

Tesis de Posgrado

Caracterización molecular de una fosfoproteína novel intermediaria en el mecanismo de acción de hormonas proteicas

Finkielstein, Carla V.

1998

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

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

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

Cita tipo APA:

Finkielstein, Carla V.. (1998). Caracterización molecular de una fosfoproteína novel intermediaria en el mecanismo de acción de hormonas proteicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3008_Finkielstein.pdf

Cita tipo Chicago:

Finkielstein, Carla V.. "Caracterización molecular de una fosfoproteína novel intermediaria en el mecanismo de acción de hormonas proteicas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3008_Finkielstein.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Caracterización molecular de una fosfoproteína novel intermediaria en
el mecanismo de acción de hormonas proteicas.

Lic. Carla V. Finkielstein

Director: Prof. Dr. Ernesto J. Podestá

Departamento de Bioquímica Humana
Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires
- Mayo, 1998 -

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Molecular characterization of a novel phosphoprotein intermediary in
the mechanism of action of protein hormones

Lic. Carla V. Finkielstein

Director: Prof. Dr. Ernesto J. Podestá

Departamento de Bioquímica Humana
Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires

Thesis submitted for the Ph degree of the Buenos Aires University

- May, 1998-

A mis padres
que son una fuente constante de estímulo
A Daniel
con todo mi amor

L'imagination au pouvoir
(Paredes de Paris: Sorbona, Mayo del 68)

Finalmente llegué a lo que he dado en llamar, la última hoja de mi Tesis. Me parece que es el momento de agradecer a todos aquellos que directa o indirectamente ayudaron a la realización de este trabajo. En particular quiero agradecer

Al Dr. E.J. Podestá quien fue mi Director de Tesis durante estos años y quien tuvo a su cargo la difícil tarea de guiarme durante esta etapa. Por estímulo permanente y por apoyar esta línea de trabajo aún en los momentos mas críticos.

Al Dr. Gerardo Piroli por la colaboración en los experimentos de hibridación in situ.

A mis compañeros de laboratorio Isabel Neuman, Pablo Mele, Cristina Paz, Fabiana Cornejo Maciel, Carlos Mendez, Laura Dada, Cora Cymering y Paula Maloberti por los gratos momentos que hemos compartido.

En particular quiero agradecerles a Cristina Paz, Cora Cymering y Paula Maloberti que siempre que necesite una mano extra en los experimentos estuvieron permanentemente dispuestas a ayudarme.

A Irene y osvaldo por los buenos momentos compartidos.

El hecho de que esta Tesis este hoy terminada se debe al esfuerzo de un grupo de amigos que se tomaron la molestia de reemplazar sus momentos libres por la lectura de alguna de las tantas versiones o el diseño de algunas figuras. En particular quiero agradecerle a Cristina Borges, Cora y Ruth por las correcciones de redacción y a Mariano por los gráficos.

A mis Padres por su constante estímulo e iniciativa y por estar siempre a mi lado.

A Daniel que siempre estuvo a mi lado durante esta Tesis, que me ayudó en cada uno de los momentos difíciles por los que pasé y que nunca dejó de alentarme para seguir adelante.

A la Universidad de Buenos Aires que me brindó las becas necesarias para realizar este trabajo de investigación.

Trabajos previos de nuestro laboratorio han permitido caracterizar una fosfoproteína novel (p43), intermediaria en la síntesis de esteroides en la zona fasciculata de la corteza adrenal de rata (Paz C. *et al.* (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**:709-716). En la presente Tesis, se describe la caracterización molecular de p43 así como también la regulación hormonal del transcripto. Los resultados obtenidos mostraron que p43 es homóloga a una acil-CoA tioesterasa mitocondrial.

La secuencia aminoacídica deducida de la proteína presentó sitios consenso de fosforilación para diferentes proteínas quinasas y un *motif* para serina lipasa. Anticuerpos dirigidos contra un péptido sintético que incluye dicho *motif* y otro contra la región N-terminal de p43, bloquearon la actividad biológica de la proteína. El transcripto de p43 fue detectado en ovario de ratas pseudopreñadas, en zona fasciculata y glomerulosa de adrenal de rata, en una línea tumoral de células de Leydig, en cerebro de ratón y en placenta humana. El tratamiento de ratas con dexametasona (Dx) provoca una disminución en los niveles del ARNm de p43 de manera dosis-dependiente en adrenales de rata. El tratamiento posterior con ACTH no sólo revierte el efecto de la Dx, sino que produce un aumento rápido (5 min) en los niveles del mensajero alcanzando un máximo a los 15 min (62%) y retornando a los valores basales a los 30 min posteriores al estímulo. El tratamiento con actinomicina D o cicloheximida antes del estímulo con ACTH provoca una disminución o un aumento en los niveles del ARNm de p43 respectivamente. Estos resultados relacionan por primera vez que una actividad de acil-CoA tioesterasa está involucrada en los procesos esteroidogénicos.

Palabras claves: ácido araquidónico, acil-CoA tioesterasa, fosforilación y esteroidogénesis.

We have previously reported the purification of a phosphoprotein (p43) intermediary in steroid synthesis from adrenal zona fasciculata (Paz C. *et al.* (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**:709-716). Here we describe the cloning and sequencing of a cDNA encoding p43 as well as the hormonal regulation of p43 transcript. The protein resulted homologous to a very recently described mitochondrial peroxisome proliferator-induced very-long-chain acyl-CoA thioesterase. The deduced amino acid sequence of the protein shows consensus sites for phosphorylation by different protein kinases, and a lipase serine motif. Antibodies raised against a synthetic peptide that includes the lipase serine motif and against the N-terminal region of p43 block the action of the protein. The transcript of p43 was detected in ovary of pseudopregnant rats, rat adrenal zona fasciculata and glomerulosa, mouse Leydig tumor cell line, rat brain and human placenta. Inhibition of adrenocorticotropin hormone (ACTH) release and steroid synthesis by dexamethasone produced a dose-dependent decrease in the abundance of the adrenal transcript. The transcript was induced by *in vivo* stimulation of the adrenals with ACTH. The effect had a rapid onset (5 min), reached maximal stimulation (62%) at 15 min and returned to basal levels at 30 min. ACTH effect on p43 transcript was inhibited by actinomycin D and enhanced by cycloheximide. Our results provide the first evidence linking acyl-CoA thioesterases, with very-long-chain specificities, and a protein intermediary in steroid synthesis, thereby supporting a regulatory role for acyl-CoA thioesterases in steroidogenic tissues.

Key words: acyl-CoA thioesterase; arachidonic acid; phosphorylation; steroidogenesis.

AA, ácido araquidónico; **All**, angiotensina II; **act.D**, actinomicina D; **ACTH**, hormona adrenocorticotrófica; **ADNc**, ácido desoxirribonucleico copia; **ADNds**, ácido desoxirribonucleico doble cadena; **BAAT**, ácido biliar-CoA aminoácido N-aciltransferasa; **CaMKII**, proteína quinasa Ca^{2+} -Calmodulina dependiente; **Chx**, cicloheximida; **CSCC**, *cholesterol side chain cleavage*; **DAG**, diacilglicerol; **DBI**, *diazepam binding inhibitor*; **Dx**, dexametasona; **FSH**, hormona folículo estimulante; **HL**, hormona luteinizante; **HETE**, ácido hidroxieicosatetraenoico; **HPETE**, ácido hidroperoxieicosatetraenoico; **IP₃**, inositol 1,4,5-trifosfato; **IPTG**, isopropil tiogalactósido; **LCAH**, hiperplasia lipóide congénita; **MA-10**, línea tumoral de células de Leydig; **mCTE-I**, acil-CoA tioesterasa citosólica de *Mus musculus*; **PBR**, *peripheral benzodiazepine receptor*; **PCR**, reacción en cadena de la polimerasa; **PI**, fosfatidil inositol; **PIP**, fosfatidilinositol 4-monofosfato; **PIP₂**, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; **PKA**, proteína quinasa dependiente de AMPc; **PKC**, proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos; **PLA₂**, fosfolipasa A; **PLC**, fosfolipasa C; **PLD**, fosfolipasa D; **PMA**, ésteres de forbol; **PP1**, fosfatasa de tipo 1; **PP2**, fosfatasa de tipo 2; **5' RACE**, *rapid amplification of cDNA ends*; **rCTE-I**, acil-CoA tioesterasa citosólica de *Rattus norvegicus*; **rMTE-I**, acil-CoA tioesterasa mitocondrial de *Rattus norvegicus*; **RPTK**, receptor con actividad de tirosina quinasa; **RT-PCR**, transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa; **SAP**, *steroidogenesis activator polypeptide*; **SCP2**, *sterol carrier protein 2*; **StAR**, *steroidogenic acute regulatory protein*; **Y1**, línea celular de tumor de adrenal; **7TMS**, receptores siete segmentos transmembrana; **3'UTR**, región no codificante 3'; **5' UTR**, región no codificante 5'.

	Página
INTRODUCCION.....	1 - 80
<u>I La modificación covalente de proteínas como respuesta a señales extracelulares</u>	1 - 12
<i>I-1 Proteínas quinasas versus proteínas fosfatasa</i>	3
<i>I-1.1 Proteínas quinasas: Generalidades</i>	3
<i>I-1.2 Proteínas fosfatasa: Generalidades</i>	6
<i>I-1.3 Regulación de la actividad celular por la acción conjunta y coordinada de proteínas quinasas y fosfatasa..</i>	8
<i>I-1.4 Cascadas de proteínas quinasas y sus interrelaciones (cross-talk)</i>	11
<i>I-2 De la recepción de la señal extracelular a la activación de las proteínas quinasas</i>	13
<i>I-2.1 Moléculas receptoras</i>	13
<i>I-2.2 Moléculas transductoras: Proteínas G</i>	15
<i>I-2.3 Moléculas efectoras: adenilil ciclaza y fosfolipasa C</i>	16
<i>I-2.3.1 Adenilil ciclaza</i>	16
<i>I-2.3.2 Fosfolipasa C</i>	17
<i>I-3 Los procesos que suceden a la activación de las proteínas quinasas y que generan la respuesta celular</i>	19
<u>II Mecanismos de transducción de señales desencadenados por hormonas esteroideogénicas</u>	21 - 49
<i>II-1 Mecanismo de señalización desde el ligando a la activación de proteínas quinasas</i>	22

II-1.1 Mecanismo de acción de la hormona Adrenocorticotrófica (ACTH)	22
II-1.1.1 Generalidades	22
II-1.1.2 ACTH: Relación entre estructura y actividad	23
II-1.1.3 Receptor de ACTH	24
II-1.1.4 El sistema transductor de ACTH en la corteza adrenal	26
II-1.2 Mecanismo de acción de la hormona luteinizante (LH)	30
II-1.2.1 Generalidades	30
II-1.2.2 Estructura de la molécula de LH	31
II-1.2.3 Receptor de LH	32
II-1.2.4 El sistema transductor de LH en las gónadas	33
II-1.3 Mecanismo de acción de Angiotensina II (All)	36
II-1.3.1 Generalidades	36
II-1.3.2 Estructura de la molécula de All	36
II-1.3.3 Receptor de All	37
II-1.3.4 El sistema transductor de All en la corteza adrenal	38
II-1.4 Mecanismo de acción del K^+	41
II-2 Principales proteínas quinasas involucradas en el mecanismo de acción de las hormonas esteroideogénicas	42
II-2.1 Proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA)	42
II-2.2 Proteína quinasa C (PKC)	45
II-2.3 Proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} / calmodulina (CaMKII)	48
II-2.4 Síntesis comunes de acción de los diferentes agonistas que regulan la esteroideogénesis	49

<u>III El ácido araquidónico y sus metabolitos en la síntesis de hormonas esteroideas</u>	50 - 60
III-1 Generalidades	50
III-2 Síntesis del ácido araquidónico (AA)	51
III-3 Sistemas involucrados en la liberación de ácido araquidónico	51
III-4 Caracterización estructural y funcional de la fosfolipasa A₂ (PLA₂)	52
III-5 Regulación de la actividad de la fosfolipasa A₂	54
III-5.1 Acción del Ca²⁺	54
III-5.2 Regulación de la actividad de la PLA₂ por fosforilación	55
III-6 Metabolismo del ácido araquidónico	56
III-7 La función del ácido araquidónico y sus metabolitos en la esteroidogénesis	58
<u>IV Regulación crónica y aguda de la esteroidogénesis</u>	61 - 80
IV-1 Introducción	61
IV-2 Mecanismo de regulación crónica de la esteroidogénesis	63
IV-3 Mecanismo de regulación aguda de la esteroidogénesis	65
IV-3.1 La función de la traducción en la síntesis proteica	65
IV-3.2 La función de la transcripción	67
IV-3.3 La función del citoesqueleto en la esteroidogénesis	68
IV-3.4 La función de la fosforilación	70
IV-4 Proteínas inducidas en respuesta a la acción de hormonas esteroidogénicas	71
IV-4.1 Sterol carrier protein 2 (SCP2)	71
IV-4.2 Steroidogenesis activator polypeptide (SAP)	73

IV-4.3 <i>Peripheral benzodiazepine receptor (PBR)</i>	74
IV-4.4 <i>Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)</i>	76
IV-4.5 <i>p43</i>	79
OBJETIVOS	81 - 82
MATERIALES Y METODOS	83 - 110
<u>I- Materiales</u>	83 - 90
I-1 <i>Reactivos utilizados</i>	83
I-2 <i>Soluciones y medios de cultivo</i>	84
I-3 <i>Oligonucleótidos y sondas</i>	87
I-4 <i>Animales</i>	89
I-5 <i>Cepas de bacterias y fagos</i>	90
<u>II- Métodos</u>	90 - 110
II-1 <i>Cultivo de bacterias</i>	90
II-2 <i>Titulación de la biblioteca de ADNc de λgt11 y λZAPII</i>	91
II-3 <i>Rastreos en bibliotecas de ADNc : λgt11 y λZAPII</i>	91
II-3.1 <i>Aislamiento del ADN de los fagos de λgt11</i>	93
II-3.1.1 <i>Digestión con endonucleasas de restricción</i>	93
II-3.1.2 <i>Purificación de fragmentos de ADN</i>	94
II-3.2 <i>Subclonado de los fragmentos de ADN</i>	95
II-3.2.1 <i>Defosforilación del vector y reacción de ligación</i>	95
II-3.2.2 <i>Preparación de células competentes</i>	95
II-3.2.3 <i>Transformación de células JM109 o XL1-Blue</i>	96

II-3.2.4 <i>Purificación del ADNds de los plásmidos recombinantes</i>	96
II-3.3 <i>Escisión in vivo de plásmidos a partir de λZAPII</i>	97
II-3.4 <i>Secuenciación de los fragmentos de ADN</i>	97
II-3.4.1 <i>Secuenciación directa de productos de PCR</i>	99
II-4 <i>Obtención y tratamiento de muestras de ARN</i>	100
II-4.1 <i>Extracción de ARN</i>	100
II-4.2 <i>Northern blot</i>	101
II-4.3 <i>RT-PCR y 5' RACE</i>	102
II-4.3.1 <i>Subclonado en pGEM-T de los productos amplificados</i>	104
II-5 <i>Obtención y tratamiento de muestras de ADN</i>	105
II-5.1 <i>Extracción de ADN genómico</i>	105
II-5.1.1 <i>Amplificación de fragmentos de ADN genómico por PCR</i>	105
II-5.2 <i>Southern blot y dot blot</i>	105
II-5.2.1 <i>Marcación de sondas por nick translation</i>	106
II-6 <i>Obtención de la fracción citosólica de la zona fasciculata de adrenales de rata</i>	107
II-6.1 <i>Western blot</i>	107
II-7 <i>Hibridación in situ</i>	108
II-8 <i>Transcripción y traducción in vitro</i>	109
II-9 <i>Radioinmunoensayo</i>	110
II-10 <i>Análisis de secuencias y alineamientos</i>	110
 RESULTADOS Y DISCUSION.....	 111 - 200
 <u>I- Clonado y caracterización molecular de p43</u>	 111 - 187

I-1 <i>Introducción</i>	111
I-2 <i>Relación entre el clon D12Ucla1 y p43</i>	112
I-3 <i>Transcripción y traducción in vitro del clon D12Ucla1</i>	121
I-4 <i>Identificación de p43 en zona fasciculata de adrenal de rata por RT-PCR</i>	127
I-5 <i>Aislamiento y caracterización de clones de p43 obtenidos a través de rastreos en diferentes bibliotecas</i>	129
I-5.1 <i>Rastreo de una biblioteca λZAPII de adrenal</i>	129
I-5.2 <i>Rastreo de una biblioteca λgt11 de riñón</i>	134
I-6 <i>Detección de extremos 5' por RT-PCR</i>	148
I-7 <i>Estudios de homologías de secuencia con otras proteínas</i>	156
I-8 <i>Análisis de la estructura primaria de p43</i>	163
I-8.1 <i>Identificación de un sitio de serina esterasa en p43</i>	163
I-8.2 <i>Identificación de sitios consenso de fosforilación y de unión al ATP en p43</i>	169
I-9 <i>Distribución tisular del ARNm de p43</i>	171
I-9.1 <i>Identificación del transcripto de p43 en tejidos esteroideogénicos</i>	171
I-9.2 <i>Identificación del transcripto de p43 en tejidos no esteroideogénicos</i>	179
I-9.3 <i>Hibridación in situ del ARNm de p43</i>	183
I-10 <i>Análisis genómico de p43</i>	186
 <u>II <i>Regulación de los niveles de ARNm de p43 en la fase aguda de la esteroideogénesis</i></u>	 188 - 200
 II-1 <i>Efecto de la dexametasona sobre los niveles de ARNm de p43</i>	 188

II-2 Efecto del ACTH sobre los niveles de ARNm de p43.....	190
II-2.1 Efecto de la actinomicina D sobre los niveles de ARNm de p43.....	192
II-2.2 Efecto de la cicloheximida sobre los niveles de ARNm de p43.....	195
II-3 Identificación de p43 en la fracción citosólica de la zona fasciculata de la glándula adrenal de animales tratados con cicloheximida.....	198
II-4 Conclusión de los resultados presentados.....	200
 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	 201 - 206
 BIBLIOGRAFIA	 207 - 241

INTRODUCCION

I La modificación covalente de proteínas como respuesta a señales extracelulares

Hace cuatro mil millones de años, la tierra era un paraíso molecular. Algunas moléculas se multiplicaban de un modo "ineficaz", compitiendo en la búsqueda de bloques constructivos y produciendo muchas copias de sí mismas. Sin embargo, la evolución estaba ya definitivamente en marcha, a través de las mutaciones (cambios repentinos en la herencia) y la eliminación de las variedades menos eficientes. Las moléculas llegaron a unirse e interactuar entre sí dando origen a funciones especializadas, hasta constituir lo que fue probablemente la primera célula. Mil millones de años después aparecieron los primeros organismos pluricelulares, quizás porque una mutación impidió que una sola célula se separara después de dividirse en dos.

A principios del siglo pasado, C. Darwin y A.R. Wallace postularon que el mecanismo de la evolución es la selección natural. Hicieron hincapié en que la naturaleza es prolífica, es decir que nacen muchos más animales y plantas de los que pueden sobrevivir y que el medio ambiente selecciona las variedades que son accidentalmente más adecuadas para ello. Los cambios moleculares se transmiten y proporcionan la materia prima de la evolución. El medio ambiente selecciona aquellos cambios que favorecen la supervivencia, obteniéndose una serie de lentas transformaciones de una forma de vida en otra, lo que finalmente origina la aparición de nuevas especies.

Las células interactúan con su ambiente y responden a los cambios en su entorno porque la supervivencia en un medio hostil es parte de la adaptación. En los organismos pluricelulares, esta adaptación exige el funcionamiento de mecanismos mucho más complejos, que finalmente conducirán al funcionamiento armónico del organismo y a su supervivencia.

Este requerimiento resulta evidente al advertir la complejidad de los mecanismos homeostáticos desarrollados en los organismos evolutivamente más avanzados.

En la difícil tarea de sobrevivir, las células utilizan una variedad de moléculas y mecanismos de señalización para comunicarse entre sí y responder a cambios en el medio ambiente. Algunas de estas moléculas incluyen hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y neurotransmisores y sus mecanismos de señalización resultan de la interacción con sus moléculas receptoras. En algunos casos, el resultado es la liberación (o síntesis) intracelular de segundos mensajeros y en otros el incremento en una actividad enzimática intrínseca de las moléculas receptoras. Se producirá entonces, una cascada de reacciones que permitirá no sólo la amplificación del estímulo original, sino también la regulación coordinada de procesos celulares independientes mediante acciones pleiotrópicas. Existe un considerable consenso en creer que de los dos mecanismos generales utilizados en la regulación de los procesos metabólicos, esto es, el control alostérico y la modificación covalente, es este último el que utilizan las señales extracelulares para modular la actividad celular.

Desde hace aproximadamente 40 años se acepta que la fosforilación/defosforilación enzimática de proteínas, proceso altamente dinámico, es central en la regulación de las funciones celulares de los eucariontes. En última instancia, es el contenido de grupos fosfato de proteínas específicas el factor determinante en el control de procesos celulares tales como el crecimiento, diferenciación, división, transición morfológica y muerte celular.

Para el control de procesos celulares por fosforilación de determinadas proteínas se requiere principalmente de dos actividades enzimáticas: la de proteínas quinasas, que permiten la incorporación de grupos fosfato a

residuos específicos de la proteína sustrato, y la de proteínas fosfatasas que catalizan la remoción subsecuente de los mismos.

I-1 *Proteínas quinasas versus proteínas fosfatasas*

La importancia de las proteínas quinasas y fosfatasas en la regulación de la actividad celular se ve reflejada por la enorme cantidad de genes que codifican para estas proteínas en el genoma eucariótico. En particular, se estima que en el genoma humano existen cerca de 2000 genes que codifican a las distintas proteínas quinasas (Hunter, 1994). La secuenciación reciente del cromosoma 3 de *Caenorhabditis elegans* (Wilson *et al.*, 1994) reveló la existencia de aproximadamente 230 genes que codifican para distintas proteínas fosfatasas dentro de las 2,2 Mb secuenciadas. Extrapolando estas observaciones al *Homo sapiens* y teniendo en cuenta que su genoma es cinco veces superior al de *C.elegans*, sería de esperar la existencia de al menos 1000 genes que codifican para distintas fosfatasas.

La idea original sobre el funcionamiento conjunto de proteínas quinasas y fosfatasas adjudicaba el rol de activación a las fosforilaciones catalizadas por las quinasas y el de reversión de este efecto a las de las fosfatasas. Esta hipótesis resultó pronto una explicación por demás simplista de un proceso enzimático mucho más complejo en el cual las proteínas fosfatasas no necesariamente originan la inactivación de actividades enzimáticas determinadas (Cohen y Cohen, 1989; Cohen, 1992; Hubbard y Cohen, 1993; MacKintosh y MacKintosh, 1994; Shenolikar, 1994).

I-1.1 *Proteínas quinasas: Generalidades*

Las proteínas quinasas constituyen una familia de enzimas cuya actividad se regula por diversos mecanismos. Para las actividades de proteína quinasa intrínsecas de algunas moléculas receptoras, el mecanismo de activación involucra la interacción de un ligando a su receptor específico. En otros casos, la activación de las quinasas es el resultado de la unión de una

molécula de diferente naturaleza química denominada segundo mensajero como 3'5' adenosina monofosfato cíclico (AMPc), el 3'5' guanosina monofosfato cíclico (GMPc), el diacilglicerol (DAG), el inositol 1,4,5-trifosfato y el Ca^{2+} , entre otros. Estas moléculas se producen como consecuencia de la interacción de una señal, emitida por un grupo de células en respuesta a la detección de una variación en el medio, con sus células blanco a través de la unión a sus proteínas receptoras específicas. Las quinasas actúan entonces amplificando, integrando y coordinando la respuesta celular a los diferentes estímulos.

Las proteínas quinasas conforman un grupo de enzimas de características estructurales y funcionales muy variables. Todas ellas catalizan la transferencia de una unidad de fosfato de una molécula dadora (ATP) a un sustrato proteico, siendo el grupo (fosfo) aceptor un aminoácido como serina (Ser), treonina (Thr) o tirosina (Tyr). El criterio general de clasificación de las proteínas quinasas tiene en cuenta el residuo específico al cual se une covalentemente el grupo fosfato, estableciéndose una clasificación como quinasas de serina o treonina y quinasas de tirosina (Krebs, 1985a).

Dentro del grupo de las quinasas de serina, las más extensamente caracterizadas son la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos (PKC), la proteína quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y las quinasas dependientes de ciclinas (CDK). De la mayoría de estas se han encontrado múltiples isoformas. Por ejemplo de la PKA, una proteína tetramérica con dos subunidades catalíticas (C) y dos regulatorias (R), se han descrito dos variantes, las de tipo I y II que predominan en el músculo esquelético y en el músculo liso respectivamente. En estas variantes la secuencia aminoacídica de la subunidad C está altamente conservada, mientras que las subunidades R presentan una estructura primaria diferente por lo que las isoformas presentan distintas propiedades físico-químicas, difiriendo también en su regulación y distribución tisular. Otro ejemplo lo constituye la PKC, una

quinasa donde un único polipéptido contiene el dominio catalítico y el regulatorio y de la que se han identificado nueve subtipos expresados específicamente en determinados tejidos (Coussens *et al.*, 1986; Knopf *et al.*, 1986) donde se presentan diferencias en sus propiedades enzimáticas (Nishisuka, 1988).

A pesar de las diferencias en la especificidad de sustratos todas las quinasas descritas presentan la secuencia aminoacídica del centro catalítico altamente conservada (Hanks *et al.*, 1988). En cambio, las regiones no catalíticas presentan una elevada variabilidad, lo cual posiblemente determine las diferencias en localización subcelular y regulación por otras enzimas de las distintas isoformas.

El grupo de las proteínas quinasas de tirosina incluye formas citosólicas, como los productos de los oncogenes retrovirales src (Woodford-Thomas *et al.*, 1992) y neu (Brown-Shimer *et al.*, 1992) y formas transmembrana como las de los receptores de insulina y de factores de crecimiento. En estas últimas, la actividad de quinasa de tirosina se pone de manifiesto luego de la unión del ligando al dominio extracelular del receptor, siendo la actividad enzimática una función característica del dominio intracelular (Hunter y Cooper, 1985). Al igual que las quinasas de serina, las de tirosina en eucariotas presentan semejanzas estructurales además de una alta homología de secuencia entre sus miembros (Hunter, 1987; Knighton *et al.*, 1991).

Con relación a la secuencia de reconocimiento de la proteína quinasa en su sustrato, en un principio se pensaba que la fosforilación de los distintos sustratos proteicos sólo era posible cuyo la proteína quinasa interactuaba tanto con el residuo aceptor como con otras regiones distantes en la molécula. Esta hipótesis exigía el adecuado mantenimiento de la estructura espacial del sustrato. Sin embargo, los estudios realizados sobre la proteína básica de mielina (MBP), un sustrato de la PKA, mostraron que la misma

podía ser fosforilada aún desnaturalizada (Bylund y Krebs, 1975). Más aún, la digestión de esta proteína con distintas endoproteinasas generaba péptidos, los cuales servían como sustratos de la PKA (Daile y Carnegie, 1974). Actualmente se acepta que la proteína quinasa reconoce una secuencia específica de aminoácidos, secuencia consenso, cuya existencia es necesaria y suficiente para el reconocimiento por la quinasa. En este contexto, la estructura local que rodea al fosfoaceptor es la involucrada en la determinación de la especificidad de sustrato y en menor grado las regiones distantes de la cadena polipeptídica. Se determinaron entonces las estructuras primarias mínimas necesarias para la acción de cada una de las quinasas ejemplo de las cuales son la de PKA que fosforila en los residuos de Ser o Thr incluidos en la secuencia consenso R-R-X-S/T (Zetterquist *et al.*, 1976; Kemp, 1977); de PKC que reconoce diferentes regiones de las cuales la más frecuente es (R/K₁₋₃,X₂₋₀)-S/T-(X₂₋₀,R/K₁₋₃) (Marais, 1990) y la de las ERKs que fosforilan al sustrato sólo en el contexto de la secuencia Pro-X_{1,2}-Ser/Thr-Pro (Hill y Treisman, 1995).

I-1.2 *Proteínas fosfatasas: Generalidades*

Las proteínas fosfatasas se clasifican según el residuo del cual remueven el grupo fosfato, encontrándose fosfatasas de serina/treonina y proteínas fosfatasas de tirosina. Un tercer grupo lo constituyen las fosfatasas ácidas y alcalinas que no presentan especificidad de sustrato.

Las proteínas fosfatasas de serina presentan alta homología de secuencia entre sus miembros (Ballou y Fischer, 1986) conteniendo un *motif* característico involucrado en la unión al sustrato y a metales (Zhuo *et al.*, 1994). Se ha postulado que estas fosfatasas catalizan reacciones en las cuales no se formaría ninguna clase de intermediario fosfoenzimático (Martin y Graves, 1986).

Las proteínas fosfatasas de serina se dividen, según sus características bioquímicas, en cuatro grupos principales, las de tipo 1, 2A, 2B y 2C (Cohen, 1991). Las fosfatasas de tipo 1 (PP1) se caracterizan por defosforilar la subunidad β de la fosforilasa quinasa y son inhibidas por concentraciones nanomolares de dos inhibidores endógenos termoestables, el inhibidor 1 (I1) y el inhibidor 2 (I2). Las fosfatasas de tipo 2 se caracterizan por defosforilar la subunidad α de la fosforilasa quinasa y pueden ser subsecuentemente divididas de acuerdo a sus requerimientos de cationes. La PP2A defosforila sustratos en ausencia de cationes divalentes mientras que PP2B y PP2C resultan dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} respectivamente (Ingebritsen y Cohen, 1983a,b).

El segundo grupo de fosfatasas lo conforman las fosfatasas de tirosina que incluyen aproximadamente 40 enzimas, cuyas estructuras primarias no presentan similitud alguna con la de las fosfatasas de serina. Frecuentemente, esta familia de fosfatasas se subdivide en tres grupos: 1) las fosfatasas de tirosina de estructura semejante a receptores; 2) las fosfatasas de tirosina intracelulares y 3) las fosfatasas de tirosina de doble especificidad. El rasgo estructural característico del primer grupo es la presencia de un dominio extracelular de composición aminoacídica y longitud variables, una región transmembrana y uno o dos dominios catalíticos intracelulares. En general, las fosfatasas de tirosina intracelulares contienen un único dominio catalítico y extensiones N y C-terminales que se cree tienen funciones regulatorias (Mauro y Dixon, 1994). Las proteínas fosfatasas de tirosina de doble especificidad constituyen una clase especial de fosfatasas de tirosina intracelulares cuya característica relevante es la homología de secuencia con el producto codificado por el gen H1 del virus vaccinia. Estas enzimas son únicas dentro de las fosfatasas de tirosina por su capacidad para utilizar fosfoserina o fosfotreonina además de fosfotirosina como sustratos. Todas las fosfatasas de tirosina, sin excepción, contienen un *motif* característico, (I/V)HCXAGXGR(S/T)G, el cual contiene el

residuo de cisteína involucrado en la formación del intermediario en la reacción enzimática (Guan y Dixon, 1990).

Las proteínas fosfatasas de tirosina intervienen en múltiples procesos celulares como la regulación del crecimiento y la diferenciación celular, así como también en la plasticidad del citoesqueleto en respuesta a una variedad de estímulos externos (Mauro y Dixon, 1994). Se han descrito proteínas fosfatasas de tirosina involucradas en procesos tan dispares como los oncológicos, donde actúan como supresores de tumores (Laforgia *et al.*, 1991), en procesos inmunológicos mediando la activación de las células T (Pingel y Thomas, 1989), en los eventos que controlan la entrada en mitosis de una célula durante el ciclo celular (Gould y Nurse, 1989; Hannon *et al.*, 1994) y en la ontogenia (Perkins *et al.*, 1992; Shultz *et al.*, 1993).

El tercer grupo de proteínas fosfatasas incluye a las alcalinas y ácidas que intervienen en procesos degradativos o catabólicos y constituyen un grupo de enzimas entre cuyos miembros no se conserva ningún tipo de homología en la estructura primaria. Estas enzimas son capaces de hidrolizar monoésteres de fosfato asociados a cualquier tipo de sustrato a través de mecanismos que involucran la existencia de un intermediario, el cual resulta ser la fosfoserina en el caso de las fosfatasas alcalinas o la fosfohistidina en el caso de las fosfatasas ácidas (Schwartz y Lipmann, 1961; Van Etten y Hickley, 1977; Kim y Wyckoff, 1991; Coleman, 1992).

I-1.3 Regulación de la actividad celular por la acción conjunta y coordinada de proteínas quinasas y fosfatasas

La interrelación entre las distintas proteínas quinasas y fosfatasas en la regulación metabólica de la célula ha sido extensamente estudiada (Cohen, 1992). Un ejemplo ilustrativo de esta clase de interrelaciones lo constituye el estudio de la regulación del metabolismo del glucógeno (Cohen, 1992; Shenolikar, 1994). La glucógeno fosforilasa muscular es una enzima

oligomérica que cataliza la remoción secuencial de unidades de glucosa del glucógeno. Cuyo un ligando como la adrenalina se une a su receptor específico en la membrana plasmática, se desencadenan una sucesión de eventos celulares que llevan a la activación de la fosforilasa quinasa. Esta enzima, cataliza la incorporación de un grupo fosfato en un único residuo de serina (Ser) en cada una de sus subunidades (Krebs *et al.*, 1959). La actividad de la fosforilasa quinasa es a su vez regulada por procesos de fosfo- y defosforilación (Friedman y Lerner, 1963). La defosforilación e inactivación de la enzima es catalizada por la PP1, mientras que la fosforilación ocurre tanto por acción de la PKA como de la proteína quinasa Ca^{2+} -Calmodulina dependiente (CaMKII). De este modo, la activación de la fosforilasa quinasa puede ocurrir a través del aumento en las concentraciones intracelulares de AMPc o Ca^{2+} . La acción de PKA es aún más amplia, ya que además inhibe la actividad de la PP1 asociada a glucógeno (PP1_G) sobre la fosforilasa. La PP1_G consiste de dos subunidades, una catalítica C y otra de anclaje al glucógeno, G. La subunidad C está unida al glucógeno a través de la G y la asociación entre las subunidades está regulada por la fosforilación de G (Hubbard y Cohen, 1993). La acción de PKA sobre la PP1 es a dos niveles. Por un lado, actúa fosforilando al inhibidor I1, con la consecuente inhibición de la PP1 y por otro, fosforila la subunidad G de la PP1, la cual está unida al glucógeno en asociación con la subunidad C, causando la disociación de esta última y su liberación de la partícula de glucógeno. Otras hormonas, como por ej. la insulina, promueven un mecanismo de inactivación de la glucógeno fosforilasa por asociación de la subunidad C de la PP1_G al glucógeno. Otro punto de control del metabolismo del glucógeno lo constituye la glucógeno sintasa, enzima regulable de la vía de síntesis. La síntesis de glucógeno es activada o inhibida por hormonas como la insulina o adrenalina que utilizan mecanismos de transducción de señales que conducen a un cambio en la actividad de esta enzima. Estudios *in vitro* indicaron que esta proteína puede ser sustrato de hasta siete quinasas diferentes incluyendo a la PKA y a la

CaMKII. La fosforilación por cualquiera de estas dos quinasas inactiva a la glucógeno sintasa, mientras que la defosforilación por PP1, la activa. Así, la transición que induce la insulina desde el catabolismo a la síntesis del glucógeno está determinada por la activación de PP1.

Un ejemplo de regulación recíproca y coordinada de procesos celulares mediante la fosfo- y defosforilación en residuos de tirosina lo constituye el receptor de PDGF. En células estimuladas con PDGF, un inductor de procesos mitóticos, se observa un aumento transitorio en la fosforilación en tirosina tanto en el receptor con actividad de tirosina quinasa (RPTK) como en algunas proteínas celulares. La transitoriedad de la fosforilación indicaría que una función de las fosfatasas de tirosina es atenuar las señales generadas por las quinasas de tirosina. Más aún, los procesos mitóticos frecuentemente involucran la activación de oncogenes con actividad de tirosina quinasa como c-src. Dicha actividad se regula negativamente por fosforilación del residuo de Tyr-527 por otra quinasa de tirosina, mientras que la activación de la quinasa de tirosina-src es el resultado de la defosforilación por una fosfatasa de tirosina aún no identificada (Sun y Tonks, 1994).

De los ejemplos citados, podemos concluir que en el control hormonal de la actividad celular resulta crucial que las actividades de quinasas y de fosfatasas presenten niveles similares, de no ser así, las proteínas sólo se presentarían completamente fosforiladas o completamente defosforiladas. En el caso de las proteínas fosfatasas y quinasas de serina su actividad catalítica intrínseca es cuantitativamente semejante, manteniéndose sus concentraciones intracelulares relativamente constantes. Por lo tanto es posible que, la distribución subcelular de las distintas isoformas y la afinidad por sus respectivos sustratos constituyan el punto clave para la regulación de este mecanismo (Cohen, 1992).

En las fosfatasas y quinasas de tirosina el balance de las actividades intrínsecas resulta aún más complejo. A diferencia de lo que sucede para las de serina donde las actividades catalíticas son semejantes, la actividad de las fosfatasas de tirosina *in vivo* resulta generalmente de dos a tres órdenes de magnitud mayor que las de las quinasas de tirosina (Sun y Tonks, 1994). Esta diferencia en las actividades explicaría los bajos niveles de proteínas celulares fosforiladas en tirosina y la naturaleza transitoria de la mayoría de las respuestas que involucran la fosforilación en este residuo. Debido a esto para que las señales mediadas por quinasas de tirosina sean efectivas, la actividad de las fosfatasas de tirosina debe ser cuidadosamente regulada. Esto se consigue a través de una distribución subcelular muy organizada (Fischer *et al.*, 1991) y por la regulación de estas fosfatasas por fosforilación en residuos de Ser/Thr o Tyr (Sibley *et al.*, 1987) ya que, a diferencia de las fosfatasas de serina, las fosfatasas de tirosina no tienen subunidades regulatorias ni inhibidores proteicos identificados.

En síntesis, los mecanismos de transducción de señales convergen en procesos de fosfo/defosforilación de proteínas que resultan del complejo balance entre las actividades de las proteínas quinasas y las proteínas fosfatasas.

1-1.4 Cascadas de proteínas quinasas y sus interrelaciones (cross-talk)

La transducción del mensaje incluye una cascada de eventos, entre los cuales se encuentran, como ya se han nombrado, la fosforilación y defosforilación de proteínas. Cada etapa de esta cascada está catalizada por una enzima cuya actividad es modulada (positiva o negativamente) por el producto de la etapa precedente. Las proteínas quinasas forman parte de estas cascadas y los estudios sobre la regulación de su actividad han revelado un mecanismo de transducción de señales interesante ya que permite no sólo la amplificación de la señal sino también el *cross-talk* de cascadas iniciadas por activación de quinasas de serina y tirosina.

Las cascadas enzimáticas resultan ventajosas en muchos aspectos, respecto de aquellos sistemas de enzimas únicas, porque pueden responder a un gran número de reguladores produciendo variaciones en el grado de amplificación de la señal y mostrando respuestas sigmoidales pronunciadas a una intensidad de estímulo específica (Chock y Stadtman, 1977).

Si bien las cascadas pueden parecer extremadamente complejas, en realidad resultan bastante simples y lógicas. Un ejemplo de lo expuesto se puede advertir en el importante número de reacciones catalizadas enzimáticamente que pueden ser reguladas por los niveles de una única molécula, el AMPc. Este sistema presenta dos ventajas. Por un lado, puede ser rápidamente revertido sólo disminuyendo los niveles de AMPc y por otro, se obtiene una gran amplificación a partir de una mínima señal (Hallberg et al., 1994). La amplificación de las señales puede ser, como en el caso de las proteínas quinasas de hasta 100 veces en cada paso.

Existen numerosos ejemplos de *cross-talk* entre los distintos mecanismos de señalización que involucran la fosforilación de proteínas. Muchas quinasas de serina y tirosina son reguladas positiva o negativamente por fosforilación en los residuos de Ser y/o Tyr. Esta forma de regulación también se aplica a las fosfatasas serina y tirosina, convirtiéndolas en los principales blancos para el *cross-talk* en los mecanismos que utilizan cascadas de proteínas quinasas. Un ejemplo de lo expuesto es la fosfatasa de tirosina PEST (PTP-PEST), una tirosina fosfatasa citosólica, que se fosforila *in vitro* e *in vivo* en Ser-39 y Ser-435 por la acción de las quinasas A y C (Garton y Tonks, 1994). La fosforilación en Ser-39 ocasiona un aumento en el K_m de la enzima, lo que se traduce en la disminución de la actividad de fosfatasa de tirosina. Existen también ejemplos de fosfatasas de serina donde la regulación de la actividad enzimática resulta de la fosforilación por quinasas de tirosina y de serina. Por ejemplo, la actividad de la PP2A puede ser modificada por fosforilación en residuos de tirosina (Chen et al., 1992) o treonina (Guo y Dammi, 1993). De lo indicado surge que una característica

de los mecanismos de señalización es la interrelación en las fosforilaciones de los residuos de Ser/Thr y Tyr, sugiriendo que los cambios en la actividad de las proteínas quinasas de serina pueden, indirectamente, modular la fosforilación de proteínas en los residuos de tirosina a través de la regulación de las fosfatasa de tirosina y viceversa.

I-2 De la recepción de la señal extracelular a la activación de las proteínas quinasas

I-2.1 Moléculas receptoras

La capacidad de respuesta de una célula a una molécula de señalización (ligando) extracelular depende de la presencia de receptores que unen a estos ligandos específicamente. Los ligandos liposolubles interactúan con receptores citoplasmáticos o nucleares. En cambio, los ligandos hidrosolubles, incluidos todos los neurotransmisores, las hormonas proteicas y los factores de crecimiento, se unen a proteínas receptoras específicas presentes en la superficie de la célula blanco. Los receptores son proteínas integrales de membrana y generalmente constituyen menos del 1% de la masa proteica total de la membrana plasmática.

La gran mayoría de los receptores presentes en la superficie celular experimentan un cambio conformacional cuando se unen a un ligando en el exterior de la célula. Este cambio conduce a la generación de una señal intracelular que altera el comportamiento de la célula blanco. Se conocen dos mecanismos generales por los cuales los receptores de la superficie celular generan señales intracelulares. En el primero de ellos, la unión del ligando extracelular al receptor ocasiona directamente la fosforilación de proteínas celulares, tal es el caso de la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a su proteína receptora, la que mediante su actividad intrínseca de quinasa produce, no sólo su propia fosforilación, sino también la de proteínas citosólicas y de membrana. También puede ocurrir que la

unión del ligando a su proteína receptora ocasione la activación o inactivación de enzimas ligadas a la membrana plasmática. En algunos casos, esta enzima cataliza la producción de un mediador intracelular soluble y el cambio de la concentración intracelular de este mediador actúa como señal. Un ejemplo de esta clase de enzimas es la adenilil ciclasa, la cual cataliza la conversión de ATP en AMPc. La activación o inhibición de la enzima efectora está mediada por una proteína transdutora, denominada proteína G.

Todos los receptores que interactúan con proteínas G comparten ciertas características estructurales: tienen siete secuencias de 22-24 aminoácidos hidrofóbicos que constituyen siete α -hélices transmembranas, un extenso lazo de aminoácidos hidrofílicos entre las α -hélices 5 y 6 y un segmento hidrofílico en el extremo C-terminal. Tanto el lazo como el segmento C-terminal se encuentran del lado citosólico y es sobre estas regiones hidrofílicas que el receptor interactúa con la proteína G.

Los receptores siete segmentos transmembrana (7TMS) comparten una estructura espacial común a pesar de que su estructura primaria esta muy poco conservada. Se cree que las diferencias en la secuencia de aminoácidos determina que tipo de ligando se une a cual receptor y como interactúan con los diferentes tipos de proteínas G.

El segundo tipo de mecanismo estudiado involucra la apertura o cierre de canales iónicos en la membrana plasmática luego de la interacción ligando-receptor. Las consecuencias de esto pueden ser: a) provocar un flujo reducido y transitorio de iones, que altera brevemente el voltaje en la membrana plasmática, lo que ocurre sobre todo en las neuronas y fibras musculares o bien b) originar un importante flujo de entrada de iones hacia el citosol, que a su vez provoca una respuesta intracelular.

I-2.2 Moléculas transductoras: Proteínas G

Las proteínas G constituyen una familia de enzimas heterotriméricas ($\alpha\beta\gamma$) que actúan como transductoras entre las moléculas receptoras y las proteínas efectoras. Si bien se han descrito numerosas proteínas G descritas asociadas a diferentes sistemas receptores-efectores, el mecanismo de activación es esencialmente el mismo. En cualquiera de los casos, la proteína G se presenta en el estado inactivo como un complejo heterotrimérico con una molécula de GDP unida a la subunidad α . Cuyo el ligando se une al receptor, interacciona con la proteína G. Esto ocasiona la disociación de la subunidad α del dímero $\beta\gamma$ por disminución en su afinidad, lo cual es consecuencia del intercambio de una molécula de GDP unida a la subunidad α por una de GTP. La hidrólisis del GTP unido a la subunidad α debido a una actividad de GTPasa intrínseca de la misma ocasiona la reunificación del heterotrímero. Esta actividad GTPásica es característica de cada subunidad α y determina la vida media del dímero activo $\beta\gamma$.

En los mamíferos existen descritas más de 20 subunidades α diferentes, producto de 16 genes que dan origen por *splicing* alternativo a otras isoformas (Kaziro *et al.*, 1991). De acuerdo al grado de identidad en la secuencia aminoacídica, que en general varía entre el 56 y el 95%, las distintas proteínas pueden ser clasificadas en α_s , α_i , α_q , α_{12} . En todas las subunidades α se han identificado dos dominios, uno de los cuales, el que incluye el extremo carboxilo, contiene la actividad de GTPasa, el sitio de unión al receptor, al efector y a la subunidad $\beta\gamma$ mientras que el segundo dominio, está constituido por una hélice cuya función no ha sido aún establecida. En los mamíferos, la subunidad β se presenta en cinco variantes cuya homología de secuencia varía entre el 53 y el 90% (Simon *et al.*, 1991) mientras que, no existe homología significativa entre las seis variantes de la subunidad γ (Cali *et al.*, 1992).

La existencia de múltiples isoformas de cada una de las subunidades se traduce en un gran número de variantes de proteínas G involucradas en los diferentes sistemas de transducción. Así por ejemplo existen receptores acoplados a proteínas G asociadas a la activación (G_s) o inhibición (G_i) de la adenilil ciclasa.

Si bien se ha establecido que tanto las α -GTP como las $\beta\gamma$ pueden interactuar con varias moléculas efectoras, la forma en que estos efectores son regulados a través de estas proteínas, resulta ser muy amplia y extraordinariamente específica.

I-2.3 Moléculas efectoras: adenilil ciclasa y fosfolipasa C

I-2.3.1 Adenilil ciclasa

La adenilil ciclasa, enzima que cataliza la síntesis de AMPc, es activada por proteínas transductoras que unen nucleótidos de guanina y que se encuentran acopladas al receptor. La interacción de determinados ligandos con su receptor específico produce la activación de esta enzima, mediante la activación de la proteína G. De esta forma, la señal extracelular se traduce en un aumento intracelular de AMPc.

En los mamíferos, se han identificado al menos ocho isoformas de la adenilil ciclasa que se agrupan en cinco familias distintas (Iyengar, 1993). Se trata de glicoproteínas integrales de membrana cuya masa molecular varía entre 110000 y 180000 (Pfeuffer *et al.*, 1991). El clonado y posterior secuenciación de las adenilil ciclasas de mamíferos, permitió predecir su estructura topológica incluyéndola dentro del complejo grupo de las proteínas integrales de membrana del tipo de las transportadoras o de los canales iónicos. Las adenilil ciclasas contienen 12 fragmentos transmembrana que se agrupan en dos dominios de seis segmentos cada uno. Estos fragmentos incluyen secuencias consenso de N-glicosilación. Las porciones N- y C-

terminales de la molécula están incluidas en la región citoplasmática (Krupinski *et al.*, 1989).

Además de los dominios transmembrana, existen dos citosólicos que corresponden a dos fragmentos de 350 y 250-300 aminoácidos ubicados entre los dos dominios transmembranas y como una prolongación del extremo C-terminal respectivamente. Estos dos dominios intracelulares comparten similitudes estructurales entre sí que no comparten los dominios transmembrana. De hecho, están altamente conservados en todas las adenilil ciclasas de mamíferos siendo algunos residuos particularmente característicos entre los miembros de las adenilil y las guanilil ciclasas. Además, se han encontrado *motif* característicos de unión a nucleótidos (GXGXXG, Wierenga y Hol, 1983) como los caracterizados en las proteínas que unen nucleótidos de guanina (Gilman, 1987) y sitios consenso de fosforilación por PKA y PKC (Yoshimasa *et al.*, 1987). Teniendo en cuenta las similitudes estructurales entre las familias de las adenilil y guanilil ciclasas es que se sugirió que el centro catalítico de las primeras estaba determinado por los dominios citosólicos (Koesling *et al.*, 1991). A pesar del extenso número de semejanzas entre estas enzimas, sus propiedades regulatorias son diferentes (Singh *et al.*, 1988).

I-2.3.2 Fosfolipasa C

Otro tipo de respuesta celular a la unión de hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores consiste en la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la consecuente hidrólisis de polifosfoinosítidos unidos a membrana.

La activación de la PLC ocasiona la metabolización del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) y en la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (Berridge y Irvine, 1984; Majerus *et al.*, 1986). El IP₃ difunde a través del citosol y se une a receptores específicos en el retículo endoplásmico produciendo la movilización de Ca²⁺ del mismo. Por otro lado,

el DAG permanece en la membrana y regula la actividad de las PKC modificando la afinidad de la enzima por el Ca^{2+} y la fosfatidilserina.

El aislamiento, clonado y secuenciación de las PLC en mamíferos reveló la presencia de múltiples isoenzimas. Estas isoformas estarían involucradas en los mecanismos de transducción de señales utilizados por diferentes receptores. Hasta el momento se conoce la existencia de 16 secuencias aminoacídicas distintas (14 de mamíferos y 2 de *Drosophila melanogaster*) de la PLC, todas ellas deducidas del aislamiento de sus correspondientes ADNc (Rhee y Choi, 1992). La comparación de las secuencias aminoacídicas descritas permitió dividir a la familia de PLC en tres grandes grupos, PLC- β , PLC- γ y PLC- δ , las cuales incluyen a su vez diferentes subtipos.

El análisis de la secuencia aminoacídica de los diferentes tipos de PLC reveló que la homología de secuencia entre los grupos es baja excepto en dos regiones denominadas X e Y, de 170 y 260 aminoácidos respectivamente. Estas regiones incluyen una secuencia de 80 aminoácidos que permanece prácticamente invariable en cada una de las PLCs. Todas las PLCs contienen una región N-terminal de aproximadamente 300 aminoácidos que precede a la región X. Por otro lado, mientras las PLC- β y PLC- δ contienen secuencias cortas de entre 50-70 aminoácidos separando las regiones X e Y, la PLC- γ tiene una secuencia de aproximadamente 400 aminoácidos que incluyen dominios del tipo src o SH2 y SH3 (dominios identificados como regiones no catalíticas comunes a las PTKsrc) (Koch *et al.*, 1991). Además, mientras la secuencia C-terminal de la PLC- β se extiende 450 aminoácidos después de la región Y, en la PLC- δ el extremo C-terminal es prácticamente inexistente. Se ha informado que la identidad de la secuencia aminoacídica entre los diferentes subtipos de PLC de cada uno de los grupos es mayor que entre los 3 tipos de PLC y que esta homología no está restringida únicamente a las regiones X e Y (Rhee y Choi, 1992).

La actividad catalítica de cualquiera de los tipos de PLC es dependiente de Ca^{2+} y aunque no se ha establecido una unión directa entre el Ca^{2+} y la PLC se ha localizado, en la mitad C-terminal de la región Y, un sitio de unión al Ca^{2+} que sería homólogo al dominio descrito en la PKC y la fosfolipasa A_2 citosólica (Clark *et al.*, 1991). Los tres tipos de PLC catalizan la hidrólisis de tres fosfoinosítoles comunes, el fosfatidil inositol (PI), el fosfatidilinositol 4-monofosfato (PIP) y el PIP_2 , siendo los dos últimos los sustratos preferentemente utilizados.

1-3 Los procesos que suceden a la activación de las proteínas quinasas y que generan la respuesta celular

La respuesta fisiológica de una célula o tejido a una hormona específica está determinada por la clase de receptores que posee y por las reacciones intracelulares iniciadas luego de la formación del complejo hormona-receptor. Por ejemplo, la respuesta celular a la interacción de una hormona proteica como la luteinizante (LH) o la foliculo estimulante (FSH) a su receptor en la superficie de las células de Leydig o en el foliculo ovárico respectivamente, produce un incremento en los niveles intracelulares de AMPc con la consecuente activación de la PKA y la fosforilación de diferentes sustratos. La respuesta celular a estos eventos es la síntesis y secreción de hormonas esteroides, en este caso testosterona y 17β -estradiol respectivamente.

En los ejemplos mencionados, el mecanismo de acción de estas hormonas involucra, entre la activación de la PKA y la producción de esteroides, al menos una proteína sustrato de la PKA. En otros sistemas esteroideogénicos, como por ejemplo la zona glomerulosa de la corteza adrenal, la respuesta celular a angiotensina II, la producción del esteroide aldosterona, es la consecuencia de la activación de la PKC y de la fosforilación de proteínas.

Con los ejemplos mencionados se pone de manifiesto que diferentes agonistas provocan en sus respectivos tejidos blanco una misma respuesta, aún cuando actúan a través de mecanismos de señalización que involucran la activación de diferentes proteínas quinasas. La existencia de un blanco común en los distintos sistemas productores de esteroides los presenta como modelos útiles para estudiar, entre otros aspectos, los puntos de convergencia de los diferentes mecanismos de transducción de señales.

II Mecanismos de transducción de señales desencadenados por hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas se clasifican en cinco grupos principales: los progestágenos (C21), los glucocorticoides (C21), los mineralocorticoides (C21), los andrógenos (C19) y los estrógenos (C18) las cuales intervienen en la regulación de una variedad de funciones biológicas.

La progesterona, un progestágeno, interviene en el mecanismo de implantación del óvulo en el útero y en el mantenimiento del embarazo. Los andrógenos (por ej. la testosterona) y estrógenos (por ej. el 17β -estradiol) son los responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios masculinos y femeninos respectivamente. Los estrógenos participan también en el ciclo ovárico. Los glucocorticoides (por ej. el cortisol) promueven la gluconeogénesis y la formación de glucógeno y aumentan la degradación de lípidos y proteínas. Los mineralocorticoides (principalmente la aldosterona) actúan en el túbulo distal del riñón aumentando la reabsorción de Na^+ y la excreción de K^+ y H^+ , lo cual produce un aumento en el volumen y la presión sanguínea. Por último, los esteroides como la pregnenolona, progesterona, y 20α -hidroxi-pregnenolona, entre otros, constituyen los neuroesteroides del sistema nervioso (LeGoascogne *et al.*, 1987; Mellon, 1994). Los principales tejidos donde se sintetizan los esteroides son: el cuerpo lúteo y la placenta para los progestágenos, el ovario para los estrógenos, el testículo para los andrógenos, la corteza adrenal para los glucocorticoides y mineralocorticoides y el cerebro para los neuroesteroides.

La secreción de hormonas esteroideas en los distintos tejidos responde a la acción de diferentes ligandos. Por ejemplo, en las zonas fasciculata y reticularis de la corteza adrenal, la producción de glucocorticoides es regulada por la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), mientras que la secreción de aldosterona por las células de glomerulosa es estimulada por

AI, ACTH y por otro efector de naturaleza no proteica como el K^+ (Davis, 1975; Fraser *et al.*, 1979). Es interesante notar que aunque los mecanismos de transducción de señales promovidos por estos agonistas son esencialmente distintos, todos convergen en el paso enzimático limitante de la síntesis de esteroides que es la conversión de colesterol en pregnenolona.

A continuación se profundizará el estudio de los mecanismos de acción de los ligandos involucrados en la síntesis de esteroides. En particular se hará hincapié en las señales de transducción originadas por ACTH, LH, AI y K^+ .

