

## Tesis de Posgrado

# Caracterización de caseína quinasas del hongo dimórfico *Mucor rouxii*

Pardo, Patricia Susana

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Pardo, Patricia Susana. (1991). Caracterización de caseína quinasas del hongo dimórfico *Mucor rouxii*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2455\\_Pardo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2455_Pardo.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Pardo, Patricia Susana. "Caracterización de caseína quinasas del hongo dimórfico *Mucor rouxii*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2455\\_Pardo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2455_Pardo.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARACTERIZACION DE CASEINA QUINASAS DEL HONGO DIMORFICO

Mucor rouxii

Autor: Patricia Susana Pardo

Director: Dra. Silvia Moreno de Colonna

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica, Facultad  
de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad  
de Buenos Aires

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

- 1991 -

*Tesis  
2455  
ej. 2*

## INDICE

Contenido

### INTRODUCCION

I-MODIFICACIONES QUIMICAS POST-TRADUCCIONALES  
REVERSIBLES

II-FOSFORILACION Y DEFOSFORILACION DE PROTEINAS

II-1-Generalidades

II-2-Su importancia biológica

III-QUINASAS DE PROTEINAS

III-1-Generalidades y clasificación

III-2-Regulación

IV-FOSFATASAS DE PROTEINAS

V-LAS CASEINA QUINASAS

V-1-Definición

V-2-Distribución

V-3-Caracterización fisicoquímica

V-4-Autofosforilación

V-5-Especificidad de sustrato

V-5a) Requerimiento de nucleótidos  
dadores del grupo fosfato

V-5b) Especificidad de sustrato proteico

V-5b1) Estudios con caseína y sus variantes

V-5b2) Estudios con péptidos sintéticos

V-6-Fosforilación de proteínas endógenas

V-7-Regulación

V-7a) Estudios in vitro

V-7b) Regulación de la actividad de caseína quinasa de tipo II por factores de crecimiento	34
V-8-Importancia de la caseína quinasa de tipo II en transducción de señales y el control del ciclo celular	35
VI-MECANISMOS DE FOSFORILACION EN EL HONGO <i>Mucor rouxii</i>	38
VI-1-Biología del género <i>Mucor</i>	38
VI-2-Dimorfismo de <i>Mucor</i> y acción del AMP <sub>c</sub>	38
VI-3-Estudios previos sobre los mecanismos de fosforilación en <i>Mucor rouxii</i>	39
OBJETIVO DE ESTA TESIS .....	42
MATERIALES Y METODOS .....	43
ORGANISMO UTILIZADO	43
PARTE A: PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION DE LAS CASEINA QUINASAS DEL HONGO <i>Mucor rouxii</i> .....	43
I-CONDICIONES DE CULTIVO	43
II-FREPARACION DE SUSTRATOS	44
II-1-Defosforilación de caseína	44
II-2-Síntesis de nucleótidos radioactivos: [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP y [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] GTP	45
III-ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE CASEINA QUINASA	45
IV-PREPARACION DE CASEINA QUINASAS SOLUBLES DE <i>Mucor rouxii</i>	47
V-PREPARACION DE CASEINA QUINASAS PARTICULADAS	49
VI-ANALISIS CROMATOGRAFICO DE CASEINA QUINASAS PARTICULADAS EN DEAE-SEPHAROSA	50
VII-DETERMINACION DE CONSTANTES CINETICAS DE LAS CASEINA QUINASAS SOLUBLES	50
VIII-DETERMINACION Y CALCULO DE LOS PARAMETROS FISICOS E HIDRODINAMICOS DE LAS CASEINA QUINASAS	51
VIII-1-Radio de Stokes	51

VIII-2-Coeficiente de sedimentacion	52
VIII-3-Pesos moleculares	52
VIII-4-Coeficientes friccionales	53
VIII-5-Parámetros moleculares de las proteínas marcadoras	53
IX--DETERMINACION DEL AMINOACIDO FOSFORILADO EN CASEINA	54
X-MISCELANEAS	55
X-1) Ensayo de la actividad de proteina quinasa dependiente de AMP <sub>c</sub>	55
X-2) Medición de proteínas	56
<b>PARTE B: ESTUDIO DE LA FOSFORILACION ENDOGENA DEBIDA A CASEINA QUINASAS Y PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE AMP<sub>c</sub> POR MEDICION in situ EN LEVADURAS PERMEABILIZADAS DE <i>Mucor rouxii</i> .....</b>	<b>56</b>
I-CULTIVOS	56
II-PROCEDIMIENTO DE PERMEABILIZACION DE CELULAS LEVADURIFORMES DE <i>Mucor rouxii</i>	57
III-PREPARACION DE SUSTRATOS RADIOACTIVOS: Sintesis de [ <sup>32</sup> P] ATP y [ <sup>32</sup> P] GTP	57
IV-ENSAYO DE FOSFORILACION ENDOGENA	58
V-ANALISIS DE LAS PROTEINAS ENDOGENAS FOSFORILADAS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTES	59
<b>RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>61</b>
<b>PARTE A: PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION DE LAS CASEINA QUINASAS DEL HONGO <i>Mucor rouxii</i> .....</b>	<b>61</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
I-DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE CASEINA QUINASA EN EL HONGO <i>Mucor rouxii</i>	61
II-PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION DE LAS CASEINA QUINASAS SOLUBLES DE <i>Mucor rouxii</i>	63

II-1-Cromatografía en DEAE-Sepharosa de los extractos solubles	63
II-2-Efecto de la heparina sobre las actividades de caseína quinasa	63
II-3-Cromatografía en columnas de fosfocelulosa	64
II-4-Sedimentación de CK I y CK II en gradientes de sacarosa	67
II-5-Determinación de los radios de Stokes y estimación de pesos moleculares y coeficientes friccionales	69
II-6-Especificidad para el sustrato fosforilable y dependencia de catión divalente	70
II-7-Efecto de iones monovalentes	72
II-8-Especificidad para nucleótidos dadores del grupo fosfato	72
II-9-Identificación de los aminoácidos fosforilados en caseína por CK I y CK II	73
II-10-Influencia de las poliaminas sobre la actividad de CK I y CK II	74
III-CARACTERIZACION DE LAS CASEINA QUINASAS PARTICULADAS	75
DISCUSION .....	77
<b>PARTE B: ESTUDIO DE LA FOSFORILACION ENDOGENA DEBIDA A CASEINA QUINASAS Y A PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE AMP<sub>c</sub> POR MEDICION in situ EN LEVADURAS PERMEABILIZADAS .....</b>	<b>84</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>84</b>
I-ESTUDIO DE LA FOSFORILACION DE PROTEINAS ENDOGENAS MEDIDA in toto	86
II-ESTIMULACION DE LA FOSFORILACION ENDOGENA POR CATIONES	90
III-CAMBIOS EN EL PATRON DE FOSFOPROTEINAS PRODUCIDOS POR LOS MODULADORES CONOCIDOS DE LAS PROTEINA QUINASAS DE <i>Mucor rouxii</i>	92
DISCUSION .....	97

BIBLIOGRAFIA .....	106
ABREVIATURAS .....	118

**INTRODUCCION****I- MODIFICACIONES QUIMICAS POST-TRADUCCIONALES REVERSIBLES**

Las modificaciones químicas reversibles post-traduccionales de las proteínas proporcionan un mecanismo fundamental de regulación celular tanto en células procarióticas como eucarióticas. De acuerdo a los requerimientos celulares, una proteína interconvertible cambia de una forma modificada covalentemente a una no modificada. Estas modificaciones son catalizadas por enzimas conversoras, que catalizan reacciones opuestas y determinan un estado estacionario en el nivel de modificación del sustrato interconvertible. Estos ciclos se definen como **sistemas de cascada** (Chock et al., 1980), y en ellos cada reacción de modificación utiliza como sustrato al producto de la otra reacción.

Estas modificaciones químicas pueden ser clasificadas en cinco clases (Krebs y Beavo, 1980):

- a) **Fosforilación-defosforilación**
- b) **Acetilación-desacetilación**
- c) **Adenilación-deadenilación**
- d) **Uridilación-deuridilación**
- e) **Metilación-demetilación**
- f) **Interconversión S-S/ 2SH**



El análisis teórico de los sistemas de modificación covalente reversible, corroborado por estudios *in vitro*, ha revelado que ellos poseen capacidades regulatorias extraordinarias que proveen a la célula de la capacidad de coordinar y regular muchas vías metabólicas (Chock y Stadman, 1977; Stadman y Chock, 1977 y 1978).

Estos sistemas combinan la amplificación de señales con la flexibilidad y sensibilidad de la regulación alosterica. Si el sustrato de la modificación participa en un segundo ciclo de modificación reversible, la capacidad regulatoria de todo el sistema se multiplica varios ordenes de magnitud (Shacter et al., 1984). Todos los sistemas de cascada descritos son capaces de detectar fluctuaciones en la concentración de sustratos de diferentes vías metabólicas y funcionan por lo tanto como sistemas integradores (Chock et al., 1980).

## II- FOSFORILACION Y DEFOSFORILACION DE PROTEINAS

### II-1-Generalidades

Uno de los sistemas de modificación química mejor estudiado y más difundido en la naturaleza es la fosforilación de proteínas. La modificación covalente de proteínas a través del ciclo de fosforilación-defosforilación es un mecanismo muy importante en la regulación de las funciones celulares (Weller, 1979; Cohen, 1978; Cohen et al., 1981). Su importancia deriva de la función que cumple en la transducción de señales: las señales que llegan a las

células diseminan y amplifican sus efectos por una red de reacciones de fosforilación y defosforilación (Krebs, 1986).

En la década del 30, se demostró la existencia de fosfato unido covalentemente a proteínas de la clara de huevo y de la leche (Lipmann y Levene, 1932 y Lipmann, 1933). Veinte años más tarde, se estableció por primera vez, la relación entre los procesos de fosforilación-defosforilación y la regulación de la actividad enzimática, en este caso, de las enzimas que intervienen en la síntesis del glucógeno (Sutherland y Wosilait, 1955; Krebs y Fischer, 1956; Krebs et al., 1959 y Friedman y Larner, 1963).

La interconversión de una proteína fosforilable es catalizada por una proteína quinasa y por una proteína fosfatasa. La primera, transfiere el fosfato terminal de un nucleósido trifosfato a un residuo de aminoácido. Usualmente el aminoácido modificado es serina o treonina y, menos frecuentemente, tirosina; aunque existen evidencias de enzimas específicas para otros aminoácidos (Fujitaki y Smith, 1984; Martensen, 1984). La segunda, produce la remoción del fosfato. El fosfato, unido en forma covalente a la proteína, puede modificar las propiedades originales de la misma, y, de esta forma, afectar el proceso metabólico en el que ésta forma parte. Si bien, es en sí mismo, un mecanismo de regulación sencillo, es importante tener en cuenta que, numerosas proteínas se modifican en más de un sitio (Hayakawa et al., 1973; Cohen, 1973) y estas modificaciones pueden tener efectos distintos y ser catalizadas por más de una quinasa (Embi et al., 1980; Cohen,

1982). Asimismo, diferentes fosfatasa pueden llevar a cabo la defosforilación (Antoniw y Cohen, 1976; Ganapathi et al., 1981; Cohen, 1982).

## II-2- Su importancia biológica

Dada la capacidad regulatoria de los ligandos no covalentes y el control alostérico, resulta llamativo que la evolución haya desarrollado el sistema de regulación por fosforilación reversible.

Se ha interpretado al control alosterico como una forma de regulación rápida, mientras que las modificaciones covalentes, y entre ellas, la fosforilación reversible de proteínas, serian mecanismos reguladores que actúan más lentamente.

Otra propuesta (Krebs, 1985) plantea que los dos sistemas de control han surgido como respuesta a distintas situaciones. El control alostérico respondería a señales originadas en el interior de la célula, mientras que el control por fosforilación lo haria a señales provenientes del exterior celular. Esta idea se corresponde con el hecho de que la regulación por fosforilación proteica se encuentre mucho más difundida en células eucarióticas, donde las señales extracelulares son mas importantes y que en células procarióticas se la haya encontrado asociada a los fenomenos quimiotacticos (Parkinson, 1988).

Cuáles son los procesos regulados por fosforilación proteica?

La actividad de más de treinta enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos están reguladas por fosforilación (Krebs y Beavo, 1979). La transducción de señales a través de la membrana es otro sistema mediado por eventos de fosforilación proteica. Una gran cantidad de proteínas quinasas se expanden a través de la membrana plasmática o están asociadas a su cara interna, y están por lo tanto en una posición ideal para transducir las señales de los estímulos externos. Por ejemplo, muchos receptores de factores de crecimiento transmiten sus señales mitogénicas a través de fosforilaciones en tirosina y el receptor de insulina transmite de la misma manera una señal anabólica (Cohen, 1982). Las alteraciones en la organización del citoesqueleto dependen fundamentalmente de la fosforilación de proteínas clave regulatorias que, generalmente, no corresponden a las principales proteínas estructurales. Otros diversos procesos, como la contracción del músculo liso (Adelstein y Eisenberg, 1980) y la resistencia celular a algunos virus (Lengyel, 1982), están mediados por fosforilación reversible de proteínas.

### III- PROTEINA QUINASAS

#### III-1- Generalidades y clasificación

Hace diez años se conocían unas pocas proteínas quinasas bien caracterizadas. Con el advenimiento del clonado molecular y el

descubrimiento de que muchos oncogenes codificaban para este tipo de enzimas, el número de proteína quinasas probadas o putativas ascendió a aproximadamente un ciento y se postula que el genoma de los mamíferos codifica para cerca de mil proteína quinasas diferentes (Hunter, 1987).

La primera proteína quinasa que se purificó fue la quinasa de la fosforilasa en 1959 (Krebs et al., 1959) seguida en 1968 por la proteína quinasa dependiente de  $AMP_c$  (Walsh et al., 1968). En 1979, se purificó por primera vez una proteína quinasa que fosforila residuos de tirosina, pp60  $v-src$  (Erikson et al., 1979) seguida en 1982 por el receptor del EGF (factor de crecimiento epidermal) (Cohen et al., 1982). Existen también reportes de protein-histidina quinasas y protein-lisina quinasas, pero no se conoce la estructura de estas enzimas (Smith et al., 1974).

Desde 1980 ha habido una verdadera explosión en el número de proteína quinasas identificadas que ha resultado más del clonado molecular de genes de proteína quinasas que de la purificación enzimática. Un factor importante en este sentido ha sido el descubrimiento de una gran similitud entre las secuencias de los dominios catalíticos de todas las proteína quinasas. La primera demostración provino del hallazgo de que la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de  $AMP_c$  y la proteintirosina quinasa pp60  $v-src$  están relacionadas por su homología en una región de 300 aminoácidos (Barker y Dayhoff, 1982). Esto resulta sorprendente dada la diferente especificidad de aminoácido de

estas enzimas. Esta homología significa que la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>2</sub> y pp60  $\gamma$ -src provienen de la misma proteína quinasa ancestral. La comparación de un gran número de dominios catalíticos reveló que existe una serie de secuencias cortas que están altamente conservadas. A partir del extremo N-terminal, éstas incluyen una secuencia Gly-X-Gly-X-X-Gly seguida por una Lys a una distancia de 15 a 20 residuos, ambas formando parte del sitio de unión de ATP, y luego, a una distancia de 80 a 180 residuos, una región de 60 aminoácidos que contiene las secuencias conservadas Arg-Asp-Leu, Asp-Phe-Gly y Ala-Pro-Glu (Hunter y Cooper, 1985; 1986).

Las proteína quinasas específicas para serina y treonina y las tirosina quinasas, si bien están muy relacionadas, pueden distinguirse por algunos aspectos de la secuencia primaria de su dominios catalíticos. Entre ellos, está la región entre los elementos Asp-Phe-Gly y Ala-Pro-Gl, que contiene el sitio de autofosforilación; la presencia en esta zona de una tirosina rodeada de aminoácidos ácidos es perfectamente indicativo de que la proteína es una tirosina quinasa (Hunter y Cooper, 1986).

Según estos criterios, se pudo establecer una taxonomía de proteína quinasas formada por series de familias generadas en base a los diferentes grados de homología entre los genes de las proteínas quinasas (ver TABLA 1). Este análisis genético ha arrojado algunos resultados sorprendentes, ya que algunas proteína

quinasas bien caracterizadas como entidades catalíticas únicas, se probó que están codificadas por múltiples genes. Por ejemplo, se han identificado cuatro genes para la proteína quinasa C de mamíferos, uno de los cuales da lugar a dos proteínas con diferente extremo C-terminal, por maduración alternativa de su RNA mensajero y esto genera al menos cinco isoenzimas diferentes en la subfamilia de la proteína quinasa C (Coussens et al., 1986; Knopf et al., 1986; Ono et al., 1986a; 1986b; Parker et al., 1986; Housey et al., 1987; Ohno et al., 1987). Del mismo modo, la proteína quinasa dependiente de  $AMP_c$ , si bien era sabido que presenta múltiples subunidades regulatorias, se creía que tenía un único tipo de subunidad catalítica. Ahora, se han encontrado al menos dos genes que codifican para subunidades catalíticas altamente relacionadas (Uhler et al., 1986; Shouers y Maurer, 1986). La formación de múltiples proteína quinasas, a partir de un solo gen, ejemplificado por la proteína quinasa C, se ha encontrado también para el gen *c-abl*, cuyos productos tienen uno de dos extremos N-terminales posibles (Ben-Neriah et al., 1986; Shtivelman et al., 1986) y el gen *c-src*, que codifica dos formas de pp60 *src* que difieren por la presencia o ausencia de un exón interno de 6 aminoácidos (Martinez et al., 1987).

La existencia de más de setenta proteína quinasas descubiertas hasta el momento resulta llamativo, y la pista más importante sobre el propósito de un número tan vasto proviene del estudio de las mutantes de levaduras del ciclo de división celular (CDC).

Los productos de los genes *CDC 28* en *Saccharomyces cerevisiae* y *cdc 2\**, el gen homólogo en *Schizosaccharomyces pombe*, son necesarios para pasar un punto en  $G_1$  llamado "start", y en el caso de *cdc2\** un segundo punto en  $G_2$ . Los dos genes codifican productos con actividad de proteína quinasas específicas para serina y treonina (Reed et al., 1985; Simanis y Nurse, 1986). Existen indicios de que la proteína *wee1\** regula la actividad de la proteína *cdc 2\** por fosforilación (Simanis y Nurse, 1986). A su vez, la proteína *wee1\** parece estar regulada por otra proteína quinasa, el producto del gen *nim1\** (Russell y Nurse, 1987). De este modo, un punto de control del ciclo celular de la levadura está regulado por una cascada de al menos tres proteínas quinasas. En mamíferos se encuentran genes relacionados con *CDC28* y *cdc2\** (Lee y Nurse, 1987; Hanks, 1987; D'Amico et al., 1987) y la secuencia de cDNA humano *CDC2Hs*, complementa la mutación *cdc2* en *S. pombe*, lo que significa que estos genes podrían tener funciones similares en levaduras y mamíferos (Lee y Nurse, 1987).

El número total de proteína quinasas encontradas en levaduras es ahora próximo a veinte (ver TABLA 1) y, hasta ahora, todas ellas son quinasas de serina o treonina. Si bien, se ha detectado en extractos de levaduras actividad de tirosina quinasa (Schieven et al., 1986), no se ha logrado aislar una enzima con esta especificidad.

En *Drosophila melanogaster*, en cambio, los genes que codifican para proteínas quinasas incluyen tanto genes de tirosina quinasas



como genes de serina quinasas (ver TABLA 1).

### III-2- Regulación

Los mecanismos involucrados en la regulación de la actividad de las proteina quinasas son muy diversos.

Las proteina quinasas son, a menudo, enzimas multiméricas de naturaleza homo- o hetero-oligomérica. Sus subunidades pueden tener todas actividad catalitica o algunas de ellas pueden ser puramente regulatorias. Estas estructuras oligoméricas les permite responder en forma cooperativa y muy sensible a factores regulatorios.

Las proteina quinasas monoméricas suelen tener dominios regulatorios discretos. Estos dominios contienen secuencias que funcionan como seudosustratos y actúan como reguladores negativos (Soderling, 1990).

TABLA 1: PROTEINA QUINASAS DE MAMIFEROS, DROSOPHILA Y LEVADURA

## A- Mamíferos (total= 79)

Protein serina/treonina quinasas (50)

## Reguladas por nucleótidos cíclicos

Proteína quinasas dependientes de AMP<sub>c</sub> (C $\alpha$ , C $\beta$ )Proteína quinasa dependiente de GMP<sub>c</sub>

## Reguladas por calmodulina

Fosforilasa quinasa (forma muscular y hepática)

Quinasa de la cadena liviana de la miosina (esquelética, de musculo liso)

Proteínas quinasas dependientes de calmodulina I y II

Proteína quinasa dependiente de calmodulina de tipo II

(subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  en cerebro; subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  en higado;subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  en musculo)

## Reguladas por diacilglicérol

TKR16)

Proteína quinasas C ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ ,  $\tau$ ,  $\delta$ )

## Otras

Caseína quinasas I y II

Proteína quinasas nucleares N1 y N2

Proteína quinasas activadas por proteasas I y II

Glucógeno sintetasa quinasas 3 y 4

Proteína quinasa hemo-regulada

Proteína quinasa regulada por RNA doble cadena

So quinasa

Receptor  $\beta$ -adrenérgico quinasa

Rodopsina quinasa

Histona H1 quinasa

Hidroximetilglutaril-CoA reductasa quinasa

Piruvato dehidrogenasa quinasa

Cetoácidos de cadena ramificada dehidrogenasa quinasa

Proteína quinasa dependiente de polipéptido

Proteína quinasa dependiente de poliamina

CDC-R (PSK-J3), CDC2H5, PSK H1, PSK-C3

Protein tirosina quinasas (29)

## Familia génica src

pp60<sup>c-src</sup> (formas fibroblástica y neuronal)pp62<sup>c-yy</sup>, pp56<sup>c-lk</sup>

Proteínas fgr, hck, fyn, lyn

## Familia génica abl

p150<sup>c-abl</sup> (Tipo I y Tipo II)

Proteína arg

## Familia génica fps

p98<sup>c-fps</sup>

NCP94

Proteínas relacionadas con c-fps (TKR11 y

## Receptores de factores de crecimiento

## Familia del receptor de EGF

Receptor de EGF (proteína c-erb)

Proteína neu (proteína erbB2)

## Familia del receptor de insulina

Receptor de insulina

Receptor de IGF-1

Proteínas c-ros, met, trk

## Familia del receptor de PDGF

Receptor de PDGF

Receptor de CSF-1 (proteína c-fms)

Proteína c-kit

Proteínas c-sea, ret

## Otras

p75 (higado)

p120 (cerebro)

Proteínas c-mos, c-raf, A-raf, pks, pim-1

**Drosophila (total = 18)**

Protein serina/treonina quinasas

**Reguladas por nucleótidos cíclicos**

Relacionadas con proteína quinasas dependiente de AMP<sub>c</sub> (C0, C1, C2)

Relacionadas con proteína quinasas dependiente de GMP<sub>c</sub> (G0 [2 genes], G1)

**Reguladas por diacilglicerol**

Proteína quinasa C

**Otras**

Caseína quinasa II

Protein tirosina quinasas

Proteína Dsrc64B

Proteína Dsrc28C

Proteína Dash

Proteínas relacionadas con fps

Receptor del EGF (Extremos N-terminal de tipo I, II, III)

Receptor de insulina

Proteína sevenless

Proteína raf

**Levaduras (total = 14)**

Protein serina/treonina quinasas

**Reguladas por nucleótidos cíclicos**

Relacionadas con la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>

TFK1, TPK2, TPK3, SRA3 (*S. cerevisiae*)

**Otras**

CDC2B (*S. cerevisiae*), cdc2\* (*S. pombe*)

CDC7 (*S. cerevisiae*)

KIN2B (*S. cerevisiae*)

wee1\* (*S. pombe*)

nim1\* (*S. pombe*)

STE7, STE11 (*S. cerevisiae*)

KIN1, KIN2 (*S. cerevisiae*)

SNF1 (*S. cerevisiae*)

ran1\* (*S. pombe*)

Muchas proteínas quinasas son reguladas positivamente por ligandos, que se unen a dominios o subunidades regulatorias. Por ejemplo, las tirosina quinasas que son receptores de factores de crecimiento, se estimulan por la unión del factor respectivo. Otras proteína quinasas se activan por segundos mensajeros. La actividad de las proteínas quinasas reguladas por nucleótidos cíclicos, se aumenta por elevación de los niveles de los nucleótidos cíclicos generados por ciclasas que suelen actuar, a su vez, en forma hormono-dependiente; mientras que la familia de las proteínas quinasas C es estimulada por diacilglicerol producido por un aumento en la velocidad de recambio de los fosfoinosítidos inducido por hormonas o factores de crecimiento. Por último, también hay proteínas quinasas reguladas por cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$ , siendo esta regulación mediada por calmodulina. Además de las quinasas nombradas y de las reguladas por RNA de doble hebra (London et al., 1986) y por hemo (Proud, 1986), existen varias de las que no se conocen moduladores.

Es también común la regulación positiva o negativa de la actividad de quinasa mediante autofosforilación o fosforilación heteróloga. La autofosforilación generalmente resulta en una autoactivación, como en el caso de los receptores de insulina (Rosen et al., 1983) y probablemente el de EGF (Bertics y Gill, 1985). La regulación por fosforilación heteróloga puede ocurrir entre tirosina y serina

quinasas o dentro de cada clase. La actividad del receptor de EGF está regulada por fosforilación por la proteína quinasa C (Cochet et al., 1984; Friedman et al., 1984). La actividad de la tirosina quinasa pp60<sup>src</sup> es suprimida por un evento de fosforilación en tirosina que se cree está mediado por otra tirosina quinasa (Cooper y King, 1986; Jove et al., 1987). Un ejemplo de regulación positiva es la activación de la fosforilasa quinasa mediada por fosforilación por una proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> (Walsh et al., 1968).

La complejidad de los sistemas regulados por fosforilación proteica no depende sólo del número de factores capaces de regular la actividad de cada proteína quinasa, sino también del número de sustratos que son capaces de fosforilar. La mayoría de las proteínas quinasas tienen múltiples sustratos, pero hay ejemplos como en el caso de la rodopsina quinasa, la receptor β-adrenérgico quinasa y la S6 quinasa donde se conoce un solo sustrato. Llamativamente en estos casos la enzima a menudo actúa procesivamente y agrega varios fosfatos a cada molécula de sustrato. Alternativamente, en algunos ejemplos, el mismo sustrato puede ser fosforilado por distintas proteínas quinasas en el mismo o en distintos sitios. La fosforilación en distintos sitios sobre una proteína puede tener efecto sinérgico o antagonista. El número de sustratos potenciales de las proteínas quinasas no se conoce y si bien, casi todas las proteínas son capaces de sufrir fosforilación, es difícil distinguir entre la fosforilación gratuita o significativa.

#### IV-FOSFATASAS DE PROTEINAS

Para que la fosforilación proteica funcione como mecanismo regulatorio, esta modificación debe ser reversible. La defosforilación es llevada a cabo por proteínas fosfatasas. En principio, todo el control del circuito de fosforilaciones podría ser llevado a cabo por las proteínas quinasas. Sin embargo, se ha encontrado que al menos algunas proteínas fosfatasas están reguladas. Existen dos inhibidores de proteínas fosfatasas que son activos sólo cuando son fosforilados por la proteína quinasa que fosforila a los sustratos sobre los que actúa la fosfatasa respectiva (Cohen, 1985). La posibilidad de regular las proteínas fosfatasas agrega a estos sistemas flexibilidad y sensibilidad. Es materia de debate si las proteínas fosfatasas tienen la misma diversidad que las proteínas quinasas o si existen pocas fosfatasas de amplia especificidad.

#### V- LAS CASEINA QUINASAS

##### V-1- Definición

La mayoría de las proteínas quinasas han sido identificadas de acuerdo a su sustrato específico o por el compuesto regulatorio que activa o inactiva la enzima. En el caso de las caseína (o

fosvitina) quinasas, fueron designadas de acuerdo al sustrato usado para detectar su actividad durante la purificación; el cual, hasta el momento, no parece ser un sustrato fisiológico.

Estas enzimas pertenecen al grupo de las proteína quinasas que catalizan la fosforilación de residuos de serina o treonina (serina/treonina quinasas), son independientes de mensajeros, no responden directamente a estímulos hormonales o a factores de crecimiento y se las define operacionalmente por preferir sustratos ácidos como caseína o fosvitina (Hathaway Traugh, 1982; Edelman et al., 1987).

#### V-2- Distribución

Las caseína quinasas parecen ser ubicuas. Se las ha encontrado en numerosas células de mamíferos que incluyen reticulocitos (Traugh y Traut, 1974), eritrocitos (Kumar y Tao, 1975; Traugh y Traut, 1974), linfocitos (Kemp et al., 1975); en células de hígado (Baggio et al., 1970; Burnett y Kennedy, 1954; Desjardins et al., 1972; Takeda et al., 1971), útero (Puca et al., 1972), cerebro (Rabinowitz y Lipmann, 1960; Rodnight y Lavin, 1964), riñón (Damun y Reed, 1988) epidermis (Murray et al., 1976), músculo esquelético (Risnik y Gusev, 1984), miocardio (Gibson et al., 1974), corteza adrenal (Cochet et al., 1977), timo (Dahmus, 1981) y en células tumorales, de tumor ascítico (Dahmus, 1976), de eritroleucemia (Neumann et al., 1979), de carcinoma cervical (Quarless, 1985), de neuroblastoma (Verma y Chen, 1986) y de hepatoma (Stetler et al.,

1984). También se las ha encontrado en aves (Keller et al., 1976); en invertebrados como el calamar (Fant et al., 1986); *Artemia salina* (Thoen et al., 1984) y *Ascaridia galli* (Ossikovski y Walter, 1984); en plantas, en particular, soja (Murray et al., 1978a), coliflor (Murray et al., 1978b) y trigo (Yan y Tao, 1982); en algunos hongos como *Saccharomyces cerevisiae* (Kudlicki et al., 1978; 1980; 1984 y Rigobello et al., 1982) y *Physarum polycephalum* (Daniels et al., 1981) y en la ameba *Dictyostelium discoideum* (Renart et al., 1984).

En la mayoría de los tipos celulares, se han encontrado dos tipos diferentes de caseína quinasa. Han sido designadas caseína quinasa I y caseína quinasa II de acuerdo al orden de elución cromatográfico en dietilaminetilocelulosa (DEAE-celulosa) (Hathaway y Traugh, 1982).

