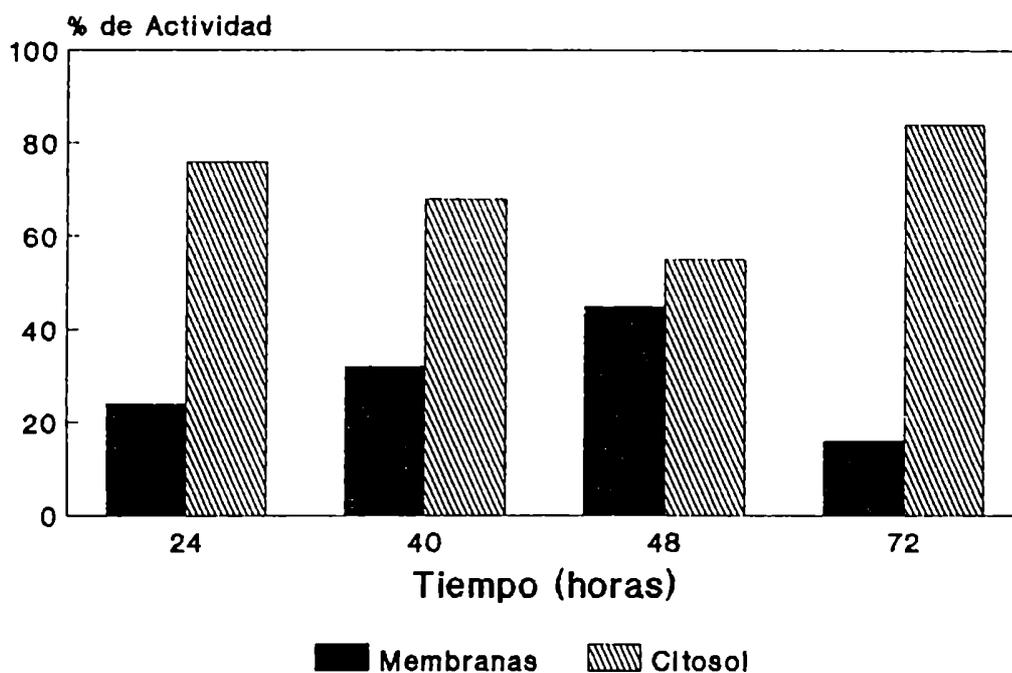


Se midió la actividad de la enzima en cada uno de los puntos obtenidos de la curva de crecimiento de *A. rhizogenes* y se obtuvo el resultado que se muestra en la figura 37.



Se puede observar que la actividad de la enzima aumentó hasta las 48 horas para luego descender levemente y mantenerse en un valor constante. Si se compara la curva de crecimiento con la de actividad, se ve que ambas son semejantes, es decir, hay una correlación perfecta entre el crecimiento de la bacteria y la actividad de la adenilil ciclasa.

Al analizar la distribución subcelular en cada punto de la curva, se obtuvo el resultado que se observa en la figura 38.



La proporción de actividad enzimática en cada fracción varía con el crecimiento. Como se aprecia en la figura 38, la forma particulada aumenta su proporción hasta llegar a un 45-50% en el punto de máximo crecimiento y luego disminuye marcadamente.

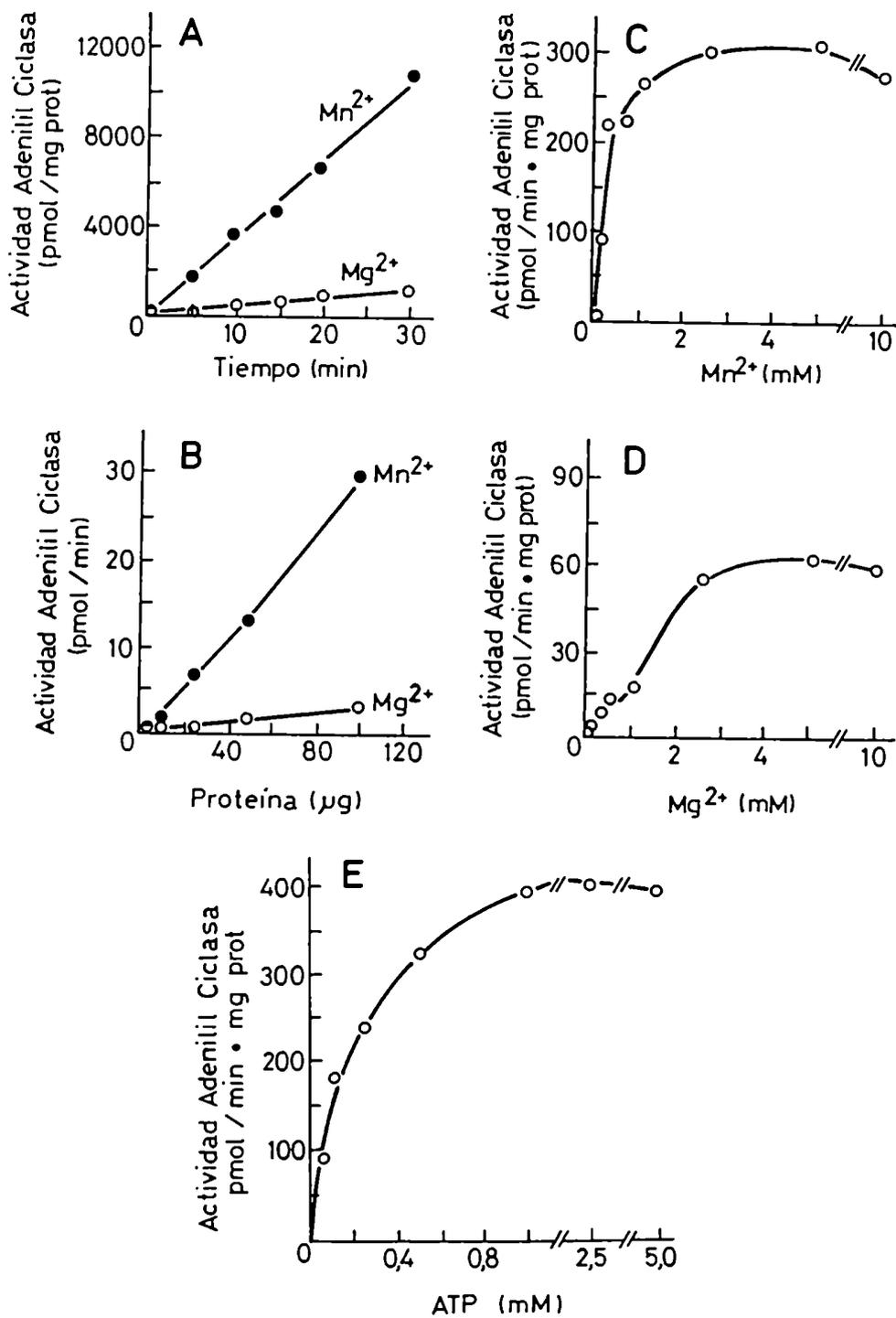
Propiedades cinéticas, efectores de enzimas eucarióticas

Una vez detectada la localización subcelular y la variación de la actividad de la enzima en las distintas fases del cultivo, se determinaron sus propiedades cinéticas. Estos experimentos se llevaron a cabo sobre la enzima unida a membranas y también sobre la forma soluble de *A. rhizogenes*.

En primer lugar se determinaron la concentración de proteínas y

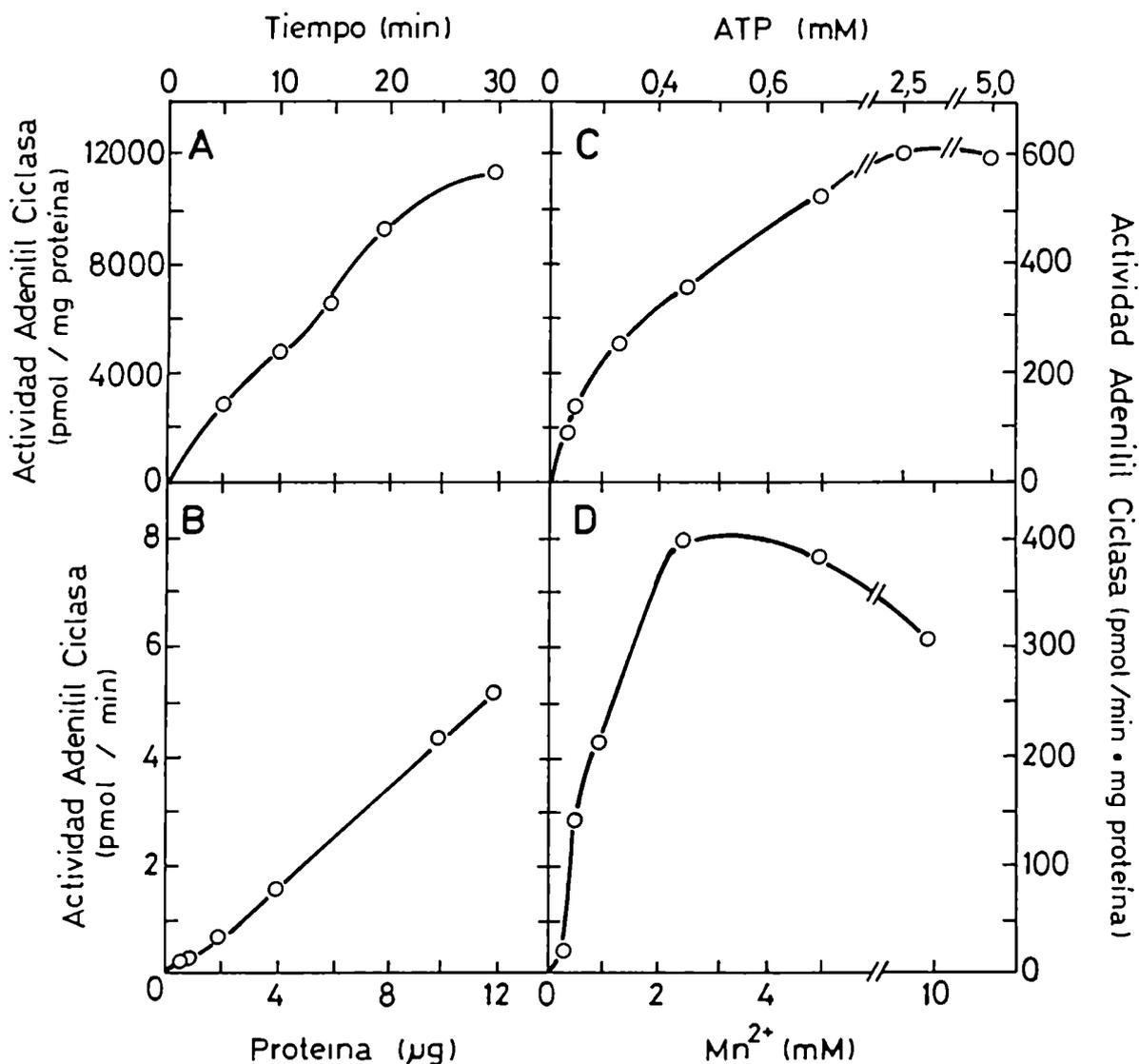
tiempo de incubación óptimos y, con esos datos, se investigó cuáles son las concentraciones adecuadas de ATP y cationes divalentes.

En la figura 39 se observan los resultados obtenidos con la enzima asociada a membranas.



La producción de AMPc se mantuvo lineal hasta los 30 minutos utilizando 0,1 mg de proteína; la concentración óptima de ATP fue de 0,5 mM y la de cationes divalentes, ya sea Mn^{2+} o Mg^{2+} fue de 2,5 mM.

En cuanto a la forma soluble, los resultados obtenidos se muestran en la figura 40.



La actividad enzimática también permaneció lineal hasta los 30 minutos de incubación usando 12 μg de proteína por ensayo y las concentraciones óptimas de ATP y Mn^{2+} fueron similares a las que se obtuvieron con la enzima particulada.

En base a los resultados obtenidos, el ensayo de actividad de adenilil ciclase se hizo utilizando ATP 0,5 mM, catión divalente 2,5 mM y 100 μg de proteína de membrana o 10 μg de proteína citosólica. El tiempo de incubación se fijó en 10 minutos.

Cuando se utilizaron efectores de adenilil ciclasas eucarióticas no se obtuvo activación de la enzima, tal como se detalla en la tabla 7.

Agregados	Actividad adenilil ciclase (pmoles/min/mg proteína)	
	Membrana	Citosol
Mg^{2+} 2,5 mM	29,5	0,4
Mg^{2+} 2,5 mM + NaF 10 mM	20,0	0,3
Mg^{2+} 2,5 mM + GTP 10 μM	26,9	0,4
Mg^{2+} 2,5 mM + GTP γ S 10 μM	26,1	0,4
Mg^{2+} 2,5 mM + Forskolina 0,05 mg/ml	19,7	0,3

Además, cuando la muestra fue preincubada con toxinas de cólera o *pertussis* en presencia de NAD^+ no se observó estimulación de la actividad enzimática.

Comparación de las formas particulada y soluble

La distribución subcelular que mostró la adenilil ciclase de *Agrobacterium* y el hecho de que se la extrajo con NaCl 0,5 M su-

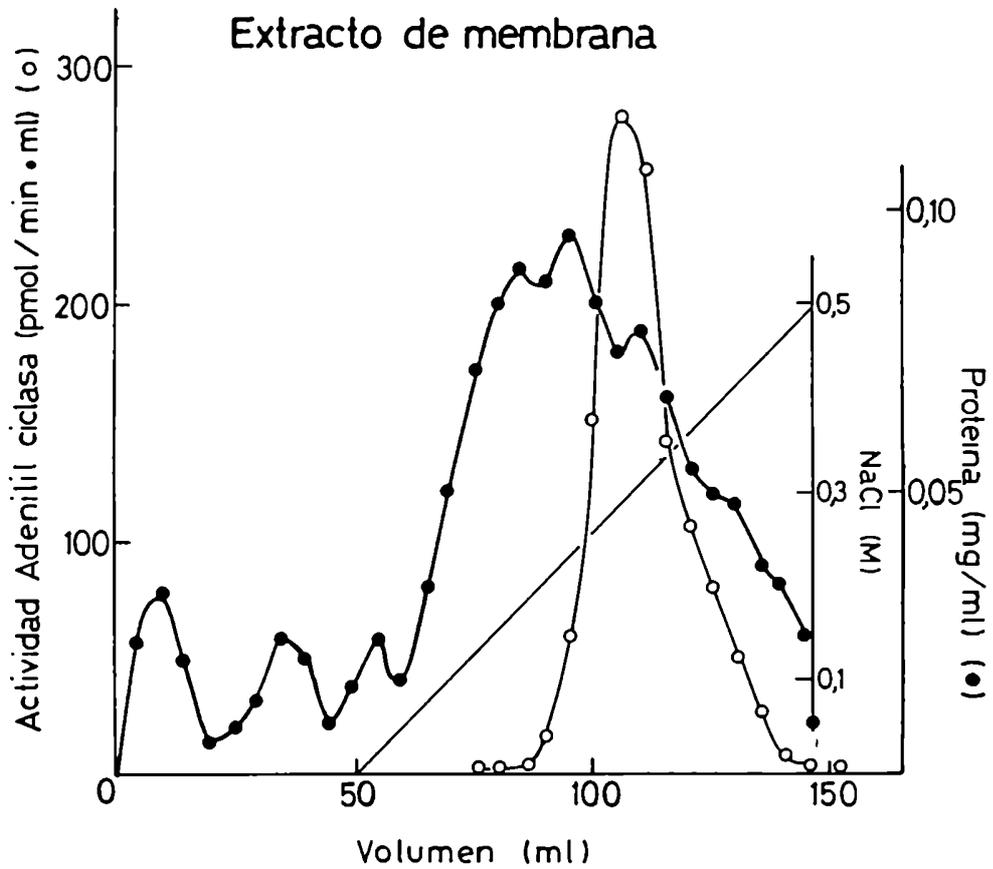
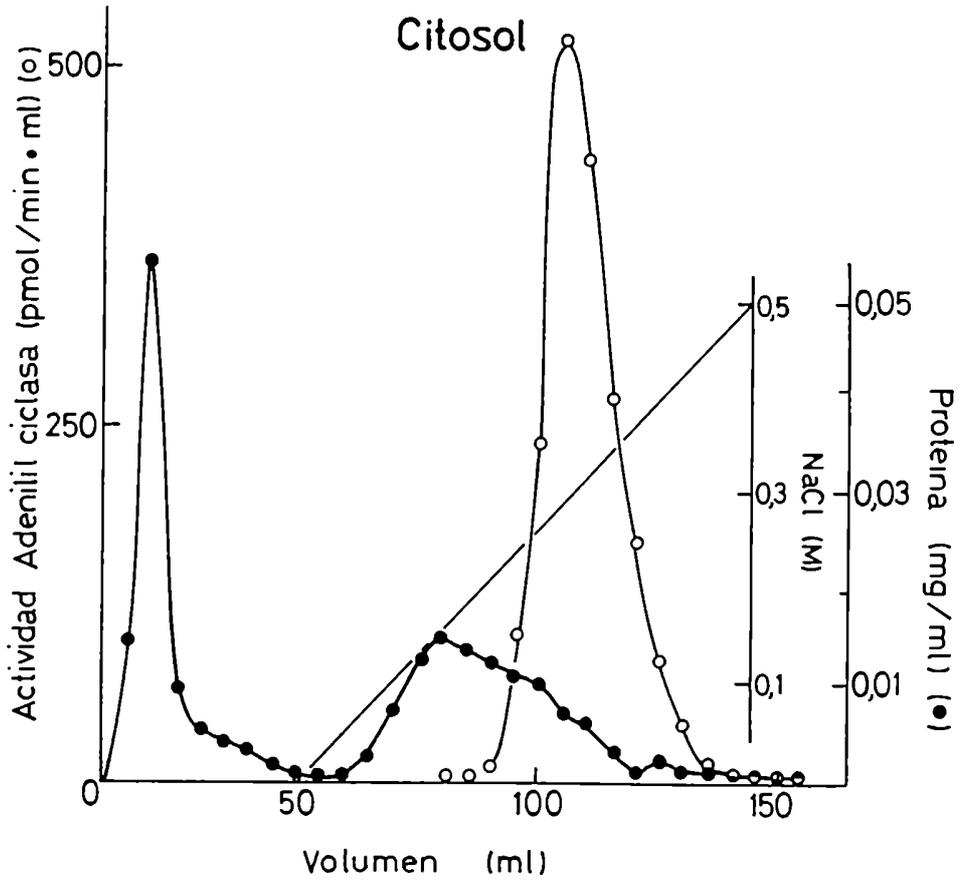
girió que la actividad enzimática se debe a una proteína capaz de unirse en forma débil y transitoria a la membrana. Sin embargo, podrían existir otras posibilidades: a) que la forma citosólica sea un producto de proteólisis de la enzima asociada a la membrana, y b) que se trate de dos proteínas distintas.

Para resolver la primera posibilidad, se dividió un cultivo en dos alícuotas y una de ellas se procesó en presencia de aprotinina (25 U/ml) que es un inhibidor de proteasas. El resultado obtenido se muestra en la tabla 8.

Agregados	Fracción	Act. Total (pmol/min)	Act. Específica
Ninguno	Membrana	4304,2	254,4
	Citosol	4480,3	391,3
Aprotinina (25 U/ml)	Membrana	4835,9	286,0
	Citosol	5033,7	439,7

Las actividades se determinaron utilizando Mn^{2+} , que es el catión divalente que utilizan ambas formas. Como se ve, la presencia de un inhibidor de proteasas no alteró la distribución subcelular que se había determinado previamente. La presencia del inhibidor sólo permitió obtener actividades mayores en aproximadamente un 10%; esto puede indicar que la enzima es sensible a proteasas de la propia bacteria. Se puede concluir de este experimento que la actividad detectada en la fracción citosólica no es un producto de proteólisis de la enzima unida a membrana.

A partir del resultado obtenido anteriormente, se trató de determinar si se trata de la misma proteína o no. Para ello se sembraron muestras de la fracción citosólica y extractos de membrana obtenidos con detergentes en una columna de DEAE-celulosa (Figura 41).



Como se ve en la figura 41, en ambos casos la actividad enzimática se recuperó en una fracción eluída a una concentración de NaCl de aproximadamente 0,28 M. Además, al analizar sus características cinéticas el comportamiento fue semejante, ya que ambas mostraron concentraciones óptimas de 1 mM de ATP y 2,5 mM de Mn^{2+} mientras que ninguna de las fracciones obtenidas respondió al Mg^{2+} como catión divalente.

Estos resultados sugieren que las dos formas de adenilil ciclasa detectadas en *Agrobacterium* se deben a una única proteína.