II-1 Mecanismo de señalización desde el ligando a la activación de proteínas quinasas

II-1.1 Mecanismo de acción de la hormona Adrenocorticotrófica (ACTH)

II-1.1.1 Generalidades

La adrenocorticotrofina (ACTH) es secretada por los corticotropos hipofisarios como respuesta a la estimulación por un péptido de 41 aminoácidos conocido como factor liberador de corticotropina (CRF, Saffran *et al.*, 1955), que se generó en neuronas del hipotálamo (Harris, 1955). Los tejidos blanco del ACTH están extendidos a diversos tejidos, incluyendo la corteza adrenal, el tejido adiposo y el cerebro.

La principal respuesta celular desencadenada por la estimulación de las células adrenocorticales con ACTH es el incremento de 10 a 15 veces en la biosíntesis de corticoides (Hechler *et al.*, 1951) relacionado con la disminución en el contenido de colesterol (Sayers *et al.*, 1944) y ácido ascórbico (Sayers *et al.*, 1946), la estimulación de la actividad de la colesterol esterasa (Shima *et al.*, 1972), el aumento en la utilización de glucosa (Macho y Saffran, 1967) y la inducción coordinada de genes (Rice *et al.*, 1989).

II-1.1.2 **ACTH: Relación entre estructura y actividad**

La hormona adrenocorticotrópica (ACTH) es un péptido de 39 aminoácidos que se origina a partir de una proteína precursora mayor, la pro-opiomelanocortina (POMC) sintetizada y procesada en la adenohipófisis (Eipper *et al.*, 1976), de la cual se libera mediante desdoblamiento proteolítico. A partir del mismo precursor también se producen varios otros péptidos que tienen importancia biológica, entre ellos la β -endorfina, β -lipotrofina y las hormonas estimulantes de los melanocitos (α -MSH y β -MSH).

La especificidad funcional de la molécula reside en el extremo N-terminal mientras que la porción C-terminal (a partir del aminoácido 25) no tiene un rol biológico conocido y presenta un alto grado de heterogeneidad en las distintas especies. De hecho, la pérdida de un único aminoácido en el extremo N-terminal altera notoriamente la actividad biológica de la hormona, mientras que la remoción de varios aminoácidos en el extremo C-terminal, no tiene consecuencias importantes en la misma. El fragmento que comprende los primeros 24 aminoácidos de la molécula de ACTH, ACTH₁₋₂₄, presenta una actividad biológica igual o aún ligeramente mayor que la molécula completa. Una disminución de 6 aminoácidos en el tamaño del péptido, de ACTH₁₋₂₄ a ACTH₁₋₁₈, está asociada a una reducción, no a una pérdida, de su actividad biológica (Seelig y Sayer, 1973). Además, se ha observado que la actividad biológica se reduce paralelamente a la disminución del número de aminoácidos del fragmento ACTH₁₋₂₄ al ACTH₁₋₁₈ (Li *et al.*, 1961; Hofmann *et al.*, 1962 y 1970). La presencia de los aminoácidos básicos en las posiciones 15 a 18 (Lys-Lys-Arg-Arg) constituye un importante sitio de afinidad en la molécula de ACTH y un requisito estructural la conservación de la actividad biológica (Ney *et al.*, 1965; Hofmann *et al.*, 1970). Sin embargo, a pesar de esto, el péptido ACTH₁₋₁₀ es capaz de estimular la síntesis de esteroides en ratas hipofisectomizadas (Ney *et al.*, 1965) o en suspensiones de células de la corteza adrenal

(Schwyzer *et al.*, 1971) cuyo es administrado en dosis altas. Los aminoácidos en las posiciones 11 a 14 (Lys-Pro-Val-Gly) influyen la afinidad de la molécula por el receptor, pero ninguno es esencial para la activación del mismo. Experimentos realizados con el péptido ACTH₁₁₋₂₄ mostraron que aunque este no tiene actividad intrínseca *per se*, es un antagonista competitivo del péptido ACTH₁₋₂₄ (Seelig *et al.*, 1971).

Las observaciones anteriores indican que el centro activo de la molécula de ACTH reside en los aminoácidos comprendidos entre las posiciones 1 y 10. Experimentos realizados con péptidos sintéticos de distintas regiones de la molécula de ACTH demostraron que, la secuencia de aminoácidos comprendida entre las posiciones 6 y 9 (His-Phe-Arg-Trp) está directamente involucrada en la activación del receptor (Fujino *et al.*, 1971; Schwyzer *et al.*, 1971).

De lo anteriormente expuesto, se desprende que la hormona ACTH pertenece a un grupo de hormonas polipeptídicas en las cuales un único segmento de unos pocos aminoácidos de la cadena peptídica activa el receptor, mientras que las otras regiones están involucradas en la disposición de la molécula en el sitio de acción.

II-1.1.3 **Receptor de ACTH**

Aunque el receptor de ACTH ha sido uno de los primeros receptores para hormonas polipeptídicas en identificarse, la caracterización completa del mismo ha sido realizada recientemente. La metodología utilizada para la caracterización de la molécula receptora de ACTH incluyó técnicas de marcación por fotoafinidad y *cross-linking*, lo que llevó a la identificación de posibles proteínas receptoras cuyas masas moleculares oscilaron entre 40000 (Hofmann *et al.*, 1988; Penhoat *et al.*, 1993) y 100000 (Ramachandran *et al.*, 1980). Por otra parte, los estudios de unión a

receptores en células de adrenales bovinas indicaron la existencia de una única clase de receptores de ACTH (Zhang *et al.*, 1993).

La secuencia del ADNc del receptor de ACTH bovino (EMBL, GenBank X74501, Raikhinstein *et al.*, 1994) mostró un marco de lectura abierto de 891 bp lo que corresponde a una proteína de 297 aminoácidos (Mr: 33258). Esta proteína es 81% homóloga a la correspondiente de adrenales humanas (EMBL, GenBank X65635, Mountjoy *et al.*, 1992), siendo la homología particularmente alta en el sitio de unión al ligando. La secuencia de aminoácidos contiene siete segmentos hidrofóbicos que posteriormente fueron identificados como los siete dominios transmembrana. Por otra parte, a diferencia de la mayoría de los receptores transmembranas acoplados a proteínas G, el receptor de ACTH bovino y el humano presentan una secuencia extracelular corta en su extremo N-terminal (de aproximadamente 20 aminoácidos) y un dominio intracelular pequeño en el extremo C-terminal. El segundo lazo extracelular es reducido (11 aminoácidos) y el quinto dominio transmembrana del receptor de ACTH humano es más corto que el correspondiente bovino.

El análisis de la estructura primaria mostró la presencia de dos sitios consensos de fosforilación en el tercer lazo intracelular, uno para PKA dependiente (R/K-R/K-X-X-S/T, Feramisco *et al.*, 1980) localizado en la posición Ser-209 y otro para PKC (T-X-R, Woodgett *et al.*, 1986) en Thr-204. Se especula que estos sitios podrían actuar como sustratos intracelulares de fosforilación. También se detectaron, un segundo sitio consenso de fosforilación para PKC en la porción N-terminal (Thr-14) y uno para fosforilación por caseína quinasa II (CKII, S/T-X-X-D) en el segundo lazo extracelular. En las secuencias estudiadas no se identificaron sitios de fosforilación para quinasas de tirosina.

Las diferencias obtenidas en la masa molecular del receptor de ACTH, en las distintas especies, por las técnicas bioquímicas respecto de la calculada

a partir de su secuencia de aminoácidos podría explicarse por la glicosilación del receptor en cualquiera de los dos sitios consenso (N-X-S/T) presentes en la región N-terminal.

II-1.1.4 *El sistema transductor de ACTH en la corteza adrenal*

Se ha demostrado que la estimulación en la síntesis de esteroides es un proceso mediado por la unión de la ACTH a su receptor, la transducción de la señal a través de una proteína G estimuladora (Gs), la activación de la adenilil ciclase, el incremento en los niveles de AMPc y la activación de la PKA.

Tauton *et al.* describieron que la ACTH estimulaba la síntesis de esteroides en fragmentos de adrenales por un mecanismo sensible al tratamiento con tripsina, concluyendo que el primer paso en la acción de ACTH sobre la esteroidogénesis es la unión de la hormona a un sitio accesible a la tripsina en la superficie de las células adrenales (Tauton *et al.*, 1967). Los estudios de Schimmer *et al.* en una línea celular de tumor de adrenal (Y1) utilizando ACTH inmovilizada a un polímero de celulosa, permitieron concluir que además de ejercer su acción esteroidogénica a través de receptores específicos localizados en la superficie celular, la molécula de ACTH no es internalizada durante este proceso (Schimmer *et al.*, 1968). Casi simultáneamente se informaba que ACTH aumentaba los niveles de AMPc en fragmentos de adrenales de rata (Grahame-Smith *et al.*, 1967; Ney *et al.*, 1969), que este incremento precedía temporalmente los efectos de ACTH sobre la esteroidogénesis adrenal (Grahame-Smith *et al.*, 1967) y que estaba asociado a la activación de la adenilil ciclase ya que, preparaciones de membrana plasmática de células adrenocorticales estimuladas con ACTH producían un incremento en la concentración de AMPc (Grahame-Smith *et al.*, 1967; Hechler *et al.*, 1969). Dado que la adenilil ciclase asociada a membrana es rápidamente activada por ACTH, se postuló que estas moléculas deberían estar próximas una de otra.

Por otra parte, el agregado exógeno de análogos del AMPc a células adrenocorticales o a secciones de adrenales de rata estimulaba la esteroidogénesis, reproduciendo de esta manera los efectos del ACTH (Haynes *et al.*, 1959; Birmingham *et al.*, 1960; Ferguson, 1963; Karaboyas y Koritz, 1965; Halkerston *et al.*, 1966). Sin embargo, las relaciones cuantitativas entre la acción de ACTH, la acumulación de AMPc y la esteroidogénesis resultaron mucho más complejas.

En células adrenales de rata se demostró que ACTH estimulaba la producción de esteroides y de AMPc generando curvas dosis-respuesta paralelas (Beall y Sayers, 1972; Mackie *et al.*, 1972). Sin embargo, en los estudios sobre la síntesis de esteroides se realizaron con concentraciones menores a la dosis media máxima de ACTH, no se observaron cambios detectables sobre los niveles de AMPc. Para explicar estas observaciones, se argumentó que los cambios en las concentraciones de AMPc ocurrían en lugares discretos y que eran demasiado pequeños para ser detectados. En consecuencia, se desarrolló la metodología para medir la cantidad de AMPc unido a receptores citoplasmáticos con el fin de examinar la posibilidad de que esta fracción representara con mayor exactitud la cantidad del nucleótido cíclico importante para la esteroidogénesis (Podestá *et al.*, 1979a; Sala *et al.*, 1979). Los estudios realizados por Podestá *et al.* demostraron que el AMPc está altamente compartimentalizado (Podestá *et al.*, 1979a). Parte del AMPc intracelular generado en respuesta a un estímulo es transportado activa o pasivamente al espacio extracelular tan pronto como se alcanza una concentración intracelular mínima mientras que los depósitos intracelulares son compartimentalizados. La mayoría de las moléculas de AMPc son accesibles a las fosfodiesterasas, mientras que una fracción muy pequeña del total está en equilibrio con el complejo AMPc/subunidad reguladora de la PKA. El incremento en el AMPc unido a su receptor intracelular se correlaciona con la estimulación aguda de la esteroidogénesis en células adrenocorticales en todo rango de concentraciones de ACTH.

Más aún, no es necesaria la ocupación de todos los sitios receptores disponibles para lograr la producción máxima de esteroides. Este modelo explica el hecho de que la síntesis de esteroides ocurra en ausencia de un aumento medibles en los niveles de AMPc. Por lo tanto, en la síntesis de esteroides estimula por ACTH no serían necesarias grandes cantidades de AMPc, un pequeño aumento puede ser suficiente para cumplir la función celular.

Experimentos realizados con células Y1 deficientes en las actividades de adenilil ciclasa y PKA (Y1(cyc⁻) y Y1(kin⁻) respectivamente) permitieron establecer el rol intermediario de estas enzimas en el mecanismo de acción de ACTH. Las células Y1(cyc⁻) estimuladas con análogos del AMPc produjeron una respuesta esteroidogénica normal, o sea que no mostraron alteraciones en la actividad de PKA. Sin embargo, la esteroidogénesis en estas células ya no era estimulable por ACTH. Por otro lado, las células Y1(kin⁻) eran resistentes a los efectos de los análogos de AMPc sobre la esteroidogénesis (Rae *et al.*, 1979). Estos estudios proporcionaron evidencia experimental en favor del rol obligatorio de la PKA en el control hormonal de la esteroidogénesis adrenal.

El rol intermediario de la proteína G estimuladora en la transducción de la señal de la ACTH también se demostró por la estimulación de la adenilil ciclasa de células Y1 con toxina colérica (Rae *et al.*, 1979). Estos estudios, se complementaron con los de Sáez *et al.* donde se describía el aumento en los niveles de AMPc en preparaciones de membranas de células adrenocorticales estimuladas con fluoruro, GTP o sus análogos no hidrolizables (Sáez *et al.*, 1984).

Los eventos anteriormente descriptos ocurren también en otros tejidos esteroidogénicos en respuesta a determinadas hormonas tróficas como se desprende de experimentos realizados en una línea tumoral de células de Leydig, MA-10, donde al ser transfectadas con una forma mutada de la

subunidad regulatoria de tipo I de la PKA o con una fosfodiesterasa se reduce la respuesta esteroideogénica a hCG (Ascoli y Wang, 1991). Estos resultados indican que la formación de AMPc y la activación de la PKA son eventos comunes en el mecanismo de acción de LH y ACTH, lo que ya había sido demostrado en los experimentos de fusión de células realizados por Podestá *et al.* (Podestá *et al.*, 1984). En estos experimentos, células de Leydig y de zona fasciculata adrenal fueron electrofusionadas y los fusatos resultantes sintetizaron corticosterona y testosterona en respuesta al estímulo de LH o ACTH respectivamente. Estos resultados sugieren que los eventos desencadenados en respuesta al estímulo hormonal tienen intermediarios comunes en el mecanismo de acción.

Con respecto al mecanismo de acción de la ACTH también se ha demostrado que el Ca^{2+} tendría un rol sinérgico y modulador de la acción de ACTH, aunque en forma variable según el tipo celular y la especie. El Ca^{2+} extracelular sería necesario para la unión de la hormona a su receptor específico en la célula blanco (Ramachandran, 1984) y en un paso posterior a la activación de la adenilil ciclasa (Podestá *et al.*, 1980).

Se ha descrito que la formación del complejo hormona-receptor produce la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, generando un influjo de Ca^{2+} en células adrenocorticales (Kojima *et al.*, 1985a). Más aún, en aquellos sistemas esteroideogénicos donde el aumento en la producción de AMPc es consecuencia de la estimulación directa de la adenilil ciclasa (por ej. con forskolina) no se produce influjo de Ca^{2+} a la célula. Se postuló entonces que el receptor de ACTH actuaría acoplado a un canal de Ca^{2+} a través de una proteína G (Payet *et al.*, 1987) y que el influjo de Ca^{2+} posiblemente active la CaMKII sinergizando los efectos esteroideogénicos en respuesta al AMPc.

Además de las acciones a corto plazo sobre la síntesis de esteroides, ACTH incrementa la capacidad esteroideogénica de la célula adrenal como

consecuencia de los efectos a largo plazo sobre la síntesis de enzimas involucradas en la esteroidogénesis. Si bien el mecanismo molecular de este proceso será descrito con mayor detalle en la próxima sección, vale mencionar que el efecto crónico de ACTH involucra la expresión coordinada de los genes que codifican para las P₄₅₀ hidroxilasas y que los factores de transcripción involucrados responden a la cascada de señales AMPc/PKA.

Otros estudios, realizados en cultivo de células adrenocorticales humanas, sugieren que la PKC cumple un rol modulador en el mantenimiento a largo plazo de la esteroidogénesis inducida por ACTH (McAllister y Hornsby, 1987 y 1988). Recientemente, se ha informado que en adenomas adrenocorticales, ACTH induce la translocación de la PKC α y β del citosol a la membrana plasmática y que en estas células, la secreción de cortisol inducida por ACTH puede estar mediada por PKC (Ishizuka, 1997).

II-1.2 *Mecanismo de acción de la hormona luteinizante (LH)*

II-1.2.1 *Generalidades*

En todos los embriones de los vertebrados existe un grupo de células que se diferencian durante las etapas iniciales del desarrollo como progenitoras de los gametos. Estas células germinales primordiales se diferenciarán a gametos maduros en las gónadas (ovario en las hembras y testículo en el macho). Tanto el ovario como el testículo comparten homologías estructurales y funcionales que incluyen además de la producción de gametas y la regulación de la esteroidogénesis. Esta correlación entre estructura y función ha sido determinada para la teca interna (en ovario) y las células de Leydig (en testículo) y para las células de la granulosa en ovario y las células de Sertoli en testículo. Además, se ha descrito que tanto la teca interna como las células de Leydig tienen la capacidad común de sintetizar y secretar esteroides en respuesta a LH.

En el testículo, la síntesis de testosterona por las células de Leydig es de fundamental importancia para la función de las células de Sertoli en la espermatogénesis. En el ovario, la capacidad esteroidogénica combinada de la teca interna y de las células de la granulosa resulta fundamental para la gametogénesis. En cualquiera de los casos, el funcionamiento normal de las gónadas es dependiente, entre otros factores, de las gonadotrofinas LH y FSH sintetizadas y secretadas por la glándula pituitaria. Se han encontrado receptores para LH en las células de la teca interna del ovario y en las células de Leydig del testículo, mientras que para FSH en células de Sertoli y de granulosa. En todas estas células, la regulación de la esteroidogénesis se produce a través de diferentes mecanismos de señalización intracelular los que, en algunos casos, resultan de la activación por un único ligando.

En esta sección describiremos los mecanismos a través de los cuales LH regula la esteroidogénesis ovárica y testicular.

II-1.2.2 Estructura de la molécula de LH

La molécula de LH es una glicoproteína de masa molecular aproximada de 30000. Esta formada por dos cadenas polipeptídicas distintas, α y β , asociadas a través de interacciones no covalentes (Parsons *et al.*, 1985). Las subunidades α y β contienen 89 y 129 aminoácidos y presentan una masa molecular de 15750 y 15350 respectivamente.

Esta hormona se presenta altamente glicosilada. Su contenido de carbohidratos representa entre el 15 y el 30% de su masa molecular. Estos residuos están unidos a los grupos amida de la asparagina o a los grupos hidroxilo de los residuos de serina o treonina a través de uniones N-glicosídicas.

Los estudios funcionales de la molécula de LH permitieron establecer que la subunidad β determina la especificidad biológica pero esto sólo es posible en el contexto de la α . Por otra parte, se ha informado que la deglicosilación

de las subunidades no conduce a un cambio en la estructura cuaternaria de la hormona ni a la modificación de su afinidad, aunque si se ha informado de una reducción significativa en la actividad estimuladora sobre la adenilil ciclasa y sobre la actividad esteroidogénica (Manjunath y Sairam, 1985). Estas observaciones se discutirán en el contexto de las características del receptor de LH en la siguiente sección.

II-1.2.3 **Receptor de LH**

Los primeros estudios sobre el receptor de LH de ovario de rata resultaron en la caracterización de diferentes polipéptidos de 75, 90 y 92 kDa (Podestá *et al.*, 1986; Keinanen *et al.*, 1987; Ascoli y Segaloff, 1989). Otros estudios demostraron que el receptor estaba predominantemente N-glicosilado (Minegishi *et al.*, 1989).

La caracterización molecular del ADNc correspondiente permitió establecer que el receptor de LH pertenecía a la familia de los receptores 7TMS. La secuencia del polipéptido incluía un péptido señal de 26 aminoácidos, seguido de un dominio extracelular de 341 residuos y un segmento de 333 aminoácidos que se distribuía espacialmente como los siete segmentos transmembrana (Segaloff y Ascoli, 1993). Tanto el dominio extracelular como el transmembrana presentan características estructurales únicas. El primero incluye secuencias repetidas características de la familia de glicoproteínas ricas en leucina (LRG), mientras que la región transmembrana presenta homología con los genes que codifican para receptores acoplados a proteínas G por ejemplo el receptor de la hormona estimuladora de la tiroides. Estas evidencias permitieron postular que el receptor de LH surge de la recombinación de los genes de los receptores acoplados a proteínas G y de las LRG. Por otro lado, se han identificado múltiples especies de ARNm para el receptor de LH que resultan del *splicing* alternativo del gen. Las distintas variantes de ARNm se presentan con abundancia variable en las gónadas de especies evolutivamente cercanas.

El análisis de la estructura primaria del receptor de LH permitió identificar un segmento citosólico rico en residuos de serina y treonina con potenciales sitios de fosforilación por proteínas quinasas de serina (Sáez, 1994). La porción extracelular contiene seis sitios consenso de glicosilación, los que participarían en la modificación post-traducciona del receptor y serían los responsables de las diferencias observadas entre la masa molecular del receptor purificado y la deducida a partir de su estructura primaria.

Estudios con anticuerpos monoclonales que inhiben competitivamente la unión del ligando LH a su receptor llevaron a postular la existencia de dos sitios de interacción de LH con su receptor, de los que sólo uno sería el sitio de unión funcional (Podestá *et al.*, 1984). Los resultados descriptos en la sección anterior con respecto a la falta de efecto de la deglicosilación de LH en su capacidad de unión al receptor pero el bloqueo completo de su respuesta biológica, constituirían una evidencia adicional, y podrían explicarse suponiendo que la modificación estructural de LH interfiere con su interacción con el sitio funcional.

II-1.2.4 *El sistema transductor de LH en las gónadas*

Las gonadotrofinas regulan la esteroidogénesis a través de diferentes mecanismos, siendo el más relevante aquel que involucra la formación de AMPc a través de la estimulación de la adenilil ciclase. En ovario y testículo, la acción de LH lleva a la conversión del colesterol en esteroides de C21 y C19 (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Los efectos esteroidogénicos de LH se inician por la interacción de la hormona circulante a receptores de alta afinidad ubicados en la membrana plasmática de la célula blanco (Catt *et al.*, 1972). La formación del complejo hormona-receptor genera la activación de diferentes moléculas efectoras. Se ha postulado que este proceso sólo se producirá si la interacción del receptor de LH con su ligando genera la agregación y/o microdistribución de

la molécula receptora. Las evidencias experimentales indican que estos procesos pueden ser promovidos por la asociación o dimerización del receptor en la membrana (Podestá *et al.*, 1983 y 1986).

La unión de LH a su receptor 7TMS está asociada a un aumento en los niveles de AMPc (Cooke *et al.*, 1981; Adashi y Resnick, 1986), a la activación de la PKA (Cooke *et al.*, 1976; Podestá *et al.*, 1978; Petersson *et al.*, 1988) y a la fosforilación de proteínas (Bakker *et al.*, 1983). Al igual que para el receptor de ACTH u otros 7TMS, la estimulación de la adenilil ciclase es mediada por una proteína G estimuladora. La participación de la misma se demostró por el tratamiento de células de Leydig con toxina colérica o análogos no hidrolizables del GTP que produjeron un aumento significativo en los niveles de AMPc y de esteroides (Rommerts y Cooke, 1988). Por otro lado, cuando las mismas células son tratadas con un estimulador de la adenilil ciclase, como la forskolina, se produce un aumento en los niveles de AMPc y en la biosíntesis de andrógenos (Adashi y Resnick, 1986). Más aún, la forskolina reproduce la acción de LH sobre la esteroidogénesis confirmando el rol intermediario del AMPc en la esteroidogénesis testicular.

En células de Leydig se han identificado las isoformas de tipo I y II de la PKA (Rommerts *et al.*, 1974; Cooke *et al.*, 1976; Podestá *et al.*, 1976a,b y 1978a,b; Moger, 1991) postulándose que la diferente localización subcelular de cada una de las isoformas limita la respuesta al sitio de estimulación (Podestá *et al.*, 1991). Si bien la activación de la PKA está claramente establecida, aún no se han descrito en detalle los eventos celulares siguientes a la activación de la quinasa y que llevan a la síntesis de esteroides.

La acción de LH también se encuentra modulada por iones, en particular por el Ca^{2+} . Este ión participa en la estimulación de la adenilil ciclase por LH en ovario, en células de Leydig y en la teca (Veldhuis y Klase, 1982; Lee *et al.*, 1989; Levorse *et al.*, 1991). Se postula que se requiere Ca^{2+} extracelular

para obtener la respuesta esteroideogénica máxima a LH en células de Leydig y se ha demostrado que los análogos del AMPc aumentan los niveles intracelulares de Ca^{2+} , sugiriendo al AMPc como uno de los mediadores de la acción de LH en la movilización de Ca^{2+} (Sullivan y Cooke, 1986). Por otra parte, se ha informado que la disminución en la concentración extracelular de Ca^{2+} por el agregado al medio de incubación de un quelante (EGTA) o de un bloqueante de canales de Ca^{2+} (verapamil) produce una atenuación en la actividad esteroideogénica estimulada por LH, lo cual apoya la hipótesis del rol intermediario del Ca^{2+} (Levorse *et al.*, 1991).

En ovario se ha descrito la activación de la PLC en la vía de estimulación de la producción de progesterona. En células de la granulosa de rata aislada de folículos maduros, el estímulo con LH muestra un aumento tanto en la síntesis (Davis, 1983 y 1984a) como en la degradación (Davis, 1984b) de fosfoinosítidos y un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} . En células de Leydig, la adición de LH o análogos del AMPc provoca un aumento en la producción de testosterona y una acumulación simultánea de fosfolípidos (Lowitt *et al.*, 1982) y Ca^{2+} intracelular. Aunque estas observaciones permiten establecer el rol intermediario de los fosfoinosítidos en la movilización del Ca^{2+} , el mecanismo principal de regulación de los niveles intracelulares de este ión lo constituye el sistema de la adenilil ciclasa.

Por otro lado, la activación del recambio de fosfatidilinositoles conduce a la liberación de DAG. Sin embargo, no se ha informado la estimulación directa del DAG y/o activación de la PKC en células de Leydig estimuladas con LH (Leung y Steele, 1992).

A pesar de las evidencias presentadas, la participación del Ca^{2+} y la activación de la PLC en el mecanismo de acción de LH en células de Leydig siguen siendo controvertidas. Trabajos de Wang y Ascoli, realizados sobre una línea tumoral de células de Leydig (MA-10) salvaje y otra con la

subunidad regulatoria de la PKA tipo I mutada demostraron que en estos sistemas, la síntesis de esteroides inducida por LH, resulta únicamente vía AMPc (Wang y Ascoli, 1990). En trabajos previos, los mismos autores demostraron que LH no activa a la PLC y que la activación de esta enzima por otros ligandos no resulta en un aumento de la síntesis de esteroides; más aún, la remoción del Ca^{2+} extracelular no afectaría la respuesta esteroidogénica de LH (Ascoli *et al.*, 1989).

En conclusión, se ha demostrado exhaustivamente la participación de la PKA en el mecanismo de acción de LH; resta por dilucidar la posible participación de la PKC en este mecanismo. La activación de quinasas, según se ha descrito, llevará a la fosforilación de distintos sustratos celulares, necesarios para activar la síntesis de esteroides.

II-1.3 *Mecanismo de acción de Angiotensina II (All)*

II-1.3.1 *Generalidades*

La All es uno de los mayores reguladores hormonales de la homeostasis cardiovascular y de la secreción de aldosterona en células de la glomerulosa adrenal. La hormona actúa en diversos tejidos como el músculo liso, riñón, cerebro, útero, placenta y células hepáticas en los que cumple diferentes funciones tales como controlar el tono muscular, estimular el crecimiento de los tejidos, la actividad neuronal y la regulación de la secreción de esteroides.

II-1.3.2 *Estructura de la molécula de All*

La síntesis de All se produce como respuesta a una disminución tanto en los niveles circulantes de Na^+ como de la presión y el volumen sanguíneos. La All es un octapéptido generado por ruptura proteolítica del angiotensinógeno, una α_2 -globulina sintetizada en el hígado. Las células yuxtaglomerulares del riñón secretan una proteasa, la renina, que actúa sobre el angiotensinógeno

produciendo el decapeptido Angiotensina I (AI, DRVYIHPFHL), un precursor hormonalmente inactivo. La posterior remoción de dos aminoácidos del extremo C-terminal del decapeptido Angiotensina I por acción de la enzima convertidora da origen al octapéptido AII (DRVYIHPF). La enzima convertidora es una glicoproteína presente en pulmón, células endoteliales y plasma. En algunas especies, la AII es convertida al heptapéptido angiotensina III (AIII, RVYIHPF) por acción de una aminopeptidasa. Tanto AII como AIII resultan potentes estimulantes de la producción de aldosterona. Ambos péptidos, son inactivados con rapidez por angiotensinasas.

II-1.3.3 **Receptor de AII**

Como toda hormona peptídica, la AII se une específicamente a receptores de alta afinidad ubicados en la membrana plasmática (Lin y Goodfriend, 1970). La molécula receptora ha sido extensamente estudiada debido a las variedad de respuestas celulares que se suceden luego de la formación del complejo hormona-receptor.

En los últimos años, se ha establecido la heterogeneidad del receptor de AII. Los estudios farmacológicos y bioquímicos permitieron por un lado, confirmar la existencia de dos grandes grupos de receptores, los de tipo 1 (AT₁) y los de tipo 2 (AT₂) (Whitebread *et al.*, 1989) y por otro, permitieron conocer la distribución tisular de cada una de las variantes en las distintas especies.

Se ha informado que en la corteza adrenal de la mayoría de las especies, los receptores de AII son casi exclusivamente del tipo AT₁, aunque se han descrito casos en los que la proporción de ambos subtipos es mayor (Timmermans *et al.*, 1993). El subtipo AT₂ ha sido también localizado en tejidos como la médula adrenal, el cerebro y el útero. Recientemente, se ha descrito un nuevo subtipo de receptor de AII en la corteza adrenal

denominado AT₄, cuya única característica conocida es la mayor afinidad por el hexapéptido 3-8 de la AII que por la misma AII (Harding *et al.*, 1992; Jarvis *et al.*, 1992; Swanson *et al.*, 1992).

La caracterización del gen del receptor AT₁ de la corteza adrenal bovina demostró una secuencia codificante que corresponde a una proteína de 359 aminoácidos, de masa molecular 41000, que incluye siete potenciales dominios transmembrana, tres sitios de N-glicosilación en las regiones extracelulares y varias secuencias consenso de fosforilación por proteínas quinasas de serina y tirosina en los dominios intracelulares (Sasaki *et al.*, 1991). Más recientemente, se ha informado que en la corteza adrenal de rata y en otros tejidos existen dos subtipos diferentes de receptores AT₁ denominados AT_{1A} y AT_{1B} (Elton *et al.*, 1992; Iwai y Inagami, 1992; Kakar *et al.*, 1992; Syberg *et al.*, 1992). El estudio molecular de estos dos subtipos reveló una identidad del 95% en la secuencia de aminoácidos, sin embargo, la secuencia de los respectivos genes presentó importantes diferencias en las regiones 5' y 3' no codificantes (Bernstein y Alexy, 1992) sugiriendo una expresión diferencial de los mismos. El subtipo AT_{1B} es el que se expresa preferencialmente en la glándula adrenal.

Los receptores AT₂ han sido clonados y su estructura primaria deducida. Se trata de una proteína de 363 aminoácidos que presenta una disposición espacial semejante a la de los receptores 7TMS. Sin embargo, resulta sólo 32-34% idéntica respecto del subtipo AT₁ (Kambayashi *et al.*, 1993).

II-1.3.4 El sistema transductor de AII en la corteza adrenal

En la actualidad no existen dudas del rol intermediario de la PLC en la síntesis de aldosterona inducida por AII en la zona glomerulosa de la corteza adrenal. Se sabe además, que la actividad hidrolítica de la PLC sobre el PIP₂ lleva a la formación de IP₃ y DAG y que el efecto de AII sobre la formación de IP₃ está mediado por una proteína G. Esta última afirmación, se basa en

experimentos realizados con células de la granulosa electropermeabilizadas, donde los análogos no hidrolizables del GTP aumentaron los niveles intracelulares de IP_3 , implicando la existencia de una proteína G en la transducción de la señal desde el receptor al efector.

La respuesta esteroidogénica a AII en la zona glomerulosa de la corteza adrenal está mediada por dos proteínas G. A bajas concentraciones de la hormona, la síntesis de aldosterona se produce a través de la activación de la PLC mediada por una proteína G insensible al tratamiento con toxina pertusis, la G_q (Hausdorff *et al.*, 1987; Baukal *et al.*, 1988) pero cuyo la concentración de AII es supramáxima, la atenuación de la respuesta esteroidogénica está mediada por una proteína G diferente que resulta sensible a toxina pertusis (Hausdorff *et al.*, 1987). También se ha informado que la toxina pertusis actúa inhibiendo la entrada de Ca^{2+} inducida por AII sin modificar los niveles de inositol trifosfato (Kojima *et al.*, 1986a) e inhibiendo la adenilil ciclasa probablemente a través de la activación de una proteína G del tipo G_i (Woodcock y Johnston, 1984; Hausdorff *et al.*, 1987).

El estímulo con AII conduce a la rápida acumulación de IP_3 , que es luego metabolizado a diferentes productos. Algunos de estos metabolitos, como los isómeros del IP_3 , aparecen a tiempos cortos sugiriendo que ambas isoformas están metabólicamente relacionadas (Balla *et al.*, 1986; Rossier *et al.*, 1988). La existencia de otros productos más fosforilados sensibles a la hormona, como por ej: $Ins(1,3,4,5)P_4$ y los isómeros de los inositoles tetraquisfosfato (Balla *et al.*, 1987) y pentaquisfosfato (Balla *et al.*, 1989) revelan la complejidad del metabolismo de los inositoles fosfato y el rol fundamental que deben cumplir las proteínas quinasas y fosfatasas para regular los niveles de estos metabolitos.

Debido a lo complejo del sistema, sólo se ha definido con claridad la función intracelular del IP_3 . Esta molécula es la mediadora en la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares (Kojima *et al.*, 1984) y ejerce su acción a través

de la unión a receptores específicos (Baukal *et al.*, 1985; Guillemette *et al.*, 1987) localizados en una organela relacionada al retículo endoplásmico (Rossier *et al.*, 1989).

Concomitantemente con la producción de IP₃, AII estimula la formación de DAG, un activador endógeno de la PKC (Kojima *et al.*, 1986b). La participación de esta enzima en la secreción de aldosterona es actualmente motivo de controversia. Se ha informado que la estimulación de células de la granulosa bovina con AII produce una redistribución de la actividad de PKC del citosol a las membranas (Lang y Vallotton, 1987). Se han descrito por lo menos tres isoformas diferentes de PKC en zona glomerulosa de rata, α , δ , ξ , aunque la función de cada una de ellas en la esteroidogénesis aún no ha sido establecida (Capponi *et al.*, 1994). Tampoco está claro el mecanismo por el cual la hormona induce la translocación de la PKC, aunque se cree que en este proceso estaría involucrado el DAG. El tratamiento de células de glomerulosa con ésteres de forbol (PMA), un activador de la PKC, induce la translocación de la enzima y este efecto no puede ser reproducido ni por K⁺ ni por agentes promotores del aumento en los niveles citosólicos de Ca²⁺. A pesar de que es claro que AII causa la translocación de la PKC y probablemente su activación en la zona glomerulosa de adrenal de rata, aún no se ha establecido si esta activación es parte del mecanismo de síntesis de aldosterona.

Estudios recientes indican que PKC no sólo participaría en la fase sostenida de la esteroidogénesis, sino también en la respuesta inicial a AII (Kojima *et al.*, 1994).

La identificación de los sustratos endógenos de la PKC en células de la zona glomerulosa parecería ser un paso esencial para el esclarecimiento de la función de la enzima en la activación de la síntesis de esteroides.

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento de las células de glomerulosa con All provoca un aumento inmediato de los niveles citosólicos de Ca^{2+} . Este aumento se debe a la liberación de Ca^{2+} del compartimento intracelular durante la fase temprana de la respuesta, o bien al influjo de Ca^{2+} extracelular en la última fase de la respuesta (Barret *et al.*, 1988). Se han propuesto tres vías diferentes de entrada de Ca^{2+} a las células de la zona glomerulosa luego de la estimulación con All: (1) los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOC); (2) los canales de calcio activados por la liberación de Ca^{2+} intracelular mediada por la generación de IP_3 (CRAC), esta es la vía mas importante de entrada de calcio activada por la hormona (Burnay *et al.*, 1994); y (3) el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Hunyady *et al.*, 1988). Además, se ha demostrado que All despolariza las células de zona glomerulosa lo suficiente como para abrir canales de Ca^{2+} de bajo umbral tipo T (Quinn *et al.*, 1987) y que este efecto se debería al bloqueo de los canales de K^+ posiblemente por acción de la PKC (Lobo *et al.*, 1990).

II-1.4 Mecanismo de acción del K^+

Se ha informado que el K^+ estimula la secreción de aldosterona en células de la glomerulosa adrenal (Williams y Braley, 1977) y que a diferencia de otros secretagogos, el K^+ extracelular actúa a nivel de la membrana plasmática alterando la fuerza conductora para este ión con la consecuente modificación del potencial de membrana (Quinn *et al.*, 1987). La despolarización de la membrana observada en respuesta al K^+ se traduce en la activación de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (Kojima *et al.*, 1985b) del tipo de bajo umbral (Johnson *et al.*, 1989). Este evento constituye el paso inicial en la transducción de la señal. El incremento en el influjo de Ca^{2+} , produce un aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} libre que se correlaciona con la producción de aldosterona (Williams y Braley, 1977; Capponi *et al.*, 1984; Connor *et al.*, 1987), siendo este aumento rápido y sostenido mientras dura la estimulación.

Se especula que la acción del K^+ es a través de la activación de la CaMKII y posterior fosforilación de proteínas (Elliot *et al.*, 1993).

II-2 Principales proteínas quinasas involucradas en el mecanismo de acción de las hormonas esteroideogénicas

II-2.1 Proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA)

Esta proteína, en mamíferos y en su estado inactivo, es un tetrámero constituido por dos subunidades regulatorias (R) y dos catalíticas (C) (Corbin *et al.*, 1978). La activación de la quinasa se produce cuando dos moléculas de AMPc se unen a cada una de las subunidades R provocando una disminución en la afinidad por las C (Dorskely *et al.*, 1993). De esta forma, se produce la disociación de la holoenzima en un dímero de subunidades R y dos monómeros C (Flockhart *et al.*, 1982) que en presencia de ATP/Mg²⁺ transfieren catalíticamente el γ -fosfato del ATP a un residuo de Ser/Thr incluido en la secuencia consenso, RRXS/TX, dentro del sustrato (Edelman *et al.*, 1987; Francis y Corbin, 1994).

Existen descritas en mamíferos dos formas principales de PKA (tipos I y II) que se distinguen entre sí por su comportamiento en una columna de DEAE-celulosa, su especificidad por análogos de AMPc y su capacidad de autofosforilación (Nairn *et al.*, 1985). El estudio de las características físico-químicas de las subunidades reveló que, a pesar de las ligeras diferencias estructurales e independientemente del tipo de PKA, las subunidades C serían idénticas (Zoller *et al.*, 1979).

Las principales diferencias estructurales y funcionales entre las quinasas de tipo I y II parecen deberse a las diferentes características de las subunidades R de tipo I (43 kDa) y II (45 kDa). Ambas subunidades forman complejos con las mismas isoformas de C por lo tanto, la activación de cualquiera de las holoenzimas y consecuente liberación de C llevaría, siempre que existiera una igual distribución de todos los componentes

dentro de la célula, a la fosforilación del mismo sustrato (Daskely *et al.*, 1993). Aparentemente, las subunidades R son homodimerizadas a través de interacciones entre las regiones N-terminales de los monómeros (Takio *et al.*, 1984). Además, mientras la región N-terminal determina la localización subcelular de R (Scott *et al.*, 1990), el extremo C-terminal participa en la acción inhibitoria de R sobre C.

Se han descripto diferentes isoformas de cada una de las subunidades R (RI α , RI β , RII α y RII β), las cuales serían el resultado de la expresión de genes diferentes (Beebe y Corbin, 1986; McKnight, 1991). La expresión de las distintas isoformas de subunidades R varía según la especie y en los diferentes tejidos. Así, mientras la subunidad RI α se expresa en la mayoría de los tejidos, la subunidad RII β está selectivamente expresada en sistema nervioso central, tejidos neuroendócrinos, células de Sertoli, células de la granulosa de ovario (Jahnsen *et al.*, 1980) y pulmón (Robinson-Steiner y Corbin, 1983).

Se ha determinado, que la localización subcelular de la PKA depende de sus subunidades R. Aunque ambas isoformas de R son predominantemente citoplasmáticas, ciertos tejidos contienen hasta un 75% de RII asociada a la fracción particulada (Scott *et al.*, 1990). Esta asociación se debe a la existencia de una familia de proteínas de anclaje denominadas AKAPs (A kinase Anchoring Proteins) (Hirsch *et al.*, 1992) que varían en tamaño, estructura primaria (Bregman *et al.*, 1989 y 1991) y afinidad por RII α y RII β (Leiser *et al.*, 1986) y que están presentes, entre otros, en el citoesqueleto y en el aparato de Golgi (Nigg *et al.*, 1985).

La subunidad C tiene un centro catalítico que se encuentra altamente conservado en todas las quinasas (Hanks *et al.*, 1988). El análisis de la estructura primaria determinó que el sitio de unión al ATP se encuentra en la porción N-terminal y que la unión al sustrato, próxima al extremo C-terminal,

se daría sólo en el contexto de dos aminoácidos ácidos y en la Thr-197 de la molécula.

Se ha informado que la subunidad C purificada de mamíferos presenta dos fosfatos unidos covalentemente en los residuos de Thr-197 y Ser-338 que son inaccesibles al tratamiento con fosfatasas y que se cree son incorporados por modificación post- o co-traducciona l en la proteína, aunque no puede descartarse un proceso autocatalítico. Un tercer residuo, Ser-10, puede ser fosforilado *in vitro*. La fosforilación disminuye los K_m s de la enzima tanto por el sustrato como por el ATP (Toner-Webb *et al.*, 1992; Steinberg *et al.*, 1993).

En los mamíferos, la subunidad C se presenta como tres isoformas: la $C\alpha$, $C\beta_{1,2}$ (producto del *splicing* alternativo del ARNm) y la $C\gamma$. Las isoformas $C\alpha$ y $C\beta$ han sido clonadas en varias especies y presentan un 98% de homología de secuencia (Uhler *et al.*, 1986a,b) mientras que la $C\gamma$, cuya expresión parece estar restringida al testículo, es 80% homóloga a las anteriores (Beebe *et al.*, 1990; Foss *et al.*, 1992). Teniendo en cuenta las isoformas presentes de cada una de las subunidades R y C de la PKA se puede predecir la existencia de múltiples holoenzimas cuya expresión, regulación y afinidad por el sustrato sean diferentes.

La actividad de la PKA eucariótica puede ser inhibida por un heptadecapéptido, antagonista competitivo del sustrato, denominado PKI (5-24, TTYADFIASGRTGRRNAIHD) (Demaille, 1977; Walsh y Glass, 1991) que presenta un sitio de pseudosustrato (RRNAI) en el extremo C-terminal y una estructura de α -hélice anfipática en la porción N-terminal. La interacción entre PKI y las subunidades $C\alpha$ o $C\beta$ es a través de los residuos de Phe-10, Arg-18, Arg-19, Ile-22 y en menor grado por Arg-15 (Kemp, 1994). La inhibición de la actividad se produce por la interacción de la Phe-10 del PKI a la porción hidrofóbica de la subunidad C constituida por Tyr-235, Arg-133 y Phe-239 y por las interacciones de las Arg-18 y Arg-19 del PKI con los

residuos de Glu-127, Asp-329, Glu-331 y Glu-170, Glu-230 de la subunidad regulatoria C α .

Los residuos de contacto están conservados en las subunidades C de muchas especies y se encuentran presentes en las proteínas quinasas dependientes de GMPc sugiriendo un posible rol regulatorio del PKI sobre este tipo de quinasas.

II-2.2 **Proteína quinasa C (PKC)**

Una de las proteínas quinasas de serina más importantes descritas, además de la PKA, es la PKC. Los estudios moleculares de la PKC condujeron a la caracterización de nueve ADNc correspondientes a distintas isoformas de la enzima cuya expresión es propia de diferentes especies, tejidos y líneas celulares (Nishizuka, 1988). El conjunto de estas isoformas puede dividirse en dos grupos principales: las PKCs convencionales o dependientes de Ca²⁺ (cPKC) donde se incluyen a las isoformas α , β I, β II, y γ y las noveles o independientes de Ca²⁺ (nPKC) que involucran a las isoformas δ , ϵ , ζ , η y θ (Ohno *et al.*, 1991).

El estudio de la estructura primaria de estas enzimas permitió establecer que todas las isoformas de PKC consistían de una única subunidad proteica que incluía dominios conservados, presumiblemente funcionales (C1-C4), y dominios variables (V1-V5) de función no definida (Coussens *et al.*, 1986). En todas las isoformas de PKC, las regiones C3-V5 de la porción C-terminal constituye el dominio catalítico, el cual está separado de la porción regulatoria N-terminal por la región V3.

El dominio V1, ubicado en la región N-terminal de todas las isoenzimas del tipo cPKC, constituye una secuencia corta de aproximadamente 20 aminoácidos a la cual no se le ha atribuido ninguna función específica. Sin embargo, se especula que en las isoformas nPKC esta región puede modular la función de los dominios conservados.

Mientras el dominio C1 incluye dos *motif* característicos de unión al ADN y está presente en todas las PKCs, la región C2 que contiene el dominio de unión al Ca^{2+} sólo se encuentra en las cPKCs (Ohno *et al.*, 1988). El dominio V3 constituye la región bisagra de la molécula y separa los dominios catalíticos de los regulatorios. Esta región es sensible a la ruptura proteolítica por tripsina o calpaína I y II. El tratamiento con cualquiera de estas proteasas conduce a la activación en forma constitutiva de la quinasa (Kishimoto *et al.*, 1983). La región C3 contiene la secuencia consenso de unión al ATP $\text{XGXXGX}_{16}\text{KX}$ característica de las proteínas quinasas (Kemp y Pearson, 1990; Taylor *et al.*, 1990). La región C4 contiene el sitio de unión al sustrato y la región de transferencia del fosfato. Además, en todas las isoenzimas de la PKC existe una distancia conservada de 105-108 aminoácidos (113 en PKC γ) entre el final del sitio de unión al ATP y el comienzo de la región de transferencia del fosfato.

El modelo de activación de las cPKCs implica los siguientes eventos: (1) la generación de DAG e IP_3 como resultado de la hidrólisis del PIP_2 por la PLC, (2) la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares, (3) la unión del Ca^{2+} a la región C2 de la PKC y (4) la consecuente translocación a la membrana plasmática, donde es activada por la unión del DAG y la fosfatidilserina al dominio C1 (Bell y Burns, 1991). En este modelo, los ésteres de forbol pueden imitar la acción del DAG y por su persistencia en la membrana celular, llevar a la activación de la PKC por largo tiempo (Gschwendt *et al.*, 1991).

El único requerimiento para la activación de las nPKC es el DAG o los ésteres de forbol y la fosfatidilserina (Liyanage *et al.*, 1992). La excepción la constituye la PKC ζ que exhibe una actividad constitutiva de quinasa.

La mayoría de las proteínas quinasas descritas exhiben autofosforilación, la cual no está necesariamente ligada a la modulación de la actividad de quinasa (Miller y Kennedy, 1986). La autofosforilación ha sido informada en

todas las formas conocidas de PKC (Hug y Sarre, 1993 y sus citas). En particular, el estudio de las distintas isoenzimas de cPKC ha revelado que se trata de una reacción intramolecular en los residuos de Ser y Thr de los dominios regulatorios y catalíticos (Huang *et al.*, 1986; Mochly-Rosen y Koshly, 1987).

Un estudio realizado sobre la PKC β II (Flint *et al.*, 1990) reveló ciertas características interesantes de la autofosforilación: (1) todos los residuos fosforilados se encuentran en las regiones variables de la PKC, (2) el contexto de aminoácidos que los rodea no exhibe ninguna secuencia consenso; (3) la distribución de los sitios de autofosforilación sobre las regiones N-terminal, bisagra y C-terminal sugieren la proximidad de estas regiones al centro catalítico de la PKC y apoya la hipótesis de un plegamiento parcial o total de la proteína como prerequisite para la autofosforilación (Bell y Burns, 1991). Se postula que la función de la autofosforilación en estas enzimas estaría relacionada con la especificidad de sustrato o la translocación.

La distribución tisular de las isoenzimas de la PKC ha sido determinada por Northern y Western blot. Las isoformas α , β I, β II, δ , ϵ , ζ parecen estar ubicuamente distribuidas, por ej. en cerebro, pulmón, bazo, timo y piel (Nishizuka, 1988; Wada *et al.*, 1989; Ohno *et al.*, 1991; Wetsel *et al.*, 1992) mientras que la PKC γ está exclusivamente expresada en el sistema nervioso central (Nishizuka, 1988; Ohno *et al.*, 1991), la PKC η se expresa preferentemente en pulmón y piel (Osada *et al.*, 1990; Bacher *et al.*, 1991) y la PKC θ principalmente en músculo esquelético (Osada *et al.*, 1992).

La distribución, cantidad y número de las diferentes formas de PKC expresadas en un determinado tejido varía según el estado de su desarrollo (Nishizuka, 1988). Estas observaciones sugieren la existencia de un cierto conjunto de isoenzimas de PKC que garantizan la secuencia ordenada de

eventos de proliferación y diferenciación que lleva al mantenimiento de las características de un tejido determinado.

II-2.3 **Proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} / calmodulina (CaMKII)**

El aislamiento y la caracterización de proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina en cerebro de rata, hígado y músculo esquelético de conejo, permitió identificar una nueva clase de enzimas distintas de las MLCK (*myosin light chain kinase*).

Esta enzima llamada CaMKII ha sido purificada a partir de numerosas fuentes. En el cerebro, donde existe en altas concentraciones, se encuentra principalmente asociada a membrana o a estructuras del citoesqueleto, aunque una proporción menor se encuentra en el citosol (Ouimet *et al.*, 1984; Sahyoun *et al.*, 1984; Edelman *et al.*, 1985).

La CaMKII consiste de una subunidad α de 49-55 kDa y un dímero β/β' de 60/58 kDa (Fukunaga *et al.*, 1982; McGuinness *et al.*, 1983 y 1985). Ambas subunidades, son dependientes de calmodulina y se autofosforilan. La calmodulina es un miembro de una familia de proteínas que unen Ca^{2+} , siendo su distribución ubicua en células eucariontes. Es una proteína de 17 kDa (148 aminoácidos) compuesta por dos dominios globulares unidos por una α -hélice. Cada dominio contiene dos sitios de unión a Ca^{2+} y la unión del ión resulta de un efecto cooperativo. La unión del Ca^{2+} a los dos últimos sitios activa la calmodulina que es capaz de estimular una variedad de enzimas. La CaMKII tiene un K_m bajo por el ATP (7-109 μM) y una afinidad alta K_a (10-123 nM) por la CaM (Yamauchi y Fujisawa 1983; Schulman, 1984).

La CaMKII reconoce varias secuencias consenso de las cuales una resulta homóloga a la de la PKA y MLCK y por tal razón es capaz de fosforilar los mismos sustratos (Ahmad *et al.*, 1982; McGuinness *et al.*, 1983; Payne *et al.*,

1983). Sin embargo, la fosforilación del residuo de Ser/Thr sólo se realiza en presencia de una Arg en la posición -3 del residuo fosfoaceptor.

Se han identificado otras dos Ca^{2+} /CaM quinasas llamadas I y III. La CaMKI se identificó en cerebro como un monómero de 37-42 kDa mientras que la expresión de la CaMKII es mayoritaria en el páncreas y el músculo esquelético.

II-2.4 Sitios comunes de acción de los diferentes agonistas que regulan la esteroidogénesis

Hasta aquí hemos descripto algunos de los mecanismos de transducción de señales que conducen a la síntesis de esteroides. Se ha demostrado que tanto LH como ACTH activan la adenilil ciclasa produciendo un aumento en los niveles intracelulares de AMPc con la consecuente activación de la PKA. All actúa a través de una proteína efectora diferente, la PLC, que genera IP_3 y DAG produciendo un aumento intracelular de Ca^{2+} , lo que se traduce en la activación de la PKC. Por otro lado, las variaciones en las concentraciones extracelulares de K^+ se reflejan en la despolarización de la membrana plasmática y la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, generando un influjo de Ca^{2+} que probablemente impulse la activación de CaMKII.

Sea cual fuere el agonista que promueve la respuesta fisiológica en los distintos órganos blanco, todos los procesos celulares generados a partir de la producción de segundos mensajeros convergen en la activación de diferentes proteínas quinasas. Es evidente que en los distintos tejidos esteroidogénicos, la producción de hormonas esteroides en respuesta al estímulo por diferentes agonistas debe necesariamente contener sitios de acción comunes. Uno de estos eventos, podría ser la existencia de una proteína sustrato de las diferentes proteínas quinasas e intermediaria común en todos los mecanismos de acción.

III El ácido araquidónico y sus metabolitos en la síntesis de hormonas esteroideas

III-1 Generalidades

En tejidos endócrinos como la corteza adrenal, células de Leydig y de la granulosa, islotes de Langerhans y diferentes tipos celulares de la adenohipófisis, los metabolitos del ácido araquidónico (AA) son intermediarios obligatorios en la respuesta celular a la acción hormonal (Canónico *et al.*, 1983; Dix *et al.*, 1984; Kojima *et al.*, 1985b; Solano *et al.*, 1987 y 1988; Dada *et al.*, 1996; Van Voorhis *et al.*, 1993; Vlaskova y Knepel, 1984; Naor *et al.*, 1985; Metz *et al.*, 1982; Turk *et al.*, 1984).

Se ha descrito que la activación de varios tipos de receptores produce la liberación de AA a partir de los fosfolípidos de membrana (Burgoye y Morgan, 1990). En este sentido, se ha postulado que este metabolito constituye un segundo mensajero ya que su aumento intracelular puede reproducir los efectos hormonales, en tanto que la inhibición de su liberación o metabolismo bloquea la respuesta final del sistema y su agregado exógeno revierte la inhibición producida por los inhibidores de su liberación (McPhail *et al.*, 1984; Murakami y Routtenberg, 1985; Naor, 1991).

El AA y sus metabolitos (eicosanoides) pueden actuar como mensajeros intra e intercelulares. El AA puede activar directamente a algunas proteínas quinasas o bien puede ser metabolizado a prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, hidroperóxidos o epóxidos, potentes mediadores de la respuesta celular que intervienen en procesos tan diversos como la agregación plaquetaria, el *shock* anafiláctico, la inflamación, termogénesis, en la relación huésped-parásito y en el catabolismo de lipoproteínas.

III-2 Síntesis del ácido araquidónico (AA)

El AA se sintetiza a partir de ácidos grasos poliinsaturados esenciales de la familia del ácido linoleico (18:2, $\Delta^{9,12}$). Los mamíferos tienen la Δ^9 desaturasa y por lo tanto son capaces de sintetizar completamente la serie del ácido oleico o la familia de ácidos grasos insaturados mediante una combinación de alargamiento de la cadena y desaturación. Sin embargo, son incapaces de sintetizar ácidos linoleico o α -linolénico por carecer de las desaturasas necesarias. Estos ácidos grasos deben ser suministrados en la dieta para poder realizar la síntesis de los demás miembros de las series de los ácidos grasos poliinsaturados.

El linoleato es convertido en araquidonato a través de un proceso que involucra sucesivas reacciones de elongación y desaturación. El linoleato se desatura por acción de la Δ^6 desaturasa dando origen al γ -linolenato que contiene tres dobles ligaduras (18:3, $\Delta^{6,9,12}$). La elongación de este ácido graso por adición de una unidad de dos carbonos del malonil-CoA en el sistema microsómico de alargamiento de las cadenas, da origen al dihomo- γ -linolenato de 20 carbonos (20:3, $\Delta^{8,11,14}$). Finalmente, la síntesis del araquidonato (20:4, $\Delta^{5,8,11,14}$) resulta de la posterior desaturación de este ácido graso por la Δ^5 desaturasa (Myon *et al.*, 1986).

III-3 Sistemas involucrados en la liberación de ácido araquidónico

Probablemente, dada la función del AA en el metabolismo celular, los niveles de AA libre son cuidadosamente regulados a través de diferentes sistemas. Los mecanismos que intervienen en el mantenimiento de los niveles de AA libre, involucran la activación de la fosfolipasa A₁, A₂, C y D.