La caseína quinasa I ha sido encontrado tanto en el reino animal como en el vegetal. En la rata los niveles más altos de actividad se encuentran en el músculo esquelético y en células grasa (Singh y Huang, 1985). Esta proteína quinasa ha sido encontrada tanto en el citoplasma como asociada a membranas (Hosey y Tao, 1977); núcleos (Desjardins et al., 1972; Keller et al., 1976; Murray et al., 1978; Thornburg et al., 1978); ribosomas (Traugh y Sharp, 1977) y mitocondrias (Clari et al., 1976).

La enzima de tipo II, también está ampliamente distribuida en organismos eucarióticos. En la rata, los niveles de actividad más



elevados se encuentran en bazo, testículo y cerebro y los más bajos en células grasas y músculo esquelético (Singh y Huang, 1985). La caseína quinasa II es fundamentalmente citosólica, pero también se la ha encontrado en núcleos (Takeda et al., 1971; Thornburg y Lindell, 1977), membranas (Hosey y Tao, 1977); ribosomas (Traugh y Sharp, 1977) y mitocondrias (Clari et al., 1976).

La asociación de las caseína quinasa a los diferentes componentes celulares depende del tejido y de la especie (Hosey y Tao, 1977).

#### Caracterización fisicoquímica

La caseína quinasa I purificada a partir de diversas fuentes (Hathaway y Traugh, 1979 y 1982; Dahmus, 1981; Itarte y Huang, 1979; Ahmad et al., 1984; Lerch et al., 1975; Kudlicki et al., 1978; Itarte et al., 1981; Thornburg et al., 1979) es similar en cuanto a sus propiedades moleculares. Eluye de DEAE-celulosa a una concentración de ión monovalente de aproximadamente 0,07 a 0,13 M a pH 7,4; se adhiere a fosfocelulosa a pH 7 y es eluida a una concentración de ión monovalente de 0,5 M (Hathaway y Traugh, 1981). La enzima altamente purificada analizada por electroforesis en gel parece ser un único péptido de 37000 Daltones (Dahmus, 1981; Hathaway y Traugh, 1981; Tao et al., 1980)

La caseína quinasa II ha sido purificada y caracterizada en la

mayoría de las fuentes usadas para la purificación de la enzima de tipo I (Dahmus, 1981; Hathaway y Traugh, 1979; Kudlicki et al., 1978; Itarte et al., 1981; Thornburg y Lindell, 1977; DePaoli-Roach et al., 1981; Rigobello et al., 1982; Meggio y Pinna, 1984) y de otros tejidos de organismos eucarióticos superiores e inferiores (Cochet et al., 1981; Glover et al., 1983; Renart et al., 1984 y Villar-Palasi y Kumon). Esta enzima eluye de DEAE-celulosa a una concentración de ión monovalente de 0,15 a 0,22 M a pH 7,4. A pH 7, bajo condiciones de baja fuerza iónica, la caseína quinasa II no se adhiere a la fosfocelulosa; sin embargo cuando se eleva la concentración de ión monovalente a 0,25 M antes de su aplicación, la enzima se adhiere fuertemente a la fosfocelulosa y eluye a una concentración de aproximadamente 0,7 M. Este comportamiento parece ser la consecuencia de la formación de grandes agregados enzimáticos a baja fuerza iónica (Hathaway y Traugh, 1981; Hosey y Tao, 1977).

La caseína quinasa II tiene un peso molecular de aproximadamente 130000 Daltones, según se determinó por velocidad de sedimentación y equilibrio de sedimentación (Hathaway y Traugh, 1981). El análisis por geles desnaturalizantes evidencia una composición de subunidades consistente con un heterodímero  $\alpha_2\beta_2$ , con pesos moleculares que según la fuente enzimática varían entre 38000 y 44000 Daltones para la subunidad  $\alpha$  y entre 24000 y 26000 Daltones para la  $\beta$  (Hathaway y Traugh, 1982; Meggio y Pinna, 1984; Rigobello et al., 1982). Esta estructura es resistente a la disociación por alta fuerza iónica; detergentes y proteólisis

limitada. En forma espontánea se obtiene un producto proteolizado con estructura  $\alpha\alpha'\beta_2$ , donde  $\alpha$  tiene un peso molecular que varía entre 35000 y 39000 Daltones según la fuente enzimática (Dahmus, 1981; Hathaway y Traugh, 1979; Meggio et al., 1983; Thornburg y Lindell, 1977). Recientemente se detectó una heterogeneidad de  $\alpha$  debida a diferencias de carga (Fabmanadabham y Glover, 1987) y por secuenciación de fragmentos tripticos se detectó una heterogeneidad consistente con la presencia de al menos tres variantes de cadena polipeptídica (Takio et al., 1987).

Las caseína quinasa de tipo II de Eucariontes inferiores tiene subunidades  $\alpha$  pero no subunidades  $\beta$  (Kudlicki et al., 1984; Meggio et al., 1986; Renart et al., 1984; Rigobello et al., 1982). En levaduras (Meggio et al., 1986), se encontró una caseína quinasa de tipo II de 150000 Daltones que carece de la subunidad  $\beta$  de 25000 Daltones típica de las caseína quinasa II de animales; se ha propuesto para esta enzima una estructura tetramérica formada sólo por subunidades catalíticas de 37000 Daltones o asociadas con subunidades de 39000 y 31000 Daltones probablemente desprovistas de actividad catalítica.

A baja fuerza iónica, la enzima forma grandes agregados visibles al microscopio electrónico como filamentos lineales que luego se agregan lado a lado (Glover, 1986).

La subunidad  $\alpha$  contiene el sitio de unión del ATP, según se demostró por experimentos de marcación por fotoafinidad con [ $^{14}\text{C}$ ]

5 -p-fluorosulfonilbenzoil adenosina (Hathaway et al., 1981b). Esta subunidad presenta homología de secuencia con dominios catalíticos de otras proteína quinasas (Saxena et al., 1987) y una relación especial con la región COOH-terminal del gen de levadura CDC28 (Saxena et al., 1987; Takio et al., 1987). La reconstitución usando subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  separadas da mayor actividad que la obtenida con la subunidad  $\alpha$  sola alcanzando un máximo con una relación  $\alpha:\beta$  de 1:1; lo que sugiere que  $\beta$  cumple un rol en la producción de actividad óptima (Cochet y Chambaz, 1983). La secuencia de la subunidad  $\beta$  (Takio et al., 1987) no muestra homología con otras proteínas.

Las dos caseína quinasas requieren  $Mg^{2+}$  para su actividad, el óptimo de  $Mg^{2+}$  varía entre 5 y 15 mM; esto sugiere que además de la formación de un complejo  $Mg^{2+}$ -ATP, el catión es necesario para la actividad enzimática. En la mayoría de los casos, la presencia de cationes monovalentes en concentraciones desde 140 a 250 mM, estimula marcadamente la actividad de caseína quinasa tanto con caseína como con sustratos endógenos (Hathaway y Traugh, 1982). En los dos casos, el sustrato usado influye en el grado de estimulación (Itarte y Huang, 1979; Itarte et al., 1981; Plana et al., 1985).

#### V-4- Autofosforilación

Las dos caseína quinasas se autofosforilan. La enzima de tipo I

sufre autofosforilación sin ningún efecto aparente sobre la actividad (Ahmad et al., 1984). En general incorpora 1 mol de fosfato por mol de enzima; pero la enzima de timo de ternera puede incorporar hasta 4 moles de fosfato (Dahmus, 1981).

La caseína quinasa de tipo II; incorpora intramolecularmente 2 moles de fosfato casi exclusivamente en la subunidad  $\beta$  sin que esto tenga efecto sobre la actividad (Dahmus, 1981; De-Paoli-Roach et al., 1981; Hathaway y Traugh, 1979). Sin embargo, efectores (por ejemplo: espermina) que bloquean la autofosforilación también disminuyen la  $K_m$  para los sustratos proteicos, sugiriendo una influencia negativa de la autofosforilación sobre la actividad (Meggio y Finna, 1984).

#### V-5- Especificidad de sustrato

##### V-5-a) Requerimiento de nucleótidos dadores del grupo fosfato

La enzima de tipo I tiene especificidad absoluta para ATP como dador de fosfato. Los valores de  $K_m$  para ATP con las enzimas citoplasmáticas de células de mamíferos varían entre 11 y 20  $\mu$ M. Las enzimas provenientes de levadura (Kudlicki et al., 1978), membranas de eritrocitos (Hosey y Tao, 1977) y núcleos de hígado de rata (Thornburg et al., 1979) presentan valores de  $k_m$  mayores (ver TABLA 2).

**TABLA 2: PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS CASEINA QUINASAS DE TIPO I**

Fuente	PM	$K_{mATP}$ [ $\mu$ M]	Aminoácido modificado	Referencia
Reticulocito de conejo	37000	13	Ser	Hathaway y Traugh, 1979
Hígado de rata	ND	10	Ser	Matsumura y Takeda, 1972
Timo de ternera	37000	22	ND	Dahmus, 1981
Eritrocitos humanos	30000	20	ND	Simkowski y Tao, 1980
Hígado de rata, núcleos	28000	50	ND	Thornburg et al., 1979
Membranas de eritrocitos de conejo		65	ND	Hosey y Tao, 1977
Membranas de eritrocitos humanos	32000	11	ND	Tao et al., 1980
Levadura	42000	33	Ser	Kudicki et al., 1978
	23000	ND	Treo	Szyska et al., 1985
Núcleos de soja	55000	8	ND	Murray et al., 1978a
Núcleos de coliflor	39000		ND	Murray et al., 1978b

La caseína quinasa II es única entre las proteína quinasas en que utiliza GTP como dador de fosfato casi tan eficazmente como el ATP en la reacción fosfotransferásica. Los valores de  $K_m$  para las enzimas citosólicas varían entre 4 a 15  $\mu$ M para el ATP y desde 7 a 40  $\mu$ M para el GTP (ver TABLA 3).

**TABLA 3: CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE CASEINA QUINASAS DE TIPO II**

Fuente	Subunidades [Daltones]	Km ATP	Km [μM] GTP	Aminoácido modificado	Referencia
Reticulocito de conejo	43000 (α) 24000 (β)	10	40	Treo	Hathaway y Traugh, 1979
Eritrocito humano	35000 (α) 25000 (β)	15	26	ND	Boivin y Galand, 1979
Timo de ternera	44000 (α) 40000 (α') 26000 (β)	14	30	ND	Dahmus, 1981
Hígado de rata	ND	6	ND	Treo	Matsumura y Takeda, 1972
Hígado de rata, núcleo	42000 (α) 39000 (α') 26000 (β)	6	32	Treo	Thörnburg et al., 1979
Membranas de eritrocitos de conejo	ND	62	48	ND	Hosey y Tao, 1977
Levadura	37000 (α) 25000 (β)	ND	ND	Treo	Rigobello et al., 1982

V-5-b) Especificidad de sustrato proteico

V-5-b-1) **Estudios con caseína y sus variantes**

Las caseína quinasas prefieren sustratos acidicos tipificados por la caseína y la fosvitina; la protamina y la mezcla de histonas no

son modificadas por estas enzimas. En estos sustratos ácidos reconocen secuencias específicas que están afectadas por el estado de fosforilación de la molécula.

Las caseínas son una familia de fosfoproteínas, cuyos principales componentes son las caseínas  $\alpha$ -<sub>1</sub> (45-50%),  $\beta$  (33%) y  $\kappa$  (15%); la caseína  $\alpha$ -<sub>2</sub> es una fracción menor (Brignon et al., 1970). Los estudios con estas variantes de caseína usando las caseína quinasas de tipo I y de tipo II de hígado de rata y de reticulocitos de conejo se resumen en la TABLA 4 (Hathaway y Traugh, 1982).

Con caseína quinasa I, se modifica un residuo serina y el determinante estructural para el sitio de fosforilación parece ser un ácido glutámico a dos residuos hacia el extremo N-terminal seguido por un aminoácido ácido o neutro.

La presencia de grupos fosfato hacia el extremo N-terminal podrían también tener efecto, ya que la velocidad de incorporación de fosfatos disminuye con  $\beta$ -caseínas completamente defosforiladas (Traugh y Traut, 1974). Los valores de  $K_m$  para caseína varían de 0,53 a 1,7 mg/ml (Desjardins et al., 1972; Itarte y Huang, 1979; Traugh y Traut, 1974).

La caseína quinasa II modifica tanto residuos de serina como de treonina ubicados en regiones con ácido glutámico o aspártico hacia el extremo C-terminal. En la caseína comercial defosforilada (Reimann et al., 1971) el principal aminoácido fosforilado es



treonina; al igual que en la caseína nativa. Sin embargo, cuando las caseínas  $\beta$ ,  $\alpha_{s1}$  y  $\alpha_{s2}$  están parcialmente defosforiladas, se fosforilan preferencialmente grupos de tres residuos de serina que están fosforilados en la caseína nativa; donde la ser-P funciona como determinante ácido. De acuerdo a esto la secuencia de reconocimiento sería Thr/Ser-Glu/Ser-P-Glu/Asp. La  $K_m$  para la caseína nativa o completamente defosforilada es de aproximadamente  $1\text{mg/ml}$  (Traugh y Traut, 1974); la defosforilación parcial no afecta la  $K_m$  pero aumenta la  $V_{m\max}$  (Donella-Deana et al., 1979).

Los sitios fosforilados por las caseína quinasas se encuentran en zonas  $\beta$ -plegadas; otros sitios de fosforilación potenciales ubicados fuera de estas zonas no son fosforilados (Pinna et al., 1979).

TABLA 4: SECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO EN VARIANTES DE CASEINA

Sustrato	Secuencia fosforilada
<u>Tipo I</u>	
$\beta$ -caseínas	Ser-Leu-Ser-Ser-Ser- <u>Glu-Glu-Ser</u> -Ile-Thr-Arg P P P P
$\alpha_{s1}$ -caseínas	Lys-Glu-Lys-Val-Asn- <u>Glu-Leu-Ser</u> -Lys-Asp-Ile
$\alpha_{s2}$ -caseínas	His-Val-Ser-Ser-Ser- <u>Glu-Glu-Ser</u> -Ile-Ile-Ser P P P Leu-Ser-Thr-Ser-Glu- <u>Glu-Asn-Ser</u> -Lys-Lys-Thr P
<u>Tipo II</u>	
$\beta$ -caseínas	Ser-Glu-Glu-Gln-Gln- <u>Thr-Glu-Asp</u> -Glu-Leu P
$\alpha_{s1}$ -caseínas	Asp-Ile-Gly-Ser-Glu-Ser- <u>Thr-Glu-Asp</u> -Gln-Ala P P
$\alpha_{s2}$ -caseínas	Asn-Arg-Glu-Gln-Leu-Ser- <u>Thr-Ser-Glu</u> -Glu-Asn P P
$\beta$ -caseínas defosforiladas	Ile-Val-Glu-Ser-Leu-Ser- <u>Ser-Ser-Glu-Glu</u> -Ile (P) (P) (P) (P)
$\alpha_{s1}$ -caseínas defosforiladas	Glu-Ala-Glu-Ser-Ile-Ser- <u>Ser-Ser-Glu-Glu</u> -Ile (P) (P) (P) (P)
$\alpha_{s2}$ -caseínas defosforiladas	Thr-Met-Glu-His-Val-Ser- <u>Ser-Ser-Glu-Glu</u> -Ser (P) (P) (P) Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ser (P) (P) (P)

**V-5-b-2) Estudios con péptidos sintéticos**

Se ha estudiado la especificidad de la caseína quinasa II analizando la cinética de la reacción de fosforilación usando péptidos sintéticos como sustratos. Los primeros estudios realizados demostraron que péptidos con una serina en el extremo N-terminal seguida por glutamatos eran fosforilados por la caseína quinasa II pero no por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> ni por la fosforilasa quinasa (Meggio et al., 1984; Finna et al., 1984). Más adelante (Kuenzel et al., 1987), se demostró que la caseína quinasa II prefiere serina a treonina; péptidos con serina en lugar de treonina presentan una diferencia en la relación  $V_{max}/K_m$  de 10 veces.

La presencia de un residuo ácido en la posición n+3 (n= posición del residuo fosforilable) es la condición para que la caseína quinasa II reconozca a un péptido como sustrato; por lo tanto la secuencia Ser-X-X-Glu/Asp puede representar la secuencia con los requerimientos estructurales mínimos para la caseína quinasa II (Kuenzel et al., 1987). Sin embargo, en algunos sustratos proteicos conocidos la existencia de un residuo ácido en la posición n+4 o n+5 resulta un determinante suficiente en lugar del determinante en la posición n+3 (ver TABLA 6). La presencia de un residuo ácido en la posición n+1 mejora la  $K_m$ , en cambio este tipo de aminoácido en la posición n+2 no contribuye de manera importante, lo que contrasta con la hipótesis que postula el

reconocimiento de una secuencia Ser-X-Glu. Estudiando el efecto de la longitud de este cluster ácido COOH-terminal se encontró que un péptido con un cluster de 5 residuos ácidos se fosforila 10 veces más rápido que un cluster con 3 residuos ácidos (Marin et al., 1986).

La presencia de residuos ácidos en posición N-terminal respecto del residuo fosforilable parece ser importante para el reconocimiento por la caseína quinasa II que además prefiere aspartato a glutamato como proveedor de determinantes ácidos (Kuenzel et al., 1987).

#### V-6) Fosforilación de proteínas endógenas

Se ha encontrado que las caseínas quinasas fosforilan varios componentes involucrados en la síntesis de proteínas como factores de iniciación y proteínas ribosomales ácidas; proteínas de membrana y proteínas nucleares ácidas incluyendo las RNA polimerasas I y II (ver TABLAS 5 y 6). Las enzimas de tipo I y de tipo II fosforilan en muchos casos la misma proteína, aunque es probable que modifiquen sitios diferentes.

En varios casos, la fosforilación por caseína quinasa II ha mostrado regular la actividad, esto ha sido demostrado para la DNA topoisomerasa II (Ackerman et al., 1985) y para las RNA

polimerasas I y II de hepatoma (Stetler y Rose, 1982). La fosforilación de varias proteínas por la caseína quinasa de tipo II potencia su fosforilación por la glucógeno sintetasa 3/Fa; tal es el caso de la subunidad regulatoria de tipo II de la proteína quinasa dependiente de  $AMP_c$  (Hemmings et al., 1982); el inhibidor 2 de la fosfatasa 1 de proteínas (DePaoli-Roach, 1984) y la glucógeno sintetasa (DePaoli-Roach et al., 1983; Pictou et al., 1982).

**TABLA 5: SUSTRATOS ENDOGENOS FOSFORILABLES POR LA CASEINA QUINASA DE TIPO I**

Sustrato	Fuente enzimática	Referencia
Proteínas cromosomales no histónicas (56,49 y 43 KDaltones)	Tumor ascítico de rata	Christmann y Dahmus, 1981
RNA polimerasa I	Timo de ternera	Dahmus, 1981
RNA polimerasa II	Timo de ternera	Dahmus, 1981
Glucógeno sintetasa	Musculo de conejo	DePaoli-Roach et al., 1981
Fibrinogeno	Glóbulos rojos humanos	Itarte et al., 1983
AcetilCoAcarboxilasa	Higado de rata	Tipper et al., 1983
Receptor de insulina	Reticulocitos de conejo	Tuazon et al., 1985

**TABLA 6: SUSTRATOS ENDOGENOS FOSFORILABLES POR LA CASEINA QUINASA DE TIPO II**

Sustrato	Secuencia	Referencia
R <sub>11</sub> de la PK dep de AMP <sub>c</sub>	Asp- <u>Ser</u> -Glu- <u>Ser</u> -Glu-Asp-Glu-Glu	Hemmings et al., 1982
Inhibidor 2 de la fosfatasa de fosfoproteínas	Glu-Gln-Glu- <u>Ser</u> - <u>Ser</u> -Gly-Glu-Glu Asp-Asp-Ala-Tyr- <u>Ser</u> -Asp-Thr-Glu	Holmes et al., 1986
Glucógeno sintetasa	Pro-His-Gln- <u>Ser</u> -Glu-Asp-Glu-Glu	Cohen et al., 1982
Proteína nucleolar B23	Glu-Asp-Ala-Glu- <u>Ser</u> -Glu-Asp-Glu	Chan et al., 1986
Proteína HM614	Glu-Ser-Pro-Ala- <u>Ser</u> -Asp-Glu-Ala	Walton et al., 1985
RNA polimerasa I	ND	Dahmus, 1981
RNA polimerasa II	ND	Dahmus, 1981
Topoisomerasa II	ND	Ackerman et al., 1985
Troponina T	ND	Risnik et al., 1984
Nucleoplasmina	ND	Taylor et al., 1987
Ornitina decarboxilasa	ND	Atmar y Kuenn, 1981
AcetilCoaA carboxilasa	ND	Czech et al., 1988

ND = No determinado

#### V-7- Regulación

##### V-7-a) Estudios in vitro

Las caseína quinasas se definen como proteína quinasas independientes de mensajeros y que no responden directamente a

moduladores o estímulos hormonales. Con el fin de establecer un rol regulatorio para estas enzimas se han buscado reguladores potenciales. Los esfuerzos han estado dirigidos fundamentalmente a las caseína quinasas de tipo II, debido a su estructura más compleja.

Se han encontrado algunos compuestos que regulan la actividad de las caseína quinasas de tipo II por inhibición (heparina; otros glicosaminoglicanos y 2,3 difosfoglicerato) o por activación (poliaminas).

La inhibición por 2,3 difosfoglicerato ( $IC_{50} = 3 \text{ mM}$ ) es reversible por caseína pero no por ATP (Kumar y Tao, 1975). La concentración de este compuesto necesaria para un 50% de inhibición de la caseína quinasa II es cercana a la fisiológica en eritrocitos y podría regular la enzima en este tipo celular.

La heparina es un inhibidor potente de la caseína quinasa II ( $K_i = 1,4 \text{ nM}$ ) (Hathaway et al., 1980). La inhibición es competitiva para el sustrato caseína y no competitiva para el ATP. La heparina es un polisacárido sulfatado formado por ácido L-idurónico; N-acetil y N-sulfato glucosamina y ácido D-glucurónico. El bajo valor de  $K_i$  sugiere que la heparina podría ser un regulador de esta enzima aunque también podría representar un análogo estructural de un inhibidor endógeno verdadero. En corteza adrenal bovina se ha identificado un factor proteico endógeno que inhibe selectivamente

a la caseína quinasa de tipo II de bajo peso molecular, con propiedades ácidas que contiene dos regiones de glicosaminoglicanos identificados por su contenido en sulfato y en azúcares como estructuras de tipo heparina y condroitín-sulfato (Firollet et al., 1981).

El inositol hexasulfato inhibe a la caseína quinasa II con una  $K_i = 0,02$  mM y es el único inhibidor de esta enzima y es el único inhibidor de esta enzima que también inhibe a la caseína quinasa I con una concentración dos veces superior a la requerida para inhibir la caseína quinasa II (Hathaway y Traugh, 1982).

Se encontró además un inhibidor artificial específico de la caseína quinasa de tipo II, el 5,6 dicloro 1- $\beta$ -D ribofuranosil benzimidazol, un análogo de la adenosina. Estudiando la inhibición sobre la iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa II producida por este compuesto, se comprobó que este efecto estaba mediado por la inhibición de la actividad de la caseína quinasa II (Zandomei y Weinmann, 1984).

Algunos policationes, como por ejemplo, las poliaminas son capaces de estimular la actividad de la caseína quinasa de tipo II y la activación de la enzima por putrescina, espermidina o espermina es superior a la observada con  $Mg_{2+}$  a cualquier concentración. A diferencia del  $Mg_{2+}$ , la espermina y la espermidina son capaces de contrarrestar el efecto inhibitorio de la heparina (Feige et al., 1980; Maepaa, 1977)



Si bien la caseína quinasa II, es muy sensible a algunos de estos componentes *in vitro*, no ha sido demostrado aún que las fluctuaciones en su concentración intracelular regulen la actividad de esta enzima.

#### V-7-b) Regulación de la actividad de caseína quinasa II por factores de crecimiento

La actividad de caseína quinasa II evidenciada por fosforilación de sustratos peptídicos específicos aumenta por insulina en la línea celular de adipocitos 3T3-L1 (Sommercorn y Krebs, 1987) y por insulina y el factor de crecimiento "insulina-like" en fibroblastos BALB/c/3T3 (Klarlund y Czech, 1988). La magnitud de la activación varía entre 30 y 160%.

La activación es muy sensible a insulina con una respuesta media a 0,15 nM y se debe a un aumento en la  $V_{max}$  y no a cambios en la  $K_m$  por el sustrato peptídico (Krebs et al., 1988). Una pequeña activación de la caseína quinasa II también se observó luego de la adición de factor de crecimiento epidermal a células A431 (Sommercorn et al., 1987).

La activación de la caseína quinasa II por insulina se puede relacionar con algunos estudios sobre sustratos endógenos potenciales de esta enzima. La fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa en adipocitos estimulados con insulina aumenta en un 31% en un único péptido triptico de la subunidad de 240000 que

también es fosforilado por incubación de la enzima purificada con caseína quinasa II *in vitro* (Czech et al., 1988)

V-8- Importancia de la caseína quinasa de tipo II en la transducción de señales y el control del ciclo celular

En los últimos años, se han reunido evidencias que sugieren que la activación de la caseína quinasa de tipo II puede ser un paso fundamental en la regulación del crecimiento celular.

Utilizando la información disponible sobre las bases moleculares de la especificidad de sustrato para la caseína quinasa de tipo II, se encontraron nuevos sustratos potenciales para esta enzima. Estos incluyen la mayoría de las proteínas nucleares codificadas por oncogenes (las proteínas transformantes E1A, myc, myb, fos, erb-A, n-myc y el antígeno T) (Krebs et al., 1988) y otras reguladores de la transcripción (GCN4, Jun y Gal4) (Carroll et al., 1988). Péptidos derivados de los dominios asociados a la transformación e inmortalización de myc, fos, E1A y el antígeno T tienen alta afinidad por la caseína quinasa II y no son fosforilables por la caseína quinasa I, la proteína quinasa dependiente de  $AMP_2$  ni la fosforilasa quinasa (Carroll et al., 1988). Las secuencias reconocidas por la enzima se encuentran en los dominios ácidos ligados a la capacidad transformante de las proteínas oncogénicas (Figge et al., 1988) y en los dominios activadores de los factores transcripcionales que contienen la

actividad sobre la transcripción (Ma y Ptashne, 1987; Struhl, 1988). Existen algunas evidencias que permiten postular que la fosforilación transiente de residuos de serina o treonina, introduciendo cargas negativas adicionales en estas porciones ácidas de los dominios asociados a la transformación de las proteínas oncogénicas y los dominios asociados a la activación de la transcripción de los activadores transcripcionales sirve para aumentar la función de estos dominios (Carroll et al., 1988; Krebs et al., 1988).

Por otra parte, se ha observado que los niveles de caseína quinasa II aumentan seis veces por estimulación con suero humano de células W 138 quiescentes a los 30 minutos post-estimulación y su nivel desciende luego de dos horas. Aparecen ciclos adicionales de activación y desactivación a las 12 y 24 horas después de la estimulación (Carroll et al., 1988).

La activación de la caseína quinasa II podría estar ligada con las transiciones de  $G_0$  a  $G_1$  y de  $G_1$  a la fase S. En *Xenopus laevis* se observó que la actividad de la caseína quinasa II está asociada a la transición entre profase y metafase de la división meiótica de los oocitos (Muhliner-Louillon et al., 1988).

La activación de la caseína quinasa II podría ser el resultado de otros caminos metabólicos que intervienen en la transducción de señales. El éster de forbol, TPA, promotor de tumores y activador potente de la proteína quinasa C, produce una elevación de tres

veces en la actividad de la caseína quinasa en cultivos primarios de células BRK. De acuerdo a estos resultados, la proteína quinasa C mediaría la activación de la caseína quinasa II. La activación temprana por suero humano en células W 138 coincide con una inhibición de la actividad de la proteína quinasa dependiente de  $AMP_c$ . El agregado de dibutiril  $AMP_c$  a los cultivos inhibe la capacidad del éster de forbol de activar la caseína quinasa II. Esto sugiere que la proteína quinasa dependiente de  $AMP_c$  y la proteína quinasa C actúan regulando en forma directa o indirecta la actividad de la caseína quinasa de tipo II (Carroll et al., 1988).

VI- MECANISMOS DE FOSFORILACION EN EL HONGO *Mucor rouxii*VI-1) Biología del género *Mucor*

*Mucor* es un género de hongos perteneciente a la clase Zigomicetes, orden Mucorales, que crece bajo dos formas diferentes según el medio en que se halle.