Purificación parcial de la adenilil ciclasa soluble de *Agrobacterium rhizogenes*

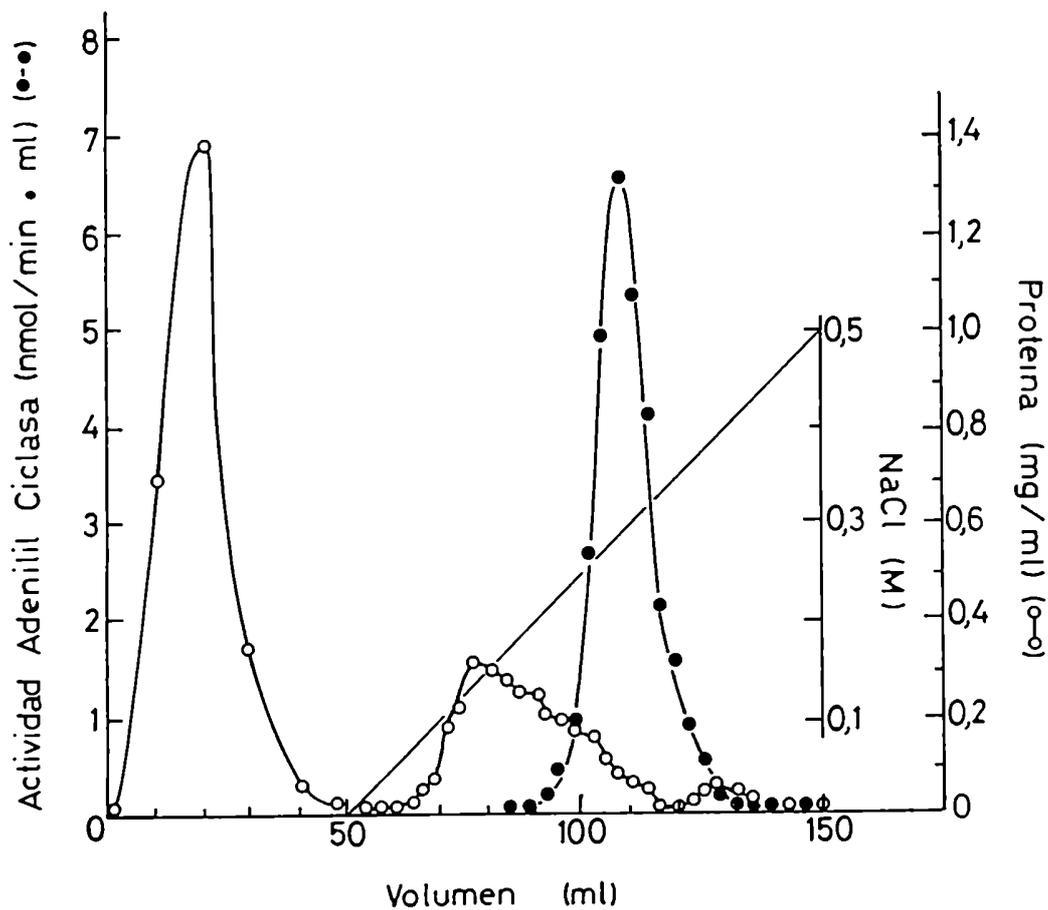
Cromatografía en columna de DEAE-celulosa

Como la actividad de adenilil ciclasa de *Agrobacterium* se debe a una única proteína, se utilizó la fracción citosólica para la purificación por la facilidad de su obtención.

El primer paso de la purificación se realizó utilizando una columna de DEAE-celulosa en las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

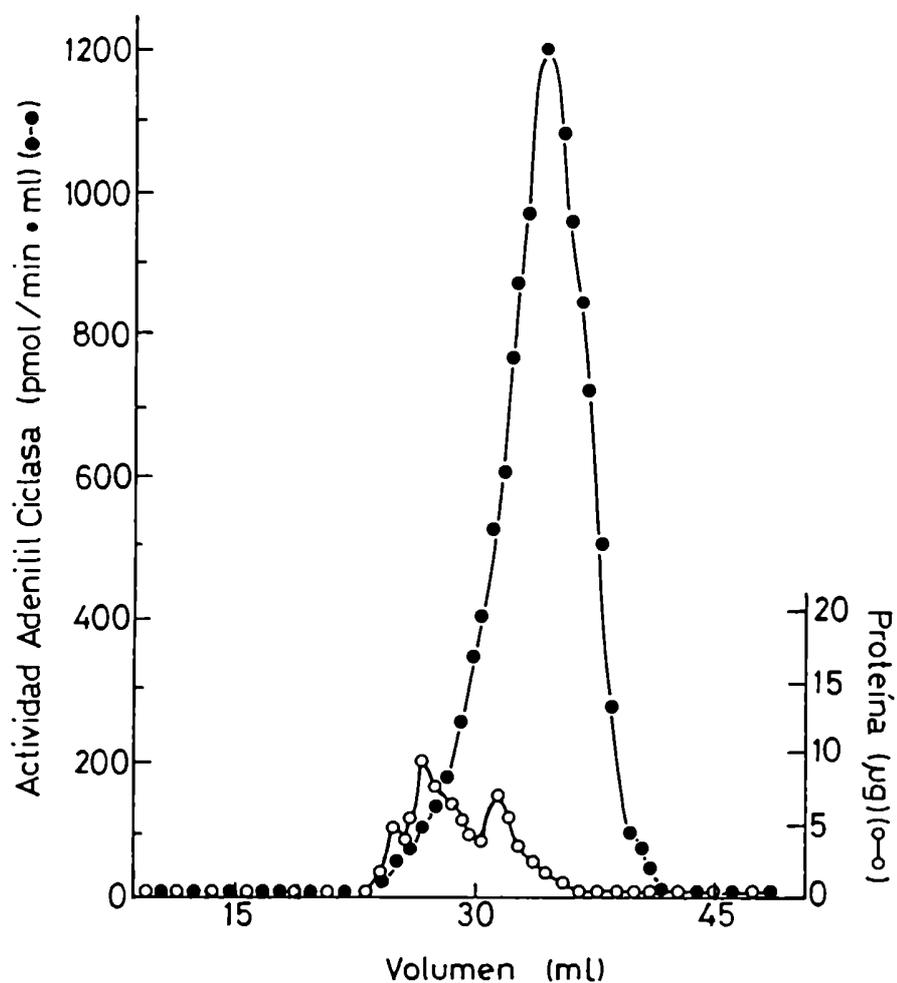
El perfil cromatográfico obtenido se aprecia en la figura 42.

Como ya se había visto, la actividad de adenilil ciclasa se recuperó en forma de un único pico que eluyó a una concentración salina de alrededor de 0,28 M. No hubo actividad enzimática en los lavados; en estas fracciones se recuperaron mayoritariamente las proteínas. La actividad enzimática específica recuperada fue de 11,12 nmoles/min por mg de proteína, lo que indica que en este paso la purificación fue de 15 veces.



Cromatografía preparativa en Ultrogel AcA34

Las fracciones con mayor actividad de adenilil ciclasa se concentraron en la forma descrita en Materiales y Métodos, y se sembraron en una columna preparativa de Ultrogel AcA34. En la figura 43 se muestra el perfil de elución.

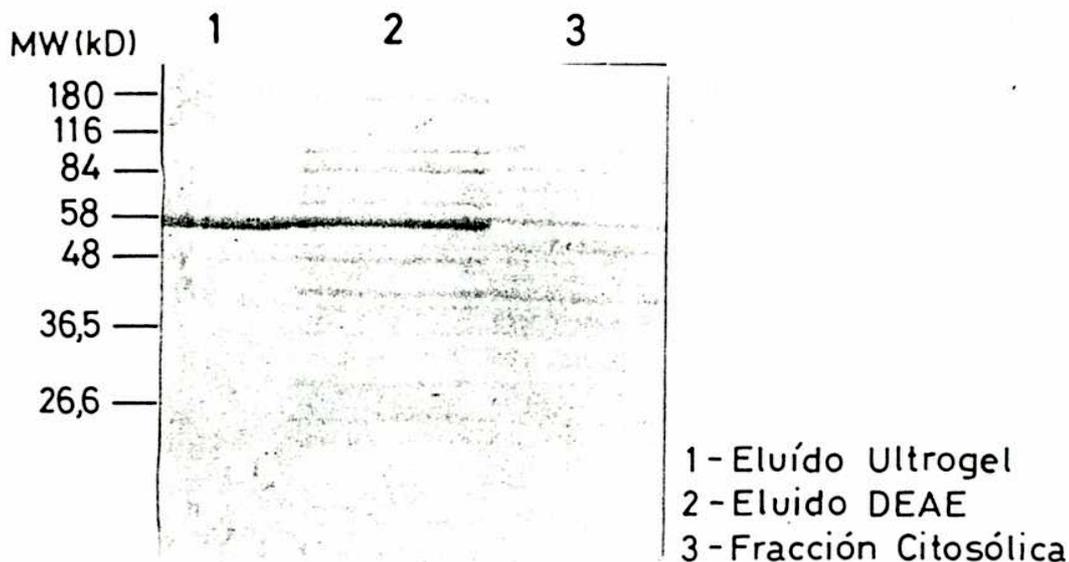


La enzima eluyó en un solo pico de actividad. La actividad específica recuperada fue de 47,34 nmoles/min por mg de proteína.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se tomaron alícuotas de fracción citosólica y de cada paso de purificación (aproximadamente 35 µg de proteína) y se las sometió a

una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS 10% (P/V). Concluida la corrida electroforética, se tiñó el gel con Coomassie-blue y el resultado obtenido se observa en la figura 44.



En la figura 44 se aprecia el patrón proteico de la fracción citosólica donde no hay proteínas preponderantemente mayoritarias. Con los pasos de purificación disminuyeron las bandas detectadas, excepto una de aproximadamente 55 kDa que aumentó considerablemente; en especial en la calle correspondiente al pico de Ultrogel, se obtuvo la banda de 55 kDa muy intensa, y sólo cinco bandas muy tenues cuyos PM oscilan entre 50000 y 100000, que serían contaminantes. Por lo tanto, dicha banda debe corresponder a la adenilil ciclasa, cuyo peso molecular aparente es de 55000.

Los datos de la purificación realizada se resumen en la tabla 9.

Fracción	Proteína (ng)	Actividad Total (pmol/min)	Recuperación (%)	Actividad Específica (pmol/min ng prot)	Purificación
Sobrenadante 105000 g	37,8	28007,7	100	740,9	1
Preparación DEAE	0,226	20027,4	72	11159,7	15
Preparación Ultrogel	0,010	5163,3	15	47336,8	64

La purificación obtenida fue del orden de 64 veces en dos pasos; la inactivación que sufrió la enzima durante el proceso de purificación impidió un mayor avance aún cuando se utilizó glicerol 20% (V/V) y 2-mercaptoetanol, que permitieron superar en parte esta dificultad.

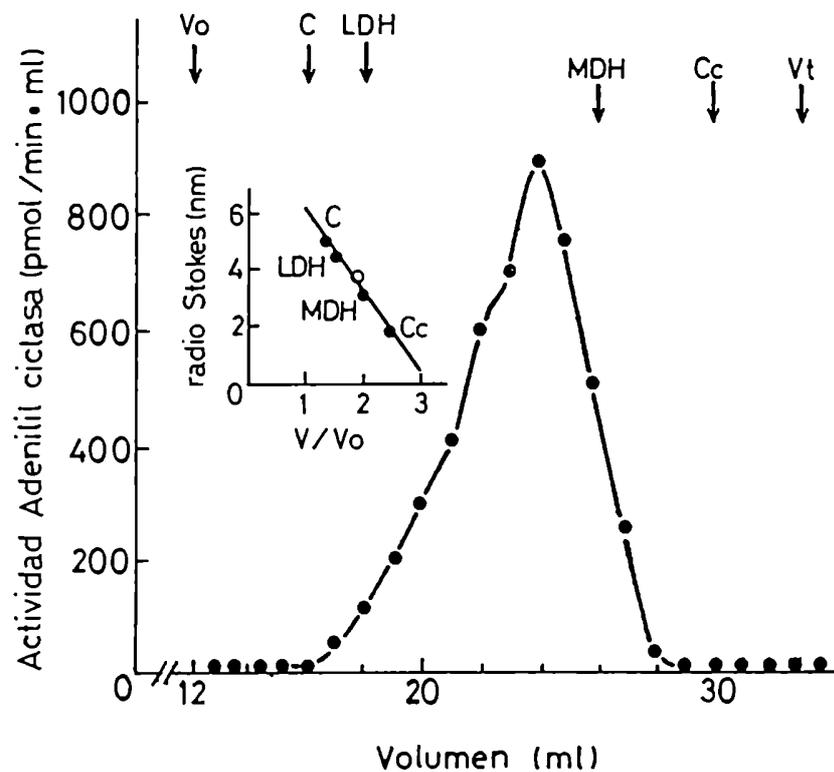
En el último paso se obtuvieron aproximadamente 10 µg de proteína y, dado que la enzima no se recuperó en forma homogénea, es posible deducir que la adenilil ciclasa corresponde a menos del 0,025% de la proteína soluble.

Parámetros moleculares e hidrodinámicos de la adenilil ciclasa soluble de *Agrobacterium rhizogenes*

Filtración por geles

Se realizó una filtración en columna analítica de Ultrogel AcA34 para determinar el radio de Stokes de la adenilil ciclasa. La muestra utilizada fue una preparación de DEAE de la enzima soluble de *A. rhizogenes*. El perfil obtenido es el que muestra la figura 45.

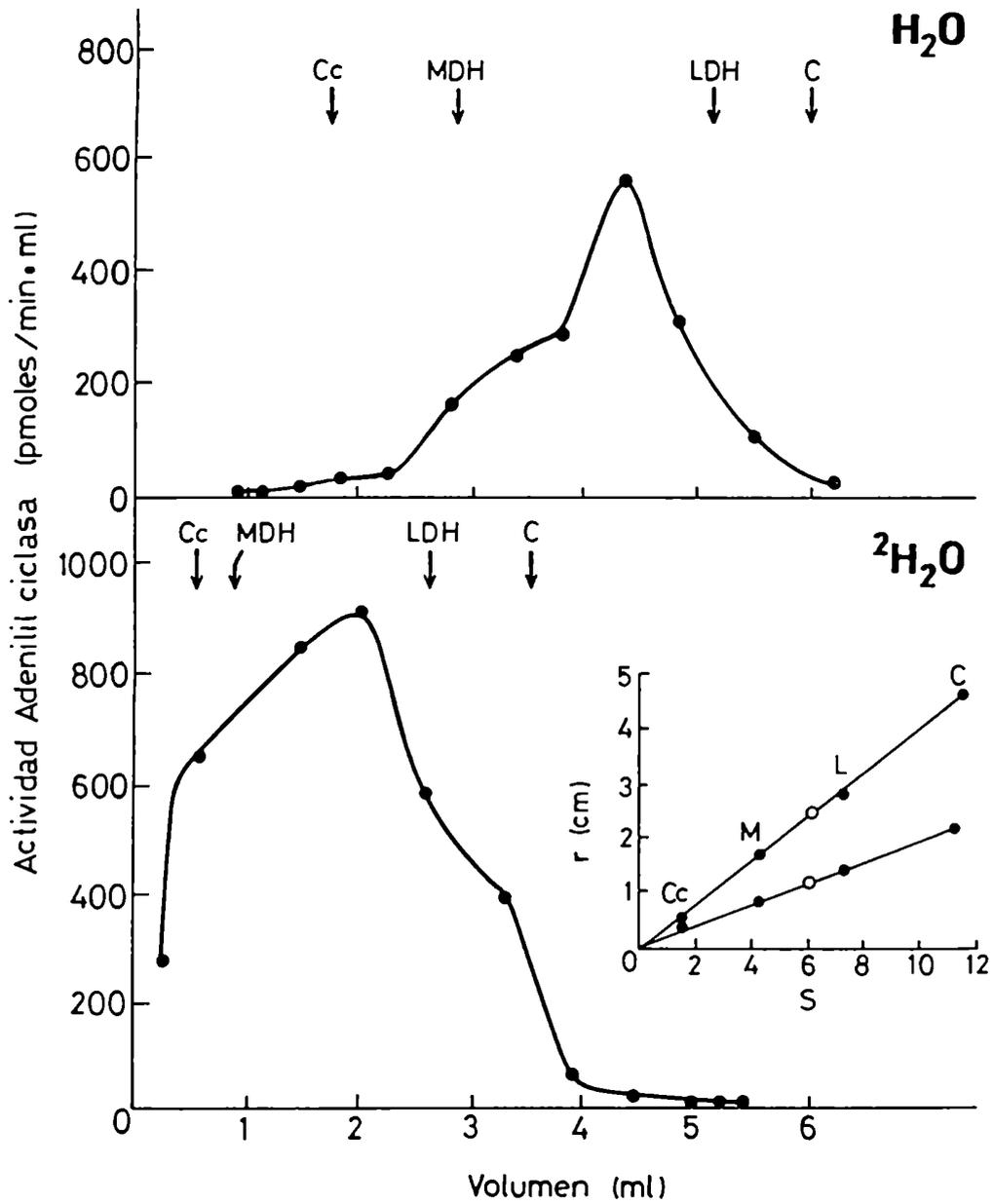
Las posiciones de las enzimas marcadoras están señaladas con flechas. La enzima eluyó a una relación v/v_0 de 1,9 que corresponde a un radio de Stokes de 3,8 nm.



Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa

Mediante la técnica de ultracentrifugación en gradientes de sacarosa en H₂O y D₂O se determinaron el coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) y el volumen específico parcial (\bar{V}) de la adenilil ciclasa. En los gradientes se sembró una preparación DEAE de la enzima soluble. El resultado obtenido se observa en la figura 46.

Las posiciones de las enzimas marcadoras están señaladas con flechas. Además, se graficó la distancia recorrida por cada una de estas enzimas (r) en función de sus coeficientes de sedimentación (s).



Esta curva permitió determinar el coeficiente de sedimentación de la enzima, que es de 6,1 S. Además, como se ve en el gráfico, la posición de la enzima respecto de las proteínas marcadoras fue la misma en ambos gradientes; por lo tanto, la adenilil ciclasa de *A. rhizogenes* tiene el mismo valor de volumen específico parcial que las proteínas globulares, es decir 0,74 ml/g.

Con los datos obtenidos en los ensayos anteriores (radio de Stokes, coeficiente de sedimentación y volumen específico parcial) se estimó el peso molecular relativo y el coeficiente friccional. Los parámetros obtenidos se resumen en la tabla 10.

PARAMETRO	VALOR
$S_{20,w}$ (s)	6,1 ± 0,2
a (nm)	3,8 ± 0,2
\bar{v} (ml/g)	0,74
PM	110700
f/f _o	1,21

Se obtuvo un peso molecular de 110700 y un coeficiente friccional de 1,21 que indica que la proteína se aleja un poco de la esfericidad o está hidratada, ya que el valor de este coeficiente es mayor que la unidad.

Efecto de posibles activadores de la adenilil ciclasa de *Agrobacterium rhizogenes*

Efecto de calmodulina

Dado que varias bacterias presentan proteínas similares a la calmodulina, como son los casos de *Escherichia coli* (Juvasa et al, 1981) y *Bacillus subtilis* (Fray et al, 1986), y que algunas ade-

nilil ciclasas bacterianas son sensibles a esta proteína, como la de *Bordetella pertussis* (Hewlett *et al*, 1976; Ladant, 1988), se decidió investigar si este mecanismo de activación es utilizado por la adenilil ciclase de *Agrobacterium*. Más aún, recientemente se descubrió que en *Anabaena sp* la adenilil ciclase es regulada por un factor similar a calmodulina, propio de la bacteria (Bianchini *et al*, 1990).

El ensayo se realizó incubando fracciones de membrana o citosólicas con Mg^{2+} , ya que los efectos de calmodulina siempre se detectan con este catión divalente, y agregando Ca^{2+} y calmodulina de cerebro bovino. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 11.

AGREGADOS	ACTIVIDAD ESPECIFICA (pmol/min por mg prot)	
	Membrana	Citosol
Mg^{2+} 2,5 mM	27,2	0,93
Mg^{2+} 2,5 mM- Ca^{2+} 10 μ M	18,3	0,95
Mg^{2+} 2,5 mM- Ca^{2+} 10 μ M-Cam	18,5	0,91

No se observó efecto de calmodulina sobre la enzima en ninguna de sus formas. El Ca^{2+} pareció tener un efecto negativo sobre la actividad enzimática detectada en membranas.

Como en el ensayo anterior se utilizaron fracciones crudas, que pueden poseer endógenamente Ca^{2+} y calmodulina, se decidió determinar si existe efecto utilizando preparaciones de DEAE de ambas formas de la enzima.

En este caso, sólo se logró medir actividad enzimática en presencia de Mn^{2+} . Con Mg^{2+} no se obtuvo actividad enzimática aún agregando diferentes concentraciones de estos efectores.

Por lo tanto, se puede afirmar que la adenilil ciclasa de *Agrobacterium* no es regulada por Ca^{2+} -calmodulina.