El AA puede ser generado por acción de la PLA₁ sobre los fosfolípidos o el ácido fosfatídico. La PLA₂ como enzima efectora (Axelrod *et al.*, 1988; Axelrod, 1990) cataliza la hidrólisis del enlace éster en la posición 2 de los glicerofosfolípidos como la fosfatidilcolina, fosfatidilserina,

fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico y plasmalógenos produciendo AA libre y lisofosfolípidos.

Otros mecanismos de liberación de AA, incluyen la activación de la PLC como consecuencia de la formación del complejo hormona-receptor y a través de una proteína transductora G. Uno de los productos que resultan de esta interacción es el DAG, fuente importante de AA (Lapetina, 1982). La acción de la PLD sobre los glicerofosfolípidos genera ácido fosfatídico a partir del cual puede también obtenerse AA (Exton, 1990). Existen evidencias que indican que los niveles de AA libre también pueden ser modificados alterando su captación a través de receptores para lipoproteínas de baja densidad (Habenicht *et al.*, 1990) y por deacilación/reacilación de fosfolípidos.

Si bien todos estos mecanismos directa o indirectamente generan AA, la fuente más importante de producción de este metabolito es la activación de la PLA₂ como consecuencia de la acción hormonal.

III-4 Caracterización estructural y funcional de la fosfolipasa A₂ (PLA₂)

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) son un conjunto de enzimas que hidrolizan la unión de un ácido graso ubicado en la posición *sn*-2 de los fosfolípidos para producir lisofosfolípidos y ácidos grasos libres. Las células de mamíferos contienen formas estructuralmente diferentes de PLA₂ que incluyen a las variedades secretoria (sPLA₂), a las independientes de calcio y a las citosólicas (cPLA₂) (Kudo *et al.*, 1993; Dennis, 1994; Ackerman y Dennis, 1995; Clark *et al.*, 1995). La presencia de diferentes PLA₂ permite la regulación de los múltiples sistemas de señales relacionados con el recambio de ácidos grasos. En el presente trabajo se describirán sólo las propiedades bioquímicas y regulatorias de la cPLA₂ debido a la relevancia de esta enzima en la liberación del ácido araquidónico.

El ADNc de la cPLA₂ ha sido clonado y secuenciado. Se ha determinado que su masa molecular es de 85000 (Clark *et al.*, 1991; Sharp *et al.*, 1991), valor que difiere del obtenido por electroforesis en geles de poliacrilamida (95-110 kDa, Leslie *et al.*, 1988; Clark *et al.*, 1990; Kramer *et al.*, 1991) probablemente debido a una modificaciones post-traduccionales en la enzima. La cPLA₂ se transloca desde el citosol a la membrana de manera Ca²⁺ dependiente (Channon y Leslie, 1990) posiblemente por unión de este catión a un dominio ubicado en la porción N-terminal de la proteína. Este dominio, denominado CalB, resulta homólogo a la región de unión a Ca²⁺ de la PKC (C2) y a la descrita en la fosfolipasa Cy.

La cPLA₂ está ampliamente distribuida y su transcripto expresado en niveles relativamente constantes en todos los tejidos humanos, a excepción del pulmón y el hipocampo donde se encuentran más elevados (Kramer *et al.*, 1991; Sharp *et al.*, 1991). Un caso particular lo constituyen los linfocitos T y B que contienen cPLA₂ solo en la etapa previa a la diferenciación. Se cree que la expresión de la cPLA₂ en el linfocito maduro podría ser incompatible con su función (Barbour y Dennis, 1991). La expresión ubícu de la cPLA₂ se correlaciona con las características estructurales de la región 5' no codificante del gen en el que se puede identificar una secuencia promotora *housekeeping* que no incluye al TATA box (Wolf y Gross, 1985; Hazen *et al.*, 1990; Kramer *et al.*, 1991). Sin embargo, a diferencia de muchos promotores *housekeeping*, no existen en este caso las típicas regiones ricas en GC ni los sitios SP1 donde se unen factores de transcripción. Además, la región regulatoria del gen contiene una secuencia de 27 nucleótidos de pirimidinas responsable de la expresión basal del gen (Kramer *et al.*, 1991) y dos elementos respondedores a glucocorticoides, lo que sugiere que los esteroides pueden bloquear la síntesis de cPLA₂ actuando posiblemente a nivel transcripcional.

Esta enzima contiene nueve residuos de cisteína que no son esenciales para la actividad catalítica de la enzima ni forman uniones disulfuro

intracatenarias resultando estable frente a agentes reductores (Scott *et al.*, 1990; Wery *et al.*, 1991). Sin embargo, los estudios con agentes modificadores de grupos sulfhidrilos permitieron identificar un único residuo de Cys en la posición 331 que sería esencial para la actividad catalítica de la cPLA₂ (Verger *et al.*, 1973; Deems *et al.*, 1975).

El análisis de la estructura primaria de la cPLA₂ permitió identificar un sitio consenso característico, GXXS (GLS²²⁸GS), que podría constituir el sitio catalítico de la enzima. En particular, la Ser-228 ha sido recientemente confirmada como el nucleófilo activo (Berg *et al.*, 1991).

La cPLA₂ tiene otras actividades enzimáticas como las de lisofosfolipasa y de transacilasa (Gassama-Diagne *et al.*, 1992).

III-5 Regulación de la actividad de la fosfolipasa A₂

III-5.1 Acción del Ca²⁺

La cPLA₂ requiere Ca²⁺ para su actividad, sin embargo la función del Ca²⁺ parece estar asociada más a la unión de la cPLA₂ a membranas que a la catálisis. Como se mencionó anteriormente, la cPLA₂ tiene un dominio CalB de unión al Ca²⁺ que es homólogo a los descritos en otras proteínas. Este dominio que se extiende desde los aminoácidos 18 a 141 (Scott *et al.*, 1991) contiene cuatro de los cinco residuos que se consideran esenciales para la unión del Ca²⁺ a esta región (Asp³⁷, Asp⁴³, Asp⁹³ y Glu¹⁰⁰). Cuyo las concentraciones de Ca²⁺ oscilan entre 0,3 y 1 μM, se favorece la unión del catión al dominio CalB y la consecuente translocación de la cPLA₂ a la membrana. Estos niveles de Ca²⁺ se correlacionan con los descritos para estimular *in vitro* la actividad catalítica de la enzima usando vesículas de fosfolípidos como sustrato (Plesniak *et al.*, 1993). Se ha demostrado que un fragmento conteniendo únicamente el dominio CalB de la cPLA₂ se une a una membrana artificial cuyo es incubado con el mismo rango de concentraciones de Ca²⁺ que el descripto para la enzima intacta. Cuyo en las

mismas condiciones, se utiliza un fragmento de la porción C-terminal de la enzima que no incluye el dominio C2, en presencia de fosfolípidos como sustrato, se retiene la actividad catalítica sin producirse translocación a la membrana (Yu y Dennis, 1992). Esto demuestra la existencia de dos regiones estructuralmente diferentes dentro de la cPLA₂, que constituirían los dominios estructurales y funcionales de la enzima.

Las propiedades descritas para la cPLA₂ se correlacionan con las de enzimas que se localizan en la fracción soluble cuyo las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ oscilan entre 50-100 nM y que se translocan a la membrana cuyo los niveles de Ca²⁺ aumentan. En este sentido, se ha descrito que la liberación de AA se produce por acción de agonistas que movilizan Ca²⁺ (Dennis, 1983). En algunas líneas celulares de rata, el tratamiento con ionóforos de Ca²⁺ produce la translocación de la cPLA₂ del citosol a la membrana nuclear que se correlaciona con la liberación de AA (Diez y Mong, 1990). La sobreexpresión de la cPLA₂ en células CHO y el tratamiento con inóforos de Ca²⁺, induce la translocación de la enzima al retículo endoplásmico y a la membrana nuclear (Rehfeldt *et al.*, 1991). Por el contrario, la mutación de la Ser-505, incluida en un sitio consenso de fosforilación para MAPK, no tiene efecto sobre la translocación, aunque bloquea la liberación de AA. Por lo tanto, se postula que el Ca²⁺ cumpliría un papel fundamental en la translocación de la enzima de un compartimento celular a otro sin tener un papel determinante en la actividad catalítica de la enzima.

III-5.2 Regulación de la actividad de la PLA₂ por fosforilación

En muchos tipos celulares, la exposición a diferentes agonistas produce un aumento en la actividad de la cPLA₂ que puede ser revertido por el tratamiento con fosfatasas (Dennis, 1983). Se ha descrito que un residuo de Ser de la cPLA₂ es el que se modifica por fosforilación. En células estimuladas, la actividad de la cPLA₂ aumenta como consecuencia de la

fosforilación en el residuo de Ser-505 por acción de la MAPK (Channon y Leslie, 1990; Wijkyer y Sundler, 1992; Reynolds *et al.*, 1993). La cPLA₂ tiene un sitio consenso de fosforilación para MAPK (PLS⁵⁰⁵P) y la fosforilación *in vitro* de este sitio, tanto por ERK1 como por ERK2, lleva a un aumento en la actividad de la enzima (Leslie, 1991). Aunque otras proteínas quinasas como la PKC, PKA, p38K y JNK (c-Jun N-terminal Kinases) también pueden fosforilar a la cPLA₂ *in vitro*, en ningún caso se observa un aumento significativo en la actividad de la enzima.

Algunas evidencias involucran a la PKC en la activación de la cPLA₂ y en la regulación de la liberación de AA. Sin embargo, la participación de la PKC no sería directa, ya que no existen evidencias que relacionen directamente esta quinasa con la fosforilación de la cPLA₂ *in vivo*, sino que su acción sería a través de cascadas de proteínas quinasas que producirían la activación de las MAPK (Lin *et al.*, 1992).

Aunque la fosforilación en Ser-505 es importante para la activación de la cPLA₂, sólo se alcanza la actividad máxima cuando hay un incremento en la concentración intracelular de Ca²⁺ (Dennis, 1983). De hecho, se ha demostrado que el evento de fosforilación precede temporalmente al de la translocación (Hazen y Gross, 1991).

Existen otras evidencias experimentales que sugieren que la actividad de la cPLA₂ puede ser regulada a través de otros mecanismos como ser la fosforilación en residuos de Tyr (Qiu *et al.*, 1993), el acoplamiento a proteínas G (Axelrod *et al.*, 1988) y la existencia de proteínas regulatorias positivas (Clark *et al.*, 1987) o negativas (Qiu *et al.*, 1993).

III-6 Metabolismo del ácido araquidónico

El AA puede ser metabolizado a eicosanoides. Estas moléculas constituyen una familia de ácidos grasos oxigenados que contienen 20 átomos de carbono, pueden dividirse en tres grupos: los prostanoideos que son

sintetizados a través de la vía de la ciclooxigenasa e incluye a las prostaglandinas y los tromboxanos; los leucotrienos y ciertos mono-, di- y tri-hidroxiácidos que se forman a través de la vía de la lipoxigenasa y finalmente, los epóxidos que se sintetizan a través de la vía de la epoxigenasa.

Los prostanoïdes no se encuentran almacenados, sino que son sintetizados en respuesta a un estímulo. Por ejemplo, las plaquetas sintetizan prostanoïdes (especialmente tromboxano A_2) en respuesta a la trombina o el colágeno (Lapetina *et al.*, 1981; Neufeld *et al.*, 1983) mientras que otras células responden a estos u otros agentes como la AII (Schwartzman *et al.*, 1981), la bradiquinina (Schwartzman *et al.*, 1981; Whorton *et al.*, 1982; García-Perez y Smith, 1984) y la arginina-vasopresina (Kirschenbaum *et al.*, 1982; García-Perez y Smith, 1984). El efecto inmediato de cada uno de estos estímulos, es el incremento en la concentración de AA libre en la vecindad de la ciclooxigenasa. Normalmente las células no producen, o lo hacen en muy bajos niveles, prostanoïdes y el aumento en la producción de estos está correlacionada temporalmente con la liberación de AA, sugiriendo que este evento es un punto de control.

Los prostanoïdes se sintetizan a través de un mecanismo que involucra tres etapas principales: (1) la liberación del AA de los glicerofosfolípidos precursores, (2) la oxigenación del AA libre por la prostaglandina endoperóxido G/H (PGG/H) sintasa (ciclooxigenasa) y (3) la metabolización del endoperóxido PGH_2 a productos biológicamente activos y específicos tales como las prostaglandinas de las series E (E_2), F ($F_{2\alpha}$) e I_2 (prostaciclina) o el tromboxano (TxA_2).

Los leucotrienos y los ácidos grasos relacionados se sintetizan a través de la vía de la lipoxigenasa. Se han descripto en mamíferos tres lipoxigenasas distintas que catalizarían la incorporación de una molécula de oxígeno en la posición 5, 12 o 15 del AA. El producto inicial de estas reacciones es un

ácido hidroperoxieicosatetraenoico (por ej. el 5-, 12- o 15-HPETE) el que puede ser reducido al correspondiente ácido hidroxeicosatetraenoico (por ej. 5-, 12- o 15-HETE).

El mecanismo que involucra a la 5-lipoxigenasa ha sido el más estudiado ya que es el precursor de la síntesis de los leucotrienos. El 5-HPETE puede convertirse por deshidratación en el leucotrieno A_4 (LTA_4) que por hidrólisis no enzimática origina el LTB_4 .

Las epoxigenasas transforman al AA en ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) por un mecanismo dependiente de NADPH. Los productos obtenidos tienen potentes actividades biológicas como ser la agregación plaquetaria y el transporte iónico (Capdevila *et al.*, 1982; Schwartzman *et al.*, 1987; Marcus *et al.*, 1988).

III-7 La función del ácido araquidónico y sus metabolitos en la esteroidogénesis

En nuestro laboratorio se han desarrollado diversos estudios tendientes a establecer el rol del AA y sus metabolitos como intermediarios en la regulación hormonal de la esteroidogénesis. Para que estas moléculas sean consideradas intermediarios comunes en la acción hormonal debían verificarse los siguientes postulados:

- a) Inhibidores de la liberación del intermediario deben inhibir la respuesta final.
- b) Debería ser posible imitar la respuesta hormonal agregando el intermediario exógenamente.
- c) El agregado exógeno del intermediario debería anular la inhibición producida por los inhibidores de su liberación.

d) La hormona debería producir un incremento de los niveles intracelulares del intermediario y este debería observarse a concentraciones fisiológicas de la hormona y preceder temporalmente a la respuesta biológica para cada hormona en particular.

e) Si el intermediario es metabolizado, inhibidores del metabolismo deberían bloquear la respuesta biológica.

Inicialmente describimos que los inhibidores de la liberación de AA por la PLA₂ anulan el efecto de ACTH, LH o dibutilil-AMPc sobre la secreción de esteroides en la zona fasciculata de corteza adrenal y en células de Leydig y que este efecto es revertido por el agregado exógeno de AA al sistema. Más aún, la adición de únicamente este metabolito estimula la producción de corticosterona y testosterona en los mismos sistemas. Además, hemos descrito que la estimulación de células de Leydig o de la zona fasciculata con niveles fisiológicos de LH o ACTH promueve la liberación de AA (Dada, 1996).

El conjunto de estos resultados nos permitieron postular que la liberación de AA es un evento común en la estimulación de la síntesis de esteroides luego de la activación por ACTH y LH de sus respectivos receptores.

Posteriormente se procedió a identificar el metabolito del AA que media la respuesta esteroideogénica. En tal sentido se estudió el efecto de diferentes inhibidores de la metabolización del AA sobre la esteroideogénesis. Se ha observado que el tratamiento de células de la corteza adrenal con dosis crecientes de indometacina, un inhibidor de la ciclooxigenasa, bloquea la formación de prostaglandinas de modo dosis-dependiente sin afectar los niveles de esteroides sintetizados en respuesta a ACTH (Hirai *et al.*, 1985). Los mismos resultados se obtuvieron con células de la glomerulosa adrenal estimuladas con AII (Kojima *et al.*, 1985c). De tal modo, se pudo concluir que los inhibidores de la ciclooxigenasa no afectan la respuesta esteroideogénica

de los diferentes sistemas confirmando que los metabolitos del AA sintetizados por esa vía no participan de la regulación de la síntesis y liberación de esteroides.

Los estudios realizados con distintos inhibidores de la metabolización del AA permitieron inferir que específicamente los productos de la lipooxigenasa serían los metabolitos involucrados en la regulación de la secreción de hormonas esteroides en los sistemas mencionados anteriormente. Los inhibidores de la lipoxigenasa bloquean la producción de corticosterona estimulada por ACTH en adrenales de rata sin alterar los niveles de AMPc producidos (Jones *et al.*, 1987; Solano *et al.*, 1988). La inhibición específica de la 5-lipoxigenasa en células aisladas de zona fasciculata de adrenal de rata bloquea la respuesta a la ACTH en forma dosis-dependiente, sin alterar la actividad de la PKA. Este efecto se revierte por el agregado exógeno de 5-HPETE (Mikami *et al.*, 1990). En cambio, en células de zona fasciculata bovina la producción de pregnenolona parece estar mediada por el 15-HPETE (Yamasaki *et al.*, 1996).

En la zona glomerulosa de la corteza adrenal, la producción de aldosterona estimulada por All disminuye luego del tratamiento con inhibidores de la lipoxigenasa (Kojima *et al.*, 1985c). Sin embargo, la posterior adición de 12-HETE o 12-HEPTE (aunque no el 15-) restablece la producción de aldosterona entre 20-50% (Nadler *et al.*, 1987; Stern *et al.*, 1993) lo cual sugiere que el 12-HETE estaría involucrado en la liberación de aldosterona estimulada por All.

Estos resultados indican que en las distintas especies y aún en diferentes sistemas esteroideogénicos, los diferentes productos de las lipoxigenasas están involucrados en el mecanismo de acción de ACTH.

IV Regulación crónica y aguda de la esteroidogénesis

IV-1 Introducción

La síntesis de hormonas esteroideas inducida por una hormona trófica se inicia con la ruptura de la cadena lateral del colesterol, formando el primer esteroide sintetizado en todos los tejidos esteroidogénicos, la pregnenolona. Esta reacción está catalizada por el citocromo P450_{scc} que forma parte del llamado sistema enzimático de ruptura de la cadena lateral del colesterol o CSCC (*cholesterol side chain cleavage*) (Simpson y Boyd, 1966 y 1967; Yago y Ichii, 1969; Churchill y Kimura, 1979). El CSCC de adrenal está compuesto por una flavoproteína conocida como la adrenodoxina reductasa y por una hemoproteína, la adrenodoxina, que funcionan como un sistema de transporte de electrones que transfiere los equivalentes de reducción del NADPH al P450_{scc} (Lambeth *et al.*, 1979; Tuls *et al.*, 1987). Además, se ha demostrado que tanto la reacción catalizada por el sistema CSCC como el suplemento de equivalentes de reducción no representan el paso limitante en la ruptura de la cadena lateral de colesterol (Hanukoglu y Hanukoglu, 1986).

Una vez sintetizada la pregnenolona, ésta puede ser metabolizada dentro de la mitocondria a progesterona por la forma mitocondrial de la 3 β hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) (Sulimovici *et al.*, 1973; Chapman *et al.*, 1992). En otros casos y dependiendo del tejido, la progesterona sale de la mitocondria y se metaboliza a otro esteroide por acción de las deshidrogenasas microsomales y de las P450 hidroxilasas.

Para que los procesos de síntesis de esteroides se inicien y se sostengan, resulta necesario el aporte constante de colesterol de las reservas celulares al complejo CSCC ubicado en la membrana mitocondrial interna. El colesterol presente en las células esteroidogénicas puede provenir del suero, en forma de lipoproteína de alta o baja densidad dependiendo de la

especie y del tejido en cuestión (Kovanen *et al.*, 1980; Gwynne y Mahaffee, 1989) o bien y en menor importancia, de la síntesis *de novo* del colesterol a partir del acetato. Independientemente del origen, el colesterol intracelular se moviliza en respuesta a la estimulación por una hormona trófica en un proceso que ocurre en dos etapas. En la primera etapa, se produce la movilización de las reservas celulares de colesterol hacia la membrana mitocondrial externa, mientras que en la segunda etapa se transfiere el colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna (Liscum y Dahl, 1992).

Múltiples pruebas experimentales señalan que el verdadero paso limitante en la estimulación hormonal es la disponibilidad del colesterol en la membrana mitocondrial interna (Karaboyas y Koritz, 1965; Simposon *et al.*, 1979; Crivello y Jefcoate, 1980; Privalle *et al.*, 1983; Jefcoate *et al.*, 1987). Se ha observado que análogos hidroxilados del colesterol, como el 22R-hidroxicolesterol, 20 α -hidroxicolesterol o 25-hidroxicolesterol, pueden difundir fácilmente a través de las membranas mitocondriales y resultar adecuados sustratos para el P450scc. De esta forma, se pueden sintetizar grandes cantidades de esteroides aún en ausencia de estímulos hormonales (Tuckey y Atkinson, 1989; Tuckey, 1992). Por lo tanto, la transferencia de colesterol de la membrana mitocondrial externa al P450scc debe considerarse el verdadero paso limitante.

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de esteroides en tejidos como la corteza adrenal o las gónadas resulta un proceso inicialmente rápido que ocurre en respuesta a la estimulación por una hormona trófica y a través de mecanismos de transducción que involucran la activación de proteínas quinasas, como la PKA, PKC, CaMKII. El efecto rápido o agudo de la esteroidogénesis ocurre pocos minutos después de aplicado el estímulo y puede ser distinguido temporalmente del crónico, mucho más lento, que ocurre en las horas posteriores al estímulo e involucra mecanismos que favorecen la transcripción de genes y la traducción de enzimas como las

deshidrogenasas y las P450scc hidroxilasas involucradas en la síntesis de esteroides. Los efectos crónicos de la estimulación hormonal son extremadamente importantes para el mantenimiento de la capacidad esteroidogénica de los tejidos.

IV-2 *Mecanismo de regulación crónica de la esteroidogénesis*

Las hormonas peptídicas ejercen efectos a largo plazo, regulando la transcripción de los genes que codifican para las enzimas involucradas en el proceso de biosíntesis de esteroides. Algunas de esas enzimas, como las oxidasas e hidroxilasas, pertenecen a la superfamilia del citocromo P450 cuya regulación se encuentra principalmente bajo el control de factores de transcripción activados por AMPc. En la corteza adrenal, la ACTH induce la expresión coordinada de los genes del citocromo P450, a través de la activación de la cascada de señalización AMPc/PKA. En la mayoría de los casos, la expresión de genes inducidos por AMPc ocurre en forma rápida y resulta de la interacción de un elemento respondedor a AMPc (CRE) con un factor de transcripción específico que es activado por PKA (Montminy *et al.*, 1986). Menos frecuentemente, esta respuesta está mediada por otros reguladores de la transcripción, también dependientes de AMPc, como el AP-1 y el AP-2 (Roesler *et al.*, 1988). Por ejemplo, en la estructura de los genes que codifican para las enzimas P450aldo y el P450c11b, que intervienen en la conversión de deoxicorticosterona a aldosterona, se identificó un elemento CRE próximo a la región promotora, esencial para la inducción de estos genes en respuesta a la ACTH y el AMPc (Rice *et al.*, 1989, Honda *et al.*, 1990). Sin embargo, la presencia de elementos CRE no resulta un componente común a todos los genes P450.

La regulación de algunos de estos genes resulta ser aún mas compleja. Ejemplos de ello lo constituyen la regulación del P450scc y del P450c21 (que cataliza la conversión de la 17 α -OH progesterona en 11-deoxicortisol). En el caso del gen que codifica para el P450scc el estudio de la región

regulatoria permitió identificar un elemento AP-1 respondedor a AMPc que permite suponer que la regulación sería a través de este elemento y dependiente de AMPc. Sin embargo, los estudios posteriores permitieron determinar que la regulación dependiente de AMPc en este gen se encuentra conservada aún cuyo el elemento AP-1 esta deletado (Rice *et al.*, 1990). En el caso del P45021c, la inducción de la expresión en respuesta a la ACTH está demorada algunas horas y requiere de la síntesis de proteínas (John *et al.*, 1986). Estas características inusuales sugieren que la ACTH y el AMPc regulan la expresión del P450scc y el P450c21 a través de un mecanismo novel que involucra la existencia de elementos respondedores aún no caracterizados.

Algunos trabajos han sugerido la participación del factor esteroideogénico 1 (SF-1) en la regulación de la expresión dependiente de AMPc del P450c21 (Parissenti *et al.*, 1993). La secuencia del factor SF-1 contiene un único sitio consenso de fosforilación por PKA, lo que sugiere que su actividad puede modificarse por esta enzima. Diversos grupos han propuesto que la regulación de la expresión de los genes de los P450c11b, P450c21 y P450c17 (que cataliza la conversión de pregnenolona en 17 α -OH pregnenolona) resultan de la acción cooperativa del elemento SF-1 con otros elementos respondedores como el CRE, NGFI-B y COUP-TF (Hashimoto *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1993; Bakke y Lund, 1995).

En células de la zona glomerulosa adrenal, la acción crónica de AII conduce a un aumento en los niveles de ARNm del P450scc y de la adrenodoxina (Tremblay y Lehoux, 1992). El estímulo crónico con altas concentraciones de K⁺ tiene las mismas consecuencias moleculares, aunque los niveles de ARNm alcanzados de estas enzimas resultan menores. Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos de regulación dependientes e independientes de Ca²⁺, estos últimos posiblemente mediados por la PKC.

El efecto crónico de All sobre los niveles de ARNm también afecta los genes que codifican para la 3 β -HSD y el P450c21 (Tremblay *et al.*, 1991). Se ha descrito que también incrementa tanto los niveles de ARNm como la actividad enzimática del producto del gen CYP11B2 que codifica para la aldosterona sintasa (Shibata *et al.*, 1991; Tremblay *et al.*, 1991). Por el contrario, los niveles de expresión del producto del gen CYP45011B1, P45011 β , que cataliza la conversión de 11-deoxicorticosterona en corticosterona, no se ven afectados ni por alto K⁺ ni por All.

La regulación de la expresión por All podría involucrar la activación de genes tempranos de las familias c-jun y c-fos, cuyos productos de expresión se unen como heterodímeros jun/fos a los sitios AP-1 presentes en las regiones 5' no codificante (Rice *et al.*, 1990). Además, la All induce la expresión de otros genes tempranos como junB y Krox 24 en diversos tipos celulares incluyendo las células de glomerulosa bovina (Clark *et al.*, 1992). En los casos mencionados, la expresión de los genes tempranos está mediada por la activación de receptores del subtipo AT1 y a través de la acción del Ca²⁺ y la PKC.

IV-3 *Mecanismo de regulación aguda de la esteroidogénesis*

Cualquiera sea el tejido esteroidogénico estudiado, la respuesta esteroidogénica aguda muestra la misma relación temporal con la producción de esteroides produciéndose en todos los casos, dentro de los pocos minutos posteriores a la estimulación. Esta evidencia podría sugerir que el/los mecanismo(s) involucrados son similares en todos los tipos celulares esteroidogénicamente activos.

IV-3.1 *La función de la traducción en la síntesis proteica*

Los primeros estudios realizados con inhibidores de la síntesis de proteínas permitieron establecer la importancia de la traducción *de novo* en los procesos esteroidogénicos.

Los trabajos de Ferguson demostraron que en la glándula adrenal, la estimulación aguda de la síntesis de corticoides inducida por ACTH es sensible a la puromicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas (Ferguson, 1962 y 1963). Ferguson predijo la existencia de una proteína específica que debía ser necesariamente sintetizada en respuesta al estímulo con ACTH en la glándula adrenal, que conduciría a la síntesis de esteroides. Casi simultáneamente, Garren *et al.* comprobaron que mientras la esteroidogénesis estimulada por ACTH en la corteza adrenal era un proceso dependiente de la síntesis de proteínas nuevas (sensibles a cicloheximida), la conversión de los ésteres de colesterol a colesterol libre no lo era (Garren *et al.*, 1965 y 1966; Davis y Garren, 1966; Davis y Garren, 1968; Garren, 1968). Esto indicaba que el paso hormonalmente controlado se encontraba en algún punto intermedio entre la hidrólisis de los ésteres de colesterol y la ruptura de su cadena lateral. Una observación adicional fue que en células adrenales preestimuladas, la proporción de esteroides sintetizados disminuía rápidamente luego de la adición de cicloheximida. Por lo tanto se concluyó, que la vida media del factor estimulador debía ser muy corta. A este factor se lo denomina usualmente cicloheximida sensible o factor lábil (Garren *et al.*, 1965). Los estudios de van der Molen *et al.* confirmaron la síntesis *de novo* de proteínas en la estimulación de la esteroidogénesis en células de Leydig de rata como requisito necesario (Janszen *et al.*, 1976 y 1977).

Más recientemente se demostró que los inhibidores de la síntesis de proteínas no afecta la actividad del P450_{scc} (Arthur y Boyd, 1976) ni la movilización del colesterol de las reservas citosólicas a la membrana mitocondrial externa, aunque actúa sobre la transferencia del colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna (Ohno *et al.*, 1983; Privalle *et al.*, 1983). El sitio de acción del factor lábil quedó completamente establecido a partir de los experimentos realizados en células Y1 y MA-10 tratadas con inhibidores de la síntesis de proteínas. En estas células y en presencia de

cicloheximida, el colesterol se acumula en la membrana mitocondrial externa y la producción de pregnenolona permanece bloqueada hasta que se remueve el inhibidor y las células son subsecuentemente estimuladas por la hormona (Stevens *et al.*, 1993).

Estos y otros resultados, permitieron establecer lo que constituye el modelo actual de la síntesis de esteroides en la fase aguda. En este modelo, se postula la existencia de una proteína inducida hormonalmente en forma rápida (de manera sensible a cicloheximida) cuya función involucra la transferencia de colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna y a la enzima P450_{scc}.

IV-3.2 La función de la transcripción

Las primeras observaciones tendientes a establecer la importancia de la transcripción durante la fase aguda de la esteroidogénesis fueron realizadas en cuartos de adrenales de rata. En estos experimentos se demostró que la síntesis de adrenocorticoides permanecía invariable luego del tratamiento con actinomicina D, un inhibidor de la transcripción (Ferguson y Morita, 1964). Al mismo tiempo, Garren *et al.* demostraron que la inhibición de la transcripción *de novo* por actinomicina D no tiene efecto en la estimulación aguda de la esteroidogénesis adrenal (Ferguson, 1962). Sin embargo, aunque la actinomicina D no afecta la producción de corticosterona estimulada por ACTH durante los primeros 30 min, la producción de esteroides está totalmente inhibida a las 24 h (Vernikos-Danellis y Hall, 1965). Estos resultados indican que mientras en la fase no se requiere la síntesis ARN, la transcripción resulta esencial para el mantenimiento de la producción de esteroides a largo plazo. Los mismos estudios fueron realizados en otros tejidos esteroidogénicos obteniéndose idénticos resultados en todos los casos, excepto en células de testículo de rata donde se demostró que la producción de esteroides resultó ser dependiente de la

transcripción (Ferguson y Morita, 1964; Sculster, 1974; Nakamura *et al.*, 1978; Cooke *et al.*, 1979).

Teniendo en cuenta la rapidez con que se sintetizan los esteroides en respuesta al estímulo hormonal, resulta poco probable que los procesos acoplados de transcripción y traducción puedan llevarse a cabo en tan corto tiempo (Schulster *et al.*, 1974). Por lo tanto, la respuesta aguda sería la consecuencia directa de alguno de los siguientes mecanismos entre otros la existencia de una proteína inactiva que es rápidamente convertida en activa por acción de una hormona trófica o la síntesis de una nueva proteína a partir de un ARNm preexistente estable (Schulster *et al.*, 1974).

De lo anteriormente expuesto se desprende que la fase aguda de la síntesis de esteroides involucra únicamente la síntesis *de novo* de proteínas.

IV-3.3 La función del citoesqueleto en la esteroidogénesis

La función del citoesqueleto en la esteroidogénesis ha cobrado relevancia a partir de los estudios morfológicos realizados en células esteroidogénicas en cultivo. En estas células se ha observado que los cambios fenotípicos producidos en respuesta al estímulo por una hormona trófica frecuentemente se correlacionan con la producción de esteroides (Betz y Hall, 1987).

Como se mencionó anteriormente, la movilización de colesterol a la mitocondria y su subsecuente transferencia desde la membrana externa a la interna son dos procesos independientes en la estimulación de la esteroidogénesis por una hormona trófica. Mientras el último evento constituye el paso limitante de este proceso, la disponibilidad continua de sustrato en la membrana mitocondrial externa resulta esencial para el mantenimiento de la producción máxima de esteroides. En este contexto, se ha propuesto la participación de los componentes del citoesqueleto, como los microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, en la regulación de la producción de esteroides. Se ha observado que drogas antimicrobiales

tales como la colchicina y la vinblastina, aumentan la producción de esteroides en células Y1, adrenocorticales (Temple y Wolff, 1973; Sackett y Wolff, 1986) y MA-10 (Nagy y Freeman, 1990). Estos resultados sugieren que la alteración de la estructura microtubular de las células esteroideogénicas elimina alguna de las barreras físicas que existen entre los depósitos de los ésteres de colesterol y la mitocondria, donde son metabolizados. De esta forma, el aumento de la disponibilidad de colesterol se traduce en la estimulación de la esteroideogénesis. Sin embargo, para que exista síntesis de esteroides, el colesterol transportado a la mitocondria debe acceder a la membrana interna donde se producirá la ruptura de la cadena lateral. Si bien hasta el momento no existen evidencias que sugieran la participación directa de los microtúbulos en este proceso, se especula que la exposición a largo plazo de agentes antimicrotubulares resulta en una mezcla artificial de membranas que permitiría el acceso del colesterol al CSCC.

En células MA-10, Y1 o de adrenal de rata, el tratamiento con inhibidores de la polimerización de los microfilamentos como las citocalasinas, inhibe la esteroideogénesis (Crivello y Jefcoate, 1978; Nagy y Freeman, 1990; Mrotek y Hall, 1975; Hall *et al.*, 1979 y 1981). Sin embargo, estos estudios resultan contradictorios con aquellos descritos para células Y1 en las cuales el tratamiento con citocalasinas B, D y E produce un efecto estimulador sobre la producción de esteroides aunque sin alcanzar los niveles obtenidos luego del estímulo con ACTH. Otro elemento que resulta discrepante es que, mientras la producción basal de esteroides está ligeramente aumentada en cultivos primarios de células adrenocorticales bovinas tratados con citocalasina D, el estímulo con ACTH no se ve afectado. Teniendo en cuenta las contradicciones existentes es difícil asignarle a los microfilamentos una función específica en la esteroideogénesis aguda. Sin embargo se postula que, al igual que los microtúbulos, participan en la movilización del colesterol hacia la membrana mitocondrial externa.

Otro de los componentes del citoesqueleto que resulta relevante en la esteroidogénesis son los filamentos intermedios. Almahbobi y Hall (Almahbobi y Hall, 1990) demostraron que en células Y1 existe una porción significativa de lípidos asociados a los filamentos intermedios y que las mitocondrias se co-localizan con estos complejos. Similares observaciones se obtuvieron en células adrenocorticales y en cultivos primarios de células de Leydig (Almahbobi *et al.*, 1992a,b). La hipótesis que surge de estos estudios es que, para que el transporte de colesterol a la mitocondria sea efectivo, debe existir una conexión entre las mitocondrias y las reservas citosólicas de colesterol a través de los filamentos intermedios.

En síntesis, el citoesqueleto parece tener una función importante en todas las células esteroidogénicas participando principalmente en el mantenimiento de la arquitectura celular lo que favorece la rápida interacción entre las organelas en respuesta a un estímulo.

IV-3.4 La función de la fosforilación

Anteriormente señalamos que la respuesta aguda a una hormona trófica está mediada por el incremento en los niveles de AMPc y la consecuente activación de la PKA (Rommerts *et al.*, 1974; Marsh, 1975; Cooke *et al.*, 1979; Sala *et al.*, 1979). Alternativamente, la estimulación por AII y alto K⁺ activan la PKC vía Ca²⁺/DAG y la CaMKII. Todas las proteínas quinasas mencionadas pertenecen al tipo de las serina-quinasas. Los experimentos realizados en células de la corteza adrenal (Griffin Green y Orme-Johnson, 1991) y en MA-10 (Stocco y Clark, 1991) incubadas con análogos no fosforilables de Ser/Thr permitieron inferir que la fosforilación de proteínas en esos residuos es un evento esencial en el mecanismo de acción de las hormonas ACTH y LH, dado que la presencia de estos análogos bloquean la síntesis de esteroides en ambos tipos celulares cuyo son estimulados con las respectivas hormonas.

Se han descrito fosfoproteínas en células de Leydig y de adrenal, que son sintetizadas *de novo* en respuesta a la estimulación hormonal y que serían responsables directas de la acción esteroidogénica de los diferentes agonistas en los respectivos tejidos blanco.

IV-4 *Proteínas inducidas en respuesta a la acción de hormonas esteroidogénicas*

De los trabajos de Ferguson y Garren se desprende que la síntesis *de novo* de proteínas es un requerimiento obligatorio en la producción aguda de esteroides. Durante los últimos 30 años se ha intentado identificar y caracterizar la(s) proteína(s) intermediarias en este proceso habiéndose descrito una serie de factores que cumplen con los requerimientos mínimos de la esteroidogénesis aguda esto es: ser sintetizados *de novo* en respuesta al estímulo hormonal y ser cicloheximida sensibles. Algunos de esos factores se describen a continuación.

IV-4.1 *Sterol carrier protein 2 (SCP2)*

La SCP2 es una proteína de 13 kDa que se encuentra presente en tejidos esteroidogénicos y en hígado. Se ha demostrado que, en los tejidos esteroidogénicos, SCP2 transfiere el colesterol desde las reservas de lípidos hacia la mitocondria. Además, en experimentos *in vitro*, estimula la producción de esteroides en mitocondrias adrenales aisladas (Chyerbhan *et al.*, 1982; Vahouny *et al.*, 1983 y 1984; McNamara y Jefcoate, 1989).

En tejidos no esteroidogénicos como el hígado de rata, SCP2 puede mediar la transferencia de fosfolípidos como la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina desde las vesículas hacia la mitocondria (Megli *et al.*, 1986). En fibroblastos humanos, SCP2 es capaz de transportar el colesterol recién sintetizado desde el retículo endoplásmico a la membrana plasmática. En conjunto, todos estos resultados sugieren que la función de SCP2 involucra el transporte de colesterol dentro de la célula (Puglielli *et al.*,

1995), una función que sería compatible con la regulación de la esteroidogénesis.

La co-expresión en células COS7 del complejo CSCC y de SCP2 resultó en un aumento de 2,5 veces en la producción de esteroides (Yamamoto *et al.*, 1991) mientras que el tratamiento de células adrenales con el anticuerpo anti-SCP2 inhibió la esteroidogénesis adrenal (Chyerbhan *et al.*, 1986).

El gen que codifica para el SCP2 da origen a dos transcriptos: uno de ellos codifica para una proteína de 58 kDa, la SCPx, que presenta una alta homología de secuencia con las tiolasas. El segundo transcripto codifica para una proteína de 15,3 kDa, la SCP2, que es procesada a un polipéptido maduro de 13 kDa. Tanto la secuencia de SCPx como la de SCP2 contienen en su extremo C-terminal, un péptido señal de exportación al peroxisoma, que es precisamente la organela involucrada en la síntesis del colesterol (Keller *et al.*, 1989; van Amerongen *et al.*, 1989; Ohba *et al.*, 1994).

En la glándula adrenal, los niveles de SCP2 están sujetos a regulación por ACTH, aunque el aumento de la síntesis ocurre después de algunas horas de producido el estímulo (Trzeciak *et al.*, 1987). Sin embargo, mientras la estimulación de células adrenocorticales con ACTH no tiene un efecto agudo en los niveles de SCP2, la estimulación aguda de células de Leydig con LH resulta en una rápida redistribución de SCP2 dentro de la célula, observándose migraciones desde el citosol hacia la mitocondria (van Noort *et al.*, 1988; van Amerongen *et al.*, 1989). Los mismos resultados se observaron en el cuerpo lúteo de rata y en líneas celulares no esteroidogénicas, en respuesta a la estimulación por estrógenos y análogos del AMPc respectivamente (McLean *et al.*, 1989). Estas observaciones indicarían que la regulación de SCP2 no está necesariamente acoplada a la esteroidogénesis (Rennert *et al.*, 1991).

Por lo tanto, los datos indican que la SCP2 es una proteína asociada al movimiento de colesterol dentro de la célula. El hecho de que los niveles de SCP2 no cambien en forma rápida en respuesta a la estimulación aguda o como consecuencia del tratamiento con cicloheximida, excluye a esta proteína de entre los posibles candidatos a ser el factor lábil descrito por Ferguson y Garren, aunque podría participar en el mantenimiento de la esteroidogénesis a través del movimiento intracelular de esteroides (Pfeifer *et al.*, 1993).

IV-4.2 *Steroidogenesis activator polypeptide (SAP)*

Pedersen y Brownie aislaron de células adrenales de rata un péptido de 2,2 kDa que denominaron SAP (Pedersen y Brownie, 1983; Pedersen, 1984). Posteriormente, trabajando con células MA-10 se llegó a determinar que se trataba de un péptido de 30 aminoácidos (3,2 kDa) (Pedersen y Brownie, 1987). El análisis de su estructura primaria indicó que su secuencia era prácticamente idéntica a la del extremo C-terminal de una *heat shock protein* minoritaria conocida como GRP78 (Li *et al.*, 1989; Mertz y Pedersen, 1989). Este péptido resultó un candidato atractivo como regulador de la esteroidogénesis aguda ya que se encontraba presente en todas las células esteroidogénicas. Sus niveles podían ser incrementados en forma aguda luego de la estimulación con una hormona trófica y este aumento podía bloquearse por cicloheximida (Pedersen, 1987; Mertz y Pedersen, 1989).

Uno de los resultados más relevantes fue la demostración de que la producción de esteroides en mitocondrias aisladas, se incrementaba (4-5 veces) en forma dosis-dependiente cuando eran incubadas con SAP.

Si bien no se ha establecido satisfactoriamente el mecanismo por el cual SAP transporta el colesterol hacia la membrana mitocondrial interna (Pedersen y Brownie, 1983; Pedersen, 1984), este péptido debe ser tenido en cuenta en el contexto del movimiento intramitocondrial de colesterol.

IV-4.3 *Peripheral benzodiazepine receptor (PBR)*

Otra de las proteínas que ha sido involucrada en la regulación aguda de la esteroidogénesis es el PBR (*Peripheral benzodiazepine receptor*) y su ligando intracelular endógeno el DBI (*diazepam-binding inhibitor*).

Los estudios de unión a receptores usando diazepam marcado radioactivamente permitieron identificar receptores de benzodiazepinas y localizarlos no sólo en el sistema nervioso central (SNC) sino en tejidos periféricos tales como el riñón (Braestrup y Squires, 1977). De hecho, esta clase de receptores se han identificado en muchos tejidos incluyendo los esteroidogénicos, donde los estudios de localización subcelular permitieron identificarlos asociados a la membrana mitocondrial externa lo que sugiere una relación con la biosíntesis de hormonas esteroideas (DeSouza *et al.*, 1985; Verma y Snyder, 1989).

El PBR es una proteína de 18 kDa localizada en la membrana mitocondrial externa, que se encuentra asociada a un canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y a una proteína transportadora del nucleótido de adenina (McEnery *et al.*, 1992 y 1993). Los estudios estructurales permitieron establecer la organización del complejo proteico deduciéndose una agrupación en forma de poro, que contiene entre cuatro y seis moléculas de PBR que estarían asociadas a una única molécula de VDAC. Los VDAC están localizados en los llamados "sitios de contacto" de las mitocondrias. Estos sitios se forman por el contacto entre las membranas mitocondriales externa e interna, lo que sugiere que este complejo actuaría como puente entre las mismas (Kinnally *et al.*, 1993).

El ligando endógeno del PBR, el DBI (*diazepam binding inhibitor*), fue originalmente aislado de células de adrenales bovinas y es de naturaleza proteica (8,2 kDa) (Yanagibashi *et al.*, 1988). La estructura primaria de este péptido resultó homóloga a aquella de la endozepina aislada de cerebro

bovino, excepto que la porción C-terminal estaba truncada en dos aminoácidos (Gly-Ile) (Besman *et al.*, 1989). Las endozepinas inhiben la unión del diazepam al receptor en el SNC y tienen un efecto estimulador en la producción de esteroides en células de la corteza adrenal y las gónadas. Estos resultados sugieren que el PBR estaría involucrado en la producción de esteroides (Holloway *et al.*, 1989; Mukhin *et al.*, 1989; Papadopoulos *et al.*, 1990 y 1991; Cavallaro *et al.*, 1992).

Los resultados obtenidos luego de incubar las células de Leydig MA-10 o R2C con un oligonucleótido *antisense* del DBI constituyen una de las evidencias mas contundentes que relacionan al PBR/DBI con la esteroidogénesis. La ausencia del DBI conduce a la inhibición de la producción de esteroides en células donde la síntesis es constitutiva como en el caso de las R2C o estimulada por hormonas como en las MA-10 (Boujrad *et al.*, 1993; Garnier *et al.*, 1994). Yanagibashi *et al.* postularon que el efecto estimulador del DBI sobre el PBR favorece el pasaje de colesterol a través de las membranas mitocondriales, dado que la adición de DBI a mitocondrias de adrenales bovinas, produce un aumento en los niveles de colesterol de la membrana mitocondrial interna (Yanagibashi *et al.*, 1989).

Para examinar la regulación del DBI por hormonas tróficas se cuantificaron los niveles de DBI en adrenales y células de Leydig de ratas hipofisectomizadas. En ambos tejidos se observó una disminución significativa que en la adrenal, podía ser restablecida por el tratamiento con ACTH, lo cual indicaba que su expresión era dependiente de la hormona trófica pituitaria (Anholt *et al.*, 1985; Cavallero *et al.*, 1993). Sin embargo, esta inducción ocurre horas después de la estimulación de la síntesis de corticoesteroides por ACTH, por lo que se deduce que la síntesis del DBI no se encuentra relacionada temporalmente con la biosíntesis de esteroides inducida por hormonas (Cavallero *et al.*, 1993).

Aunque el DBI/PBR estimula la esteroidogénesis, la síntesis del DBI no se encuentra regulada en forma aguda por hormonas ni resulta sensible a cicloheximida (Brown *et al.*, 1992). De hecho, la vida media de la proteína supera las 3h. Por lo tanto, parece probable que la acción del DBI/PBR no esté bajo control hormonal directo (Brown *et al.*, 1992) y que el DBI no sería el factor lábil propuesto por Ferguson y Garren. Sin embargo, se afirma que la activación hormonal de la esteroidogénesis puede estar mediada en parte por la regulación de las interacciones del DBI con el PBR (Papadopoulos y Brown, 1995) como lo muestran los experimentos con flunitrazepam (Papadopoulos *et al.*, 1991). El flunitrazepam es una droga que se une con gran afinidad al PBR e inhibe la producción de pregnenolona en células Y1, MA-10 y en mitocondrias aisladas de estas líneas celulares. La unión del flunitrazepam puede ser competida por el PK11195, que presenta un efecto estimulador en estos sistemas. En función de estas observaciones, se sugiere que la función del DBI/PBR es necesaria para la esteroidogénesis inducida por hormonas.

Boujrad *et al.* demostraron que la estimulación hormonal de células MA-10 conduce a un rápido aumento AMPc-dependiente (15 seg), en la unión del DBI al PBR probablemente debido a la exposición a un segundo sitio de alta afinidad (Boujrad *et al.*, 1994). El flunitrazepam podría bloquear esta respuesta rápida por unión al sitio de alta afinidad. En la línea celular R2C, que expresa constitutivamente esteroides, sólo se han detectado sitios de alta afinidad del PBR. Por lo tanto, se postula que la estimulación hormonal induciría un cambio estructural en el PBR exponiendo sitios de unión de alta afinidad para el DBI.

IV-4.4 *Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)*

Experimentos realizados en células adrenocorticales de rata estimuladas con ACTH permitieron identificar una fosfoproteína novel, denominada pp30, cuya aparición se correlaciona con la producción de corticosterona después

de la estimulación por la hormona trófica. Las mismas observaciones fueron confirmadas en suspensiones de células del cuerpo lúteo, de Leydig y de adrenal de ratón (Pon y Orme-Johnson, 1986a,b). Posteriormente se demostró que la síntesis de pp30 es sensible a cicloheximida, que la vida media de la proteína es de 5 min, que su localización subcelular esta limitada a la membrana mitocondrial y que existen dos proteínas precursoras lábiles de 37 y 32 kDa en el compartimento citosólico (Alberta *et al.*, 1989; Epstein y Orme-Johnson, 1991).

En células MA-10 estimuladas con LH o análogos del AMPc se han identificado proteínas de características similares a las descritas por Orme-Johnson *et al.* (Stocco y Kilgore, 1988). En estas células, la inducción de la síntesis de pp30 por la hormona se correlaciona espacialmente con la producción de esteroides y es además dosis-dependiente (Stocco y Chen, 1991). Asimismo, se ha establecido que la síntesis de pp30 está, de alguna manera, regulada por un mecanismo de señalización que involucra el aumento en los niveles de AMPc y la activación de la PKA (Stocco y Ascoli, 1993).

La purificación, el clonado y la posterior secuenciación de la pp30 en células MA-10 permitió su caracterización como una proteína de 284 aminoácidos, de masa molecular 31,6 kDa. Además, tanto la secuencia de nucleótidos como la de aminoácidos no presentaron homologías significativas con otras proteínas conocidas, indicando que se trataba de una proteína novel (Clark *et al.*, 1994). Esta proteína fue clonada en diferentes especies presentando una identidad del 85-88%. La región de mayor diferencia se encuentra en la porción N-terminal, que contiene el péptido señal de exportación a mitocondrias.

Los estudios de Northern y Western blot han permitido detectar la presencia del ARNm y a la proteína pp30 en tejidos como adrenal, testículo y ovario lo que podría ser un indicador de la función de pp30 en la esteroidogénesis

(Clark *et al.*, 1995). Sin embargo, en otros tejidos esteroideogénicos como la placenta y el cerebro ni la proteína ni el mensajero han sido detectados.

Los experimentos de transfección de células permitieron establecer la función de pp30. En estos estudios, se describió que la expresión del ADNc de pp30 en células MA-10 induce la producción de esteroides en ausencia de estímulo hormonal. Los mismos resultados se obtuvieron luego de co-transfectar células COS-1 con P450scc, adrenodoxina y el ADNc de la pp30. En este caso, se observó un aumento de 6 veces en la conversión de colesterol a pregnenolona. Estos resultados indican que la proteína de 30 kDa cumple una función en la producción de esteroides regulados por hormona (Clark *et al.*, 1994). Basándose en estos y otros experimentos, Stocco *et al.* denominaron a esta proteína StAR (steroidogenic acute regulatory protein).

La evidencia más significativa a favor de la importancia de la StAR en la regulación aguda de la esteroideogénesis provino del estudio de la estructura primaria de esta proteína, en pacientes que presentan hiperplasia lipoide congénita (LCAH). La LCAH es una enfermedad homocigota recesiva letal cuyo fenotipo se caracteriza por la completa incapacidad de sintetizar esteroides. En particular, los pacientes afectados con esta enfermedad no pueden convertir el colesterol en pregnenolona (Camacho *et al.*, 1968; Hauffa *et al.*, 1985), sin embargo presentan niveles normales de las diferentes enzimas esteroideogénicas. La estructura primaria del P450scc de estos pacientes no presenta ninguna característica anómala (Lin *et al.*, 1991; Sakai *et al.*, 1994). En base a estos antecedentes se postuló que la LCAH podía ser causada por un defecto en la expresión o función de la proteína transportadora de colesterol en la membrana mitocondrial. Esta hipótesis se confirmó al detectar, en pacientes con LCAH, dos mutaciones *nonsense* diferentes en el ARNm de la StAR. Estas mutaciones producen una terminación prematura de la proteína originando dos formas nuevas no

funcionales (Lin *et al.*, 1995). Estos y otros estudios sugieren que la StAR cumple una función indispensable en la producción de esteroides.

En células adrenales de rata o células MA-10 tratadas con análogos no fosforilables de treonina, la expresión de StAR es indetectable. Esta evidencia sugiere la participación de eventos de fosforilación mediados por PKA (Griffin Green *et al.*, 1991; Stocco y Clark, 1993). Sin embargo, el papel de la fosforilación en la expresión de la StAR no ha sido formalmente demostrado y se especula que podría estar relacionado con la activación de la transcripción del gen de la StAR, aunque no se descarta que la fosforilación pueda intervenir en otros niveles como en la traducción del mensajero o sobre el mismo sustrato proteico.

Hasta el momento, se desconoce el mecanismo a través del cuál StAR participa como regulador agudo de la esteroidogénesis, ni cuál es la importancia de la fosforilación de dicha proteína en este proceso.

IV-4.5 **p43**

p43 es una fosfoproteína citosólica novel aislada de la zona fasciculata de la corteza adrenal de ratas estimuladas con ACTH (Paz *et al.*, 1994) que cumple con todos los requisitos para ser considerada un regulador agudo de la esteroidogénesis.

Esta proteína tiene la capacidad de estimular *in vitro* la producción mitocondrial de esteroides en forma dosis dependiente (Paz *et al.*, 1994) y en igual magnitud a la descrita para ACTH u 8Br-AMPC en células aisladas de la zona fasciculata adrenal (Mele *et al.*, 1996). El hecho de que la actividad esteroidogénica de p43 se bloquee en presencia de un inhibidor de la PLA₂ cuyo los estudios se realizan en un sistema *in vitro*, sugiere que p43 puede regular directa o indirectamente la liberación de AA en la síntesis de esteroides (Paz *et al.*, 1994).

Hemos informado que p43 es una fosfoproteína y que el grado de fosforilación de la misma es ACTH-dependiente. El hecho de que el tratamiento con fosfatasa ácida de una muestra purificada de p43 aislada de citosoles de ratas estimuladas con ACTH muestre una disminución en el número de isoformas, confirma que los cambios en la movilidad electroforética de p43 en geles bidimensionales son el resultado de la incorporación de fosfatos en la molécula (Finkielstein *et al.*, 1996).

Además, anticuerpos anti-péptidos de p43 nos permitieron identificar a esta proteína en los distintos tejidos esteroideogénicos y bloquear la actividad esteroideogénica de la misma en estudios *in vitro* (Finkielstein *et al.*, 1996).

Por otra parte se ha observado que el tratamiento de animales con un inhibidor de la traducción como la cicloheximida antes del estímulo con ACTH produce una rápida disminución en los niveles citosólicos de p43 siendo esta característica consistente con aquella propuesta para el factor lábil (Finkielstein *et al.*, 1996).

OBJETIVOS

Como hemos descripto anteriormente, ACTH, AII y K^+ estimulan la secreción de aldosterona en la zona glomerulosa de la corteza adrenal a través de mecanismos de señalización activados por AMPc, inositolesfosfato y Ca^{2+} respectivamente (Saruta *et al.*, 1972; Fraser *et al.*, 1979; Tait *et al.*, 1980; Kojima *et al.*, 1984; Braley *et al.*, 1986).

Teniendo en cuenta que en los tejidos esteroideogénicos los mecanismos de acción generados por hormonas tróficas actúan a través de la activación de diferentes proteínas quinasas y que el AA y sus metabolitos son intermediarios obligatorios en este proceso, surge el interrogante acerca del nexo entre estos eventos.

Con el fin de esclarecer esta cuestión, en nuestro laboratorio estudiamos el mecanismo de acción de hormonas proteicas involucradas en la esteroideogénesis. En tal sentido el modelo de trabajo elegido es la corteza adrenal de rata y en particular los sistemas de señales generados en respuesta a ACTH.

Los estudios realizados nos permitieron identificar y purificar un fosfoproteína citosólica novel de 43 kDa (p43) ACTH-, AMPc- y PKA-dependiente que estimula la síntesis de esteroides a través de la liberación de AA en la zona fasciculata de adrenal de rata. Esta proteína podría resultar un intermediario común en los diferentes eventos de señalización originados en respuesta a distintos estímulos promoviéndose su activación y respondiendo directa o indirectamente sobre la liberación de AA.