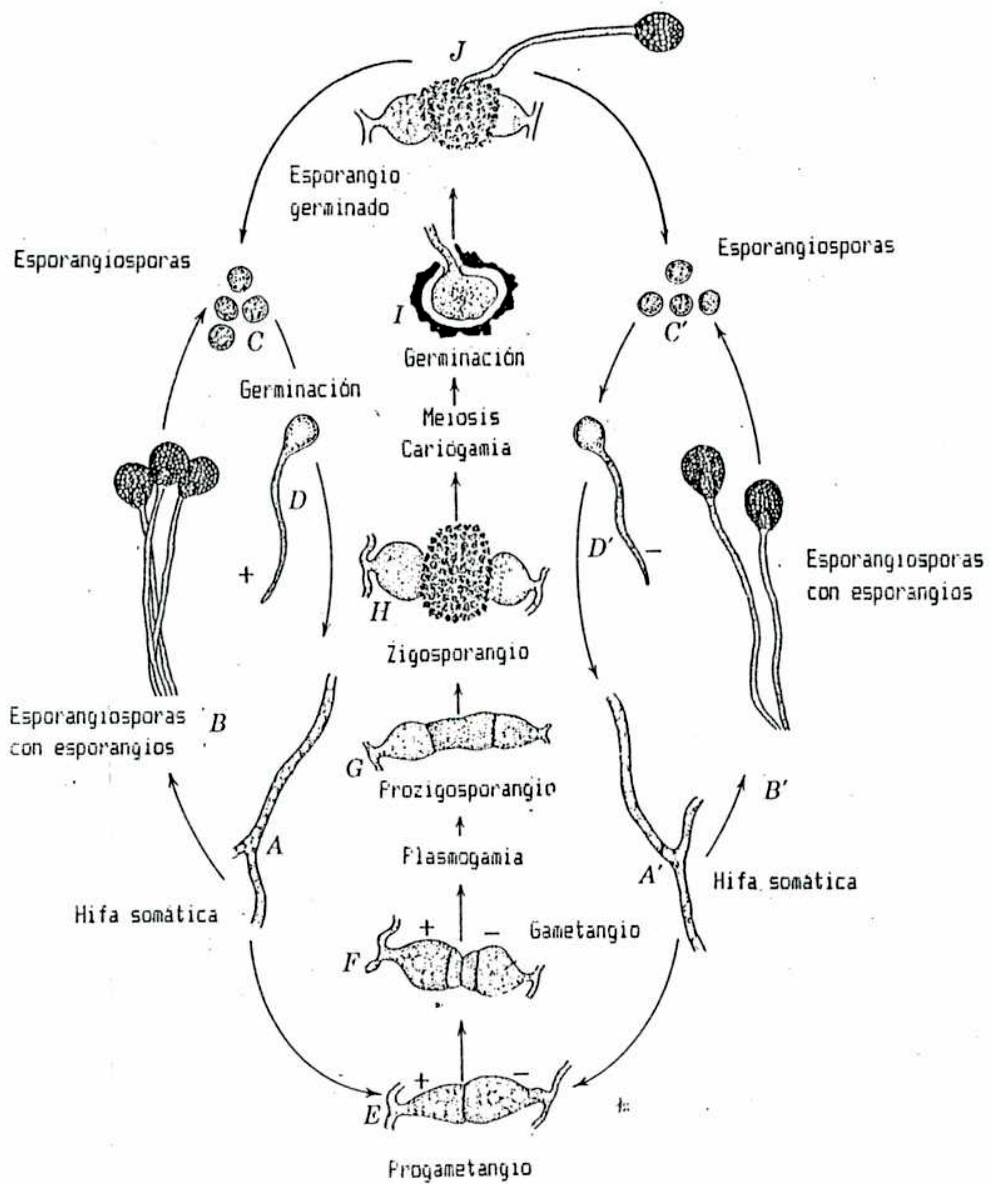
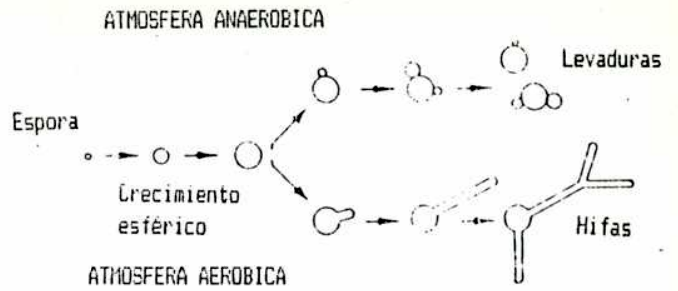
En aerobiosis, en medio sólido o líquido, desarrolla un micelio cenocítico típico produciendo estructuras de reproducción vegetativa: las clamidosporas. Bajo ciertas condiciones, se producen en los extremos de las hifas esporangios portadores de esporas asexuales. La reproducción sexual se produce por copulación gametangial produciendo una cigospora. En el esquema 1 se muestra el ciclo de vida aeróbico de este género.

Como una respuesta adaptativa de *Mucor* a una atmósfera pobre en oxígeno aparecen células esféricas o hifas cortas muy engrosadas que se reproducen por gemación; este estado se denominó fase levaduriforme y revierte a micelio por oxigenación (Bartnick Garcia y Nickerson, 1962; Bartnicki-Garcia, 1968).

VI-2) Dimorfismo en *Mucor* y acción del  $AMP_c$ 

Ha sido demostrado que el  $AMP_c$  juega un rol importante en la morfología del hongo. En *Mucor racemosus*, el agregado de dibutiril

Alternativas morfo genéticas de *Mucor rouxii*



Esquema 1: Ciclo de vida del hongo *Mucor rouxii*

AMP<sub>2</sub> a cultivos levaduriformes inhibe el desarrollo de las hifas cuando éste se airea e induce la forma levaduriforme en cultivos aeróbicos jóvenes (Larsen y Sypherd, 1974).

En *Mucor rouxii*, el dibutiril AMP<sub>2</sub> y el AMP<sub>2</sub> impiden el desarrollo de las hifas aún en condiciones aeróbicas; por otra parte, el dibutiril AMP<sub>2</sub> también inhibe la transformación de levadura a micelio cuando se expone un cultivo levaduriforme al aire. La forma levaduriforme tiene mayor contenido de AMP<sub>2</sub> que la forma micelial (Paveto et al., 1975). Se evidenció, además efecto sinérgico de los análogos de sitio del AMP<sub>2</sub> para la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>2</sub> sobre el cambio de morfología del hongo, lo que permite establecer que este efecto es producido por la proteína quinasa sin que medie otro efector (Fardo y Moreno, resultados no publicados).

### VI-3) Estudios previos sobre los mecanismos de fosforilación en *Mucor rouxii*

Dada la importancia regulatoria del AMP<sub>2</sub> en la morfología de este hongo, se ha dedicado mucho esfuerzo al estudio de la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>2</sub> (PK A) en esta especie.

Se han encontrado dos formas de esta enzima, una tetramérica (R<sub>2</sub>C<sub>2</sub>) de peso molecular 230000 y otra forma dimérica (R'C) de peso molecular 88000 (Moreno y Passeron, 1981; Paveto et al.,

1989). Esta última se genera en forma espontánea en cultivos de fase estacionaria y se obtuvo con idénticas características por proteólisis limitada. Las dos formas son inactivas en ausencia de  $AMP_2$  y para que ocurra la activación es necesaria la disociación de las subunidades de forma que se libere la forma catalítica (C). A diferencia de Eucariontes, en *Mucor rouxii* la disociación-activación no ocurre por la sola presencia de  $AMP_2$  y se obtuvo *in vitro* por agregado de  $AMP_2$  y sal (Moreno y Passeron, 1980).

Se demostró que la forma tetramérica tiene dos calidades de sitios por cada subunidad R y que en el complejo ternario  $R_2C_2$  ( $AMP_2$ )<sub>2</sub> se ocupan sólo una calidad de sitios (Fastori et al., 1981, Moreno et al., 1983; Paveto et al., 1989).

Se estudió también la influencia del sustrato proteico en la activación de la proteína quinasa dependiente de  $AMP_2$  por  $AMP_2$  y se observó que la activación por sustratos básicos como protamina e histona era mayor que por el heptapéptido sintético de Kemp. Se encontró, además que los policationes, polilisina, un grupo de histonas no fosforilables por esta enzima y las poliaminas, promueven la activación total de esta proteína quinasa por  $AMP_2$ , cuando se usa péptido de Kemp como sustrato. A partir de estos resultados se postula que dominios básicos en el sustrato proteico o la presencia de poliaminas puede tener gran importancia en la activación de la proteína quinasa por  $AMP_2$  (Guthmann y Moreno, resultados no publicados).



Se estudio además la sensibilidad de la PK A de *Mucor rouxii* al inhibidor termoestable de la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> aislado de músculo de conejo y del péptido derivado de este inhibidor. Si bien el péptido inhibe a la subunidad catalítica (C) de *Mucor* con una eficiencia similar a la C de corazón bovino; tanto la holoenzima como la subunidad catalítica son insensibles a la proteína inhibidora completa (Guthmann et al., 1990)

Además de los estudios sobre la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>, se aislaron y caracterizaron dos fosfatasas de proteínas que resultaron susceptibles de inhibición por inhibidores endógenos (Seigelchifer y Passeron, 1984 y 1985).

**OBJETIVO DE ESTA TESIS**

Ha sido demostrada la importancia del rol del AMP<sub>c</sub> en la regulación de la morfología del hongo *Mucor rouxii*. Los efectos producidos en el hongo por cambios en los niveles de AMP<sub>c</sub> son llevados a cabo por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>, única proteína receptora de este nucleótido.

Teniendo en cuenta que las proteína quinasas suelen actuar como complejos sistemas en cascada, se consideró importante la caracterización de otras proteína quinasas del hongo. Resultaron de particular interés las caseína quinasas por su ubicuidad y por la multiplicidad de sustratos que, en otros sistemas, son fosforilados por estas enzimas. Investigaciones recientes confirman el interés de estas quinasas debido a su importancia en el control del ciclo celular.

Asimismo, se intentó una primera caracterización de los sustratos endógenos de las proteína quinasas cuya existencia ha sido demostrada en *Mucor rouxii*, como intento de aproximación a la comprensión de los mecanismos que regulan el metabolismo de este hongo y en particular, su dimorfismo.

## MATERIALES Y METODOS

### ORGANISMO UTILIZADO

Para la realización de este estudio se utilizó la cepa NRRL 1894 del hongo *Mucor rouxii* obtenida originalmente por el Dr. W. C. Hesseltine y cedida a nuestro laboratorio por el Dr. Roger Storck

El mantenimiento de la cepa y la obtención de las esporas usadas para el cultivo del hongo fueron realizadas de acuerdo a lo descrito por Haidle y Storck (Haidle y Storck, 1966).

### PARTE A: PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION DE LAS CASEINA QUINASAS DEL HONGO *Mucor rouxii*

#### I- CONDICIONES DE CULTIVO

La forma micelial del hongo se obtuvo inoculando  $5 \times 10^8$  esporas por ml de medio complejo YPG que contenía 2% (p/v) de glucosa como fuente principal de carbono (Bartnicki-García y Nickerson, 1962). Los cultivos se desarrollaron a 28° con agitación rotatoria en Erlenmeyers de 5 litros que contenían 2 litros de medio. Luego de 13 a 16 horas de crecimiento (fase logarítmica), se cosecharon por

filtración en un embudo Büchner con vacío y se lavaron con 2 volúmenes de agua destilada mantenida a 4°. El micelio obtenido (entre 5 y 8 g/litro de medio) se conservó a -70° hasta el momento de su uso.

## II- PREPARACION DE SUSTRATOS

### II-1) Defosforilación de caseína

Las caseínas son un grupo heterogéneo de proteínas aisladas a partir de la leche que contienen grupos fosfatos agregados endógenamente por la caseína quinasa de la glándula mamaria (Weller, 1979).

La caseína mezcla que se obtiene comercialmente es ideal como sustrato aceptor de grupos fosfato para los ensayos de rutina que conducen a la purificación y caracterización de las caseína quinazas, pero debe defosforilarse antes de ser usada con el fin de obtener un sustrato más homogéneo.

Nosotros hemos usado una modificación del método de Reinmann et al. (Reinmann et al., 1986) para defosforilar la caseína. Se suspendieron 500 mg de esta proteína en 10 ml de buffer Tris HCl 50 mM pH 8 y la mezcla se llevó a pH 9,5 con NaOH 0,1 N; se calentó a 100° en un baño de agua hirviendo y se mantuvo a esta temperatura durante 10 minutos. En este momento la caseína se

solubiliza completamente. Luego, se dializa contra buffer Tris ClH 50 mM pH 7,4 y finalmente contra 10 volúmenes de agua destilada. La solución se hizo 1 mM en azida sódica y se guardó a

II-2) Síntesis de nucleótidos radioactivos: [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP y [ $\gamma$ - $^{32}$ P] GTP

Se usó [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP sintetizado según la técnica de Glynn y Chappell (Glynn y Chappell, 1966) con las modificaciones introducidas por Chang et al. (Chang et al., 1974). El [ $\gamma$ - $^{32}$ P] GTP se obtuvo según el mismo procedimiento reemplazando en la mezcla de reacción el ATP por GTP.

El grado de conversión de  $^{32}$ P-PO<sub>4</sub> a ATP o GTP se evaluó por cromatografía ascendente sobre PEI-celulosa desarrollada con LiCl 1 M y se tuvo en cuenta para todas las determinaciones de actividad específica del ATP o GTP.

III- ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE CASEINA QUINASA

La actividad enzimática se ensayo en un volumen final de 100  $\mu$ l. La mezcla estándar contenía buffer Tris HCl pH 7,4 50 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP 0,05 mM con una actividad específica entre 200 y 1000 cpm/pmol; 5 mg/ml de caseína

defosforilada y cantidades variables de la preparación enzimática. La incubación se realizó a 30° por 10 minutos.

La incorporación de  $^{32}\text{P}$  a caseína se midió por unión a papeles de fosfocelulosa según el método de Roskoski jr. (Roskoski, 1983). Se sembraron alícuotas de los ensayos (50 - 70  $\mu\text{l}$ ) en cuadrados de papel de fosfocelulosa de 2 cm x 2 cm y se sumergieron en  $\text{H}_3\text{PO}_4$  75 mM; el líquido se descartó y los papeles se lavaron tres veces más en la misma solución con agitación suave durante 4 minutos. Por último, los papeles se lavaron con etanol, el líquido se descartó, se secaron bajo aire caliente y se sumergieron en mezcla centelleadora contenida en viales para su conteo.

Los ensayos enzimáticos se realizaron en condiciones de linealidad respecto del tiempo y de la concentración de enzima. La actividad de caseína quinasa se expresó como pmoles de fosfato incorporados al sustrato proteico por minuto.

La fosforilación endógena se determinó con la mezcla estándar de incubación libre de caseína.

Para el estudio de la especificidad de sustrato proteico, la caseína fue reemplazada por fosvitina (5 mg/ml); histona mezcla (1,5 mg/ml); fosforilasa b (4 mg/ml); protamina (1,5 mg/ml) o péptido de Kemp (0.25 mg/ml).

IV- PREPARACION DE CASEINA QUINASAS SOLUBLES DE *Mucor rouxii*

El micelio congelado a  $-70^{\circ}$  fue molido con  $N_2$  líquido hasta obtener un polvo fino. Luego de esto, todas las operaciones que se detallan se realizaron a  $4^{\circ}$ . El polvo micelial fue extraído con 2 volúmenes de Tris HCl pH 7,4 10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 4 mM,  $N_3Na$  1 mM y PMSF 0,5 mM (buffer A) con agitación suave durante 60 minutos.

El extracto crudo se centrifugó por 30 minutos a 15000 g y el sobrenadante ( $S_{15}$ ) se sembró en DEAE-Sepharosa a una relación de 20 mg de proteína ml de resina. La columna se desarrolló con un gradiente de 0 a 0,4 M de NaCl en buffer A. Con este procedimiento se separaron dos tipos de actividades de caseina quinasa a las que llamamos CK I y CK II según el orden de elución.

Las fracciones que contenían la actividad CK I se juntaron y se sembraron en una columna de fosfocelulosa con un volumen tal que la relación con la cantidad de proteína sembrada fuera de 10 mg/ml de resina. La columna se eluyó con un gradiente de 0 a 1 M de NaCl en buffer A. Las fracciones activas se juntaron y la proteína se precipitó por diálisis contra una solución saturada de  $(NH_4)_2 SO_4$  en buffer A. La proteína precipitada se resuspendió en el mínimo volumen de buffer A y se desaló por filtración a través de Sephadex G 25 o por diálisis contra buffer A. La preparación enzimática así obtenida se distribuyó en alícuotas y se conservó a  $-20^{\circ}$  hasta el momento de su uso.

Las fracciones con actividad de CK II se juntaron, se dializaron contra 0,25 M de NaCl en buffer A y se sembraron en una columna de fosfocelulosa según una relación de 40 mg de proteína / ml de resina. La columna se eluyó con un gradiente entre 0,25 y 1,25 M de NaCl en buffer A. Las fracciones que contenían actividad de caseína quinasa se juntaron, se dializaron contra buffer A 0,25 M en NaCl y se guardaron en alícuotas a  $-20^{\circ}$  hasta el momento de ser usadas.

Para estas preparaciones las cromatografías en columnas se desarrollaron de la siguiente forma: después de cargar la muestra en las relaciones masa proteica a volumen de lecho indicadas más arriba; las columnas fueron lavadas con 2 volúmenes de buffer y eluidas con 10 volúmenes de un gradiente lineal de NaCl; se recogieron fracciones de 0,1 volumen y la actividad de caseína quinasa fue ensayada en alícuotas adecuadas cada dos fracciones.

Las actividades específicas de las preparaciones fueron de aproximadamente 1400 pmoles de fosfato incorporados/min/mg de proteína para CK I (20 veces purificada) y de 9000 pmoles de fosfato incorporado/min/mg de proteína para CK II (300 veces purificada).

En algunas preparaciones se separó en DEAE-Sepharosa un tercer pico de actividad minoritario. En estos casos, se juntaron estas fracciones, se concentraron por diálisis contra una solución



saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y la proteína precipitada se disolvió en el mínimo volumen de buffer A y se dializó contra el mismo buffer. Esta preparación se conservó en alícuotas a  $-20^\circ$ .

#### V- PREPARACION DE CASEINA QUINASAS PARTICULADAS

A partir de un cultivo micelial se preparó un extracto según el procedimiento indicado previamente. Este extracto crudo se centrifugó a 15000 g por 30 minutos, el sobrenadante se conservó a  $4^\circ$  y el precipitado obtenido ( $P_{15}$ ), luego de un lavado en buffer A, se resuspendió en el mínimo volumen de buffer hecho 1 M en NaCl y se dejó extrayendo por 30 minutos a  $4^\circ$ . Este nuevo extracto se centrifugó en las mismas condiciones y el sobrenadante ( $S_{\text{NaCl}}$ ) se dializó contra buffer A y se conservó a  $4^\circ$  para ser ensayado como se indica más adelante. El precipitado, luego de un lavado en buffer A, se resuspendió en el mínimo volumen de buffer A hecho 1% en Nonidet P-40 y se extrajo durante 30 minutos a  $4^\circ$ . Este extracto se centrifugó, se guardó el sobrenadante ( $S_{\text{Det}}$ ) y el sedimento se lavó y se resuspendió en buffer A ( $P_{\text{Det}}$ ).

Las actividades de caseína quinasa del  $S_{\text{NaCl}}$  y del  $S_{\text{Det}}$  se analizaron por cromatografía en DEAE-Sepharosa y por centrifugación en gradientes de sacarosa como se indica más adelante.

## VI- ANALISIS CROMATOGRAFICO DE CASEINA QUINASAS PARTICULADAS EN DEAE-SEPHAROSA

El  $S_{NaCl}$  previamente dializado se cromatografió en una columna de DEAE-Sepharosa equilibrada con buffer A. Se sembraron 10 mg de proteína/ml de resina y luego de un lavado con 1,5 volúmenes de buffer A se aplicaron 20 volúmenes de un gradiente entre 0 y 0,4 M de NaCl en el mismo buffer. Se recogieron fracciones de 0,4 volúmenes y la actividad de caseína quinasa fue ensayada en alícuotas de las fracciones.

El  $S_{D_{11}}$  se sembró en una columna de DEAE-Sepharosa equilibrada en buffer A hecho 1% en Nonidet P-40 a 20 mg de proteína/ml de resina y luego de un lavado con 1,5 volúmenes del mismo buffer, se eluyó con 10 volúmenes de un gradiente entre 0 y 0,4 M de NaCl en buffer A 1% Nonidet P-40. Se recogieron fracciones de 0,2 volúmenes y alícuotas de las fracciones se ensayaron para caseína quinasa.

## VII- DETERMINACION DE CONSTANTES CINETICAS DE LAS CASEINA QUINASAS SOLUBLES

La caracterización cinética de CK I y CK II respecto de los nucleótidos dadores de fosfatos se realizó ensayando la actividad de caseína quinasa en presencia de 2,5 mg/ml de caseína,  $MgCl_2$  20 mM, las preparaciones obtenidas de fosfocelulosa y concentraciones variables de ATP y GTP desde 4 a 400  $\mu M$ . Todos los ensayos se

realizaron en condiciones tales que la cantidad de compuesto radioactivo agregada (ATP o GTP) se mantuviera fija.

Las constantes cinéticas fueron calculadas a partir de gráficos de dobles recíprocas. Los valores calculados fueron corroborados calculando estas constantes en gráficos de  $v$  vs  $v/s$  y  $s/v$  vs  $s$ .

#### VIII- DETERMINACION Y CALCULO DE LOS PARAMETROS FISICOS E HIDRODINAMICOS DE LAS CASEINA QUINASAS

##### VIII-1) Radio de Stokes

Los radios de Stokes de las caseina quinasas solubles se obtuvieron utilizando los datos de elución de una columna de Sephacryl S-300 de 1 41 cm.

La columna se equilibró con 20 mM NaCl en buffer A para CK I y con 250 mM NaCl en buffer A para CK II. El volumen de exclusión se calculó como el volumen de elución de Azul de Dextrano. Como proteínas marcadoras se usaron catalasa de hígado bovino, seroalbúmina bovina, peroxidasa de rabano picante y citocromo c de corazón equino.

El valor del radio de Stokes se determinó según el método de Laurent y Killander (Laurent y Killander, 1964), representando  $(-\log K_{av})^2$  versus el radio de Stokes ( $a$ ) de las proteínas

marcadoras e interpolando el valor de  $(-\log K_{av})^m$  de las proteínas en estudio, donde:  $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$  y  $V_e$ =volumen de elución de la proteína,  $V_o$ =volumen de exclusión y  $V_t$ =volumen total de la columna.

#### VIII-2) Coefficientes de sedimentación ( $s_{20,w}$ )

Los coeficientes de sedimentación se determinaron de acuerdo a Martin y Ames (Martin y Ames, 1961). Se prepararon gradientes lineales de 5 a 20% en sacarosa (p/v) en buffer A para CK I y CK I' y CK II; en buffer A 0,25 M en NaCl para CK II desagregada o en buffer A 1% en Nonidet P-40, para  $S_{Det}$ . Las muestras respectivas se sembraron en presencia de las proteínas marcadoras (catalasa de hígado bovino, 11,3 S; fosfatasa alcalina de mucosa intestinal, 6,3 S; peroxidasa de rábano picante, 3,5 S y citocromo c de corazón equino, 1.7 S) y fueron centrifugadas por 17 horas a 35000 rpm en un rotor SW 55 Ti.

#### VIII-3) Pesos moleculares

Los pesos moleculares de las caseína quinasa solubles fueron calculados según el método de Siegel y Monty (Siegel y Monty, 1966) usando la siguiente ecuación:

$$PM = [6\pi N \bar{\eta}_{20,w} / (1-v) \rho_{20,w}] a s_{20,w}$$

donde PM=peso molecular; N=número de Avogadro;  $\bar{\eta}$ =viscosidad del agua a 20°; v=volumen específico parcial (se consideró 0,74 ml/g);  $\rho$ =densidad del agua a 20°; a=radio de Stokes y  $s_{20,w}$ =coeficiente

de sedimentación en agua a 20°.

#### VIII-4) Coefficientes friccionales

Se determinaron según la ecuación de Siegel y Monty a partir de los radios de Stokes (a) y los pesos moleculares calculados, considerando que el volumen específico parcial (v) para proteínas solubles es de 0,74 ml/g:

$f/f_0 = a [4\pi\eta N / 3vPM]^{1/3}$ , donde  $f/f_0$ =coeficiente friccional.

#### VIII-5) Parámetros moleculares de las proteínas marcadoras

Los parámetros de las proteínas marcadoras usadas para determinar los radios de Stokes y los coeficientes de sedimentación se resumen en la siguiente tabla:

Proteína	Coefficiente de sedimentación [S]	Radio de Stokes [nm]	Peso molecular [Daltones]
Catalasa	11,3	5,2	247000
Fosfatasa alcalina	6,3	2,9	100000
Seroalbúmina bovina	4,3	3,6	67000
Peroxidasa	3,5	3,0	40000
Citocromo c	1,7	1,8	12400

## IX- DETERMINACION DEL AMINOACIDO FOSFORILADO EN CASEINA

Para este análisis se fosforilaron 1,5 mg de caseína en un volumen final de 1 ml con una cantidad apropiada de las preparaciones enzimáticas de CK I y CK II, en las condiciones estándar a excepción de que la actividad específica del [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP se aumentó a 2000 cpm/pmol y la incubación se extendió durante 45 minutos.

Las mezclas de incubación se concentraron por Minicon CS-15 hasta 30  $\mu$ l, luego se diluyeron por agregado de agua destilada hasta 2,5 ml y se concentraron nuevamente. Esta operación se repitió una vez y tuvo por objeto concentrar las muestras y eliminar el [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP. Las muestras concentradas se hidrolizaron en 2 ml de HCl 6 N durante 60 min en un baño de glicerina mantenido a 110°. El HCl se removió completamente por evaporaciones sucesivas bajo presión reducida, luego de resuspensión en agua.

Los productos de hidrólisis se resuspendieron en 50  $\mu$ l de agua y se analizaron por electroforesis mono y bidimensionales en placas delgadas de microcelulosa. Entre 0,5 y 2  $\mu$ l de las muestras hidrolizadas en presencia de 10 a 15  $\mu$ g de una mezcla de fosfoserina, fosfotreonina y fosfotirosina no radiactivos usados como marcadores internos, se sembraron en placas de 10cmx10cm a 1,5 cm de uno de los bordes.

Las electroforesis monodimensionales se corrieron a pH 1,9 en buffer ácido fórmico 88% : ácido acético glacial : agua (50:156:1794) durante dos horas a 300 V.

En las electroforesis bidimensionales la primera dimensión se corrió a pH 1,9 como se indicó anteriormente y la segunda dimensión a pH 3,5 en buffer piridina : ácido acético glacial : agua (10:100:1890) durante una hora a 300 V.

Los aminoácidos fosforilados patrones fueron revelados vaporizando con ninhidrina 0,2% en acetona. Las manchas radioactivas se ubicaron por autoradiografía.

#### MISCELANEAS

##### X-1) Ensayo de la actividad de proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>.

La actividad de proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> se ensayó en un volumen final de 100 µl de una mezcla de incubación que contenía Tris HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, β-mercaptoetanol 2 mM, [γ-<sup>32</sup>P] ATP 100 µM (300 cpm/pmol), péptido de Kemp 125 µg/ml y AMP<sub>c</sub> 0,1 µM en presencia de una alícuota adecuada de la fracción enzimática correspondiente. La incubación se realizó a 30°C durante 10 minutos. La incorporación de fosfato radioactivo al péptido de Kemp se realizó por el método de Roskoski<sup>1</sup> (Roskoski, 1983).

## x-2) Medición de proteínas

La proteína se midió según Bradford (Bradford, 1976) usando seroalbúmina bovina como patrón. La proteína particulada se midió por el método de Lowry (Lowry et al., 1951), luego de solubilizar la proteína calentando 30 minutos a 100° en HONa 0,1 M.

PARTE B: ESTUDIO DE LA FOSFORILACION ENDOGENA DEBIDA A CASEINA QUINASAS Y PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE AMP<sub>2</sub> POR MEDICION *in situ* EN LEVADURAS PERMEABILIZADAS DE *Mucor rouxii*.

## 1- CULTIVOS

La forma levaduriforme del hongo se obtuvo de acuerdo al método de Reyes (Reyes et al., 1983). Se inocularon  $1,2 \times 10^9$  esporas en Erlenmeyers de 125 ml que contenían un volumen de medio YFG 2% (p/v) de glucosa tal que quedara una pequeña cámara de aire. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente durante 20 a 22 horas (fase logarítmica) y para evitar que las células sedimenten durante la incubación se las sometió a agitación suave con barra magnética.

Las células levaduriformes obtenidas (300-400 mg/100 ml de medio) fueron cosechadas por filtración con vacío, lavadas con dos



volúmenes de agua destilada enfriada a 4° y usadas inmediatamente.

## II- PROCEDIMIENTO DE FERMEABILIZACION DE CELULAS LEVADURIFORMES DE *Mucor rouxii*

La permeabilización de células levaduriformes de *Mucor rouxii* se realizó según el método de Passeron (Maggese et al., 1982) con algunas modificaciones.

Entre 300 y 400 mg (peso húmedo) de levaduras se suspendieron en buffer imidazol-HCl pH 7, 75 mM; KCl 0,1 M; MgCl<sub>2</sub> 10mM; PMSF 0,5 mM (buffer P<sub>1</sub>, a una concentración de 30 mg/ml. A 10 ml de esta suspensión celular se agregaron 0,5 ml de una mezcla tolueno : etanol (1:4, v/v) y esta mezcla se agitó ininterrumpidamente por 5 min en un vórtex. Las células se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min en un rotor JA 20 y se lavaron con buffer P<sub>1</sub>. Finalmente se resuspendieron en buffer imidazol-HCl pH 7 75 mM; PMSF 0,5 mM (buffer P<sub>2</sub>).

## III- PREPARACION DE SUSTRATOS RADIOACTIVOS: Síntesis de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] GTP

Se usó [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP sintetizado de acuerdo al método de Walseth y Johnson (Walseth y Johnson, 1979) modificado por Gupta et al. (Gupta et al., 1982). Este método permitió obtener nucleótido de mayor actividad específica y como resultado de la reacción más del 95% de la radioactividad se encontró asociada al ATP. El [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]

GTP se sintetizó según el método de Glynn y Chappell modificado (Glynn y Chappell, 1966; Chang et al., 1974).

#### IV- ENSAYO DE FOSFORILACION ENDOGENA

La incorporación de fosfato a proteínas endógenas se realizó en presencia de buffer fosfato pH 7 20 mM, [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP o [ $\gamma$ - $^{32}$ P] GTP 20  $\mu$ M cuando no se indica una concentración diferente (1-2  $\times 10^7$  cpm/ensayo),  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EGTA 1mM, KCl 0,1 M y las cantidades indicadas de células permeabilizadas en un volumen final de 100  $\mu$ l, con los agregados que se indican en cada caso. La mezcla se incubó durante 3 min con agitación constante. La reacción se inició con el agregado de las células se paró por el agregado de 1 ml de TCA 10% y 10  $\mu$ l de BSA 50 mg/ml. Los precipitados se resuspendieron en 0,2 ml de una solución saturada de PO<sub>4</sub>HNaNH<sub>4</sub> en agua y luego de tres lavados y reprecipitaciones se solubilizaron en HOK 1 M y el volumen completo de la solución resultante se sembró en cuadrados de 2,5 cm  $\times$  2,5 cm de papel Whatman 3M. Los papeles se secaron en estufa y se resuspendieron en viales conteniendo mezcla centelleadora.

En los casos en los que se estudió la degradación del ATP, se tomó una alícuota del sobrenadante de TCA 10%, se analizaron por cromatografía ascendente en placas de PEI-celulosa y se cuantificó la proporción de radiactividad asociada a fosfato libre.

Los ensayos realizados con el doble objeto de analizar las

proteínas fosforiladas por electroforesis en geles de poliacrilamida y cuantificar la radioactividad incorporada, se hicieron en las mismas condiciones en un volumen final de 250  $\mu$ l de los cuales se tomó una alícuota de 50  $\mu$ l que se trató como se indicó en el párrafo anterior; el resto de la mezcla de reacción se paró por el agregado de 50  $\mu$ l de buffer de solubilización conteniendo Tris HCl pH 6,8 0,325 M; SDS 10%;  $\beta$ -mercaptoetanol 25% y glicerol 50% (Dunbar, 1987). Estas muestras fueron calentadas en un baño a 95° durante 15 min y luego se centrifugaron durante 10 min a 10000rpm en microcentrifuga. El sobrenadante se recogió y se conservó a -20° hasta el momento de ser usado.