Efecto de compuestos vegetales de la familia de las syringonas

Como se vio en la Introducción, *Agrobacterium* infecta plantas para producir lesiones tumorales. Para ello requiere que la planta esté previamente herida, ya que en ese estado libera compuestos fenólicos que son captados por la bacteria y, de ese modo, se pone en marcha el sistema de transferencia de ADN mediado por la región de virulencia. Se sabe que la señal es captada por un sensor (producto del gen VirA) que fosforila a un factor (producto del gen VirG) que activa la transcripción de los demás genes involucrados en la región de virulencia. No se sabe si al ser captada la señal se produce algún otro evento. En base a esto, se decidió investigar si la adenilil ciclasa es afectada por estos compuestos. Para ello se utilizó la 3-5 dimetoxi 4-hidroxi acetofenona, que es el compuesto vegetal activante y algunos derivados como el ácido syringico, la syringaldazina y el syringaldehído.

AGREGADOS	ACTIVIDAD ESPECIFICA (pmol/mg proteínaxmin)	
	Mn ²⁺	Mg ²⁺
Ninguno	280,2	30,3
Acido syringico 10 ⁻⁶ M	310,1	33,5
Acido syringico 10 ⁻³ M	291,3	33,0
Syringaldehído 10 ⁻⁶ M	260,8	33,2
Syringaldehído 10 ⁻³ M	252,6	33,6
Syringaldazina 10 ⁻⁶ M	252,1	33,0
Syringaldazina 10 ⁻³ M	277,8	33,2
3-5 Dimetoxi 4-hidroxi 10 ⁻⁶ M	277,3	33,8
Acetofenona 10 ⁻³ M	272,0	32,0

En la tabla 12 se resumen los resultados obtenidos al incubar membranas de *Agrobacterium* con los compuestos mencionados. Como se observa, la 3-5 dimetoxi 4-hidroxi acetofenona no tuvo efecto sobre la actividad de la enzima; sus derivados hicieron variar la actividad enzimática alrededor de un 10% y sin dependencia de la concentración utilizada, por lo que el leve efecto observado sería inespecífico. Resultados similares se obtuvieron al incubar la enzima soluble con estos compuestos. Por lo tanto, se deduce que la adenilil ciclasa no está relacionada con la captación de la señal emitida por la planta y, por ende, con el proceso de infección.

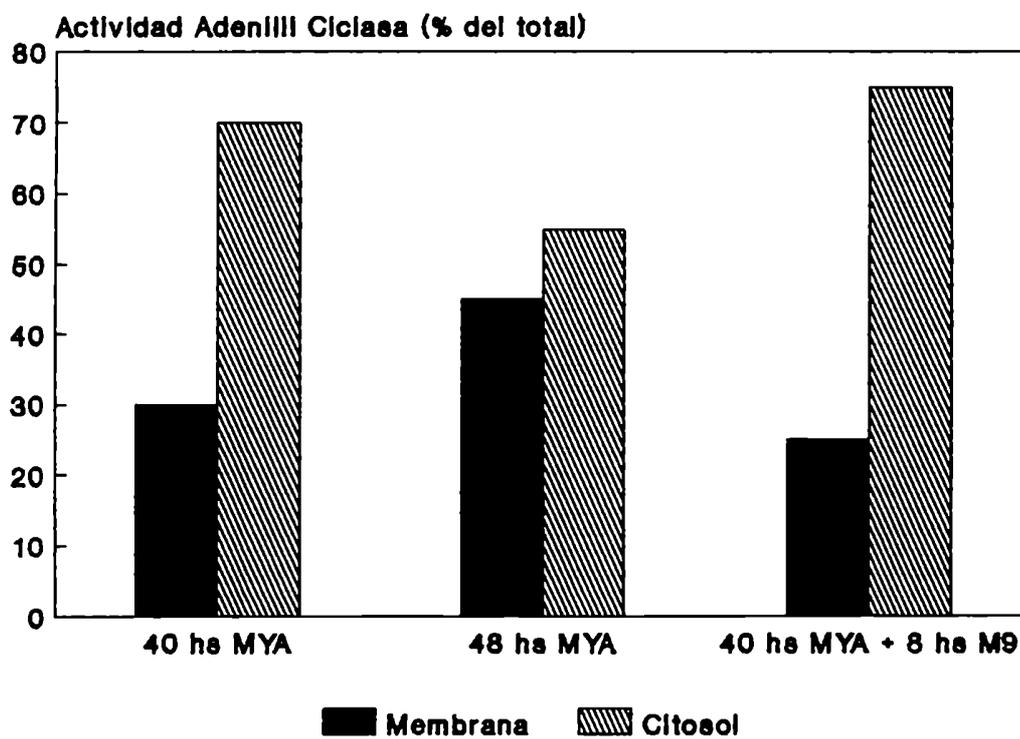
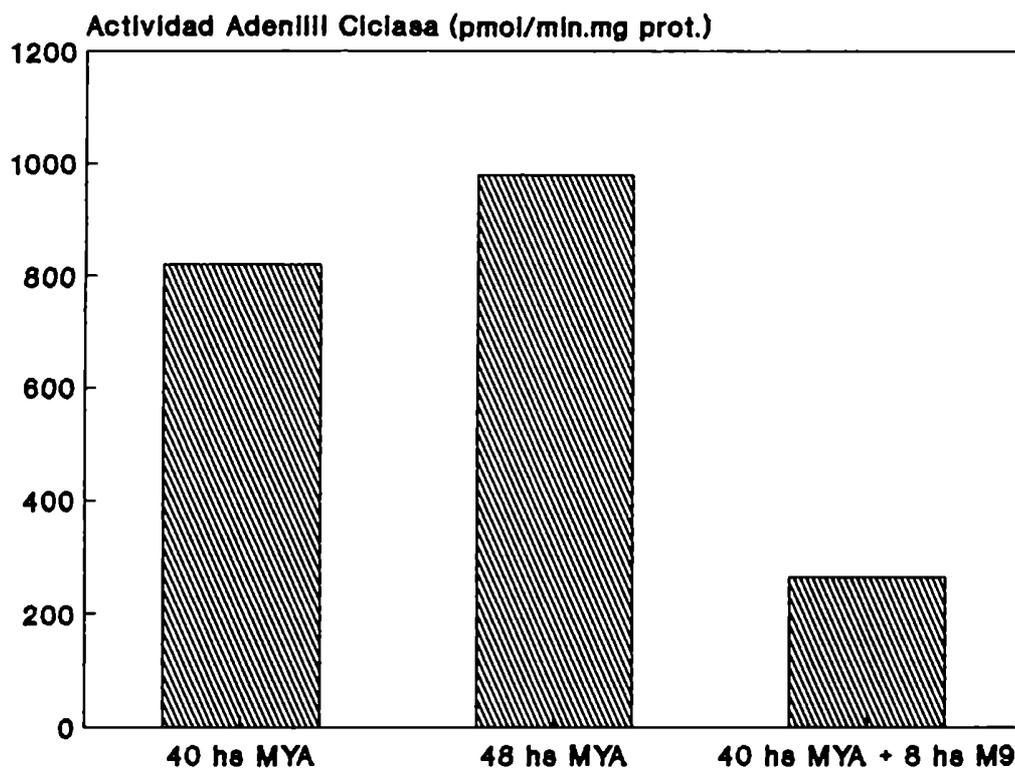
Efecto de nutrientes

Como la actividad enzimática disminuyó marcadamente en la fase estacionaria del cultivo cuando hay limitación de nutrientes, se decidió determinar si la limitación de nutrientes es la causante del efecto observado. Para ello, se cultivó *A. rhizogenes* durante 40 horas en medio MYA. Se cosechó una alícuota de ese cultivo y el resto se dividió en dos fracciones: una se incubó 8 horas más en medio MYA, mientras que la restante se incubó en medio M9 (medio mínimo) durante el mismo período.

En medio MYA, se observó el aumento de actividad entre las 40 y las 48 horas, como ya se había determinado. En cambio, al reemplazar el medio MYA por M9, la actividad enzimática disminuyó un 73%, dando un valor similar a los obtenidos en la fase estacionaria cultivando con MYA. El resultado de este experimento se observa en la figura 47.

Además, al analizar la distribución subcelular de las tres fracciones obtenidas, se observó lo que se indica en la figura 48.

Nuevamente, las 8 horas de incubación con M9 produjeron un resultado similar al obtenido en fase estacionaria.



Discusión

Mediante técnicas de ultracentrifugación, se obtuvieron fracciones de membrana y citosol de *Agrobacterium*, y en ambas se detectó actividad de adenilil ciclasa; al separar membranas internas y externas, la actividad se recuperó casi totalmente en la primer fracción. La enzima está débilmente unida a membranas, ya que es extraíble con sales y parece ser una única proteína, ya que ambas formas presentaron patrones de elución de columnas de DEAE-celulosa similares. Además, al determinar las características cinéticas de la enzima en los picos de elución de las columnas mencionadas, no se advirtieron diferencias entre ambas fracciones. Por otro lado, la forma citosólica no es producto de proteólisis de la forma particulada, ya que la presencia de inhibidores de proteasas no modificó la distribución subcelular observada.

Este tipo de distribución tiene antecedentes, tanto en bacterias como en eucariotes superiores. Se ha detectado la presencia de adenilil ciclasa en citosol y membranas de *E. coli* (Yang y Epstein, 1983), *Streptococcus salivarius* (Khandelwal y Hamilton, 1971), como también en *N. crassa* (Flawiá y Torres, 1972a), *Mucor rouxii* (Cantore y Passeron, 1982), y *Tetrahymena pyriformis* (Kassis y Kindler, 1975).

Se determinaron las propiedades cinéticas de la enzima en ambas formas y, además, no se obtuvo activación por efectores de ciclasas eucarióticas. Estos datos muestran que la adenilil ciclasa de *Agrobacterium* se comporta como una típica protociclase similar a la de *N. crassa* (Reig Macía *et al*, 1984), *testis* (Kornblihtt *et al*, 1981), *Mucor rouxii* (Cantore *et al*, 1980) y *Rhizobium meliloti* (Carricarte, tesis doctoral, 1988).

Por medio de columnas de DEAE-celulosa y Ultrogel ACA34 se logró purificar 64 veces la enzima soluble. Además, se sembraron muestras de cada paso de purificación en un gel de poliacrilamida,

obteniéndose una banda de 55 kDa que, especialmente en la calle correspondiente a la preparación Ultrogel, es mayoritaria (sólo aparecen 5 bandas muy tenues impurificando). Este hecho no concuerda con una purificación de sólo 64 veces y esto podría deberse a la inactivación sufrida por la enzima durante el proceso. Esta inactivación es la que impidió una mayor purificación.

El factor de purificación obtenido está en el orden de lo habitual para dos pasos de purificación. Es común también que en columnas de DEAE-celulosa equilibradas a pH cerca de la neutralidad, la elución se produzca con concentraciones salinas de entre 0,2 y 0,3 M, como ocurre con las adenilil ciclasas de *Medicago sativa* (Carricarte *et al*, 1988), *Brevibacterium liquefaciens* (Takai *et al*, 1974) y de hígado de rata (Swizlocki *et al*, 1977). En general, la purificación ha sido dificultosa aunque varios grupos han obtenido buenos resultados. En *Brevibacterium liquefaciens* se purificó a homogeneidad por medio de procedimientos habituales y se logró la cristalización. En eucariotes, se logró purificar la adenilil ciclasa de cerebro bovino a homogeneidad, utilizando como herramienta fundamental una columna de afinidad forskolina-sefarosa (Mollner y Pfeuffer, 1988).

También se determinaron los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la enzima soluble, utilizando como herramientas filtración por geles y gradientes de sacarosa en agua y agua deuterada.

El peso molecular calculado a partir de los parámetros obtenidos es 110700. Comparando con el deducido del gel que se corrió con las muestras purificadas (55000) se puede inferir que la enzima podría ser de naturaleza oligomérica, estando integrada por dos subunidades iguales. Este hecho también es común en protociclasas, como la ya citada de *B. liquefaciens* que es un dímero de peso molecular 92400 compuesto por dos subunidades idénticas de 46200 daltons.

En la tabla 13 se comparan los parámetros obtenidos con los de otras adenilil ciclasas.

TEJIDO	TESTICULO	<i>N. crassa</i>	<i>B. liquefaciens</i>	<i>Anabaena sp</i>	<i>R. meliloti</i>	<i>A. rhizogenes</i>
Referencia	Kornblihtt (1981)	Reig et al (1984)	Takai et al (1974)	Bianchini et al (1990)	Carricarte (Tesis doctoral)	Esta tesis
PH	74000	200,000	92400	183400	140000	110700
S _{20,v} (s)	4,3	6,2	4,5	6,4	6,3	6,1
Radio de Stokes (nm)	3,9	7,3	4,9	6,0	4,8	3,8
\bar{v} (ml/g)	0,74	0,74	0,73	0,74	0,74	0,74
f/f ₀	1,4	1,64	1,6	1,59	1,39	1,21

Como se observa, los parámetros de *Agrobacterium rhizogenes* se asemejan a los de protociclasas, en especial a la de *Rhizobium meliloti*. Este hecho tiene lógica, ya que ambos géneros pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*.

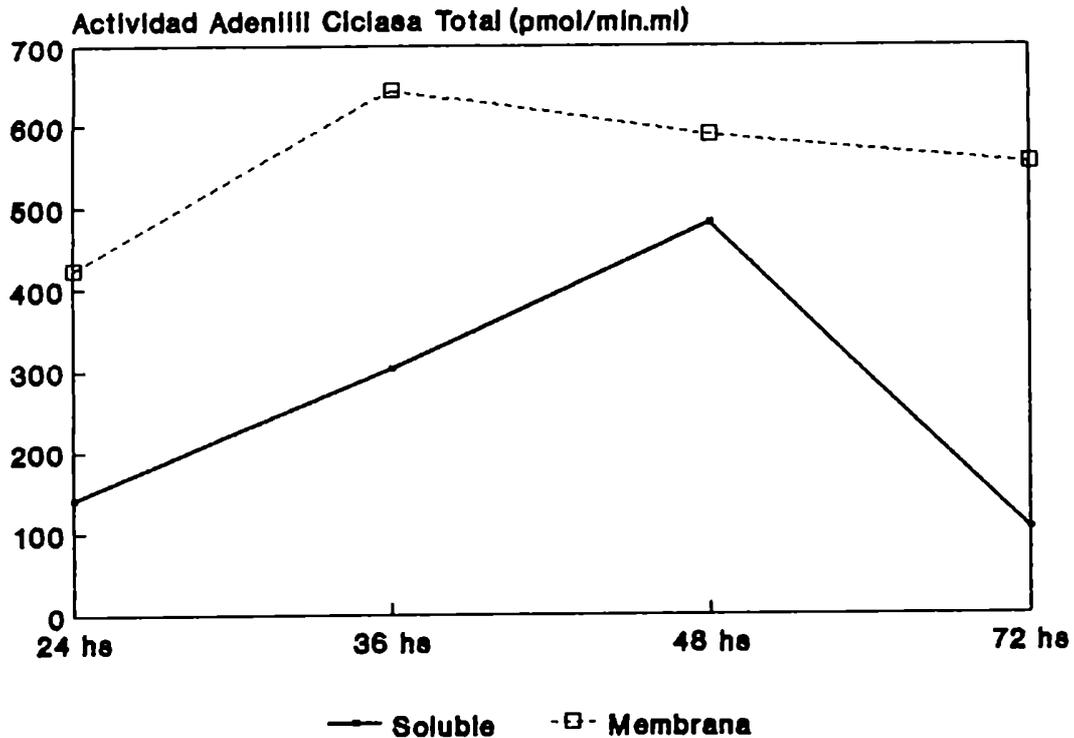
También se intentó determinar si la actividad de la adenilil ciclasa de *Agrobacterium* muestra algún tipo de regulación similar a lo observado en otras bacterias. Se analizó el efecto del sistema calcio-calmodulina, que por ejemplo en cianobacterias (Bianchini et al, 1990) regula la actividad de la adenilil ciclasa. Los resultados obtenidos indican que este tipo de regulación no ocurre en *Agrobacterium*.

Se analizó también si existe una relación entre la enzima y la captación de las señales vegetales que desatan el proceso de infección de la planta por la bacteria. Si bien, como se detalló en la Introducción, el sistema de captación de la señal y puesta en marcha del proceso infeccioso ha sido bien caracterizado, no se sabía si los compuestos vegetales tenían efecto sobre los niveles

de AMP cíclico. Podría darse el caso de que el sistema VirA-virG, que es el encargado de captar la señal, necesitara modificar la actividad de la adenilil ciclasa para cumplir su función en forma óptima. Con ese objeto, se midió el efecto de syringonas sobre la actividad de las dos formas de la enzima, pero no se detectaron variaciones significativas. Esto indica que la adenilil ciclasa participa en transducción de señales que no se relacionan con el proceso infeccioso que es capaz de desarrollar la bacteria.

Una posible función de la adenilil ciclasa se desprende del análisis de la actividad en distintas fases del crecimiento bacteriano. Como se vio, la actividad de la enzima se correlaciona con el crecimiento de la bacteria. Esto indicaría que el AMP cíclico estaría relacionado con la proliferación, ya que la máxima actividad de la enzima se obtuvo en el punto de máximo crecimiento y luego disminuyó levemente y quedó constante en forma proporcional a la variación en el número total de bacterias. Por otra parte, al analizar la distribución subcelular de la enzima en esos mismos puntos del crecimiento, se observó que hay una gran variación en la proporción de la enzima en cada fracción. En general, predomina la forma soluble aunque la forma particulada aumenta hasta representar, en el punto de máximo crecimiento, casi la mitad de la actividad total y luego su proporción desciende hasta alrededor del 15% del total.

De este análisis podría deducirse que la enzima cumpliría diferentes funciones según su localización. Así, la forma soluble, que como muestra la figura 49 se mantiene con pocas variaciones, estaría activada constitutivamente y proveería AMP cíclico necesario para funciones independientes del ciclo celular. Por su parte, la forma unida a membranas podría estar relacionada con la proliferación y por ello alcanza la mayor proporción precisamente en el momento de máximo crecimiento.



Es decir, la enzima se traslocaría a la membrana cuando hay disponibilidad de nutrientes y hay, por ende, una activa división celular. Cuando comienzan las restricciones del entorno, la división celular disminuye considerablemente y la enzima disminuye de la misma manera su asociación con la membrana. Esta hipótesis se confirma al cultivar *A. rhizogenes* en medio mínimo (M9); un cultivo de 48 horas que fue crecido las últimas 8 horas en medio mínimo presenta una actividad y una distribución subcelular de la adenilil ciclasa propias de la fase de crecimiento estacionario. Por lo tanto, habría un nivel basal de AMP cíclico producido en forma constitutiva por la forma soluble, al que se le suma el producido por la forma particulada que, al llegar al máximo crecimiento, representaría casi la mitad del AMP cíclico total.

PROTEINAS DE TIPO RAS EN *Agrobacterium*

Detección de una proteína que une GTP en membranas de *Agrobacterium*

Detección de unión específica de [³⁵S]GTPγS en membranas de *Agrobacterium*

Durante el desarrollo de los estudios de la adenilil ciclasa de *Agrobacterium*, si bien no se observó efecto de GTP o de sus análogos no hidrolizables sobre la actividad de dicha enzima, se detectó en membranas (tanto de *A. rhizogenes* como de *A. tumefaciens*), unión específica de [³⁵S]GTPγS. Este hecho podría indicar que en esas membranas se encuentra una proteína que une GTP. Dado que el *binding* detectado era muy bajo, aproximadamente 0,5 pmol por mg de proteína de membrana, este ensayo no sirvió como herramienta para caracterizar a la proteína responsable de la actividad señalada.

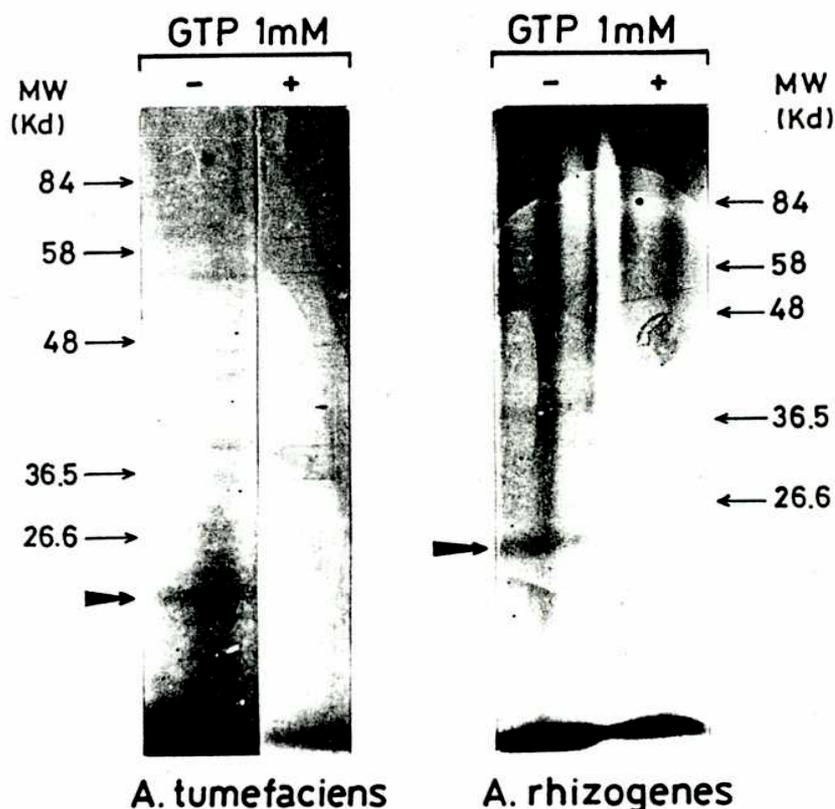
Por otro lado, si bien no hay antecedentes en bacterias, las proteínas que unen GTP en membranas están, en general, asociadas a la transducción de señales, como ya se describió en la Introducción. En bacterias, las únicas GTPasas conocidas son las que actúan en iniciación y elongación de la síntesis proteica y son citosólicas.