Teniendo en cuenta que en trabajos previos describimos las características bioquímicas y regulatorias de p43 (Paz *et al.*, 1996), los objetivos del presente trabajo estuvieron dirigidos a:

1- La caracterización molecular de esta fosfoproteína. Para tal fin, se procederá a determinar la estructura primaria de p43 a través del aislamiento y caracterización de la secuencia de su ADNc. El análisis de esta secuencia nos permitirá inferir sobre el mecanismo de acción y/o activación de p43, así como su posible participación como intermediaria en el mecanismo de acción de diferentes agonistas que promueven la síntesis de esteroides en otros tejidos a través de la activación de diferentes quinasas.

2- El estudio de la regulación hormonal sobre los niveles de expresión del ARNm de p43.

El análisis de las características moleculares de p43 constituye un factor esencial para identificar el o los posibles mecanismos regulatorios que pueden determinar su actividad en uno u otro sistema de transducción de señales.

MATERIALES Y METODOS

I- Materiales

I-1 Reactivos utilizados

Los medios de cultivo y antibióticos utilizados fueron provistos por Life Technologies, Inc., Sigma Chemical Co., Boheringer Mannheim y Difco Laboratories. El material radiactivo [γ - ^{35}S]dATP (1250 Ci/mmol), [α - ^{32}P]dCTP (3000 Ci/mmol) y [^{35}S]-metionina (800 Ci/mmol) fue provisto por Dupont, NEN. Los plásmidos, endonucleasas de restricción, ligasas, polimerasas, exonucleasas, quinasas, ribonucleasas, desoxirribonucleasas y fosfatasa utilizadas fueron suministradas por Stratagene Labs Systems, Pharmacia Biotech Inc., Life Technologies, Inc., Boheringer Mannheim, Promega, Amersham y New England Biolabs, TaKara Shuzo Co., Japan y Novagen Co.

Los oligonucleótidos comerciales utilizados fueron obtenidos de Pharmacia Biotech Inc., Life Technologies, Inc. y CLONTECH Laboratories, Inc. Los cebadores sintetizados fueron provistos por Universal DNA Inc.

La resina Sephadex G-50 fue adquirida a Pharmacia Biotech Inc y las membranas de nylon (Hybon-N) y nitrocelulosa (BA 85) utilizadas fueron suministradas por Amersham Life Science y Schleicher & Schuell respectivamente.

La adrenocorticotropina sintética, Synacthen (péptido 1-24), (1 fmol=0,3 μU) y la hormona luteinizante (LH) fueron donadas por Ciba Geigy, Basel, Switzerland. La dexametasona (9-fluoro-11 β ,17,21-trihidroxi-16 α -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona) fue provista por Fluka Chemie AG. La actinomicina D y la cicloheximida fueron obtenidas de Sigma Chemical Co.

Todos los otros reactivos utilizados fueron productos comerciales del más alto grado de pureza disponible.

I-2 Soluciones y medios de cultivo

LB

10 g Bacto-triptona, 5 g Extracto de levadura, 5 g NaCl. Ajustar a pH 7,5 con NaOH 5 N, completar a 1 l y autoclavar.

LB agar

Al medio LB descrito anteriormente se le adicionaron 15 g de agar. Ajustar a pH 7,5 con NaOH 5N, completar a 1 l y autoclavar.

LB/amp

Al medio LB descrito anteriormente se le adicionaron 50 µgr/ml de ampicilina.

LB/amp/IPTG/X-gal

Al medio LB descrito anteriormente se le adicionaron 50 µgr/ml de ampicilina, 50 µgr/ml de X-gal e IPTG 1 mg/ml.

LB/MgSO₄ blando

Al medio LB descrito anteriormente se le adicionaron 0,7% de agarosa. Ajustar a pH 7,5 con NaOH 5 N, completar a 1 l y autoclavar. Luego adicionar MgSO₄.7H₂O hasta una concentración final de 1 mM.

LB/MgSO₄/Maltosa

Al medio LB descrito anteriormente se le adiciona MgSO₄.7H₂O 1 mM final y Maltosa 0,2%.

M9

3 g Na_2HPO_4 , 1,5 g KH_2PO_4 , 0,25 g NaCl , 0,5 g NH_4Cl , 1 ml MgSO_4 1 M, 5 ml glucosa 20%, 50 μl CaCl_2 . Llevar a pH 7,4 y a volumen final de 500 ml.

NaI/ Na_2SO_3

0,2 g Na_2SO_3 , 90,8 g NaI. Llevar a 100 ml de volumen final.

NZY

5 g NaCl , 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g extracto de levadura, 10 g de NZ-amina, 15 g de agar. Llevar a pH 7,5 con NaOH 10 N y adicionar H_2O hasta 1 l.

PKB

10 mM NaCl , 10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 0,1% SDS.

10xSM

58,3 g NaCl , 24,65 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 350 ml Tris-HCl 1 M pH 7,5. Adicionar dH_2O hasta 1 l. Autoclavar y conservar a 4°C.

SOC

2% Bacto-triptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl , 2,5 mM KCl , 20 mM glucosa, 10 mM MgCl_2 , 20 mM MgSO_4 .

Solución de Desnaturalización

87,75 g NaCl , 20 g NaOH . Completar a 1 l con dH_2O . Conservar a temperatura ambiente.

Solución de Neutralización

87,75 g NaCl , 6,7 g Tris-OH, 70,2 g Tris-HCl. Llevar a pH 7,4 y completar a 1 l con dH_2O . Conservar a temperatura ambiente.

Solución NEW

10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 50% EtOH.

Solución de Prehibridización

50% formamida deionizada, 5x Solución de Denhardtts, 0,1% SDS, 5x 20xSSC, 100 µg/ml ADN de esperma de salmón. Conservar a -20°C.

20xSSC

175,3 g NaCl, 88,2 g citrato de sodio.2H₂O. Ajustar a pH 7 con NaOH 10 N. Completar a 1 l con dH₂O. Conservar a temperatura ambiente.

2xSSC/0,5%SDS

0,3 M NaCl, 0,03 M citrato de sodio, 0,5% SDS.

1xSSC/0,1%SDS

0,15 M NaCl, 0,015 M citrato de sodio, 0,1% SDS.

2xSSPE

0,36 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄ pH 7,4, 20 mM EDTA pH 7,4.

10xTBE

108 g Tris base, 55 g ácido bórico, 40 ml EDTA 0,5 M pH 8. Completar a 1 l con dH₂O.

TE

10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8.

2x YT

10 g extracto de levadura, 16 g bacto triptona. Completar a un volumen final de 1l y autoclavar.

I-3 *Oligonucleótidos y sondas*

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación y secuenciación se resumen en la siguiente Tabla:

Nombre	Secuencia (5' a 3')
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
60	TGCTGGCTGGGAAGGGGCTTT
61A	TCATCTGAAATGATATTCTTA
92	CTTTCTGGAGTATCGGG
93	GGGCTTGGGAATGGAGTT
393	GCGGGAAGCACCTCGA
341-1	CTTGTCTACCAGAGGCTTTGC
341-2	TTGTGGTCGTCCTGACCTAC
341-3	AGCCTCGAGTCATCTGAAATGATATTCTTA
341-4	ACCGAATTCTGCTGGCTGGGAAGGGGCTTT
341-5	GGGTCCAGGTTCTGGGGGCA

341-6	AATTCCGTCCCAGCAGCTG
341-7	AGCTCCACCACGAAGGGCG
381-1	AGAGCCATGACGGCAAAGCCC
381-2	ATAGCAAGGCCAAGTTCACCC
λ gt11 directo	ATTGGTGGCGACGACTCC
λ gt11 complementario	CCAAGTGGTAATGGTAGC
368-1	GACTCCTGGAGCCCG
368-2	GGTAGCGACCGGCGC
368-4	GGTTTCCATGGTCTTGGG
377-1	CCCTGCATCTCTCAGAGCT
377-2	GTCGGGCTCGTGTCCGTCCAG
377-3	TTTCTGGCGTCTGGTCAAGCGC
377-4	GTAATACGACTCACTATAGGGC
377-5	AATTAACCCTCACTAAAGGG
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
V15Q	GACGGACACGAGCCCGACGGCGG
F7R	TTCTTGGCTCCGGGGGTG

oligo5RC degenerado	TGYTTRTGRAARAANGTYTG
oligo5RC	CTGTTTGTGGAAGAAAGTCTG
P1	GCCTTATGTGGTGGAGCTGGAA
P1RC	TCCAGCTCCACCACATAAGGCA
P1scramble	GTAGCTGGTAGCTGGTCATGGA
M1	TGGAGCCATGAACTGACGCTCGTGC

A menos que se indique lo contrario, la sonda utilizada resultó de la amplificación con los cebadores 60/oligo5RC (692 bp) sobre el templado obtenido por RT-PCR de adrenal o P1/oligo5RC (921 bp) amplificado a partir del clon E312. La reacción de amplificación por PCR se describe en la sección II-5.1.1.

I-4 Animales

Se utilizaron ratas (cepa Wistar) de 90 días de edad. En los estudios de RT-PCR y 5' RACE las ratas fueron inyectadas (s.c.) con dexametasona (Dx), 2,5 mg/Kg, 15 min antes de las 5h posteriores a la primera inyección recibieron otra de 200 µg adrenocorticotropina (ACTH)/Kg.

En los estudios de abundancia del ARNm de p43, las ratas recibieron diferentes tratamientos. En un caso, las mismas fueron inyectadas s.c. con dosis de Dx entre 0,5 y 5 mg/Kg. En otro caso, las ratas fueron inyectadas con 2,5 mg/Kg de Dx y 5, 10, 15 o 30 min previo al sacrificio recibieron una segunda inyección esta vez de 200 µg ACTH/Kg. Los efectos de la actinomicina D (act.D) y la cicloheximida (Chx) sobre la abundancia del transcripto se estudiaron sobre un lote de ratas inyectadas con 2,5 mg/Kg de Dx las cuales recibieron act.D (500 µg/Kg o 750 µg/Kg) o CHx (50, 100 o 200

mg/Kg) 45 min antes del estímulo con ACTH (15 min, 200 µg/Kg). En todos los estudios realizados, las ratas fueron sacrificadas por decapitación 5h después de la primera inyección. De cada uno de los animales tratados, se obtuvo una alícuota de sangre a partir de la cual se determinaron los niveles de corticosterona en plasma por radioinmunoensayo. En los estudios de distribución tisular del ARNm de p43 los tejidos analizados fueron obtenidos de ratas que no habían recibido tratamiento alguno antes del sacrificio a excepción de los ovarios que fueron obtenidos de ratas pseudopreñadas (Dufau *et al.*, 1975).

I-5 Cepas de bacterias y fagos

La cepa hospedadora de fagos λgt11 fue la Y1090r⁻ (CLONTECH Laboratories, Inc.) cuyo genotipo es: araD139, hsdR (r_k⁻, m_k⁺), mcrA⁻, rpsL, supF, trpC22::Tn10, ΔlacU169, Δlon, (pMC9) (Stanley, 1983). Las cepas utilizadas en los subclonados fueron JM109 de Life Technologies, Inc. y XL1-Blue de Stratagene Labs Systems, los genotipos de las mismas se detallan a continuación:

JM109: recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, lacI^qΔM15, proAB]

XL1-Blue: endA1, gyrA96, hsdR17, lac⁻, recA1, relA1, supE44, thi-1, [F' lacI^qΔM15, proAB, Tn10]

Los fagos *helper* R408 y VCM13 y las bibliotecas λgt11 y λZAPII fueron adquiridas a Stratagene Labs Systems.

II- Métodos

II-1 Cultivo de bacterias

Alícuotas de 5 µl de las distintas cepas bacterianas fueron estriadas en placas de LB e incubadas toda la noche a 37°C. Estas placas se

denominaron placas Maestra y las cepas de cada una de estas fueron replaqueadas cada dos semanas y conservadas a 4°C.

II-2 *Titulación de la biblioteca de ADNc de λ gt11 y λ ZAPII*

Se inoculó una colonia aislada de Y1090^r o XL1-Blue en 3 ml de medio LB/MgSO₄/Maltosa. El cultivo se creció toda la noche en agitador (200 rpm) a 37°C hasta llegar a una DO₆₀₀=2. A una alícuota de 2 µl de cada una de las bibliotecas (λ ZAPII y λ gt11 5' Stretch CLONTECH) se le adicionó 1 ml de 1xSM (dilución 1: 1:500). Luego se extrajeron 2 µl de la anterior dilución y se diluyeron a 1 ml con 1xSM (dilución 2: 1:250.000). A continuación se procedió al siguiente esquema de titulación:

Tubo	1xSM	Cultivo de Bacterias	Dilución 2 del fago
1	100 µl	200 µl	2 µl
2	100 µl	200 µl	5 µl
3	100 µl	200 µl	10 µl
4 (control)	100 µl	200 µl	-

Todas las infecciones fueron incubadas a 37°C por 15 min. A cada uno de los 4 tubos se le adicionaron 3 ml de medio LB/MgSO₄ blando, se mezclaron, y el contenido de cada uno se volcó en respectivas placas de LBagar/MgSO₄. Las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C.

II-3 *Rastreo en bibliotecas de ADNc : λ gt11 y λ ZAPII*

Una colonia aislada de Y1090^r o XL1-Blue fue crecida hasta alcanzar la fase estacionaria en LB/MgSO₄/Maltosa. Teniendo en cuenta el título de cada una de las bibliotecas, se procedió a preparar una dilución de la misma

que contenga 30000 ufp/100 μ l de 1xSM. Esta dilución se combinó con 0,6 ml de bacterias y se incubó a 37°C por 15 min antes de plaquearlas. Las placas fueron mantenidas a 37°C hasta que las playas de lisis tuvieran un tamaño aproximado de 1,5 mm (3-8h), luego se conservaron a 4°C hasta el momento del rastreo. A continuación, se separaron igual número de filtros de nylon que placas. Usando pinzas, estas membranas fueron cuidadosamente superpuestas sobre la superficie de cada placa evitando la formación de burbujas. Se realizaron 3 marcas asimétricas con agujas que atravesaron la membrana y el agar de manera de poder orientar posteriormente el filtro y la placa. Después de 2 min, se removió la membrana y con el lado que contenía el ADN hacia arriba se transfirió a un recipiente conteniendo un papel Whatman 3 MM™ embebido en solución de desnaturalización. La membrana permaneció en esta solución por 5 min y luego fue transferida a otra de neutralización por 7 min. Finalmente, se le realizó un lavado en 2xSSC. El ADN se fijó por calor incubando las membranas a 80°C por 2h.

La prehibridización de los filtros se llevó a cabo en un horno rotatorio con 2,5 ml de solución de prehibridización por cada 177 cm² de superficie de membrana durante 4h a 42°C. La sonda marcada se precalentó a 100°C por 10 min y luego se enfrió rápidamente antes de ser incorporada a la anterior solución (10⁶ cpm/ml). Los filtros embebidos en esta nueva solución fueron incubados a 42°C por 16-20h. Después de la hibridación, los filtros fueron sometidos a sucesivos lavados con soluciones amortiguadoras de distinta fuerza iónica. Inicialmente, las membranas fueron lavadas dos veces con 2xSSC/0,5% SDS durante 20 min a temperatura ambiente y luego, dos veces, con 1xSSC/0,1% SDS a 65°C por 30 min cada vez. Los filtros fueron expuestos con pantalla intensificadora a -70°C por 16-24h. Luego del revelado, las playas positivas fueron removidas del agar y resuspendidas en 1 ml de 1xSM.

Este procedimiento se repitió entre 4 y 5 veces hasta obtener un 100% de playas de lisis positivas.

II-3.1 Aislamiento del ADN de los fagos de λ gt11

Los fagos positivos de λ gt11 fueron eluidos y pre-adsorbidos a las células Y1090r⁻. Para ello, se pre-incubó a 37°C una mezcla de 40 μ l de fagos (1×10^{10} ufp/ml) con 0,4 ml de células crecidas en LB/MgSO₄/Maltosa y 0,4 ml de solución de Mg²⁺/Ca²⁺. La mezcla se transfirió a un erlenmeyer de 250 ml conteniendo 40 ml de medio NZY (Maniatis *et al.*, 1982), el mismo se incubó a 37°C con agitación toda la noche. Finalizada la incubación, se adicionaron 100 μ l de CHCl₃ y se agitó el sistema otros 15 min. Luego el cultivo fue transferido a tubos de plástico de 50 ml y centrifugado a 7000xg por 15 min. El pellet se descartó y el sobrenadante se transfirió a un tubo FalconTM de 50 ml al cual se le adicionaron 40 μ l de DNasa I (1 mg/ml) y 40 μ l de RNasa IA (1 mg/ml). El sobrenadante se incubó entonces a 37°C por 30 min. Luego se adicionaron 5 ml de NaCl 5 M y 5 ml de PEG-8000 50%, manteniéndose en baño de hielo durante 2h. El pellet obtenido de una segunda centrifugación a 7000xg se suspendió en 0,4 ml de PKB. A esta suspensión se le adicionó 10 μ l de proteinasa K (1 mg/ml) y se incubó a 37°C por 20 min. La mezcla fue extraída dos veces con 0,4 ml de una solución de fenol:CHCl₃:alcohol isoamílico (50:50:2) y una vez con CHCl₃:alcohol isoamílico (24:1). Luego de agitar la mezcla vigorosamente se procedió a centrifugarla a 13000xg por 15 min a temperatura ambiente. La capa superior fue extraída y el ADN precipitado adicionando 2,5 volúmenes de etanol 100% y 1/20 de AcONa 3 M pH 4,8-5,2. La suspensión se mantuvo a -20°C por 30 min. Luego se centrifugó a 13000xg por 15 min a 4°C y el pellet se lavó una vez con etanol 70%. El ADN fue resuspendido en un volumen apropiado de dH₂O.

II-3.1.1 Digestión con endonucleasas de restricción

Una alícuota de ADNds (1-2 μ g) se digirió con 10 U de la endonucleasa de restricción apropiada en las condiciones experimentales descriptas para cada endonucleasa. La enzima utilizada para liberar los insertos de los vectores λ gt11 fue EcoRI. En aquellos casos en los cuales los insertos

fueron cortados para obtener el mapa de restricción correspondiente, se procedió a realizar dos digestiones consecutivas en las condiciones de sales requeridas para cada caso según las indicaciones de los proveedores. En primer término, la preparación de ADNds fue digerida por una de las siguientes endonucleasas *AccI*, *BamHI*, *Clal*, *HindIII*, *KpnI*, *NotI*, *PstI*, *SacI*, *XhoI*, *XbaI*, *NcoI* en un volumen final de 10 μ l. Luego de la incubación correspondiente, las enzimas fueron inactivadas por calentamiento a 65°C por 5 min. En segundo término, para liberar los fragmentos unidos al vector, el producto anterior fue nuevamente digerido aunque en este caso con 10 U de *EcoRI*. Posteriormente, se adicionó RNasa a una concentración final de 20 μ g/ml y se incubó otros 5 min a 37°C. Este último tratamiento permite visualizar mejor fragmentos de ADN inferiores a 1 kb. Luego de finalizada la reacción, los productos de la digestión fueron sembrados en geles de agarosa 1% y corridos a 75 volts durante 30 min aproximadamente.

II-3.1.2 *Purificación de fragmentos de ADN*

Cada uno de los fragmentos de interés fue cortado del gel de agarosa, pesado y colocado en un tubo eppendorf™ conteniendo de 2,5 a 3 volúmenes de una solución de NaI/Na₂SO₃. La suspensión fue incubada a 55°C por 5 min hasta la disolución completa del fragmento de agarosa. Posteriormente se adicionaron 5 μ l de GLASSMILK (GENECLEAN Kit BIO 101 Inc.) separándose el complejo GLASSMILK/ADN por centrifugación a 12000xg por 20 seg. El residuo fue lavado 3 veces con 0,7 ml de solución NEW y seguidamente se resuspendió en 5 μ l de dH₂O. La suspensión fue incubada 2-3 min a 55°C y centrifugada. El sobrenadante con el inserto purificado fue subclonado, amplificado y/o utilizado como sonda según el caso.

II-3.2. Subclonado de los fragmentos de ADN

II-3.2.1 Defosforilación del vector y reacción de ligación

Cada uno de los plásmidos fue cortado con las mismas endonucleasas de restricción que se utilizaron para liberar el inserto de ADN del vector. Para ello, 2 μ l de pBS SK⁺ (1,3 mg/ml) o pET-22(+) (3 mg/ml) fueron cortados con 30 U de la endonucleasa correspondiente en un volumen final de 22 μ l. La reacción se incubó a 37°C durante 1h y luego de la adición de 26,7 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternero se continuó la incubación por otros 20 min. La mezcla de reacción se completó a 200 μ l con dH₂O y luego se extrajo 2 veces con una mezcla de Fenol:CHCl₃:Alcohol isoamílico (50:50:2) y una vez con CHCl₃:Alcohol isoamílico (24:1). El ADN se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 1/20 de AcONa 2 M pH 4,8. El pellet se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 10 μ l de dH₂O.

La reacción de ligación se realizó combinando 1 μ l del vector defosforilado (100 ng), 2 μ l de amortiguador de ligación 5x (Boheringer Mannheim), 1 μ l de T4 ADN ligasa (3 U/ μ l) y la cantidad correspondiente de inserto en un volumen final de 20 μ l. La reacción se incubó toda la noche a 15°C.

II-3.2.2 Preparación de células competentes

Una colonia aislada de XL1-Blue o JM109, según sea el caso, fue inoculada en 5 ml de medio LB y crecida toda la noche a 37°C con agitación continua. Una alícuota de 100 μ l fue diluída 1:100 en medio LB fresco y crecida a 37°C hasta llegar a la fase exponencial (DO_{600} = 0,4-0,6). Luego el cultivo fue centrifugado a 5000 rpm (Sorvall SS34) por 10 min y el pellet resuspendido en 5 ml de CaCl₂ 50 mM frío. La suspensión fue mantenida en hielo por 20 min y posteriormente se repitió la centrifugación. En este caso el pellet obtenido fue suspendido en 1 ml de la solución de CaCl₂ 50 mM y mantenido a 4°C toda la noche. Luego las células fueron fraccionadas en 200 μ l y conservadas a -70°C.

II-3.2.3 Transformación de células JM109 o XL1-Blue

En todos los pasos que se detallan a continuación el material utilizado, soluciones y tubos de polipropileno, fue mantenido durante todo el proceso a 4°C.

Una alícuota de 200 µl de las células competentes fue mantenida en un baño de hielo hasta que se descongeló completamente. A cada alícuota se le adicionaron 2 µl de una dilución 1:5 del producto de la ligación. La mezcla se dejó estabilizar a 4°C por 30 min y luego se incubó a 42°C por 45 seg y a 4°C por 2-3 min. A la suspensión anterior se le adicionaron 0,8 ml de medio SOC y se incubó a 37°C por 1h con agitación continua a 200 rpm. Alícuotas de 200 µl de este cultivo fueron sembradas en placas de LB/amp/IPTG/X-gal o LB/amp según el caso y crecidas toda la noche a 37°C. En los plásmidos con selección azul/blanca, las colonias blancas contienen el plásmido con el inserto, mientras que las azules contienen únicamente el vector. En otros casos, la selección de las transformantes se hizo sólo en base a la resistencia a antibióticos.

I-3.2.4 Purificación del ADNds de los plásmidos recombinantes

Las colonias recombinantes fueron seleccionadas y crecidas toda la noche a 37°C en 3 ml de medio LB/amp. El cultivo se centrifugó a 13000xg por 2 min a temperatura ambiente y el pellet se resuspendió en 200 µl una solución amortiguadora que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM y RNasa A 100 µg/ml. A continuación, se adicionaron 200 µl de solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%) y 200 µl de solución de neutralización (AcOK 1,32 M pH 4,8). En todos los casos la agitación fue por inversión del tubo. La suspensión se centrifugó a 13000xg por 5 min y el sobrenadante se transvasó a un nuevo tubo eppendorf™ al cual se le adicionó 1 ml de resina ADN Wizard™. La mezcla se transfirió a una jeringa cuyo extremo finalizaba en una minicolumna. La resina con el ADN plasmídico quedó retenida en la

columna y la matriz se lavó con 2 ml de Tris-HCl 20 mM pH 7,5 conteniendo NaCl 200 mM, EDTA 5 mM y etanol 55%. El ADN fue eluido de la resina con 50 μ l de dH₂O previamente calentada a 60°C.

Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de agarosa utilizando un amortiguador de siembra de la siguiente composición: Tris-HCl 10 mM pH 8, 0,25% (p/v) de xilencianol, 0,25% (p/v) de azul de bromofenol y 50% de glicerol.

II-3.3 *Escisión in vivo de plásmidos a partir de λ ZAPII*

Para la escisión del fagémido (pBS) se incubaron 200 μ l de células XL1-Blue (DO₆₀₀=1) con 200 μ l de los fagos correspondientes a cada uno de los clones (conteniendo más de 1×10^5 partículas del fago) y 20 μ l del fago *helper* VCM13 en un tubo cónico de 50 ml. La mezcla se incubó durante 15 min a 37°C y luego se adicionaron 5 ml de YT 2x y se mantuvo a 37°C por otras 3h. Posteriormente, el cultivo se agitó en un baño a 70°C por 20 min y se centrifugó a 1000xg por 5 min. El sobrenadante conteniendo el fagémido empaquetado en las partículas del fago puede ser conservado a 4°C por períodos de tiempo superior a un mes.

Para recobrar el fagémido escindido, se incubó por separado 200 μ l de células XL1-Blue DO₆₀₀=1 con 200 μ l o 20 μ l de una dilución 10^{-2} del sobrenadante conteniendo los fagos durante 15 min a 37°C. Una alícuota de 20 μ l de cada infección se plaqueó en LB/amp y se incubó a 37°C toda la noche. Las colonias resistentes incluyeron al fagémido.

II-3.4 *Secuenciación de los fragmentos de ADN*

Los templados fueron secuenciados utilizando el Kit de Sequenase versión 2.0 (Pharmacia) (Tabor y Richardson, 1987), con [γ -³⁵S]dATP (1250 Ci/mmol) como nucleótido marcado utilizando la técnica de Sanger *et al.* (Sanger *et al.*, 1977). Para aquellos templados doble cadena la concentración de los

misimos fue ajustada a 1,5-2 μg en un volumen final de 32 μl . A esta preparaci3n se le adicionaron 8 μl de NaOH 2 M, se agiti3 suavemente y se incub3 a temperatura ambiente por 10 min. Luego se adicionaron 7 μl de AcONa 3 M pH 4,8, 4 μl de dH₂O y 120 μl de etanol 100% y se incub3 en hielo por 30 min. La preparaci3n fue centrifugada a 13000xg por 15 min a temperatura ambiente. El pellet de ADN fue lavado con etanol 70% fr3o, secado al vac3o y suspendido en 10 μl de dH₂O. A la suspensi3n anterior se le adicionaron 2 μl de amortiguador de reacci3n (Tris-HCl 280 mM pH 7,5, MgCl₂ 100 mM, DTT 160 mM) y 1 μl (5 pmoles) del cebador correspondiente en cada caso. La mezcla se incub3 a 37°C por 20 min. A continuaci3n, las muestras permanecieron al menos 10 min a temperatura ambiente. De esta forma se complet3 la hibridaci3n entre el templado y el cebador. Aquellas preparaciones que no fueron utilizadas inmediatamente fueron conservadas a 4°C.

Para la reacci3n de secuenciaci3n se adicionaron 3,5 U de la enzima SequenaseTM con una concentraci3n de dNTPs limitante (diluci3n 1:3 de la mezcla original, 0,16 μM de dCTP, dGTP y dTTP respectivamente), 1 μl de [γ -³⁵S]dATP 0,57 μM (1250 Ci/mmol) y 1 μl de DTT 0,1 M. La mezcla se incub3 a temperatura ambiente por 2-5 min. Luego fueron transferidos 4,5 μl de la anterior a cada uno de cuatro tubos eppendorfTM conteniendo cada uno de ellos una mezcla de terminaci3n definida compuesta seg3n el caso por uno de los cuatro ddNTPs en una concentraci3n final de 3,33 μM . La reacci3n se incub3 a 37°C por 5 min y luego se detuvo con el agregado de 4 μl de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,5 M, glicerol 50%. Antes de sembrar las muestras en el gel, las mismas fueron calentadas a 85°C por 2 min.

Tres μl de la reacci3n de secuenciaci3n fueron analizados en un gel de poliacrilamida 7%, urea 8 M en amortiguador TBE. La corrida se realiz3 a voltaje constante y en general entre 1600 y 2000 volts. Luego de la corrida, el gel fue fijado en una soluci3n de 3cido ac3tico 10% / metanol 12% por 15

min y secado a 90°C por 2h. El gel seco se expuso con un film KODAK™ X-OMAT por 18 a 36h a temperatura ambiente.

II-3.4.1 ***Secuenciación directa de productos de PCR***

El método utilizado consistió en la secuenciación directa de los productos de amplificación obtenidos con cebadores específicos. En algunos casos fueron utilizados cebadores sobre los vectores en los cuales los insertos estaban subclonados y en otros casos, fueron utilizados cebadores específicos incluidos en la secuencia en estudio.

Siete μ l del producto de PCR™ fueron previamente tratados con una combinación de exonucleasa I y fosfatasa alcalina. El producto amplificado fue incubado 15 min a 37°C con 10 U de cada una de estas enzimas. Durante esta incubación, la exonucleasa I remueve el exceso de cebadores que quedaron sin reaccionar y cualquier material simple cadena extraño que podría haberse generado. Por otra parte, la fosfatasa alcalina remueve los dNTPs remanentes existentes en la muestra de PCR de forma tal, que la concentración final de dNTPs de la reacción de secuencia esta sólo controlada por los adicionados en el momento de la polimerización. Tanto la exonucleasa como la fosfatasa fueron inactivadas por calentamiento a 80°C durante 15 min. Al producto obtenido luego del tratamiento enzimático, se le adicionaron de 5 a 10 pmoles de cebador. La mezcla se calentó 2-3 min a 100°C en el ciclador térmico y rápidamente fue enfriada en un baño de hielo y agua por 5 min. Esta preparación fue conservada a 4°C hasta el momento de la reacción.

La reacción de secuencia se inició con el agregado de 2 μ l de amortiguador de reacción 5x (Tris-HCl 200 mM pH 7,5, MgCl₂ 100 mM, NaCl 250 mM), 1 μ l de DTT 0,1 M, 2 μ l de una dilución 1:5 de la mezcla de los 3 dNTPs (7,5 μ M dGTP, 7,5 μ M dCTP, 7,5 μ M dTTP), 5 μ Ci de [γ -³⁵S]dATP 0,57 μ M (1250 Ci/mmol) y 2 μ l de la T7 ADN polimerasa. La mezcla fue incubada a

temperatura ambiente por 5 min y a continuación se transfirieron 3,5 µl de la reacción anterior a cada uno de los 4 tubos conteniendo 2,5 µl de la mezcla de terminación (A, C, G o T). La incubación se continuó otros 5-10 min a 37°C y fue detenida por el agregado de 4 µl de EDTA 20 mM, formamida 95%, azul de bromofenol 0,05% y xilencianol 0,05%. Cada una de las reacciones fueron calentadas 2-3 min a 85°C inmediatamente antes de ser cargadas en el gel. Las muestras secuenciadas por este método fueron corridas en un gel de poliacrilamida 7% preparado utilizando un amortiguador tolerante al glicerol en lugar de TBE.

II-4 *Obtención y tratamiento de muestras de ARN*

II-4.1 *Extracción de ARN*

La extracción fue realizada utilizando una variación del método desarrollado por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi, 1987). Cien mg de tejido fueron homogeneizados en 1 ml de TRIzol™ usando un homogenizador vidrio-teflon; el volumen de muestra no excedió el 10% del volumen de reactivo utilizado. El homogenato fue incubado por 5 min a temperatura ambiente, para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente, se adicionaron 0,2 ml de CHCl₃ y la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 seg. Luego de incubar 2 a 3 min a temperatura ambiente la suspensión fue centrifugada a 12000xg por 15 min a 4°C. Seguidamente a la centrifugación se observan una fase inferior, fenólica y de color rojo, una interfase y una fase superior acuosa incolora. El ARN permanece exclusivamente en esta última fase. Se transfirió la misma a un tubo nuevo y se adicionaron 0,5 ml de alcohol isopropílico por cada 1 ml de reactivo de TRIzol™ utilizado. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 10 min y centrifugadas a 12000xg por 10 min a 4°C. El ARN puede observarse como un precipitado blanco gelatinoso en el fondo del tubo. El pellet se lavó con 1 ml de etanol 75%, se secó y resuspendió en dH₂O tratada con di-etil-pirocabonato (DEPC). La

cuantificación del mismo fue llevada a cabo espectrofotométricamente con una dilución 1:100 de la muestra medida a 260 y 280 nm. Solo aquellas preparaciones de ARN con una relación 260/280 mayor a 1,85 fueron utilizadas en las reacciones de transcripción reversa y en los estudios de Northern blot.

II-4.2 *Northern blot*

Cada una de las preparaciones de ARN (24 µg) se combinaron con 12,3 µl de formamida, 4,3 µl de formaldehído y la cantidad necesaria de solución amortiguadora 5x (Hepes 0,25 M pH 7,8, acetato de sodio 0,05 M pH 7, EDTA 0,05 pH 8) para que el volumen final a sembrar en el gel sea de 27 µl. Las muestras se incubaron a 65°C por 15 min antes de sembrarlas en geles de agarosa 1,2% y 2,2 M de formaldehído. La corrida de las mismas se realizó a 75 volts por 4h corriente constante en amortiguador de corrida 1x (125 ml de Hepes 0,5 M pH 7,8, 12,5 ml de AcONa 1 M pH 7,5 ml de EDTA 0,25 M pH 8). Luego de la corrida el gel se dejó lavando toda la noche en dH₂O.

La transferencia del ARN a la membrana fue pasiva. Se realizó colocando el gel sobre un papel Whatmann 3MM™ saturado en el amortiguador de transferencia 20xSSC con un filtro de nylon Hybon-N (Amersham) sobre la parte superior, a su vez sobre el cual se apoyan dos o tres piezas de papel Whatmann 3MM™ y luego una pila de papel absorbente con un vidrio en la parte superior que la separa de un recipiente de plomo de aproximadamente 0,5 Kg de peso. Esta estructura de transferencia se mantuvo toda la noche.

Al día siguiente la membrana fue removida y horneada a 80°C por 2h para fijar el ARN. En estas condiciones la membrana puede ser conservada indefinidamente o directamente prehibridizada. Para ello, la misma se incubó en 10 ml de solución de prehibridización por cada 120 cm² de superficie de membrana durante 4h a 42°C.

La hibridación se realizó incubando la membrana a 42°C toda la noche en la solución de prehibridación a la cual se le adicionó la sonda marcada y desnaturalizada en una concentración de 20 ng/ml. Los lavados de la membrana se realizaron en sucesivos pasos en los cuales se disminuyó la concentración salina y se aumentó la temperatura. El procedimiento incluyó: a) 2xSSPE, SDS 0,1% (p/v) a temperatura ambiente por 20 min, dos veces y b) 1xSSPE, SDS 0,1% (p/v) a 65°C por 30 min, dos veces. La membrana finalmente se lavó en 2xSSPE y se expuso con intensificador a -70°C. Las autoradiografías fueron cuantificadas usando un densitómetro láser Shimadzu.

II-4.3 RT-PCR y 5' RACE

Este procedimiento fue diseñado con el objetivo de convertir secuencias específicas de ARN en ADNc *in vitro*. El primer paso consistió precisamente en dicha síntesis. Para ello, se combinaron 2,5 pmoles de cebadores (oligo dT o 368-4) con aproximadamente 1 µg de ARN total o ARNm según el caso y dH₂O tratada con DEPC hasta completar un volumen de 15,5 µl. La mezcla fue incubada 10 min a 70°C para desarmar las estructuras secundarias en el ARN y luego 1 min a 4°C. El contenido del tubo fue colectado por centrifugación adicionándose los siguientes reactivos en el orden descrito: 2,5 µl de amortiguador de PCR 10x (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9, TritonTM X-100 1%), 2,5 µl de MgCl₂, 1 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM y 2,5 µl de DTT 0,1 M. El volumen final fue de 24 µl. Los reactivos fueron mezclados y preincubados 1 min a 42°C. Luego se adicionaron 200 U de transcriptasa reversa SuperScriptTM II y se incubó a 42°C por 50 min. La enzima fue inactivada por calentamiento a 70°C por 15 min y la mezcla mantenida a 37°C. Luego de unos minutos se adicionó 1 µl de RNasa y se incubó a 37°C por 30 min.

Los productos de la transcripción reversa fueron posteriormente separados del exceso de cebadores utilizando el sistema de purificación de ADNc

conocido como GlassMax (Life Technologies Inc.). En este procedimiento, al total de la muestra obtenida en el paso anterior se le adicionaron 120 μ l de NaI 6 M. La solución de ADNc/NaI fue transferida a un soporte GlassMax y centrifugada a 13000xg por 20 seg. El ADNc quedó retenido en la resina y se lavó tres veces con 0,4 ml de solución de lavado 1x y una vez con 0,4 ml de etanol 70%. El soporte fue transferido a un nuevo tubo eppendorfTM y centrifugado a 13000xg por 1 min. El ADNc sintetizado fue recuperado de la resina por elución con 50 μ l de dH₂O precalentada a 65°C.

El producto de ADNc purificado fue incorporado en la reacción de la deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) de forma de adicionar una cola homopolimérica de dCTP en el extremo 3' del cDNA. Para ello, una cantidad variable del ADNc obtenido en el paso de purificación anterior (10-50 μ l) fue combinada con 5 μ l del buffer de reacción (Tris-HCl 10 mM pH 8,4, KCl 25 mM y MgCl₂), 2,5 μ l de dCTP 2 mM y suficiente cantidad de dH₂O tratada con DEPC para completar un volumen final de 24 μ l. La mezcla fue incubada 2-3 min a 94°C y mantenida 1 min en hielo. Luego se adicionó 1 μ l de TdT y se incubó por 10 min a 37°C. Finalmente, la enzima fue inactivada por calentamiento a 65°C durante 10 min.

El ADNc modificado fue amplificado por PCR. Para ello, 5 μ l de esa reacción fueron incorporados en una mezcla que contenía 5 μ l de amortiguador de PCR 10x (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM), 3 μ l de MgCl₂ 25 mM, 1 μ l de la mezcla de dNTPs 10 mM, 2 μ l del cebador específico oligo5RC o 341-5 (10 μ M) y 2 μ l del cebador específico del extremo 3' (AAP o AUAP) del ADNc también 10 μ M y dH₂O hasta completar un volumen final de 49,5 μ l. Luego se adicionaron 2,5 U de Taq ADN polimerasa y la mezcla se mantuvo a 4°C hasta que el ciclador térmico estuvo equilibrado a 94°C. Los tubos fueron entonces transferidos al ciclador y se realizó el siguiente protocolo de amplificación: desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min durante 35 ciclos. Alícuotas de 5 a 20 μ l de

esta reacción fueron analizadas en geles de agarosa de acuerdo a los protocolos convencionales.

En los experimentos de 5' RACE se utilizó como control un fragmento de ARN de 891 bp obtenido por transcripción *in vitro* del gen que codifica para la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y al cual se le adicionó una cola de poli(A⁺).

II-4.3.1 Subclonado en pGEM-T de los productos amplificados

Cada uno de los productos amplificados fueron eluidos de la matriz de agarosa aplicando el procedimiento descrito en la sección II-3.1.2 y directamente ligados al vector pGEM-T™. La reacción de ligación se llevó a cabo combinando 1 µl de amortiguador de reacción de la ligasa 10x (Tris-HCl 300 mM pH 7,8, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM y ATP 10 mM), 1 µl de vector pGEM-T (50 ng), un volumen adecuado del producto de PCR, 3 Unidades Weiss de T4 ADN ligasa y dH₂O hasta completar un volumen final de 10 µl. La mezcla fue incubada toda la noche a 4°C.

El producto de la ligación se usó para transformar células competentes JM109 siguiendo el protocolo descrito en la sección II-3.2.3. Los controles de ligación realizados fueron tres: el control positivo de ligación, el control de autoligado del vector y el control de la transformación. Respecto del primero, la reacción de ligación se llevó a cabo en las condiciones antes descritas, sólo que el producto de PCR a ligar fue un fragmento de ADN de 542 bp del gen de la luciferasa (8 ng de inserto:50 ng de vector, relación molar 1:1). Este fragmento ha sido mutado, generándose múltiples codones de terminación en los seis marcos de lectura lo cual asegura una baja producción de colonias azules. La transformación de células JM109 con una eficiencia de 1×10^8 ufc/µg produce la aparición de entre un 10-30% de colonias azules. Los mismos resultados se alcanzaron en los controles de

fondo. Luego, el ADN recombinante fue extraído (sección II-3.2.4) y secuenciado (sección II-3.4).

II-5 *Obtención y tratamiento de muestras de ADN*

II-5.1 *Extracción de ADN genómico*

La preparación de ADN genómico se realizó utilizando una modificación de la técnica descrita por Cox (Cox, 1968). Un fragmento de 25 mg de tejido fue homogeneizado en 1 ml de DNAzol™ (Gibco BRL) y el ADN genómico precipitado con 0,5 ml de etanol 100%. El pellet se lavó dos veces con 0,8-1 ml de etanol 95% y entre cada lavado el ADN se suspende en etanol invirtiendo el tubo 3-6 veces. Finalmente, el ADN genómico se suspendió en dH₂O de manera que la concentración final sea de 0,2-0,3 µg/µl.

II-5.1.1 *Amplificación de fragmentos de ADN genómico por PCR*

Una alícuota de 0,1 µg fue utilizada en la reacción de amplificación por PCR utilizando los cebadores 60 y oligo5RC específicos de p43. La mezcla de reacción tenía la siguiente composición final: 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 400 nM cebador 60, 400 nM cebador oligo5RC, 200 µM de cada dNTP y 2,5 U de Taq polimerasa. La amplificación se llevó a cabo en un ciclador térmico Perkin Elmer 9600 siguiendo 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 30 seg y 72°C por 2 min.

Los productos de amplificación obtenidos se resolvieron en geles de agarosa 1,5% y se transfirieron a membranas de nylon para su análisis por Southern blot.

II-5.2 *Southern blot y dot blot*

El método empleado fue una variación del procedimiento original descrito por Southern (Southern, 1975).

Las muestras a analizar por Southern blot fueron sembradas en un gel de agarosa y corridas por aproximadamente 2h a 70 volts. Luego de finalizada la electroforesis el gel, se sumergió en HCl 0,25 M por 15 min (sólo si las muestras provenían de la amplificación sobre el ADN genómico) y luego se desnaturalizó por 30 min a temperatura ambiente en una solución de desnaturalización. La neutralización del gel se consiguió luego de dos lavados de 15 min cada uno con una solución de NaCl 1,5 M, 0,5 M Tris-HCl pH 7,2, EDTA 1 mM. A partir de este paso el protocolo de transferencia y fijación del ADN así como también el tratamiento posterior de la membrana fueron idénticos a los descritos para el Northern blot.

En el caso del dot blot una alícuota de cada una de las muestras a analizar fueron sembradas directamente en la membrana de nylon, fijadas, desnaturalizadas e hibridizadas según el procedimiento descrito para el Southern blot.

II-5.2.1 ***Marcación de sondas por nick translation***

En un tubo eppendorf™ se colocaron 5 µl de una mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dTTP; 156 pmoles de cada uno), 200 ng de templado y 50-65 µCi de [α -³²P]dCTP en un volumen final de 45 µl. A esta mezcla de reacción se le adicionaron 5 µl de DNA polimerasa I/DNasa I. La reacción se incubó a 15 °C por 1h y se detuvo por el agregado de 5 µl de EDTA 0,5 M.

Para separar el nucleótido no incorporado de la sonda marcada, la mezcla de reacción fue sembrada en una columna de Sephadex G-50 (10 ml) equilibrada con una solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 50 mM, Na₂EDTA 0,1 mM pH 8. Se colectaron fracciones de 0,5 ml de las cuales fueron separados 5 µl para su cuantificación en un contador de centelleo líquido. Luego de establecerse el perfil de elución, las alícuotas que conformaron el primer pico fueron recolectadas y reunidas en una única

fracción la cual fue desnaturalizada por calor antes de adicionarse a la solución de prehibridización.

II-6 Obtención de la fracción citosólica de la zona fasciculata de adrenales de rata

Un grupo de ratas fueron inyectadas con ACTH 200 µg/Kg o con CHx 100 mg/Kg por 10 min y luego con ACTH 200 µg/Kg. Los animales fueron sacrificados, extraídas las adrenales y liberadas del tejido graso circulante. A menos que se indique lo contrario, todas las etapas del protocolo se llevaron a cabo a 4°C. Las glándulas decapsuladas fueron cuarteadas y homogeneizadas en 0,2 ml de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 / manitol 270 mM. El homogenato fue centrifugado a 800xg durante 10 min y el sobrenadante fue separado y centrifugado a 105000xg por 1h. El sobrenadante de esta última centrifugación constituyó la fracción citosólica.

II-6.1 Western blot

Las proteínas contenidas en las fracciones citosólicas obtenidas de la zona fasciculata de adrenales de ratas tratados o no con CHx antes del estímulo fueron cuantificadas utilizando el método de Lowry *et al.* (Lowry *et al.*, 1951). Una alícuota conteniendo 20 µg de proteínas fue combinada con un amortiguador conteniendo: Tris-HCl 25 mM pH 6,8, SDS 1%, β-mercaptoetanol 5%, EDTA 1 mM, glicerol 4% y azul de bromofenol 0,01%. La mezcla se resolvió electroforéticamente en un SDS-PAGE 12,5% (Mini-Protean II System, Bio-Rad) siguiendo las indicaciones descriptas por el fabricante. Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa durante 2h a 4°C y 100 volts. El procedimiento de identificación de p43 por Western blot fue el siguiente: las membranas fueron incubadas con una solución de bloqueo (amortiguador PBS conteniendo 4% de leche en polvo y 0,5% de Tween 20) a temperatura ambiente por 1h. El primer anticuerpo anti-p43 fue adicionado a una solución de bloqueo fresca en una

dilución 1:500 y las membranas se incubaron durante 1h en estas condiciones. Posteriormente, las mismas fueron lavadas 3 veces con PBS 1x/0,5% Tween 20 por 10 min cada uno e incubadas por 1h con el segundo anticuerpo anti-IgG conejo conjugado con fosfatasa alcalina. Las membranas se lavaron de la forma antes descripta y la señal específica fue detectada por revelado de las membranas con indolilfosfato como sustrato.

II-7 Hibridación *in situ*

El procedimiento seguido fue similar al descrito previamente por Grillo *et al.*, 1994. En este caso fue utilizado un oligonucleótido sintético antisentido de 22 bases, P1RC. Como controles, se utilizaron los oligonucleótidos de secuencia directa a la del mensajero en la misma región (P1) y un segundo oligonucleótido conteniendo el mismo número y composición de bases ordenadas aleatoriamente (P1scramble). Los oligonucleótidos fueron marcados en el extremo 3' con [³⁵S]-dATP (1000 Ci/mmol) utilizando la enzima deoxinucleotidiltransferasa terminal (Gibco BRL), de acuerdo a la técnica descripta por Angulo *et al.* (Angulo *et al.*, 1991). La sonda marcada fue separada del nucleótido no incorporado por cromatografía en columnas pre-empacadas de Sephadex G-25 (Boehringer Mannheim). Los tejidos seleccionados fueron cortados con un criostato mantenido a -15°C y montados sobre portaobjetos tratados con dietilpirocarbonato. Las secciones de cada tejido fueron fijadas por 30 min a 4°C en paraformaldehído 2% / amortiguador fosfato de sodio 0,1 M pH 7,2 y luego lavadas por 1-2 min en 0,5xSSC y mantenidas a -70°C hasta el momento de ser utilizadas. El día de la hibridación, las secciones fueron acetiladas con 0,25% de anhídrido acético en trietanolamina 0,1 M, pH 8 por 10 min para reducir la unión inespecífica. Sobre cada portaobjeto se colocaron 100 µl de solución de hibridación conteniendo Ficoll 400 20 mg%, BSA 20 mg%, polivinilpirrolidona 20 mg%, formamida 50%, 3xSSC, DTT 10 mM, ADN de esperma de salmón 0,1mg/ml, EDTA 1 mM, heparina 4 µg/ml, ARNt 0,4 mg/ml, sulfato dextran 10% y 1x10⁷ cpm/ml de la sonda marcada radiactivamente. Los portaobjetos

se incuban toda la noche en una atmósfera saturada y a 40°C. Posteriormente, las secciones fueron lavadas tres veces con 1xSSC/1mM DTT por 20 min cada vez a temperatura ambiente y dos veces con el mismo amortiguador pero a 45°C. El lavado final fue realizado con 1xSSC a 45°C por 20 min. Luego de secarse las secciones fueron expuestas sobre un film KODAK X-OMAT AR por 2 semanas.

II-8 *Transcripción y traducción in vitro*

El fragmento del clon D12Ucla1 fue liberado con EcoRI del pBS SK y subclonado en el vector de expresión pET-22b(+) siguiendo el procedimiento experimental descrito en las secciones II-3.1.1, II-3.1.2 y II-3.2.

La transcripción y traducción *in vitro* se realizó con el Kit comercial TNT™ *Coupled Reticulocyte Lysate Systems* siguiendo las instrucciones técnicas del proveedor. En un tubo se combinaron, 25 µl de lisado de reticulocitos, 2 µl de amortiguador de reacción, 1 µl de la polimerasa de T7, 1 µl de una mezcla 1 mM de aminoácidos excepto metionina, 4 µl de [³⁵S]-metionina (1000 Ci/mmol) a 10 mCi/ml, 40 U de inhibidor de ribonucleasas RNasin™, 1 µg del templado de ADN y completando a 50 µl con dH₂O. La mezcla de reacción se incubó durante 2h a 30°C.

Una alícuota de 5 µl de la misma se analizó en SDS-PAGE y luego fue transferida a una membrana de nitrocelulosa y expuesta con un film X-OMAT AR durante 48h a -70°C. La misma membrana, fue luego bloqueada e incubada toda la noche a 4°C con una dilución 1:500 del anticuerpo antipéptido FR7. Posteriormente, la membrana fue lavada e incubada con un segundo anticuerpo según el procedimiento experimental detallado en la sección II-6.1.

II-9 *Radioinmunoensayo*

La medición de corticosterona en plasma fue realizada según la técnica descrita por Resko *et al.* (Resko *et al.*, 1974). La corticosterona fue adquirida a New England Nuclear y el anticuerpo utilizado fue una donación del Dr. Alain Bélanger de la Universidad de Laval, Quebec, Canadá.

II-10 *Análisis de secuencias y alineamientos*

Las homologías de secuencia fueron analizadas con el programa *GeneJockeyII* y los alineamientos confirmados utilizando el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del National Center for Biotechnology Information.

RESULTADOS Y DISCUSION

I- Clonado y caracterización molecular de p43

I-1 Introducción

En trabajos previos, Paz *et al.* describieron la purificación de p43 a partir de la fracción citosólica de la zona fasciculata de adrenales de ratas estimuladas *in vivo* con ACTH (citósoles activados) (Paz *et al.*, 1994). En estas condiciones, la proteína resulta biológicamente activa y por lo tanto factible de ser detectada en un ensayo de recombinación *in vitro* (Neher *et al.*, 1982). El protocolo seguido incluyó la combinación de diferentes cromatografías (DEAE-celulosa, Sephadex G-100, Mono Q y Superosa HPLC) y finalmente la elución de la proteína de geles de poliacrilamida. El procedimiento seguido resultó en un grado de purificación de 13000 veces.

p43 se presenta como un doblete de bandas característico de proteínas con múltiples sitios de fosforilación cuando una alícuota de la misma es analizada en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE). Además, se describió que una alícuota parcialmente purificada de p43, obtenida de citósoles activados, presenta varias isoformas fosforiladas cuando se analiza en geles bidimensionales y Western blot (Paz *et al.*, 1994). Más aún, fracciones de Mono Q HPLC con las que eluye p43, obtenidas a partir de citósoles controles (ratas no estimuladas) y activados, exhiben diferentes isoformas fosforiladas cuya aparición es dependiente de ACTH (Paz *et al.*, 1994). Otros experimentos confirmaron la naturaleza fosfoproteica de p43 ya que el tratamiento con fosfatasa ácida de una alícuota parcialmente purificada de esta proteína disminuyó el número de isoformas fosforiladas de p43 cuando se analizó en geles bidimensionales y Western blot (Finkielstein *et al.*, 1996).

Una alícuota de p43 eluída de SDS-PAGE fue sometida a digestión triptica y los productos obtenidos fueron separados por una columna de HPLC en fase reversa y microsecuenciados (Paz *et al.*, 1994). No se encontró homología

significativa para estas secuencias en los diferentes bancos de datos (*Brookhaven Protein Data Bank*; *Swiss-Prot*; *PIR*; *CDS translations from GenBank*) deduciéndose entonces que se trataba de una proteína novel (Paz *et al.*, 1994).

Anticuerpos anti-péptidos sintéticos de las regiones microsecuenciadas de p43 fueron capaces de reconocer a la proteína en su forma nativa (Finkielstein *et al.*, 1996) y desnaturalizada en geles de poliacrilamida en una y dos dimensiones (Paz *et al.*, 1994; Finkielstein *et al.*, 1996).

En el presente trabajo se detallan los avances alcanzados en la caracterización molecular de p43.

I-2 Relación entre el clon D12Ucla1 y p43

Una alícuota purificada de p43 se sometió a digestión con tripsina y N-Asp endoproteinasa (Paz, 1996). Algunos de los péptidos obtenidos se purificaron y microsecuenciaron, obteniéndose nueve secuencias noveles que se resumen en la Tabla I.

El análisis de diferentes bancos de datos de proteínas con los péptidos incluidos en la Tabla I no reveló una homología de secuencia significativa con otras proteínas. Sin embargo, el análisis en el *GenBank* de las secuencias nucleotídicas degeneradas correspondientes a cada uno de los péptidos secuenciados, reveló la existencia de un fragmento de ADNc parcialmente caracterizado de *Mus musculus domesticus* que contenía dos de los péptidos microsecuenciados de p43 (Warden *et al.*, 1993).

Este fragmento, denominado D12Ucla1, fue aislado de una biblioteca λ ZAP construida por transcripción reversa del ARNm derivado del hígado de un ratón hembra F₁ (C57BL/6J x CBA/J) utilizando como cebador oligo dT. Cada uno de los fragmentos obtenidos fueron subclonados en el sitio EcoRI del plásmido Bluescript (pBS).

Nomenclatura del péptido	Secuencia
FG7	NATLSLEPGS (amino terminal) (**)
A10A	ADAGGELDLA (**)
V15Q	VVELEVLDGHEPDGGQR (**)
FR56	IEYFEEAVNYL
G11K	GPGIGLLGISK (**)
F7R	FMAPGVR (**)
FR38	LAPEQPVTLR
FR20	TMETMR
FR11	GH(W)EVK
FR33	GALFR
FR40	EPERPLWRLVK
FR64	*DAWQQLQTFFHKQLSGK
FR54	*DEPLSITVRGLAPEQPVTLR(A)L
FR28	*DEKGALFRAHARYRA

Tabla I. Secuencia de aminoácidos de los diferentes péptidos de p43. Los péptidos fueron obtenidos por digestión con tripsina o con una N-Asp endoproteinasa (*). Los fragmentos generados fueron separados por HPLC, purificados y microsecuenciados por el método de Edman (Fischer *et al.*, 1991). Los péptidos señalados (**) fueron descritos por Paz *et al.* (Paz *et al.*, 1994). (Xaa) significa que el aminoácido señalado tiene un 50% de probabilidad de ser el correcto.

Los rastreos realizados sobre la biblioteca de λ ZAP se realizaron descartando los clones relacionados a los mensajeros más abundantes, permitiendo así el aislamiento de otros menos abundantes para su posterior mapeo cromosómico. Para tal fin, se procedió a realizar rastreos cíclicos utilizando como sonda ADNc de clones previamente identificados (Waterston *et al.*, 1992). De esta manera, sólo aquellos clones que no hibridizaban con la sonda eran seleccionados. Una vez purificados, los mismos fueron parcialmente caracterizados por secuenciación de ambos extremos con cebadores universales e incorporados al *GenBank*.