#### V-ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS ENDOGENAS FOSFORILADAS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTES

Las muestras tratadas como se indicó previamente y en presencia de azul de bromofenol fueron corridas electroforéticamente minigeles (10 cm  $\times$  10 cm  $\times$  0,8 cm) de poliacrilamida 4,5% con SDS 0,1% según Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles se calibraron usando como marcadores de peso molecular las siguientes proteínas: fosforilasa b de músculo de conejo (94000); seroalbumina bovina (67000); ovoalbúmina de clara de huevo (43000); anhídrido carbónico de eritrocito bovino (30000), inhibidor de tripsina de soja (20100) y  $\alpha$ -lactoalbumina de leche bovina (14400) o  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* (116000); fructosa 6-fosfato quinasa de músculo de conejo (84000); piruvato quinasa de músculo de pollo (58000) fumarasa de corazón porcino (48500); lactico

deshidrogenasa de músculo de conejo (36500) y triosa fosfato isomerasa de músculo de conejo (26600).

Los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue R 250 0,2% en metanol : ácido acético : agua (50:5:45) overnight a temperatura ambiente y se destiñeron en metanol : ácido acético : agua (20:5:75). Los geles teñidos se secaron bajo vacío y se autoradiografiaron. El tiempo de exposición se calculó en cada caso de acuerdo a los experimentos de incorporación endógena total correspondientes.

Las placas autoradiográficas fueron analizadas por densitometría al igual que las bandas teñidas por Coomassie. Las áreas de los picos obtenidos a partir de las autoradiografías se compararon para evaluar los cambios producidos en las bandas de fosfoproteínas. La densitometría de la tinción con Coomassie se usó para establecer coincidencias entre las bandas teñidas y las bandas fosforiladas.

PARTE A: PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION DE LAS CASEINA  
QUINASAS DEL HONGO *Mucor rouxii*

RESULTADOS

I- DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE CASEINA QUINASAS EN EL HONGO  
*Mucor rouxii*

En trabajos previos del laboratorio se demostró la existencia de actividad de caseina quinasas en la forma micelial y levaduriforme del hongo (Moreno et al., 1977).

Retomando el estudio de estas enzimas, se determino su distribución en la forma micelial del hongo. Debido a que en extractos crudos se pierde la linealidad de estas actividades respecto de la cantidad de proteína, aún a muy bajas concentraciones de proteína, fue necesario hacer algunas consideraciones para estimar cuantitativamente la distribución de esta actividad enzimática.

Se considero como fracción soluble a los sobrenadantes de 15000 g obtenidos a partir de extractos crudos de micelios y, teniendo en cuenta las actividades obtenidas con extractos crudos muy diluidos, pudimos establecer que mas del 50% de la actividad contenida en el extracto se encuentra asociada a la fracción soluble.

Con el fin de establecer una relación más ajustada entre las actividades solubles y particuladas de estas enzimas se consideró que la suma de las actividades medidas en los sobrenadantes y precipitados de 15000 g contenía la totalidad de caseína quinasa del hongo. Según este criterio aproximadamente el 65% de la actividad de caseína quinasa está presente en la fracción soluble (ver resultados en la Tabla 7)

TABLA 7 : DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE CASEINA QUINASA

Fracción	% de la actividad total
	(*)
S <sub>15</sub>	65
P <sub>15</sub>	35

(\*) Estas relaciones se obtuvieron calculando el promedio de las actividades de caseína quinasa de los sobrenadantes de 15000 g y los correspondientes sedimentos (S<sub>15</sub> y P<sub>15</sub>, respectivamente) de tres preparaciones diferentes y considerando como 100% a la suma de éstas (la actividad total de 3 gramos de micelio conteniendo 170 mg de proteína celular fue de 58500 pmoles/min).

## II- PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION DE LAS CASEINA QUINASAS SOLUBLES DE *Mucor rouxii*

### II-1) Cromatografía en DEAE-Sepharosa de los extractos solubles

El análisis cromatográfico de sobrenadantes de 15000 g obtenidos de extractos crudos de micelio de *Mucor rouxii* en DEAE-Sepharosa, permitió detectar dos tipos de actividad de caseína quinasa a las que llamamos CK I y CK II según su orden de elución (ver figura 1).

El primer pico (CK I) no se unió a la resina mientras que el segundo (CK II) eluyó entre 0,18 y 0,25 M de NaCl, parcialmente separado de la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>2</sub> que eluyó a concentraciones levemente inferiores de NaCl. En algunas preparaciones, se observó además, la aparición de un tercer pico con menor actividad que los ya mencionados que eluyó a 0,05 M de NaCl y a esta especie se la llamó CK I\*. Ninguna de estas actividades se modificaron cuando se ensayaron en presencia de AMP<sub>2</sub> o GMP<sub>2</sub> 10 μM.

### II-2) Efecto de la heparina sobre las actividades de caseína quinasa

Ha sido demostrado en experimentos in vitro que la heparina es el inhibidor más potente y selectivo para las caseína quinasas de tipo 2 (Hathaway et al., 1980) y este criterio es usado de rutina

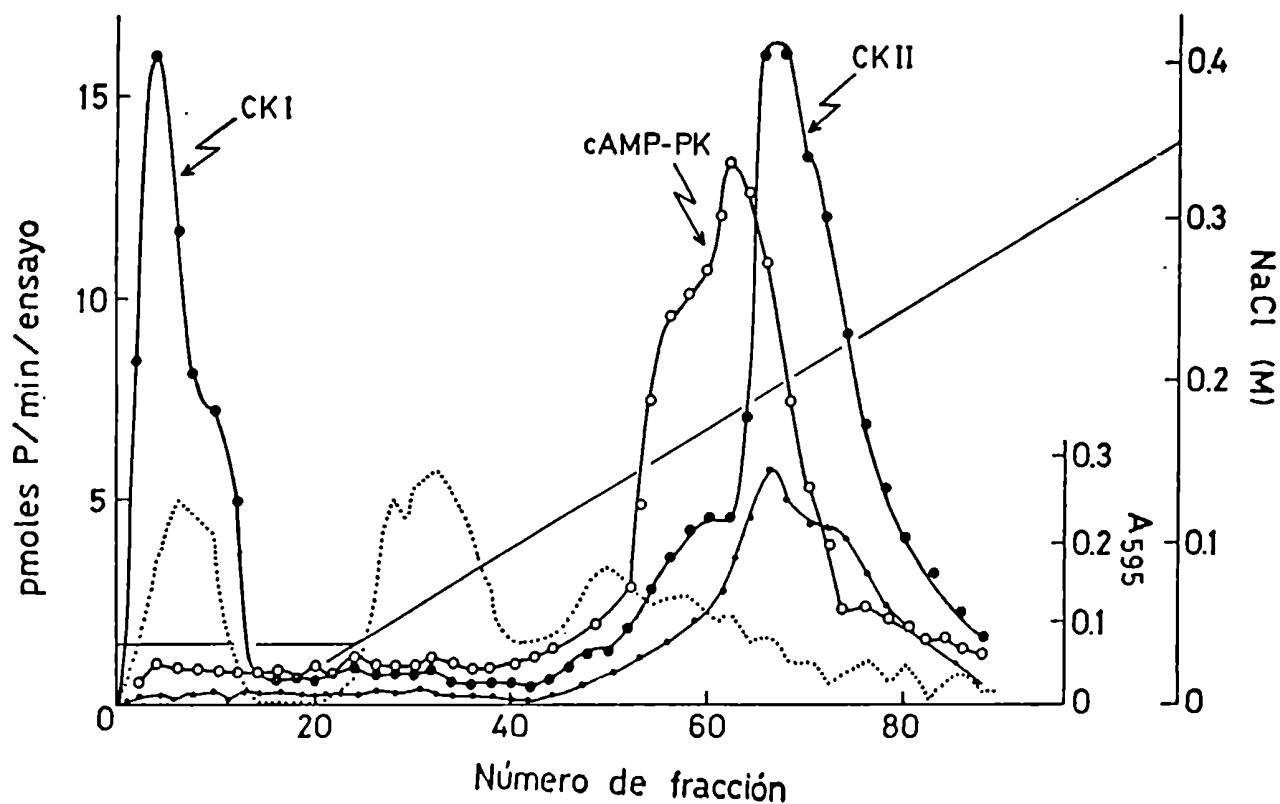


FIGURA 1: Cromatografía en DEAE-Sepharosa de las actividades de caseína quinasa

La cromatografía se desarrolló como se indica en Materiales y métodos aplicando un gradiente de 0 a 0,4 M de NaCl.

Se ensayaron en alícuotas de 50  $\mu$ l las siguientes actividades: caseína quinasa (-●-); proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> (-○-) y fosforilación endógena (- - -) según se detalla en Materiales y métodos.

La proteína está expresada como la absorbancia a 595 nm (...) de alícuotas de 5  $\mu$ l de las fracciones pares en un volumen final de 1,5 ml de reactivo de Bradford.



para clasificar las caseína quininas en los tipos 1 y 2. Por esta razón, se estudió la sensibilidad a la heparina de las dos actividades de caseína quinasa separadas por cromatografía en DEAE-Sepharosa. Para ello, alícuotas de los conjuntos de fracciones activas e indicadas como CK I y CK II se ensayaron, en las condiciones previamente establecidas como óptimas, en presencia de distintas concentraciones de heparina.

La figura 2 muestra que CK II fue inhibida por heparina con un  $IC_{50}$  de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  mientras que CK I resultó prácticamente insensible a este compuesto hasta 25  $\mu\text{g/ml}$ . Se estudió esta misma propiedad en la enzima CK I\* que resultó insensible a heparina a estas mismas concentraciones.

De acuerdo a la sensibilidad a heparina y al perfil de elución en DEAE-Sepharosa, las enzimas CK I y CK I\* se clasificaron en forma tentativa como caseína quininas de tipo 1 y a la enzima CK II como caseína quinasa de tipo 2. Para confirmar esta clasificación se estudiaron otras características que se detallan a continuación.

### II-3) Cromatografía en columnas de fosfocelulosa

Con el fin de continuar la caracterización de las caseína quininas de *Mucor rouxii* se sometieron las actividades separadas por cromatografía en DEAE-Sepharosa a un segundo paso de purificación.

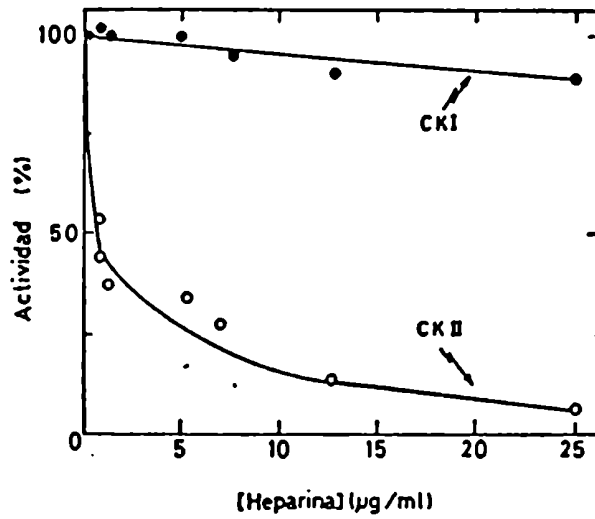


FIGURA 2: Efecto de la heparina sobre las actividades de CK I y CK II

Alícuotas de las fracciones enzimáticas de caseína quinasa I, CK I (-●-) y caseína quinasa II, CK II (-○-), de 25 y 10 µl respectivamente, obtenidas del paso en DEAE-Sepharosa, fueron ensayadas en presencia de concentraciones crecientes entre 0 y 25 µg/ml de heparina en las condiciones del ensayo estándar.

Las caseína quinasas de tipo 1 y de tipo 2 de otros organismos (Haythaway y Traugh, 1982) se unen a columnas de fosfocelulosa a pHs próximos a 7. Se introdujo entonces este paso cromatográfico en la purificación de estas enzimas.

Según se observa en la figura 3A la enzima CK I se unió a columnas de fosfocelulosa a pH 7,5 y eluyó a una concentración de NaCl de aproximadamente 0,4 M.

La enzima CK II presentó un comportamiento diferente según que la cromatografía se realizara en condiciones de baja o alta fuerza iónica. Cuando la concentración de ión monovalente (NaCl) de las fracciones de la columna de DEAE-Sepharosa con actividad de CK II se llevó a 0,25 M antes de su aplicación, la enzima se adhirió fuertemente a la fosfocelulosa y a pH 7,5 eluyó a aproximadamente 0,5 M de NaCl. El perfil de elución se muestra en la figura 3B.

Como resultado de este paso se obtuvieron preparaciones con actividades específicas promedio de 1400 pmoles de fosfato incorporados/min/mg de proteína para CK I y de 10000 pmoles de fosfato incorporados/min/mg de proteína para CK II. Esto representa una purificación de 20 veces para CK I y de 300 veces para CK II (ver Tabla 8). La peculiaridad que presenta la enzima CK II de unirse a un intercambiador aniónico y a uno catiónico al mismo pH se refleja en la diferencia en la purificación obtenida para las dos enzimas.

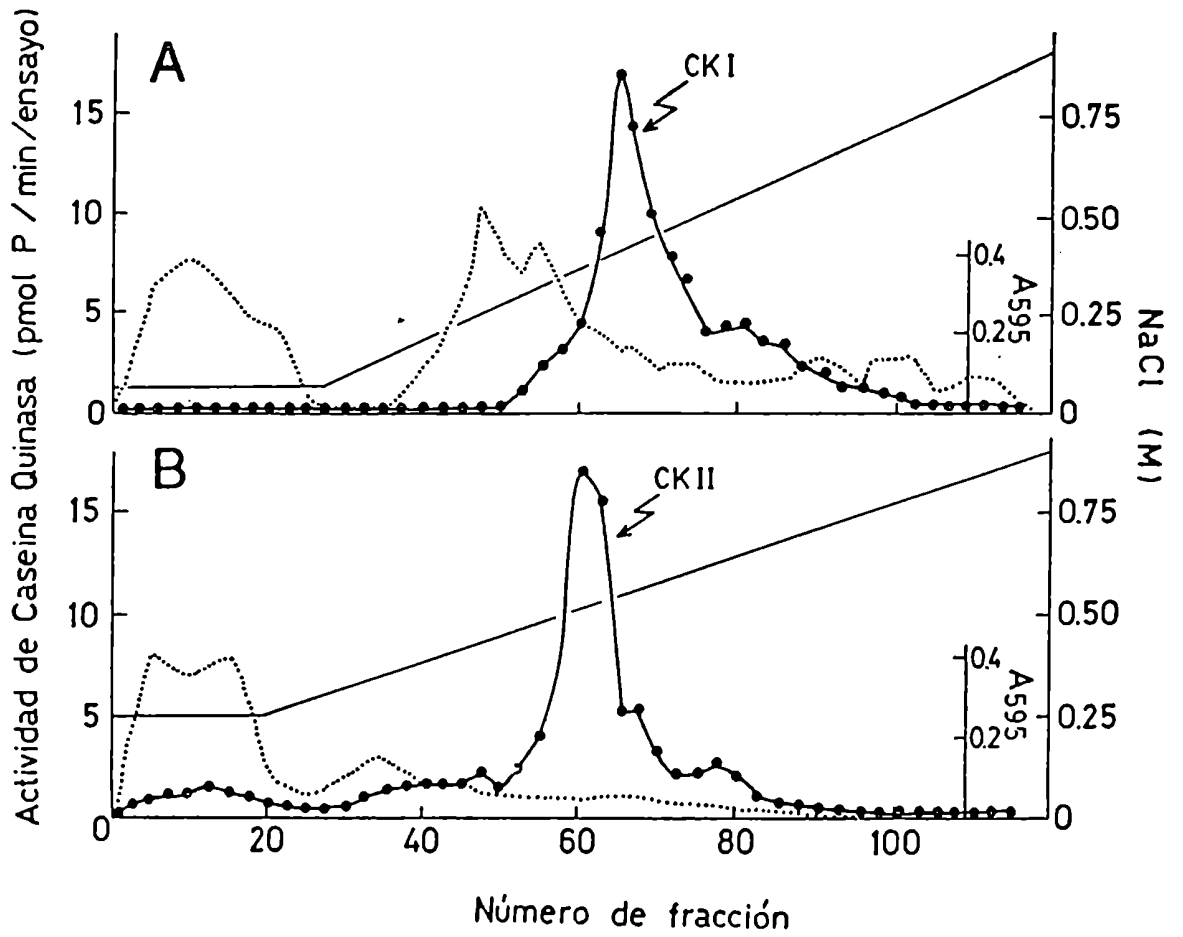


FIGURA 3: Análisis cromatográfico de CK I (A) y CK II (B) en columnas de tosofocelulosa

Las fracciones obtenidas en DEAE-Sepharosa con actividad de caseína quinasa I (A) o caseína quinasa II (B) se sembraron en columnas de tosofocelulosa y se procesaron según se indica en Materiales y métodos. Se ensayaron alícuotas de 50  $\mu$ l para la actividad de caseína quinasa (-●-). La proteína se ensayó como se indica en la figura 1 en alícuotas de 20  $\mu$ l.

Sin embargo, cuando las fracciones con actividad de CK II se dializaron para disminuir su fuerza iónica y la cromatografía se

TABLA 8: PURIFICACION DE LAS CASEINAS QUINASAS CK I Y CK II

Paso	Proteína [mg]	Actividad especifica [pmol PO <sub>4</sub> / min/mg]	Actividad total [pmol PO <sub>4</sub> / min]	Purificación (veces)	Rendi- miento (%)
S <sub>15</sub>	1400	59,1* 40,3**	82684 56434	1 1	100 100
DEAE-Sepharosa					
CK I	264	247,4	65311	4,2	79
CK II	128	354,1	45326	8,8	80,3
Fosfocelulosa					
CK I	28	1280,5	35854	21,7	43,4
CK II	5	11192,3	32458	277,7	57,5

\* actividad medida en presencia de 12,5 µg/ml de heparina (se tomó como 100% de CK I).

\*\* actividad total - actividad medida en presencia de 12,5 µg/ml de heparina (se tomó como 100% de CK II).

Los datos presentados en esta tabla fueron obtenidos de una preparación realizada a partir de 30 g de micelio según el procedimiento de purificación típico descrito en Materiales y Método (sección IV) desarrolló a pH 7,5 en ausencia de iones monovalentes, la enzima

se distribuyó en dos poblaciones: entre el 65 y el 80% de la actividad apareció en el percolado, mientras que el resto se unió a la resina. Este comportamiento cromatografico de CK II en columnas de fosfocelulosa puede explicarse por la formación de agregados enzimáticos que se destruyen a alta fuerza iónica, de

forma tal que cuando está desagregada se exponen grupos de la proteína capaces de interactuar con el intercambiador catiónico. La existencia de grandes agregados con estructura definida ha sido descrita para algunas caseína quinasas de tipo 2 (Glover, 1986). Este proceso de agregación es reversible según se aumente o disminuya la fuerza iónica de la preparación; sin embargo, cuando la preparación enzimática obtenida de DEAE-Sepharosa se concentró por salting out producido por diálisis contra una solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en buffer A y se dializó contra este mismo buffer antes de la siembra, aunque la fuerza iónica se aumentara hasta 0,25 M de NaCl, la actividad de CK II se repartió en un 75% que percoló y un 25% que se unió a la resina. Por lo tanto, para obtener la enzima desagregada, se evitó la concentración por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en la rutina de purificación.

Para corroborar la hipótesis de la formación de agregados, se estudió la sedimentación de esta enzima en gradientes de sacarosa isocinéticos a baja y a alta fuerza iónica.

#### II-4) Sedimentación de CK I y CK II en gradientes de sacarosa

Con el fin de determinar los coeficientes de sedimentación de CK I, CK I\* y CK II y la probable agregación de esta última a baja concentración de iones se sometió a estas enzimas a centrifugación en gradientes de sacarosa.

La figura 4A muestra la posición de la enzima CK I y de las proteínas marcadoras en el gradiente, luego de la centrifugación. El coeficiente de sedimentación determinado por interpolación en la recta que relaciona las distancias recorridas por las proteínas marcadoras con sus coeficientes de sedimentación, fue de 3,5 S.

Se determinó el coeficiente de sedimentación de la especie CK I\* obtenida en algunas preparaciones que resultó de 2,7 S (ver figura 5).

Como se muestra en la figura 6, cuando CK II se centrifugó en gradientes de sacarosa preparados a baja fuerza iónica, la actividad enzimática se recuperó en el fondo del tubo o se repartió en la zona pesada del gradiente. Cuando la concentración de iones monovalentes de la preparación enzimática y del gradiente se mantuvo en 0,25 M de NaCl, CK II sedimentó como un pico único de 7,4 S (ver figura 4B). Este resultado confirma la existencia de agregados que involucran esta actividad enzimática.

Para estudiar la naturaleza de estos agregados se investigó si alguno de los sustratos endógenos era responsable de la agregación. Se analizaron entonces los sustratos fosforilados por CK II que acompañaban la preparación enzimática en gradientes de sacarosa de baja fuerza iónica. Con este fin, una alícuota de una preparación de CK II proveniente de DEAE-Sepharosa se fosforiló en presencia de [ $^{32}$ P] ATP y el resultado de la incubación se sembró en el gradiente y se analizó la radioactividad que acompañaba a

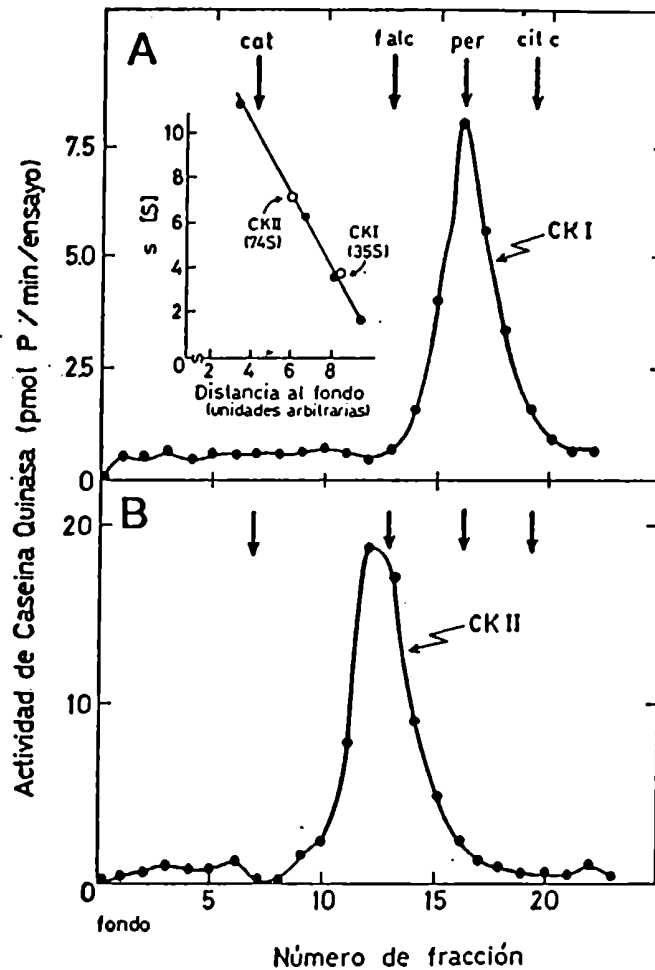


FIGURA 4: Centrifugación en gradientes de sacarosa isocinéticos de CK I (A) y CK II (B)

Huestras con actividad de caseína quinasa I (A) y caseína quinasa II (B) obtenidas luego del paso cromatográfico en tosoquelulosa se mezclaron con marcadores de coeficiente de sedimentación y se sembraron en gradientes lineales de sacarosa 5 a 20% en buffer A (A) o en buffer A hecho 0,25 M en NaCl (B) y fueron centrifugadas como se indicó en Materiales y métodos. Se ensayó la actividad de caseína quinasa en alícuotas de 80  $\mu$ l (-●-). Se indica la posición de los marcadores: catalasa (cat); fosfatasa alcalina (f. alc.); peroxidasa (per) y citocromo c (cit c).

Los coeficientes de sedimentación de las dos proteínas con actividad de caseína quinasa, CK I y CK II, se calculó por interpolación en la recta que resulta de graficar los coeficientes de sedimentación de los marcadores respecto de su migración.



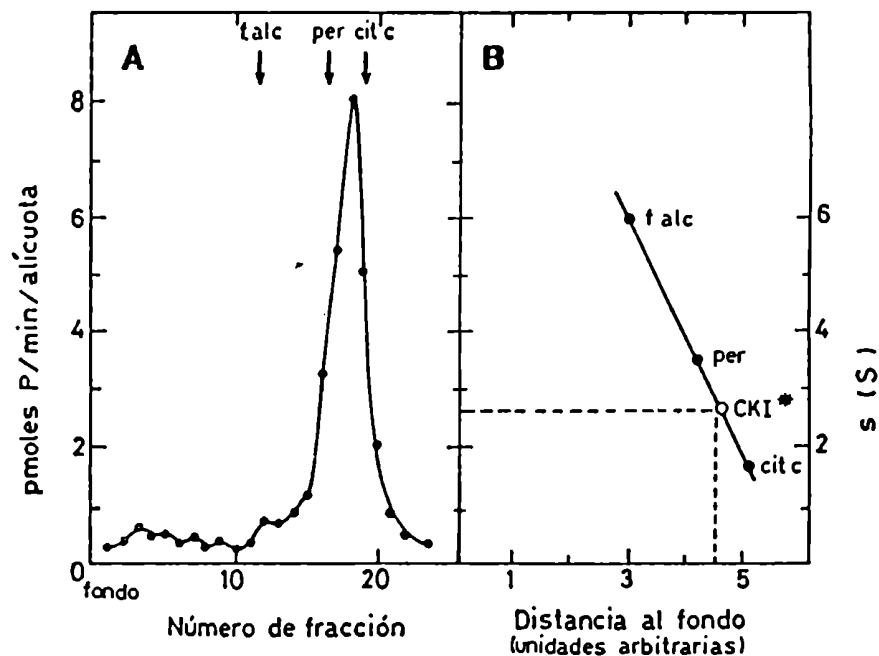


FIGURA 5: Centrifugación en gradiente de sacarosa de CK I\*

Una alícuota con la actividad de caseína quinasa I\* obtenida por cromatografía en DEAE-Sepharosa se sembró junto con marcadores de coeficiente de sedimentación: fosfatasa alcalina (f. alc.); peroxidasa (per) y citocromo c (cit c), en un gradiente lineal 5 a 20% de sacarosa en buffer A. Se centrifugó como se indica en Materiales y métodos. Se midió la actividad de caseína quinasa en alícuotas de 80  $\mu$ l (-o-). La actividad de los marcadores se midió en alícuotas apropiadas y los máximos se indican con flechas en la parte superior del gráfico. El coeficiente de sedimentación de CK I\* se determinó por interpolación en la recta que queda determinada relacionando los coeficientes de sedimentación de los marcadores con su velocidad de migración representada como la distancia al fondo del tubo.

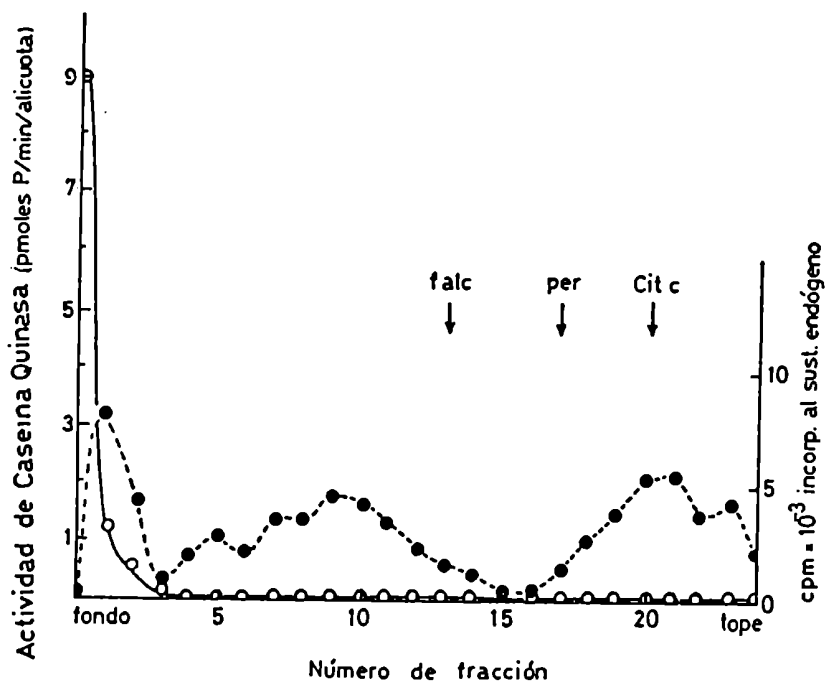


FIGURA 6: Análisis por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa de los sustratos endógenos que coeluyen con CK II en DEAE-Sepharosa.

Una alícuota con la actividad de CK II obtenida de DEAE-Sepharosa se incubó con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP en las condiciones establecidas para ensayar caseína quinasa en ausencia de sustrato exógeno. La mezcla de incubación se sembró sobre un gradiente lineal de sacarosa 5 a 20% en buffer A. En un gradiente similar se sembró otra alícuota de esta preparación de CK II, en presencia de marcadores de coeficiente de sedimentación: fosfatasa alcalina (f. alc.); peroxidasa (per) y citocromo c (cit c). Se centrifugó a 35000 rpm durante 16 horas en un rotor SW 55 Ti y luego se fraccionó el contenido de los tubos.

Alícuotas de 80  $\mu$ l de las fracciones del gradiente que contenía la mezcla incubada se sembraron en papeles de fosfocelulosa; se lavaron cuatro veces en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 75 mM y se contó la radioactividad unida al papel (---). Las fracciones del gradiente que contenía la enzima no incubada se ensayaron para actividad de caseína quinasa (-o-) y de los marcadores de coeficiente de sedimentación cuyos máximos se indican con flechas.

las fracciones. Como se observa en la figura 6 , si bien hay numerosos sustratos acompañando la preparación, ninguno de ellos acompañó al pico de la actividad enzimática; por lo tanto, no hay sustratos endógenos formando parte de estos agregados.