En base a todo lo mencionado previamente, se decidió comenzar los análisis utilizando tres herramientas: unión específica de α[³²P]GTP por fotoafinidad, ADP ribosilación por toxinas de *V. cholerae* y *B. pertussis*, e *immunoblot* utilizando una serie de anticuerpos dirigidos contra distintos epitopes de subunidades α y β de proteínas G. Este análisis sigue los criterios definidos por Bourne y De Franco (1989) para definir a una proteína como proteína G.

Unión específica de α [32 P]GTP por fotoafinidad

Se incubaron membranas de *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens* con α [32 P]GTP y se iluminó con luz UV para lograr que la unión del nucleótido a la proteína sea covalente tal como se describió en Materiales y Métodos. Para determinar la especificidad de la unión del nucleótido, se repitió la reacción agregando GTP 0,1 mM de modo de desplazar al nucleótido unido específicamente. El resultado obtenido se observa en la figura 50.

Como puede apreciarse, se detectó una banda de 21 kDa que une GTP en forma específica en ambas especies.



ADP ribosilación

Para la reacción de ADP ribosilación, se trataron membranas de *A. rhizogenes* con toxinas de *V. cholerae* y *B. pertussis*. Para determinar que la incorporación fuera específica, se usó NAD 0,1 mM para desplazar. Paralelamente, se trataron en la misma forma membranas de segmentos externos de bastones de retina bovina (ROS) que contienen transducina; este control resulta muy útil ya que la subunidad α de esta proteína (αt) es ADP ribosilable por ambas toxinas; también se hizo un control incubando membranas de ROS con NAD³²P sin toxinas, para detectar ADPribosilación endógena.

Dado que la transducina es una de las proteínas mayoritarias de la membrana de ROS (ya que ésta es una región de la célula altamente especializada en la fototransducción), las calles que contenían membranas de ROS se expusieron 40 horas mientras que las que contenían membranas de *Agrobacterium* se expusieron 6 días.

PT	-	+	+	-	-
CT	-	-	-	+	+
NAD	-	-	+	-	+



Membranas ROS

+	+	-	-
-	-	+	+
-	+	-	+



Membranas Ar

Como se observa en la figura 51, las membranas de ROS incorporaron ADPribosa radioactiva en forma específica y se detectó perfectamente una banda de 39 kD correspondiente a α exponiendo 40 horas; en cambio, las membranas de *Agrobacterium* no mostraron ese efecto aún luego de una exposición de 6 días.

Immunoblots utilizando anticuerpos dirigidos contra epitopes de subunidades α y β de proteínas G

Los ensayos de identificación de una proteína G en membranas de *Agrobacterium* se completaron haciendo *immunoblots* utilizando una batería de anticuerpos policlonales dirigidos contra distintos epitopes de subunidades α y β de proteínas G.

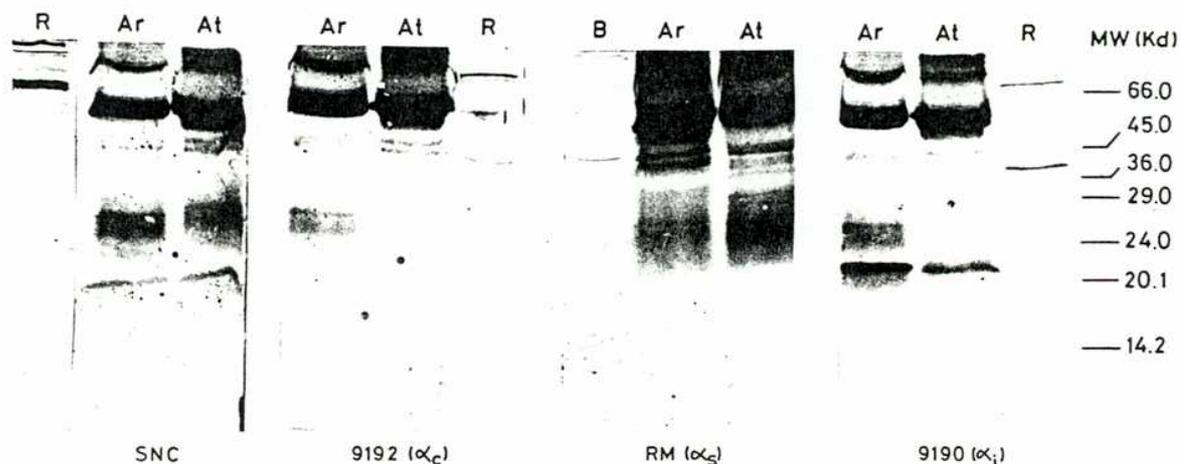
En la tabla 14 se detallan los anticuerpos utilizados:

Denominación reconocido	Especificidad	Región reconocida	Epitope
9192	α común	sitio de unión de GTP	GAGESGKSTIVKWMK
RM1	α_s	C-terminal	RMHLRQYELL
9190	α_i	C-terminal	KNNLKDCGLF
SW1	β	C-terminal	

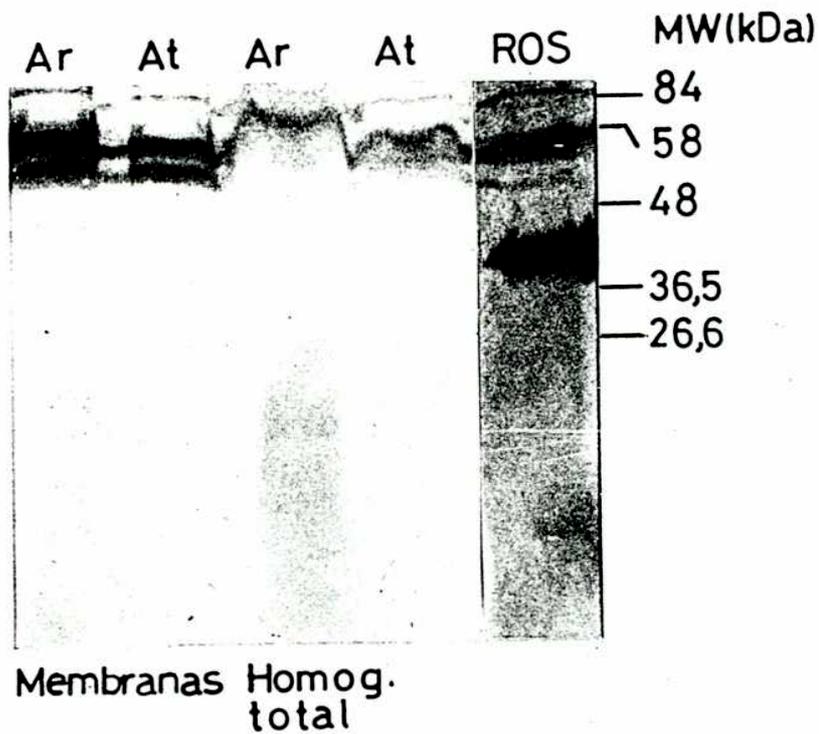
Todos estos anticuerpos fueron obtenidos por inmunización con péptidos sintéticos cuya secuencia se detalla en la tabla 14 y fueron obtenidos en conejo. Como hubo una importante reacción cruzada entre suero de conejo y proteínas de *Agrobacterium*, se

decidió clarificar las muestras con suero normal de conejo y proteína A-sepharosa, como se describió en Materiales y Métodos, antes de sembrarlas en los geles.

En la figura 52 se muestran los resultados obtenidos con los anticuerpos 9192, RM1 y 9190 y se hizo un control de especificidad utilizando suero normal de conejo como control negativo. Además, se utilizaron membranas de ROS (para 9190 y 9192) y de cerebro de rata (para RM1) como controles positivos.



Para detectar la posible presencia de subunidades β , se utilizaron membranas y también homogenatos de *Agrobacterium*. Esto se debe a que en algunos casos como transducina, los complejos $\beta\gamma$ se unen débilmente a membranas. Como control positivo se utilizaron membranas de ROS. En la figura 53 se observan los resultados obtenidos.



Como puede apreciarse en las figuras 52 y 53, sólo se detectó reacción positiva con el anticuerpo 9190, que reconoce la región carboxilo terminal de subunidades α_1 , alumbrándose una banda de

21 kDa.

Un resultado aparentemente contradictorio es el obtenido con el anticuerpo 9192. El epítopo contra el cual el anticuerpo está dirigido es la zona donde se fija el β fosfato del GTP y es un dominio conservado en toda la familia de las GTPasas (proteínas G, ras, factores de iniciación y elongación de la síntesis proteica). Por lo tanto, habiendo detectado unión específica del GTP, era de esperar obtener un resultado positivo con este anticuerpo. Sin embargo, si se analiza la secuencia del péptido utilizado en la inmunización, GAGESGKSTIVKQHK, se advierte que sólo los primeros siete aminoácidos pertenecen a la región consenso A definida por Halliday que es común a toda la familia. Los ocho aminoácidos restantes sólo están conservados dentro de las subunidades α de proteínas G. Por lo tanto, es muy probable que los aminoácidos con mayor antigenicidad sean los últimos ocho y de ahí que no se haya obtenido una reacción positiva.

Cabe destacar que el único anticuerpo que dio reacción positiva, 9190, reconoce una región que contiene el consenso "CAAX" que aparece no sólo en α_1 , α_t y α_o , sino también en ras y en uno de los componentes de las "ras-relacionadas" como es rho. Si bien los últimos tres aminoácidos son removidos cuando se procesan las proteínas ras, el epítopo reconocido por este anticuerpo presenta lisinas en las posiciones 1 y 5 además de la cisteína, lo que hace que presente homología con el carboxilo terminal (aminoácidos 180-186) de K-ras y también con el de proteínas RHO de *Aplysia* y *S. cerevisiae* (Schafer et al, 1989).

Analizando los resultados obtenidos con los tres métodos utilizados, se puede deducir que la proteína responsable de la unión de GTP en membranas de *Agrobacterium* no es una proteína G; además de la capacidad de unir GTP específicamente y de localizarse en la membrana plasmática, las subunidades α de estas proteínas presentan otras características conservadas en toda la familia:

ADP ribosilación por toxinas de *V. cholerae* y/o *B. pertussis*
Interacción con subunidades β y γ
PM que oscila entre 39000 y 52000
Actividad GTPásica

Sin embargo, los resultados obtenidos son muy importantes, ya que la proteína detectada muestra un PM de 21000, lo que implica que puede tratarse de un miembro de la familia ras o de la familia de las "ras-relacionadas"; además, la presencia del epítopo reconocido por el anticuerpo 9190 limita las posibilidades a las familias ras y rho. Asimismo, estas proteínas en general tienen un nivel muy bajo de expresión y por ello es coherente que para su detección se necesite un método sensible como la unión de [32 P] α GTP por fotoafinidad, y un método general como es la unión de [35 S]GTP γ S no resulte de mayor utilidad.

Caracterización inmunológica de la proteína

Inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo Y13-259

De acuerdo a los resultados obtenidos en la sección anterior, se decidió determinar si la proteína de *Agrobacterium* que une GTP es reconocida por el anticuerpo Y13-259. Este experimento permite hacer una caracterización más precisa de la proteína, ya que la presencia del epítopo reconocido por Y13-259 es un criterio de clasificación (Santos y Nebreda, 1989), tal como se vio en la Introducción.

Como ocurre con los miembros de estas familias, el nivel de expresión de la proteína parece ser bajo. Por lo tanto, se decidió hacer una inmunoprecipitación para concentrar específicamente la proteína y luego, con el precipitado obtenido un *immunoblot*.

Como era de esperar, se obtuvieron bandas de aproximadamente 25 y 50 kDa que corresponden a las cadenas livianas y pesadas de los anticuerpos utilizados en la precipitación. En la calle donde se sembró la muestra precipitada en presencia de Y13-259, se pudo detectar también una banda de PM 21000, que es la banda esperada en caso de que la proteína fuera reconocida por el anticuerpo.

Este experimento permitió confirmar que la proteína en estudio pertenece a la familia ras.

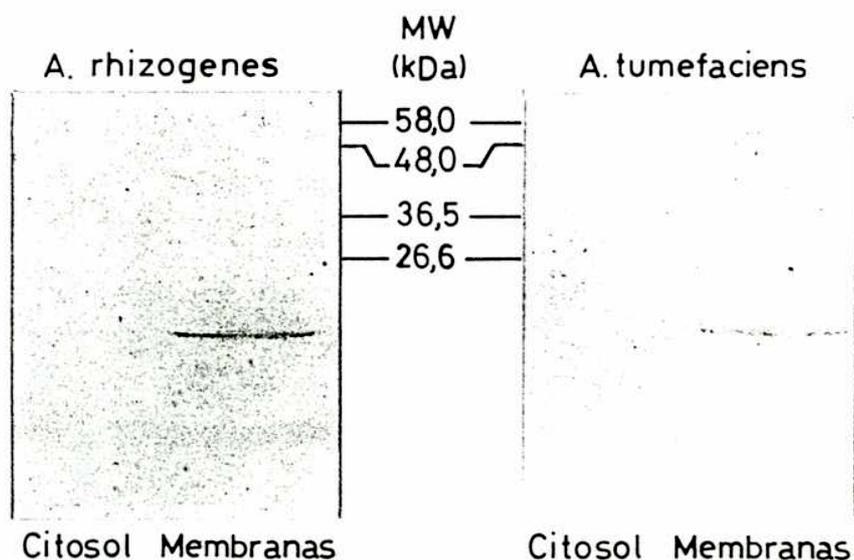
Distribución subcelular y solubilización

El anticuerpo Y13-259 se convirtió en una herramienta de muchísima utilidad para la caracterización de la proteína, ya que proporciona especificidad y sensibilidad en la detección. Se hicieron *Western blots* con membranas de *Agrobacterium*, utilizando entre 0,28 y 0,30 mg de proteína por calle de gel, y de ese modo se logró detectar una señal positiva sin distorsiones. Por lo tanto, para todos los experimentos que involucraron revelado con Y13-259 se usó el método de *immunoblot* sin necesidad de inmunoprecipitar previamente, utilizando la masa de proteínas citada.

Para determinar la distribución subcelular, se sembraron fracciones de membrana y citosol de *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens* en geles y se procedió en la forma descripta. Se sembró la misma cantidad de proteínas en cada calle para poder comparar luego los resultados de cada fracción.

La figura 55 muestra los resultados obtenidos. Como se puede apreciar, tanto en *A. rhizogenes* como en *A. tumefaciens*, la proteína apareció exclusivamente en la fracción de membranas.

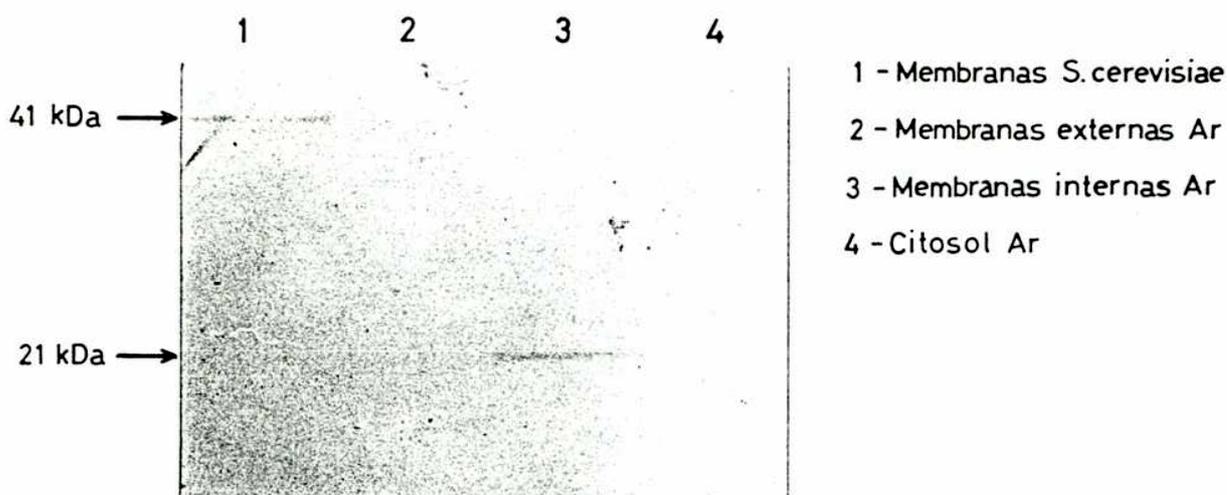
Posteriormente, se obtuvieron membranas internas y externas de *A. rhizogenes* en la forma descripta en Materiales y Métodos y esas muestras se utilizaron para lograr una localización más precisa



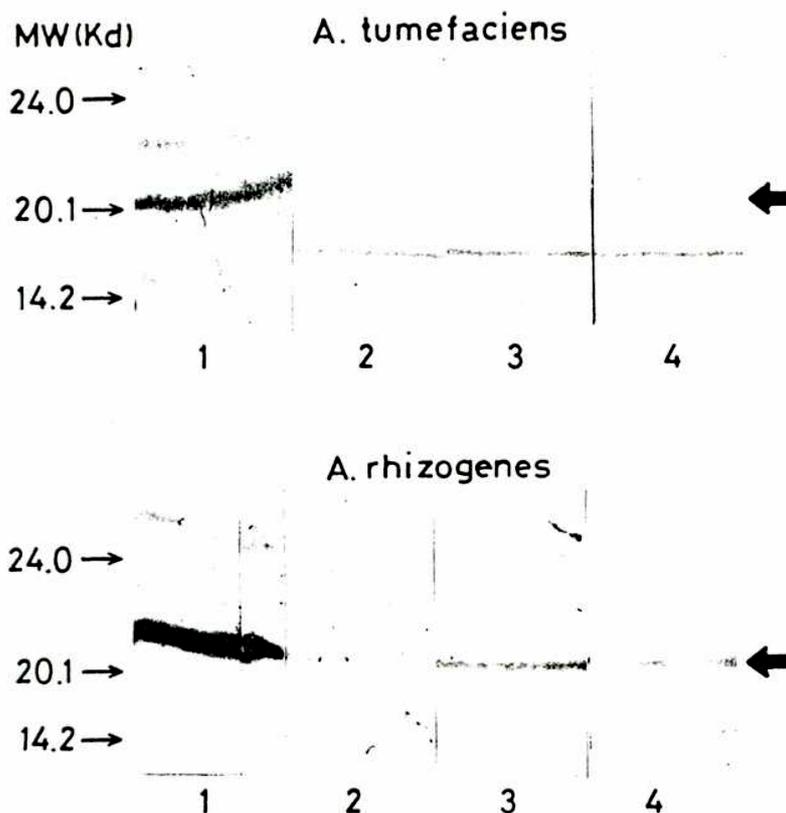
de la proteína; además, se sembraron también muestras de fracción citosólica y membranas de *S. cerevisiae* como control positivo. El resultado obtenido fue el que se observa en la figura 56.

Como ya se había visto, no apareció la proteína en citosol; la proteína se detectó claramente en la fracción que contenía membranas internas y en la fracción de membranas externas sólo pudo observarse una banda muy débil, que podría deberse a una contami-

nación de la fracción con membranas internas al separar los gradientes. Las membranas de *S. cerevisiae* mostraron la banda característica de 40-41 kDa.



Además, se decidió determinar el tipo de asociación de la proteína con la membrana. Para ello, se trataron membranas con NaCl 0,25 M, NP40 0,5 (v/v) y colato de sodio 0,5 (v/v) para solubilizar proteínas. Los extractos obtenidos se sembraron en geles y se realizó un *Western blot* con el anticuerpo Y13-259.