El clon D12Ucla1 (ATCC 63280) corresponde a un inserto de ADNc de aproximadamente 1,4 kb fue clonado en el sitio EcoRI de pBS SK. El número de acceso en el *GenBank* L11811 corresponde a una secuencia parcial de este clon. Esta secuencia de 341 bp (Figura 1A) presenta dos marcos de lectura abierto (Figura 1B) de los cuales uno (RF2), que codifica para 113 aminoácidos, incluye a dos de los péptidos obtenidos por digestión trípica de p43, el V15Q (con un 100% de homología) y el F7R (con un 85,7% de homología) (Figura 1A). En el F7R, esta diferencia se debe únicamente al cambio de una A por una T en la primera posición del triplete de la secuencia del D12Ucla1, lo que provoca el cambio del aminoácido Met (M) por Leu (L). Este cambio probablemente resulte de las divergencias evolutivas entre *Mus musculus* (D12Ucla1) y *Rattus norvegicus* que es la especie a partir de la cual se purificó p43.

Una segunda secuencia parcial del clon D12Ucla1 de 463 bp encontrada en el *GenBank* (L11810) no incluía ninguno de los péptidos microsecuenciados de p43 descritos en la Tabla I, ni presentaba un marco de lectura abierto extenso. Dicha secuencia se obtuvo utilizando un segundo cebador universal ubicado sobre el plásmido y en el otro extremo del fragmento D12Ucla1.

Teniendo en cuenta la existencia de péptidos de p43 dentro del fragmento de 1,4 kb fue conveniente proceder a su caracterización completa.

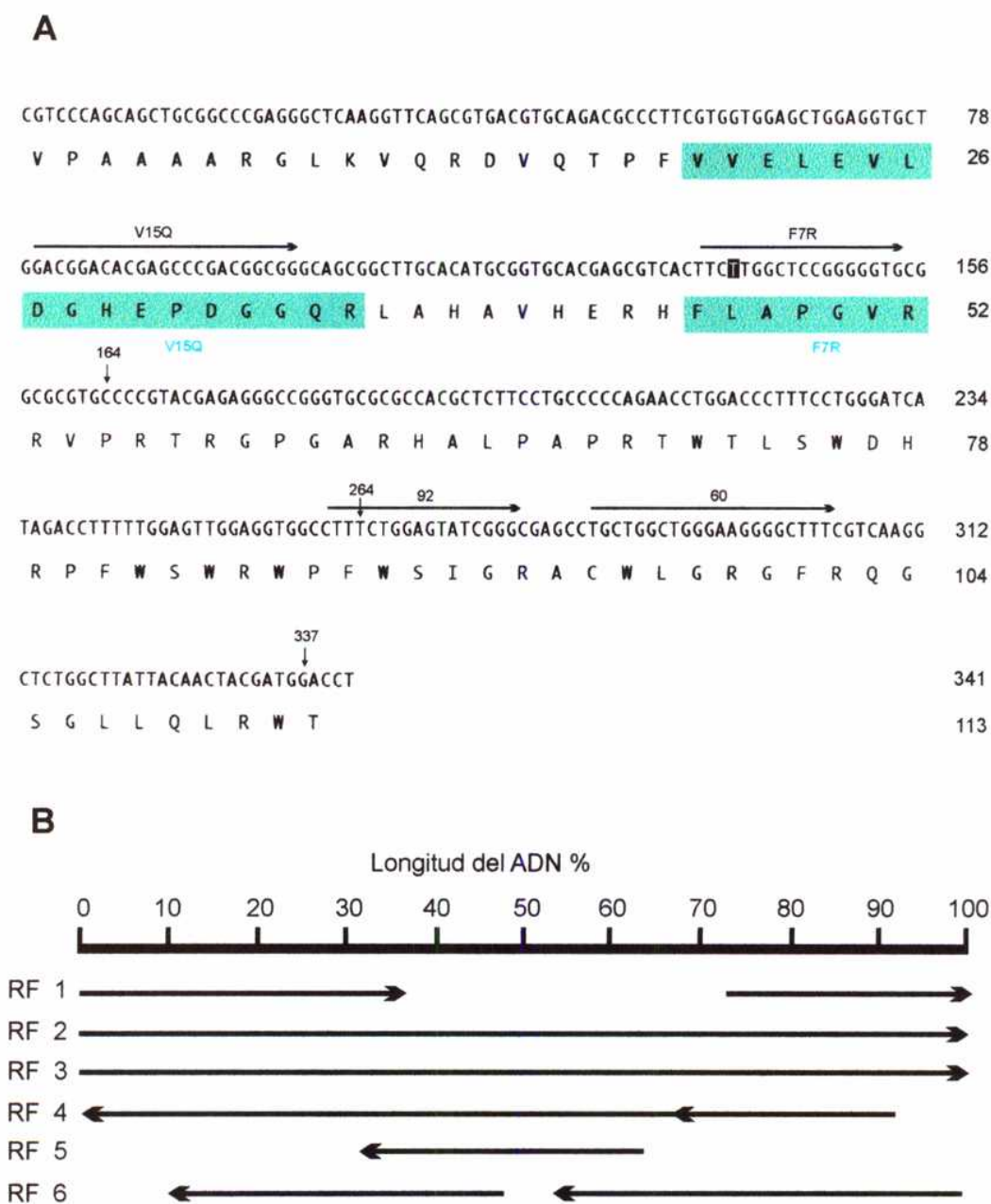


Figura 1. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente al fragmento L11811. A. Secuencia depositada en el *GenBank*. Las flechas horizontales abarcan las regiones correspondientes a los oligonucleótidos sintetizados. Las secuencias homólogas a los péptidos V15Q y F7R de p43 se incluyen en los rectángulos. El nucleótido de la posición 140 se indica sombreado y los nucleótidos 164, 264 y 337 se indican con una flecha vertical. **B.** Análisis de los seis marcos de lectura en esta secuencia.

Una primera aproximación experimental para identificar la presencia de algún otro péptido dentro del fragmento consistió en realizar diferentes reacciones de amplificación por PCR sobre el templado del clon D12Ucla1 con una variedad de oligonucleótidos que en algunos casos correspondían a secuencias incluídas dentro del vector y flanqueantes al inserto y en otros, correspondían a secuencias degeneradas deducida de la aminoacídica correspondiente a alguno de los péptidos. Tal es el caso del oligo5RC degenerado, que es un oligonucleótido de 21 bp que corresponde a la secuencia nucleotídica de la región QTFFHKQ incluída en el péptido FR64.

Los resultados de las diferentes amplificaciones se muestran en la Figura 2. En la calle 1 se observa el producto de amplificación obtenido con los cebadores T7/T3 que corresponde al fragmento completo de 1,4 kb y a las regiones flanqueantes del vector incluídas entre el sitio de clonado y los cebadores T3 y T7. En la calle 2 se observa un único fragmento de aproximadamente 820 bp amplificado con los cebadores 92/61A. Una alícuota de este producto fue reamplificada con los cebadores 60/61A. En este caso, el fragmento obtenido fue 20 bp menor que el anterior (calle 3) lo cual se correlaciona con las posiciones relativas de los cebadores 60 y 92 en el clon L11811 (Figura 1).

La amplificación con el cebador 61A y los oligonucleótidos V15Q (23 bp) o F7R (18 bp) origina productos específicos de aproximadamente 1000 y 950 bp respectivamente (calles 8 y 11). La diferencia de tamaño entre los fragmentos amplificados es la esperada en relación a la distancia descripta para los péptidos. Las mismas observaciones se desprenden de los resultados obtenidos entre T3 y V15Q o F7R (calles 10 y 13).

Las calles 5 y 9 muestran los productos de amplificación obtenidos con el oligo5RC degenerado y los cebadores 60 o V15Q respectivamente. Los fragmentos obtenidos de aproximadamente 700 y 900 bp resultan específicos ya que las diferencias entre sus respectivos tamaños se

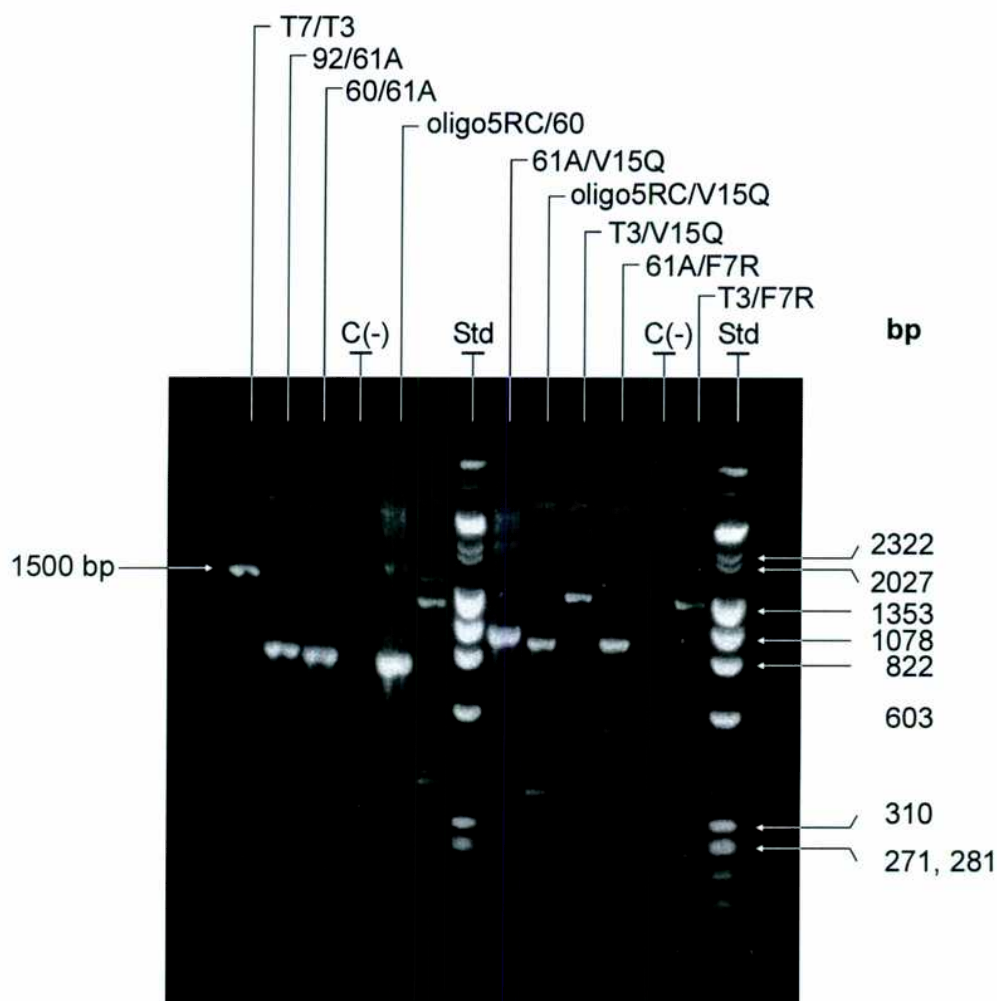


Figura 2. Amplificación de regiones específicas de la secuencia del clon D12Ucla1. A. Una alícuota de 20 ng del pBS SK/D12Ucla1 fue amplificada por PCR siguiendo las condiciones experimentales descritas en Materiales y Métodos. Los productos obtenidos con las diferentes combinaciones de cebadores se resolvieron en un gel de agarosa 1,5% y se muestran en la calle 1: T7/T3; calle 2: 92/61A; calle 3: 60/61A; calle 5: oligo5RC/60; calle 8: 61A/V15Q; calle 9: oligo5RC/V15Q; calle 10: T3/V15Q; calle 11: 61A/F7R; calle 13: T3/F7R. Las calles 4 y 12 son los controles negativos de los cebadores oligo5RC y 60 respectivamente. En cada una de las calles 7 y 14 se sembraron alícuotas de una combinación de marcadores de ADN λ /HindIII y ϕ X174/HaeIII.

correlacionan con la distancia que separa al cebador 60 del V15Q en la secuencia. Este resultado sugiere que la secuencia correspondiente al oligo5RC y por lo tanto la del péptido FR64 están contenidas en el clon D12Ucla1.

De acuerdo a estos resultados resultaba de interés obtener la secuencia completa del clon para poder determinar al menos una parte de la secuencia codificante de p43. Inicialmente, la estrategia seguida consistió en la secuenciación de ambas hebras del fragmento de 1,4 kb desde ambos extremos con cebadores universales (T7/T3). A partir de la información de secuencia obtenida, se sintetizaron nuevos oligonucleótidos que a su vez sirvieron de cebadores en nuevas reacciones de secuenciación.

De las lecturas obtenidas en la región de la secuencia próxima a los cebadores universales fue posible deducir la orientación del fragmento respecto del promotor de T7 en el pBS e identificar la región 3' no codificante (3'UTR) del clon. En esta región se detectaron dos señales de poliadenilación (AATAAA) que precedían en 69 y 20 bp a la cola de poli(A⁺). Además, parte de la secuencia nucleotídica de este extremo estaba contenida en el clon L11810. Más aún, la secuencia descrita incluía al oligo5RC y en consecuencia al péptido FR64, lo cual confirmaba los resultados obtenidos por PCR.

La secuencia aminoacídica del péptido FR64 era 82,4% similar a la correspondiente región en el clon D12Ucla1. En este caso, las diferencias se deben a modificaciones en la porción C-terminal del péptido. El cambio de los últimos tres aminoácidos SGK (5' TCNGGNAAR 3') en el péptido microsecuenciado de p43 por GSE (5' GG TAGTGAG 3') en el clon D12Ucla1 refleja claras diferencias en la secuencia nucleotídica dentro de esta región.

La secuenciación de ambas hebras del fragmento de 1,4 kb se completó mediante el diseño de oligonucleótidos de regiones internas. Sin embargo,

algunas regiones presentaban compresiones como consecuencia de un alto contenido en GC, lo que generaba una estructura topológicamente inaccesible a la polimerasa. En un principio se procedió a resolver estas estructuras con análogos de nucleótidos sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios obligándonos a cambiar la estrategia experimental. Por lo tanto, se procedió a la amplificación por PCR de diferentes regiones internas del fragmento y a la secuenciación directa de los productos obtenidos. En paralelo, se procedió a subclonar y secuenciar los fragmentos obtenidos por digestión del clon D12Ucla1 con diferentes endonucleasas de restricción. El conjunto de los resultados de secuencia obtenidos resultó en la caracterización molecular del clon D12Ucla1.

La secuencia del clon D12Ucla1 (Figura 3) presentó un marco de lectura abierto de 1009 bp y una región 3'UTR de 309 bp que incluye dos sitios de poliadenilación localizados en las posiciones 1232 y 1281 y una cola de poli(A⁺). La región codificante se extiende 336 aminoácidos e incluye además de los descriptos V15Q, F7R y FR64 a otros cuatro péptidos descriptos en la Tabla I. Ellos son: FR20, FR56, FR11 y G11K. A excepción del G11K cuya secuencia resultó idéntica a la del clon D12Ucla1, los otros péptidos presentaron una identidad parcial: FR20 y FR11, 66,7% y FR56 91%.

Los datos de secuencias obtenidos sugieren que la información depositada en el *GenBank*, bajo el número de acceso L11811, contiene dos errores de lectura en las posiciones 264 (T) y 337 (G) además de la adición de una base (C) en la posición 164 (Figuras 1A y 3). La consecuencia directa de esta última observación es el cambio en el marco de lectura a partir del aminoácido 56 (Figura 1B). Esto explica las diferencias en la estructura primaria observadas entre el clon D12Ucla1 (Figura 3) y la secuencia L11811 descrita en el *GenBank* (Figura 1).

CGTCCAGCAGCTGCGGCCGAGGGCTCAAGGTTACGCTGACGTGCAGACGCCCTTCGTGGTGGAGCTGGAGGTGCT	78
V P A A A A R G L K V Q R D V Q T P F V V E L E V L	26
GGACGGACACGAGCCGACGCGGGCAGCGGCTTGACATGCGGTGCACGAGCGTCACCTTCTGGCTCCGGGGGTGCG	156
D G H E P D G G Q R L A H A V H E R H F L A P G V R	52
GCGCGTGCCCGTACGAGAGGGCGGGTGCAGCCACGCTCTTCTGCCCCAGAACCTGGACCTTCTCGGGATCAT	234
R V P V R E G R V R A T L F L P P E P G P F P G I I	78
AGACCTTTTGGAGTGGAGGTGGCTTCTGAGTATCGGGCAGCCTGCTGGCTGGGAAGGGCTTTCGCCATCGGC	312
D L F G V G G L L E Y R A S L L A G K G F A V M A	104
TCTGGCTTATTACAACTACGATGACCTCCCAAGAACATGGAACATGCACATGGAGTACTTTGAAGAAGCCGTGAA	390
L A Y Y N Y D D L P K N M E T M H M E Y F E E A V N	130
CTACCTGCGCAGCCACCCGAGGTAAAAGGACCTGGAATTGGCTTGGGATTTCAAAGGGGTGAACCTTGGCCT	468
Y L R S H P E V K G P G I G L L G I S K G G E L G L	156
TGCTATGGCCTCCTTCTGAAGGGCATCACAGTGTCTGTGTCATCAATGGCTCCGTGGCTGCTGTTGGGAACCCAT	546
A M A S F L K G I T A A V V I N G S V A A V G N T I	182
CTCTACAAGGATGAGACTATACCCCTGTGACTATCCTGAGAAATCAGGTCAAATGACCAAGGATGGCCTCAAGGA	624
S Y K D E T I P P V T I L R N Q V K M T K D G L K D	208
TGTTGTAGATGCTTTGCAAGCCCTCTGGTAGACAAGAAGAGCTTTCATTCCTGGTGAAGGTCTGACAGCACCTTCT	702
V V D A L Q S P L V D K K S F I P V E R S D T T F L	234
GTTCTCGTAGGTGAGGACGACCACAACCTGGAAGAGCGAGTTCTATGCTGATGAGATCTCCAAACGCCTGCAGGCGCA	780
F L V G Q D D H N W K S E F Y A D E I S K R L Q A H	260
CGGGAAGGAGAAGCCCGAGATCATCTGCTACCCAGCAGCAGGGCATTACATCGAGCCCCCTTACTCCCGCTGTGCAG	858
G K E K P Q I I C Y P A A G H Y I E P P Y F P L C S	286
CGCTGGCATGCACCTCTGGTGGGTGCCAATCACCTTTGGAGGGGAGCCCAAGCCTCATG CATGG CCGAGTTGGA	936
A G M H L L V G A N I T F G G E P K P H A M A Q L D	312
TGCATGGCAGCAGCTCCAGACTTTCTCCACAAACAGTTGGGTAGTGAGTGTGTCATGTCTCCTAAAAATAAAC	1014
A W Q Q L Q T F F H K Q L G S E C L H V S P K I •	336
TATTATATGATGGTTTGGAGGTGGGGAAGGTACAATACATTGTAAGAATATCATTTCAGATGACTTCATCTGAAC	1092
ATAAACTGCTTTAGATTACATTTAAAAAATGTATATAATTACAAATAGTGTGATTCAAGGGCTGGGAATGGA	1170
GTTTCATTGTCAAGTCCTTACTGGCGCATGCAGGATCCTGGGTCAATCCAGCTGCGAGAAATAAGCACGTTCTAT	1248
GGAACTGGAGCTATCCAAGAAAAGTGCAGGAATAAAAGGAACCATGATTAATAAAAAAAAAAAAAA	1318

Figura 3. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del clon D12Ucla1. La secuencia presentada incluye toda la región codificante del inserto, el codón de terminación (TAA) que se indica con un punto negro y la región 3'UTR que incluye las señales de poliadenilación, AATAAA (doblemente subrayadas) y la cola de poli(A⁺). Dentro de la región codificante se subrayan las secuencias correspondientes a los cebadores utilizados en las distintas amplificaciones. Se indican con flechas verticales la posición de los nucleótidos 164, 264 y 337. El sitio NcoI (CCATGG) se encuentra sombreado. Los rectángulos incluyen las regiones homólogas a los péptidos microsecuenciados de p43.

Otras diferencias de secuencia han sido detectadas en las 463 bp correspondientes al clon L11810. En este fragmento se encontraron cambios de nucleótidos en las posiciones 217 a 219 (TTA por ATA), deleciones en las posiciones 11, 15, 19, 28, 31, 39, 54, 55, 63, 66, 80, 81, 91, 120, 333 y 339, inserciones en 276 (A) y en 95 (AG) y cambios de nucleótidos en 10, 23 y 53. La consecuencia más importante de estas diferencias se refleja en el cambio del marco de lectura en la secuencia y en la aparición del péptido FR64 en la misma.

En síntesis podemos decir que el clon D12Ucla1 está relacionado con p43, aunque sólo es un fragmento del correspondiente ARNm. Esta afirmación se basa en el hecho de que D12Ucla1 contiene siete de los péptidos microsecuenciados de p43 que se ordenan desde las regiones N a C-terminal de la siguiente forma: V15Q, F7R, FR20, FR56, FR11, GIIK y FR64 y en que, si bien incluye la región 3'UTR completa, no contiene la secuencia correspondiente al péptido N-terminal ni la de los otros siete péptidos internos descritos en la Tabla I. En consecuencia se deduce que parte de la región 5' codificante está ausente.

Las diferencias de secuencias encontradas entre algunos de los péptidos microsecuenciados de p43 y su región homóloga en el clon D12Ucla1 serían de esperar de acuerdo a las diferencias evolutivas que puedan existir entre las especies de las cuales derivan ambas secuencias, aunque también podrían sugerir la existencia de isoenzimas molecularmente relacionadas a p43. El conjunto de las observaciones antes detalladas hacen del clon D12Ucla1 un fragmento valioso para los estudios moleculares tendientes a caracterizar la estructura primaria de p43.

I-3 Transcripción y traducción in vitro del clon D12Ucla1

Con el fin de confirmar los resultados de los estudios de secuenciación del clon D12Ucla1 y la identidad del producto de expresión de dicho clon, se

estudió la posibilidad de que anticuerpos antipéptidos sintéticos de p43 puedan reconocerlo. A tal fin, el fragmento de 1,4 kb se clonó en un vector de expresión adecuado (Figura 4A), según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos y el producto de la transcripción y traducción *in vitro* se analizó por SDS-PAGE, Western blot y autoradiografía.

La elección del vector de expresión se ajustó a las características del fragmento aislado el cual carece de la región 5'UTR y en consecuencia de las señales necesarias para su transcripción y traducción *in vitro*. El clonado en este tipo de vectores genera una pseudo-región 5'UTR que permite la transcripción y traducción del clon por contener las secuencias AAGGAG y ATG de unión a ribosomas en procariontes y de inicio de la traducción respectivamente. Todo el sistema queda bajo la regulación del promotor de T7 y el operador *lac* (Figura 4B).

En este vector, el *poli-linker* se encuentra a continuación de una secuencia señal N-terminal, *pelB*, que se incluye en todas las proteínas de fusión producidas y que permite que las mismas sean exportadas al espacio periplásmico luego de ser sintetizadas en un sistema *in vivo*. El inserto se clonó *downstream* de *pelB* por lo que la porción N-terminal de la proteína sintetizada incluyó 33 aminoácidos adicionales.

El fragmento de 1,4 Kb se liberó del pBS SK con la endonucleasa de restricción EcoRI y se clonó en el mismo sitio dentro del *poli-linker* del vector pET-22b(+). De esta forma, el marco de lectura abierto 2 de D12Ucla1 queda en *frame* y el producto de expresión obtenido contiene los péptidos de p43 (Studier y Moffatt 1986; Studier *et al.*, 1990) (Figura 4C). El procedimiento experimental seguido se detalla en las secciones II-3.1.1 y II-3.2

Con la intención de determinar la orientación del fragmento clonado respecto del promotor de T7, el producto de ligación pET-22b(+)/D12Ucla1 se usó para transformar células (sección II-3.2.3 de Materiales y Métodos) y el

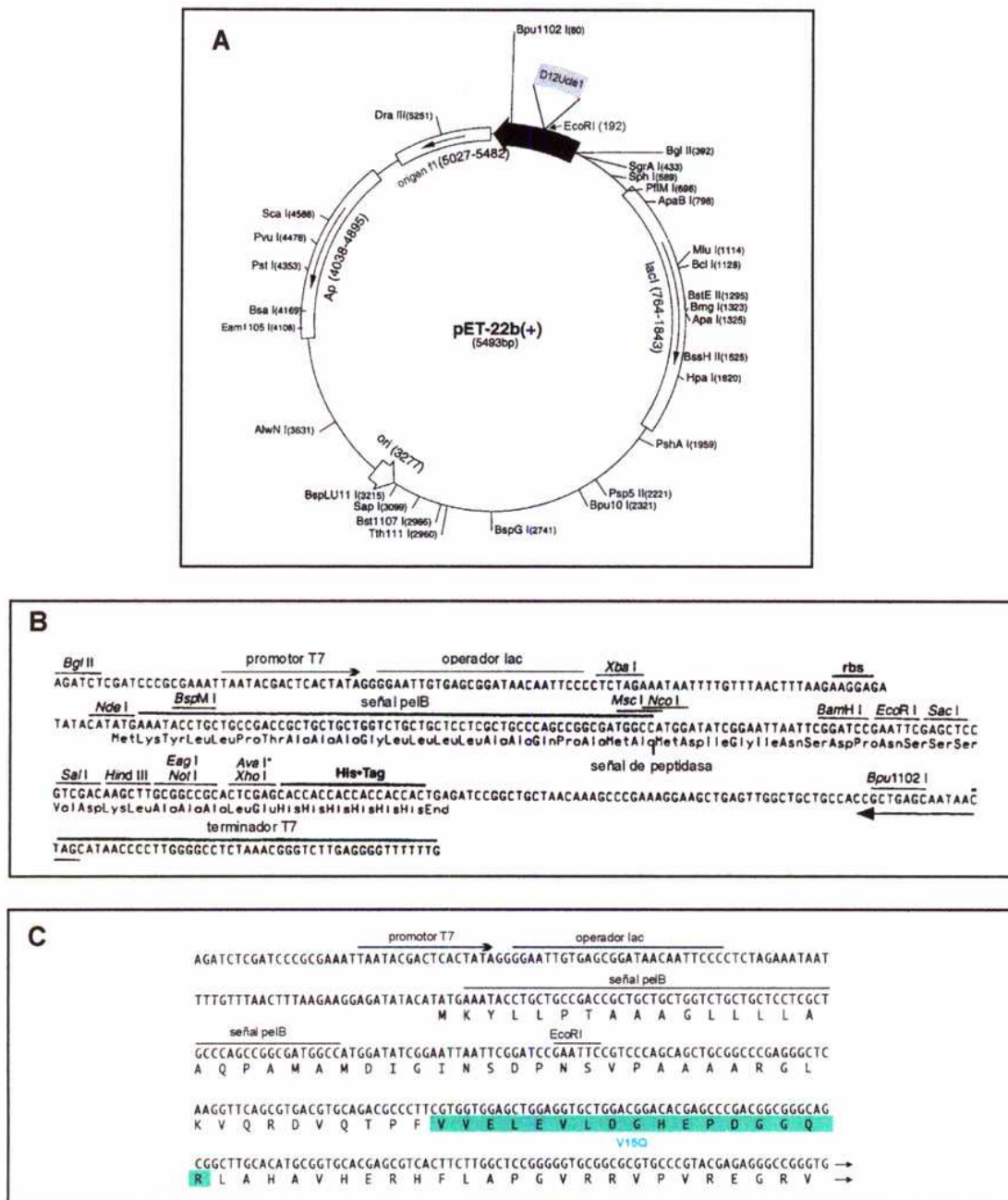


Figura 4. Estructura del pET-22b(+) y estrategia de clonado. **A.** Representación esquemática de pET-22b(+) donde se indica el sitio de clonado de D12Ucla1. **B.** Secuencia de nucleótidos correspondientes a la región adyacente al sitio de clonado. En la misma se indica con una flecha la región promotora de T7 y se subrayan, la región operadora, el sitio de unión a ribosomas, la secuencia correspondiente al péptido señal y los posibles sitios de clonado. **C.** Secuencia parcial de nucleótidos de la región adyacente al sitio de clonado y de las primeras 184 bp del clon D12Ucla1. Con un rectángulo se indica el péptido V15Q de p43 y con líneas las posiciones de las regiones promotoras y operadoras.

ADNds plasmídico extraído se analizó según se describe en la sección II-3.1.1 de Materiales y Métodos. Algunas de las colonias transformantes fueron picadas, crecidas y el ADN plasmídico extraído y cortado con EcoRI para verificar la presencia del inserto. Como puede observarse en la Figura 5A, las transformantes 1, 3, 4, 6, 8, 9 y 10 contienen el fragmento de 1,4 kb. La orientación del mismo respecto del promotor de T7 se determinó cortando sucesivamente una alícuota del plásmido purificado de cada una de las transformantes con NcoI y EcoRI. La endonucleasa NcoI tiene un sitio único de corte en D12Ucla1 en la posición 921 respecto del extremo 5' (Figura 3). De esta forma, sólo aquellas colonias recombinantes cuyo corte con NcoI liberen un fragmento de aproximadamente este tamaño, estarán orientadas correctamente respecto del promotor de T7; si por el contrario el inserto está invertido, el fragmento esperado es de 397 bp. En la Figura 5B se muestra el resultado obtenido luego de cortar una alícuota de cada una de las transformantes antes mencionadas con NcoI y EcoRI. En este caso vemos que únicamente las transformantes 3 y 10 contienen el inserto en la orientación correcta.

Una alícuota de la transformante 3 fue utilizada como templado en la transcripción y traducción *in vitro* siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. La síntesis de la proteína de fusión se realizó en presencia de [³⁵S]-Metionina y el producto obtenido se resolvió en SDS-PAGE y luego se analizó por Western blot y autoradiografía.

La masa molecular esperada para la proteína de fusión se correspondió con la detectada por estas técnicas. La traducción de la región codificante del clon D12Ucla1 y de la correspondiente al péptido señal ubicado *upstream* del sitio de clonado produjo un polipéptido de masa molecular 40590 que fue reconocido en un Western blot por el anticuerpo antipéptido-F7R de p43 (Figura 6).

De esta forma, los anticuerpos anti-péptidos de p43 reconocieron al producto

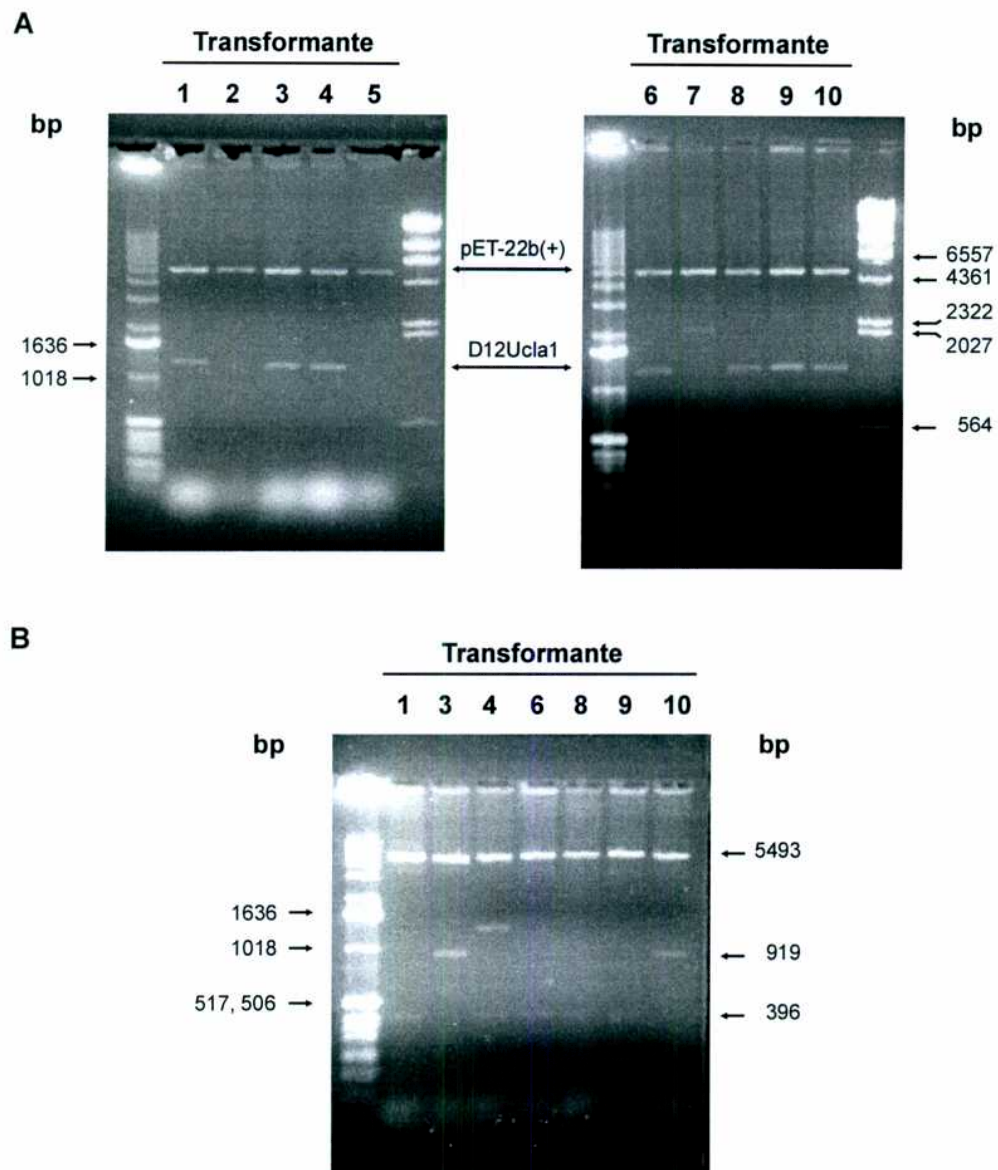


Figura 5. Determinación de la orientación de D12Ucl1 respecto del promotor T7 en pET-22b(+). **A.** Una alícuota de 2 μ g de ADN plasmídico purificado de cada una de las transformantes fue digerido con 20U de EcoRI según se describe en la sección II-3.1.1 de Materiales y Métodos. El producto de la digestión se resolvió en geles de agarosa 1,5%. En las calles 2 a 6 de cada uno de los geles se sembraron las digestiones de las diferentes transformantes. En la primera y última calle de cada gel se corrieron marcadores de ADN, 1 kb DNA ladder y λ DNA/HindIII (Gibco BRL) respectivamente. **B.** Dos μ g de ADN plasmídico de las transformantes 1, 3, 4, 6, 8, 9 y 10 fueron digeridos sucesivamente con 20U de NcoI y 20U de EcoRI y analizados en un gel de agarosa 1,7%. En las calles 2 a 8 se muestra el producto de la digestión de cada una de las transformantes. En la primera calle se sembraron marcadores de ADN, 1 kb DNA ladder.

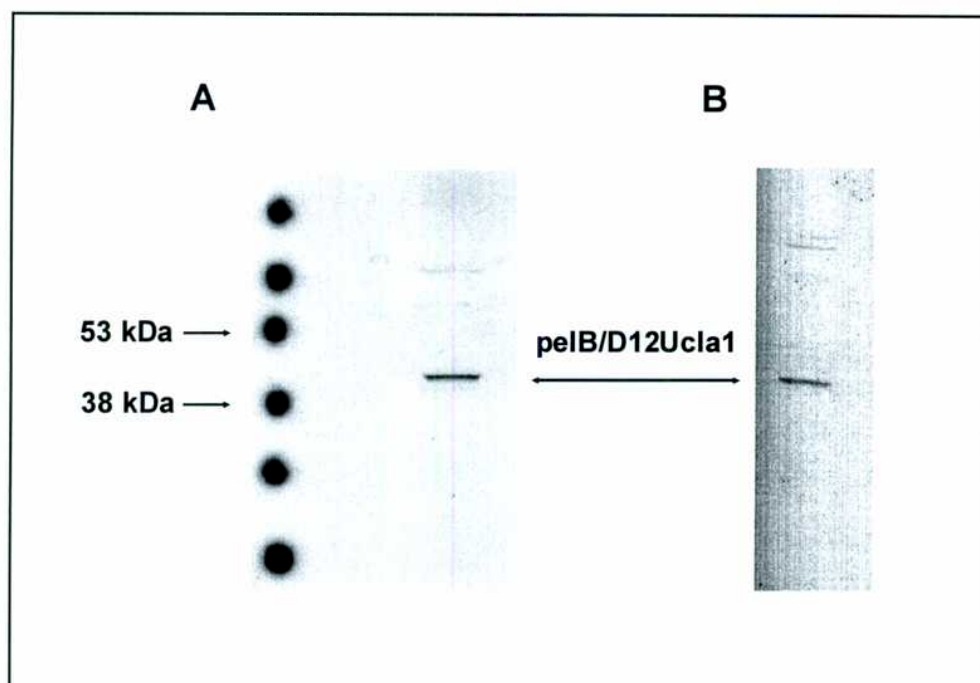


Figura 6. Transcripción y traducción *in vitro* del clon D12Ucla1. A. Una preparación de ADNds (1 μ g) de pET22b(+)/D12Ucla1 de la transformante 3 fue incluido en el sistema de expresión *in vitro* TNTTM con [³⁵S]-metionina como aminoácido marcado. El procedimiento experimental seguido se detalla en la sección II-8. El producto obtenido se resolvió en SDS-PAGE, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y la misma se expuso sobre una película X-OMAT AR por 48h. B. La misma membrana, fue posteriormente incubada con una dilución 1:500 del anticuerpo purificado anti-péptido F7R y luego revelado con un segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina, según se describe en la sección II-6.1.

de expresión del clon D12Ucla1 aislado de una biblioteca de ADNc de hígado de *Mus musculus*. Este resultado confirma la relación entre el polipéptido codificado por el clon D12Ucla1 y p43 apoyando de esta forma las observaciones de secuencia mencionadas anteriormente.

I-4 Identificación de p43 en zona fasciculata de adrenal de rata por RT-PCR

Con el fin de lograr la caracterización de p43 en adrenal de rata se procedió a la identificación y secuenciación del producto de amplificación obtenido por RT-PCR sobre una preparación de ARNm de la zona fasciculata de la corteza adrenal, según el procedimiento descrito en la sección II-4.3 de Materiales y Métodos.

La síntesis del ADNc se realizó por transcripción reversa a partir de un cebador de oligo dT. La amplificación del fragmento específico se consiguió empleando una combinación de cebadores no degenerados diseñados a partir de la secuencia de nucleótidos del clon D12Ucla1 en la reacción de PCR. El protocolo de amplificación empleado se detalla en Materiales y Métodos.

Los productos de amplificación obtenidos para cada combinación de cebadores fueron variables y en general se revelaron múltiples bandas en geles de agarosa. Sin embargo, la amplificación con los cebadores 60/oligo5RC mostró un único producto de aproximadamente 700 bp (Figura 7, calles 3 y 4). Teniendo en cuenta las posiciones relativas de estos cebadores en el clon D12Ucla1, el producto de amplificación esperado se corresponde con el descrito. De alguna manera, este resultado sugiere que la distancia entre los cebadores 60/oligo5RC en el ARNm de p43 de rata está conservada y que probablemente la secuencia de nucleótidos sea relativamente homóloga a la descrita para el clon D12Ucla1 descartando la existencia de nuevas regiones de secuencia entre estos cebadores en

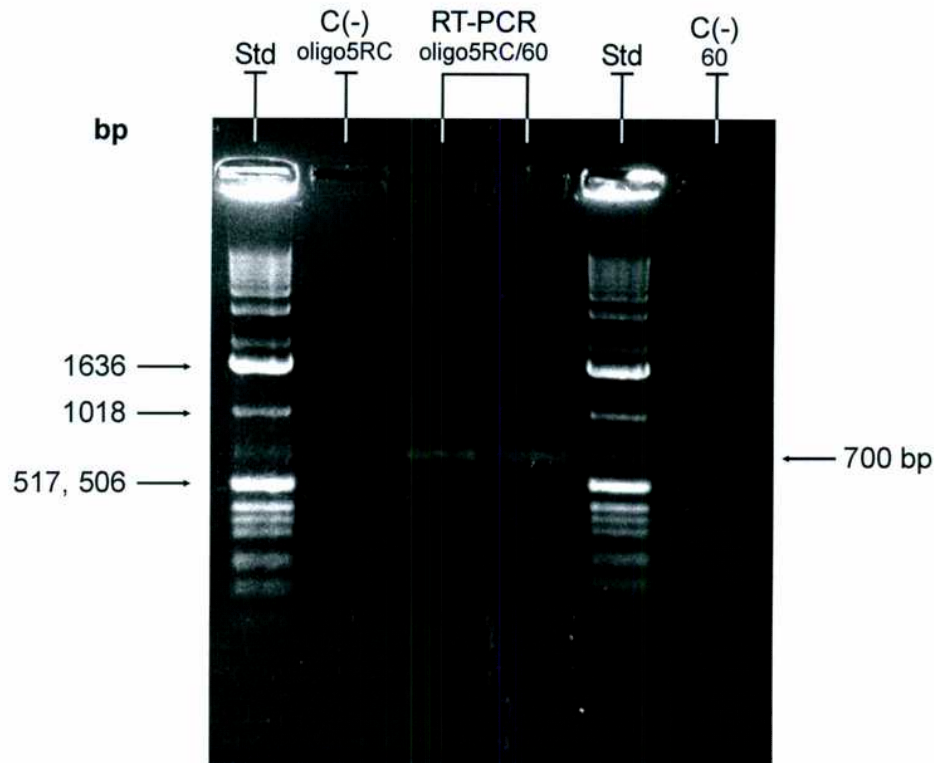


Figura 7. Detección del ARNm de p43 en la zona fasciculata de la corteza adrenal por RT-PCR. Un μg de ARN total de este tejido fue utilizado como templado en una reacción de transcripción reversa con oligo dT como cebador. Una alícuota del ADNc sintetizado se incorporó en una reacción de amplificación por PCR con los cebadores 60/oligo5RC siguiendo el protocolo de ciclado descrito en la sección II-4.3. Una alícuota de 7 μl de esta amplificación se resolvió en un gel de agarosa 1,7% y el producto obtenido se muestra en las calles 3 y 4. En las calles 2 y 6 se sembraron alícuotas semejantes correspondientes a los controles negativos de amplificación. En este caso, la misma reacción de amplificación por PCR se realizó con un único cebador en cada caso, oligo5RC (calle 2) o 60 (calle 6). En las calles 1 y 5 se sembraron marcadores de ADN, 1 kb DNA ladder.

adrenal de rata. La secuenciación del fragmento amplificado confirmó las conclusiones de los experimentos de RT-PCR.

El producto de 700 bp fue secuenciado directamente a partir de los cebadores usados en la amplificación y con otros de regiones internas diseñados posteriormente. La lectura completa de la secuencia mostró un marco de lectura abierto de 692 bp que resultó ser 91% homólogo al clon D12Ucla1. La confirmación de la lectura fue realizada por secuenciación de ambas hebras del fragmento amplificado subclonado en pGEM-T (sección II-4.3.1). La correspondiente secuencia de aminoácidos incluyó varios de los péptidos microsecuenciados de p43, FR20, FR56, FR11, GIIK y FR64 (Figura 8). En todos los casos, la homología de secuencia fue del 100%.

Las evidencias presentadas indican que el fragmento amplificado por RT-PCR en adrenal codifica para un polipéptido que corresponde a parte de la secuencia de p43. El hecho de que la secuencia de este ADNc resulte altamente homóloga al clon D12Ucla1 confirma que ambas secuencias estaban relacionadas.

I-5 Aislamiento y caracterización de clones de p43 obtenidos a través de rastreos en diferentes bibliotecas

I-5.1 Rastreo de una biblioteca λ ZAPII de adrenal

La estrategia seguida para obtener la secuencia completa de p43 fue rastrear una biblioteca de λ ZAPII de adrenal de rata. El procedimiento seguido se detalla en la sección II-3 de Materiales y Métodos.

Esta biblioteca incluye fragmentos de hasta 10 kb de ADNc obtenidos por transcripción reversa de ARNm utilizando como cebador oligo dT. En particular, este oligonucleótido contiene un sitio XhoI en su extremo 5' y otro EcoRI adicionado en el extremo 5' de los fragmentos de ADNc doble cadena sintetizados. Esto permite que los mismos sean clonados

60					
TGCTGGCTGGGAAGGGTTTTGCCGTCATGGCTCTGGCTTATTACAACCTACGACGACCTCCCCAAGACCATGGAAACCA			78		
L A G K G F A V M A L A Y Y N Y D D L P K		T M E T M	26		
		FR20			
TGCGCATTGAGTACTTTGAAGAAGCCGTGAACTACCTGCGTGGCCACCCTGAGGTAAAAGGACCAGGAATTGGGCTGC			156		
R	I E Y F E E A V N Y L	R	G H P E V K	G P G I G L L	52
		FR56	FR11	G11K	
TTGGGATTTCCAAAGGGGGTGAACCTGGCCTTGCTATGGCCTCCTTCTCTGAAGGGCATCACGGCTGCTGTTGTCATCA					234
G I S K		G G E L G L A M A S F L K G I T A A V V I N			78
ATGGCTCCGTGGCTGCTGTTGGGAACACCGTATGCTACAAGGATGAGACTATACCCCTGTGTCCTTCTGAGAGACA					312
G S V A A V G N T V C Y K D E T I P P V S L L R D K					104
AAGTCAAAATGACCAAAGATGGTCTCTTGATGTCGTGGAAGCTCTGCAAAGCCCTTTGGTAGACAAGAAGAGCTTCA					390
V K M T K D G L L D V V E A L Q S P L V D K K S F I					130
TCCCTGTGGAAGGTCTGACACGACCTTCTGTTCTCTGTTGGTCAGGATGACCACAACCTGGAAGAGCGAGTTCTATG					468
P V E R S D T T F L F L V G Q D D H N W K S E F Y A					156
CCAGAGAGGCCTCCAAACGCTTGCAGGCCACGGGAAAGAGAAGCCCCAGATCATCTGCTACCCAGAAGCAGGGCACT					546
R E A S K R L Q A H G K E K P Q I I C Y P E A G H Y					182
ATATCGAGCCTCCTTACTTCCCACTGTGCAGCGCTGGCATGCACCTCTTGGTGGGTGCTAACATCACCTTTGGAGGGG					624
I E P P Y F P L C S A G M H L L V G A N I T F G G E					208
AGCCTAAGCCTCACTCTGTGGCCAGTTGGATGCATGGCAGCAACTCCAGACTTTCTTCCACAAACAG					692
P K P H S V A Q L		D A W Q Q L Q T F F H K Q			229
		oligo5RC			
		FR64			

Figura 8. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del fragmento amplificado por RT-PCR en adrenal. Los péptidos correspondientes a p43 se encuentran incluidos en los rectángulos. La secuencia de nucleótidos correspondientes a los cebadores 60/oligo5RC utilizados en la reacción de amplificación se encuentra subrayada.

unidireccionalmente (EcoRI-XhoI) respecto del promotor *lacZ* en el vector λ ZAP. De esta forma, la biblioteca puede ser rastreada con sondas de ADN o con anticuerpos. Además, por tratarse de un vector del tipo Uni-ZAP™ XR se puede inducir la escisión *in vivo* del fagémido pBluescript, permitiendo que cualquier inserto pueda ser caracterizado en un sistema plasmídico.

Los rastreos realizados en la biblioteca de λ ZAPII de adrenal de rata fueron inicialmente sobre 8×10^5 fagos recombinantes, siguiendo el procedimiento experimental detallado en la sección II-3. El resultado de cinco series de rastreos llevó al aislamiento de 17 clones positivos. Los mismos fueron amplificados y caracterizados mediante el aislamiento del ADN de los distintos fagos y la secuenciación de 300-400 bp de ambos extremos de cada uno de los clones con los cebadores T3 o T7. El resultado del estudio exhaustivo de cada uno de los insertos llevó a la identificación de dos clones positivos relacionados con p43, L720 y LZ621 (Figura 9).

La secuencia de nucleótidos del clon L720 incluye 1130 bp de las cuales 197 bp pertenecen a la región 3'UTR. Este inserto tiene un marco de lectura abierto que codifica para un polipéptido de 311 aminoácidos que incluye en su extremo 5' la secuencia correspondiente al péptido V15Q y dentro de la región codificante a los péptidos F7R, FR20, FR56, FR11, GIIK y FR64. El segundo clon tiene una extensión de 1149 bp de las cuales 1117 bp resultan 100% idénticas al clon L720 y las 32 bp restantes se expanden en dirección 5' (Figura 10). En ambos casos la detección de siete de los péptidos de p43 con un 100% de homología en el orden descripto para el clon D12Ucla1 (Finkielstein *et al.*, 1996) y para el fragmento obtenido por RT-PCR de adrenal confirma la identidad de los mismos.

Es de notar que tanto los clones aislados de la biblioteca de adrenal como el clon D12Ucla1 obtenido de una biblioteca de hígado finalizan alrededor de una misma región 5' y que ninguno de ellos contiene la región N-terminal de p43 o una secuencia homóloga ni un codón ATG de iniciación.

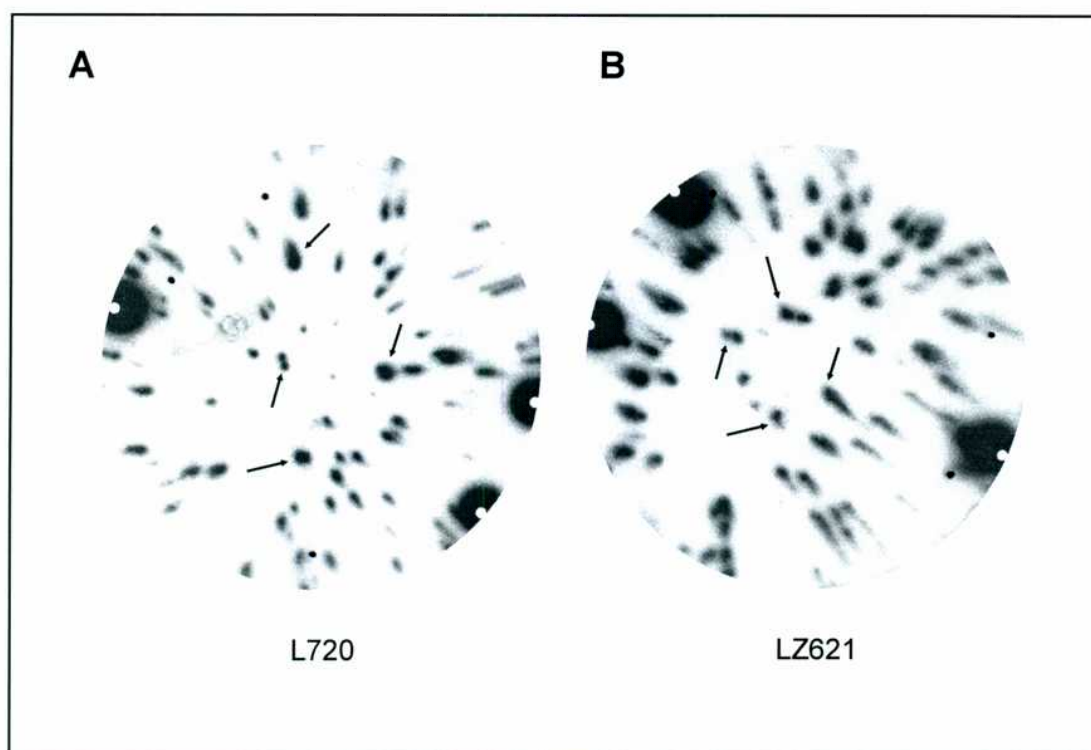


Figura 9. Aislamiento de clones positivos en una biblioteca λ ZAPII de adrenal. Una alícuota de fagos L720 y LZ621 aislados luego del cuarto rastreo de la biblioteca fue combinada con una cantidad apropiada de células XL1-Blue y plaqueadas en LB/amp según se describe en la sección II-3. El ADN de los fagos fue transferido a membranas de nylon siguiendo el procedimiento descrito en las secciones I-3 y II-3. **A.** y **B.** Autoradiografías correspondientes al último rastreo de los clones L720 y LZ621 respectivamente. Las flechas indican algunas de las playas de lisis positivas.

Se realizaron entonces nuevos rastreos sobre la biblioteca de fagos recombinantes con el fin de identificar algún fragmento de ADNc que contuviera la secuencia del extremo 5' del ARNm de p43. Los rastreos se realizaron con sondas de ADNc de diferente longitud obtenidas por amplificación con diferentes cebadores sobre los clones L720, LZ621 o D12Ucla1 o con otras correspondientes a oligonucleótidos sintéticos de p43 o con anticuerpos antipeptidos de esta proteína. En todos los casos, los clones positivos identificados resultaron ser fragmentos de ADNc incluidos en las regiones ya descritas del ARNm de p43.

I-5.2 Rastreo de una biblioteca λ gt11 de riñón

La segunda estrategia utilizada para identificar el ARNm completo de p43 surgió de la información descrita por Warden *et al.* en relación al clon D12Ucla1 (Warden *et al.*, 1993). Estos autores demostraron que la expresión del fragmento D12Ucla1 no se restringía al hígado que de por sí constituía un sitio de baja expresión, sino que por el contrario también se encontraba el transcripto correspondiente en otros tejidos, tales como riñón, corazón y pulmón. Además, se informaba que en algunos tejidos como corazón y riñón se detectaba más de un transcripto para D12Ucla1 (Warden *et al.*, 1993). Teniendo en cuenta que el sitio de mayor expresión para D12Ucla1 es el riñón, decidimos estudiar la posibilidad de encontrar el ADNc completo de p43 o la región 5' faltante en una biblioteca de este tejido.

Los rastreos se realizaron sobre una biblioteca λ gt11 de riñón de rata. Esta biblioteca contenía fragmentos de ADNc (0,8-4 kb) obtenidos por transcripción reversa del ARNm poli(A⁺) de riñón de rata usando oligo dT como cebador. Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el único sitio EcoRI del vector. El procedimiento experimental seguido es el que se detalla en Materiales y Métodos.

Inicialmente se analizaron 3×10^5 fagos recombinantes utilizando la misma

sonda que para la biblioteca de λ ZAPII de adrenal. En este caso, cada uno de los rastreos se llevó a cabo con filtros duplicados de manera de evitar el aislamiento de clones falsos positivos.

El resultado del primer rastreo llevó al aislamiento de 112 clones positivos. Estos fueron purificados a través de sucesivos rastreos y clasificados en función de la intensidad de la señal positiva. De esta forma, al cabo de cinco series se seleccionaron 30 clones recombinantes, algunos de los cuales se muestran en la Figura 11.

A continuación se purificó el ADN de cada uno de los clones y se liberaron los insertos correspondientes por digestión de una alícuota de la preparación con la endonucleasa EcoRI (sección II-3.1.1 de Materiales y Métodos). Los fragmentos obtenidos se subclonaron en pBS SK⁺. Sin embargo, no todos los insertos pudieron liberarse por este tratamiento probablemente como consecuencia de la pérdida de uno o ambos sitios de restricción por recombinación génica en los sucesivos rastreos (Figura 12). Teniendo en cuenta la extensión de la delección se emplearon algunas de las siguientes estrategias para obtener el inserto.

La primera consistió en cortar el ADN de cada uno de los clones con una combinación de endonucleasas de restricción de las cuales una era EcoRI y la otra correspondía a una enzima cuyo sitio de corte en el vector era próximo al sitio de clonado. Esta estrategia resultó en general poco práctica ya que las endonucleasas de restricción alternativas a EcoRI distaban hasta 1 kb del sitio de clonado (KpnI o SacI) en el vector. La consecuencia directa de la digestión con cualquiera de estas enzimas resulta en la liberación de un fragmento de ADN que contiene tanto al inserto clonado como un fragmento de lambda. Esto implica la secuenciación de una región extra de ADN distinta del inserto. Esta estrategia se utilizó para la caracterización de únicamente dos clones aislados de la biblioteca.