#### II-5) Determinación de los radios de Stokes y estimación de pesos moleculares y coeficientes friccionales

Los radios de Stokes de las caseína quinasas de *Mucor rouxii* se determinaron por filtración en gel en columnas de Sephacryl S 300. Cuando se cromatografió CK II, la columna se equilibró con buffer hecho 0,25 M en NaCl para evitar la formación de agregados. Los radios obtenidos fueron de 3,0 nm para CK I y de 4,8 nm para CK II (ver figura 7).

Los pesos moleculares estimados en base a los radios de Stokes y los coeficientes de sedimentación (Siegel y Monty, 1966) de cada una de las proteínas en estudio son de 44300 para CK I, 150000 para CK II. De acuerdo a los coeficientes friccionales calculados, las caseína quinasas solubles del hongo *Mucor rouxii* son globulares. En la Tabla 9 se resumen los parámetros moleculares de CK I y CK II.

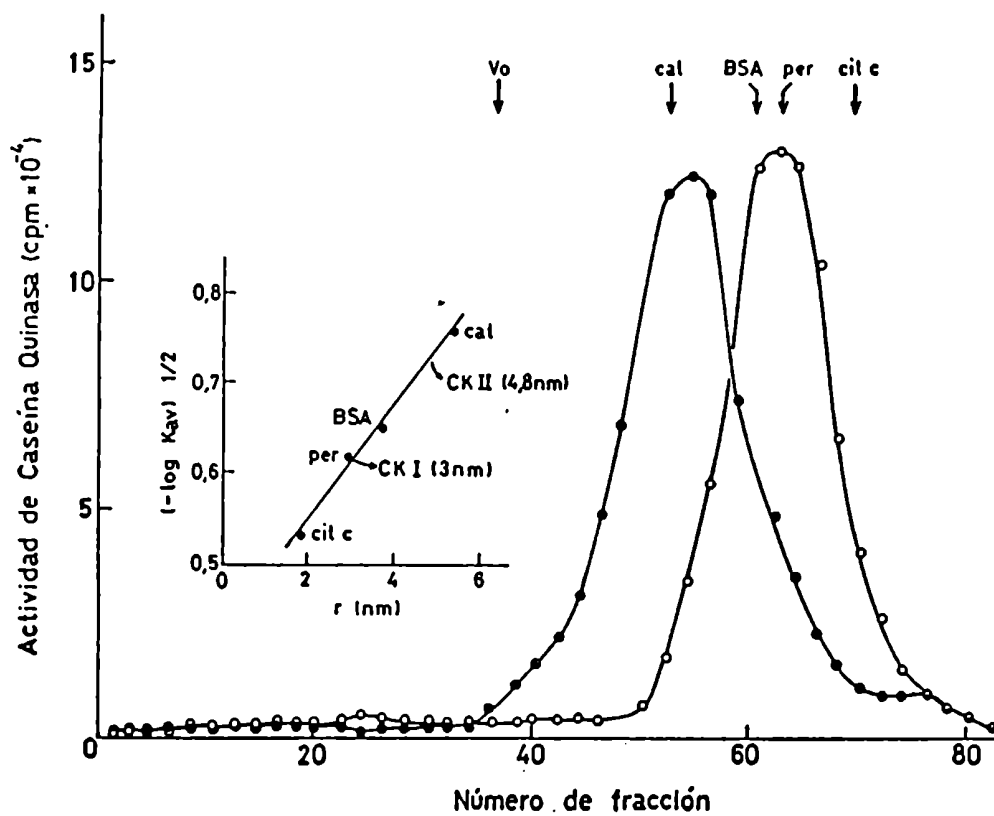


FIGURA 7: Filtración en columnas de Sephacryl S-300 de las caseína quinasa CK I y CK II.

Una alícuota de una preparación de CK I con una actividad de 400000 pmoles/min proveniente del paso de DEAE-Sepharosa se sembró en una columna de Sephacryl S-300 (1x41 cm). La filtración se desarrolló como se indicó en Materiales y métodos. Alícuotas de las fracciones eluidas se ensayaron para actividad de caseína quinasa (-o-).

Una alícuota de una preparación de CK II (400000 pmoles/min) proveniente del paso de DEAE-Sepharosa se sembró en la misma columna a una concentración salina de 0,25 M de NaCl. La filtración se desarrolló como se indicó en Materiales y métodos y alícuotas adecuadas de las fracciones obtenidas se ensayaron para actividad de caseína quinasa (-o-).

TABLA 9: DETERMINACION DE LOS PARAMETROS MOLECULARES DE LAS  
CASEINA QUINASAS DE *Mucor rouxii*

Actividad	a [nm]	$s_{20,w}$ [S]	PM [Daltones]	f/f <sub>0</sub>
CKI	3,0	3,5	44300	1,25
CKII	4,8	7,4	150000	1,28

Los valores de los radios de Stokes (a) y de los coeficientes de sedimentación ( $s_{20,w}$ ) se obtuvieron como se indicó en Materiales y métodos en las secciones VIII-1 y VIII-2, respectivamente. Los pesos moleculares (PM) y los coeficientes friccionales se calcularon de acuerdo a lo indicado en las secciones VIII-3 y VIII-4 de Materiales y métodos.

#### II-5) Especificidad para el sustrato fosforilable y dependencia de catión divalente

Se investigó la capacidad de CK I, CK II y CK I\* para fosforilar proteínas usadas comúnmente como sustratos de proteína quinasas. La tabla 10 muestra que CK I, CK II y CK I\* prefieren a las

proteínas ácidas, caseína y fosvitina, como sustratos aceptores de fosfatos.

La velocidad máxima con caseína como sustrato se obtuvo con 2,5 mg/ml para CK I y CK II (ver figura 8).

Las actividades de las enzimas CK I y CK II fueron absolutamente dependientes de magnesio y se alcanzó máxima actividad con  $MgCl_2$  10 mM para CK I y con  $MgCl_2$  20 mM para CK II (ver figura 9).

Ninguna de las dos enzimas se inhibió por aumento de la concentración de  $MgCl_2$  hasta 100 mM.

**TABLA 10: ESPECIFICIDAD PARA EL SUSTRATO FOSFORILABLE**

Sustrato	Cantidad ( $\mu g/100\mu l$ )	Actividad de caseína quinasa (pmoles P/min)		
		CK I	CK I*	CK II
Caseína	500	19,3	3,7	3,8
Fosvitina	500	14,5	1,6	4,0
Protamina	150	0,4	0,1	
Histona	150		0,1	
Peptido de Kemp	12,5			0,0
Fosforilasa b	400		0,0	

Se usó como fuente de enzima preparaciones de CK I y CK II provenientes del paso de fosfocelulosa y una preparación de CK I\* provenientes de DEAE-Sepharosa. Los ensayos se realizaron en las condiciones establecidas como óptimas usando caseína como sustrato (ver Materiales y métodos, sección III). Los valores fueron corregidos restando la fosforilación endógena que fue inferior a lo detectable para CK I, menor de 0,2 pmoles/min para CK I\* y menor de 0,4 pmoles/min para CK II.

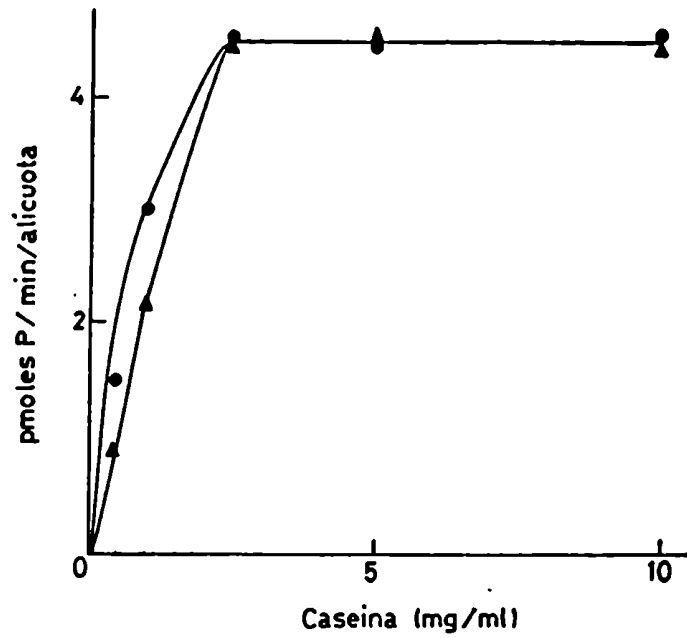


FIGURA 8: Curva de sustrato proteico

Se ensayó la actividad de caseína quinasa de alícuotas conteniendo 3  $\mu\text{g}$  de proteína de una preparación de CK I obtenida de fosfoelulosa (●) y 0,4  $\mu\text{g}$  de proteína de una preparación de CK II obtenida de fosfoelulosa (▲) en presencia de distintas concentraciones de caseína total defosforilada según el método de Reinmann.

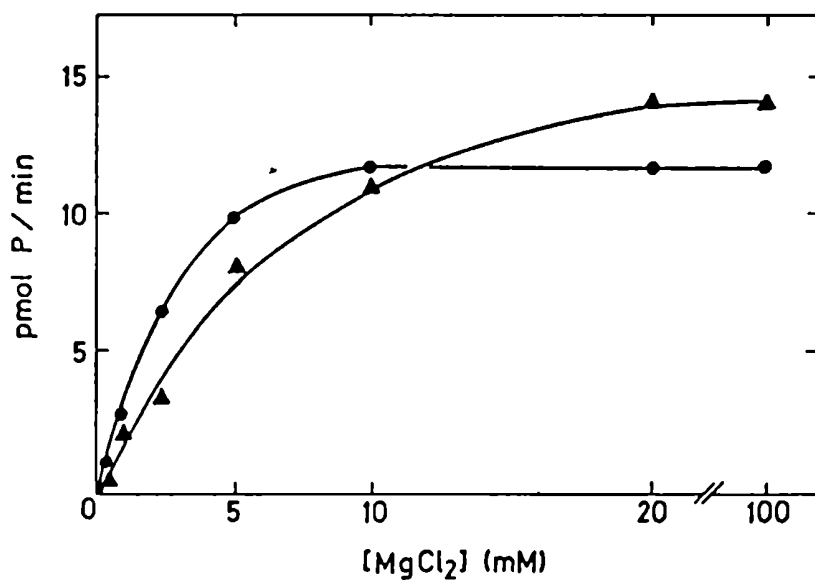


FIGURA 9: Efecto de la concentración de  $MgCl_2$  sobre las actividades de CK I y CK II.

La actividad de caseína quinasa se determinó en presencia de concentraciones crecientes de  $MgCl_2$  sobre alícuotas conteniendo  $9 \mu g$  de proteína de una preparación de CK I (●) y  $1 \mu g$  de proteína de una preparación de CK II (▲), ambas del paso de fosfocelulosa, manteniendo constantes las otras condiciones del ensayo según lo establecido en Materiales y métodos.



### II-7) Efecto de iones monovalentes

Para la mayoría de las caseína quinazas estudiadas se reportó un efecto estimulador de KCl en un rango entre 140 y 250 mM (Hathaway y Traugh, 1982). En la figura 10 se muestran los efectos de concentraciones variables de KCl hasta 500 mM. Se observó una leve estimulación sobre la actividad de CK II entre 200 y 250 mM (ver figura 10B). Por el contrario, CK I y CK I\* fueron fuertemente inhibidas por KCl, obteniéndose un 50% de inhibición con 100 mM de esta sal para CK I (ver figura 10A) y con 25 mM para CK I\* . Los mismos resultados se obtuvieron cuando se usó NaCl en lugar de KCl.

### II-8) Especificidad para nucleótidos dadores del grupo fosfato

Las enzimas CK I y CK II utilizaron ATP como sustrato dador de fosfatos. Los valores de las  $K_m$  aparentes para el ATP fueron de 40  $\mu$ M para CK I y de 10  $\mu$ M para CK II (ver figuras 11A y 11B) . La enzima CK II fue también capaz de usar GTP como dador de grupos fosfato con un valor de  $K_m$  aparente de 40  $\mu$ M (ver figura 11C). Las velocidades máximas alcanzadas por CK II con los dos nucleótidos fueron similares. En cambio, el GTP resultó un sustrato pobre para CK I, obteniéndose con 400  $\mu$ M de este nucleótido una velocidad 10 veces inferior a la máxima alcanzada con ATP. Un resumen de estos resultados se muestra en la tabla 11.

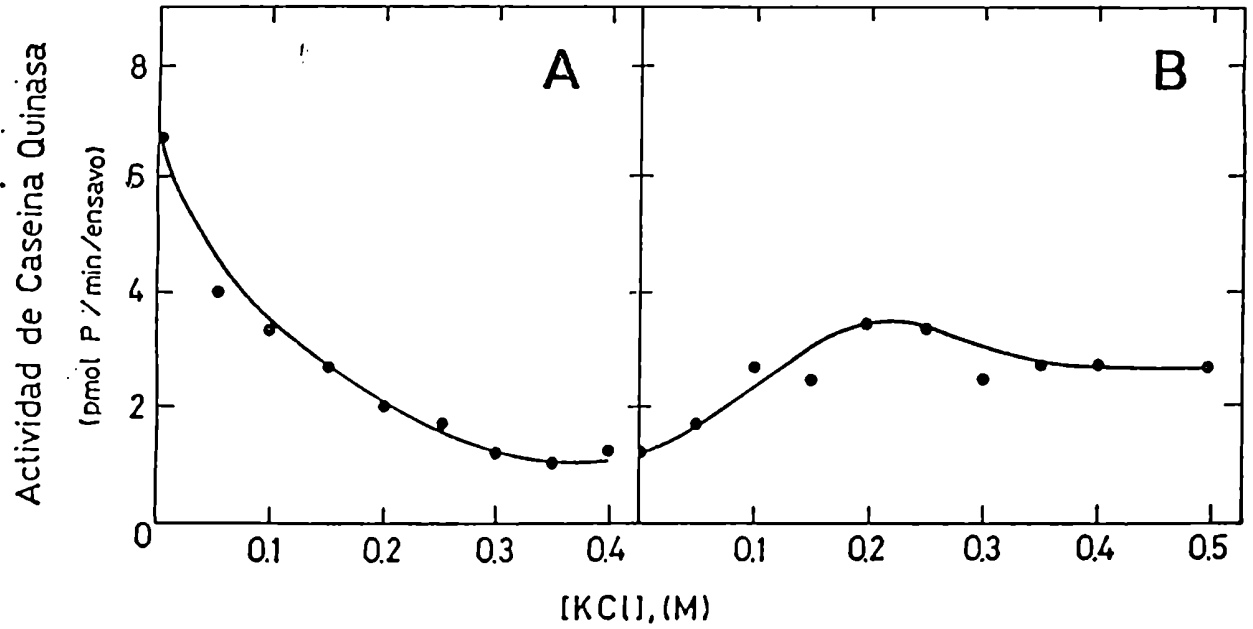


FIGURA 10: Influencia de la concentración de KCl sobre las actividades de CK I y CK II

Se ensayó la actividad de caseína quinasa sobre alícuotas conteniendo 5  $\mu\text{g}$  de proteína de una preparación de CK I (A) y 0,1  $\mu\text{g}$  de proteína de una preparación de CK II, ambas del paso de fosfocelulosa, en presencia de concentraciones crecientes de KCl entre 0 y 0,5 M.

TABLA 11: INFLUENCIA DEL NUCLEÓTIDO DADOR DE FOSFATOS SOBRE LA  $V_{m\acute{a}x}$  DE LAS ENZIMAS CK I Y CK II

Nucleótido (NTP)	CK I		CK II	
	$K_m$ [ $\mu$ M]	$\frac{V_{m\acute{a}x} \text{ NTP}}{V_{m\acute{a}x} \text{ ATP}}$	$K_m$ [ $\mu$ M]	$\frac{V_{m\acute{a}x} \text{ NTP}}{V_{m\acute{a}x} \text{ ATP}}$
ATP	40	1,00	10	1,00
GTP	ND	0,14*	40	1,20

Se usó como fuente de enzima preparaciones de CK I y CK II provenientes del paso de fosfocelulosa. Los valores de  $K_m$  se obtuvieron como se indicó en Materiales y métodos (sección VII). Los valores de velocidades máximas de CK I y CK II con cada uno de los nucleótidos se midieron utilizando alícuotas idénticas de cada preparación con concentraciones saturantes de ATP (400  $\mu$ M para CK I y 200  $\mu$ M para CK II) y GTP (200  $\mu$ M para CK II) excepto para el valor obtenido para CK I con GTP (la relación se indica con \*) en que no se alcanzó la saturación y se eligió la velocidad obtenida con GTP 400  $\mu$ M.

#### II-9) Identificación de los aminoácidos fosforilados en caseína por CK I y CK II

Se fosforiló caseína usando ATP como dador de fosfato y se analizaron los aminoácidos fosforilados por hidrólisis parcial de la caseína fosforilada según se describió en "Materiales y

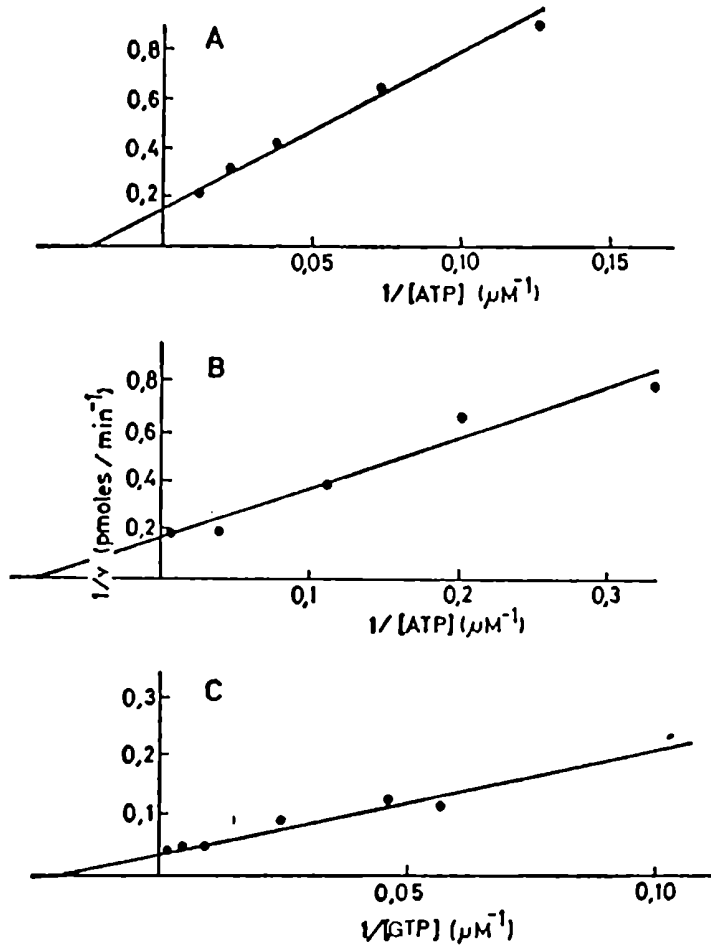


FIGURA 11: Determinación de las  $K_m$  de CK I y CK II para los nucleótidos dadores del grupo fosfato: ATP y GTP.

Alicuotas apropiadas de preparaciones de CK I (A) y CK II (B), ambas provenientes del paso de fosfocelulosa, fueron ensayadas usando caseína como sustrato fosforilable en presencia de concentraciones variables de ATP entre 4 y 400  $\mu\text{M}$ . Una alícuota idéntica de la preparación de CK II se ensayó usando caseína como sustrato fosforilable en presencia de GTP entre 4 y 400  $\mu\text{M}$  (C).

La actividad total de ( $\tau$ - $^{32}\text{P}$ )ATP (A y B) y ( $\tau$ - $^{32}\text{P}$ )GTP (C) se mantuvo constante.

En la figura se graficaron las inversas de las concentraciones de sustrato versus las inversas de las velocidades obtenidas.

métodos". Debido a que en nuestras condiciones experimentales no fue posible separar fosfotreonina de fosfotirosina a pH 1,9; fue necesario realizar una electroforesis a pH 3,5 en una segunda dimensión para identificar claramente a los fosfoaminoácidos radioactivos.

La figura 12A muestra que la fosforilación de caseína por CK I ocurre principalmente sobre residuos de serina y con bajísima ocurrencia en residuos de treonina sólo apreciable por sobreexposición de la placa. La figura 12B muestra que CK II fosforila a la caseína tanto en serina como en treonina con preferencia por residuos de serina.

#### II-10) Influencia de las poliaminas sobre CK I y CK II

Las poliaminas se encuentran ampliamente distribuidas entre los organismos vivientes desde las bacterias hasta los mamíferos y juegan un papel importante en diversas funciones celulares (Clo et al., 1979; Mach et al., 1982; Marshall et al., 1979; Stevens, 1981; Tabor y Tabor, 1976). En *Mucor rouxii* se demostró que las poliaminas son necesarias para la expresión de distintos patrones de crecimiento (Ruiz-Herrera y Cano, 1987).

La mayoría de las caseína quinasas de tipo 2 estudiadas se estimulan por poliaminas (Hathaway y Traugh, 1982; Katon et al., 1985; Leiderman et al.; 1985), mientras que la actividad de las caseína quinasas de tipo 1 no se ve afectada por estos compuestos

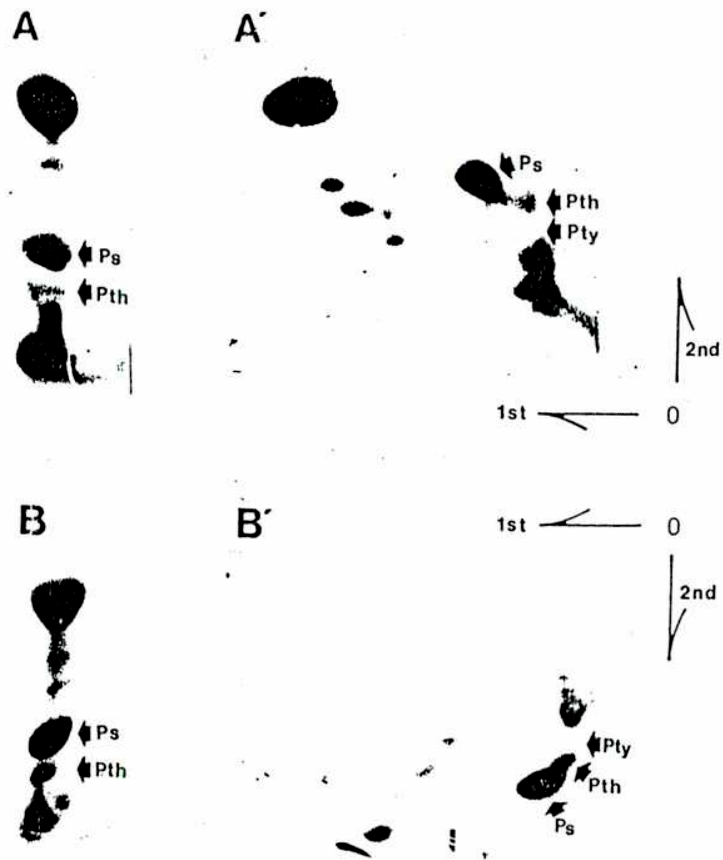


FIGURA 12: Identificación del aminoácido fosforilado por CK I y CK II

Se realizaron electroforesis monodimensionales (A y B) y bidimensionales (A' y B') de hidrolizados de caseína previamente fosforilada por CK I y CK II, según se indica en Materiales y métodos. Se muestra el resultado de la placa revelada autorradiográficamente. Las flechas indican la posición de los fosfoaminoácidos usados como estándar, visualizados por tinción con ninhidrina (Ps: fosfoserina; Pth: fosfotreonina; Pty: fosfotirosina). En la electroforesis bidimensional mostrada en B', la mancha correspondiente al tostato radioactivo (la más conspicua en A') no se observa, pues corrió más allá de la placa en la segunda dimensión.

(Hathaway y Traugh, 1982). La figura 13A muestra que CK I tiene un comportamiento no típico ya que se inhibe fuertemente por concentraciones milimolares de espermina y espermidina. La actividad de CK II aumentó en presencia de espermina y espermidina obteniéndose una estimulación de 4 veces con 5 mM espermina y de 2,5 veces con 10 mM espermidina (ver figura 13B). Esta estimulación se observó en un amplio rango de concentraciones de  $MgCl_2$  (10-100 mM), lo que parece indicar que las poliaminas tienen efecto por sí mismas y no por reemplazo del catión divalente.

### III- CARACTERIZACION DE LAS CASEINA QUINASAS PARTICULADAS

Dada la importancia cuantitativa de la actividad de caseína quinasa asociada a la fracción particulada, se decidió estudiar en esta fracción las propiedades más distintivas de las caseína quinasas solubles del hongo: elución en DEAE-Sepharosa; sensibilidad a la heparina y coeficiente de sedimentación.

Para solubilizar la actividad asociada a la fracción particulada se utilizaron en forma secuencial, altas concentraciones de sal (NaCl 1 M) y un detergente no iónico como se indicó en "Materiales y métodos". Como se describió previamente, aproximadamente un 42% del total de la actividad de caseína quinasa se encuentra asociada a la fracción particulada. Como se observa en la tabla 12, el 66%

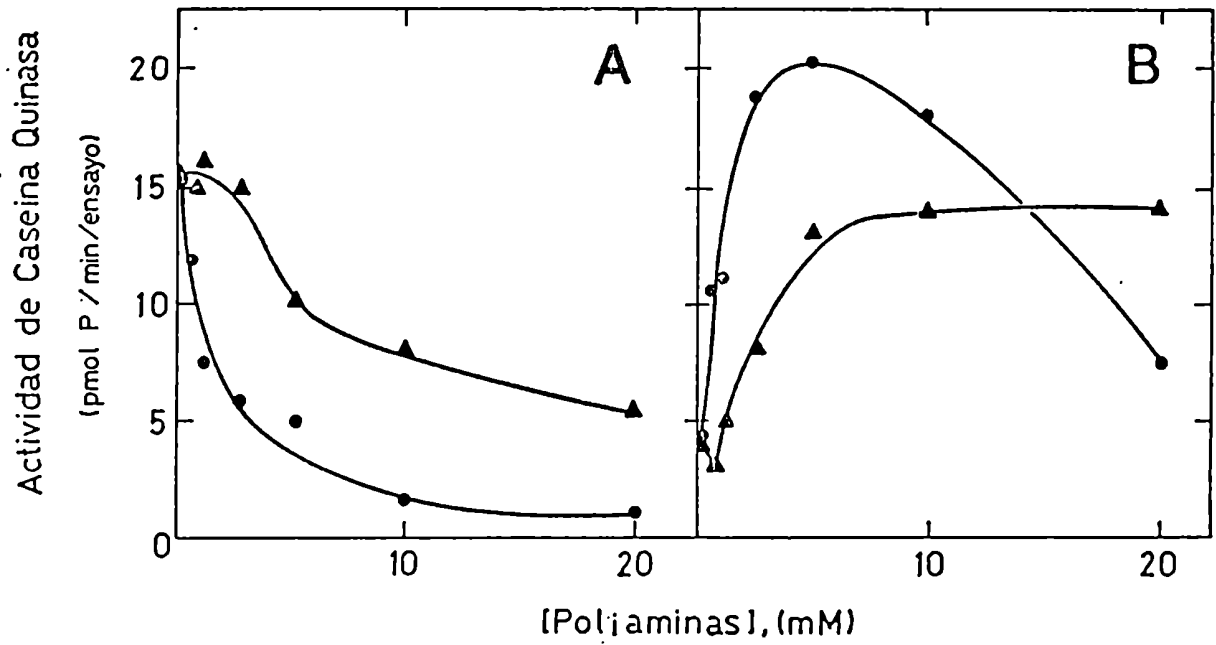


FIGURA 13: Influencia de la concentración de poliaminas sobre la actividad de CK I (A) y CK II (B).

La actividad de caseína quinasa fue ensayada en alícuotas apropiadas de la fracción de fosfocelulosa de CK I y CK II en presencia de concentraciones variables de espermidina (▲) o espermina (●). Las condiciones de ensayo fueron las del ensayo estándar excepto que se usó MgCl<sub>2</sub>, 40 mM.



de la actividad particulada se solubilizó con alta sal ( $S_{NaCl}$ ) y del 34% restante sólo la mitad se solubilizó con Nonidet P-40 ( $S_{Det}$ ).

TABLA 12: DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE CASEINA QUINASA PARTICULADA

Fracción	Actividad total (%)	Actividad relativa +/- heparina (%)
$S_{NaCl}$	66 <sup>a</sup>	98
$S_{Det}$	17 <sup>a</sup>	91
$F_{Det}$	17 <sup>a</sup>	109

a- Se tomó la suma de los tres valores como 100%.

Las diferentes fracciones se obtuvieron como se indica en Materiales y métodos (sección V). La sensibilidad de la actividad de caseína quinasa a heparina se determinó usando una concentración de 12,5  $\mu\text{g/ml}$  de este compuesto en una mezcla de incubación estándar.

Las actividades solubilizadas por sal o por detergente fueron indistinguibles en cuanto a las propiedades estudiadas. Ambas percolaron en DEAE-Sepharosa (ver figura 14); resultaron no inhibibles por heparina 12,5  $\mu\text{g/ml}$  (ver tabla 12) y mostraron un coeficiente de sedimentación de 3,2 S (ver figura 15).