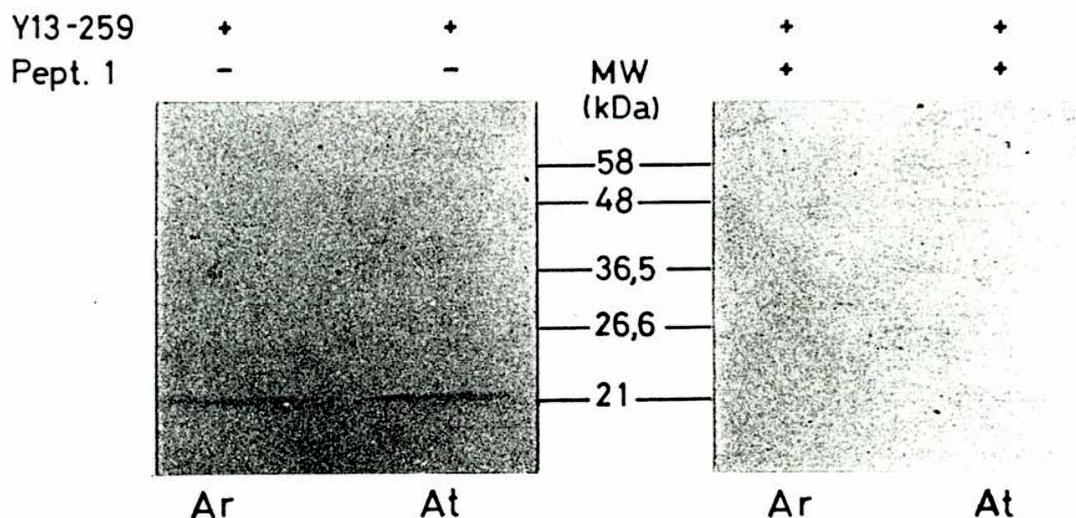


Como muestra la figura 57, la proteína se extrajo con colato (detergente iónico) en ambos casos; con NP40 la extracción fue mucho menos efectiva, y con NaCl no se logró extraer la proteína. Este resultado indica que la proteína tiene una gran afinidad por la membrana y es coherente con los datos ya reportados para los diferentes miembros de la familia.

Especificidad de la detección-Desplazamiento

Si bien al hacer controles con los reactivos utilizados en los *Western blots* como el segundo anticuerpo, reactivos de revelado, etc., no se detectó la existencia de falsos positivos, cabía la posibilidad de una reacción inespecífica del anticuerpo Y13-259 con alguna proteína de *Agrobacterium*.

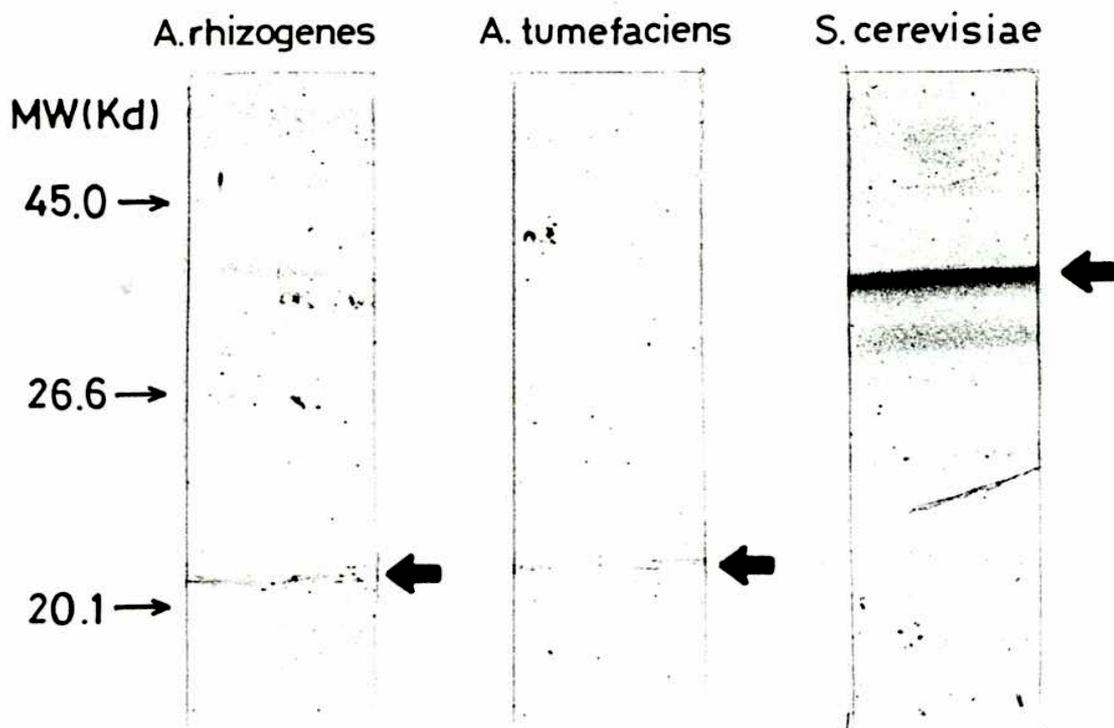
Para excluir esta posibilidad, el siguiente experimento fue fundamental: se hizo un desplazamiento de la señal utilizando el péptido 1, cuya secuencia es EEYSAMRDQYMRTGE y es el utilizado en la inmunización para la obtención del monoclonal Y13-259. Para ello se adsorbió el anticuerpo con el péptido en relación 1:10 durante 2 horas, y luego se procedió en la forma habitual; se usaron muestras de membranas de *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens*.



Como muestra la figura 58, en presencia del péptido la banda reconocida por Y13-259 no se alumbró; este hecho indica que la reacción de Y13-259 con la proteína de 21 kDa es específica.

Immunoblots utilizando anticuerpos pan-reactivos

Se utilizaron también otros dos anticuerpos monoclonales para caracterizar la proteína. Estos anticuerpos se denominan pan-reactivos porque reaccionan con los tres tipos de proteínas ras humanas (N, H y K). Se utilizaron el pan Ab1 y el pan Ab2, de los que no se conoce la región con la que interactúan.



Como se observa en la figura 59, los anticuerpos pan-reactivos revelaron una proteína de 21 kDa en membranas de *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens*. Como control positivo se utilizó una fracción de membranas de *S. cerevisiae*, obteniéndose una banda de alrededor de 40 kDa. El resultado mostrado se obtuvo con el Ab1; con el Ab2 el resultado obtenido fue idéntico.

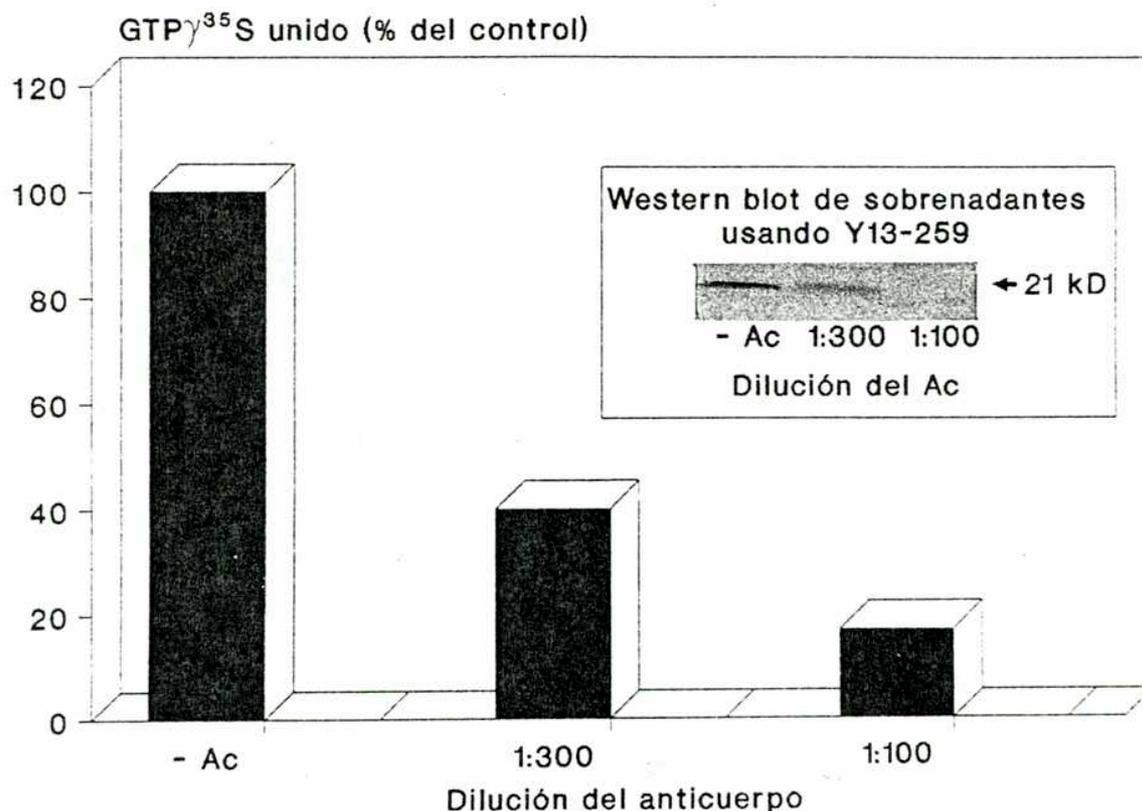
Análisis bioquímico e inmunológico simultáneo

Hasta este punto, se había detectado en membranas de *Agrobacterium*, una proteína de PM 21000 por dos métodos diferentes: uno bioquímico, unión específica de GTP, y otro inmunológico, *Western blot*.

Para confirmar que se trata de una sola proteína hubo que demostrar que la unión de GTP y la reacción con el anticuerpo eran producto de la misma proteína. Para ello se realizó el siguiente experimento: se tomaron tres alícuotas de membranas de *A. rhizogenes* y a dos de ellas se las inmunoprecipitó con distintas concentraciones de Y13-259 (1:100 y 1:300); a la tercera se la trató en la misma forma pero omitiendo el agregado del anticuerpo. De este modo, si la proteína reconocida por Y13-259 es la responsable de la unión de GTP, al precipitarla debería disminuir la capacidad de unir el nucleótido en el sobrenadante de la reacción. Se tomaron entonces esos sobrenadantes y se utilizaron para medir la unión específica de [³⁵S]GTPγS y para *immunoblot* como control paralelo.

Como se observa en la figura 60, al aumentar la concentración de anticuerpo, disminuyó la unión de [³⁵S]GTPγS en los sobrenadantes; además, como se ve en el *inset* de la figura, en esos sobrenadantes disminuyó la proteína de 21 kDa detectada por Y13-259 al aumentar la concentración del anticuerpo en la precipitación. El experimento indica entonces, que la proteína detectada por los distintos métodos empleados es la misma.

No se utilizaron las fracciones precipitadas ya que debido al efecto neutralizante del anticuerpo no hay intercambio de nucleótidos y, por lo tanto, no se puede medir unión de GTP radioactivo agregado exógenamente.



Identificación de secuencias de ADN homólogas a genes ras

Southern blot

Para confirmar a nivel genómico los datos obtenidos hasta este punto, se obtuvo ADN total de *A. rhizogenes* y se lo digirió con las siguientes enzimas de restricción: BamHI, PstI, EcoRI y BamHI

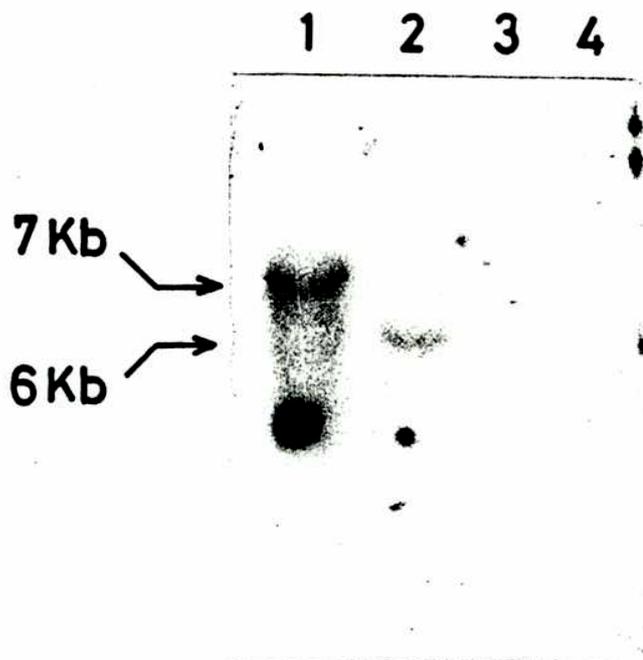
+PstI. Se hizo un *Southern blot* con el ADN digerido y para hibridar se utilizó como sonda un fragmento de ADN copia que contiene la región codificante completa del gen *ras* de *Neurospora crassa* (NC-*ras*)(Altschuler *et al*, 1990), que fue clonado en nuestro laboratorio.

El gen NC-*ras* codifica para una proteína de 213 aminoácidos (24 kDa) que presenta 84% de homología con los primeros 80 aminoácidos de H-*ras* 1 humana y 60% de homología con los siguientes 80 aminoácidos; el fragmento restante no presenta homología salvo en los últimos 4 aminoácidos que constituyen el consenso "CAAX". En ese tracto de 164 aminoácidos, NC-*ras* presenta la mayor homología de secuencia con H-*ras* 1, si se lo compara con el resto de eucariotes inferiores que presentan genes *ras* (*S. cerevisiae*, *S. pombe*, etc.). *N. crassa* y *S. pombe* son los antecedentes evolutivos más antiguos de la familia de proteínas *ras* de 21-24 kDa y, por ese motivo, se utilizó la sonda de NC-*ras* para analizar el ADN de *Agrobacterium* que es un organismo aún menos evolucionado.

La hibridación se realizó en condiciones de baja rigurosidad y los lavados se llevaron a cabo en condiciones más rigurosas, tal como se describió en Materiales y Métodos. Esta combinación de condiciones de hibridación y lavado son las adecuadas para detectar miembros de una familia de genes con un grado intermedio de homología (Hames y Higgins, 1985). El resultado obtenido se muestra en la figura 61.

Como se aprecia en la figura 61, en las condiciones utilizadas se detectó una banda de alrededor de 7 kb al cortar con BamHI y una banda de 6 kb al digerir simultáneamente con BamHI y PstI.

El resultado obtenido concuerda con lo esperado, ya que las condiciones en que se realizó el ensayo son las adecuadas para revelar genes homólogos de diferentes especies. Cabe destacar que la sonda utilizada presenta de por sí una región de no homología de



- 1 - Bam H1
- 2 - Bam H1-Pst1
- 3 - Pst 1
- 4 - EcoR1

alrededor del 10% de su secuencia que equivale a las bases presentes en ella que no aparecen en *Agrobacterium* y que determinan la diferencia en peso molecular de las proteínas codificadas.

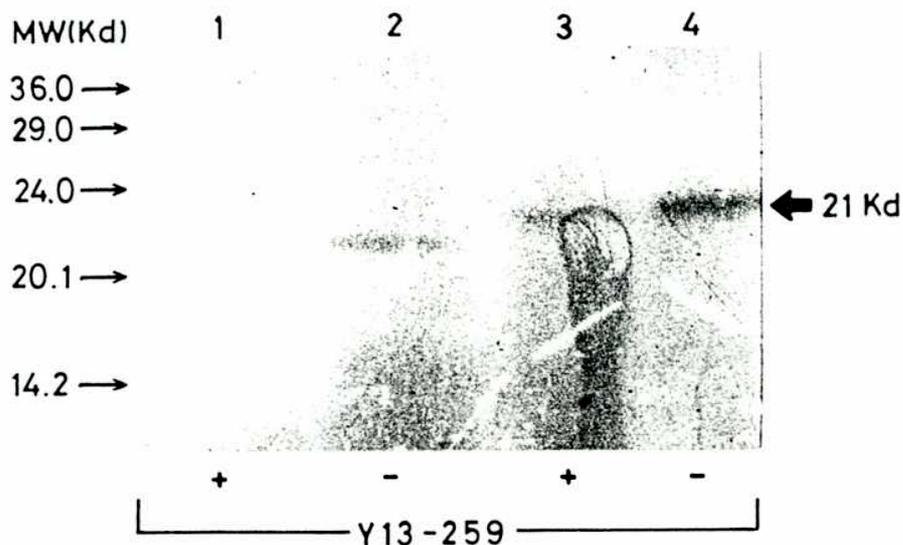
Efecto funcional del anticuerpo Y13-259

Efecto de Y13-259 sobre la unión de GTP

El anticuerpo Y13-259 tiene efecto neutralizante sobre la actividad biológica de p21^{ras}; la microinyección del anticuerpo en líneas celulares impide la transformación de dichas líneas por p21 (Mulcahy *et al*, 1985). Este efecto ocurre porque el anticuerpo impide el intercambio de nucleótidos de modo que la proteína permanece unida a GDP, es decir, en su estado inactivo.

Para comprobar si Y13-259 además de reconocer a la proteína de *Agrobacterium* tiene el efecto neutralizante, se decidió investigar si la presencia del anticuerpo incide de algún modo en la unión de [³²P]αGTP. Para ello, se incubaron membranas de *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens* con el anticuerpo, de modo que la dilución de éste fuera 1:100; como control, se incubaron muestras idénticas de membranas pero sin el anticuerpo. Luego de 60 minutos a temperatura ambiente, se realizó la reacción de unión de [³²P]αGTP por fotoafinidad, tal como se describió en Materiales y Métodos.

Como se aprecia en la figura 62, en presencia del anticuerpo prácticamente desapareció la banda de 21 kDa que se observó en los controles que no se preincubaron con Y13-259. Por lo tanto, el anticuerpo impide la unión de GTP a la proteína. Este experimento demuestra que Y13-259 ejerce un efecto neutralizante sobre las p21 de *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens*.



1-2 *A. rhizogenes*

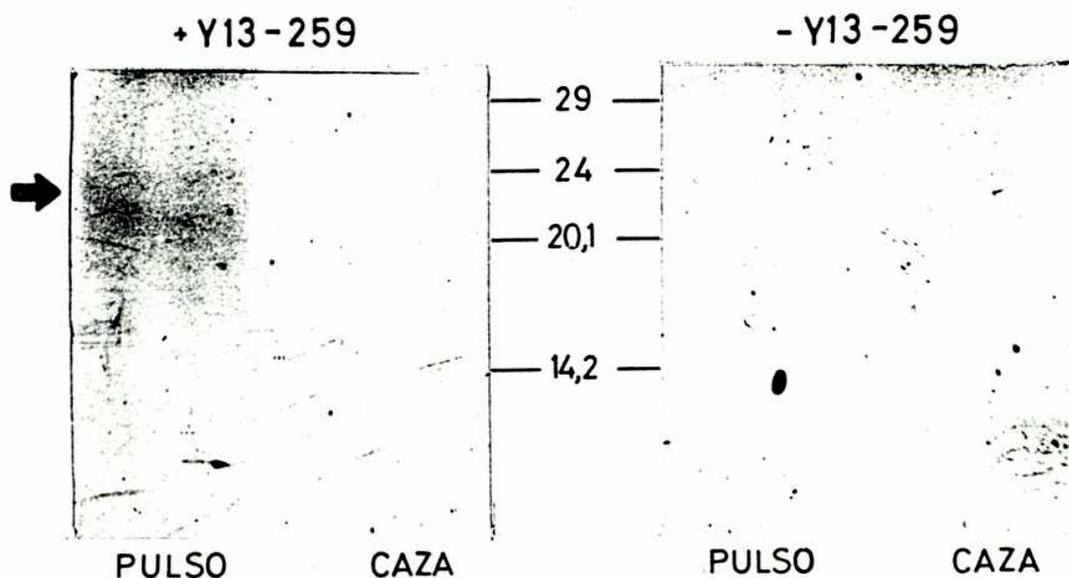
3-4 *A. tumefaciens*

Estimación de la vida media de p²¹ de *Agrobacterium*

Marcación con [³⁵S] metionina - Pulso y caza

Para estimar la vida media de la proteína, se hizo un experimento de pulso y caza marcando *in vivo* un cultivo de *A. rhizogenes* con [³⁵S] metionina.

El pulso fue de 30 minutos y la caza se prolongó por 2 horas. Luego, se inmunoprecipitó la proteína tal como se describió en Materiales y Métodos.



Como muestra la figura 63, se observó una banda de 21 kDa en el pulso que no apareció en la calle correspondiente a la caza. Dicha banda no se observó en los controles negativos, en los cuales se omitió el agregado de Y13-259 durante la precipitación.