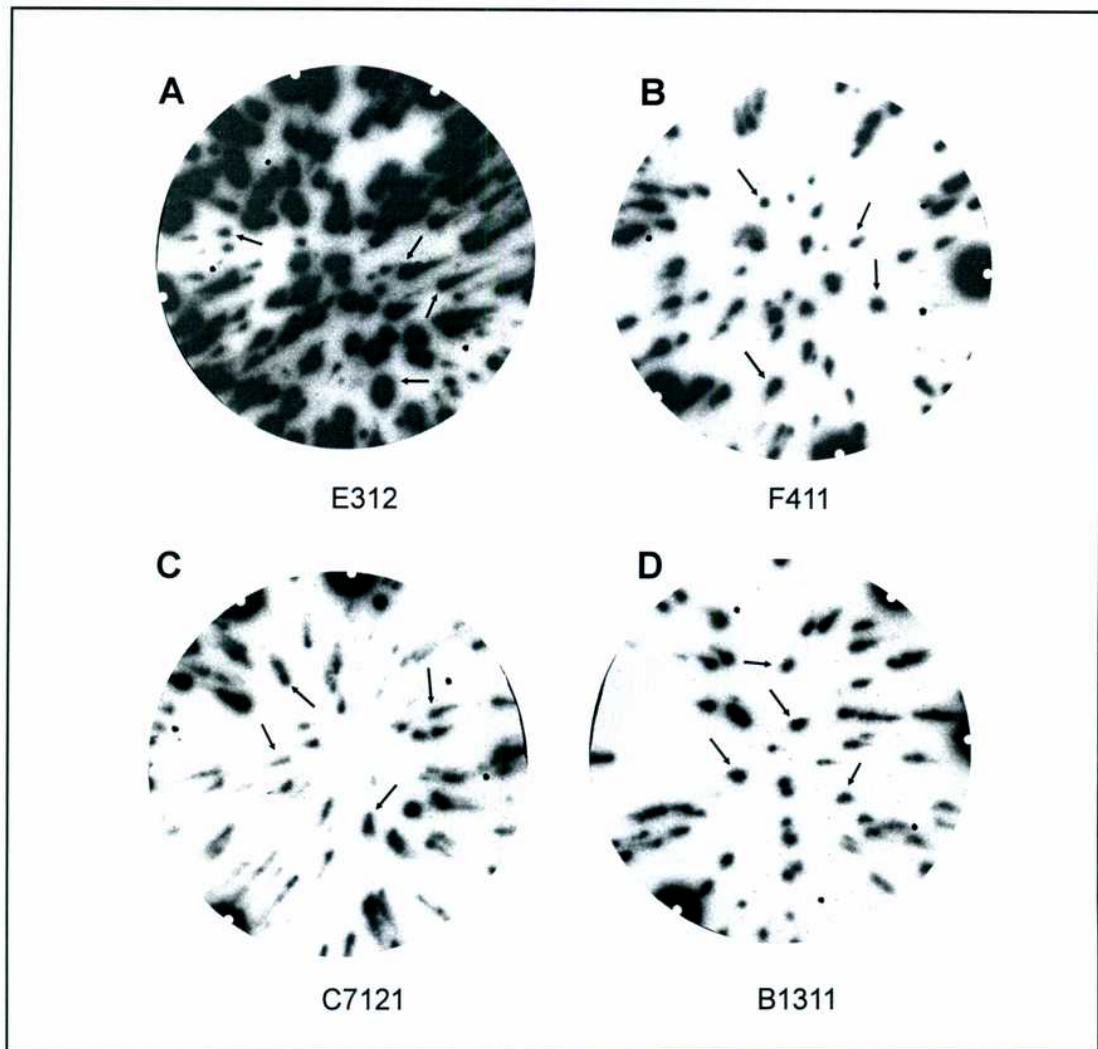


Figura 11. Aislamiento de clones positivos en una biblioteca λ gt11 de riñón. Una alícuota de los diferentes fagos positivos aislados luego del cuarto rastreo de la biblioteca fue combinada con una cantidad apropiada de células Y1090r⁺ y plaqueadas en LB/amp. El ADN de los fagos fue transferido a membranas de nylon siguiendo el procedimiento descrito en las secciones I-3 y II-3. Las autoradiografías correspondientes al último rastreo de cada uno de los clones E312, F411, C7121 y B1311 se muestran en los paneles A, B, C y D respectivamente.

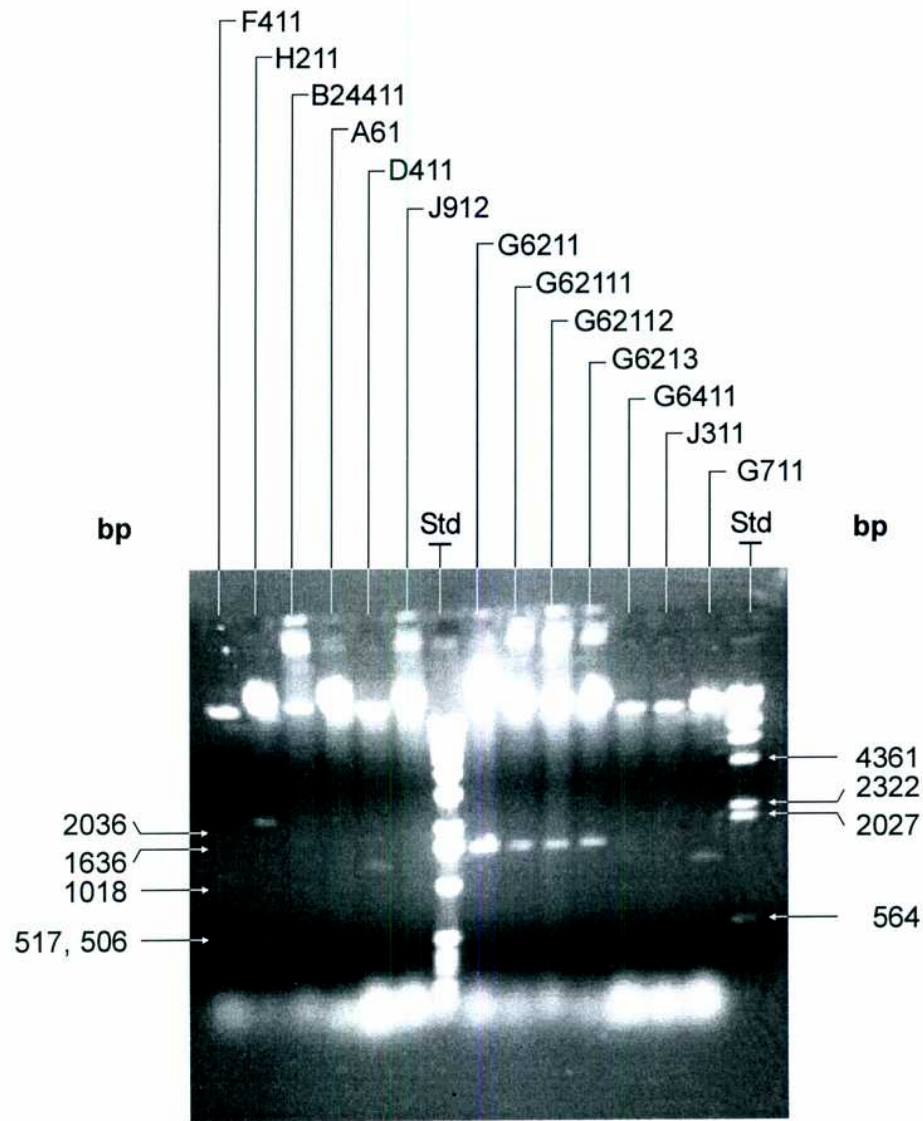


Figura 12. Digestión con la endonucleasa EcoRI del ADN de algunos de los clones positivos aislados. Una alícuota de 2 μ g de ADN aislado de cada uno de los clones positivos fueron digeridos con 20U de EcoRI según se describe en la sección II-3.1.1. El producto de la digestión se resolvió en un gel de agarosa 1,5%. En las calles 1 a 6 y 8 a 14 se muestra el resultado de la digestión de los clones F411, H211, B24411, A61, D411, J912, G6211, G62111, G62112, G62113, G6411, J311 y G711. En las calles 7 y 15 se sembraron los marcadores de tamaño de ADN 1 kb DNA ladder y λ DNA/HindIII respectivamente.

La segunda estrategia utilizada consistió en diseñar cebadores próximos al sitio de clonado y amplificar el inserto por PCR (Figura 13). Los fragmentos amplificados fueron en algunos casos, secuenciados directamente y en otros subclonados en pGEM-T según se describe en las secciones II-3.4.1 y II-4.3.1.

Para acotar el número de clones a secuenciar, se procedió a analizar el mapa de restricción de los mismos con la intención de identificar un patrón de corte similar al descripto para los clones D12Ucla1, L720 y LZ621. Por lo tanto, se procedió a incubar una alícuota de cada una de las preparaciones de ADN de los diferentes clones amplificados por PCR o subclonados en pBS con cada una de las endonucleasas indicadas en cada caso. A continuación, el producto de la digestión se analizó en geles de agarosa y el resultado obtenido se muestra en las Figuras 14, 15, 16.

El análisis de los mapas de restricción sugiere que los clones E312, F411 (no mostrado), B1311 y C7121 están relacionados entre sí y con los de adrenal e hígado (Figura 17). Los clones E312 y B1311 son digeridos por *AccI* y *NcoI* dando origen a fragmentos de tamaño similar a los obtenidos por digestión del clon D12Ucla1 con las mismas enzimas. Por su parte, los clones C7121 y D12Ucla1 son digeridos por *NcoI*, *BamHI* y *PstI* aunque en este caso, el tamaño de los fragmentos obtenidos se correlacionan sólo parcialmente. Los resultados obtenidos nos permitió alinearlos entre sí y especular que todos los clones se interrumpían alrededor de una misma región 5' y que, si bien existían clones de mayor tamaño, la nueva región se encontraría hacia el extremo 3'UTR.

La relación existente entre estos clones, aquel de hígado y el obtenido de adrenal, quedó inicialmente establecida en los estudios de Southern blot en los cuales se analizaron alícuotas del producto de amplificación del clon E312 y de los digestos obtenidos con *EcoRI* sobre los clones D12Ucla1, B1311 y C7121. Estas preparaciones se resolvieron en geles de agarosa y

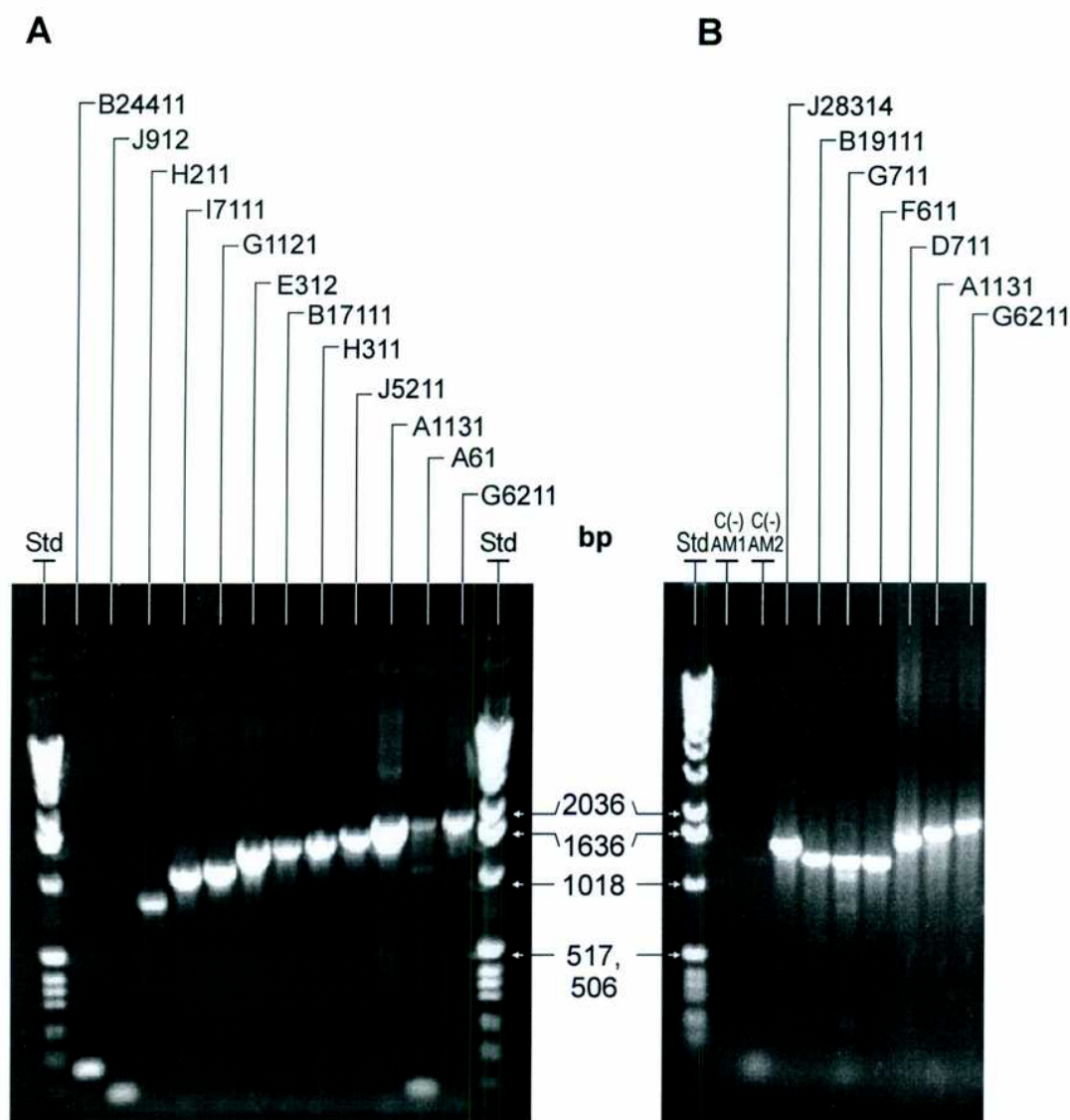


Figura 13. Amplificación por PCR de los insertos clonados en λ gt11. Una alícuota conteniendo 0,1 μ g de ADN de cada uno de los fagos positivos fue amplificada por PCR siguiendo las indicaciones sugeridas por los proveedores de la biblioteca. En este caso, se utilizaron dos cebadores específicos de las regiones flanqueantes al sitio de clonado del inserto (AM1, 5'GACTCCTGGAGCCCG3' y AM2, 5'GGTAGCGACCGGCGC3') y sobre el vector λ gt11. **A.** Las calles 2 a 13 muestran los productos de amplificación obtenidos para los clones, B24411, J912, H211, I7111, G1121, E312, B17111, H311, J5211, A1131, A61 y G6211 respectivamente. **B.** Se muestran los insertos amplificados correspondientes a los clones: J528314, B19111, G711, F611, D711, A1131 y G6211 (calles 4 a 10). En las calles 2 y 3 se sembraron los controles negativos correspondientes a la amplificación con los cebadores AM1 o AM2 respectivamente. Los marcadores de ADN (1 kb DNA ladder) se sembraron en la primera calle de ambos geles y en la última del Panel A.

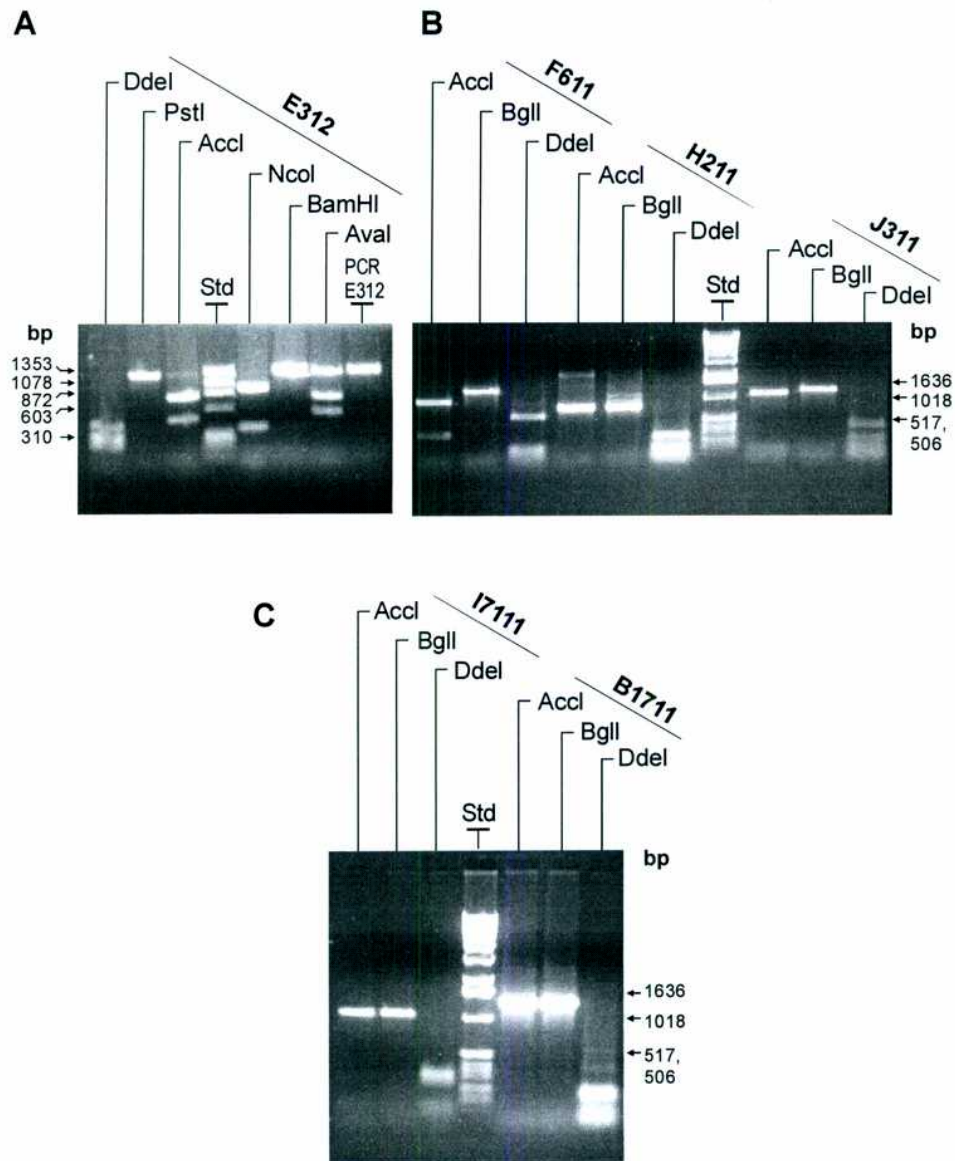


Figura 14. Corte de los productos de amplificación de los clones E312, F611, H211, J311, I7111 y B1711 con diferentes endonucleasas de restricción. Una alícuota de 10 μ l del producto de PCR de cada uno de los clones fue digerido con 20U de cada una de las endonucleasas indicadas siguiendo el procedimiento descrito en la sección II-3.1.1. **A.** Digestión del clon E312 con Ddel, PstI, Accl (calles 1 a 3) y NcoI, BamHI y Aval (calles 5 a 7). En las calles 4 y 8 se sembraron marcadores de ADN, ϕ X174 (Gibco BRL) y una alícuota del inserto sin digerir respectivamente. **B.** Digestión de los clones F611, H211 y J311 con las endonucleasas Accl (calles 1, 4 y 8), BglI (calles 2, 5 y 9) y Ddel (calles 3, 6 y 10). En la calle 7 se sembraron los marcadores de ADN 1 kb DNA ladder. **C.** Digestión de los clones I7111 y B1711 con Accl (calles 1 y 5), BglI (calles 2 y 6) y Ddel (3 y 7). En la calle 4 se sembraron los marcadores de ADN, 1 kb DNA ladder.

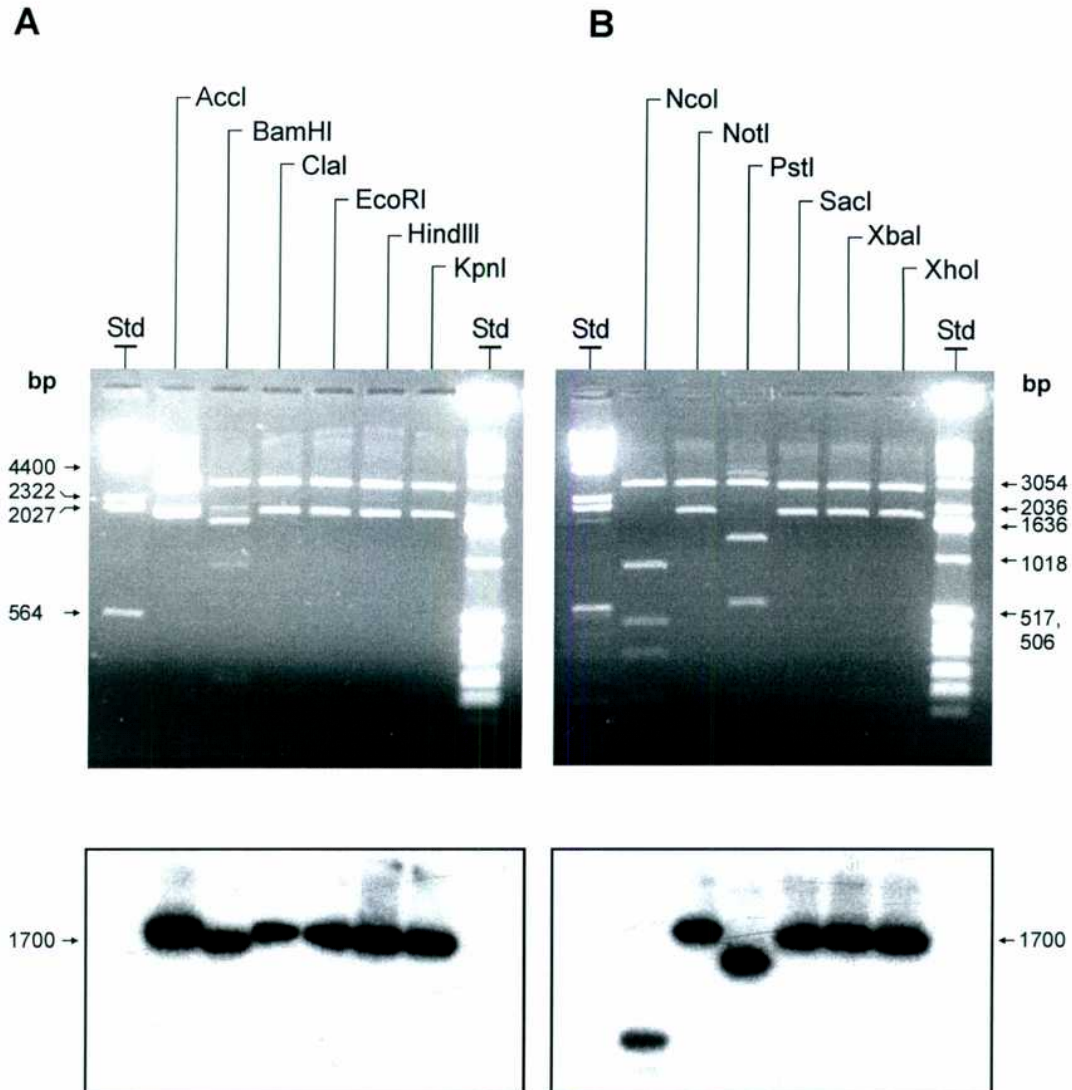


Figura 15. Digestión del clon C7121 con diferentes endonucleasas de restricción. Una preparación de 2 μ g de ADNds pBS SK⁺/C7121 fue digerida sucesivamente con una de las endonucleasas específicas indicadas y luego con EcoRI. Los productos de cada una de las digestiones se resolvieron en geles de agarosa 1,5%. **A.** Calles 2 a 7, digestiones con: Accl, BamHI, Clal, EcoRI, HindIII y KpnI respectivamente. **B.** Calles 2 a 7, digestiones con: NcoI, NotI, PstI, SacI, XbaI y XhoI respectivamente. En ambos casos, las calles 1 y 8 muestran los marcadores λ DNA/HindIII y 1 kb DNA ladder respectivamente. Ambos geles fueron transferidos e hibridizados con el fragmento de 692 bp, según el procedimiento descrito en la sección II-5.2. Las autoradiografías se muestran debajo de los Paneles A y B.

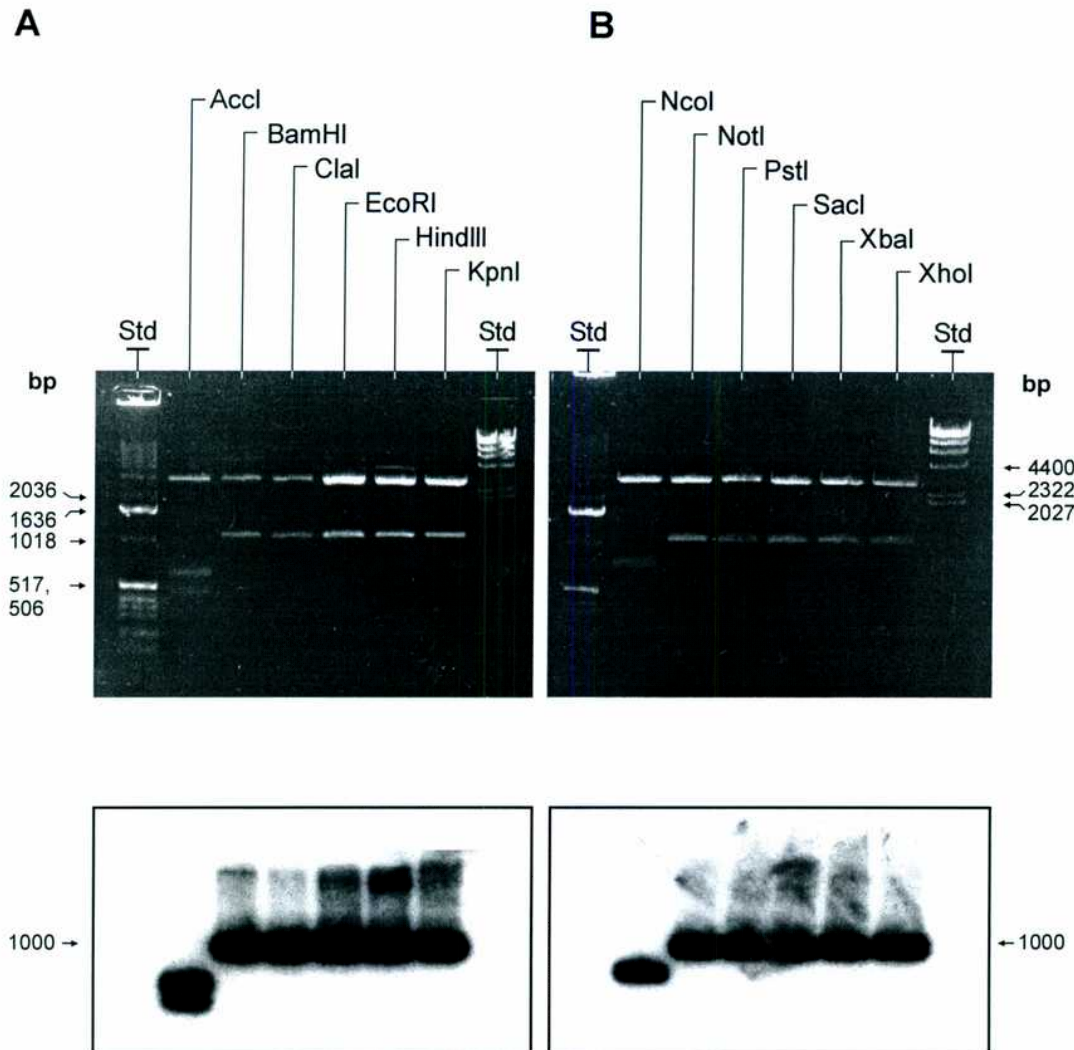


Figura 16. Digestión del clon B1311 con diferentes endonucleasas de restricción. Una preparación de 2 μ g de ADNds pBS SK⁺/B1311 fue digerida sucesivamente con una de las endonucleasas específicas indicadas y luego con *EcoRI*. Los productos de cada una de las digestiones se resolvieron en geles de agarosa 1,5%. **A.** Calles 2 a 7, digestiones con: *AccI*, *BamHI*, *Clal*, *EcoRI*, *HindIII* y *KpnI* respectivamente. **B.** Calles 2 a 7, digestiones con: *NcoI*, *NotI*, *PstI*, *SacI*, *XbaI* y *XhoI* respectivamente. En ambos casos, las calles 1 y 8 muestran los marcadores λ DNA/*HindIII* y 1 kb ladder respectivamente. Ambos geles fueron transferidos e hibridizados con el fragmento de 692 bp según el procedimiento descrito en la sección II-5.2. Las autoradiografías se muestran debajo de los Paneles A y B.

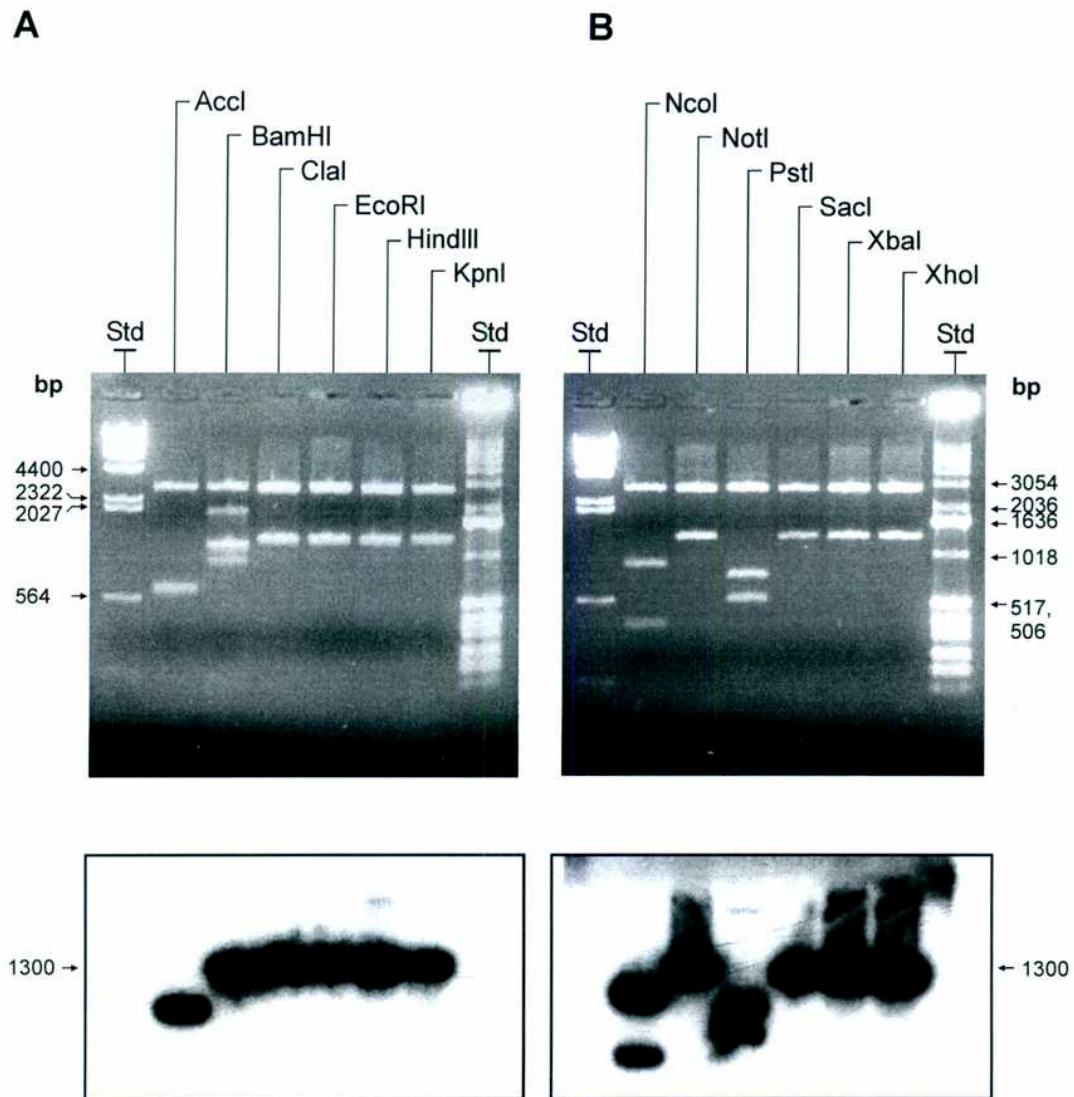


Figura 17. Digestión del clon D12Ucla1 con diferentes endonucleasas de restricción. Una preparación de 2 μ g de ADNds pBS SK/D12Ucla1 fue digerida sucesivamente con una de las endonucleasas específicas indicadas y luego con EcoRI. Los productos de cada una de las digestiones se resolvieron en geles de agarosa 1,5%. **A.** Calles 2 a 7, digestiones con: Accl, BamHI, ClaI, EcoRI, HindIII y KpnI respectivamente. **B.** Calles 2 a 7, digestiones con: NcoI, NotI, PstI, SacI, XbaI y XhoI respectivamente. En ambos casos, las calles 1 y 8 muestran los marcadores λ DNA/HindIII y 1 kb ladder respectivamente. Ambos geles fueron transferidos e hibridizados con el fragmento de 692 bp según el procedimiento descrito en la sección II-5.2. Las autorradiografías se muestran debajo de los Paneles A y B.

se transfirieron e hibridizaron con el inserto de 692 bp aislado por RT-PCR de adrenal. El resultado obtenido se muestra en la autoradiografía incluída en la Figura 18. Del análisis de la misma, se desprende que entre estos fragmentos de ADN existe una clara relación.

De todos los clones aislados de la biblioteca de riñón se secuenciaron al menos 350-400 bp en ambas hebras y cada uno de los extremos. En aquellos casos donde los insertos no pudieron ser subclonados, se procedió a la secuenciación directa de los productos de amplificación (sección II-3.4.1 de Materiales y Métodos).

De todos los clones aislados sólo aquellos incluídos en la Figura 18 y el clon F411 mostraron tener secuencias relacionadas a p43.

El resultado de la secuenciación señaló que el clon E312 tenía una longitud de 1275 bp extendiéndose en 61 bp hacia la región 5' respecto de la secuencia de nucleótidos correspondiente al péptido V15Q. Además, los clones E312 y F411 resultaron idénticos aunque sus insertos estaban invertidos en relación a la posición del amplímero 5' del vector y exhibían una secuencia nueva de 140 bp incluída en la posición 416 de estos clones (Figura 19). Por su parte, los clones B1311 y C7121 contenían insertos de 1070 bp y 1711 bp respectivamente. Ninguno de ellos incluyó la región de 140 bp, ambos se extendieron hacia la región 3'UTR aunque ninguno contenía la cola de poli(A⁺). En particular, el clon B1311 estaba incluído dentro de los descriptos en adrenal (Figura 20). El clon C7121 presentó una región codificante homóloga a las descriptas para los clones E312 y B1311 aunque su región 3' UTR era diferente. Esto sugiere que C7121 puede ser el producto de expresión de otro gen. Al igual que lo informado para los clones de adrenal y el D12Ucla1, los clones aislados de riñón no incluyeron un codón de iniciación ni la región correspondiente al péptido N-terminal sugiriendo que estos clones pierden también la región 5'.

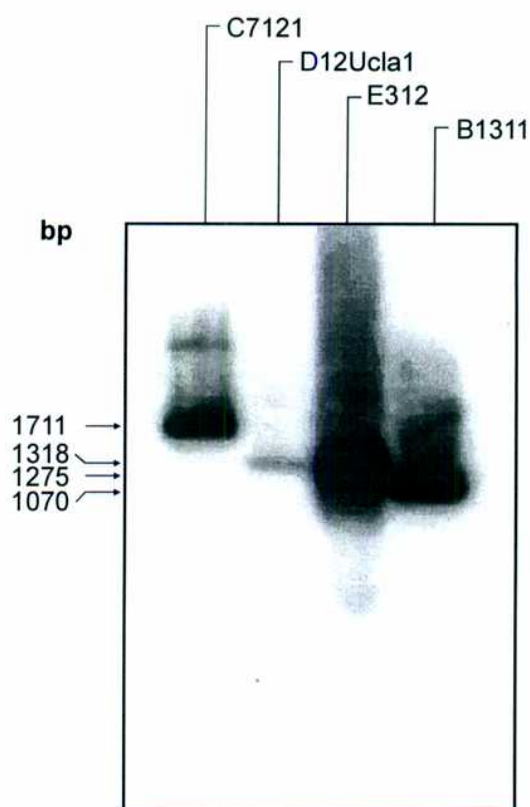


Figura 18. Análisis por Southern blot de los clones E312, B1311, C7121, D12Ucla1 y el fragmento amplificado por RT-PCR. Alícuotas equivalentes de ADNds de cada uno de los clones B1311, C7121 y D12Ucla1 fueron cortadas con EcoRI y el producto de la digestión sembrado en un gel de agarosa 1,5% junto a una alícuota del producto de amplificación del clon E312. Las muestras fueron transferidas a una membrana de nylon e hibridizadas con el fragmento de 692 bp obtenido por RT-PCR de adrenal marcado por *nick translation* (sección II-5.2.1 de Materiales y Métodos). En la figura se muestra la autorradiografía correspondiente. Las calles 1 a 4 corresponden a los clones C7121, D12Ucla1, E312 y B1311 respectivamente.

GGCCATGGAGCCGAAACGGCCTCTCTGGCGCTGGTCAAGCGGACGTGCAGAAGCCTTATGTGGTGGAGCTGGAGGT	78
A M E P E R P L W R L V K R D V Q K P Y V V E L E V	26
FR40	
GCTGGACGGACACGAGCCGACGGCGGTGACGGCTGGCACAGGCAGTGCACGAGCGTCACTTCATGGCTCCAGGGGT	156
L D G H E P D G G Q R L A Q A V H E R H F M A P G V	52
V15Q	
GCGGCGGTGCCGTGCGGACGGGGGGTGGCGCCACGCTCTTCTGCCCCAGAACCTGGGCCCTTCTCTGAAAT	234
R R V P V R D G R V R A T L F L P P E P G P F P E I	78
CATAGACCTTTTGGAGTTGGAGGCGGCTTCTGGAGTACCGGGGAGTCTGCTGGCTGGGAAGGTTTGGCGTCAT	312
I D L F G V G G G L L E Y R A S L L A G K G F A V M	104
GGCTCTGGCTATTACAACACGACGACCTCCCAAGACCATGGAACCATGCGCATTGAGTACTTTGAAGAAGCCGT	390
A L A Y Y N Y D D L P K T M E T M R I E Y F E E A V	130
140bp	
GAACTACCTGCGTGGCCACCTGAGGTAAAGGACAGGAATTGGGCTGCTGGGATTTCAAAGGGGTGAACCTGG	468
FR20	
N Y L R G H P E V K G P G I G L L G I S K G G E L G	156
FR11	
CCTTGCTATGGCTCCTTCTGAGGGCATCAGGCTGCTGTTGTCATCAATGGCTCCGTGGCTGCTGTTGGGAACAC	546
G11K	
L A M A S F L K G I T A A V V I N G S V A A V G N T	182
CGTATGTACAAGGATGAGACTATACCCCTGTGTCCTTCTGAGAGACAAAGTCAAATGACCAAAGATGGTCTCTT	624
V C Y K D E T I P P V S L L R D K V K M T K D G L L	208
GGATGTCGTGGAAGCTCTGCAAGCCCTTTGGTAGACAAGAAGAGCTTCATCCCTGTGGAAGGTCTGACACGACCTT	702
D V V E A L Q S P L V D K K S F I P V E R S D T T F	234
CCTGTTCTCTGTTGGTCAGGATGACCACAACTGGAAGAGCGAGTTCTATGCCAGAGGGCTCCAAACGCTTGACGGC	780
L F L V G Q D D H N W K S E F Y A R E A S K R L Q A	260
CCACGGGAAGAGAAGCCCGAGATCATCTGTACCCAGAAGCAGGCACATATCGAGCCTCCTTACTTCCCACTGTG	858
H G K E K P Q I I C Y P E A G H Y I E P P Y F P L C	286
CAGCGCTGGCATGCACCTCTTGGTGGTGCTAACATCACCTTTGGAGGGAGCCTAAGCCTCACTCTGTGGCCCACTT	936
S A G M H L L V G A N I T F G G E P K P H S V A Q L	312
GGATGTCATGGCAGCACTCCAGACTTTCTTCCAAACAGTTGAGTGGTAAGAGTTAGGAGGTGCCCCCTAAATATA	1014
D A W Q Q L Q T F F H K Q L S G K S •	330
FR64	
ACCTGTTATGTGGTGGTTTGGGGAAAAACCAATATCAGAATGCCACTTCAGTTTAGTTGATTGAACACATACTAA	1092
TTTTTTAAAGTTTCTTCTCCTTCTTCTTCTTCTGTTT	1275

Figura 19. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondientes al clon E312. La secuencia presentada incluye el codón de terminación (TAG), que se indica con un punto negro y a continuación la región 3'UTR. Con un inserto negro se esquematiza la posición del fragmento de 140 bp incluido en esta secuencia. Los rectángulos contienen la secuencia homóloga a los péptidos microsecuenciados de p43.

GCGCGACGTGCAGAAGCCTTATGTGGTGGAGCTGGAGGT	39
R D V Q K P Y V V E L E V	13
GCTGGACGGACACGAGCCCGACGGCGGTACGGGCTGGCACAGGCAGTGCACGAGCGTCACTTCATGGCTCCAGGGGT	117
L D G H E P D G G Q R L A Q A V H E R H F M A P G V	39
V15Q F7R	
GCGGCGCGTGCCCGTGCAGGACGGGCGGGTGCAGCGCCACGCTCTTCTGCCCCAGAACCTGGGCCCTTCTCTGAAAT	195
R R V P V R D G R V R A T L F L P P E P G P F P E I	65
CATAGACCTTTTGGAGTTGGAGGCGGCTTCTGGAGTACCGGGCGAGTCTGCTGGCTGGGAAGGGTTTGGCGTCAT	273
I D L F G V G G G L L E Y R A S L L A G K G F A V M	91
GGCTCTGGCTTATTACAACTACGACGACCTCCCAAGACCATGGAACCATGCGCATTGAGTACTTTGAAGAAGCCGT	351
A L A Y Y N Y D D L P K T M E T M R I E Y F E E A V	117
FR20 FR56	
GAACTACCTGCGTGGCCACCTGAGGTAAGGACAGGAATTGGGCTGCTGGGATTTCCAAAGGGGTGAACCTGG	429
N Y L R G H P E V K G P G I G L L G I S K G G E L G	143
FR11 G11K	
CCTTGCTATGGCCTCCTTCTGAAGGGCATCACGGCTGCTGTTGTCAATGGCTCCGTGGCTGCTGTTGGGAACAC	507
L A M A S F L K G I T A A V V I N G S V A A V G N T	169
CGTATGCTACAAGGATGAGACTATACCCCTGTGTCCTTCTGAGAGACAAAGTCAAATGACCAAAGATGGTCTCTT	585
V C Y K D E T I P P V S L L R D K V K M T K D G L L	195
GGATGTCGTGGAAGCTCTGCAAAGCCCTTTGGTAGACAAGAAGAGCTTCATCCCTGTGGAAGGTCTGACACGACCTT	663
D V V E A L Q S P L V D K K S F I P V E R S D T T F	221
CCTGTTCTCGTTGGTCAGGATGACCACAACTGGAAGAGCGAGTTCTATGCCAGAGAGGCCTCCAAACGCTTGCAAGC	741
L F L V G Q D D H N W K S E F Y A R E A S K R L Q A	247
CCACGGGAAAGAGAAGCCCCAGATCATCTGCTACCCAGAAGCAGGGCACTATATCGAGCCTCCTTACTTCCCACTGTG	819
H G K E K P Q I I C Y P E A G H Y I E P P Y F P L C	273
CAGCGCTGGCATGCACCTCTTGGTGGGTGCTAACATCACCTTTGGAGGGGAGCCTAAGCCTCACTCTGTGGCCAGTT	897
S A G M H L L V G A N I T F G G E P K P H S V A Q L	299
GGATGCATGGCAGCAACTCCAGACTTTCTTCCACAAACAGTTGAGTGGTAAGAGTTAGGAGGTGCCCCCTAAATATA	975
D A W Q Q L Q T F F H K Q L S G K S •	317
FR64	
ACCTGTTATGTGGTGGTTTGGGGAAAAACCAATATCAGAATGCCACTTCAGTTTAGTTTCATTGAAACATACTAA	1053
TTTTTTAAGTTTCTTT	1070

Figura 20. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos correspondientes al clon B1311. La secuencia presentada incluye el codón de terminación (TAG), que se indica con un punto negro y a continuación la región 3'UTR. Los rectángulos contienen la secuencia homóloga a los péptidos microsecuenciados de p43.

I-6 Detección de extremos 5' por RT-PCR

En vista de los resultados obtenidos en los sucesivos rastreos de las bibliotecas de adrenal y riñón con diferentes sondas se decidió emprender la búsqueda del extremo 5' a través de otra metodología, la del 5' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). Esta técnica permite la amplificación específica de una secuencia de ácido nucleico definida entre un sitio interno dentro del ARNm y su extremo 5' y facilita el aislamiento y la caracterización de moléculas de ARNm que se encuentran en bajo número de copias en la célula. Si bien se han descrito diversas variantes de esta técnica, que surgen de las necesidades de cada caso particular, la estrategia general es esencialmente la misma (Figura 21A). Se sintetiza la primera hebra de ADNc a partir de un templado que puede ser ARNm o total con un cebador *antisense* específico (GSP1). De esta forma, la transcripción reversa se acota a los ARNm específicos o a familias de moléculas relacionadas, maximizando las posibilidades de extenderse hasta el final del ARNm. Luego de la síntesis, el producto obtenido es purificado para eliminar los dNTPs no incorporados y el exceso de GSP1. Cada molécula de ADNc sintetizada es modificada covalentemente por el agregado de una cola homopolimérica de dC en su extremo 3' (ADNc(dC)_n) por acción de una deoxinucleotidil transferasa terminal. El ADNc(dC)_n se amplifica por PCR usando una mezcla de tres cebadores: (1) un segundo cebador específico (GSP2) que se une al templado *upstream* de GSP1 y (2) una combinación de cebadores de los cuales uno es complementario a la región homopolimérica y el otro es el adaptador a partir del cual se amplifica desde el poli(dC)_n. De esta forma, se obtienen específicamente las secuencias incluídas entre GSP2 y el 5' de los ARNm (Figura 21A). Los productos obtenidos pueden ser secuenciados directamente sin necesidad de un clonado previo.

La identificación del extremo 5' de p43 por esta técnica se llevó a cabo utilizando como templado indistintamente ARN total o ARNm aislados de riñón y de zona fasciculata de la corteza adrenal de rata. El procedimiento

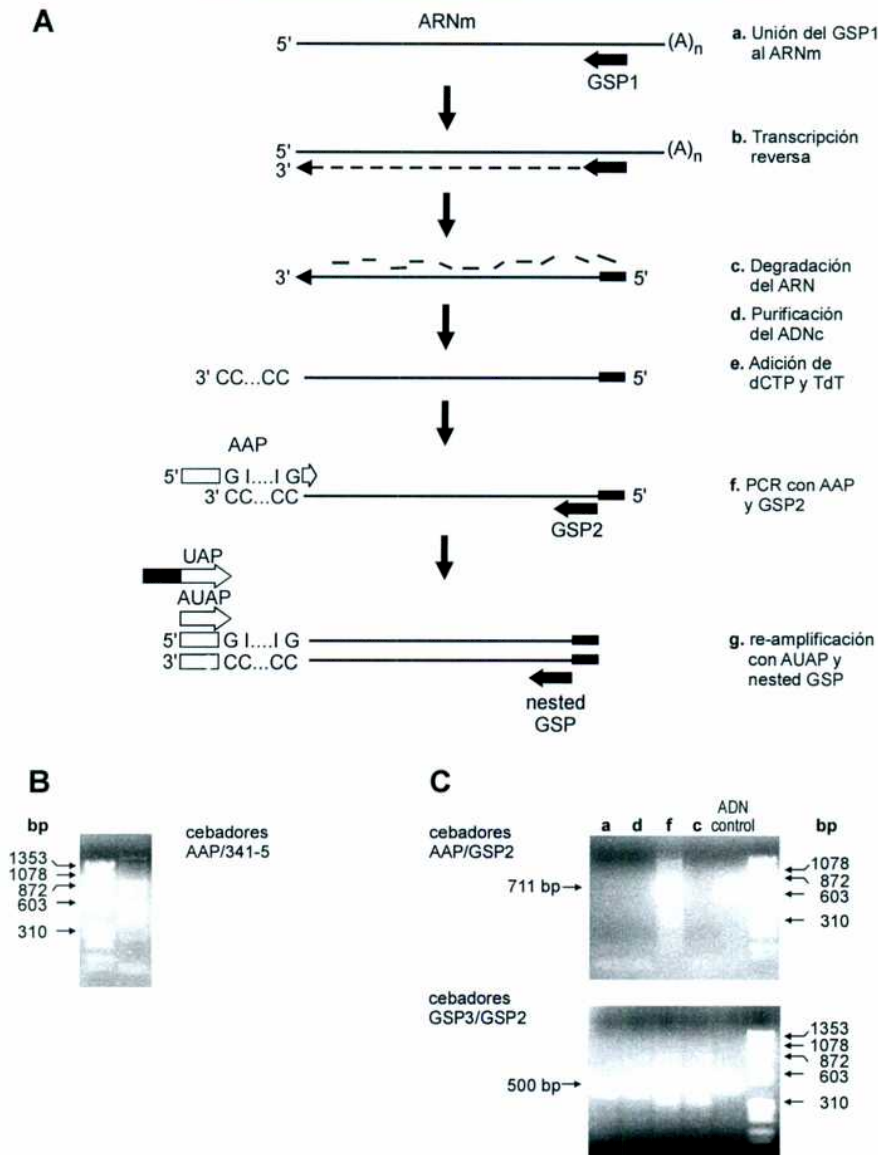


Figura 21. 5' RACE sobre ARN total obtenido de la zona fasciculata de la corteza adrenal. **A.** Esquema general del procedimiento experimental de 5' RACE. **B.** Una alícuota de ARN total (1 µg) se utilizó como templado en la reacción de transcripción reversa en la que el oligonucleótido 368-4 se incluyó cebador específico (GSP1). El producto obtenido fue purificado, modificado y amplificado siguiendo el procedimiento experimental descrito en la sección II-4.3 de Materiales y Métodos. En este caso la amplificación se realizó sobre una alícuota del ADNc(dC)_n utilizando los cebadores AAP y 341-5 (GSP2). **C.** Controles del 5' RACE utilizando 1 µg de ARNm de CAT como templado. En el panel superior se muestra el producto de amplificación obtenido con los cebadores AAP/GSP2 sobre alícuotas correspondientes a los templados de los pasos experimentales a, d, f y c y ADN control respectivamente. En el panel inferior se muestra el resultado de la re-amplificación de cada una de las alícuotas anteriores con los cebadores GSP2/GSP3 (ubicado *downstream* de AAP).

experimental seguido se detalla en la sección II-4.3 Materiales y Métodos.

Cada una de las distintas preparaciones de ARN (tanto las de riñón como las de adrenal) fueron utilizadas como templado en diferentes reacciones de síntesis de ADNc utilizando en cada caso cebadores *antisense* específicos ubicados en diferentes regiones del ARNm de p43. De todos los productos de transcripción reversa obtenidos, se describirán únicamente los resultados correspondientes a la transcripción con el cebador 368-4.

El producto de la transcripción reversa fue modificado covalentemente en el extremo 3' y amplificado por PCR utilizando una combinación de cebadores que incluyen uno específico de p43 localizado *upstream* del 368-4, denominado 341-5 y otro complementario a la cola de poli(dC)_n (36 bp, AAP) que contiene 16 G/I en el extremo 3' (Figura 21B).

Durante el procedimiento experimental cada uno de los pasos fue controlado, realizando en paralelo una reacción de 5' RACE con un fragmento de 891 bp de ARN el cual se modificó con una cola de poli(A⁺) en el extremo 3'. Este fragmento, corresponde a la transcripción de sólo una región del gen que codifica para la enzima cloranfenicol acetil-transferasa (CAT). En este caso, los fragmentos de ADNc se sintetizaron por transcripción reversa a partir de un GSP1 obteniéndose fragmentos de 702 bp los cuales fueron amplificados en dos reacciones de PCR que incluían AAP/GSP2 la primera (Figura 21C, panel superior) y GSP3 (*downstream* de AAP)/GSP2 la segunda (Figura 21C, panel inferior). Los productos obtenidos eran de 711 y 500 bp respectivamente (Figura 21C).

El producto de amplificación obtenido en adrenal con los cebadores AAP/341-5 sobre el ADNc sintetizado con el oligonucleótido 368-4 fue analizado por Southern blot (Figuras 22A y 22B). Aquellos fragmentos reconocidos por la sonda fueron eluidos. Como controles negativos se utilizaron fragmentos amplificados y purificados que no fueron reconocidos

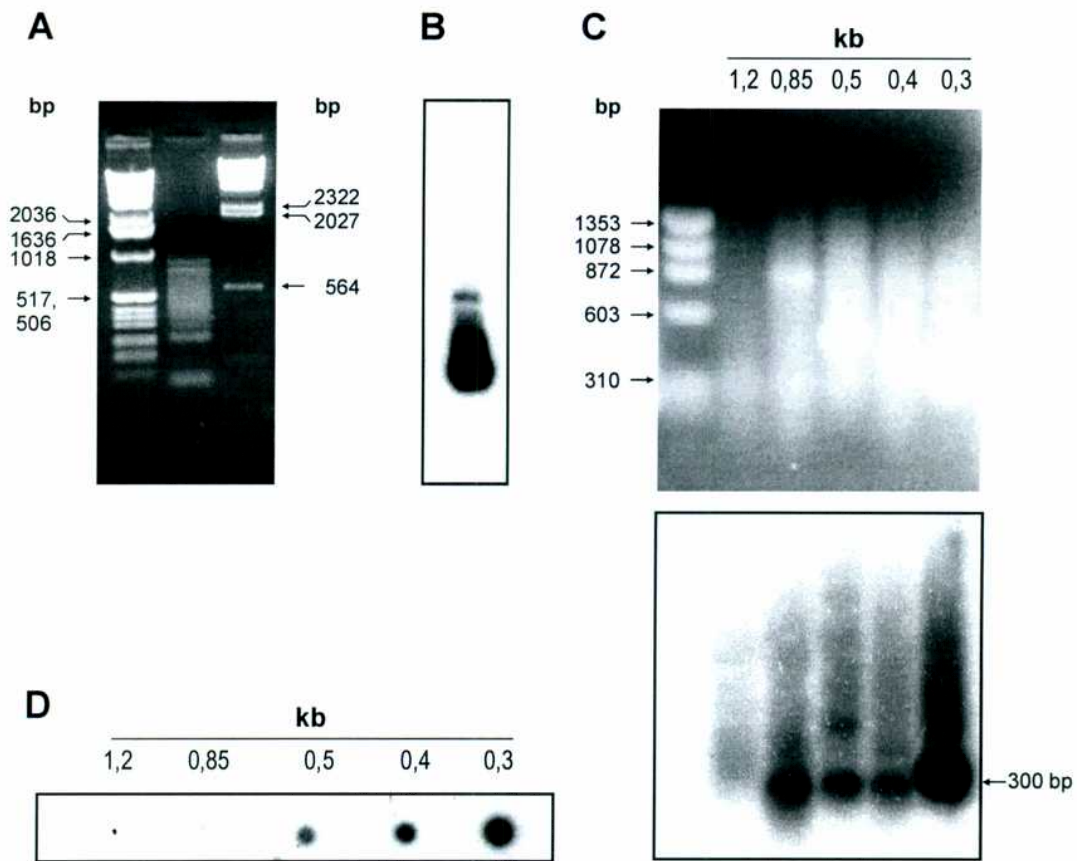


Figura 22. Análisis de los productos obtenidos por 5' RACE. A. Una alícuota de 10 μ l del producto de amplificación obtenido con los cebadores AAP/341-5 fue analizada en un gel de agarosa 2% (calle 2). En las calles 1 y 3 se sembraron alícuotas de 1 kb DNA ladder y λ DNA/HindIII respectivamente. B. Los productos amplificados fueron transferidos a una membrana e hibridizados con la sonda P1/oligo5RC según se detalla en la sección II-5.2 de Materiales y Métodos. C. Cada una de las bandas positivas por Southern (0,3, 0,4 y 0,5 kb) y otras correspondientes a productos de amplificación que no hibridizaron con la sonda, 1,2 y 0,85 kb (controles negativos) fueron eluidas y reamplificadas por separado con los cebadores AUAP/341-5. Las calles 2 a 6 corresponden a los distintos fragmentos amplificados 1,2, 0,85, 0,5, 0,4 y 0,3 kb respectivamente. La calle 1 incluye los marcadores ϕ X174/HaeIII. En el panel inferior se muestra la autorradiografía correspondiente a la transferencia de los productos de amplificación anteriores hibridizada con la sonda P1/oligo5RC. D. Dot blot de una alícuota de cada uno de los fragmentos amplificados y purificados.

por la sonda. En todos los casos, los fragmentos se re-amplificaron utilizando como cebadores el AUAP que corresponde a las últimas 20 bp del extremo 5' del AAP y el 341-5 (Figura 22C). Los productos obtenidos se resolvieron en un gel de agarosa y se analizaron por Southern y Dot blot la sonda P1/oligo5RC (Figuras 22C y 22D).