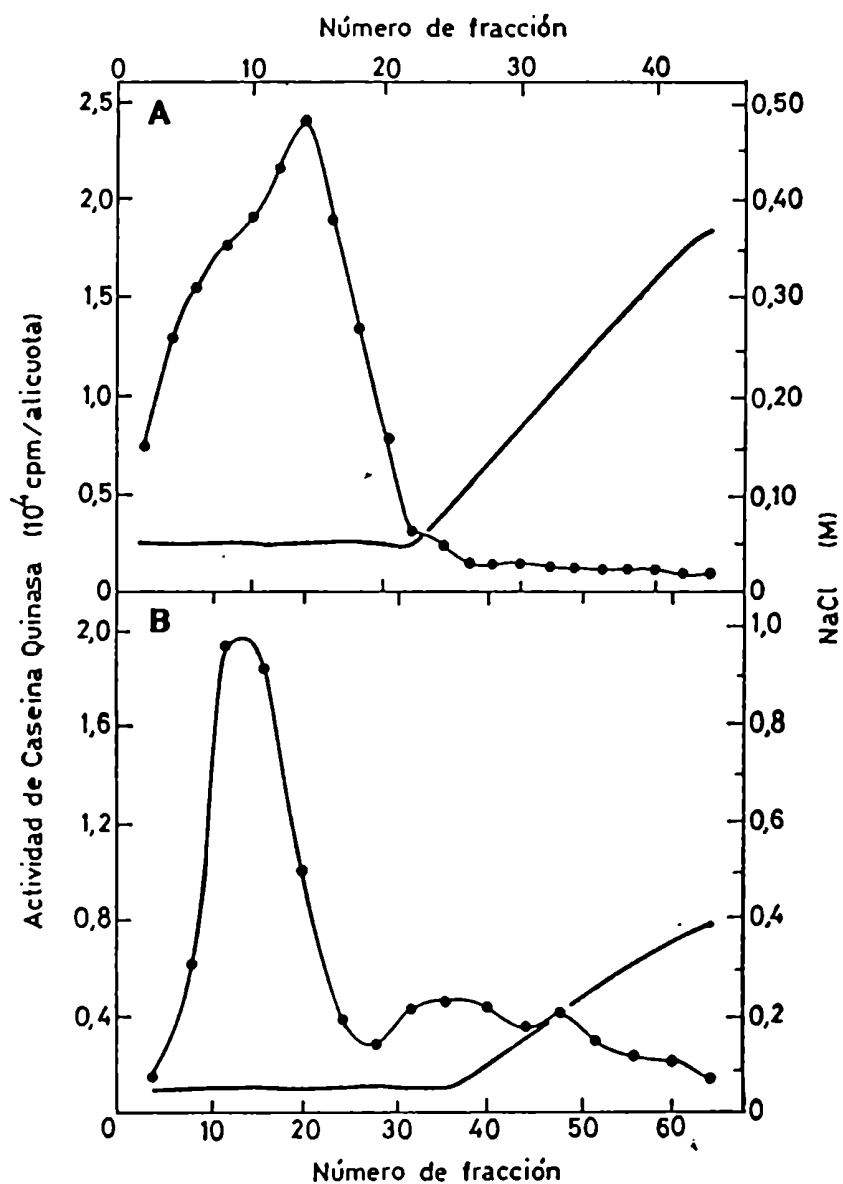


FIGURA 14: Cromatografía en DEAE-Sepharosa de las actividades de caseína quinasas particuladas.

A partir de un pellet de 15000 g obtenido de 47 g de micelio joven se obtuvo una fracción solubilizada por NaCl 1 M ( $S_{NaCl}$ ) y otra fracción solubilizada por Nonidet P-40 ( $S_{NP-40}$ ) según el procedimiento descrito en Materiales y métodos. El  $S_{NaCl}$  (A) y el  $S_{NP-40}$  (B) fueron sembrados en columnas de DEAE-Sepharosa y se cromatografiaron según se describió en Materiales y métodos. Alícuotas de cada dos fracciones fueron ensayadas para actividad de caseína quinasa.

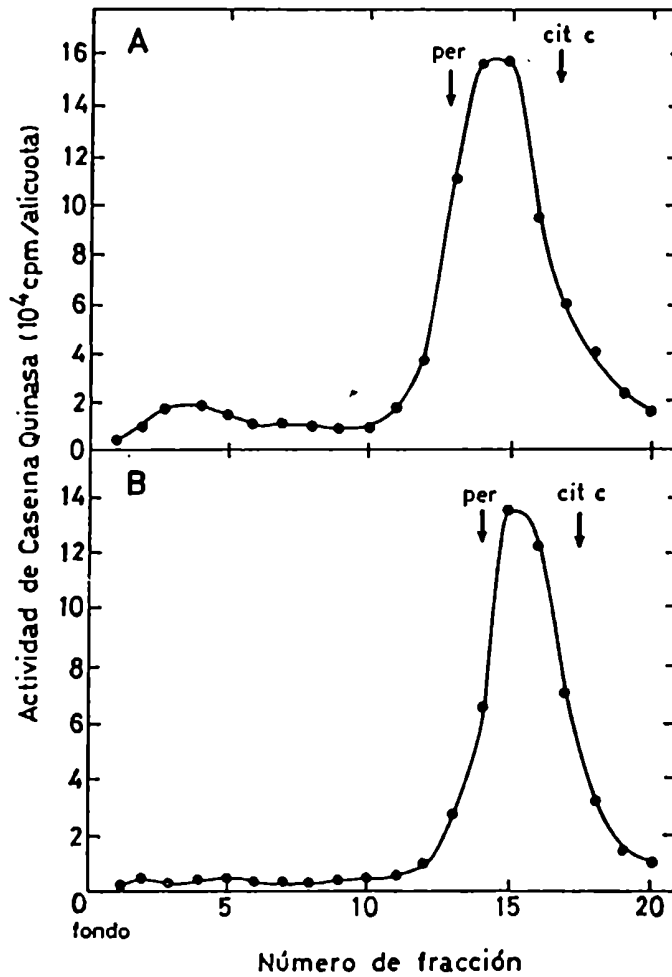


FIGURA 15: Análisis por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa isocinéticos de las actividades de caseína quinasa particuladas.

Alicuotas de la fracción solubilizada por NaCl 1M, S<sub>0.01</sub> (A), y por Nonidet P-40, S<sub>0.01</sub> (B) fueron sembradas, en presencia de peroxidasa y citocromo c, en gradientes de sacarosa 5 a 20% y se centrifugaron como se indicó en Materiales y métodos. Alicuotas adecuadas de las fracciones obtenidas se ensayaron para actividad de caseína quinasa y de los marcadores. Las flechas en la parte superior del gráfico indican la posición de los marcadores: peroxidasa (per) y citocromo c (cit c).

## DISCUSION

Hemos encontrado en la forma micelial del hongo *Mucor rouxii* dos actividades de proteína quinasas solubles independientes de calcio y de nucleótidos cíclicos y que prefieren como sustratos aceptores de fosfatos a dos proteínas acídicas: caseína y fosvitina, lo que permite identificarlas como caseína quinasas.

Las caseína quinasas descriptas hasta el momento, se pueden separar de acuerdo a sus propiedades en dos grupos: las de tipo 1 y las de tipo 2.

Las caseína quinasas de tipo 1 usan sólo ATP como dador de fosfatos y fosforilan casi exclusivamente residuos de serina en caseína. Tienen pesos moleculares relativamente bajos de entre 30000 y 42000 y han sido descriptas como monoméricas (Hathaway y Traugh, 1982). Se adhieren a fosfocelulosa a baja fuerza iónica y su actividad no se afecta por heparina ni por poliaminas (Hathaway y Traugh, 1979; 1982).

Las caseína quinasas de tipo 2 usan ATP y GTP como dadores de fosfato, fosforilan residuos de serina y treonina de la caseína. Tienen estructura oligomérica con pesos moleculares entre 120000 y 200000 (Hathaway y Traugh, 1979; 1982). Forman agregados de alto peso molecular a baja fuerza iónica (Glover, 1986; Meggio et al., 1985).

De acuerdo a su orden de elución en DEAE-Sepharosa llamamos a las caseína quinasa solubles del hongo CK I y CK II.

La enzima CK I se unió a columnas de fosfocelulosa a pH 7,5 y eluyó a 0,4 M de NaCl. Su actividad es totalmente dependiente de magnesio y alcanzó su máxima velocidad con  $MgCl_2$  10 mM y caseína 2,5 mg/ml. Usa ATP como dador de fosfatos con un valor de  $K_m$  aparente de 40  $\mu$ M; mientras que el GTP no es sustrato de esta enzima. Esta proteína tiene un coeficiente de sedimentación de 3,5 S; un radio de Stokes de 3,0 nm y el peso molecular estimado de acuerdo a estos parámetros resultó de 44300. La actividad de CK I no resultó afectada por heparina 25  $\mu$ g/ml, concentración que produce una inhibición total de la actividad de CK II. De acuerdo a estas propiedades fue posible clasificar claramente a CK I como una caseína quinasa de tipo 1.

La sensibilidad de CK I a aumentos en la concentración de poliaminas y de cationes monovalentes es una característica que distingue a esta enzima de la mayoría de las caseína quinasa de tipo 1 (Hathaway y Traugh, 1982). Usando caseína como sustrato, se observó una fuerte inhibición de la actividad fosfotransferásica con NaCl, KCl, espermidina y espermina; obteniéndose un 50% de inhibición con NaCl o KCl 100 mM; espermidina 10 mM o espermina 2 mM. El aumento de la fuerza iónica producida por las poliaminas no explica por si mismo el efecto inhibitorio ya que para los valores mencionados existe una diferencia de por lo menos 5 veces entre la fuerza iónica aportada por el NaCl (o KCl) y la aportada por la

espermina. Han sido descritas caseína quinasas inhibibles por poliaminas en el axoplasma del axón gigante del calamar y en células de neuroblastoma de ratón (Pant et al., 1986; Verma et al., 1986) y otras inhibibles por cationes monovalentes en *Saccharomyces cerevisiae* y en núcleos de células HeLa (Meggio et al., 1986; Quarless, 1985).

En cuanto al aminoácido fosforilado en caseína, la enzima CK I fosforila predominantemente residuos de serina y en muy baja proporción se ha encontrado fosfato radioactivo asociado a residuos de treonina. Si bien, esto mismo ha sido encontrado para otras caseína quinasas de tipo I (Szyska et al., 1985); no puede descartarse la existencia de más de una isoenzima con especificidad diferente en la preparación de CK I.

En levaduras se ha demostrado la existencia de una especie minoritaria de caseína quinasa con las propiedades de una caseína quinasa de tipo I, pero que fosforila a la caseína predominantemente en treonina (Szyska et al., 1985). Nosotros hemos encontrado en *Mucor rouxii* una tercera especie minoritaria de caseína quinasa a la que llamamos CK I\*, separable por DEAE-Sepharosa de las otras dos. Esta enzima comparte con CK I algunas características como la insensibilidad a la heparina y la inhibición de su actividad por iones monovalentes y difiere en cuanto a su movilidad en gradientes de sacarosa en respuesta a un campo centrifugo: tiene un coeficiente de sedimentación de 2,7 S, lo que corresponde a un tamaño menor o una forma más desplegada

con respecto a CK I. De acuerdo a estas características CK I\* es una caseína quinasa de tipo 1, pero no puede establecerse con estos datos si es otra isoenzima o es un producto de proteólisis de CK I. No se pudieron establecer las condiciones en las que esta especie se produce, razón por la cual no pudieron analizarse otras propiedades tales como el aminoácido que fosforila en caseína.

La enzima CK II presenta un comportamiento cromatográfico particular en columnas de fosfocelulosa. A baja fuerza iónica, la mayor parte de la actividad percola; mientras que cuando la fuerza iónica de la preparación enzimática se mantiene en 0.25 M de NaCl, la proteína se une a la resina y eluye a 0,5 M de NaCl. Este comportamiento podría explicarse por la formación de agregados de la proteína con actividad enzimática consigo misma o con algún otro factor de naturaleza desconocida. El análisis por sedimentación en gradientes de sacarosa corrobora la existencia de agregados enzimáticos, ya que a baja fuerza iónica la actividad fosfotransferásica se encontró asociada a estructuras con coeficientes de sedimentación desde 9 S hasta superiores a 15 S, mientras que a alta fuerza iónica apareció como un pico único con un coeficiente de 7,4 S. El análisis por el mismo método de los sustratos endógenos de CK II contenidos en la preparación enzimática de DEAE-Sepharosa permitió establecer que la formación de estos agregados no se debe a la asociación de esta enzima con un sustrato putativo, como se postuló para la caseína quinasa de tipo 2 de hígado de rata (Meggio et al., 1985). La formación de

estas estructuras es reversible ya que es posible obtener la enzima desagregada a partir de los agregados y viceversa. A partir de la actividad que percola en columnas de fosfocelulosa (estado agregado) se ha logrado por aumento de la concentración salina que parte o el total de esta actividad se una a la resina (estado desagregado). A la inversa, la enzima obtenida de DEAE-Sepharosa (estado desagregado), si es dializada presenta en gradientes de sacarosa coeficientes de sedimentación superiores a 7,4 S (estado agregado). Sin embargo, la reversibilidad de este proceso se dificulta si se aumenta la concentración de proteína de la preparación por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , probablemente debido a un aumento en el tamaño de los agregados. Se han encontrado agregados de caseína quinasa de tipo 2 en preparaciones puras de estas enzimas en células de mamíferos y en *Drosophila*. Dado que se han obtenido agregados de CK II independientemente de su grado de purificación suponemos que también la enzima de *Mucor rouxii* se agrega por asociación consigo misma.

Se obtuvo para la enzima CK II en su estado desagregado un radio de Stokes de 4,8 nm y de acuerdo a Siegel y Monty se estimó para esta proteína un peso molecular de 150000.

La enzima CK II requiere magnesio para su actividad y alcanza su máxima velocidad con  $\text{MgCl}_2$  20 mM y 2,5 mg/ml de caseína. Es capaz de usar ATP o GTP como sustratos dadores de fosfato con  $K_m$  aparentes de 10  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Es inhibible por heparina y estimulada por espermidina y espermina. También se



observa cierta estimulación de su actividad por iones monovalentes a concentraciones entre 200 y 250 mM y en este caso la estimulación podría deberse al cambio producido en el estado de agregación de la enzima. Según las características mencionadas, CK II se comporta como una caseína quinasa de tipo 2; sin embargo, esta enzima difiere de otras caseína quinasas de tipo 2 en cuanto a los aminoácidos que fosforila en caseína puesto que, si bien la fosforilación de treonina por CK II fue evidente, no resultó preferencial como ocurre con las caseína quinasas de tipo 2 estudiadas en otros organismos.

Además de los dos tipos de caseína quinasas solubles hemos encontrado en *Mucor rouxii* este tipo de actividad asociada a la fracción particulada. En distintas células de mamíferos y diversos organismos han sido encontradas caseína quinasas asociadas a membranas (Hathaway y Traugh, 1982) y a otros componentes celulares como ribosomas (Nuutinen y Londesborough, 1988); mRNA ribonucleoproteínas (Thoen et al., 1984) o mitocondrias (Rigobello et al., 1978). Debido a que el procedimiento utilizado para la homogeneización no preserva las estructuras subcelulares, sólo se pueden distinguir entre las actividades solubles y las asociadas a membranas. En este punto es conveniente aclarar que debido a la organización estructural de este hongo, las membranas quedan fuertemente asociadas a la pared celular (Cantore, 1982) y por lo tanto, el sedimento de 15000 g es representativo de la fracción membranosa. Los resultados obtenidos por fraccionamiento a 100000 g no arrojaron una distribución significativamente diferente.

Hemos encontrado que aproximadamente una tercera parte de la actividad total de caseína quinasas se encuentra asociada a las membranas y esta actividad es mayoritariamente solubilizable por sal, pertenece al tipo 1 de caseína quinasas y presenta un coeficiente de sedimentación similar al de CK I. Los estudios realizados no nos permiten establecer si la actividad asociada a membranas y la enzima CK I soluble son o no la misma proteína.

PARTE B: ESTUDIO DE LA FOSFORILACION ENDOGENA DEBIDA A CASEINA  
QUINASAS Y A PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE AMP<sub>2</sub> POR  
MEDICION *in situ* EN LEVADURAS PERMEABILIZADAS

RESULTADOS

Investigando las características de las caseína quinasas de *Mucor rouxii* se hizo evidente por análisis en DEAE-Sepharosa y gradientes de sacarosa (ver figuras 1 y 6), la existencia de numerosos sustratos endógenos de CK II, la caseína quinasa de tipo 2 de este hongo. La fosforilación de los sustratos endógenos que acompañan a CK II en columnas de DEAE-Sepharosa por esta enzima resultó inhibible por heparina del mismo modo que la fosforilación de caseína (ver figura 16).

Con el objeto de identificar a los sustratos endógenos de la caseína quinasa de tipo 2 y de las otras proteína quinasas cuya existencia ha sido demostrada en *Mucor rouxii*: la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>2</sub> (Moreno y Passeron, 1980; Pastor et al., 1981; Moreno et al., 1983; Paveto et al., 1987) y caseína quinasas de tipo 1 (Pardo y Moreno, 1988), se buscó modular la actividad de estas enzimas y observar, entonces, cambios en el patrón de fosforilación de las proteínas del hongo analizadas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Para llevar adelante este objetivo se optó por la utilización del sistema de permeabilización de células levaduriformes de *Mucor*

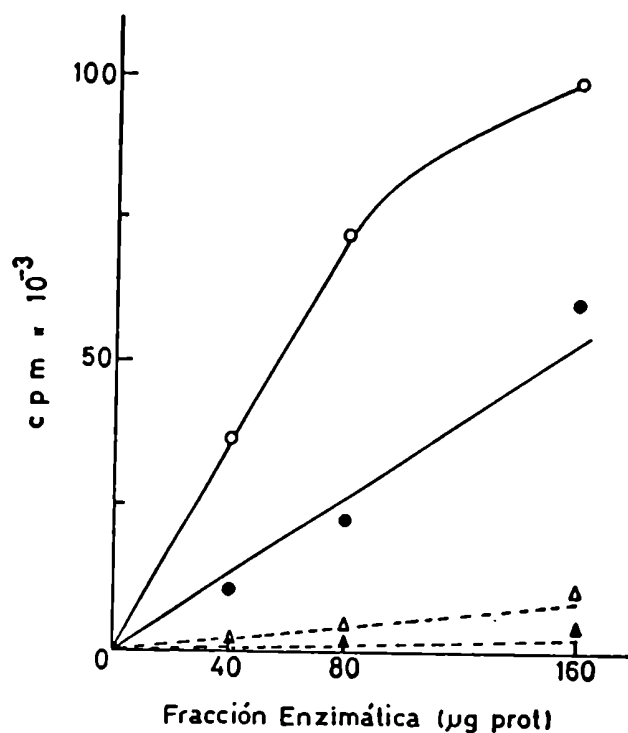


FIGURA 16: Inhibición por heparina de la fosforilación por CK II de los sustratos endógenos que coeluyen en DEAE-Sephrosa.

Alícuotas crecientes de una preparación de CK II obtenida en el paso de DEAE-Sephrosa fueron ensayadas para actividad de caseína quinasa en presencia de 2,5 mg/ml de caseína con (△) y sin (○) heparina 12,5 µg/ml y para fosforilación endógena con (▲) y sin (●) heparina 12,5 µg/ml.

rouxii (ver Materiales y métodos, sección II de la parte B), previamente usado en nuestro laboratorio para la medición de actividades enzimáticas *in situ* (Maggese et al., 1982). Este sistema permite incorporar fosfato radioactivo a las proteínas de la célula cuando se ponen en presencia de  $^{32}\text{P}$ -ATP

(ver Materiales y métodos, parte B, sección IV)

Las aproximaciones experimentales que se hacen para estudiar la fosforilación de proteínas en sistemas libres de células o por marcación de células intactas en presencia de  $^{32}\text{P}$ - $\text{PO}_4^{3-}$  adolecen de limitaciones teóricas y técnicas (Colca et al., 1985).

En cuanto al primer tipo de aproximación, no se puede asegurar que una interacción enzima sustrato medida en homogenatos celulares sea representativa de aquellas que ocurren en la célula intacta ya que podría ser un artefacto resultante del fraccionamiento celular.

Por otra parte, los estudios con células intactas están limitados por el hecho de que el tiempo necesario para marcar con fosfato radioactivo los pools endógenos de ATP son relativamente largos y esto produce un fondo de fosforilación proteica sobre el cual deben medirse los cambios producidos experimentalmente. Además, no pueden descartarse cambios en la actividad específica del pool de ATP endógeno como consecuencia de los tratamientos experimentales, ya sea que éstos se realicen en presencia del fosfato radioactivo o luego de que éste haya sido removido. Mas aun, este método no

permite controlar probables cambios en los niveles endógenos de los moduladores de las proteína quinasas como el calcio, el AMP<sub>c</sub> o las poliaminas, en respuesta a los tratamientos experimentales.

La medición de la fosforilación proteica en células permeabilizadas, como herramienta para identificar sustratos endógenos, ofrece mayores ventajas sobre estos métodos ya que permite incubar las células directamente con nucleótido radioactivo durante un tiempo definido evitando el fondo de fosforilación proteica. Además, hace posible controlar la concentración de efectores y moduladores de las proteína quinasas por adición directa al medio externo, ya que la membrana celular se hace libremente permeable a éstos cuando tienen tamaños moleculares suficientemente pequeños.

### I- ESTUDIO DE LA FOSFORILACION DE PROTEINAS ENDOGENAS MEDIDA *in toto*

Con el fin de establecer las condiciones en las que debían realizarse los ensayos para evidenciar, por análisis en geles de poliacrilamida, la fosforilación de los sustratos endógenos por las caseína quinasas y la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> de *Mucor*, se estudió cuantitativamente, la incorporación de fosfato a proteínas endógenas totales en función de la cantidad de células, del tiempo y de la concentración de ATP agregada al ensayo (ver figura 17).

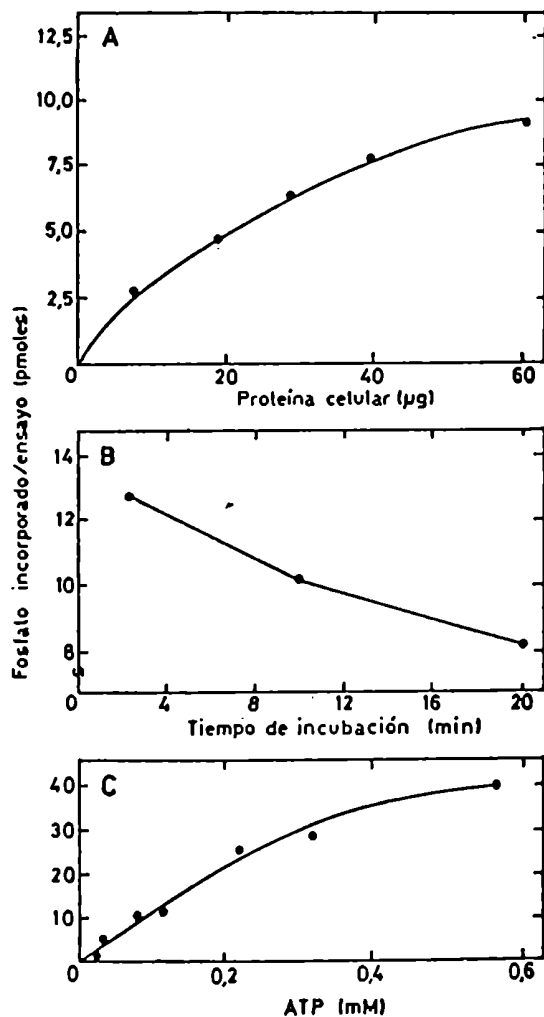


FIGURA 17: Incorporación de fosfato a proteínas totales en función de la cantidad de células (A), del tiempo de incubación (B) y de la concentración de ATP en el ensayo (C)

Se incubaron en un volumen final de 100 µl:

- A: distintas cantidades de células permeadas correspondientes a 8,5; 17; 25,5; 34 y 60 µg de proteína celular en presencia de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 20 µM (2000 cpm/pmol)
- B: células permeadas conteniendo 60 µg de proteína celular durante 3, 10 y 20 minutos en presencia de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (2000 cpm/pmol)
- C: células permeadas conteniendo 60 µg de proteína celular durante un tiempo de incubación de 3 minutos en presencia de distintas concentraciones de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP: 20, 40, 80, 120, 220, 320 y 520 µM con una actividad total de  $4 \times 10^6$  cpm/ensayo.
- En todos los casos se midió la radioactividad precipitable por TCA 10% y se calculó la incorporación de fosfato.

La fosforilación de proteínas endógenas aumenta constantemente en todo el rango de concentraciones de células probado; sin embargo, se observa rápidamente una pérdida de la linealidad (ver figura 17A).

Esta pérdida de la linealidad no puede explicarse por aumento de la concentración de moduladores endógenos, pues aquellos que son liberados al medio, se eliminan en el lavado previo a la incubación y aquellos que, debido a su tamaño, quedan localizados dentro de la célula, mantienen su concentración intracelular constante, independientemente de la cantidad de células agregadas. Esto último ocurre también, con las enzimas y los sustratos proteicos involucrados en la reacción. La concentración de ATP en el medio de incubación de las células es la misma en todos los ensayos, sin embargo, es importante tener en cuenta que a mayor concentración de células, el ATP está interactuando con un mayor número de moléculas y por lo tanto, la concentración de ATP disponible por célula es menor. Dado que la concentración de ATP usada no es saturante, esta deficiencia en el sustrato dador de los fosfatos, explicaría el cambio en el estado de fosforilación de las proteínas celulares y la consecuente pérdida de la linealidad con el aumento en el número de células en la incubación.

El efecto resultante de un aumento en los tiempos de incubación de 3 a 20 minutos, a una concentración de células equivalente a 0,6



mg/ml de proteínas, fue una disminución de los niveles de fosforilación proteica (ver figura 17B), explicable por un cambio en el estado estable de los ciclos de fosforilación-defosforilación tal que, la actividad de las fosfatasa de proteínas aumentó respecto de la actividad de las quinasas. Este cambio puede explicarse por una disminución con el curso del tiempo, de la concentración de ATP disponible debida a su localización, ya que no se detectó degradación del ATP entre 0 y 20 minutos.

Por aumento de la concentración de ATP hasta 0,5 mM no se alcanza la saturación para este sustrato (ver figura 17C). Dado que una de las estrategias para evidenciar la fosforilación de proteínas endógenas debida a caseína quinasa de tipo 2 era la visualización de la competencia por GTP no radioactivo, se estudiaron las condiciones para evidenciar esta competencia. Como se observa en la Tabla 13, el GTP compite a una concentración de ATP de 20  $\mu$ M, disminuyendo la incorporación de fosfato radioactivo a proteínas a un 56% de la obtenida en su ausencia, un valor menor del obtenido cuando se diluyó isotópicamente con ATP no radioactivo; en cambio, a una concentración de ATP 10 veces mayor se observa una mayor disminución de la incorporación de fosfato radioactivo a proteínas por dilución con ATP no radioactivo, mientras que el GTP casi no logra competir. Esta diferencia puede explicarse teniendo en cuenta que a bajas concentraciones de ATP, el efecto de la dilución isotópica está compensado por el aumento de la fosforilación total (ver figura 17C), a diferencia de lo que

ocurre a altas concentraciones de ATP. El GTP, en cambio, no parece producir un aumento de la fosforilación, pero sí funciona como sustrato competitivo del ATP produciendo una disminución en la incorporación de fosfato radioactivo a las proteínas celulares y esto se evidencia fundamentalmente a la menor concentración de ATP.

En base a estas observaciones se decidió ensayar la fosforilación endógena a una concentración de 0,3 mg/ml de proteína celular con un tiempo de incubación de 3 minutos y una concentración de ATP de 20  $\mu$ M. Estas condiciones permitirían evidenciar la fosforilación proteica debida a caseína quinasa de tipo 2 por competencia con GTP no radioactivo y detectar la influencia de los distintos moduladores en condiciones más cercanas a la linealidad con incorporaciones que se pudieran detectar por autorradiografía en geles de poliacrilamida y minimizando la acción de las fosfatasas de proteínas. Para acercarse a las condiciones fisiológicas de fuerza iónica los ensayos se realizaron en presencia de KCl 0,1 M. Además se agregó EGTA 1 mM para impedir las fosforilaciones dependientes de calcio y buffer fosfato 20 mM para minimizar la acción de las fosfatasas. De este modo, en ausencia de moduladores, la fosforilación proteica observada se debería fundamentalmente a caseína quinasa de tipo 2 y en menor medida a caseína quinasa de tipo 1 ya que la concentración de ATP usada se encuentra por debajo de la  $K_m$  de esta enzima para el nucleótido.

TABLA 13: INFLUENCIA DEL GTP EN LA FOSFORILACION ENDOGENA

ATP en el ensayo	% de incorporación relativa al control	
	+ ATP 200 $\mu$ M	+ GTP 200 $\mu$ M
control		
20 $\mu$ M	86	56
200 $\mu$ M	64	96

#### II- ESTIMULACION DE LA FOSFORILACION ENDOGENA POR CATIONES

Como se discutió anteriormente (ver Resultados, Parte A, ítem II-10), la caseína quinasa de tipo 2 de *Mucor rouxii* sufre estimulación por poliaminas del orden de 2,5 veces con espermidina y de 4 veces con espermina, con máximos de estimulación de 10 mM y 5 mM respectivamente. En cambio, la caseína quinasa de tipo 1 se inhibe hasta un 50% de su actividad por espermidina 10 mM o espermina 2 mM.

Por otra parte, la actividad de CK II, la caseína quinasa de tipo 2, es estimulable hasta un 100% por aumento de la concentración de KCl, con un óptimo a 0,25 M; mientras que la actividad de CK I, la caseína quinasa de tipo 1, se inhibe un 75% a la misma concentración.

Estas dos características se estudiaron en relación a la fosforilación de sustratos endógenos medida *in situ*.

Con espermina se observó una estimulación de la fosforilación de proteínas totales que con 10 mM alcanzó a ser de un 60% sobre la actividad basal, muy por debajo de la obtenida *in vitro* para CK II, sin que se alcance un óptimo de estimulación (ver figuras 18A y 13B). En principio, este resultado podría explicarse por los efectos contrapuestos de la espermina sobre las actividades de CK I y CK II. Sin embargo, de acuerdo al análisis de las proteínas fosforiladas por electroforesis en geles de poliacrilamida (ver figura 22) no se observa disminución en el nivel de fosforilación de ninguna de las bandas.

El desplazamiento de la estimulación a concentraciones de espermina mayores que las necesarias para producir la misma estimulación con la enzima CK II aislada, se debe probablemente a que las poliaminas se unen en la célula a diferentes elementos subcelulares tales como la membrana plasmática y los microsomas (Schuber, 1989) y a macromoléculas (Tabor y Tabor, 1984; Pegg, 1986), de manera que la concentración de espermina libre en la célula resulta mucho menor a la agregada en el ensayo.