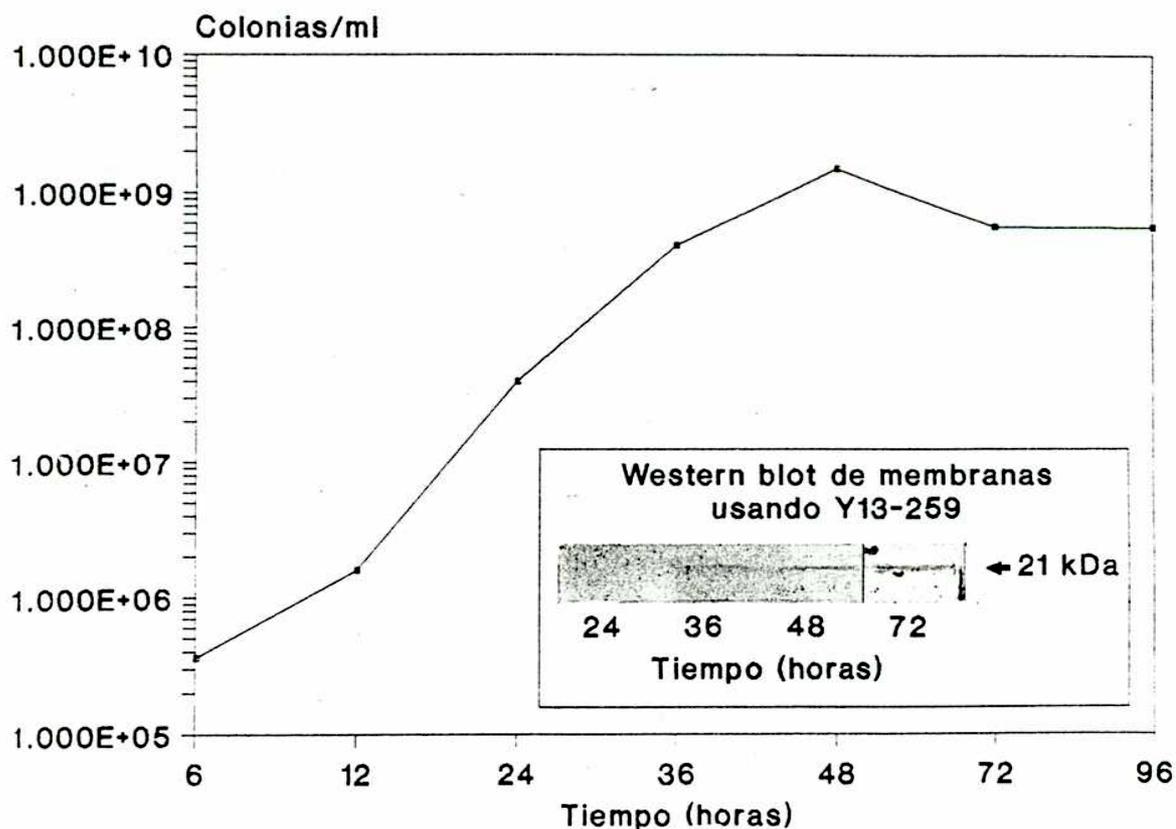
Según este resultado, la proteína tendría una vida media corta, ya que a las 2 horas se habría recambiado por completo.

Expresión de la proteína en distintos estadios del crecimiento bacteriano

Immunoblots utilizando muestras de distintas fases del cultivo

Se analizó la expresión de la p21 de *Agrobacterium* en distintas etapas del crecimiento de la bacteria. Este ensayo es importante porque puede aportar datos acerca de alguna posible función de esta proteína.

Se obtuvieron membranas de fracciones de un cultivo de *A. rhizogenes* cosechadas a 24, 36, 48 y 72 horas; estas muestras son representativas de todo el ciclo de crecimiento de la bacteria. La detección se hizo por *immunoblot* en la forma habitual. Para que los resultados fueran comparables, se sembró la misma cantidad de proteínas en cada calle del gel.



En la figura 64 se muestra una curva de crecimiento de *A. rhizogenes*. Esta curva se hizo plaqueando muestras de cada punto y contando luego el número de viables. Puede observarse que la fase de crecimiento exponencial se prolongó 48 horas; el número de bacterias luego descendió levemente y se mantuvo constante, siendo ésta la fase de crecimiento estacionario. En el *inset* de la figura se muestra el *Western blot* obtenido con membranas de diferentes etapas del cultivo; como se aprecia, la proteína pudo ser detectada a partir de las 36 horas y su expresión aumentó aún cuando el cultivo ya había alcanzado la fase estacionaria. Este dato indica que la proteína no debería estar asociada con el evento de proliferación de la bacteria.

Discusión

Utilizando anticuerpos específicos para proteínas de la familia ras, se detectó en *Agrobacterium* una proteína que presenta las características generales de esta familia: su peso molecular es de 21000, está localizada en membranas y para solubilizarla se requieren detergentes. Además, el hecho de que sea reconocida por el anticuerpo Y13-259 ya es un criterio para clasificar a la p21 de *Agrobacterium* dentro de la familia ras (Santos y Nebreda, 1989).

Por otro lado, por medio de técnicas de unión de nucleótidos radioactivos, se halló que la proteína es capaz de unir GTP en forma específica y, además, se confirmó que la proteína responsable de la unión de GTP es la misma que se detectó inmunológicamente. También se vio que existen secuencias de ADN con homología al gen ras de *N. crassa*.

Correlacionando los datos enunciados con la estructura que presentan las proteínas ras, se puede afirmar que con gran probabilidad los dominios conservados en la familia aparecen en p21 de

Agrobacterium, a pesar de no contar con la secuencia aminoacídica de la proteína. Como se detalló en la Introducción, estos dominios conservados son los siguientes:

- a- Regiones de unión del nucleótido
- b- Región de anclaje a membrana
- c- Epitope reconocido por Y13-259
- d- Dominio efector

La proteína une GTP en forma específica y, dado que las secuencias responsables de esta actividad están muy conservadas (regiones ACGEI; Halliday, 1984) aún en proteínas que no pertenecen a la familia, es altamente probable que estos dominios estén conservados.

En cuanto al anclaje a la membrana, se ha determinado que la proteína está localizada exclusivamente en esa fracción subcelular y presenta gran afinidad por la misma, ya que para la extracción se requiere un detergente como el colato; por otro lado, la proteína es detectada en ensayos de *Western blot* por un anticuerpo dirigido contra una región de Gai, que contiene el consenso "CAAX" y lisinas vecinas que pueden participar en la unión a la membrana (Hancock *et al*, 1990). Dadas las características mencionadas y teniendo en cuenta que la cisteína del dominio "CAAX" es de requerimiento absoluto para la interacción de la proteína con la membrana (Willumsen *et al*, 1984; Hancock *et al*, 1989), existe también una gran probabilidad de que el consenso mencionado esté conservado en la proteína estudiada.

Además, las vías para la síntesis de isoprenoides (farnesil pirofosfato o geranil-geranil pirofosfato) aparecen en bacterias (Pandian *et al*, 1981), por lo que, dadas los requerimientos para la solubilización de la proteína, es posible que la misma esté modificada por isoprenoides y palmitato, como ocurre en eucariotes.

También se puede afirmar que la región reconocida por Y13-259 está presente en la proteína, ya que el anticuerpo detecta a la proteína y, además, la detección es específica ya que la señal se desplazó por el péptido de inmunización. Además, se demostró que esa región no sólo está presente sino que conserva su funcionalidad, ya que como se vio, la presencia de Y13-259 impide el *binding* de GTP por parte de la proteína. Comparando la estructura tridimensional que presenta p21^{ras} cuando tiene unido GDP con la que adopta al unir GTP (Milburn *et al*, 1990), se determinó que las dos regiones que presentan los cambios conformacionales fundamentales son el dominio efector y precisamente la región reconocida por Y13-259; el anticuerpo "congelaría" la conformación en la forma inactiva y se ha postulado que esa región sería la zona de contacto con activadores en forma análoga a la región de las subunidades α donde se produce la interacción con los receptores. Finalmente, no se realizaron ensayos que demuestren la existencia del dominio efector ni de una proteína GAP.

Analizando la vida media de la proteína y su expresión en distintas fases del cultivo, se detectó que la vida media es corta y su expresión es importante cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria. Esto indica que en ese período hay una activa síntesis de la proteína; por otro lado, la proteína parece no estar relacionada con el crecimiento de la bacteria, es decir, con un proceso similar al de proliferación celular de eucariotes.

La diferencia que existe entre las dos fases del crecimiento bacteriano es que la fase estacionaria se alcanza cuando hay una limitación de nutrientes en el medio de cultivo, lo que induce a la bacteria a ajustar su número teniendo en cuenta las condiciones de su entorno; las condiciones menos favorables implican un control de la división celular que culminaría en una suerte de "arresto" del crecimiento. La p21^{ras} de *Agrobacterium* podría tener, en consecuencia, una función relacionada con la adaptación a

las condiciones limitantes del medio. Esto podría compararse con el proceso adaptativo de células eucarióticas a diferentes condiciones de su entorno que provocan arresto del ciclo celular, diferenciación ante señales que aparecen en un momento determinado, etc. Se ha comprobado que las p21^{ras} participan en procesos de diferenciación celular; un ejemplo de esto es el desarrollo vulval de *Caenorhabditis elegans*, proceso en el cual está involucrado el producto del gen let 60 que codifica una proteína perteneciente a la familia ras (Han *et al*, 1990; Beitel *et al*, 1990). Es decir, que la etapa de crecimiento estacionario podría compararse dentro de los límites del caso a un proceso de diferenciación y la p21^{ras} cumpliría entonces algún papel importante en este período. Más aún, se ha demostrado que en algunos casos, p21^{ras} puede inducir arresto del crecimiento en células eucarióticas (Hirakawa y Ruley, 1988).

Como antecedente de proteínas que unen GTP en bacterias se encuentra el producto del gen Era (Ahnn *et al*, 1986); los autores lo caracterizaron como gen homólogo a los genes ras de *S. cerevisiae* porque presenta 46% de homología con esta familia de genes en la mitad amino terminal de la proteína y es capaz de unir GTP. Además, la conservación de aminoácidos esenciales para la unión del nucleótido es mucho mayor que en otras proteínas de *E. coli* que unen GTP, como los productos de los genes lepA (March e Inouye, 1985a, 1985b) o IF2 (Sacerdot *et al*, 1984) que se relacionan con la familia del EF-Tu.

Sin embargo, analizando más detenidamente la secuencia, la homología está restringida sólo a las regiones de unión de GTP y esas zonas se conservan en proteínas que no pertenecen a la familia ras, por lo que la proteína Era no ha sido incluida en esta familia, ya que no posee el resto de los dominios conservados (Santos y Nebreda, 1989). De todos modos, la existencia de esta proteína es un dato importante ya que demuestra que el intercambio de GDP

por GTP y la hidrólisis de GTP como mecanismo de activación de proteínas, excede a la familia del EF-Tu en bacterias. Además, recientemente se ha demostrado que el producto del gen Era cumple una función esencial en el control del ciclo celular de *E. coli* (Gollop y March, 1991).

Teniendo en cuenta todo lo dicho, *Agrobacterium* constituye el género procariótico en el cual se reporta por primera vez la existencia de una proteína ras.

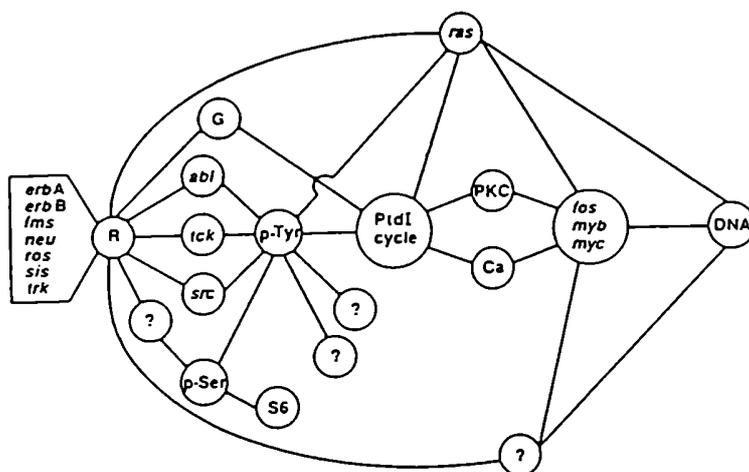
Si bien puede resultar sorprendente el hecho de hallar en bacterias una proteína codificada por un gen que puede pertenecer a una familia de oncogenes, cabe destacar que últimamente ha variado el concepto de oncogen y se ha llegado a la conclusión que cualquier gen que participe en la transducción de señales proliferativas, o que regule el ciclo celular, es candidato a ser oncogen (Bourne, 1987), sobre todo a partir del hallazgo de tumores de pituitaria debidos a mutaciones en la subunidad α de G_s (Landis *et al*, 1989; McCormick, 1990). Este hallazgo llevó a que se denominara oncogen "gsp" a ese gen mutado, y constituye el primer caso en que se conoce con anterioridad la función normal de una oncoproteína.

Por otra parte, si se comparan los mecanismos de transducción de señales en eucariotes y procariotes vistos en la Introducción, se puede observar que ambos siguen un esquema de organización similar (Igo *et al*, 1990) y se han identificado proteínas que cumplen papeles semejantes; existen sensores bacterianos que cumplen una función similar a la de los receptores de factores de crecimiento, e inclusive hay similitudes en términos de topología, por ejemplo entre el receptor de EGF y el producto del gen EnvZ bacteriano, que sensa la osmolaridad del medio. Más aún, se puede afirmar que en bacterias están presentes las dos vías generales de transducción que poseen los eucariotes: una vía que implica la

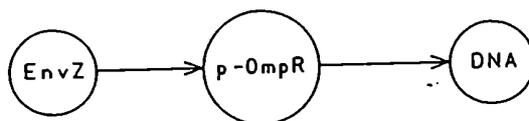
generación de segundos mensajeros (sistema CAP-AMPC) y otra independiente de segundos mensajeros (sistemas de dos componentes) que implica interacciones proteína-proteína y activación por fosforilación.

El esquema que se presenta en la figura 65, sirve para ilustrar esta hipótesis.

EUCARIOTES



PROCARIOTES



Es factible por lo ya visto, que la p21^{ras} de *Agrobacterium* participe en los mecanismos de adaptación a las limitaciones del medio, formando parte de un sistema del tipo de los de dos componentes. Estos sistemas involucran en realidad a otras proteínas, además del sensor y la proteína que se une al ADN (Stock *et al*, 1989) y, en general, participan en respuestas adaptativas que concluyen en la activación o represión de determinados genes u operones.

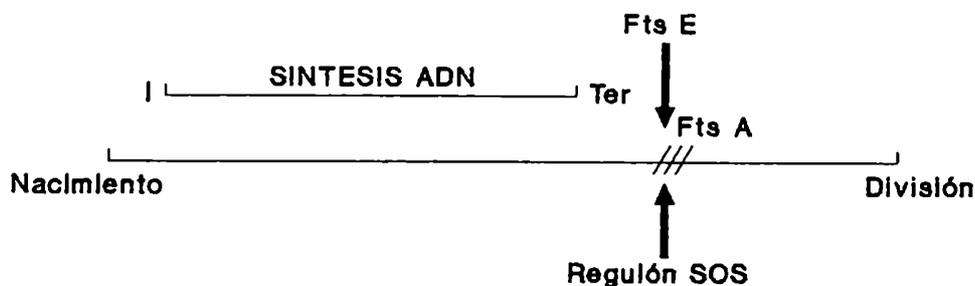
Otra posibilidad es que p21 fuera el punto donde confluyen distintos sistemas de dos componentes que sensan el entorno y afectan el ciclo de división de la bacteria.

Un ejemplo que sustenta esta hipótesis es el de los genes de esporulación de *B. subtilis*. Este proceso se desencadena por una quinasa de proteínas denominada kinA que inicia una cadena de transferencia de fosfatos a través de las proteínas SpoOF y SpoOB al regulador SpoOA; éste activa o reprime la transcripción de distintos genes, permitiendo que se lleve a cabo el proceso. La proteína SpoOB es el punto crítico de control de esta vía donde se interconectan señales metabólicas, del entorno y del ciclo celular. Esta proteína es codificada por el operón SpoOB que tiene otro gen, llamado obg, que codifica para una GTPasa. Esta proteína es esencial para el crecimiento y tiene homología con la proteína Era de *E. coli* (Burbulys *et al*, 1991). Es decir, en *B. subtilis* existe una GTPasa que actúa en el punto donde se decide si la bacteria entra o no en un ciclo de replicación.

CONCLUSIONES

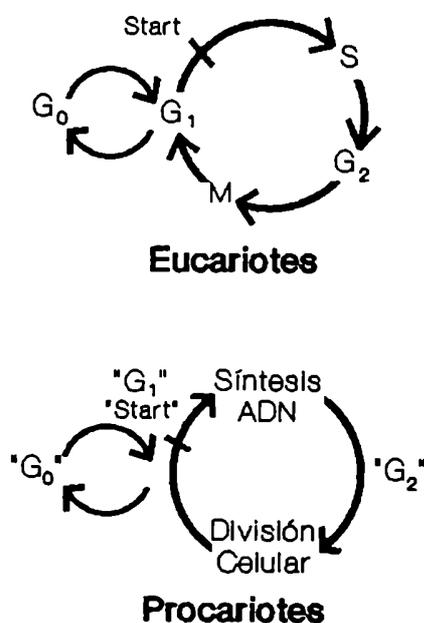
Durante el desarrollo de este trabajo se han caracterizado dos proteínas que participan en la transducción de señales ambientales, tanto en *Agrobacterium rhizogenes* como en *Agrobacterium tumefaciens*: la adenilil ciclasa y una proteína de tipo ras. Ambas proteínas, tal como se describió, parecen responder a la disponibilidad de nutrientes aunque en forma opuesta. La adenilil ciclasa muestra una alta actividad durante la fase de crecimiento exponencial y se activaría por nutrientes; por su parte, la proteína de tipo ras comienza a ser detectable sobre la culminación de dicha fase y su expresión aumenta durante la fase de crecimiento estacionario, por lo que su función parece estar vinculada a la limitación de nutrientes. Por lo tanto, es probable que ambas proteínas actúen en un mismo punto del ciclo de división celular de la bacteria.

En la figura 66 se esquematiza el ciclo celular de *Escherichia coli* que es representativo del ciclo celular bacteriano.



Cuando la célula alcanzó una masa celular precisa, comienza la replicación del ADN y a una longitud celular dada se produce la división. En bacterias, la replicación del ADN y la división están desacopladas, por lo que la entrada de la célula en uno de estos procesos es independiente del otro. Sin embargo, salvando este aspecto, hay muchas similitudes con el ciclo celular de eucariotes, ya que el período anterior a la replicación del ADN puede considerarse como una fase G₁ y el período anterior a la división se asemeja a la fase G₂. Un estado similar al G₀ es el de esporulación como ocurre en *B. subtilis*.

Más aún, se ha postulado que debe existir un punto similar al *start* del ciclo eucariótico que responda a nutrientes (Holland, 1987). En la figura 67 se muestra una comparación de ambos ciclos.

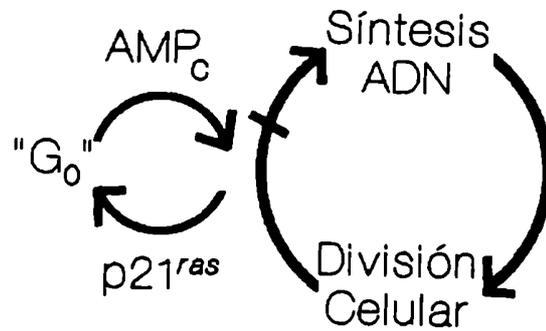


La división está controlada por un *cluster* de genes llamado fts A que son esenciales para el proceso. El gen principal, fts Z, cumple un papel de "factor de división" y actuaría del mismo modo que la cdc 2 quinasa eucariótica que maneja el ciclo celular (Lutkenhaus, 1990). Otro *cluster*, llamado fts E (Gill *et al*, 1986) vincularía al ciclo de división con mecanismos regulatorios globales como por ejemplo, el regulón SOS, que ante daño en el ADN inhibe la división celular (Huisman *et al*, 1984). La acción de este *cluster* podría producirse sobre el hipotético sitio *start*.

Además, el hecho de la existencia de las proteínas Era y Obg (que unen GTP) relacionada a la división celular (Gallop y March, 1991; Burbulys *et al*, 1991), la posibilidad de que un componente del *cluster* fts E sea una quinasa (Gill *et al*, 1986), la homología comprobada entre cdc 2 quinasa y un miembro del *cluster* fts A (Robinson *et al*, 1987), indicarían una función importante de la modificación postraducciona en la regulación de la actividad de las proteínas relacionadas con el ciclo de división, tal como ocurre en eucariotes. Es decir que el ciclo de división dependería finalmente de la actividad del producto del gen fts Z, homólogo de la cdc2 quinasa; la situación equivaldría a la transición G₂/M del ciclo celular eucariótico, donde la forma activa de esa quinasa de proteínas permite la entrada en mitosis. La activación de fts Z sería el punto de control definitivo del ciclo de división.