Los resultados obtenidos, muestran que un único producto de amplificación de aproximadamente 300 bp es reconocido específicamente por la sonda P1/oligo5RC. Los mismos resultados se obtuvieron cuando el templado utilizado provenía de preparaciones de ARNm de adrenal o riñón.

La secuencia del fragmento de 300 bp aislado de adrenal mostró un marco de lectura abierto de 299 bp que codificaba para 99 aminoácidos. Esta secuencia se extendía en 138 bp respecto del extremo 5' de la correspondiente al péptido V15Q. Este fragmento incluyó los péptidos V15Q, F7R y otro el FR40 (100% homólogo), encontrado por primera vez. Además, el fragmento aislado finaliza en su extremo 5' con una secuencia que contiene 7 de 10 aminoácidos de otro péptido de p43, el A10A (Figura 23). El fragmento riñón de 284 bp resultó ser idéntico a la misma región descripta para el de adrenal.

A continuación se procedió a sintetizar nuevos oligonucleótidos de regiones internas comprendidas dentro de este fragmento que fueron utilizados en posteriores reacciones de transcripción reversa. En ningún caso se obtuvieron fragmentos de amplificación mayores a los correspondientes entre cada uno de los cebadores y el extremo 5' que incluye al A10A.

Los mismos resultados se obtuvieron con el kit comercial de amplificación de ADNc Marathon™.

La combinación de las secuencias obtenidas por sucesivos rastreos de bibliotecas y 5' RACE permitió extender la secuencia de p43 en adrenal en 1268 bp, lo que resultó en un marco de lectura de 354 aminoácidos (Figura

```

GGTGGTGAGCTGGACCTGGCGCGCTCCCGCGCTGGGCGGCAGCTTCACGGGGCTCGAGCCCATGGGGCTGATCTG 77
G G E L D L A R A P A L G G S F T G L E P M G L I W 26
A10A
GGCCATGGAGCCCGAACGGCCTCTCTGGCGCCTGGTCAAGCGCGACGTGCAGAAAGCCTTATGTGGTGGAGCTGGAGGT 155
A M E P E R P L W R L V K R D V Q K P Y V V E L E V 52
FR40 V15Q
GCTGGACGGACACGAGCCCGACGGCGGTGAGCGGCTGGCACAGGCAGTGCACGAGCGTCACTTCATGGCTCCAGGGGT 233
L D G H E P D G G Q R L A Q A V H E R H F M A P G V 78
F7R
GCGGCGCGTGCCCGTGCGCGACGGGCGGGTGCGGCCACGCTCTTCTGCCCCAGAACCTGGGCC 299
R R V P V R D G R V R A T L F L P P E P G 99
341-5

```

Figura 23. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del clon de adrenal aislado por 5' RACE. En la secuencia presentada se indica con una flecha la posición del oligonucleótido utilizado en la amplificación. En los rectángulos se incluyen las secuencias homólogas a los péptidos microsecuenciados de p43.

24). Los resultados hasta aquí presentados indican que la máxima extensión de secuencia obtenida hacia el extremo 5' no supera la descripta en los fragmentos aislados por 5' RACE y que tanto los clones analizados en la biblioteca de adrenal como los identificados en riñón finalizan alrededor de una misma región de secuencia.

Los resultados mencionados podrían explicarse teniendo en cuenta algunas características experimentales. La construcción de las diferentes bibliotecas se realizó a partir de oligo dT y la extensión de los insertos clonados en λ es la consecuencia directa de la procesividad de la enzima sobre los diferentes templados. El hecho de que los clones aislados en las bibliotecas analizadas finalicen aproximadamente en la misma región de secuencia sugiere que la enzima se desprende del templado alrededor de esta región o bien que la misma puede liberarse como consecuencia de la existencia de estructuras secundarias muy estables en el ARNm, que hacen topológicamente inaccesible su acceso a la región 5'.

Si bien estas hipótesis explicarían los resultados obtenidos en los rastreos, no explican los obtenidos con la técnica de 5' RACE. Para empezar, los cebadores involucrados en las reacciones de transcripción reversa (368-4) y de amplificación (341-5) se encontraron más próximos al extremo 5' que el oligo dT, con lo cual no debería existir ningún impedimento en alcanzar las regiones adyacentes al extremo 5' del mensajero. Además, las reacciones de transcripción reversa se realizaron a una temperatura superior a la establecida para las técnicas convencionales con la intención de desestabilizar las posibles estructuras secundarias de los mensajeros. Si bien las modificaciones técnicas realizadas nos permitieron extender la caracterización de la región 5' del ARNm de p43, el análisis de todas las secuencias obtenidas a partir de los distintos cebadores y sobre los templados de adrenal y riñón finalizaron nuevamente alrededor de una única región.

155

Teniendo en cuenta los controles realizados en cada uno de los pasos y los resultados obtenidos con esta técnica para el ARNm de p43 podemos sugerir que el cebador AAP complementario a la cola homopolimérica de dC del extremo 5' del ADNc se une a una región interna dentro de la secuencia correspondiente al mensajero de p43 y que esta unión es lo suficientemente estable como para permitir la amplificación de un fragmento, aún cuando se aumenta la temperatura de *annealing* de la reacción de PCR. Esto es consistente con el hecho de que el cebador AAP contiene 16 G/I en su extremo 3' que le permitiría unirse en forma estable a una región rica en G dentro de la secuencia. Esto se correlacionaría con las características de las secuencias descritas en los fragmentos aislados por RACE. En consecuencia, es de esperar que sea cual fuere el GSP1 o GSP2 utilizado en las reacciones de transcripción reversa y amplificación, la región 5' secuenciada sería aproximadamente la misma. Esta hipótesis se correlaciona con los resultados de secuencia obtenidos para los fragmentos aislados en adrenal y riñón con esta técnica.

I-7 Estudios de homologías de secuencia con otras proteínas

La secuencia de aminoácidos deducida hasta aquí para p43 fue incorporada en el *GenBank* con la intención de identificar proteínas homólogas a esta que nos permitieran una caracterización molecular más profunda de p43. El resultado de una exhaustiva búsqueda en diferentes bancos de datos nos permitió identificar la secuencia de una proteína recientemente ingresada en el *GenBank* (08/01/1998) y originalmente aislada de la fracción citosólica del hígado de *Mus musculus*, denominada acil-CoA tioesterasa (mCTE-I, Y14004), que resultó 90% homóloga al polipéptido descrito para p43 y 96,4% homóloga al deducido para el clon D12Ucla1. La secuencia de nucleótidos de la mCTE-I incluía aquellos del clon D12Ucla1. Los resultados de secuencia del clon D12Ucla1 obtenidos por nuestro laboratorio, indicaron que la secuencia de nucleótidos incluídas en el *GenBank* bajo los números de acceso L11811 y L11810 presentaron diferencias respecto de la descrita

por nuestro grupo. Estas observaciones fueron también confirmadas con la caracterización de la mCTE-I. El análisis comparativo de las secuencias de nucleótidos correspondientes a la mCTE-I y el clon D12Ucla1 muestra que el primero contiene una región de 39 bp en su extremo 5' que no parece estar relacionada con la anterior. Además, mCTE-I difiere de L11811 y L11810 en las mismas posiciones de secuencia descritas por nuestro grupo.

La proteína mCTE-I es un polipéptido de 419 aminoácidos que se encuentran codificados en un fragmento de ADNc de 1574 bp que incluye una región 5'UTR de 8 bp seguida de un marco de lectura abierto de 1257 bp y una región 3'UTR de 309 bp (Lindquist *et al.*, 1998).

El análisis de la región 5' de la mCTE-I mostró que la misma incluía otros péptidos de p43 que no habían sido identificados con anterioridad en cualquiera de las secuencias. Cinco de estos péptidos se solaparon entre sí generando la región N-terminal de la molécula de mCTE-I. Estos péptidos, incluían al FG7 (N-terminal), FR54, FR38, FR28 y FR33 cuya secuencia de aminoácidos resultaba 60, 87, 100, 100 y 100% homólogas a las presentes en la mCTE-I (Figura 25). De esta forma, los péptidos microsecuenciados de p43, que no habían sido identificados con anterioridad, conformaban la región N-terminal que precedía al A10A.

Una segunda proteína, rCTE-I, en este caso aislada de la fracción citosólica del hígado de rata (Y09334, 03/02/1998) resultó 94,35% homóloga a p43. La secuencia del ADNc de la rCTE-I incluyó 1591 bp de las cuales 9 bp conforman la 5'UTR, 1257 bp codifican para los 419 aminoácidos que constituyen la proteína y 325 bp forman la 3'UTR, la cual incluye las señales de poliadenilación y el poli(A⁺). Al igual que su homóloga en ratón, la rCTE-I contiene los péptidos FG7, FR54, FR38, FR28 y FR33 pero a diferencia de la primera la homología de los mismos con la secuencia de rCTE-I resultó 60, 95,7, 90, 86,7, 100% respectivamente (Figura 26). Teniendo en cuenta

AGGTCGAGATGGAGGCGACGCTGAACCTTGAGCCCTCGGGCCGAGCTGCTGGGACGAACCGTGAGCATCGCCGTGC	78
M E A T L N L E P S G R S C W D E P L S I A V R	24
FG7 FR54/FR38	
GCGGCTGGCCCGGAGCAGCCCGTCACGCTGCGCTGTCTGCTGCGGACGAGAAGGCGCGCTCTCCGAGCCACG	156
G L A P E Q P V T L R S V L R D E K G A L F R A H A	50
FR28/FR33/A10A	
CGCGCTACCGCGGAGCTCCACGCGAGCTGGACCTGGCGCGACGCCGCGCTGGGCGGACGCTTCTCGGGGCTCG	234
R Y R A D S H G E L D L A R T P A L G G S F S G L E	76
L11811	
AGCCCATGGGCTGCTCTGGGCCATGGAGCCCGATCGGCTTTTGGCGATTGGTCAAGCGCGAGCTGCAGAGCCCT	312
P M G L L W A M E P D R P F W R L V K R D V Q T P F	102
FR40	
TCGTGGTGAGCTGGAGTGCTGGACGGACACGAGCCGACGGCGGCGAGGCTTGACATGCGGTGCACGAGCGTC	390
V V E L E V L D G H E P D G G Q R L A H A V H E R H	128
V15Q	
ACTTCTTGGCTCCGGGGTGGCGCGCTGCCCCGTACGAGAGGGCGGGTGCGGCCACGCTCTTCTGCCCCAGAAC	468
F L A P G V R R V P V R E G R V R A T L F L P P E P	154
F7R	
CTGGACCTTTCTGGGATCATAGACCTTTTGGAGTTGGAGGTGGCTTCTGGAGTATCGGGCGAGCTGCTGGCTG	546
G P F P G I I D L F G V G G G L L E Y R A S L L A G	180
GGAAGGCTTTGCCGTGCTGCTGGCTTATTACAACATGATGACCTCCCCAAGAACATGGAACCATGCACATGG	624
K G F A V M A L A Y Y N Y D D L P K N M E T W H M E	206
FR20	
AGTACTTTGAAGAAGCGTGAACCTACCTGCGCAGCCACCCGAGGTAAAGGACCTGGAATTGGGCTGCTGGGATT	702
Y F E A V N Y L R S H P E V K G P G I G L L G I S	232
FR56 FR11 G11K	
CCAAAGGGGTGAACCTGGCTTGTATGGCTCCTTCTGAAGGGCATCACAGCTGCTGGTTCATCAATGGCTCCG	780
K G G E L G L A M A S F L K G I T A A V V I N G S V	258
TGGCTGTGTTGGGAACACCTCTCTACAGGATGAGACTATACCCCTGTGACTATCTGAGAAATCAGGTCAAAA	858
A A V G N T I S Y K D E T I P P V T I L R N Q V K M	284
TGACCAAGGATGGCTCAAGGATGTTAGATGCTTTGCAAGCCCTCTGGTAGACAAGAAGCTTCATTCCTGGTGG	936
T K D G L K D V V D A L Q S P L V D K K S F I P V E	310
AAAGGTGTGACACGACCTTCTGTCTCTGATGCTGAGGACGACCAACTGGAAGAGCGAGTTCTATGCTGATGAGA	1014
R S D T T F L F L V G Q D D H N W K S E F Y A D E I	336
TCTCCAAACGCTGAGGCGCAGGGAAGGAGAAGCCCGATCATCTGCTACCCAGCAGCAGGGCATTACATCGAGC	1092
S K R L Q A H G K E K P Q I I C Y P A A G H Y I E P	362
L11810	
CCCCCTACTTCCGCTGTGAGCGCTGGCATGCACCTCTGGTGGGTGCCAATCATCCTTTGGAGGGAGGCCAAGC	1170
P Y F P L C S A G M H L L V G A N I T F G G E P K P	388
CTCATGCCATGGCCAGTTGGATGCATGGCAGCAGCTCCAGACTTTCTCCAAACAGTTGGGTAGTGAGTGTTC	1248
H A M A Q L D A W Q Q L Q T F F H K Q L G S E C L H	414
FR64	
ATGTGTCTCTAAATATAACCTATTATATGATGGTTTGGAGGTGGGGAAGGTACAAATACATTGAAGAATATCA	1326
V S P K I *	419
TTTCAGATGACTTCATCTGAACATAAACTGCTTTAGATTACATTTAAAAAATGATATAATTATCAAAATAGTC	1404
TGATTCAGGGCTGGGAATGGAGTTTCATTGTCAAGTCCTTGAAGTGGCATGCAGGATCTGGGTCAATCCAGCTG	1482
CGAGAAATAAGCACGTTCTATGGAACTGGAGCTATCCAGAAAAGTGCCAGGAATAAAAGGAACCATGATTAATA	1560
AAAAAAAAAAAAA	1574

Figura 25. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la acil-CoA tioesterasa citosólica de *Mus musculus* (mCTE-I). En la secuencia se incluyen las regiones 5'UTR y 3'UTR que contiene los sitios de poliadenilación (AATAAA) señalados con un doble subrayado y el poli (A^{*}). El codón de terminación (TAA) se indica con un punto negro. Las secuencias sombreadas en gris coinciden con las descritas por Warden *et al.* (5' L11811 y 3' L11810). En los rectángulos se incluyen las secuencias de aminoácidos homólogas a los péptidos de p43 mostrados en la Tabla I.

CGGCTCGAAATGGAGGCGACTCTGAGCCTGGGGCCCCGCGCGCAGCTGCTGGGATGAGCCGCTGAGCATCACCGTG	78
M E A T L S L G P A G R S C W D E P L S I T V	23
CGCGGCTGGTCCCCGAGCAGCCGTCACGCTGCGCGGGCCCTGCGCGACGAGAAGGGCGGCTCTCCGAGCCCGC	156
R G L V P E Q P V T L R A A L R D E K G A L F R A R	49
GCGCTCTACCGCGCCGATGCCACGGAGAGCTGGACCTGGCGCGCGCGCCGCTCTGGGGGCGAGCTTCACGGGGCTC	234
A L Y R A D A H G E L D L A R A P A L G G S F T G L	75
GAGCCCATGGGGCTGCTCTGGCCATGGAGCCCGAACGGCCTTTCTGGCGCTTGGTCAAGCGCGACGTGCAGACGCC	312
E P M G L L W A M E P E R P F W R L V K R D V Q T P	101
TTCTGGTGGAGCTGGAGGTGCTGGACGGACACAAACCCGACGGCGGGCGGCTGCTGGCGGGGCGGTGCACGAGCGT	390
F V V E L E V L D G H K P D G G R L L A R A V H E R	127
CACTTCATGGCTCCCGGGGTGCGCGGGTGCCCGTGCGGAGGGCAGGGTGCGGCCACGCTCTTCTGCCCCAGAA	468
H F M A P G V R R V P V R E G R V R A T L F L P P E	153
CCTGGGCCCTTTCTGGAATCATAAACCTTTTGGAGTTGGAGGCGGCCTTCTGGAGTACGGGCGAGTCTGCTGGCT	546
P G P F P G I I N L F G V G G G L L E Y R A S L L A	179
GGGAAGGGTTTTGCGTCATGGCTCTGGCTTATTACAACTACGACGACCTCCCCAAGACCATGGAAACCATGCGCATT	624
G K G F A V M A L A Y Y N Y D D L P K T M E T M R I	205
GAGTACTTTGAAGAAGCCGTGAACCTGCGTGGCCACCTGAGGTAAAGGACCAGGAATTGGGCTGCTTGGGATT	702
E Y F E E A V N Y L R G H P E V K G P G I G L L G I	231
TCCAAAGGGGGTGAACCTTGGCCTTCTGCTATGGCCTCCTTCTGAGGGGCATCAGGCTGCTGTTGTCATCAATGGCTCC	780
S K G G E L G L A M A S F L K G I T A A V V I N G S	257
GTGGCTGCTGTTGGGAACCATATGCTACAAGGATGAGACTATACCCCTGTGACTATCCTGAGAAACAGGTCAAA	858
V A A V G N T I C Y K D E T I P P V T I L R N Q V K	283
ATGACCAAGGATGGCCTCAAGGATGTTGTAGATGCTTTGCAAAGCCCTCTGGTAGAACAGAAGAGCTTCATCCCTGTG	936
M T K D G L K D V V D A L Q S P L V E Q K S F I P V	309
GAAAGGTCTGACACGACCTTCTGTTCTCGTTGGTCAGGATGACCACAACTGGAAGAGCGAGTTCTATGCCAATGAG	1014
E R S D T T F L F L V G Q D D H N W K S E F Y A N E	335
ATCTCCAAACGCTTGACAGGCCACGGGAAAGAGAAGCCCCAGATCATTTGCTACCCAGAAGCAGGGCACTATATCGAG	1092
I S K R L Q A H G K E K P Q I I C Y P E A G H Y I E	361
CCTCCTTACTTCCCACTGTGCAGCGCTGGCATGCACCTCCTGGTGGGTGCTAACATCACCTTTGGAGGGGAGCCTAAG	1170
P P Y F P L C S A G M H L L V G A N I T F G G E P K	387
CCTCACTCTGTGGCCAGTTGGATGCATGGCAGCAACTCCAGACTTTCTCCACAAACAGTTGGGTGGTAAGAGTCAT	1248
P H S V A Q L D A W Q Q L Q T F F H K Q L G G K S H	413
GGGGTGTCCCTAAATATAACCTGTTATGTGATGGTTTTGGCAGGAAAAGTACAAATACTTTGTAGGAATATCAGTT	1326
G V S P K I *	419
CAGATTACTTCATCTGAACATATAACCGCTTTTGGTTTACATTTTAAAAATTAATTTTAGTATCAAAATAGTGCTGA	1404
TTCAAAGGCTGGAAATATAGTTTCAAGTTGTAGAGTCTTGAAGTCAAGTTCTGGGTCAATCTCCGTGCTG	1482
TAAGGGAAAAGAGCACATTTTATGGAAGCTGAGCTATTCAAGAAATAGTGCCTAGAATTTAAAGGAACCATGAGTAA	1560
ACACTCTTATGTAACCTAAAAA	1591

Figura 26. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la acil-CoA tioesterasa citosólica de *Rattus norvegicus* (rCTE-I). En la secuencia se incluyen las regiones 5'UTR y 3'UTR que contiene el poli (A⁺). El codón de terminación (TAA) se indica con un punto negro. En los rectángulos se incluyen las secuencias de aminoácidos homólogas a los péptidos de p43 mostrados en la Tabla I.

que p43 fue aislada de la misma especie en la cual se describe la secuencia de la rCTE-I, es de esperar que no existan diferencias entre los péptidos de p43 y la secuencia correspondiente en la rCTE-I. Sin embargo, el análisis de secuencia antes mencionado indica que existen importantes diferencias. Esto nos lleva a especular que rCTE-I es una isoforma molecularmente relacionada a p43.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de las CTE de ratón y rata mostraron que entre sí presentaban una homología del 91,6% y 91,5% respectivamente.

Una tercera proteína, aún mas recientemente incorporada en el *GenBank* (08/02/1998), resultó idéntica a p43. Esta proteína también pertenece a la familia de las acil-CoA tioesterasas pero a diferencia de la anterior, que fue aislada de la fracción citosólica, esta se obtuvo de la fracción mitocondrial del hígado de rata (Svensson *et al.*, 1998). Esta acil-CoA tioesterasa mitocondrial específica de ácidos grasos de cadena larga (C₁₄-C₂₀), denominada rMTE-I (Y09333), es un polipéptido de 453 aminoácidos codificados por 1359 bp incluídas en un fragmento de ADNc de 1711 bp. Este inserto incluye una región 5'UTR de 100 bp y una 3'UTR de 252 bp que no contiene la señal de poliadenilación ni la cola de poli(A⁺) pero que contiene potenciales regiones de unión a proteínas desestabilizadoras de ARNm (Figura 27). Estas regiones, por ej. las denominadas ARE (*A+U-rich elements*), interaccionan con proteínas citosólicas del tipo AUF-1 regulando la estabilidad del transcripto (Malter, 1989).

La traducción del marco de lectura abierto de la rMTE-I genera un polipéptido de masa molecular 49707, el cual resulta de un tamaño mayor que el descrito para la proteína purificada (45kDa). El análisis de la secuencia de aminoácidos con el programa PSORT (Nakai y Kanehisa, 1992) sugirió una localización mitocondrial para esta proteína.

161

Se ha descrito que todas las proteínas mitocondriales presentan una región en su porción N-terminal que constituye el péptido señal. Esta secuencia, que usualmente es de 20-80 residuos, no contiene ningún aminoácido ácido.

En la rMTE-I madura, la región N-terminal de la proteína está bloqueada, en consecuencia la determinación de la región correspondiente al péptido señal se dedujo a partir del análisis de la secuencia de aminoácidos y de las propiedades de esta porción de la molécula. Para ello, se siguieron los criterios descritos para considerar a una secuencia como un péptido señal característico de proteínas, cuya localización subcelular es en la mitocondria (Gavel y von Heijne, 1990; von Heijne, 1994).

En la rMTE-I, el primer residuo ácido (Glu) se describe en la posición 49 del polipéptido. Teniendo en cuenta que la presencia de estos residuos es excluyente en el péptido señal, el mismo debería tener una longitud de entre 20 y 48 residuos. Se ha descrito que la peptidasa que procesa las enzimas mitocondriales lo hace preferentemente cuando el sitio de clivaje incluye una Arg (R) en la posición -2 (Niidome *et al.*, 1994). El análisis de la secuencia N-terminal sugiere que el procesamiento ocurre entre la Thr-42 y la Asn-43. Cuando la secuencia correspondiente a este péptido N-terminal es graficada como una rueda helicoidal, se observa que la misma presenta una estructura anfifílica cargada positivamente con cuatro residuos de Arg y uno de Lys característicos de estas señales de exportación.

Además, el clivaje en esta posición genera una proteína de masa molecular de 45127, siendo este valor muy próximo al descrito experimentalmente.

El análisis anterior sugiere que el péptido señal incluye los primeros 42 residuos de la región N-terminal de la proteína. Esta observación es consistente con el resultado del alineamiento entre la rMTE-I, la rCTE-I y el péptido FG7 de p43 que corresponde a la secuencia N-terminal de esta proteína (Paz *et al.*, 1994). Teniendo en cuenta que el alineamiento se

produce a partir del residuo 43 entre la rMTE-I y el FG7 de p43 y que en la rCTE-I, la Met que inicia a la proteína se alinea con la Thr-42 de la MTE-I y que la región N-terminal de la MTE-I madura es esencialmente la misma que en la CTE-I, queda establecida la región señal para los primeros 42 aminoácidos de la molécula.

Inmediatamente a continuación de esta región se encuentra la porción N-terminal (FG7) de p43 y los péptidos FR54, FR38, FR28 y FR33, todos 100% homólogos (Figura 27). Más aún, la superposición de estos cinco péptidos conforma la secuencia de aminoácidos del extremo 5' anterior al A10A en p43. Por lo tanto la secuencia de p43 podría representarse como se describe en la Figura 28.

El hecho de que p43 resulte idéntica a la rMTE-I y homóloga a la rCTE-I confirma la especulación inicial acerca de la existencia de isoenzimas de p43 y deja establecido que las diferencias de secuencias observadas entre los péptidos de p43 y las correspondientes secuencias de la mCTE-I y del polipéptido codificado por el clon D12Ucla1, no reflejan únicamente cambios evolutivos.

El análisis de secuencias en el *GenBank* reveló que, además de las acil-CoA tioesterasas descritas, la estructura primaria de p43 resultaba 40,1% y 38,2% homóloga a la ácido biliar-CoA aminoácido N-aciltransferasa de humano y ratón (Figura 29) (BAAT, D43964, BAT, EC 2.3.1.65, Falany *et al.*, 1994; Furutani *et al.*, 1995).

I-8 Análisis de la estructura primaria de p43

I-8.1 Identificación de un sitio de serina esterasa en p43

La enzima BAAT, una de las proteínas homólogas a p43, presenta en su sitio activo un residuo de Cys (GXCXG) el cual está involucrado en la formación del intermediario S-éster con el sustrato durante la reacción de

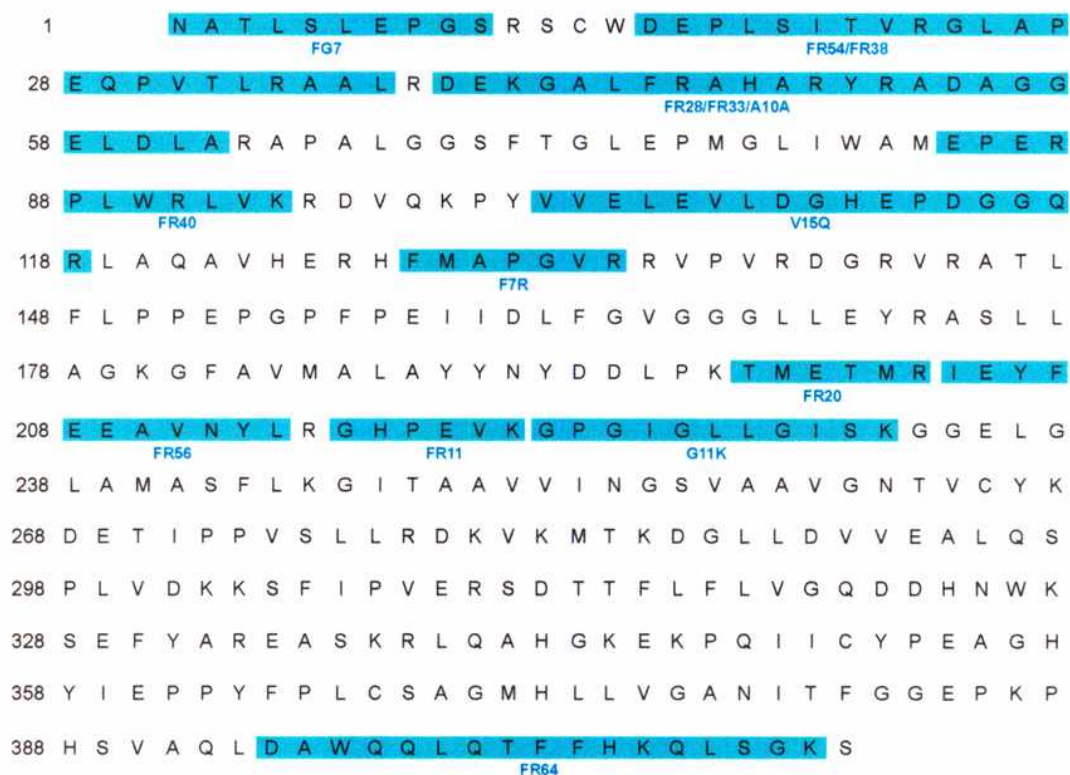


Figura 28. Estructura primaria de p43. Secuencia de aminoácidos de p43. Los péptidos incluidos en la Tabla I se indican dentro de los rectángulos.

mCTE-I	-MEATLNLEPSGRSCWDEPLSIAVRGLAPEQPVTLRSVLR	39
rCTE-I	-MEATLSLGPAGRSCWDEPLSITVRGLVPEQPVTLRAALR	39
p43	-NATLSLEPGSRSCWDEPLSITVRGLAPEQPVTLRAALR	38
rBAAT	-M-AKLT-AVPLSALVDEPVHIRVTGLTPFQVVC LQASLE	37
mCTE-I	DEKGALEFRAHARYRADSHGELDLARTPALGGSFSGLEPMG	79
rCTE-I	DEKGALEFRAHARYRADAHGELDLARA PALGGSF TGLEPMG	79
p43	DEKGALEFRAHARYRADAGGELDLARA PALGGSF TGLEPMG	78
rBAAT	DDKGNLFNSQA FYRA SEVGEVDLERDSS LGGDYMGVHPMG	77
mCTE-I	LLWAMEPDRPFWRVLVKRDV - QTPFVVELEVLDGHEPDGGQ	118
rCTE-I	LLWAMEPDRPFWRVLVKRDV - QTPFVVELEVLDGHEPDGGQR	118
p43	LIWAMEPDRPFLWRVLVKRDV - QKPYVVELEVLDGHEPDGGQ	117
rBAAT	LFWSMKPEKLLTRLVKRDVMNRPHKVHIKLCHPYFPVEGK	117
mCTE-I	RLAHAVH - - - - ERHF LAPGVRRVPVREGRVRATLFLPPEP	154
rCTE-I	LLARAVH - - - - ERHFMAPGVRRVPVREGRVRATLFLPPEP	154
p43	RLAQAVH - - - - ERHFMAPGVRRVPVRDGRVRATLFLPPEP	153
rBAAT	VTSSELDLIL ERWYMAPGVTRTHVKEGRIRGALFLPPEGE	157
mCTE-I	GPFPGLIIDLFGVGGGLLEYRASLLAGKGF AVMALAYNYD	194
rCTE-I	GPFPGLIINLFGVGGGLLEYRASLLAGKGF AVMALAYNYD	194
p43	GPFPGLIIDLFGVGGGLLEYRASLLAGKGF AVMALAYNYD	193
rBAAT	GPFPGLVIDLFGGAGGLFEFRASLLASHGFATLALAYWGYD	197
mCTE-I	DLPKNMETMHMEYFEEAVNYLRSHPEVKGP GIGLLGISKG	234
rCTE-I	DLPKTMETMRLEYFEEAVNYLRGHPEVKGP GIGLLGISKG	234
p43	DLPKTMETMRLEYFEEAVNYLRGHPEVKGP GIGLLGISKG	233
rBAAT	DLPKSRLEKVDLEYFEEGV EFLLRHPKV LGGPGV GILSVCTIG	237
mCTE-I	GELGLAMASFLKGITAAVVINGSVAAVGN TISYKDETIPP	274
rCTE-I	GELGLAMASFLKGITAAVVINGSVAAVGN TICQYKDETIPP	274
p43	GELGLAMASFLKGITAAVVINGSVAAVGN TVCYKDETIPP	273
rBAAT	AEIGLSMAINLKQITATV LINGPNFVSSNPHVYRGKVFQP	277
mCTE-I	VTILRNQVKMTKDGLKDVVDALQSPL - - VDKKSFI PVERS	312
rCTE-I	VTILRNQVKMTKDGLKDVVDALQSPL - - VEQKSFI PVERS	312
p43	VSLLRDKVKMTKDGLLDVVEALQSPL - - VDKKSFI PVERS	311
rBAAT	TPCSEEFVTTNALGLVEFYRTFEETADKDSKYCFPIEKA	316
mCTE-I	DTTFLFLVGQDDHNWKSEFYADEISKRLQAHGKEK PQIIC	352
rCTE-I	DTTFLFLVGQDDHNWKSEFYANEISKRLQAHGKEK PQIIC	352
p43	DTTFLFLVGQDDHNWKSEFYAREISKRLQAHGKEK PQIIC	351
rBAAT	HGHFLFVVGEDDKNLNSKVHAKQATAQLMKSGKKNWTLIS	356
mCTE-I	YPAAGHYIEPPYFPLCSAGMHLLVGANITFGGEPKPHAMA	392
rCTE-I	YPAAGHYIEPPYFPLCSAGMHLLVGANITFGGEPKPHSV A	392
p43	YPAAGHYIEPPYFPLCSAGMHLLVGANITFGGEPKPHSV A	391
rBAAT	YPCAGHLIEPPYSPLCSASRMPFVIPSINWGGEVIPHA A A	396
mCTE-I	QLDAWQQLQTFHKLGLGSECLHVS PKI	419
rCTE-I	QLDAWQQLQTFHKLGLGKSHGVSPKI	419
p43	QLDAWQQLQTFHKLGLSGKS	411
rBAAT	QEHSLKEIQKELKQHLNPGFNSQL	420

Figura 29. Comparación de la secuencia de aminoácidos de p43 con las acil-CoA tioesterasas citosólica de rata (rCTE-I) y ratón (mCTE-I) y la ácido biliar-CoA aminoácido N-aciltransferasa (rBAAT). El alineamiento de la secuencia de la p43 con las rCTE-I, mCTE-I y rBAAT se realizó con el método de *clusters* del *GeneJockeyII* de MacIntoch.

transferencia del acilo (Falany *et al.*, 1994; Furutani *et al.*, 1995). En esta enzima sólo existen tres residuos de Cys conservados evolutivamente. Uno de estos residuos, el involucrado en el sitio activo, coincide con la Ser-231 incluida en el *motif* de serina lipasa (GXSXG, *Prosite sequence motif database*) en la p43 (Figura 30). Esto sugiere que el sitio activo de estas dos enzimas ha sido conservado estructuralmente y modificado funcionalmente durante la evolución. En las lipasas y serina esterases un segundo residuo, en este caso de His, participa en el mecanismo catalítico. En la p43 este residuo sería la His-372 incluida en el *motif* Gly-Xaa-His. Se ha descrito que la actividad hidrolítica de muchas tioesterasas depende de la presencia de esta secuencia consenso en la porción C-terminal (Witkowski *et al.*, 1994; Camp *et al.*, 1994).

De lo anteriormente expuesto podemos sugerir que la diferencia en el aminoácido componente del sitio activo sería responsable de las diferencias en las propiedades catalíticas de las tioesterasas comparadas con las actividades de transferasas de las BAAT.

Se ha descrito que las actividades enzimáticas de las tioesterasas obedecen a una cinética de Michaelis-Menten y que en particular la rMTE-I, idéntica en secuencia a p43, es más activa con sustratos de longitud de cadena entre C₁₄-C₂₀ siendo el araquidonil-CoA (C₂₀) y el palmitoil-CoA (C₁₆) los mejores sustratos (Svensson *et al.*, 1995). Esto se deduce de los parámetros cinéticos de K_m y V_{max} obtenidos utilizando como sustratos ácidos grasos de distinta longitud de cadena. Los valores de K_m para el araquidonil- y palmitoil-CoA son de 2 y 6 µM respectivamente, diez veces menores que los descritos para otros ácidos grasos como el decanoil-CoA (C₁₀). Esta diferencia es aún más evidente con ácidos grasos de longitud de cadena entre C₄-C₈ (Svensson *et al.*, 1995). Además, se ha informado que los sustratos de cadena larga (C₁₄-C₂₀) son convertidos en producto con una velocidad mayor que la descrita para ácidos grasos de longitud de cadena de hasta 10C (Svensson *et al.*, 1995) indicando que los ácidos grasos de

1 N A T L S L E P G S R S C W D E P L S I T V R G L A P
 28 E Q P V T L R A A L R D E K G A L F R A H A R Y R A D A G G
 58 E L D L A R A P A L G G S F T G L E P M G L I W A M E P E R
 88 P L W R L V K R D V Q K P Y V V E L E V L D G H E P D G G Q
 118 R L A Q A V H E R H F M A P G V R R V P V R D G R V R A T L
 148 F L P P E P G P F P E I I D L F G V G G G L L E Y R A S L L
 178 A G K G F A V M A L A Y Y N Y D D L P K T M E T M R I E Y F
 208 E E A V N Y L R G H P E V K G P G I G L L G I S K G G E L G
 238 L A M A S F L K G I T A A V V I N G S V A A V G N T V C Y K
 268 D E T I P P V S L L R D K V K M T K D G L L D V V E A L Q S
 298 P L V D K K S F I P V E R S D T T F L F L V G Q D D H N W K
 328 S E F Y A R E A S K R L Q A H G K E K P Q I I C Y P E A G H
 358 Y I E P P Y F P L C S A G M H L L V G A N I T F G G E P K P
 388 H S V A Q L D A W Q Q L Q T F F H K Q L S G K S

Figura 30. Estudio de los diferentes sitios consenso incluidos en la secuencia de p43.
 Los *motif* correspondientes a los sitios de fosforilación por PKA se encuentran indicados en magenta, los de PKC en amarillo, los de CaMKII subrayados y los de caseína quinasa II dentro de un óvalo. El sitio de unión al ATP se indica en celeste. Los *motif* de serina lipasa y el Gly-Xaa-His involucrados en la actividad de esterasa se indican con un rectángulo.

cadena entre C₁₄-C₂₀ son los mejores sustratos.

También se ha informado, que en general las tioesterasas presentan más de una actividad enzimática y que si bien la rMTE-I no tiene la actividad de carboxilesterasa descrita para las formas citosólicas de la enzima, presenta una actividad de acil-CoA deshidrogenasa específica de ácidos grasos de cadena larga. Si bien aún no ha quedado completamente establecida la función fisiológica de estas enzimas, se ha sugerido que la rMTE-I podría estar involucrada en la regulación de las concentraciones de acil-CoA de cadena larga en la mitocondria en circunstancias en que la tasa de β -oxidación de ácidos grasos sea menor que la tasa de transporte de acil-CoA de cadena larga a la mitocondria. Hasta el momento tampoco se conocen los mecanismos de regulación de la actividad de estas enzimas.

La PLA₂ también es una esterasa, en particular, una esterasa dependiente de Ca²⁺ que hidroliza específicamente la unión éster *sn*-2 del ácido graso de los fosfoglicéridos produciendo el ácido graso libre y un lisofosfolípido. El residuo de Ser-228 que se encuentra formando parte de una secuencia consenso GXXS (GLS²²⁸GS) es necesario para la actividad catalítica de la enzimática. Aunque la PLA₂ es considerada una acil-esterasa, Dennis y Goodenough han demostrado que la PLA₂ pancreática porcina presenta una actividad de tioesterasa cuando se utilizan como sustratos ácidos grasos unidos por enlaces S-éster en la posición *sn*-2 de los fosfoglicéridos (Yu y Dennis, 1991; Bhat *et al.*, 1993). Posteriormente, Nocito *et al.* mostraron que la misma enzima tiene actividad de tioesterasa con sustratos que no son fosfolípidos, catalizando la hidrólisis de la unión tioéster de los acil-CoA derivados (Nocito *et al.*, 1996). Se ha descrito que esta actividad enzimática es específica de ácidos grasos de cadena larga (desde C₁₄).

Experimentos previos habían indicado a p43 como un intermediario obligatorio en la síntesis de esteroides (Paz *et al.*, 1994). El análisis de la estructura primaria de p43 nos permitió identificar un *motif* de serina lipasa

característico de las tioesterasas y homólogo al de las N-aciltransferasas y PLA₂. La importancia funcional de esta secuencia consenso en la actividad esteroidogénica de p43 fue evidente al analizar los resultados de un ensayo de recombinación *in vitro* de fracciones subcelulares. En este experimento se estudió la capacidad esteroidogénica de p43 en presencia de anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopes de la proteína.

Los resultados obtenidos mostraron que la preincubación de una alícuota purificada de p43 con anticuerpos dirigidos contra el *motif* de serina lipasa o la porción N-terminal de la proteína bloqueaban la actividad esteroidogénica de p43 en un ensayo de recombinación *in vitro* (Paz., 1996). Un tercer antisuero dirigido contra un péptido sintético de p43 (anti-F7R), que no incluye ningún *motif* identificable, también inhibió la actividad esteroidogénica de esta proteína, mientras que otros dos anticuerpos (anti-V15Q y anti-A10A) no tuvieron efecto sobre la síntesis de progesterona (Paz, 1996).

Estos resultados sugieren que el sitio consenso de serina lipasa de p43 y por lo tanto una actividad enzimática, la de tioesterasa, estaría involucrada en la acción esteroidogénica de p43.

I-8.2 Identificación de sitios consenso de fosforilación y de unión al ATP en p43

Otra de las características estructurales relevantes de p43 es la presencia de un número importante de sitios consenso de fosforilación reconocidos por diferentes proteínas quinasas. Así en p43 encontramos cuatro de estos *motif* para PKA (R-X₂-T, R-X-S/T) localizados en las Thr-146 y 313 y en las Ser-175 y 336, dos para CaMKII (R-X₂-S/T) en Thr-313 y en Ser-336, cinco para PKC (T-X-R, (R/K₁₋₃,X₂₋₀)-S/T-(X₂₋₀,R/K₁₋₃)) localizados en las Thr-21, 32, 201 y en la Ser-408 y 336 y dos para caseína kinasa II (S/T-(D/E/S(P)₁₋₃,X₂₋₀)) en las posiciones Ser-311 y 328 (Kennelly y Krebs, 1991). Además se identificó

un sitio consenso de unión a nucleótidos en las posiciones 223-228 (GXGXXG) (Wierenga y Hol, 1983) (Figura 30).

La presencia de una variedad de secuencias consenso para fosforilación por diferentes proteínas quinasas se correlacionaría con la hipótesis de la participación de p43 en diferentes sistemas de transducción de señales en los que se produce la activación de distintas quinasas. Sin embargo, si bien la existencia de estos sitios es necesaria para la acción de cualquiera de las mismas, su presencia no necesariamente implica que en condiciones fisiológicas los mismos sean fosforilados.

Paz *et al.* observaron que p43 altamente purificada se presenta como un doblete de bandas cuando se analizaba por SDS-PAGE siendo ésta, una característica de las proteínas que presentan múltiples sitios de fosforilación (Paz *et al.*, 1994). También se demostró que p43 exhibe un cambio ACTH-dependiente en su movilidad electroforética en geles bidimensionales detectandose hasta siete isoformas diferentes (Paz *et al.*, 1994). Por otra parte, el tratamiento con fosfatasa ácida de una alícuota de p43 purificada de adrenales de ratas estimuladas con ACTH resultó en una reducción en el número de isoformas fosforiladas, aunque no en la desaparición completa de los fosfatos (Paz, 1996).

El conjunto de estos experimentos revelaron la existencia de una modificación post-traduccionaI hormono-dependiente sobre p43 y establecían que esa modificación era la incorporación de fosfatos en la proteína. Estas observaciones experimentales se correlacionan con la existencia de múltiples sitios consenso de fosforilación en la estructura primaria de p43.

Otra característica de esta secuencia es la existencia de una región GIGLLG que constituye un *motif* de unión a nucleótidos (Wierenga y Hol, 1983) quedando aún por definir su participación en el mecanismo de acción de

p43.

I-9 Distribución tisular del ARNm de p43

I-9.1 Identificación del transcripto de p43 en tejidos esteroideogénicos

Si bien p43 fue purificada de la zona fasciculata de la corteza adrenal de ratas estimuladas con ACTH demostrándose que esta proteína es un intermediario obligatorio en la síntesis de esteroides en la glándula adrenal (Paz *et al.*, 1994), se había sugerido que p43 podría cumplir esta función en todos los tejidos esteroideogénicos, razón por la que se procedió a estudiar su presencia en dichos tejidos.

A tal fin, se procedió a la separación de cada uno de los tejidos y a la extracción del ARN total correspondiente según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

La identificación del ARNm de p43 en estos tejidos se realizó por la combinación de las técnicas de Northern blot para zona fasciculata y glomerulosa de corteza adrenal, cerebro, ovario y células de Leydig, mientras que para detectar el transcripto en placenta y en cerebro se utilizó RT-PCR.

Se disecó la corteza de la glándula adrenal de rata obteniéndose preparaciones de ARN total correspondientes a zona glomerulosa y fasciculata en forma independiente. Por otro lado, se obtuvieron también preparaciones de ARN total de cerebro de una rata adulta y los ovarios de ratas pseudopreñadas (Dufau *et al.*, 1975). La preparación de ácido nucleico de células de Leydig se realizó a partir de una línea tumoral de ratón denominadas MA-10. Iguales cantidades de cada una de las preparaciones de ARN fueron analizadas en un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes y transferidas a una membrana de nylon donde fueron hibridizadas con una sonda de 692 bp correspondiente al producto de

amplificación por PCR con las sondas 60/oligo5RC sobre el templado aislado por RT-PCR de adrenal. El procedimiento experimental seguido se describe en la sección II-4 de Materiales y Métodos.

El resultado obtenido se resume en los paneles A y C de la Figura 31. En el primer panel se observa que tanto en el ovario como en las células de Leydig se detectan dos transcritos relacionados con p43 (1,8 y 2,6 kb) mientras que en la corteza adrenal y el cerebro (Panel C) sólo se encuentra un único transcrito de 2,6 kb.

La existencia de uno o dos transcritos en los distintos tejidos estudiados podría explicarse por varias hipótesis alternativas. Por un lado, se podría suponer la existencia de un gen para p43 que esté precedido por dos regiones promotoras, cada una de las cuales tendría sus propios elementos regulatorios tejido-específicos. Esto daría lugar a distintos transcritos en los diferentes tejidos, diferenciándose en su extremo 5'. De hecho, esta región 5' podría también incluir señales de *splicing* y regiones codificantes que darían origen a dos polipéptidos con diferentes regiones N-terminal (Figura 32A) (Nabeshima *et al.*, 1984). Esta es precisamente la situación descrita para el genoma de pollo que genera dos cadenas livianas diferentes para la miosina a partir de un único gen. La estructura de este gen incluye dos promotores que se encuentran separados entre sí por 10 kb y que generan dos pre-ARNm que por *splicing* dan dos ARNm maduros que difieren en su extremo 5'.

Una explicación alternativa, podría estar relacionada con el sitio en el cual el transcrito es poliadenilado en uno u otro tejido. Este tipo de observaciones ya se habían descrito para el gen de la calcitonina de rata el cual está poliadenilado en un sitio en las células de la glándula tiroidea y en otro sitio en el cerebro (Amara, 1982). De esta forma, los dos transcritos tendrían diferente *splicing* alternativo. El resultado final sería la existencia de dos ARNm con una región 5' idéntica pero que difieren en sus exones en el

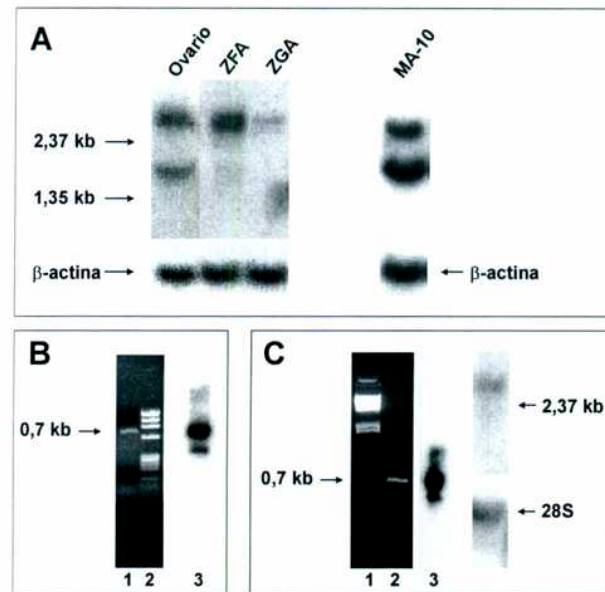


Figura 31. Distribución tisular del ARNm de p43 en los tejidos esteroidogénicos. A. Una alícuota de 24 μ g de ARN total extraídos de cada una de las preparaciones de ovarios de ratas pseudopreñadas, zonas fasciculata y glomerulosa de la corteza adrenal y de una línea celular (MA-10) de un tumor de células de Leydig, fueron analizados en geles de agarosa/formaldehído, transferidos a membranas de nylon e hibridizados con la sonda de 692 bp de adrenal o β -actina como controles siguiendo el procedimiento experimental descrito en la sección II-4.2. **B.** RT-PCR de una preparación de ARN total de placenta humana. ARN total extraído de este tejido (1 μ g) fue utilizado como templado en una reacción de transcripción reversa con oligo dT como cebador. El procedimiento seguido es el descrito en la sección II-4.3 y la amplificación se realizó con los cebadores 60/oligo5RC. En la calle 1 se muestra el producto de amplificación obtenido y en la calle 2 se sembraron marcadores de ADN ϕ X174/HaeIII. En la calle 3 se muestra la autoradiografía correspondiente al mismo gel cuando la membrana se hibridizó con la sonda de 692 bp de adrenal. **C.** RT-PCR de una preparación de ARN total de cerebro de rata. El procedimiento seguido fue esencialmente igual al anterior y la transcripción reversa y la amplificación se hicieron con los mismos cebadores. En la calle 1 se muestran los marcadores ϕ X174/HaeIII y en la calle 2 el producto de amplificación obtenido. En la calle 3 se muestra la autoradiografía correspondiente al Southern blot del mismo gel hibridizado con la sonda de 692 bp de adrenal. A la derecha se muestra el resultado del Northern blot cuando se analizaron 24 μ g de ARN total de cerebro de rata con la sonda de 692 bp de adrenal o la 28S como control.

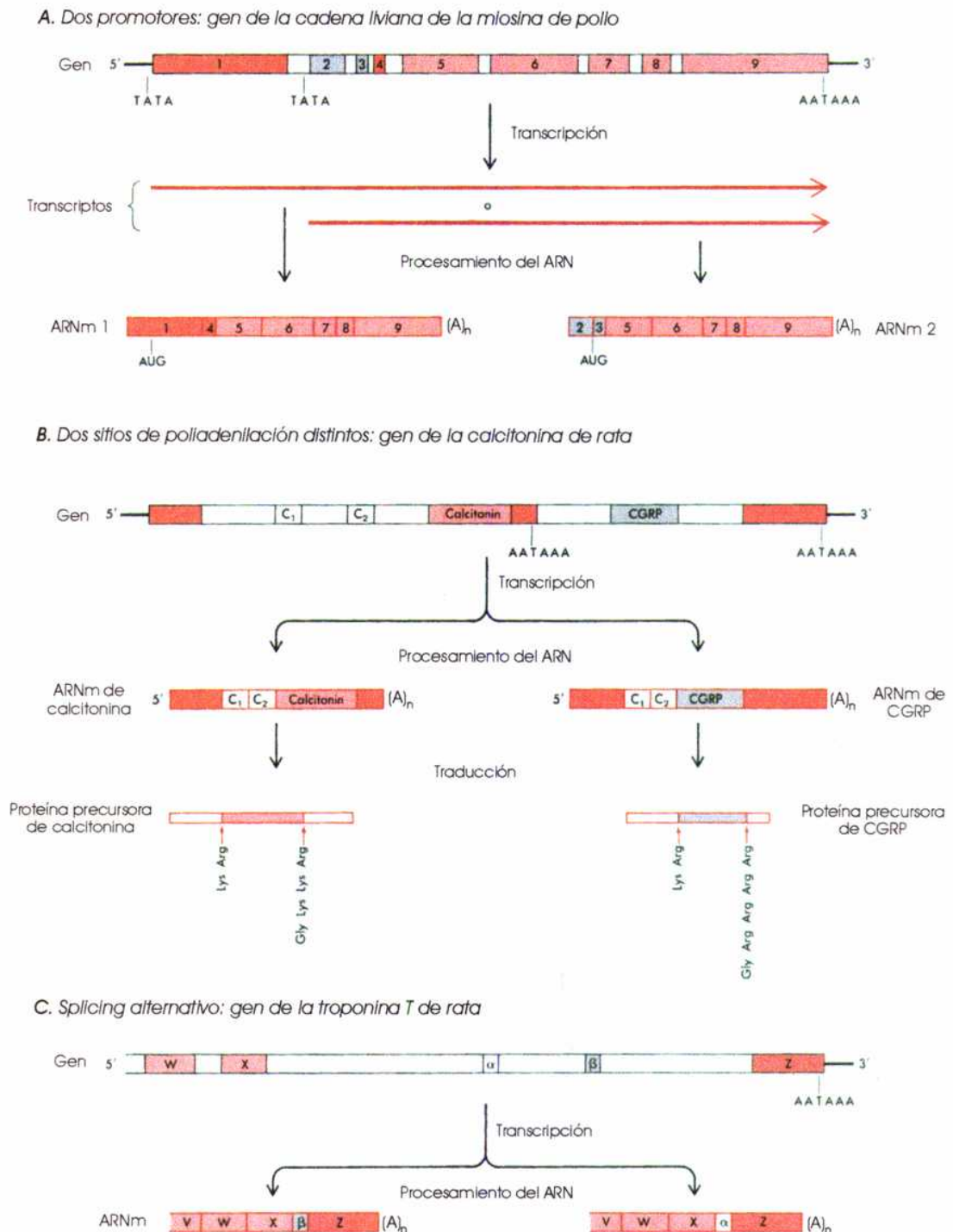


Figura 32. Diferentes estrategias que dan origen a más de un transcripto.

extremo 3'. Por lo tanto, se producirían polipéptidos diferentes en los dos tipos celulares (Figura 32B).

Una tercera posibilidad se presenta cuando tanto las regiones 5' (sitio promotor) como la 3' (sitio de poliadenilación) son idénticas en el pre-ARNm de los diferentes tejidos, pero alternativamente el *splicing* da origen a dos mensajeros maduros diferentes (por ej. para el gen de la troponina T) (Breitbart *et al.*, 1985). El procesamiento del ARNm tejido-específico podría reflejar cambios fundamentales en la maquinaria de *splicing* en diferentes tipos celulares (Figura 32C).

Finalmente, la existencia de dos transcritos relacionados entre sí puede ser la consecuencia de la expresión de genes diferentes que tuvieron un origen evolutivo común. Estos genes contendrían una región regulatoria a la cual se unirían factores de transcripción tejido-específicos y/o hormonalmente activados que llevaría a la transcripción de uno o ambos genes según el caso. El resultado obtenido serían uno o más polipéptidos cuyas estructuras primarias serían homólogas entre sí.

Los estudios de Northern blot realizados y resumidos en la Figura 31 indican que p43 se presenta como uno o dos transcritos alternativamente y que esta expresión es tejido-específica. Resta por determinar el mecanismo por el cuál la transcripción del gen de p43 genera más de un transcrito.

La comparación de las secuencias correspondientes a las regiones 5' y 3' UTR del ADNc de la rCTE-I y rMTE-I muestra marcadas diferencias entre ambas (Figuras 26 y 27) lo cual necesariamente implica que estas enzimas resultan de la expresión de genes distintos. Sin embargo, no se puede descartar la existencia de otras isoenzimas relacionadas a las tioesterasas que resulten de la expresión de genes a través de cualquiera de los otros mecanismos mencionados.

Se ha informado que la expresión de los genes de las rMTE-I y rCTE-I está

regulada por agentes proliferadores de peroxisomas (clofibrato) y por factores nutricionales (Lindquist *et al.*, 1998; Svensson *et al.*, 1998) sugiriéndose que la transcripción de estos puede estar regulada por receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), como es el caso de muchos otros genes que codifican para enzimas inducidas por estos proliferadores (Muerhoff *et al.*, 1992; Tugwood *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1992). Esta regulación transcripcional está mediada por la unión del heterodímero activado PPAR/RXR (*Retinoid X Receptor*) a los elementos respondedores de peroxisomas en las regiones 5' de los genes. Los distintos subtipos de PPAR (α , δ , γ) tienen expresión tejido-específica, lo cual explicaría la diferente expresión de las rMTE-I y rCTE-I.

Estudios por Northern blot realizados por Svensson *et al.* y Lindquist *et al.* sobre la distribución tisular de las rMTE-I y rCTE-I, no revelan niveles detectables de los transcritos correspondientes a estas enzimas en los únicos dos tejidos esteroideogénicos analizados que son el cerebro y el testículo (Svensson *et al.*, 1998; Lindquist *et al.*, 1998). Sin embargo, nuestros resultados indican que tanto p43 (rMTE-I) como rCTE-I se expresan diferencialmente en esos tejidos esteroideogénicos. La discrepancia en estos resultados puede explicarse teniendo en cuenta que los estudios sobre rMTE-I y rCTE-I no se realizaron con células de Leydig purificadas. Este tipo celular sólo representa un 10% de las células intersticiales del testículo y el análisis por Northern blot de una preparación de ARN total de testículo no presentó ninguna señal aún cuando el mismo fue sobreexpuesto (dato no mostrado) sugiriendo que la expresión de la enzima está restringida a un tipo particular de células en este tejido. El análisis por Northern blot de una preparación de ARN total de cerebro mostró la presencia de p43 sólo cuando la membrana fue sobreexpuesta, sugiriendo que la contribución del ARNm de esta proteína en el ARN total es muy baja, probablemente debido a que la expresión de la misma está restringida a algún núcleo en particular.