En base al comportamiento de las caseína quinasas de *Mucor rouxii* observado *in vitro*, se esperaba obtener por agregado de KCl la inhibición de la fosforilación de los sustratos de la enzima CK I y la estimulación de la fosforilación de los sustratos de la enzima CK II. El resultado de esta influencia sobre la fosforilación endógena total era difícil de prever; sin embargo,

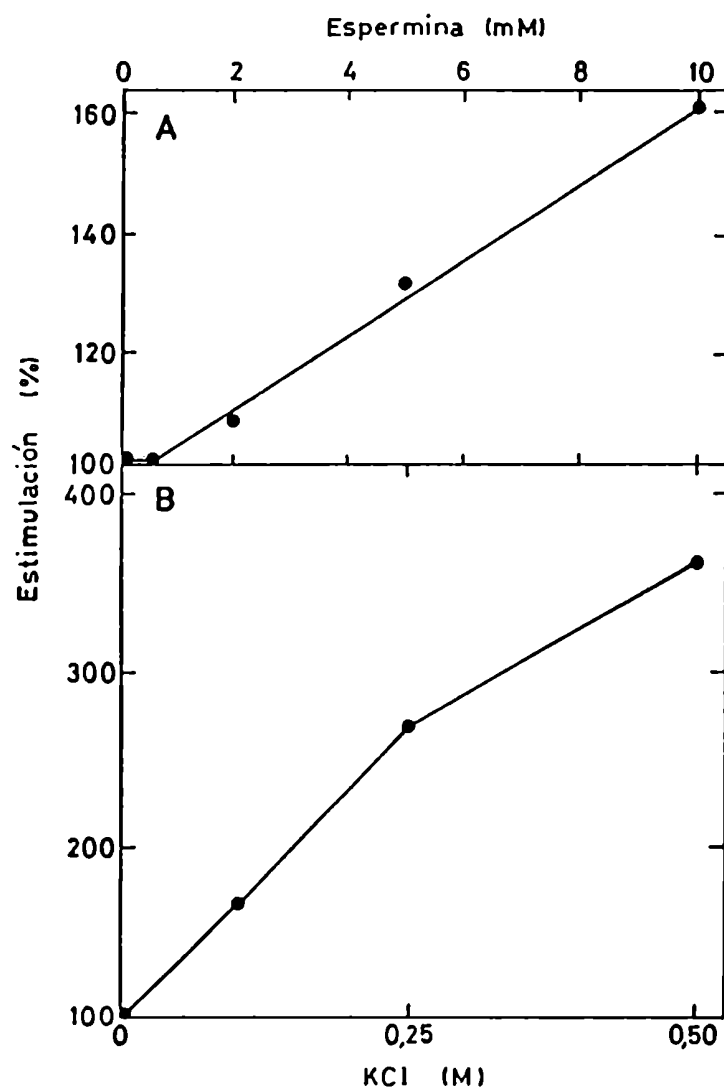


FIGURA 18: Estimulación de la fosforilación endógena por espermina (A) y por KCl (B)

Se midió la incorporación de fosfato a células permeadas (60  $\mu$ g de proteína celular) luego de una incubación de 3 minutos con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 20  $\mu$ M (2000 cpm/pmol) y en presencia de KCl 0,1M y distintas concentraciones de espermina entre 0 y 10 mM (A) o distintas concentraciones de KCl desde 0 a 0,5M (B).

el resultado obtenido no concuerda con lo esperado; pues el aumento en la concentración de KCl produjo una estimulación mucho mayor que la obtenida *in vitro* sobre la enzima CK II parcialmente purificada usando caseína como sustrato (ver figuras 18B y 10B). Nuevamente, el análisis de las fosfoproteínas por geles de poliacrilamida no evidencia una disminución en los niveles de fosforilación de ninguna de las bandas proteicas.

La estimulación observada por el aumento de la concentración salina puede atribuirse no sólo a efectos sobre la actividad catalítica de las enzimas, por ejemplo por desagregación de la caseína quinasa de tipo 2, sino a efectos sobre los sustratos endógenos en cuestión, ya sea sobre su estructura, de manera que se expongan nuevos sitios de fosforilación o por solubilización de los mismos de manera que queden accesibles a las proteína quinasa.

### III- CAMBIOS EN EL PATRÓN DE FOSFOPROTEÍNAS PRODUCIDOS POR LOS MODULADORES CONOCIDOS DE LAS PROTEÍNA QUINASAS DE *Mucor rouxii*

Por análisis electroforético en geles de poliacrilamida desnaturalizantes se estudiaron los cambios producidos en el patrón de fosfoproteínas por distintos moduladores de las proteína quinasa en estudio y por el reemplazo de ATP por GTP como sustrato dador de los fosfatos radioactivos, sobre una condición basal establecida de acuerdo a los criterios expresados

anteriormente (ver Resultados, sección II de la parte B y Materiales y métodos, sección IV de la parte B).

En las condiciones basales, se pudo establecer la existencia de diez bandas fosforiladas, de 12, 20, 25, 30, 42, 52, 63, 73, 84 y 106 Kilodaltones (KD), identificables en todos los geles y condiciones analizadas. En una sola condición (con  $AMP_c$ ) apareció una nueva banda de 95 KD, y otra de 34 KD. Sus pesos moleculares se determinaron teniendo en cuenta sus movilidades, según la relación lineal entre la relación de frente y el logaritmo del peso molecular (Weber y Osborn, 1969; Laemmli, 1970) tomando como patrones dos conjuntos de proteínas marcadoras (ver figura 19).

Con el objeto de identificar las bandas que sufren fosforilación dependiente de  $AMP_c$  se incubaron las células como se indicó en Materiales y métodos en las condiciones basales, en presencia de  $AMP_c$  y en presencia de  $AMP_c$  y del péptido inhibidor de la proteína quinasa dependiente de  $AMP_c$  y se analizó el patrón de fosfoproteínas obtenido en cada caso (ver figura 20).

En presencia de  $AMP_c$ , se observó la aparición de dos nuevas banda fosforiladas, una muy conspicua de 95 Kilodaltones y otra menos intensa de 34 Kilodaltones; la fosforilación de estas banda se revierte en más de un 50% por agregado de péptido inhibidor. La concentración de péptido inhibidor necesaria para inhibir en esa proporción la fosforilación de estas bandas es 500 veces superior a la  $K_i$  obtenida in vitro por fosforilación del heptapeptido de

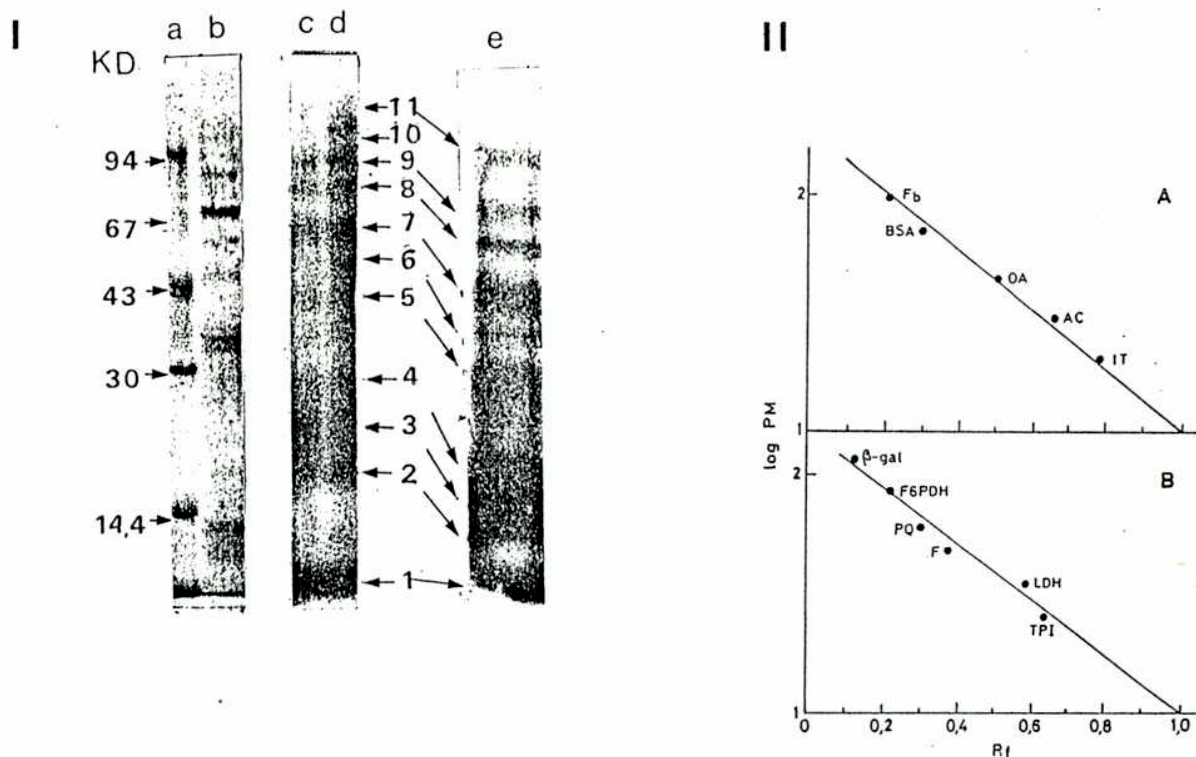


FIGURA 19: Caracterización electroforética en geles de poliacrilamida de las bandas de proteína fosforiladas en células levaduriformes de Mucor rouxii

I- Se analizaron electroforéticamente en geles 7,5% (carriles b,c y d) o 10% (carril e) las proteínas endógenas fosforiladas en células levaduriformes permeabilizadas de acuerdo a lo establecido en Materiales y métodos.

En el carril a se muestran los marcadores de peso molecular: fosforilasa b (94 KD); albumina (67 KD); ovoalbúmina (43 KD); anhidrasa carbónica (30 KD); y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14,4KD).

En el carril b se observa el perfil de bandas de proteínas obtenido de levaduras permeabilizadas (3  $\mu$ g de proteína total)

En el carril c, d y e se observa el perfil de bandas fosforiladas en las condiciones estándar (c y e) y en presencia de 20  $\mu$ M AMP. (d).

II- Curvas de calibración de los dos juegos de marcadores usados para la determinación de los pesos moleculares de las bandas (ver TABLA 14) corridos en un gel 7,5% (Abreviaturas usadas : Fb = fosforilasa b; BSA = seroalbumina bovina; OA = ovoalbúmina; AC = anhidrasa carbónica; IT = inhibidor de tripsina; LA =  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -gal =  $\beta$ -galactosidasa; F6PDH = Fructosa 6 fosfato deshidrogenasa; PQ = piruvato quinasa; F = fumarasa; LDH = láctico deshidrogenasa; TPI = triosa fosfato isomerasa).



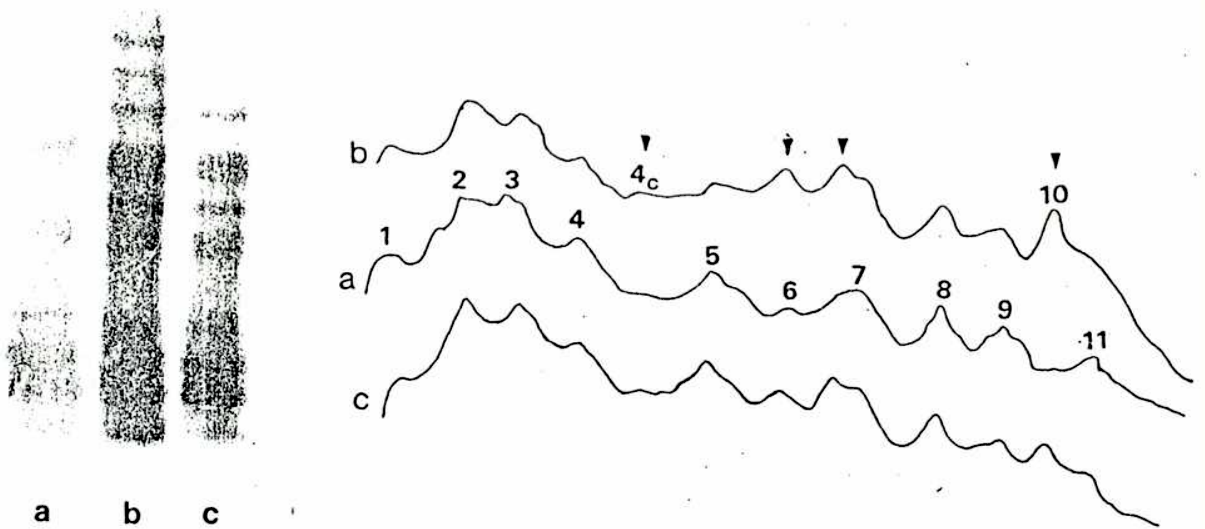


FIGURA 20: Cambios producidos por AMP<sub>i</sub> en el patrón de fosfoproteínas obtenido a partir de levaduras permeabilizadas

Alicuotas provenientes de incubaciones realizadas como se indicó en Materiales y métodos sin (carril a) y con el agregado de AMP<sub>i</sub> 20μM (carril b) o con el agregado de AMP<sub>i</sub> 20μM y péptido inhibidor de la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>i</sub> 100μM (carril c) se corrieron electroforéticamente en un gel de poliacrilamida 10% de acuerdo a lo indicado en Materiales y métodos.

Se muestran la autorradiografía del gel (A) y el densitograma de la autorradiografía (B) en el que las bandas se identificaron por sus números. Las bandas modificadas se indican con flechas.

Kemp por la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> de *Mucor* (Guthmann y Moreno, resultados no publicados). Se observó además, un aumento en la fosforilación de la banda de 63 KD (banda 7) y de la banda de 52 KD, la primera se estimuló en un 40% aproximadamente, y este aumento se revierte sólo en un 50% por el péptido inhibidor; mientras que la estimulación en la fosforilación de la banda de 52 KD (banda 6) fue de 100% aproximadamente y se revirtió casi totalmente por el péptido inhibidor.

Para identificar las bandas fosforilables por caseína quinasa de tipo 2, se incubaron las células levaduriformes permeabilizadas en presencia de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] GTP. Este patrón de fosfoproteínas se comparó con el obtenido en presencia de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP en condiciones basales y con los obtenidos por competencia del ATP con GTP 200  $\mu$ M o con el agregado de espermidina 5 mM.

El patrón obtenido usando GTP como sustrato dador de los fosfatos radioactivos es cualitativamente muy similar al obtenido con ATP, sin embargo, el nivel de fosforilación de algunas proteínas se destaca por sobre las demás sugiriendo que las mismas son sustratos preferenciales de la caseína quinasa de tipo 2. Tal es el caso de las bandas de 25 KD (banda 3), de 42 KD (banda 5) y la de 63 KD (banda 7). Diferencias menos notorias se observan en las bandas de 20 KD (banda 2) y una de 30 KD (banda 4b) (ver figura 21)

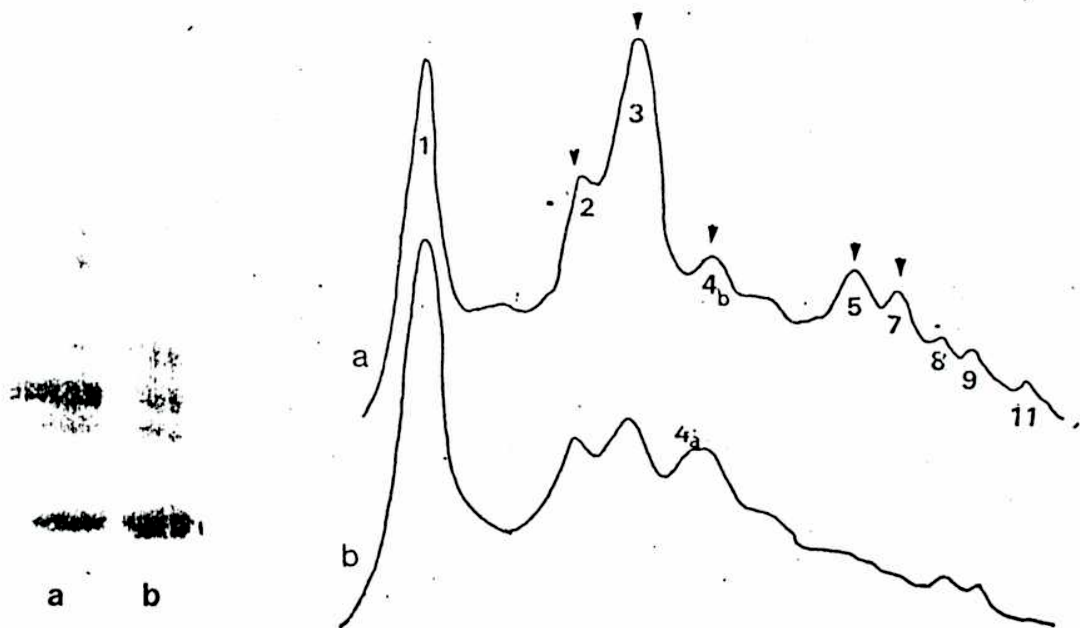


FIGURA 21: Diferencias observadas en el patrón de bandas fosforiladas obtenido usando como dadores de fosfatos ATP o GTP.

Alicuotas provenientes de incubaciones realizadas en presencia de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]GTP 20 $\mu$ M (carril a) o [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 20 $\mu$ M (carril b) se corrieron electroforéticamente en un gel de poliacrilamida 7,5% de acuerdo a lo indicado en Materiales y métodos.

En A se observa el resultado de la autorradiografía del gel y en B el densitograma correspondiente; en B las bandas se identifican por sus números.

Por competencia con GTP se produce una disminución generalizada del nivel de fosforilación de las proteínas identificadas. Por sobre esta disminución se observó un mayor efecto sobre las bandas de 20; 25; una de las de 30 y la de 42 KD (datos no mostrados).

Con poliaminas se observó una estimulación generalizada de la fosforilación de las bandas proteicas presentes. Para una mejor visualización de esta estimulación en geles se usó espermidina en lugar de espermina debido a que ésta última interfiere en la solubilización de las proteínas previa a la electroforesis (ver figura 22). Por sobre esta estimulación, se observó un aumento en la fosforilación de la banda de 25 KD (banda 3), una de 30 KD (banda 4b); y las de 42, 52, 63 y 84 KD (bandas 5, 6, 7 y 9 respectivamente). Además, se hace evidente una nueva banda fosforilada de 34 KD (banda 4c).

Por agregado de KCl 0,4 M al ensayo de fosforilación endógena, se observó una estimulación de la fosforilación de todas las bandas detectadas en la condición basal, aun mayor que la obtenida con espermidina. Nuevamente, por sobre este nivel de estimulación generalizado, se destacó el de algunas bandas de proteína (ver figura 23); fundamentalmente, de las de 12, 25, 30, 42, 63 y 84 KD (bandas 1, 3, 4b, 5, 7 y 9, respectivamente)

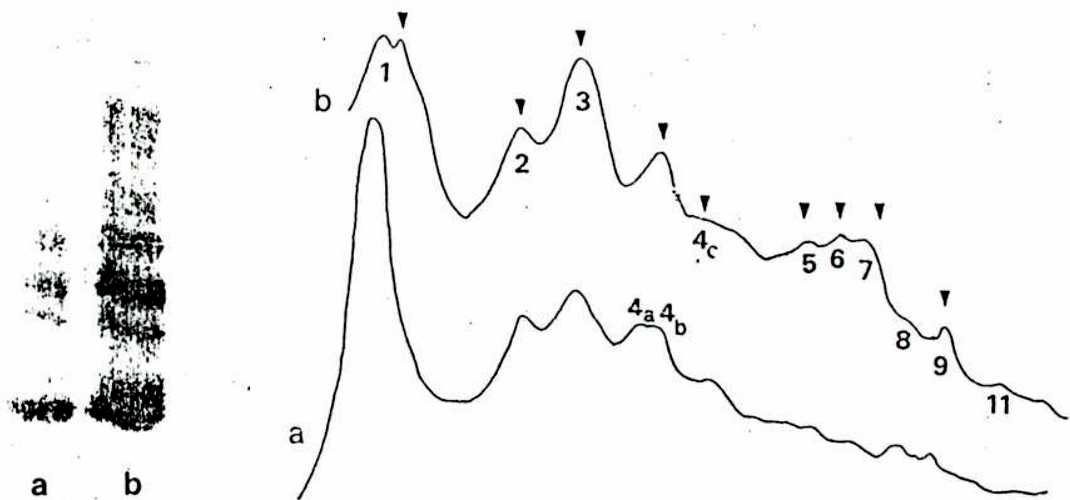


FIGURA 22: Efecto de espermidina sobre el patrón de bandas fosforiladas en células levaduriformes permeabilizadas.

Alícuotas provenientes de incubaciones realizadas como se indicó en Materiales y métodos sin agregados (carril a) o con el agregado de espermidina 5 mM (carril b) corridos en un gel de poliacrilamida 7,5%. Se muestran la autorradiografía del gel (A) y el densitograma correspondiente (B) a cada uno de los carriles.

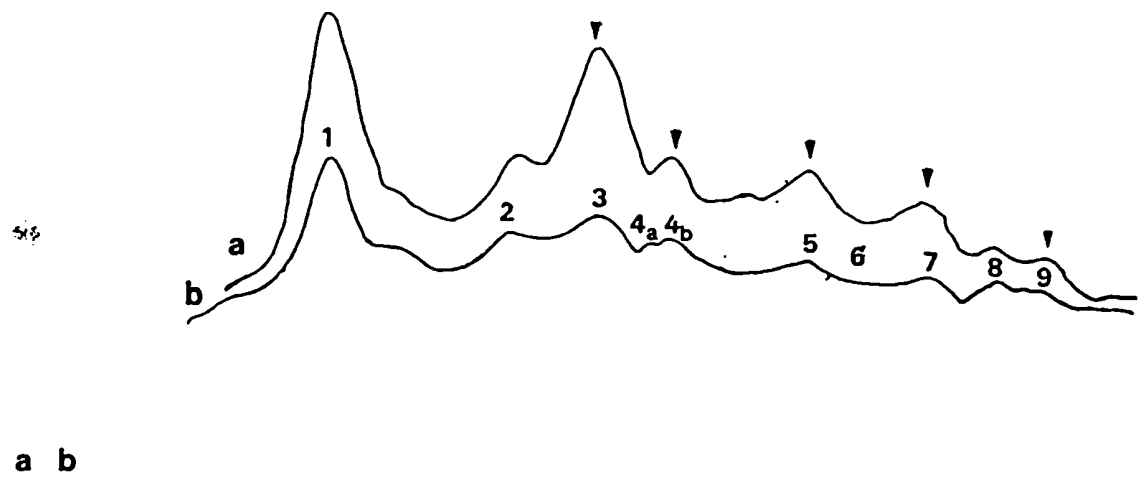


FIGURA 23: Efecto del KCl sobre el patrón de bandas fosforiladas en células levaduriformes permeabilizadas.

Alicuotas provenientes de incubaciones realizadas según se estableció en Materiales y métodos sin agregados (carril b) y con el agregado de KCl 1M (carril a) se corrieron en un gel de poliacrilamida 7,5 %. A: autorradiografía del gel , B: densitograma de cada uno de los carriles.

TABLA 14: CAMBIOS OBSERVADOS EN EL NIVEL DE FOSFORILACION DE LAS BANDAS DE FOSFOPROTEINAS

Banda	PM (KD)	CONDICION						
		basal	+AMP <sub>e</sub> (20 μM)	+AMP <sub>e</sub> * (20 μM) +p. inh. (100 μM)	+ <sup>32</sup> P-GTP	+GTP (200 μM)	+Ed (5mM)	+KCl (0.4M)
1	12	D	0	0		0	0	+
1b	14	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND
2	20	D			+		0	0
	25	D	0			-	+	+
4a		D	0	0	0	0	0	0
	b	D	0	0	+	-	+	+
	c	34	ND	+	ND	ND	ND	+
5	42	D			+		+	+
6	52	D	+	-			+	0
7	63	D	+	-	+		+	+
8	73	D	0					0
9	84	D					+	+
10	95	ND		-	ND	ND	ND	ND
11	106	D				0	0	

D = detectable  
ND = no detectable

\* Los signos - indican una disminucion en la intensidad de la banda fosforilada respecto de la obtenida en presencia de AMP<sub>e</sub>.

De acuerdo a estos resultados, las bandas de 25 (3); 30 (4b); 42 (5) y 63 Kilodaltones (7), que reúnen las siguientes características: se fosforilan en presencia de  $\gamma$ [ $^{32}$ P] ATP y  $\gamma$ [ $^{32}$ P] GTP, sus intensidades aumentan en presencia de espermina y disminuyen por agregado de GTP frío, se consideraron sustratos de la caseína quinasa de tipo 2.

Por otra parte, las bandas de 34 (4c), 52 (6), 63 (7) y 95 Kilodaltones (10) que aparecen o se estimulan por el agregado de  $\text{AMP}_e$  se consideraron sustratos de la proteína quinasa dependiente de  $\text{AMP}_e$ .

El resto de las bandas observadas pueden ser : sustratos de la caseína quinasa de tipo 1, el resultado de autofosforilaciones o intermediarios fosforilados de enzimas.

### DISCUSION

Teniendo en cuenta aquellos factores que modulan *in vitro* la actividad de las proteína quinasas encontradas en *Mucor rouxii* y estudiando los cambios producidos por estos factores en el patrón de fosfoproteínas obtenido por fosforilación *in situ* de las proteínas de levaduras permeabilizadas, se pretendió identificar a los sustratos de las caseína quinasas y de la proteína quinasa dependiente de  $\text{AMP}_e$  del hongo.



En este punto es importante considerar, de acuerdo a los conocimientos alcanzados respecto a los mecanismos de fosforilación en *Mucor rouxii* y teniendo en cuenta las condiciones establecidas para realizar estos ensayos, cuáles serían las actividades responsables de la fosforilación de proteínas endógenas en las condiciones basales. Se han estudiado en *Mucor rouxii*, tres tipos de proteína quinasas: la proteína quinasa dependiente de  $AMP_2$  (Moreno y Passeron, 1980; Moreno et al., 1983; Fastori et al., 1981) y las caseína quinasas de tipo 1 y de tipo 2 (Fardo y Moreno, 1988). Si bien no han sido demostradas en *Mucor rouxii*, existen evidencias de la existencia de proteínas quinasas dependientes de calcio y de otras proteína quinasas independientes en otros hongos (Hunter, 1987; Gupta Roy y Datta, 1986). Los ensayos de fosforilación endógena presentados fueron realizados en presencia de EGTA 1 mM, de esta manera se queló el calcio intracelular y se impidieron las fosforilaciones que lo requieren.

En ausencia de moduladores, las fosforilaciones se deberían principalmente a las caseína quinasas y a la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de  $AMP_2$  generada previamente a la permeabilización. La contribución de otras proteína quinasas independientes aún no halladas en *Mucor rouxii*, a la fosforilación endógena, no puede descartarse. En estas condiciones, también se miden las autofosforilaciones de las proteínas quinasas existentes en el hongo y los intermediarios fosforilados de enzimas.

La caseína quinasa de tipo 2 de *Mucor rouxii*, CK II, se

caracteriza por utilizar ATP o GTP como sustratos dadores de fosfatos y según los experimentos realizados *in vitro* usando caseína como sustrato, su actividad resultó estimulable por poliaminas y por sales. La inhibición de la fosforilación debida a CK II por heparina no pudo ser usada como parámetro indicador debido a que esta molécula no es capaz de ingresar en la célula permeabilizada por su tamaño. Teniendo en cuenta estas propiedades se puede considerar que aquellas bandas que resultaron fosforiladas tanto con [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP como con [ $\gamma$ - $^{32}$ P] GTP y cuya fosforilación resultó estimulada por espermidina y por KCl y disminuida en presencia de GTP frío, son sustratos probables de la caseína quinasa de tipo 2. Las bandas de 25 (3); 30 (4b); 42 (5) y 63 kilodaltones (7) reúnen estas tres características.

Del mismo modo y teniendo en cuenta las propiedades de la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> de *Mucor rouxii* se investigaron los sustratos endógenos de esta proteína quinasa, considerando aquellas bandas cuya fosforilación aumentara en presencia de AMP<sub>c</sub> y corroborando la reversión de este efecto mediante el agregado de un péptido sintético que contiene la actividad del inhibidor específico de la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> (Walsh et al., 1971). Según este criterio, las bandas proteicas de 63 (7) y 53 (6) y las bandas de 95 KD (10) y 34 KD (4c) que aparece sólo frente al agregado de AMP<sub>c</sub> son los sustratos encontrados para la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>. Llama la atención que sólo unas pocas bandas resulten fosforiladas como respuesta al agregado de AMP<sub>c</sub>. Esto puede deberse a una dificultad para producir la

disociación de la proteína quinasa dependiente de  $AMP_2$  de *Mucor rouxii*, ya que ésta no sólo depende de la concentración de  $AMP_2$ , sino de la presencia de compuestos básicos, policationes o dominios básicos de la proteína sustrato que interactúan con un dominio regulatorio de la proteína quinasa (Guthmann et al., 1990). Por otra parte resulta también llamativo, la necesidad de altas concentraciones de péptido inhibidor para impedir la fosforilación de estas proteínas por la proteína quinasa dependiente de  $AMP_2$ ; esto podría indicar que la afinidad de la enzima por estos sustratos es muy importante, dada la naturaleza competitiva respecto del sustrato proteico de este inhibidor.

La estimulación generalizada de la fosforilación proteica observada en presencia de sales y de poliaminas puede deberse a que estos compuestos sean capaces de producir alteraciones en la estructura de las proteínas sustrato, de manera que se expongan nuevos sitios o que se favorezca la interacción con la quinasa respectiva.

En el caso de las poliaminas no solo está demostrada su capacidad estimuladora sobre las fosforilaciones producidas por CK II sino también sobre la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de  $AMP_2$ , este efecto puede explicar la estimulación por espermidina de la fosforilación de las bandas de 52 KD y de 34 KD, sustratos de la proteína quinasa dependiente de  $AMP_2$ .

Según los experimentos realizados in vitro usando caseína como

sustrato, CK I, la caseína quinasa de tipo 1 de *Mucor rouxii*, se caracterizó por ser inhibible por espermina o espermidina y por sales. Sin embargo, estas características no pudieron ser evidenciadas estudiando la fosforilación endógena in situ.

Una explicación para este resultado podría ser la ausencia de actividad de CK I en la forma levaduriforme, sin embargo, existen evidencias de la existencia en levaduras de una actividad de caseína quinasa que percola en columnas de intercambio aniónico (Moreno et al., 1977), lo que es característico de CK 1.

Es probable que los efectos observados in vitro, con sales y con poliaminas usando caseína como sustrato exógeno, se deban a efectos sobre la estructura de la caseína o sobre la interacción entre este sustrato y la quinasa y que por esta razón no se verifiquen con los sustratos endógenos. Diferencias en la estimulación por poliaminas han sido observadas en experimentos in vitro con las caseína quinasa nucleares de tipo 2 de hígado y de próstata en presencia de distintos sustratos artificiales, lo que parece indicar que la influencia de estas poliaminas está relacionada con su interacción con el sustrato proteico y no sobre la actividad catalítica en sí (Ahmed et al., 1985).

La fosforilación de sustratos endógenos por CK 1 pudo haber quedado enmascarada si estos sustratos fueran, a su vez, sustratos

de la caseína quinasa de tipo 2. Hay evidencias de sustratos comunes, identificados por fosforilación *in vitro* con ambas enzimas purificadas. Entre ellos se encuentran la glucógeno sintetasa (De Paoli-Roach et al., 1981 y Cohen et al., 1982), la RNA polimerasa I y la RNA polimerasa II (Dahmus, 1981) y un sustrato purificado a partir de células de hepatoma (Shinkawa et al., 1987).