Por lo tanto, dados los resultados obtenidos, es posible que el AMP cíclico y la proteína de tipo ras actúen sobre el sitio *start*, permitiendo el primero e impidiendo el segundo la entrada en un nuevo ciclo de división, regulando tal vez las modificaciones postraduccionales de proteínas que participan en forma direc-

ta en el proceso de división como el producto del gen *fts Z*. El modelo que se postula se puede esquematizar de la siguiente manera (figura 68):



BIBLIOGRAFIA

- Aaronson, S. y Barbacid, M. (1978) *J. Virol.* 27, 366-373.
- Adari, H., Lowy, D., Whillumsen, B., Der, C.J. y McCormick, F. (1988) *Science* 240, 518-521.
- Ahnn, J., March, P.E., Takiff, H.E. e Inouye, M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8849-8853.
- Altschuler, D., Muro, A., Schijman, A., Bravo-Almonacid, F. y Torres, H.N. (1990) *FEBS Lett.* 273, 103-106.
- Amster-Choder, O., Houman, F. y Wright, A. (1989) *Cell* 58, 847-855.
- Anderegg, R., Betz, R., Carr, S., Crabb, J. y Duntze, W. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 18236-18240.
- Angel, P., Imazawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. y Karin, M. (1987) *Cell* 49, 729-739.
- Antranikian, G., Herzberg, C. y Gottschalk, G. (1985) *Eur. J. Biochem.* 153, 413-420.
- Aroian, R., Koga, M., Mendel, J., Oshima, Y. y Sternberg, P. (1990) *Nature* 348, 693-699.
- Asano, T., Semba, R., Ogasawara, N. y Kato, K. (1987) *J. Neurochem.* 48, 1617-1623.
- Avraham, H. y Weinberg, R. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9, 2058-2066.
- Ballester, R., Michaeli, T., Ferguson, K., Xy, H-P., McCormick, F. y Wigler, M. (1989) *Cell* 59, 681-686.
- Bar-Sagi, D., Suhan, J., McCormick, F. y Feramisco, J. (1988) *J. Cell. Biol.* 109, 2783-2790.
- Barbacid, M. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56, 779-828.
- Barnard, E.A., Darlison, M.E. y Seeburg, P. (1987) *Trends Neurosci.* 10, 502-509.
- Barrowman, M., Cockroft, S. y Gomperts, B. (1986) *Nature* 319, 504-507.
- Beato, M. (1989) *Cell* 56, 335-344.
- Beitel, G.J., Clark, S.G. y Horvitz, H.R. (1990) *Nature* 348, 503-509.

- Bender, A. y Pringle, J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9976-9980.
- Benovic, J.L., Strasser, R.H., Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2797-2801.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1 (1984) Editado por D. Jordan. The William & Wilkins Co., Baltimore.
- Bianchini, G.M., Pastini, A.C., Muschiatti, J.P., Téllez-Iñón, M.T., Martinetto, H.E., Torres, H.N. y Flawiá, M.M. (1990) *Biochem. Biophys. Acta* 1055, 75-81.
- Binétruy, B., Smeal, T. y Karin, M. (1991) *Nature* 351, 122-127.
- Bokoch, G., Katada, T., Northup, J., UI, M. y Gilman, A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3560-3567.
- Bourne, H. (1988) *Cell* 53, 669-671.
- Bourne, H.C. (1987) *Nature* 330, 517-518.
- Bourne, H.R. y De Franco, A.L. (1989) En: "Oncogenes and the molecular origins of cancer", editado por Weinberg, R., C.H.S., cap. 4, 97-125.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. y McCormick, F. (1990) *Nature* 348, 125-131.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. y McCormick, F. (1991) *Nature* 349, 117-127.
- Bourret, R.B., Hess, J.F., Borkovich, K.A., Pakula, A.A. y Simon, M.I. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 7085-7088.
- Bray, C. (1960) *Anal. Biochem.* 1, 279-285.
- Broach, J.R. (1991) *Trends in Genet.* 7, 28-33.
- Brown, A. y Birnbaumer, L. (1988) *Am. J. Physiol.* 23, 401-410.
- Brown, M.S., Anderson, R.G.W. y Goldstein, J.L. (1983) *Cell* 32, 663-667.
- Buchberg, A.M., Cleveland, L.S., Jenkins, N.A. y Copeland, N.G. (1990) *Nature* 347, 291-294.
- Burbulys, D., Trach, K.A. y Hoch, J.A. (1991) *Cell* 64, 545-552.
- Buss, J. y Sefton, B. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6, 116-122.

Buss, J., Quilliam, L., Kato, K., Casey, P., Solski, P., Wong, G., Clark, R., McCormick, F., Bokoch, G. y Der, C. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 1523-1530.

Calés, C., Hancock, J., Marshall, C. y Hall, A. (1988) *Nature* 332, 548-551.

Cantore, M.L. y Passeron, S. (1982) *Arch. Biochem. Biophys. Acta* 219, 1-11.

Cantore, M.L., Galvagno, M.A. y Passeron, S. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 199, 312-320.

Carricarte, V.C., Bianchini, G.M., Muschietti, J.P., Téllez-Iñón, M.T., Perticari, A., Torres, H.N. y Flawiá, M.M. (1988) *Biochem. J.* 249, 807-811.

Casey, P., Solski, P., Der, C.J. y Buss, J. (1989a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8322-8327.

Casey, P.J., Fong, H., Simon, M.I. y Gilman, A. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 2383-2390.

Casey, R.J., Graziano, M.P. y Gilman, A.G. (1989b) *Biochemistry* 28, 611-616.

Cassel, D. y Selinger, Z. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3307-3311.

Cerione, R., Gierschik, P., Staniszewski, C., Benovic, J., Codina, J., Somers, R., Birnbaumer, L., Spiegel, L.A., Lefkowitz, R. y Caron, M. (1987) *Biochemistry* 26, 1485-1491.

Cerione, R., Kroll, S., Rajaram, R., Unson, C., Goldsmith, P. y Spiegel, A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 9345-9352.

Cerione, R., Regan, J., Nakata, H., Codina, J., Benovic, J., Gierschik, P., Somers, R., Spiegel, A., Birnbaumer, L., Lefkowitz, R. y Caron, M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 3901-3909.

Chardin, P. (1991) *Cancer Cells* 3, 117-126.

Chardin, P., Boquet, P., Madaule, P., Popoff, N., Rubin, E. y Gill, D. (1989) *EMBO J.* 8, 1087-1092.

Chiang, T.M., Reizer, J. y Beachey, B.M. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 2957-2962.

Chinkers, M., Garbers, D., Chang, M-S., Lowe, D., Chin, H., Goeddel, D. y Schulz, S. (1989) *Nature* 338, 78-83.

- Clarke, S. (1970) *J. Biol. Chem.* **250**, 5459-5469.
- Clarke, S., Vogel, J., Deschenes, R. y Stock, J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4643-4647.
- Cockcroft, S. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **12**, 75-78.
- Codina, J., Hildebrant, J., Sekura, R., Birnbaumer, M., Bryan, J., Manclark, C., Iyengar, R. y Birnbaumer, L. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 5871-5886.
- Codina, J., Yatani, A., Grenet, D., Brown, A. y Birnbaumer, L. (1987) *Science* **236**, 442-445.
- Coso, O.A., Díaz Añel, A.M., Martinetto, H.E., Muschietti, J.P., Kazaniets, M., Torres, H.N. y Flawiá, M.M. (1991) Enviado a publicar.
- Cozzone, A.J. (1988) *Annu. Rev. Microbiol.* **42**, 97-125.
- Danchin, A., Dondon, L. y Daniel, J. (1984) *Mol. Gen. Genet.* **193**, 473-478.
- Daniel, J., Joseph, E. y Danchin, A. (1984) *Mol. Gen. Genet.* **193**, 467-472.
- de Vos, A.M., Tong, L., Milburn, M.V., Matias, P.M., Jancarik, J., Noguchi, S., Nishimura, S., Miura, K., Ohtsuka, E. y Kim, S-H. (1988) *Science* **239**, 888-893.
- DeFeo-Jones, D., McAvoy, E., Jones, R., Vuocolo, G., Haskell, K., Wegrzyn, R. y Oliff, A. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2307-2310.
- DeFeo-Jones, D., Scolnick, E., Koller, R. y Dhar, R. (1983) *Nature* **306**, 707-709.
- Der, C.J., Finkel, T. y Cooper, G. (1986) *Cell* **44**, 167-176.
- Deschenes, R., Stimmel, J., Clarke, S., Stock, J. y Broach, J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 11865-11873.
- Devreotes, P.N. (1989) *Science* **245**, 1054-1058.
- Dhaese, P., DeGreve, H., Decraemer, H., Schell, J. y Van Montagu, M. (1979) *Nucl. Acids Res.* **7**, 1837-1849.
- Dhar, R., Ellis, R., Shih, T., Oroszlans, E. y Shapiro, B. (1982) *Science* **217**, 934-936.
- Dietzel, C. y Kurjan, J. (1987) *Cell* **50**, 1001-1010.

- Dohlman, H.G., Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1987) *Biochemistry* 26, 2657-2664.
- Downing, J.R., Margolis, B., Zilberstein, A., Ashmun, R.A., Ullrich, A., Sherr, C. y Schlessinger, J. (1989) *EMBO J.* 8, 3345-3350.
- Downward, J. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 469-472.
- Downward, J., Riehl, R., Wu, L. y Weinberg, R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5998-6002.
- Edelstein, S.J. y Schachman, H.K. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 306-311.
- Eisenschlos, C., Paladini, A., Molina y Vedia, L., Torres, H.N. y Flawiá, M.M. (1986a) *Biochem. J.* 237, 913-917.
- Eisenschlos, C., Flawiá, M.M., Torruella, M. y Torres, H.N. (1986b) *Biochem. J.* 236, 185-191.
- Fedor-Chaiken, M., Deschenes, R. y Broach, J. (1990) *Cell* 61, 329-340.
- Feig, L.A. y Cooper, G.M. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8, 2472-2478.
- Field, J., Vojtek, A., Ballester, R., Bolger, G., Colicelli, J., Ferguson, K., Gerst, J., Kataoka, T., Michaeli, T., Powers, S., Riggs, M., Rodgers, L., Wieland, I., Wheland, B. y Wigler, M. (1990) *Cell* 61, 319-327.
- Fields, J.S. (1990) *Trends in Biochem. Sci.* 15, 270-273.
- Firtel, R.A., van Haaster, J.M., Kimmel, A.R. y Devreotes, P.N. (1989) *Cell* 58, 235-239.
- Fischer, T. y White, G. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149, 700-706.
- Fischer, T., Gatling, M., Lacal, J. y White, G. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 19405-19408.
- Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1972a) *J. Biol. Chem.* 247, 6873-6879.
- Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1972b) *J. Biol. Chem.* 247, 6880-6883.
- Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1972c) *Biochem. Biophys. Acta* 289, 428-432.

- Fray, I.J., Villa, L., Kuehn, G.D. y Hageman, J.H. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**, 212-217.
- Frech, M., John, J., Pizon, V., Chardin, P., Tavitian, A., Clark, R., McCormick, F. y Wittinghofer, A. (1990) *Science* **249**, 169-171.
- Fujiyama, A., Matsumoto, K. y Tamanoi, F. (1987) *EMBO J.* **6**, 223-228.
- Fukada, Y., Ohzuro, H., Saito, T., Yoshizawa, T. y Akino, T. (1989) *J. Biol. Chem.* **284**, 5937-5943.
- Fukada, Y., Takao, T., Ohguro, H., Yoshizawa, T., Akino, T. y Shimonishi, Y. (1990) *Nature* **346**, 658-660.
- Fukui, Y., Kozasa, T., Kaziro, Y., Takeda, T. y Yamamoto, M. (1986) *Cell* **44**, 329-336.
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Arak, S., Ueda, T., Kikuchi, A. y Takai, Y. (1990) *Oncogene* **5**, 1321-1328.
- Furth, M., Davis, L., Fleur de Lys, B. y Scolnick, E. (1982) *J. Virol.* **43**, 294-299.
- Garret, M., Self, A., Van Oers, C. y Hall, A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 10-13.
- Gautam, N., Baetscher, M. Ackersold, R. y Simon, M.I. (1989) *Science* **244**, 971-974.
- Gauthier-Rouviere, C., Fernández, A. y Lamb, N. (1990) *EMBO J.* **9**, 171-180.
- Gibbs, J., Marshall, M., Scolnick, E., Dixon, R. y Vogel, U. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 20437-20442.
- Gibbs, J., Schaber, M., Allard, W.J., Sigal, I.S. y Scolnick, E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5026-5030.
- Gill, D.R., Hatfull, G.F. y Salmond, G.P.C. (1986) *Mol. Gen. Genet.* **205**, 134-145.
- Gilman, A. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615-649.
- Giulian, G. y Graham, J. (1988) *Hoefler Scientific Instruments Catalogue*, 134-135.
- Glomset, J., Gelb, M. y Farnsworth, C. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 139-142.

- Goldsmith, P., Backlund, P.S., Rossiter, K., Carter, A., Milligan, G., Unson, C.G. y Spiegel, A. (1988) *Biochemistry* 27, 7085-7090.
- Goldstein, J. y Brown, M. (1990) *Nature* 343, 425-430.
- Gollop, N. y March, P.E. (1991) *J. Bacteriol.* 173, 2265-2270.
- Goud, B., Salminen, A., Walworth, N. y Novick, P. (1988) *Cell* 53, 753-768.
- Green, N.M. (1989) *Nature* 340, 679-680.
- Greenwald, I. y Broach, J. (1990) *Cell* 63, 1113-1116.
- Groisman, E.A. y Saier, M.H. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 30-33.
- Gutierrez, L., Magee, A.I., Marshall, C. y Hancock, J. (1989) *EMBO J.* 8, 1093-1098.
- Haga, T., Haga, K. y Gilman, A.G. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5776-5782.
- Halenbeck, R., Crosier, W., Clark, R., McCormick, F. y Koths, K. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 21922-21928.
- Hall, A. (1990a) *Cell* 61, 921-923.
- Hall, A. (1990b) *Science* 249, 635-640.
- Hall, M.N. y Silhavy, T.J. (1981) *J. Mol. Biol.* 146, 23-43.
- Halliday, K. (1984) *J. Cyclic Nucleot. Prot. Phosph. Res.* 9, 435-448.
- Hames, B.D. y Higgins, S.J. (1985) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 73-111.
- Han, M. y Sternberg, P.W. (1990) *Cell* 63, 921-931.
- Hancock, J., Cadwallader, K. y Marshall, C. (1991) *EMBO J.* 10, 641-646.
- Hancock, J., Paterson, H. y Marshall, C. (1990) *Cell* 63, 133-139.
- Hancock, J.P., Magee, A.I., Childs, J.E. y Marshall, C.J. (1989) *Cell* 57, 1167-1179.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. y Hunter, T. (1988) *Science* 241, 42-52.

Harlow, E. y Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Harvey, J. (1964) *Nature* 204, 1104-1105.

Hata, Y., Kikuchi, A., Susaki, T., Schaber, M., Gibbs, J. y Takai, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 7104-7107.

Hattori, S., Clanton, D.J., Satoh, T., Nahamura, S., Kaziro, Y., Kawakita, M. y Shih, T.Y. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 1992-2002.

Heideman, W. y Bourne, H.R. (1990) En "G proteins" editado por Iyengar, R. y Birnbaumer, L.; Academic Press, cap.2, 17-39.

Hescheler, J., Rosenthal, W., Trautmein, W. y Schultz, G. (1987) *Nature* 325, 445-447.

Hewlett, E. y Wolff, J. (1976) *J. of Bacteriol.* 127, 890-898.

Higashijima, T., Ferguson, K.M., Sternweis, P., Smigel, M.D. y Gilman, A. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 762-766.

Hildebrandt, J., Codina, J., Risinger, R. y Birnbaumer, L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2039-2042.

Hildebrandt, J., Codina, J., Rosenthal, W., Birnbaumer, L., Neer, E., Yamazaki, A. y Bitinsky, M. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14867-14872.

Hildebrandt, J., Sekura, R., Codina, J., Iyengar, R., Manclark, C. y Birnbaumer, L. (1983) *Nature* 302, 706-709.

Hirakawa, T. y Ruley, H.E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1519-1523.

Holbrook, S.R. y Kim, S-H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1751-1755.

Holland, I.B. (1987) *Cell* 48, 361-362.

Honegger, A., Dull, T.J., Bellot, F., Van Obberghen, E., Seapary, D., Schmidt, A., Ullrich, A. y Schlessinger, J. (1988) *EMBO J.* 7, 3045-3052.

Hrycyna, C., Sapperstein, S., Clarke, S. y Michaelis, S. (1991) *EMBO J.* 10, 1699-1709.

Hughes, A., Fukui, Y. y Yamamoto, M. (1990) *Nature* 344, 355-357.

- Huisman, O., D'Ari, R. y Gottesman, S. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4490-4494.
- Hynes, R.O. (1987) *Cell* **48**, 549-554.
- Igo, M.M., Stauch, J.M. y Silhavy, T.J. (1990) *New Biol.* **2**, 5-9.
- Ishii, S., Kadonaga, J., Tjian, R., Brady, J., Merlino, G. y Pastan, I. (1986) *Science* **232**, 1410-1413.
- Ishii, S., Merlino, G. y Pastan, I. (1985) *Science* **230**, 1378-1381.
- Jelsema, C.L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 163-168.
- Jelsema, C.L. y Axelrod, J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3623-3627.
- Jenssens, P. y Van Haastert, P. (1987) *Microbiol. Rev.* **51**, 396-418.
- Jin, S., Roitsch, T., Christie, P. y Nester, E. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 531-537.
- John, J., Frech, M. y Wittinghofer, A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 11792-11799.
- Jones, D. y Reed, R. (1989) *Science* **244**, 790-795.
- Jones, S., Vignais, M.L. y Broach, J.R. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2641-2646.
- Jurnak, F. (1985) *Science* **230**, 32-36.
- Jurnak, F., Heffron, S. y Bergmann, E. (1990) *Cell* **60**, 525-528.
- Juvasa, Y., Jonemitsu, K., Matsui, K., Fulkunaga, K. y Miyamoto, E. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**, 656-660.
- Kaplan, D.R., Morrison, D.K., Wong, G., McCormick, F. y Williams, L.T. (1990) *Cell* **61**, 125-133.
- Kassis, S. y Kindler, S.H. (1975) *Biochem. Biophys. Acta* **391**, 513-518.
- Katada, T., Bokoch, G., Smigel, M., Ui, M. y Gilman, A. (1984b) *J. Biol. Chem.* **259**, 3586-3595.
- Katada, T., Northup, J., Bokoch, G., Ui, M. y Gilman, A. (1984a) *J. Biol. Chem.* **259**, 3578-3585.

- Katada, T., Oinuma, M. y Ui, M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 5215-5221.
- Kataoka, T., Broek, D. y Wigler, M. (1985a) *Cell* **43**, 493-505.
- Kataoka, T., Powers, S., Cameron, S., Fasano, O., Goldfarb, M., Broach, J. y Wigler, M. (1985b) *Cell* **40**, 19-26.
- Kazlauskas, A. y Cooper, J.A. (1989) *Cell* **58**, 1121-1132.
- Khandelwal, R.L. y Hamilton, I.R. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 3297-3304.
- Kikuchi, A., Kozawa, O.I., Kaibuchi, K., Katada, T., Ui, M. y Takai, Y. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 11558-11562.
- Kirstein, W. y Mayer, L. (1967) *J. Natl. Cancer Inst.* **39**, 311-335.
- Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y. y Noda, M. (1989) *Cell* **56**, 77-84.
- Klein, C., Brachet, P. y Darmon, M. (1977) *FEBS Lett.* **76**, 145-147.
- Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C. y Pawson, T. (1991) *Science* **252**, 668-674.
- Kofoid, E.C. y Parkinson, J.S. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4981-4985.
- Koniju, T., Vander Meene, J., Bonner, J. y Barkley, D. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 1152-1154.
- Kornblihtt, A.R., Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1981) *Biochemistry* **20**, 1262-1267.
- Kuprinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H., Tang, W., Feinstein, P., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R. y Gilman, A. (1989) *Science* **244**, 1558-1564.
- Lacal, J., Anderson, P. y Aaronson, S. (1986b) *EMBO J.* **5**, 679-687.
- Lacal, J.C. y Aaronson, S. (1986a) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1002-1009.
- Lacal, J.C., Moscat, J. y Aaronson, S. (1987) *Nature* **330**, 269-272.
- Ladant, D. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 2612-2618.

- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- Landis, C.A., Masters, S.B., Spada, A., Pace, A.M., Bourne, H.R. y Vallar, L. (1989) *Nature* 340, 692-696.
- Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 4993-4996.
- Lengeler, J., Auburger, A.M., Mayer, R. y Pecher, A. (1981) *Mol. Gen. Genet.* 183, 163-170.
- Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T., Helman, L.J. y Ahn, T-G. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2329-2333.
- Lin, C.R., Chen, W.S., Lazan, C.W., Carpenter, C.D., Gill, G.N., Evans, R.M. y Rosenfel, M.G. (1986) *Cell* 44, 839-848.
- Linse, K. y Mandelkow, E. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 15205-15210.
- Lochrie, M. y Simon, M.I. (1988) *Biochemistry* 27, 4957-4965.
- Lochrie, M., Mendel, J., Sternberg, P. y Simon, M.I. (1991) *Cell Regul.* 2, 135-142.
- Logothetis, D.E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, B.J. y Clapham, D.E. (1987) *Nature* 325, 321-326.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.C. y Randal, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 267-275.
- Lowy, D.R. y Willumsen, B.M. (1989) *Nature* 341, 384-385.
- Lugtenberg, B., Peters, R., Bernheimer, H. y Berendsen, W. (1976) *Mol. Gen. Genet.* 147, 251-262.
- Lutkenhaus, J. (1990) *Trends Genet.* 6, 22-25.
- Lyons, J., Landis, C.A., Harsh, G., Vallar, L., Grünewald, K., Feitchinger, H., Du, Q-Y., Clark, O.H., Kawasaki, E., Bourne, H.R. y McCormick, F. (1990) *Science* 249, 655-659.
- Ma, H., Yanofsky, M. y Meyerowitz, E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3861-3865.
- Madaule, P., Axel, R. y Myers (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 779-781.
- Magee, A.I., Gutierrez, L., McKay, I., Marshall, C. y Hall, A. (1987) *EMBO J.* 6, 3353-3357.