No puede descartarse que esta actividad se encuentre inhibida o localizada de forma tal que su actividad no se manifieste o bien que haya quedado por debajo del nivel de detección del método.

Las bandas fosforiladas que no se modifican por agregados pueden también ser el producto de autofosforilaciones o deberse a la presencia de intermediarios fosforilados de enzimas. Casi todas las proteína quinasas se autofosforilan y si bien éstas no son proteínas abundantes, la autofosforilación es un proceso que por ser muy eficiente e independiente de la concentración proteica, permitiría la detección de las proteínas o subunidades fosforiladas. Por otra parte, Bill y Koshland han descripto la existencia de numerosas enzimas que tienen intermediarios fosforilados y pirofosforilados (Bill y Koshland, 1971).

En la literatura se encuentra que el estudio de los sustratos endógenos de las caseína quinasas se ha realizado por dos abordajes: 1) fosforilación de proteínas puras (los resultados de estas investigaciones aparecen resumidos en las tablas 5 y 6 de la

Introducción); 2) fosforilación *in vitro* en sistemas crudos o fracciones subcelulares, con las caseína quinasa endógenas o suplementando con CK I y/o CK II.

De este último enfoque se puede concluir: la fracción citosólico de hígado de rata contiene cuatro bandas proteicas fosforiladas por CK II, de 89000, 49000, 40000 y 25000 Daltones (Meggio et al., 1981); según estos autores la banda de 89000 correspondería a la glucógeno sintetasa, la de 49000 reúne las características de la calsecuestrina y la de 25000 podría ser la subunidad  $\beta$  de la CK II o el inhibidor 1 de la fosfatasa de fosfoproteínas. En la fracción microsomal se han encontrado seis proteínas fosforilables; una de 35000 Daltones y dos polipéptidos de 16000 Daltones asociados a ribosomas y tres proteínas de 91000, 79000 y 52000 Daltones asociadas a la membrana (Meggio et al., 1984). La caseína quinasa de tipo 2 de levadura que se encuentra asociada a ribosomas fosforila cuatro polipéptidos de la fracción ribosomal de 36000, 32000, 17000 y 12000 Daltones en presencia de espermina (Nuutinen y Londesborough, 1988).

La fosforilación de proteínas dependiente de AMPc también ha sido estudiada en numerosos organismos. En la ameba *Dictyostelium discoideum*, la estimulación con AMP<sub>c</sub> induce la fosforilación de una proteína de 47000 Daltones (Lubs-Haukeness y Klein, 1982). En el hongo *Coprinus macrorhizus*, el AMP<sub>c</sub> estimula la fosforilación de dos proteínas de peso molecular 64000 / 46000 e inhibe la fosforilación de una proteína de 18000. Usando mutantes

de *Saccharomyces cerevisiae* que requieren AMP<sub>c</sub> para su crecimiento, se encontró que el agregado del nucleótido, luego de su remoción, provoca la acumulación de cuatro fosfoproteínas de 76000, 65000, 56000 y 30000 Daltones (Wang y Sy, 1985). La adición de AMP<sub>c</sub> a extractos citoplasmáticos de células BHK en estado quiescente produce la fosforilación de dos proteínas mayores que 220000 Daltones y de proteínas de 140000, 76000 y 66000 e inhibe la fosforilación de una proteína de 96000 Daltones, cuando las células se encuentran en estado proliferativo el AMP<sub>c</sub> estimula la fosforilación de una proteína de 160000 Daltones (Kletzien et al., 1977).

El alcance de los estudios realizados en esta tesis no permite correlacionar ninguna de las bandas observadas con los sustratos conocidos para las caseína quinasas. No debe inferirse que el patrón de bandas obtenido en condiciones basales y con el agregado de AMP<sub>c</sub> constituye el espectro completo de proteínas fosforilables, sino más bien aquellas evidenciadas con las técnicas usadas.

Conocer el patrón y las principales bandas fosforiladas por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> y por Ck II por el método de fosforilación in situ puede resultar de utilidad para monitorear la fosforilación proteica en distintas situaciones fisiológicas del hongo, ya que consideramos que este sistema es el que mejor evidencia las fosforilaciones ocurridas in vivo ya que mantiene la localización intracelular de las enzimas y sus sustratos

respectivos y permite además simular distintas situaciones fisiológicas de la célula controlando la concentración intracelular de determinados efectores.

*Patricia Pardo*

*Silvia M. Moreno*



## BIBLIOGRAFIA

- 1) Ackerman, P., Glover, C. V. C. y Osheroff, N. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82 : 3164.
- 2) Adelstein, R. S. y Eisenberg, E. (1980) Annu. Rev. Biochem. 49 : 921.
- 3) Ahmad, Z., Camici, M., DePaoli-Roach, A.A., Roach, P.J. (1984) J. Biol. Chem. 259 : 3420.
- 4) Ahmed, K., Goueli, S. A. y Williams-Ashman, H. G. (1985) Biochem. J. 232 : 767.
- 5) Antoniw, J. F. y Cohen, P. (1976) Eur. J. Biochem. 68 : 45.
- 6) Atmar, V. J., Kuehn, G. D. y Casillas, E. R. (1981) J. Biol. Chem. 256 : 8275.
- 7) Baggio, B., Pinna, L.A., Moret, V. y Siliprandi, N. (1970) Biochim. Biophys. Acta 212 : 515.
- 8) Barker, W. C. y Dayhoff, M. O. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79 : 2836.
- 9) Bartnicki-García, S. (1968) J. Bacteriol. 96 : 1586.
- 10) Bartnicki-García, S. y Nickerson, W. J. (1962) J. Bacteriol. 84 : 829.
- 11) Ben-Neriah, Y., Bernards, A., Paskind, M., Daley, G. Q. y Baltimore, D. (1986) Cell 44 : 577.
- 12) Bertics, R.J. y Gill, G. N. (1985) J. Biol. Chem. 260 : 14642.
- 13) Blumenthal, D.K., Edelman, A. y Krebs, E. G. (1987) Annu Rev. Biochem. 56 : 567.
- 14) Boivin, P. y Galand, C. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 89 : 7.
- 15) Bradford, M. (1976) Anal. Biochem. 72 : 248.
- 16) Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B., Mercier, J.C. Felissier, J. P. FEBS Lett. 76 : 274.
- 17) Burnett, G. y Kennedy, E. F. (1954) J. Biol. Chem. 211 : 969.
- 18) Cantore, M. L. (1982) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires
- 19) Carroll, D., Santoro, N. y Marshak, D. R. (1988) Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol 53, pág. 91.

- 20) Chan, F. K. . Aldrich, R. G., Cook, R. G. y Busch, H. (1986) J. Biol. Chem. 261 : 1868.
- 21) Chang, K., Marcus, N. y Cuatrecasas, F. (1974) J. Biol. Chem. 249 : 6854.
- 22) Chock, P. B., Rhee, S. G. y Stadman, E. R. (1980) Annu. Rev. Biochem. 49 : 813.
- 23) Chock, P.B. y Stadman, E. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 : 2766.
- 24) Christmann, J. L. y Dahmus, M. E. (1981) J. Biol. Chem. 256 : 3326.
- 25) Clari, G. Pinna, L. A. y Moret, V. (1978) Bichim. Biophys. Acta 451 : 484.
- 26) Clo, C., Caldareva, C., Tantini, B., Benald. D, y Bachrach, U. (1979) Biochem. J. 182 : 641.
- 27) Cochet, C. y Chambaz, E. M. (1983) J. Biol. Chem. 258 : 1403.
- 28) Cochet, C., Gill, G. N., Meisenhelder, J., Cooper, J. A. y Hunter, T. (1984) J. Biol. Chem. 259 : 2553.
- 29) Cochet, C., Job, D. y Chambaz, E. M. (1977) FEBS Lett. 83 : 53.
- 30) Cochet, C., Job, D., Pirollet, F. y Chambaz, E. M. (1981) Biochim. Biophys. Acta 658 : 191.
- 31) Cohen, P. (1973) Eur. J. Biochem. 34 ; 1.
- 32) Cohen, P. (1978) Curr. Top. Cell. Regul. 14 : 117.
- 33) Cohen, P. (1982) Nature (London) 296 : 613.
- 34) Cohen, P. (1985) Eur. J. Biochem. 151 : 439.
- 35) Cohen , P., Foulkes, J. G., Goris, J., Hemmings, B., Ingebritsen, T. S. y Stewart, A. A. (1981) Metabolic Interconversion of Enzymes (ed. Holser, H. Springer; Heidelberg)
- 36) Cohen, S., Ushiro, H., Stoscheck, C. y Chinkers, M. (1982) J. Biol. Chem. 257 : 1523.
- 37) Colca, J. R., Wolf, B. A., Comeus, P. G. y McDaniel, M. L. (1985) Biochem. J. 228 : 529.
- 38) Cooper, J. A. Y King, C. S. (1986) Mol. Cell. Biol. 6 : 4467.

- 39) Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang-Feng, T. L., Chen, E., Waterfield, M. D. y Ullrich, A. (1986) *Science* 233 : 859.
- 40) Czech, M. P., Klarlund, J. K., Jagaloff, K. A., Bradford, A. F. y Lewis, R. E. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 : 11017.
- 41) Dahmus, M. E. (1976) *Biochemistry* 15 : 1821.
- 42) Dahmus, M. E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256 : 3319.
- 43) Damuni, Z y Reed, L. J. (1988) *Arch. Biochem. Biophys* 262 : 574.
- 44) Daniels, G. R., Atmar, V. J. Y Kuehn, G. D. (1981) *Biochemistry* 20 :2525.
- 45) DePaoli-Roach, A. A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259 : 12144.
- 46) DePaoli-Roach, A. A., Ahmad, Z., Camici, M., Lawrence, J. C. jr y Roach, P. J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258 : 1072.
- 47) DePaoli-Roach, A. A., Ahmad, Z. y Roach, P. J. (1981) *J. Biol. Chem.* 258 : 1072.
- 48) Desjardins, F. R., Lue, P. F., Liew, C. C. y Gornall, A. G. (1972) *Can. J. Biochem.* 50 : 1249.
- 49) Donella-Deana, A., Meggio, F. y Pinna, L. A. (1979) *Biochem. J.* 179 : 693.
- 50) Draetta, G., Brizuela, L., Potashkin, J. y Beach, D. (1987) *Cell* 50 : 319.
- 51) Dunbar, B. S. (1987) *Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques*, Plenum Press; New York and London, pag 246.
- 52) Embi, N., Rylatt, D. B. y Cohen, P. (1980) *Eur. J. Biochem.* 107 : 519.
- 53) Erikson, R. L., Collet, M.S., Erikson, E. y Purchio, A. F. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.* 76 : 6260.
- 54) Feige, J. J., Pirollet, F., Cochet, C y Chambaz, E. M. (1980) *FEBS Lett.* 121 : 139.
- 55) Figge, J., Webster, T., Smith, T. y Paucha, E. (1988) *J. Virol.* 62 : 1814.
- 56) Friedman, B., Frackelton, A. R., Ross, A. H., Connors, J. M., Fujiki, H., Sugimura, T. y Rosner, M. R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81 : 3034.

- 57) Friedman, D. L. y Larner, J. (1963) *Biochemistry* 2 : 669.
- 58) Fujitaki, J. M. y Smith, R. A. (1984) *Methods. Enzymol.* 107 : 203.
- 59) Ganapathi, M. K., Silberman, S. R., Paris, H y Lee, E. J. C. (1981) *J. Biol. Chem.* 256 : 3213.
- 60) Gibson, K., Tichonicky, L. y Kruh, J. (1974) *Biochimie* 56 : 1409.
- 61) Glover, C. V. C. (1986) *J. Biol. Chem.* 261 : 14349.
- 62) Glover, C. v. C., Shelton, E. R. y Brutlag, D. L. (1983) *J. Biol. Chem.* 258 : 3258.
- 63) Glynn, I. Y Chappell, J. (1966) *Biochem. J.* 90: 147.
- 64) Gupta, R. C., Vijarjaraj Reddy, M. y Randerath, K. (1982) *Carcinogenesis* 3 : 1081.
- 65) Gusev, N. B., Dobrovol'skij, A. B. y Severin, S. E. (1980) *Biochem. J.* 189 : 219. 66) Guthmann, M., Pastori, R. y Moreno, S. (1990) *Cellular Signalling* 2 : 395.
- 67) Haidle, C. W. y Storck, R. (1966) *J. Bacteriol.* 84 : 829.
- 68) Hanks (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81 : 3034.
- 69) Hathaway, G. M., Lubben, T. H. y Traugh, J. A. (1980) *J. Biol. Chem.* 256 : 11442.
- 70) Hathaway, G. M. y Traugh, J. A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254 : 762.
- 71) Hathaway, G. M. y Traugh, J. A. (1982) *Curr. Top. Cell. Regul.* 21 : 101.
- 72) Hathaway, G. M., Zoller, M. J. y Traugh, J. A. (1981) *J. Biol. Chem.* 256 : 11442.
- 73) Hayakawa, T., Perkins, J. P. y Krebs, E. G. (1975) *Biochemistry* 12 : 574.
- 74) Hemmings, B. A., Aitken, A., Cohen, F., Ryman, M. y Hofmann, F. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127 : 408.
- 75) Holmes, C. F. B., Kuret, J., Chisholm, A. K. y Cohen, P. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 870 : 408.
- 76) Hosey, M. M. y Tao, M. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 482 : 348.

- 77) Housey, G. M., O' Brian, C. A., Johnson, M. D., Kirschmeier, P. y Weinstein, J. B. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 : 1065.
- 78) Hunter, T (1987) Cell 50 : 823.
- 79) Hunter, T. y Cooper, J. A. (1985) Annu. Rev. Biochem. 54 : 897.
- 80) Hunter, T. y Cooper, J. A. (1986) The Enzymes, vol 17 (P. D. Boyer y E. G. Krebs, eds) pág 192.
- 81) Itarte, E. y Huang, K. P. (1979) J. Biol. Chem. 254 : 4052.
- 82) Itarte, E., Mori, M. A., Salavert, A., Pena, J. M., Bertomee, J. F. y Guinovart, J. J. (1981) Biochim. Biophys. Acta 658 : 334.
- 83) Itarte, E., Plana, M., Guasch, M. D. y Martos, C. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 117 : 631.
- 84) Jove, R., Kornbluth, S y Hanafusa, H. (1987) Cell 50 : 937.
- 85) Katoh, N, Kimura, S. y Sakurada, K (1985) J. Biol. Chem. 97 : 859.
- 86) Keller, R. K., Chandra, T., Schrader, W. T. y O Malley, B. W. (1976) Biochemistry 15 : 1958.
- 87) Kemp, B. E., Froscio, M., Rogers, A. y Murray, A. W. (1975) Biochem. J. 145 : 241.
- 88) Klarlund, J. K. y Czech, M. P. (1988) J. Biol. Chem. 263 : 15872.
- 89) Knopf, J. L., Lee, M., Sultzman, L. A., Kriz, R. W., Loomis, C. R., Hewick, R. M. y Bell, R. M. (1986) Science 234 : 1545.
- 90) Krebs, E. G. (1985) Biochem. Soc. Trans. 13 : 813.
- 91) Krebs, E. G. (1986) The Enzymes, vol 17, pág 3.
- 92) Krebs, E. G. y Beavo, J. A. (1979) Annu. Rev. Biochem. 48 : 923.
- 93) Krebs, E. G., Eisenman, R. N., Kuenzel, E. A., Litchfield, D. W., Lozeman, F. J., Luscher, B. y Sommercorn, J. (1988) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., vol 53 pág 77.
- 94) Krebs, E. G. y Fischer, E. H. (1956) Biochim. Biophys. Acta 20 : 150.
- 95) Krebs, E. G., Graves, D. J. y Fischer, E. H. (1959) J. Biol. Chem. 234 : 2867.

- 96) Kudlicki, W., Grankowski, N. y Gasior, E. (1978) Eur. J. Biochem. 84 : 493.
- 97) Kudlicki, W., Szyska, R. y Gasior, E. (1984) Biochim. Biophys. Acta 784 : 102.
- 98) Kuenzel, E. A., Mulligan, J. A., Sommercorn, J. y Krebs, E. G. (1987) J. Biol. Chem. 262 : 9136.
- 99) Kumar, R. y Tao, M. (1975) Biochim. Biophys. Acta 410 : 87.
- 100) Laemmlí, U. K. (1970) Nature 227 : 680.
- 101) Larsen, A. y Sypherd, P. S. (1974) J. Bacteriol. 117 : 432.
- 102) Laurent, T. C. y Killander, J. (1964) J. Chromat. 14 : 317.
- 103) Lee, M. G. y Nurse, P. (1987) Nature 327 : 31.
- 104) Leiderman, L., Criss, W. Y Takami, O. (1985) Biochim. Biophys. Acta 844 : 95.
- 105) Lengyel, P. (1982) Annu. Rev. Biochem. 51 : 251.
- 106) Lerch, K., Muir, L. W. y Fischer, E. H. (1975) Biochemistry 14 : 2015.
- 107) Lipmann, F. (1933) Biochem. Z. 262 : 3.
- 108) Lipmann, F. y Levene, P. A. (1932) J. Biol. Chem. 98 : 109.
- 109) London, J. M., Levin, D. H., Matts, R. L., Thomas, S. G., Petryshyn, R. y Chen, J. J. (1986) The Enzymes, vol. 18 pág 359.
- 110) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. C. y Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193 : 265.
- 111) Ma, J. y Ptashne, M. (1987) Cell 48 : 647.
- 112) Mach, M., Ebert, P., Popp, R. y Ogilvie, A. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 104 : 1327.
- 113) Maenpaa, P. H. (1977) Biochim. Biophys. Acta 498 : 294.
- 114) Marshall, M., Ruao, G., Van Etten, J. y Nickerson, K. (1979) Current Microbiol. 2 : 187.
- 115) Martin, R. G. y Ames, B. (1961) J. Biol. Chem. 236 : 1372.
- 116) Martinez, R., Mathey-Prevot, B., Bernards, A. y Baltimore, D. (1987) Science 237 : 411.

- 117) Matsumura, S. y Takeda, M. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 289 : 237.
- 118) Meggio, F., Agostinis, F y Pinna. L. A. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 846 : 248.
- 119) Meggio, F., Grankowski, N., Kudlicki, W., Szyska, R., Gasior, E. y Pinna, L. (1986) *Eur. J. Biochem.* 145 : 593.
- 120) Meggio, F., Marchiori, F., Borin, G., Chessa, G. y Pinna, L. (1984b) *J. Biol. Chem.* 259 : 14576.
- 121) Meggio, F. y Pinna, L. (1984) *Eur. J. Biochem.* 145 : 593.
- 122) Meggio, F., Pinna, L. A., Marchiori, F. Y Borin G. (1983) *FEBS Lett.* 162 : 235.
- 123) Moreno, S., y Passeron, S. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 199 : 321.
- 124) Moreno, S., Pastori, R y Passeron, S. (1983) *Mol. Cell. Biochem.* 52 : 13.
- 125) Moreno, S., Faveto, C. y Passeron, S. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 180 : 225.
- 126) Mulner-Lorillon, O., Marot, J., Cayla, X., Pouchle, R. y Belle, R. (1988) *Eur. J. Biochem.* 171 : 107.
- 127) Murray, A. W., Froschio, M. y Rogers, A. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71 : 1175.
- 128) Murray, M. G., Guilfoyle, T. J. y Key, J. L. (1978a) *Plant. Physiol.* 61 : 1023.
- 129) Murray, M. G., Guilfoyle, T. J. y Key, J. L. (1978b) *Plant. Physiol.* 62 : 434.
- 130) Neumann, J. R., Owens, B. B. e Ingram, V. M. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 197 : 447.
- 131) Nuntinen, M y Londesborough, J. (1988) *Second Messengers and Phosphoproteins* 12 : 197.
- 132) Ohno, S., Kawasaki, H., Imajoh, S., Suzuki, K., Inagaki, M., Jokokura, H., Sakoh, T. e Hikada, H. (1987) *Nature* 325 161.
- 133) Ono, Y., Kurokawa, T., Fujii, T., Kawahara, K., Igarishi, K Kikkawa, V., Ojita, K. y Nishizuka, Y. (1986a) *FEBS Lett.* 206 : 347.
- 134) Ono, Y., Kurokawa, T., Kawahara, K., Nishimura, O., Marumoto, R., Igarishi, K., Sugino, Y., Kikkawa, U., Ojita, K. Y Nishizuka, Y. (1986b) *FEBS Lett.* 203 : 111.

- 135) Ossikovski, E. y Walter, R. D. (1984) *Molec. and Biochem. Parasitol.* 12 : 294.
- 136) Padmanabham, R. y Glover, C. V. C. (1987) *J. Biol. Chem.*
- 137) Fant, H., Gallant, P. y Ganier, H. (1986) *J. Biol. Chem.* 261 : 2968.
- 138) Parker, P. J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M. D. y Ullrich, A. (1986) *Science* 233 : 853.
- 139) Parkinson, J. S. (1988) *Cell* 53 : 1.
- 140) Pardo, P. y Moreno, S. (1988) *Second Messengers and Phosphoproteins* 12 : 183.
- 141) Pastori, R., Kerner, N., Moreno, S. y Passeron, S. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101 : 663.
- 142) Patterson, M., Sciasfani, R. A., Fangman, W. L. y Rosamond, J. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6 : 1590.
- 143) Paveto, C., Epstein, A. y Passeron, S. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 169 : 449.
- 144) Paveto, C., Passeron, S., Corbin, J.D y Moreno, (1989) *Eur. J. Biochem.* 179 : 429.
- 145) Pegg, A. E. (1986) *Biochem. J.* 234 : 249.
- 146) Picton, C., Woodgett, J. R., Hemmings, B. A. y Cohen, P. (1982) *FEBS Lett.* 150 : 191.
- 147) Pinna, L. A., Donella-Deana, A. y Meggio, F. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87 : 114.
- 148) Pinna, L. A., Meggio, F. Murchioni, F. y Borin, G. (1984) *FEBS Lett.* 171 : 211.
- 149) Pirollet, F., Feige, J. J., Cochet, C., Job, D. y Chambaz, E. M. ((1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100 : 613.
- 150) Plana, M., Guasch, M. D. e Itarte, E. (1985) *Biochem. J.* 230 : 69.
- 151) Proud, C. G. (1986) *Trends. Biochem. Sci.* 11 :
- 152) Puca, , G. A., Nola, E., Sica, V. y Bresciani, F. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49 : 970.
- 153) Quarless, S. A. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133 : 981.



- 154) Rabinowitz, M. y Lipmann, F. (1960) *J. Biol. Chem.* 235 : 1043.
- 155) Reed, S. J., Hadwiger, J. A. y Lorencz, A. T. (1935) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80 : 3237.
- 156) Reimann, E. Walsh, D. y Krebs, E. G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246 : 1986.
- 157) Renart, M. Sastre, L. y Sebastianm, S. (1984) *Eur. J. Biochem.* 145 : 47.
- 158) Reyes, E., Novas-Ledieu, M. y Garcia Mendoza, C. (1983) *Curr. Microbiol.* 9 : 301.
- 159) Rigobello, M. P., Carignani, G. y Pinna, L. A. (1980) *FEBS Lett.* 121 : 225.
- 160) Rigobello, M. P., Jori, E., Carignani, G. y Pinna, L. A. (1982) *FEBS Lett.* 144 : 354.
- 161) Rodnight, R. y Lavin, B. E. (1964) *Biochem. J.* 93 : 84.
- 162) Rosen, O. M., Herrera, R., Olowe, Y., Petruzelli, L. M. y Cobb, M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 : 4055.
- 163) Roskoski, R. (1983) *Methods Enzymol.* vol 99, pág. 3.
- 164) Ruiz-Herrera, J. y Calvo-Méndez, C. (1987) *Exp. Mycol.* 11 : 287.
- 165) Russell, P. y Nurse, P. (1987a) *Cell* 49 : 559.
- 166) Russell, P y Nurse, P. (1987b) *Cell* 49 : 569.
- 167) Saxena, A., Padmanbhan, R. y Glover, C. V. C. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7 : 3409.
- 168) Seigelchifer, M. y Passeron, S. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 229 : 403.
- 169) Seigelchifer, M. y Passeron, S. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 238 : 353.
- 170) Schacter, E., Boon Cook, F. y Stadman, E. R. (1984) *J. Biol. Chem.* 259 : 12252.
- 171) Schieven, G., Thorner, J. y Martin, G. S. (1986) *Science* 231 : 390.
- 172) Schuber, F. (1989) *Biochem. J.* 260 : 1.

- 173) Showers, M. D. y Maurer, R. A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261 : 16288.
- 174) Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R. F., Roe, B. A. y Canaani, E. (1986) *Cell* 47 : 277.
- 175) Siegel, L. M. y Monty, K. J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 112 : 346.
- 176) Singh, T. J. Y Huang, K. P. (1985) *FEBS Lett.* 190 : 84.
- 177) Simanis, V. y Nurse, P. (1986) *Cell* 45 : 261.
- 178) Simkowski, K. W. y Tao. M. (1980) *J. Biol. Chem.* 255 : 6456.
- 179) Smith, D. L., Chen, C. C., Bruegger, B. B., Holtz, S. L., Halpern, R. M. y Smith, R. A. (1974) *Biochemistry* 13 : 3780.
- 180) Soderling, T. (1990) *J. Biol. Chem.* 265 : 1823.
- 181) Sommercorn, J. y Krebs, E. G. (1987) *J. Biol. Chem.* 262 : 3839.
- 182) Sommercorn, J., Mulligan, J. A., Lozeman, F.J. y Krebs, E. G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 : 8834.
- 183) Stadman, E. R. y Chock, P. B. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 : 2761.
- 184) Stadman, E. R. y Chock, P. B. (1978) *Curr. Top. Cell. Regul.* 13 : 53.
- 185) Stetler, D. A. y Rose, K. M. (1982) *Biochemistry* 21 : 3721.
- 186) Stetler, D. A., Seidel, B. L. y Jacob, S. T. (1984) *J. Biol. Chem.* 259 : 14481.
- 187) Stevens, L. (1981) *Medical Biology* 59 : 308.
- 188) Struhl, K. (1988) *Nature* 332 : 649.
- 189) Sutherland, E. W. y Wosilait, W. D. (1955) *Nature* 175 : 169.
- 190) Szyska, R., Kudlicki, W., Grankowski, N. y Gasior, E. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 838 : 171.
- 191) Tabor, C. y Tabor, H. (1976) *Annu. Rev. Biochem.* 45 : 285.
- 192) Takeda, M., Yamamura, H. y Ohga, Y. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42 : 103.
- 193) Takio, K., Kuenzel, E. A., Walsh, K. A. y Krebs, E. G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 : 4851.

- 194) Tao, M., Conway, R. y Cheta, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255 : 2563.
- 195) Taylor, A., Allende, C. C., Weinmann, R. y Allende, J. E. (1987) *FEBS Lett.* 226 : 109.
- 196) Thoen, C., Van Hove, L., Piot, E. y Slegers, H. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 783 : 105.
- 197) Thornburg, W. y Lindell, T. J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252 : 6660.
- 198) Thornburg, W., Gamo, S., O' Malley, A. F. y Lindell, T. J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 571 : 35.
- 199) Thornburg, W., O' Malley, A. F. y Lindell, T. J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253 : 4638.
- 200) Tipper, J. P., Bacon, G. W., Witters, L. A. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 227 : 386.
- 201) Traugh, J. A. y Sharp, S. B. (1977) *J. Biol. Chem.* 252 : 3738.
- 202) Traugh, J. A. y Traut, R. R. (1974) *J. Biol. Chem.* 249 : 1207.
- 203) Tuazon, F. T., Pang, D. T., Shafer, J. A. y Traugh, J. A. (1985) *J. Cell. Biochem.* 28 : 159.
- 204) Uhler, M. D., Chrivia, J. C. y McKnight, G. S. (1986) *J. Biol. Chem.* 261 : 15630.
- 205) Verma, R. y Chen, K. (1986) *J. Biol. Chem.* 261 : 2890.
- 206) Villar-Palassi, C. y Kumon, A. (1981) *J. Biol. Chem.* 256 : 7409.
- 207) Walseth, T. y Johnson, R. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 562 : 11.
- 208) Walsh, D. A., Perkins, J. P. y Krebs, E. G. (1978) *J. Biol. Chem.* 243 : 3763.
- 209) Walton, G. M., Siess, J. y Gill, G. N. (1985) *J. Biol. Chem.* 260 : 4745.
- 210) Weber, K. y Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244 : 4405.
- 211) Weller, M. (1979) *Protein Phosphorylation* (Languardo, J. R., ed., London) pág. 112.
- 212) Yan, T. J. y Tao, M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257 : 7044.

- 213) Zandomei, R. y Weinmann, R. (1984) J. Biol. Chem. 259 :  
14804.

## ABREVIATURAS

AMP <sub>c</sub>	adenosina 3'-5' monofosfato ciclico.
ATP	adenosina 5'trifosfato.
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP	adenosina 5' trifosfato conteniendo fosfato $\gamma$ radioactivo
BSA :	seroalbúmina bovina
CK I y II :	caseina quinasas de tipo I y de tipo II
DEAE :	dietilaminoetil
EDTA :	ácido etilendiamintetraacético
EGTA :	ácido etilenbis(oxietilennitrilo) tetracético.
KD :	kilodaltones
K <sub>m</sub> :	constante de Michaelis
P :	fosfato unido a proteínas
PEI :	polietilenimino
FMSF :	fluoruro de fenilmetilensulfonilo
S :	sobrenadante
SDS :	dodecilsulfato de sodio
TCA :	ácido tricloroacético

Quiero expresar mi agradecimiento:

a la Dra Silvia Moreno por iniciarme en la investigación,

a la Dra Susana Passeron por su apoyo,

al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas,

a mis compañeros de laboratorio,

al personal técnico del laboratorio de Biología Molecular, Noemí Arguello, Alicia Alcaraz y Emma Balderramos,

al Dr Héctor A. Lucero por la enseñanza de las técnicas de separación de aminoácidos fosforilados,

a los miembros del Departamento de Química Biológica,

a los integrantes del Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular,

al Ingeniero Pinto y al personal de mantenimiento de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,

a Norbero Malarini (dibujos) y Marcelo Lamami (fotos),

a los profesores de la cátedra de Biología Molecular y el Curso Superior de Biología Molecular y Microbiología,

a Anny Spier.