- March, P.E. e Inouye, M. (1985a) *J. Biol. Chem.* 260, 7206-7213.
- March, P.E. e Inouye, M. (1985b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7500-7504.
- Margolis, B., Bellot, F., Honegger, A.M., Ullrich, A., Schlessinger, J. y Zilberstein, A. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10, 435-441.
- Margolis, B., Lax, I., Kris, R., Dombalagian, M., Honegger, A.M., Howk, R., Givol, D., Ullrich, A. y Schlessinger, J. (1989a) *J. Biol. Chem.* 264, 10667-10671.
- Margolis, B., Rhee, S.G., Felder, S., Mervic, M., Lyall, R., Levitzki, A., Ullrich, A., Zilberstein, A. y Schlessinger, J. (1989b) *Cell* 57, 1101-1107.
- Marshall, C.J. (1991) *Trends in Genet.* 7, 91-95.
- Marshall, M., Hill, W., Ng, A-S., Vogel, U.S., Schaber, M.D., Scolnick, E., Dixon, R., Sigal, I. y Gibbs, J. (1989) *EMBO J.* 8, 1105-1110.
- Martin, R.G. y Ames, B.N. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1372-1379.
- Masters, S.B., Stroud, R.M. y Bourne, H.R. (1986) *Protein Engineering* 1, 47-54.
- Masters, S.B., Sullivan, K.A., Miller, R.T., Beiderman, B., Copey, N.G., Ramachandran, J. y Bourne, H.R. (1988) *Science* 241, 448-451.
- Masure, H.R., Shattuck, R.L. y Storm, D.R. (1987) *Microbiol. Rev.* 51, 60-65.
- Matsui, Y., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Kondo, J., Teranishi, Y. y Takai, Y. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10, 4116-4122.
- Mattera, R., Graziano, M., Yatani, A., Zhou, Z., Graf, R., Codina, J., Birnbaumer, L., Gilman, A. y Brown, A. (1989) *Science* 243, 804-807.
- Mazer, B., Maslor, R., Parkhurst, S. y Corces, V. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5, 885-889.
- McCormick, F. (1989a) *Nature* 340, 678-679.
- McCormick, F. (1989b) *Cell* 56, 5-8.
- McCormick, F. (1990) *Oncogene* 5, 1281-1283.

- McCormick, F., Clark, B.F., LaCour, T., Kyeldgaard, M., Narskov-Lauritsen, L. y Nyborg, J. (1985) *Science* 230, 78-82.
- Melançon, P., Glick, B., Malhotra, V., Weidman, P., Serafini, T., Gleason, M., Orci, L. y Rothman, J. (1987) *Cell* 51, 1053-1062.
- Meunier, J.C., Olseng, R.W. y Changeur, J.P. (1972) *FEBS Lett.* 24, 63-70.
- Milburn, M.V., Tong, L., de Vos, A.M., Brünger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. y Kim, S-H. (1990) *Science* 247, 939-945.
- Mollner, S. y Pfeuffer, T. (1988) *Eur. J. Biochem.* 171, 265-270.
- Molloy, C.J., Bottaro, D.P., Fleming, T.P., Marshall, M.S., Gibbs, J.B. y Aaronson, S.A. (1989) *Nature* 342, 711-714.
- Montminy, M.R. y Bilezikjian, L.M. (1987) *Nature* 328, 175-178.
- Moran, M., Polakis, P., McCormick, F., Pawson, T. y Ellis, C. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 1804-1812.
- Morrison, D.K., Kaplan, D.R., Escobedo, J.A., Rapp, U.R., Roberts, T.M. y Williams, L.T. (1989) *Cell* 58, 649-657.
- Mulcahy, C., Smith, M. y Stacey, D. (1985) *Nature* 313, 241-243.
- Muschietti, J., Bianchini, G., Martinetto, H., Carricarte, V., Giusto, M., Farber, D., Torres, H.N. y Flawiá, M.M. (1989) *Europ. J. Biochem.* 185, 205-210.
- Muschietti, J.P., Martinetto, H.E., Coso, O.A., Torres, H.N. y Flawiá, M.M. (1991) Enviado a publicar.
- Nadin-Davis, S., Nasim, A. y Beach, D. (1986) *EMBO J.* 5, 2963-2971.
- Nakafuku, M., Obara, T., Kaibuchi, K., Miyajima, I., Miyajima, A., Itoh, H., Nakamura, S., Arai, K-I., Matsumoto, K. y Kaziro, Y. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1374-1378.
- Nakayima, Y., Nakayima, S. e Inoue, M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3643-3647.
- Neal, S.E., Eccleston, J.F., Hall, A. y Webb, M.R. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 19718-19722.
- Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B.A., Morrison, A.R. y Lefkowitz, J.B. (1986) *Ann. Rev. Biochem.* 55, 69-102.

- Neer, E., Pulsifer, L. y Wolf, L.C. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 8996-9000.
- Neer, E.J., Wolf, L.G. y Gill, D.M. (1987) *Biochem. J.* **241**, 325-336.
- Neuman-Silverberg, f., Schejter, E., Hoffman, F. y Shilo, B. (1984) *Cell* **37**, 1027-1033.
- Nikaido, H. y Vaara, M. (1985) *Microbiol. Rev.* **49**, 1-32.
- Nimmo, H.G. (1984) *Trends Biochem. Sci.* **9**, 475-479.
- Ninfa, A.J., Ninfa, E.G., Lupas, A.N., Stock, A., Magasanik, B. y Stock, J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5492-5496.
- Nishizuka, Y. (1988) *Nature* **334**, 661-668.
- Northup, J., Smigel, J. y Gilman, A. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11416-11423.
- Northup, J., Sternweis, P., Smigel, M., Schleifer, L., Ross, E. y Gilman, A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6516-6520.
- Ohguro, H., Fukada, Y., Yoshizawa, T., Saito, T. y Akino, T. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **167**, 1235-1241.
- Ohta, H., Okajima, F. y Ui, M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 15771-15780.
- Osawa, S., Dhanasekaran, N., Woon, C.W. y Johnson, G.L. (1990b) *Cell* **63**, 697-706.
- Osawa, S., Heasley, L.E., Dhanasekaran, N., Gupta, N., Woon, S.K., Berlot, C. y Johnson, G.L. (1990a) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2931-2940.
- Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K., John, J. y Wittinghofer, A. (1989) *Nature* **341**, 209-214.
- Pai, E.F., Krengel, U., Petsko, G., Goody, R., Kabsch, W. y Wittinghofer, A. (1990) *EMBO J.* **9**, 2351-2359.
- Pandian, S., Saengchian, S. y Raman, T.S. (1981) *Biochem. J.* **196**, 675-681.
- Papermaster, D. y Dreyer, W. (1974) *Biochemistry* **13**, 2438-2444.
- Parks, S. y Weischaus, E. (1991) *Cell* **64**, 447-457.

- Paterson, H., Self, A., Garret, M., Just, I., Aktories, K. y Hall, A. (1990) *J. Cell. Biol.* 111, 1001-1007.
- Paveto, C., Epstein, A. y Passeron, S. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 169, 449-457.
- Peterkofsky, A. (1981) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 14, 215-228.
- Peterson, G. (1983) *Meth. Enzymol.* 91, 95-119.
- Pizon, v., Chardin, P., Lerusey, L., Olofsson, B. y Tavitian, A. (1988) *Oncogene* 3, 201-204.
- Platt, M.W., Rottem, S., Milner, Y., Barile, M.F., Peterhofsky, A. y Reizer, J. (1988) *Eur. J. Biochem.* 176, 61-67.
- Plutner, H., Schwaninger, R., Pind, S. y Balch, W.E. (1990) *EMBO J.* 9, 2375-2383.
- Postma, P.W. y Lengeler, J.W. (1985) *Microbiol. Rev.* 49, 232-269.
- Powers, S., Michaelis, S., Broek, D., Santa Anna, A.S., Field, J., Herskowitz, I. y Wigler, M. (1986) *Cell* 47, 413-422.
- Powers, S., O'Neill, K. y Wigler, M. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9, 390-395.
- Poysegur, J., Sardet, C., Franchi, A., L'Allemain, G. y Paris, S. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4833-4837.
- Quan, F., Wolfgang, W.J. y Forte, M.A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4321-4326.
- Rasheed, S., Gardner, M. y Huebner, R. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2972-2976.
- Rasheed, S., Norman, G. y Heidecker, G. (1983) *Science* 221, 155-157.
- Reddy, E., Lipman, D., Andersen, P., Tronick, S. y Aaronson, S. (1985) *J. Virol.* 53, 984-987.
- Reig Macia, J.A., Téllez-Iñón, M.T., Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1984) *Biochem. J.* 141, 1-11.
- Reizer, J., Saier, M.H., Deutsche, J., Grenier, F., Thompson, J. y Hengstenberg, W. (1988) *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 15, 297-338.
- Reymond, C., Nellen, W. y Firtel, R. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7005-7009.

- Riess, Y., Goldstein, J., Seabra, M., Casey, P. y Brown, M. (1990) *Cell* 62, 81-88.
- Rilling, H., Breunger, E., Epstein, W. y Crain, P. (1990) *Science* 247, 318-320.
- Rine, J. y Kim, S-H. (1990) *New Biol.* 2, 219-226.
- Robbins, S., Williams, J., Jermyn, K., Spiegelma, G. y Weeks, G. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 938-942.
- Robinson, A.R., Collins, J.F. y Donachie, W.D. (1987) *Nature* 328, 766.
- Rodbell, M. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 5744-5750.
- Rodbell, M., Birnbaumer, L. y Krans, H. (1970) Colloquium on the role of adenyl cyclase and cAMP.
- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. y Krans, H. (1971a) *J. Biol. Chem.* 246, 1877-1882.
- Rodbell, M., Krans, H., Poul, S. y Birnbaumer, L. (1971b) *J. Biol. Chem.* 246, 1877-1882.
- Ronson, C.W., Nixon, B.T. y Ausubel, F.M. (1987) *Cell* 49, 579-581.
- Roof, D., Applebury, M. y Sternweis, P. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 16242-16249.
- Rossi, G., Jian, Y., Newman, A. y Ferro-Novick, S. (1991) *Nature* 351, 158-161.
- Ruggieri, R., Tanaka, K., Nakafuku, M., Kaziro, Y., Toh-e, A. y Matsumoto, K. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8778-8782.
- Ruley, H.E. (1990) *Cancer Cells* 2, 258-268.
- Sacerdot, C., Dessen, P., Hershey, J.W.B., Plumbridge, J.S. y Grunberg-Manago, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7787-7791.
- Saier, M.H. (1989) *Microbiol. Rev.* 53, 109-120.
- Saier, M.H., Wu, L.-F. y Reizer, J. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 391-395.
- Salminen, A. y Novick, P. (1987) *Cell* 49, 527-538.

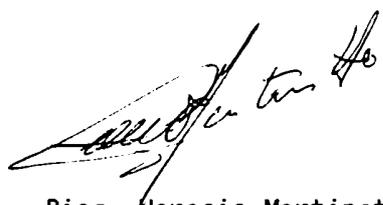
- Salomon, Y. (1979) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 10, 35-41.
- Salomon, Y., Londos, C. y Rodbell, M. (1974) *Anal. Biochem.* 58, 541-548.
- Santos, E. y Nebreda, A.R. (1989) *FASEB J.* 3, 2151-2163.
- Satoh, T., Nakamura, S. y Kaziro, Y. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 4553-4556.
- Schaber, M., O'Hara, M., Garsky, V., Mosser, S., Bergstrom, J., Moores, S., Marshall, M., Friedman, P., Dixon, R. y Gibbs, J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 14701-14704.
- Schafer, W., Kim, R., Sterne, R., Thorner, J., Kim, S-H. y Rine, J. (1989) *Science* 245, 379-385.
- Schejter, E. y Shilo, B. (1985) *EMBO J.* 4, 407-412.
- Schlessinger, J. (1988) *Trends Biochem. Sci.* 13, 443-447.
- Segel, D. y Shilo, B. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6, 2241-2248.
- Segev, N., Mulholland, J. y Botstein, D. (1988) *Cell* 52, 915-924.
- Sekine, A., Fujiwara, M. y Narumiya, S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 8602-8605.
- Shimizu, K., Goldfarb, M., Perucho, M. y Wigler, M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 383-387.
- Shoji, I., Kikuchi, A., Kurode, S. y Takai, Y. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 273-281.
- Sibley, D.R., Benovic, J.L., Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1987) *Cell* 48, 913-922.
- Siegel, L.M. y Monty, K.J. (1966) *Biochem. Biophys. Acta* 112, 346-362.
- Sigal, I. (1988) *Nature* 332, 485-486.
- Sigal, I., Gibbs, J., D'Alonzo, J. y Scolnick, E. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4725-4729.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P. y Gautam, N. (1991) *Science* 252, 802-808.
- Smell, N., Europe-Finner, G. y Newell, P. (1986) *FEBS Lett.* 203, 11-14.

- Smith, M.R., De Gubicibus, S.J. y Stacey, D.W. (1986) **Nature** 320, 540-543.
- Smith, M.R., Liu, Y-L., Kim, H., Rhee, S.G. y Kung, H-F. (1990) **Science** 247, 1074-1077.
- Smrcka, A., Hepler, J., Brown, K. y Sternweis, P. (1991) **Science** 251, 804-807.
- Southern, E. (1975) **J. Mol. Biol.** 98, 503-517.
- Stacey, D.W. y Kung, H.F. (1984) **Nature** 310, 508-511.
- Stachel, S. y Zambryski, P. (1986) **Cell** 47, 155-157.
- Stock, J. (1987) **Bioassays** 6, 199-203.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J. y Stock, A.N. (1989) **Microbiol. Rev.** 53, 450-490.
- Stone, D.E. y Reed, S.I. (1990) **Mol. Cell. Biol.** 10, 4439-4446.
- Strathmann, M.P. y Simon, M.J. (1990) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 87, 9113-9116.
- Strittmatter, S., Valenzuela, D., Kennedy, T., Neer, G. y Fishman, M. (1990) **Nature** 344, 836-843.
- Stryer, L. (1986) **Ann. Rev. Neurosci.** 9, 87-119.
- Sutherland, E.W. y Rall, T.W. (1957) **J. Am. Chem. Soc.** 79, 3608.
- Swanson, M., Elsta, A., Greenberg, S., Schwartz, J., Aldrich, T. y Furth, M. (1986) **J. Cell. Biol.** 103, 485-492.
- Swizlocki, N.I., Magnuson, T. y Tierney, J. (1977) **Arch. Biochem. Biophys.** 179, 157-162.
- Takai, K., Kurashima, V., Suzuki-Hori, C., Okamoto, H. y Hayaishi, O. (1974) **J. Biol. Chem.** 249, 1965-1972.
- Tanaka, K., Matsumoto, K. y Toh-e, A. (1989) **Mol. Cell. Biol.** 9, 757-768.
- Tanaka, K., Nakafuku, M., Satoh, T., Marshall, M., Gibbs, J., Matsumoto, M., Kaziro, Y. y Toh-e, A. (1990) **Cell** 60, 803-807.
- Terenzi, H.F., Roselino, E. y Passeron, S. (1971) **Eur. J. Biochem.** 18, 342-350.

- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K. y Wigler, M. (1985) *Cell* **40**, 27-36.
- Toki, C., Oda, K. e Ikehara, Y. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 333-336.
- Tong, L., de Vos, A.M., Milburn, M., Jancarik, J., Noguchi, S., Nishimura, S., Miura, K., Ohtsuka, E. y Kim, S-H. (1989) *Nature* **337**, 90-93.
- Torruella, M., Flawiá, M.M., Eisenschlos, C., Molina y Vedia, L., Rubinstein, C. y Torres, H.N. (1986) *Biochem. J.* **249**, 807-811.
- Trahey, M. y McCormick, F. (1987) *Science* **238**, 542-545.
- Trahey, M., Wong, G., Halenbeck, R., Rubinfeld, B., Martin, G., Ladner, M., Long, C., Crosier, W., Watt, K., Kohts, K. y McCormick, F. (1988) *Science* **242**, 1697-1700.
- Tsai, S-C., Adamik, R., Kanaho, Y., Hewlett, E.L. y Moss, J. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 15320-15323.
- Tsuchida, N., Ryder, T. y Ohtsubo, E. (1982) *Science* **217**, 937-939.
- Ullmann, A. y Danchin, A. (1983) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **15**, 1-53.
- Ullrich, A. y Schlessinger, J. (1990) *Cell* **61**, 203-212.
- Van Dongen, A., Codina, J., Olate, J., Mattera, R., Joho, R., Birnbaumer, L. y Brown, A. (1988) *Science* **242**, 1433-1437.
- Van Dop, C., Medynski, D., Sullivan, K., Wu, A., Fung, B. y Bourne, H.R. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **124**, 250-255.
- Vara, F. y Rozengurt, E. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **130**, 646-653.
- Varticovski, L., Druker, B., Morrison, D., Cantley, L. y Roberts, T. (1989) *Nature* **342**, 699-702.
- Vogel, U., Dixon, R., Schaber, M., Diehl, R., Marshall, M., Scolnick, E., Sigal, I. y Gibbs, J. (1988) *Nature* **335**, 90-93.
- Waldman, S.A. y Murad, F. (1987) *Pharmacological Rev.* **36**, 163-196.

- Waldo, G., Evans, T., Fraser, E., Northup, J., Martin, M. y Henden, T. (1987) *Biochem. J.* 246, 431-439.
- Walter, M., Clark, S.G. y Levinson, A.D. (1986) *Science* 233, 649-652.
- Walworth, N., Goud, B., Kabcenell, A. y Novick, P. (1989) *EMBO J.* 8, 1685-1693.
- Wang, J.Y.J. y Koshland, D.E. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 218, 59-67.
- Weeks, G., Lima, A. y Pawson, T. (1987) *Mol. Microbiol.* 1, 347-354.
- Weiler, E. y Schröder, J. (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 271-275.
- West, M., Kung, H-F. y Kamata, T. (1990) *FEBS Lett.* 259, 245-248.
- West, R.E., Moss, J., Vaughn, M., Lin, T. y Liu, T-Y. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14428-14430.
- Whiteway, M., Hougan, L., Dignard, D., Thomas, D.Y., Bell, L., Saari, G.C., Grant, F.J., O'Hara, P. y Mackay, V.L. (1989) *Cell* 56, 467-477.
- Wieland, T., Ulibarri, I., Aktories, K., Gierschik, P. y Jakobs, K. (1990) *FEBS Lett.* 263, 195-198.
- Wilden, U. y Kuhn, H. (1982) *Biochemistry* 21, 3014-3022.
- Wilden, U., Hall, S.W. y Kuhn, H. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1774-1778.
- Williams, L.T. (1989) *J. Cell Biol.* 107, 801-810.
- Willumsen, B., Christensen, A., Hubbert, N.L., Papageorge, A.G. y Lowy, D.R. (1984) *Nature* 310, 583-586.
- Willumsen, B., Papageorge, A., Kung, H., Beckesi, E., Hubber, N. y Lowry, D. (1985) *EMBO J.* 4, 4893-4896.
- Wolff, J., Cook, E., Goldhammer, A. y Berkowitz, S. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3840-3844.
- Wolfman, A. y Macara, I. (1990) *Science* 248, 67-69.
- Worthington Enzyme Manual (1972). Worthington Biochemical Corporation, 7-12, Free hold.

- Xu, G., O'Connell, P., Vishochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., White, R. y Weiss, R. (1990) *Cell* **62**, 599-608.
- Yang, J.K. y Epstein, W. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 3750-3758.
- Yarden, Y. y Schlessinger, J. (1987) *Biochemistry* **26**, 1434-1451.
- Yarden, Y. y Ullrich, A. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 443-478.
- Yatani, A., Mattera, R., Codina, J., Graf, R., Okabe, K., Padrell, A., Iyengar, R., Brown, A. y Birnbaumer, L. (1988) *Nature* **336**, 680-682.
- Yatani, A., Okabe, R., Polakis, P., Halenbeck, R., McCormick, F. y Brown, A. (1990) *Cell* **61**, 769-776.
- Zambriski, P., Tempe, J. y Schell, J. (1989) *Cell* **56**, 193-201.
- Zhang, K., De Clue, J., Vass, W.C., Papageorge, A., McCormick, F. y Lowy, D.R. (1990) *Nature* **346**, 754-756.



Bioq. Horacio Martinetto
Autor



Dra. Mirtha M. Flawiá
Directora