La identificación de p43 en placenta humana se realizó siguiendo también el

procedimiento descrito en Materiales y Métodos. En este caso la reacción de RT-PCR se llevó a cabo a partir de una preparación de ARNm y por transcripción reversa utilizando oligo dT como cebador. La amplificación se realizó en presencia de los cebadores 60/oligo5RC de p43. El mismo procedimiento fue realizado para una preparación de ARNm de cerebro de rata.

Una alícuota de cada uno de los productos de amplificación fue analizada en geles de agarosa. El resultado obtenido se muestra en los paneles B y C de la Figura 31. En cualquiera de los casos, puede observarse un producto de amplificación de aproximadamente 700 bp que es reconocido por una sonda específica de p43 en un Southern blot (calle 3 de los paneles B y C) y que corresponde al fragmento de amplificación esperado para esta combinación de cebadores.

Si bien no se detectó ningún otro producto de amplificación en geles de agarosa (calles 1 del Panel B y 2 del Panel C), la sonda de p43 reveló también un segundo fragmento de aproximadamente 500 bp. Es probable que este fragmento resulte del *splicing* alternativo del pre-ARNm de p43 o del correspondiente a alguna de las isoenzimas relacionadas.

El producto de 700 bp del RT-PCR de placenta humana fue clonado y secuenciado utilizando los cebadores involucrados en la amplificación y otros internos que se diseñaron posteriormente. La lectura completa de la secuencia mostró la existencia de un marco de lectura abierto de 692 bp. La estructura primaria deducida resultó 74,4% homóloga a la de p43 e incluyó a varios de los péptidos microsecuenciados de esta proteína (FR20, FR56, FR11, G11K, FR64). Al igual que lo descrito para el clon D12Ucla1, la secuencia de los péptidos de p43 es homóloga pero no idéntica a la misma secuencia en el fragmento de placenta. En particular, la secuencia del péptido G11K es 91% homóloga a la descrita en rata y el sitio consenso de serina lipasa se encuentra conservado (Figura 33).

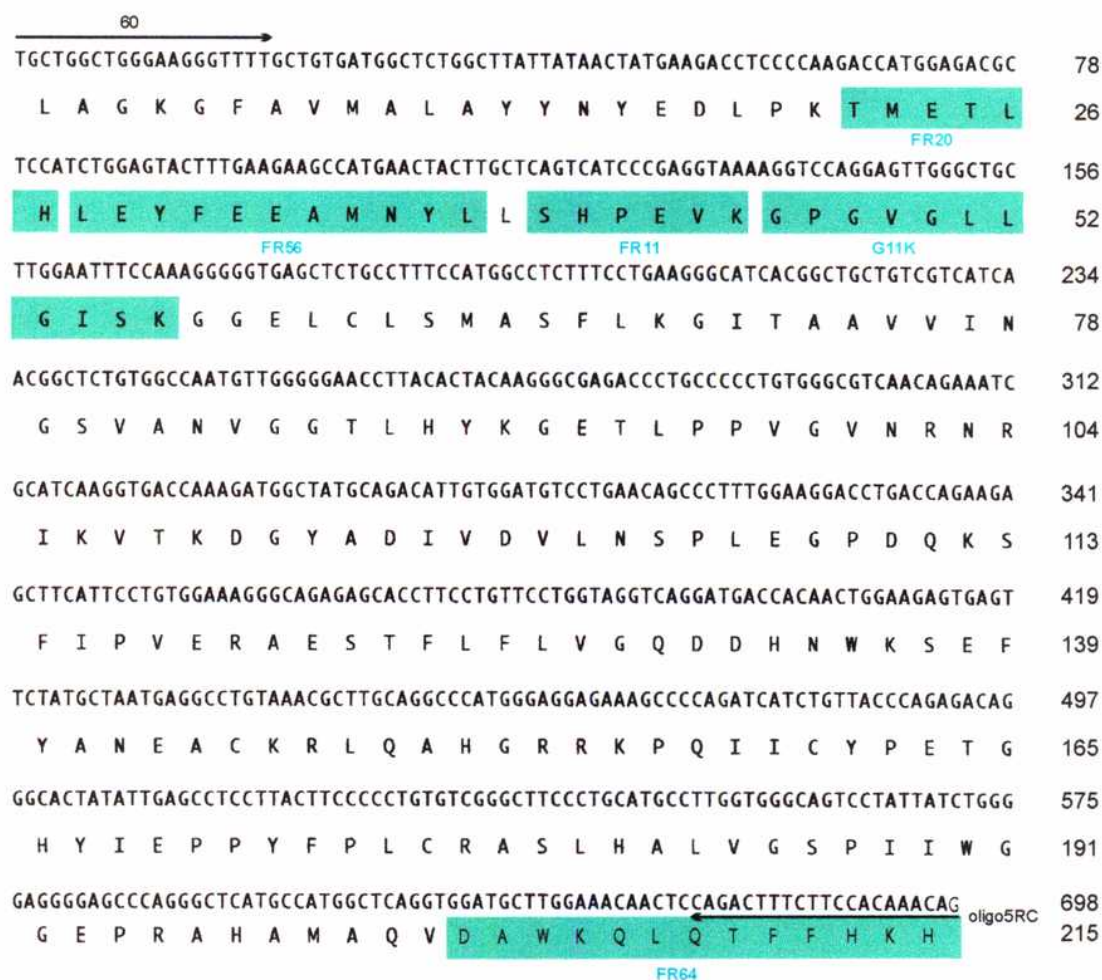


Figura 33. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del fragmento de ADNc aislado de placenta humana. En la secuencia se indican subrayadas las posiciones de los cebadores utilizados en la amplificación. Los rectángulos indican las secuencias homólogas a los péptidos microsecuenciados de p43 presentados en la Tabla I.

Por otra parte, el estudio comparativo de la secuencia de placenta con el de otras proteínas descritas en el *GenBank* mostró que la primera resulta idéntica al clon L40401. Este clon es un fragmento de ADNc de 1143 bp que codifica para un polipéptido de 311 aminoácidos que corresponde a una porción de la proteína hipotética ZAP128 aislada de cerebro humano y cuya función no ha sido aún establecida.

La comparación de las secuencias entre ZAP128 y p43 de adrenal mostró una divergencia marcada en el extremo 5' de ambas proteínas (Figura 34) sugiriendo que ZAP128 podría ser un producto de *splicing* alternativo tejido-específico de p43.

I-9.2 Identificación del transcripto de p43 en tejidos no esteroideogénicos

Teniendo en cuenta que otros clones como D12Ucla1, E312, B1311 y C7121 están relacionados con p43 y fueron originalmente aislados de bibliotecas de riñón e hígado, estudiamos la posibilidad de que la expresión de esta proteína no esté restringida únicamente a aquellos tejidos esteroideogénicos sino que su distribución sea ubicua.

Con este objetivo, analizamos por Northern blot diferentes muestras de ARN total de tejidos como corazón, riñón, hígado y bazo de rata. El resultado obtenido muestra que tanto riñón como corazón presentan dos transcriptos de 1,8 y 2,6 kb mientras que en bazo e hígado sólo se identificó el transcripto de 2,6 kb. Más aún, mientras el transcripto de 1,8 kb está expresado en mayor proporción en riñón, el de 2,6 Kb es el predominante en corazón (Figura 35).

Warden *et al.* demostraron la existencia de dos especies de ARNm para el clon D12Ucla1 (2,5 y 3,3 kb) en ambos tejidos de *Mus musculus* (Warden *et al.*, 1993). Se ha descrito que tanto la mMTE-I como la mCTE-I presentan el mismo tamaño de transcripto que su homóloga en rata y que únicamente la

ZAP128	P	RAAGIPEFKMASSPAV.....LRASRLYQWSLKSSA.....	32
p43	-	NATLSLEPGSRSCWDEPLSITVRGLAPEQPVTLRAALRDEKGALEFRAHARYRADAGGELDLARAPALGGSFTGLEPMGLIWAMEPERPLWRLVKRDVQKP	100
ZAP128		QFLGSP.....QLRQNL.....GPELGLWTCSTGGGLLEYRASLLAGKGFAYMALAYNYE	92
p43		YVVELEVLDGHEPDGGQRLAQAVHERHEMAPGVRRVPVRDGRVRATFLPPEPGPEPEIIDLFQVGGGLLEYRASLLAGKGFAYMALAYNYDDLPKTMET	201
ZAP128		LHLEYFEEAMNYLLSHPEVKGGVGLLGISKGGELCLSHASFLKGITAAVINGSVANVGGTLHYKGETLPPVGVNRNRKVKTKDGYADIVDVINSPLPDQ	195
p43		MRIEYFEEAVNYLRGHPEVKGGVGLLGISKGGELGLAMASFLKGITAAVINGSVAAVGNVTCYKDETIIPPVSLLRDKVKMTKDLLDVVEALQSPLEVDK	302
ZAP128		KSFIPVERAESTFLFLVGQDDHNWKSEFYANEACKRLQAHGRRKPQIICYPETGHYIEPPYFPLCRASLHALVGSPIIWGGEPRAHAMAQVDANKQLQTFE	296
p43		KSFIPVERSOTTFLLFLVGQDDHNWKSEFYAREASKRLQAHGKKEKPQIICYPEAGHYIEPPYFPLCSAGMHLLVGANITFGGEPKPHSVAQLDANKQLQTFE	403
ZAP128		HKHLEGGHEGTIPSKV	311
p43		HKQLSG.....KS	411

Figura 34. Comparación de la secuencias de aminoácidos entre p43 y la proteína hipotética ZAP128. Las regiones sombreadas indican los sitios conservados en ambas secuencias. El *motif* de serina lipasa se encuentra incluido en un rectángulo.

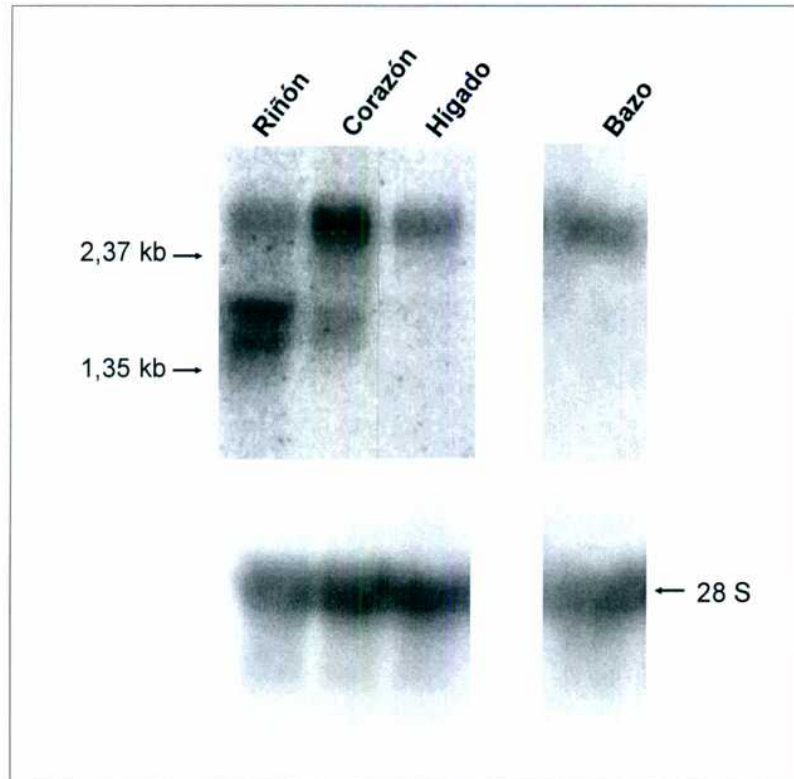


Figura 35. Distribución tisular del ARNm de p43 en tejidos no esteroideogénicos. Una alícuota de 24 μ g de ARN total extraído de homogenatos de tejidos de corazón, riñón, hígado y bazo fueron analizados en geles desnaturalizantes de agarosa según el procedimiento descrito en la sección II-4.2. Las preparaciones de ARN fueron transferidas a una membrana de nylon e hibridizada con la sonda de 692 bp de adrenal o con 28S como control.

sobreexposición de la membrana lleva a la aparición del transcripto de 3,5 kb (Lindquist *et al.*, 1998) el cual posiblemente corresponda a una acil-CoA tioesterasa estructuralmente relacionada a las descritas.

Los resultados de nuestro laboratorio indican que en el hígado, los niveles de ARNm de p43 son muy bajos y que el transcripto de la rCTE-I no es detectable en condiciones normales. Si bien se ha descrito que los niveles de expresión de la rMTE-I y la rCTE-I están transitoriamente aumentados luego del tratamiento crónico con proliferadores de peroxisomas (Svensson *et al.*, 1998; Lindquist *et al.*, 1998), nuestros resultados indicarían que, en las condiciones experimentales estudiadas, posiblemente exista alguna hormona o factor nutricional que actúa sobre la represión del gen (Lindquist *et al.*, 1998).

Teniendo en cuenta de que p43 es una acil-CoA tioesterasa y que los miembros de esta familia presentan en general más de una actividad enzimática, podemos especular acerca de la posibilidad de que p43 actúe con una u otra de estas actividades catalíticas de manera tejido-específica. Más aún, podemos sugerir que la regulación de estas actividades enzimáticas serían la consecuencia de la acción de diferentes proteínas quinasas sobre p43.

De hecho, estudios realizados en el laboratorio nos permitieron demostrar que p43 tiene una regulación hormono-dependiente en el hígado y que el número de isoformas fosforiladas de p43 en este tejido es distinto al descrito en adrenal (Finkielstein *et al.*, 1996).

Posteriormente también se detectó el ARNm de p43 en dos líneas celulares de linfocitos denominadas Ti6 y DO11.1. En este caso, preparaciones de ARN total de Ti6 y DO11.1 fueron analizadas por RT-PCR siguiendo el mismo procedimiento experimental que el descrito en placenta, identificándose un único producto de amplificación específico que fue

reconocido por la sonda de p43 en un Southern blot (Figura 36A y 36B).

Estos resultados no sólo muestran la distribución ubicua de la proteína, sino que advierten sobre su función como intermediaria en múltiples procesos celulares.

I-9.3 *Hibridación in situ del ARNm de p43*

A continuación se decidió estudiar los tipos celulares que expresan el ARNm de p43. Para tal fin, se desarrollaron experimentos de hibridación *in situ* sobre cortes de diferentes tejidos tales como glándula adrenal, corazón, riñón, testículo y glándula pituitaria. El estudio fue realizado utilizando un oligonucleótido complementario a una secuencia específica del ARNm de p43 y empleándose como controles negativos los oligonucleótidos correspondientes con la secuencia directa y aquellos con una secuencia aleatoria de igual composición de bases. El procedimiento experimental seguido se describe en la sección II-7 de Materiales y Métodos y las señales de hibridación positiva detectadas en un tejido se correlacionan con la expresión del ARNm de p43.

Como puede observarse en la Figura 37 la distribución de la señal de hibridación en la glándula adrenal está limitada a la región periférica correspondiente a la corteza, que incluye a células de las zonas glomerulosa y fasciculata-reticularis pero no se detecta en la médula. El mismo tipo de distribución heterogénea se aprecia tanto en el testículo como en el riñón, donde se detecta un aumento de la marca en la región comprendida entre la corteza y la médula. Los cortes de corazón y glándula pituitaria muestran una distribución homogénea de la marca sugiriendo que la expresión del transcripto no estaría restringida a un tipo celular particular. Los resultados obtenidos se correlacionan con los descritos en los estudios de Northern blot.

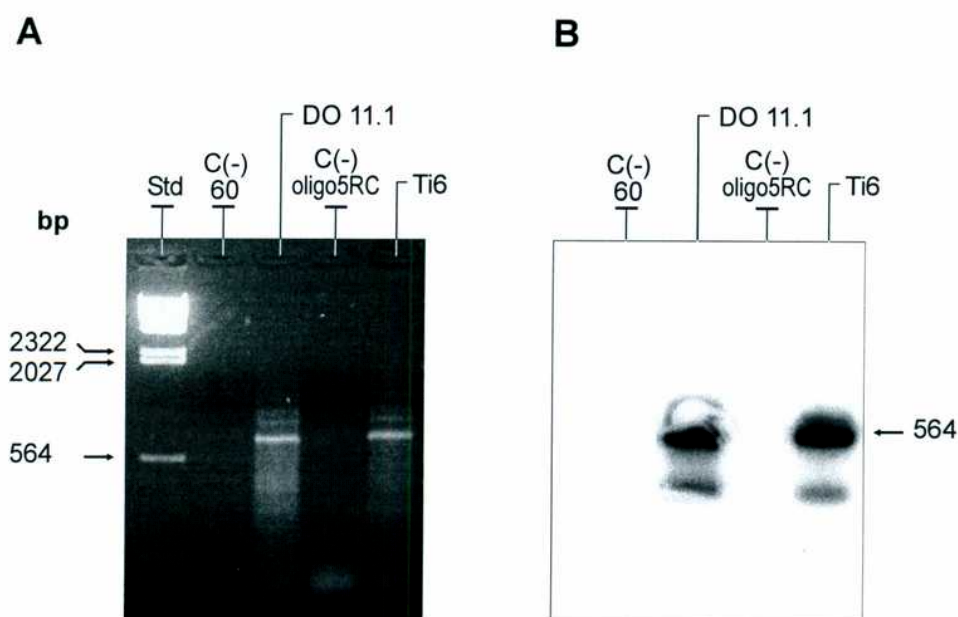


Figura 36. RT-PCR sobre una preparación de ARN total de dos líneas celulares de linfocitos (Ti6 y DO11.1). A. ARN total (1 μ g) extraído de 1×10^6 células de cada una de las líneas analizadas fueron utilizados como templado en una reacción de transcripción reversa con oligo dT como cebador. El procedimiento seguido es el descrito en la sección II-4.3 y la amplificación se realizó con los cebadores 60/oligo5RC. En la calle 1 se sembraron marcadores de ADN λ DNA/HindIII., en las calles 3 y 5 se analizaron los productos de amplificación obtenidos con las líneas DO 11.1 y Ti6 respectivamente. Las calles 2 y 4 corresponden a los controles negativos con cada uno de los cebadores sobre una mezcla de ambos templados. B. Autoradiografía correspondiente al mismo gel cuando la membrana se hibridizó con la sonda de 692 bp de adrenal.

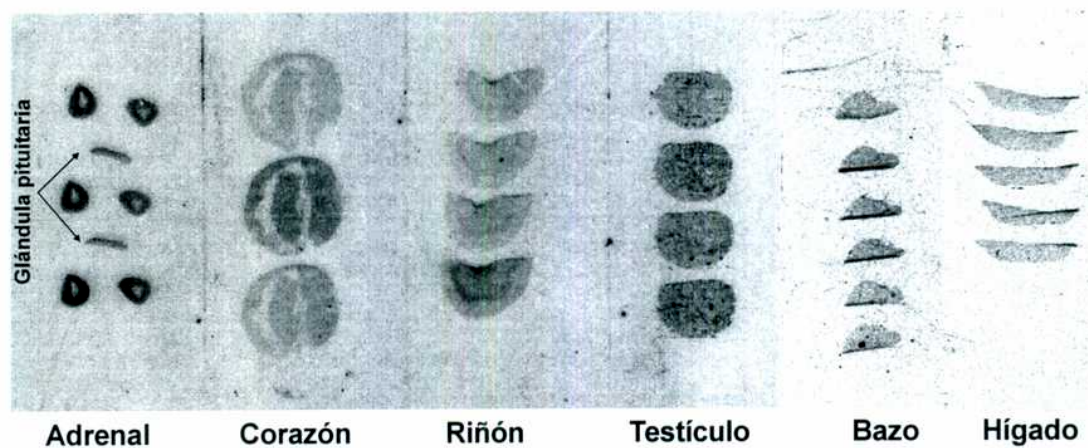


Figura 37. Hibridación *in situ*. Autorradiografía de los cortes de los diferentes tejidos de adrenal, corazón, riñón, testículo y glándula pituitaria hibridizados con un oligonucleótido *antisense* específico de p43. El procedimiento seguido se describe en la sección II-7 de Materiales y Métodos. Los portaobjetos con los tejidos fijados e hibridizados se expusieron con un film X-OMAT AR por 15 días. Los controles con los oligonucleótidos de secuencia directa y aleatoria no mostraron hibridación (datos no mostrados).

I-10 *Análisis genómico de p43*

En paralelo se han realizado estudios de p43 a nivel genómico. Para tal fin, se procedió a la extracción del ADN genómico de adrenales de rata y humano siguiendo el procedimiento descrito en **Materiales y Métodos** (sección II-5). Una alícuota del material extraído se amplificó por PCR utilizando cebadores específicos de p43 (60/oligo5RC). El producto obtenido se resolvió en geles de agarosa y se analizó por Southern blot utilizando una sonda de ADNc de p43 de 692 bp (Figura 39). En la misma se puede observar que la sonda reconoce específicamente tres fragmentos amplificados lo que sugiere la existencia de más de un gen para p43. Sin embargo, no puede descartarse la presencia de pseudogenes y sólo la secuenciación de los fragmentos amplificados confirmaría el resultado obtenido.

La presencia de más de un gen para p43 se correlaciona con la hipótesis planteada en la sección I-9 del presente capítulo sobre la expresión de genes diferentes como causa de la presencia de más de un transcripto para p43 en los distintos tejidos. Aunque no se pueden descartar otras hipótesis que expliquen los resultados anteriores, la existencia de más de un gen nos permite especular sobre los diferentes factores de transcripción que pueden estar actuando sobre una u otra región regulatoria haciendo temporal y espacialmente específica la expresión de cada uno de los mismos.

Sólo el aislamiento y secuenciación del gen de p43 nos permitirá determinar cual(es) son el/los factor(es) involucrados en la regulación de la expresión del mismo.

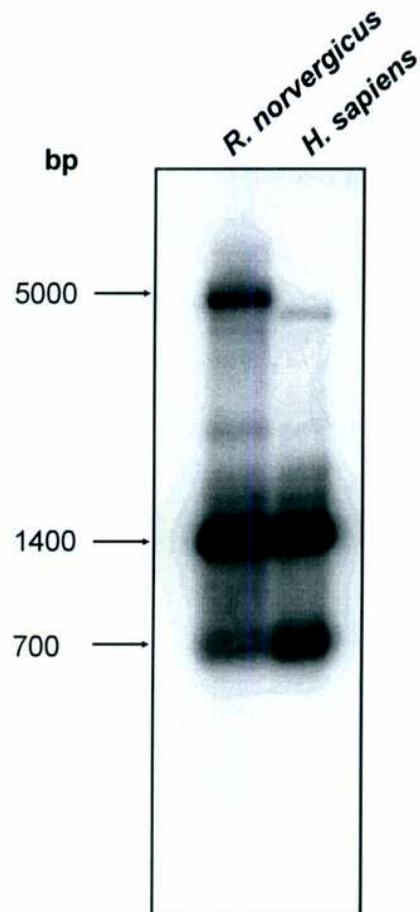


Figura 38. Southern blot de ADN genómico de rata y humano. Una alícuota de preparaciones de ADN genómico de rata y humano fueron utilizadas en reacciones de amplificación por PCR con cebadores específicos de p43. Los productos de amplificación obtenidos fueron analizados en un gel de agarosa 2% y transferidos a una membrana de nylon donde fueron hibridizados con una sonda de 692 bp de p43. El procedimiento experimental se describe en la sección II-5.1.1 de Materiales y Métodos.

II Regulación de los niveles de ARNm de p43 en la fase aguda de la esteroidogénesis

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que p43 es un componente obligatorio en la síntesis de esteroides. En tal sentido, decidimos estudiar el efecto que sobre los niveles de mensajero de p43 tiene el estímulo con una hormona trófica.

En los estudios realizados sobre la regulación de la expresión del gen de p43 por ACTH en la zona fasciculata de la corteza adrenal, se procedió a correlacionar los niveles de ARNm de p43 obtenidos en diferentes condiciones experimentales con las correspondientes medidas de corticosterona circulantes.

II-1 Efecto de la dexametasona sobre los niveles de ARNm de p43

Inicialmente, un grupo de ratas fueron inyectadas con diferentes dosis de dexametasona (Dx), glucocorticosterona, luego fueron sacrificadas y extraídas las glándulas adrenales a partir de las cuales se obtuvo una preparación de ARN total de zona fasciculata siguiendo el procedimiento descrito en la sección II-4 de Materiales y Métodos. De cada uno de los animales se obtuvieron muestras de plasma a partir de los cuales se determinaron los niveles de corticosterona circulante (sección II-9).

Las distintas preparaciones de ARN total correspondientes a cada una de las diferentes dosis de Dx fueron analizadas por Northern blot. El resultado obtenido muestra que existe una disminución en los niveles de mensajeros de p43 de manera dosis dependiente de Dx (Figura 39). Esta disminución resulta hasta un 70% menor respecto de los valores normales para dosis entre 2,5 y 5 mg/Kg mientras que los niveles de corticosterona plasmática permanecen dentro de los valores basales.

Sin embargo, quedaba por determinar si el efecto observado era la

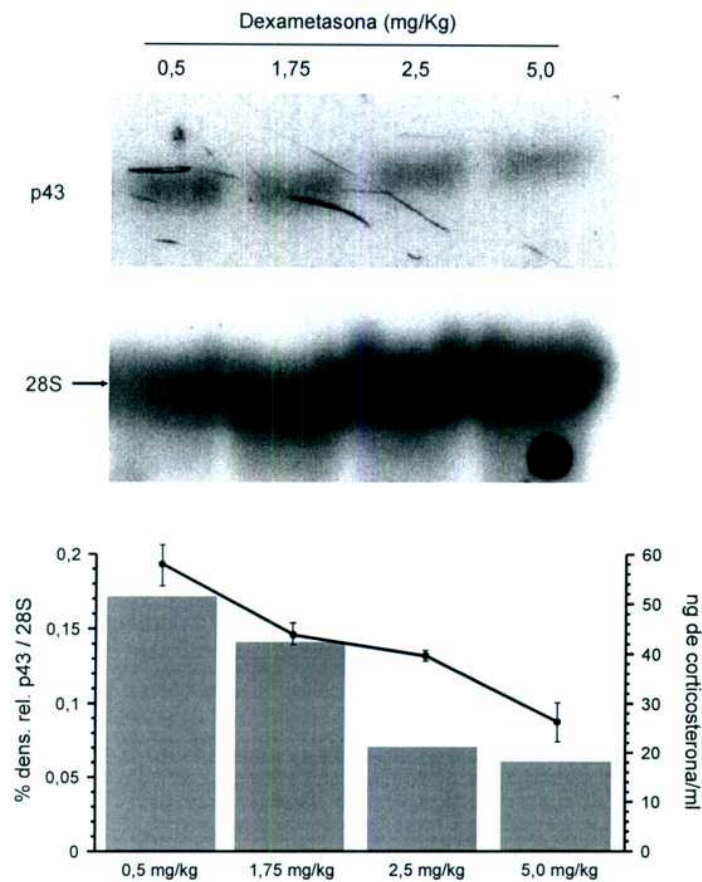


Figura 39. Efecto de la dexametasona sobre los niveles de ARNm de p43. Distintos grupos de ratas fueron inyectadas s.c. con cada una de las dosis de dexametasona (Dx) indicadas en la figura. Los animales fueron sacrificados 5h después de la inyección y extraídas las glándulas adrenales como se describe en Materiales y Métodos. Una alícuota de ARN total (24 μ g) de la zona fasciculata de la corteza adrenal de cada uno de los diferentes tratamientos fue analizada por Northern blot. La membrana se hibridizó con una sonda de 692 bp de adrenal o 28S como control y luego se expuso 48h a -70°C con una película X-OMAT AR. La autoradiografía obtenida se muestra en los paneles superior (sonda 692 bp) e intermedio (sonda 28S). Los niveles de ARNm fueron cuantificados por densitometría óptica de cada una de las autoradiografías y relativizados a los de 28S ribosomal. Los niveles de corticosterona en plasma fueron determinados por radioinmunoensayo (sección II-9). Los valores se expresan como la media $\pm$ SD, $n=3$ excepto para el ARN, en los cuales las muestras de ARN correspondientes a cada tratamiento fueron reunidas antes del análisis.

consecuencia directa de la regulación negativa de este glucocorticoide sobre el eje hipotalámico-hipofisario, lo cual conduce a la disminución en los niveles circulantes de ACTH o si se trataba de un efecto genómico de la Dx sobre la expresión del gen de p43.

II-2 Efecto del ACTH sobre los niveles de ARNm de p43

Si el efecto en los niveles de p43 es el reflejo de la disminución de los niveles circulantes de ACTH, el tratamiento de un grupo de animales con esta hormona debería revertir el efecto que produce la sólo inyección con Dx. Inicialmente, un grupo de animales fueron inyectados primero con 2,5 mg/Kg de Dx, luego estimulados con una dosis máxima de ACTH y sacrificados a diferentes tiempos posteriores a la estimulación según el procedimiento detallado en Materiales y Métodos. Cada una de las preparaciones de ARN total de la zona fasciculata de la corteza adrenal correspondientes a los diferentes tratamientos fueron analizadas por Northern blot y el resultado obtenido se muestra en el panel superior de la Figura 40. En todos los casos se analizaron los niveles de corticosterona en plasma.

De la autorradiografía mostrada en el panel superior de la Figura 40 se puede concluir que existe un aumento en los niveles de mensajero de p43 que resulta rápido (5 min) con un máximo a los 15 min (62%) posteriores al estímulo y transitorio retornando a los valores basales a los 30 min. Las mediciones de corticosterona plasmática obtenidas en cada caso se muestran en la Tabla II.

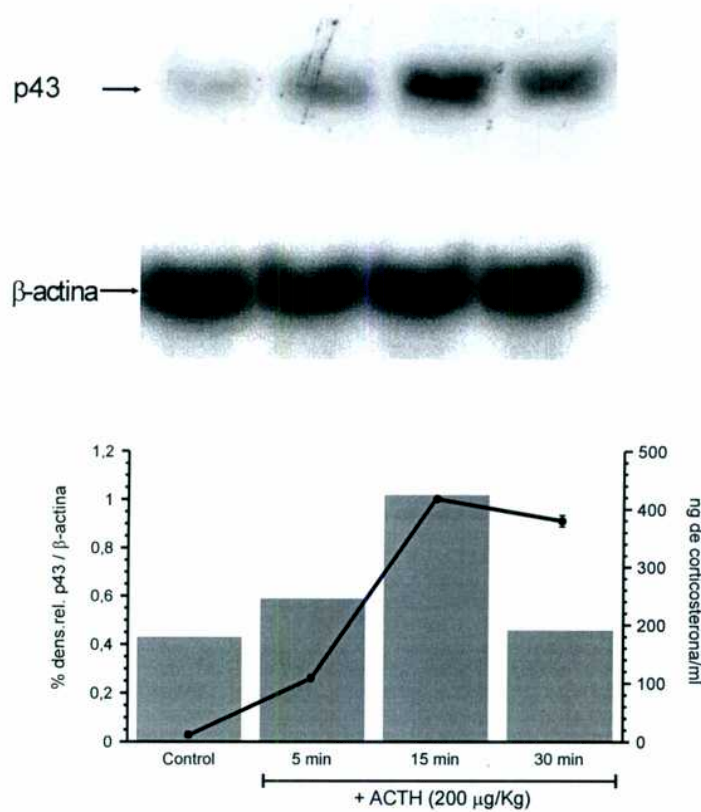


Figura 40. Efecto del ACTH sobre los niveles de ARNm de p43. Un grupo de ratas fueron inyectadas s.c. con 2,5 mg/Kg de Dx 5h antes del sacrificio (control). Otro grupo de animales fueron además inyectadas con ACTH (200 μg/Kg) 30, 15 y 5 min antes del sacrificio. Las glándulas adrenales fueron extraídas y purificado el ARN total como se describe en Materiales y Métodos. Una alícuota de 24 μg de ARN total de la zona fasciculata de la corteza adrenal de cada uno de los diferentes tratamientos fue analizada por Northern blot. La membrana se hibridizó con una sonda de 692 bp de adrenal o β-actina como control y luego se expuso 48h a -70°C con una película X-OMAT AR. La autoradiografía obtenida se muestra en los paneles superior (sonda 692 bp) e intermedio (sonda β-actina). La abundancia relativa del ARNm de p43 y los niveles de corticosterona en plasma, indicados en el panel inferior, fueron determinados como se explicó en la Figura 39.

Tratamiento	ng de corticosterona/ml
Dx (control)	11,06 $\pm$ 1,06
Dx+ACTH 5 min	108,84 $\pm$ 6,26
Dx+ACTH 10 min	256,02 $\pm$ 11,04
Dx+ACTH 15 min	417,97 $\pm$ 10,6
Dx+ACTH 30 min	380,47 $\pm$ 13,81

Tabla II. Medición de los niveles de corticosterona plasmática en animales que recibieron diferentes tratamientos.

El conjunto de estos resultados indican que la disminución en los niveles de ARNm de p43 observada luego del tratamiento con Dx (Figura 39) es revertida luego de la administración de ACTH a los animales (Figura 40), sugiriendo que los niveles circulantes de esta hormona regulan la acumulación transitoria del mensajero de p43.

Para determinar el/los eventos moleculares que producen la acumulación transitoria del mensajero de p43 en los minutos posteriores al estímulo con ACTH se desarrollaron los experimentos que se detallan a continuación.

II-2.1 Efecto de la actinomicina D sobre los niveles de ARNm de p43

En primera instancia se evaluó el efecto de la actinomicina D (act.D), un inhibidor de la transcripción, sobre la acumulación del ARNm de p43. Para ello, diferentes grupos de ratas fueron tratadas con: (1) Dx; (2) Dx y act.D; (3) Dx y ACTH o (4) Dx, act.D y ACTH. El procedimiento seguido se describe en la sección I-4 de Materiales y Métodos. De cada uno de los grupos de animales se extrajeron las glándulas adrenales y se realizó la preparación del ARN total de la zona fasciculata. Las muestras fueron sembradas en un

gel y se procedió al análisis de las mismas por Northern blot como se describió anteriormente. Además, se procedió a la extracción de una muestra de sangre de los animales correspondientes a los diferentes lotes y se determinó el nivel de corticosterona plasmática en cada caso. Los valores obtenidos se resumen en la Tabla III.

Tratamiento	ng de corticosterona/ml
Dx (control)	69 ± 6
Dx+ act.D (500 µg/Kg)	52 ± 8
Dx+ACTH 15 min	812 ± 12,5
Dx+ act.D (500 µg/Kg)+ ACTH	712,5 ± 12
Dx+ act.D (750 µg/Kg)+ ACTH	775 ± 37,5

Tabla III. Medición de los niveles de corticosterona plasmática en animales que recibieron diferentes tratamientos.

El resultado del análisis por Northern blot de cada una de las preparaciones de ARN correspondientes a los distintos tratamientos mostró que existe una evidente disminución en los niveles de mensajero de p43, cuando los animales son inyectados con cualquiera de las dosis de actinomicina D antes del estímulo con ACTH. Sin embargo, los niveles de corticosterona plasmática son máximos y permanecen invariables con ambas concentraciones (Figura 41).

Estos resultados se correlacionan con otros descriptos en la literatura que señalan que la transcripción *de novo* no es un proceso necesario en la regulación aguda de la producción de esteroides. Se ha informado que el tratamiento *in vivo* de ratas e *in vitro* de cuartos de adrenales con

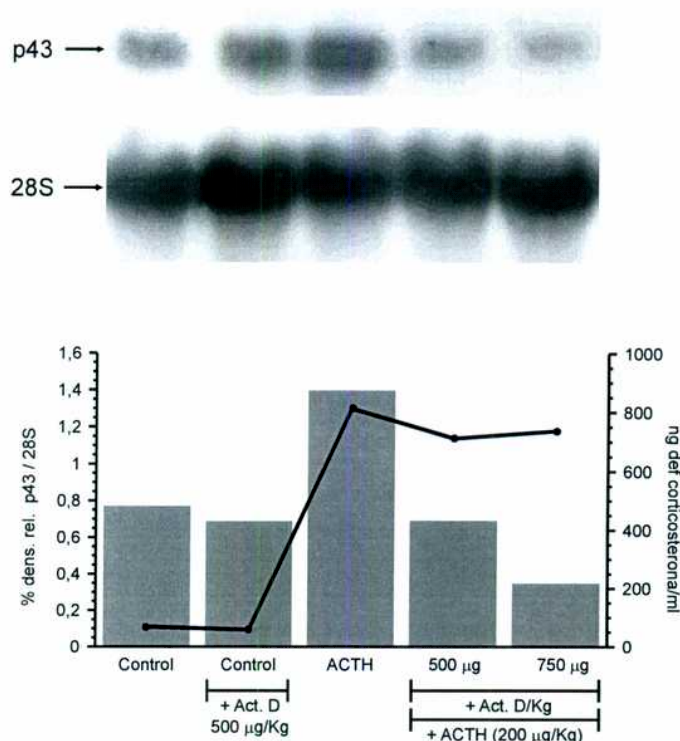


Figura 41. Efecto de la actinomicina D sobre los niveles de ARNm de p43. Un grupo de ratas fueron inyectadas s.c. con 2,5 mg/Kg de Dx 5h antes del sacrificio (control). Un segundo grupo de animales controles fueron también inyectados con actinomicina D (act. D) en la dosis indicada 45 min antes del sacrificio. Un tercer lote de animales controles fueron inyectados con ACTH (200 µg/Kg) 15 min antes del sacrificio (ACTH). Otros dos grupos de animales fueron inyectados s.c. con Dx (2,5 mg/kg), act. D (500 o 750 µg/Kg) 45 min y ACTH (200 µg/Kg) 15 min antes del sacrificio. Las glándulas adrenales fueron extraídas y purificado el ARN total como se describe en Materiales y Métodos. Una alícuota de 24 µg de ARN total de la zona fasciculata de la corteza adrenal de cada uno de los diferentes tratamientos fue analizada por Northern blot. La membrana se hibridizó con una sonda de 692 bp de adrenal o 28S como control y luego se expuso 48h a -70°C con una película X-OMAT AR. La autoradiografía obtenida se muestra en los paneles superior (sonda 692 bp) e intermedio (sonda 28S). La abundancia relativa del ARNm de p43 y los niveles de corticosterona en plasma indicados en el panel inferior fueron determinados como se explicó en la Figura 39. Las barras de error en las determinaciones de corticosterona son menores al 5% y por lo tanto no resultan visibles.

actinomicina D no bloquea la producción de corticosterona estimulada por ACTH (Garren *et al.*, 1965; Ferguson y Morita, 1964; Farese, 1966), lo cual se correlaciona con nuestras observaciones. Sin embargo, otros autores han descrito un efecto inhibitorio parcial de la act.D sobre la producción de esteroides estimulada por hormonas en células de Leydig de rata, intersticiales y en células dispersas de adrenal (Farese, 1966; Shin y Sato, 1971; Schulster, 1974; Mendelson *et al.*, 1975; Cooke *et al.*, 1979), el cual puede ser aún menor si las células en estudio son pretratadas con la hormona o si se extiende el tiempo de la misma en el cultivo.

Nuestros resultados y los informados por otros autores sugieren que la síntesis aguda de esteroides se daría en condiciones en las cuales existen niveles basales de ARNm y que la transcripción *de novo* sería fundamental para mantener la capacidad esteroidogénica del sistema a largo plazo. En la fase aguda de la esteroidogénesis, la regulación estaría dada por los procesos de traducción y modificación post-traducciona por fosforilación de diferentes sustratos.

Esta hipótesis se correlaciona con los resultados presentados en la Figura 41 y justifica el aumento en los niveles de corticosterona cuando los niveles relativos del transcripto de p43 están disminuídos.

II-2.2 Efecto de la cicloheximida sobre los niveles de ARNm de p43

A continuación se evaluó el efecto de un inhibidor de la traducción, como la cicloheximida (CHx) sobre los niveles de ARNm de p43 tenía. En tal sentido, diferentes grupos de animales fueron tratados con: (1) Dx; (2) Dx y CHx; (3) Dx y ACTH o (4) Dx, CHx y ACTH. El procedimiento experimental seguido fue el mismo que en el caso anterior y las preparaciones de ARN total se analizaron por Northern blot. En todos los casos, se procedió a la extracción de sangre y a la medición de los niveles de corticosterona en plasma encontrándose para cada tratamiento los valores resumidos en la Tabla IV.

Tratamiento	ng de corticosterona/ml
Dx (control)	43,79 $\pm$ 4,09
Dx+CHx (100 mg/Kg)	48 $\pm$ 7,3
Dx+ACTH 15 min	1058,64 $\pm$ 12,7
Dx+CHx (50 mg/Kg)+ACTH	39,6 $\pm$ 2,45
Dx+CHx (100 mg/Kg)+ACTH	26,19 $\pm$ 2,88
Dx+CHx (200 mg/Kg)+ACTH	20 $\pm$ 5,32

Tabla IV. Medición de los niveles de corticosterona plasmática en animales que recibieron diferentes tratamientos.

El resultado obtenido muestra que la CHx potencia el efecto de ACTH sobre los niveles del transcritto de p43 y que tiene un máximo cuando los animales son tratados con 100 mg/kg de CHx antes del estímulo con la hormona. Los valores de corticosterona circulantes obtenidos para cada uno de los diferentes tratamientos muestran que la inyección de cualquiera de las dosis estudiadas de CHx, bloquea la producción de esteroides inducida por ACTH (Figura 42).

De los resultados presentados se puede inferir que el efecto del tratamiento con CHx previo al estímulo con ACTH, bloquea la traducción de una proteína que estaría implicada en la desestabilización del mensajero de p43. Esta afirmación se sustenta en el análisis de la región 3'UTR del ARNm de p43 donde hemos identificado potenciales secuencias desestabilizantes (AREs y (T)_n) que resultan importantes determinantes del recambio de mensajeros y que son blancos de unión de proteínas como las AUF-1, que median la rápida degradación de los mismos.

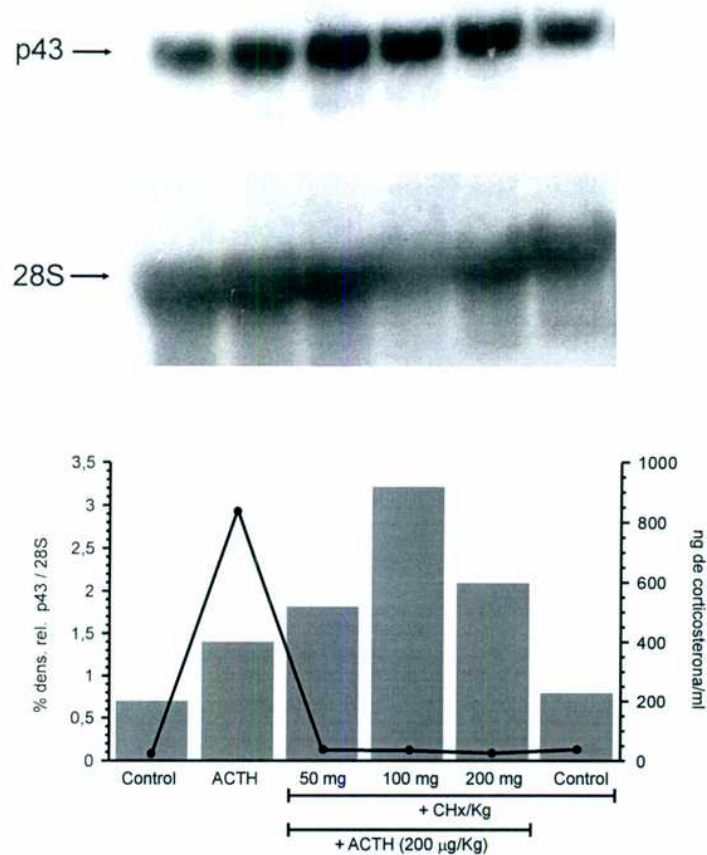


Figura 42. Efecto de la cicloheximida sobre los niveles de ARNm de p43. Un grupo de ratas fueron inyectadas s.c. con 2,5 mg/Kg de Dx 5h antes del sacrificio (control). Un segundo grupo de animales controles fueron también inyectados con cicloheximida (CHx) en la dosis indicada, 45 min antes del sacrificio. Un tercer lote de animales controles fueron inyectados con ACTH (200 µg/Kg) 15 min antes del sacrificio. Otros tres grupos de animales fueron inyectados s.c. con Dx (2,5 mg/kg), CHx (50, 100 o 200 mg/Kg) 45 min y ACTH (200 µg/Kg) 15 min antes del sacrificio. Las glándulas adrenales fueron extraídas y el ARN total fue purificado como se describe en Materiales y Métodos. Una alícuota de 24 µg de ARN total de la zona fasciculata de la corteza adrenal de cada uno de los diferentes tratamientos fue analizada por Northern blot. La membrana se hibridizó con una sonda de 692 bp de adrenal o 28S como control y luego se expuso 48h a -70°C con una película X-OMAT AR. La autoradiografía obtenida se muestra en los paneles superior (sonda 692 bp) e intermedio (sonda 28S). La abundancia relativa del ARNm de p43 y los niveles de corticosterona en plasma, indicados en el panel inferior, fueron determinados como se explicó en la Figura 39. Las barras de error en las determinaciones de corticosterona son menores al 5% y por lo tanto no resultan visibles.

La vida media de estos transcritos depende del número de regiones desestabilizantes en el 3'UTR, de la afinidad de unión de las proteínas desestabilizadoras a las diferentes secuencias y de la concentración de la forma activa de estas proteínas disponibles para la unión. En tal caso, el tratamiento con CHx conduciría al aumento en los niveles del ARNm de p43 como consecuencia de la estabilización del mismo. Sin embargo, la síntesis de esteroides permanecería bloqueada por la ausencia de p43 en el sistema.

En relación a lo discutido en la sección anterior, se puede sugerir que la acumulación del ARNm de p43 es la consecuencia de la transcripción *de novo* del gen y del bloqueo de la síntesis de una proteína represora de vida media corta por acción de la CHx. De manera tal que la acumulación del transcripto de p43 durante la fase aguda de la esteroidogénesis sería el resultado de la estabilización del mismo por algún mecanismo estimulado por ACTH.

II-3 Identificación de p43 en la fracción citosólica de la zona fasciculata de la glándula adrenal de animales tratados con cicloheximida

Los resultados descriptos en las secciones anteriores se completan con la detección de p43 en la fracción citosólica de la zona fasciculata de adrenales de ratas tratadas o no con CHx y luego estimuladas con ACTH (Materiales y Métodos sección II-6). Una alícuota de cada una de las fracciones fueron analizadas por Western blot con un anticuerpo antipéptido de p43. El resultado obtenido muestra que existe una disminución en los niveles de la proteína p43 cuando la fracción citosólica analizada corresponde a animales tratados con CHx por 5 min antes del estímulo con ACTH (Figura 43). Estos resultados sugieren que p43 es una proteína sensible a cicloheximida y de alto recambio.

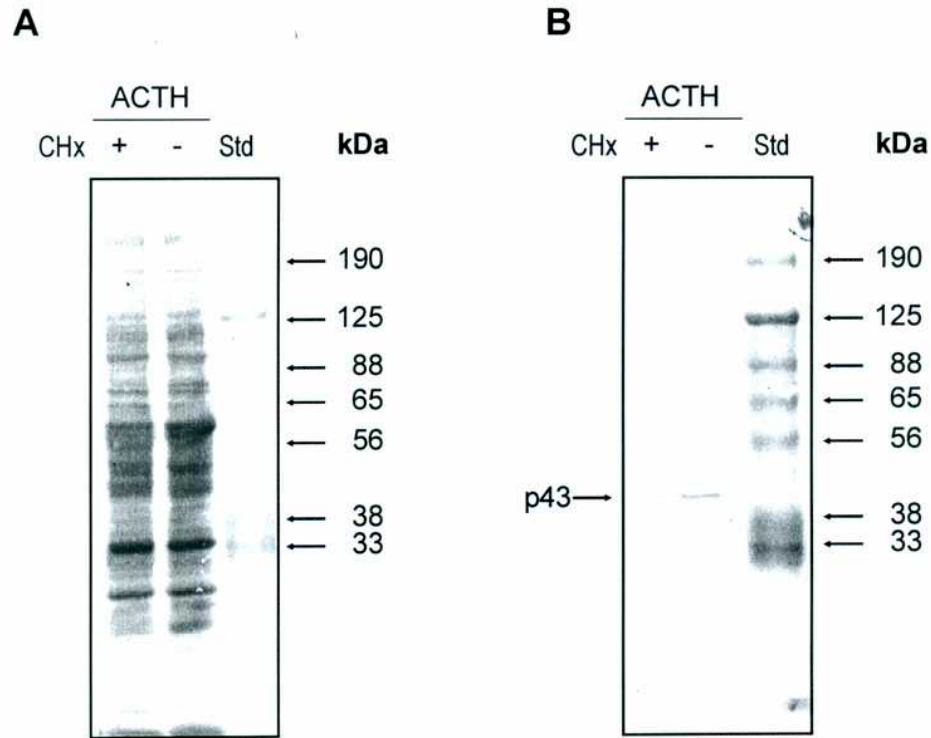


Figura 43. Análisis de los niveles de p43 en citosoles de zona fasciculata de la corteza adrenal. Un alícuota de 20 μ g de proteínas totales obtenidas de citosoles de zona fasciculata de glándula adrenal de animales que recibieron únicamente una inyección de ACTH (200 μ g/Kg), o bien CHx (100 mg/kg) por 10 min y luego ACTH (200 μ g/Kg), fueron analizadas en un SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa según se describe en la sección II-6.1. p43 se detectó utilizando un anticuerpo anti-péptido F7R en dilución 1:500. A. Tinción con Ponceau S de la membrana de nitrocelulosa. B. Western blot.

II-4 Conclusión de los resultados presentados

En resumen, podemos decir que en ausencia de ACTH circulante existen niveles basales de ARNm de p43 que se traducen dando origen a una proteína que se activa por fosforilación y que es sensible a cicloheximida y de rápido recambio. La estimulación aguda con ACTH provoca la acumulación transitoria del mensajero de p43 a través de algún proceso de estabilización. La traducción del ARNm y la modificación post traduccional por fosforilación de p43 (Paz *et al.*, 1994) estarían involucradas en la etapa inicial de la esteroidogénesis, mientras que los mecanismos de transcripción *de novo* estarían involucrados en el mantenimiento de la misma. El conjunto de los resultados obtenidos nos permiten afirmar que p43 resulta un intermediario obligatorio en la síntesis de esteroides.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La regulación hormonal del paso limitante en la síntesis de esteroides ocurre, en los distintos tejidos esteroidogénicos, a través de la activación de diferentes proteínas quinasas, sugiriendo que los distintos mecanismos de transducción de señales convergen en un intermediario común. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio y por otros grupos de trabajos señalan al AA y a sus metabolitos como intermediarios obligatorios en el mecanismo de acción de las hormonas esteroidogénicas, los que actúan regulando el paso limitante en la síntesis de esteroides. Dado que la liberación de estos metabolitos es dependiente de la fosforilación de proteínas, el tema de estudio en los últimos años en el laboratorio ha sido la búsqueda de un nexo entre los procesos de fosforilación de proteínas mediados por diferentes quinasas y la liberación de AA. Con este objetivo utilizamos como modelo experimental la zona fasciculata de la corteza adrenal, donde la síntesis de esteroides estimulada por ACTH es mediada por activación de la PKA y la liberación de AA. En este sistema identificamos una proteína novel, p43, con la capacidad de estimular la síntesis mitocondrial de esteroides mediante un proceso dependiente de la liberación de AA.

Los resultados obtenidos revelaron que tanto la bioactividad de p43 como el grado de fosforilación de ésta son eventos regulados hormonalmente. Estos conocimientos nos llevaron a postular que p43 podría establecer, en el hipotético caso de ser sustrato de diferentes quinasas, un punto de convergencia de los diferentes mecanismos de transducción de señales empleados por diferentes hormonas esteroidogénicas. Este punto de convergencia se localizaría en un sitio previo a la liberación de AA.

Las características bioquímicas que exhibe 43 resultan ciertamente atractivas cuando se la considera intermediaria común de mecanismos de transducción de señales que implican la activación de diferentes quinasas.

En el presente trabajo se procedió a realizar la caracterización molecular de p43 considerando que a partir de estos estudios se pueden inferir sus mecanismos de regulación y activación.

La determinación de la secuencia de p43 se realizó a través del análisis de diferentes bibliotecas de ADNc y por estudios de RT-PCR. La secuencia obtenida resultó idéntica a una acil-CoA tioesterasa novel denominada MTE-I, recientemente incorporada en el GenBank (Svensson *et al.*, 1998). Los estudios cinéticos de esta tioesterasa demostraron que la misma utiliza preferencialmente como sustratos ácidos grasos de cadena larga (14-20), en particular araquidonil y palmitoil-CoA.

El análisis estructural de p43 muestra la presencia de un *motif* de serina lipasa conservado estructural y funcionalmente en las distintas especies. La conservación del sitio activo durante la evolución indica entonces la importancia de esta estructura para la funcionalidad de la enzima. Aunque no hemos establecido aún el mecanismo preciso por el cual las acil-CoA tioesterasas actuarían en los sistemas esteroidogénicos, una hipótesis es que lo hagan a través de la liberación de AA a partir del araquidonil-CoA. En este sentido, el requerimiento de la presencia de la fracción microsomal en el ensayo de la bioactividad de p43 para que ésta exhiba su capacidad esteroidogénica, indicaría que esta fracción constituye la fuente de enzimas necesarias para la metabolización del AA a leucotrienos. Este mecanismo constituiría una alternativa novel de obtención de AA distinta de la PLA₂.

Un mecanismo como el propuesto se correlaciona con la detección de p43 en una amplia variedad de tejidos, algunos de los cuales como corazón e hígado, no están especializados en la síntesis de hormonas esteroideas. De acuerdo con el rol obligatorio de p43 en la esteroidogénesis, hemos detectado la presencia de su mensajero en todos los tejidos esteroidogénicos descritos, asignándole una función intermediaria en los distintos mecanismos de transducción de señales generados en respuesta al

estímulo por una hormona trófica. Sin embargo, para proponer la participación de p43 en la liberación de AA en todos los tejidos es necesario detectar su expresión y demostrar su funcionalidad en los mismos. En este sentido, la ubicuidad de p43 y los resultados obtenidos recientemente en el laboratorio utilizando un sistema experimental heterólogo tal como el citosol de corazones perfundidos con diferentes agonistas y la fracción mitocondrial de adrenales apoyan la hipotética participación de p43 en todo proceso que involucra la liberación de AA.

La estructura primaria de p43 presenta sitios consenso de fosforilación para diferentes proteínas quinasas, en particular para aquellas que participan en la regulación hormonal de la esteroidogénesis. Esta característica molecular es compatible con los resultados bioquímicos y con la hipótesis planteada acerca de la función de p43. Sin embargo, la existencia de sitios consenso de fosforilación no necesariamente implica que la proteína sea un sustrato fisiológico adecuado para estas quinasas. Sólo la expresión del ADNc de p43 en un sistema *in vivo* nos permitirá estudiar la participación de los mecanismos de fosforilación en la regulación de la actividad enzimática de la misma.

El análisis de la secuencia primaria de la MTE-I reveló la presencia de un péptido señal de importación a la mitocondria en su extremo N-terminal. La forma madura de la MTE-I coincide con la porción N-terminal descrita para p43 e incluye todos los péptidos microsecuenciados de ésta los cuales constituyen el 34,8% de la secuencia completa de la proteína.

Si bien las acil-CoA tioesterasas han sido descritas en todos los organismos estudiados y se encuentran presentes en diferentes compartimentos celulares, aún no se ha establecido la función fisiológica de las mismas, particularmente para las tioesterasas noveles presentes en el citosol y la mitocondria. Se ha descrito que la mayoría de los miembros de esta familia de enzimas tienen más de una actividad catalítica, por ejemplo

algunas de ellas tienen una actividad de carboxilesterasa asociada. En este sentido resulta interesante especular que las diferentes actividades enzimáticas pueden ser el resultado de procesos de fosfo/deforilación de proteínas que involucran mecanismos regulatorios tejido-específicos.

Si bien p43 fue aislada de la fracción citosólica de la zona fasciculata de la corteza adrenal, su secuencia primaria resultó idéntica a la acil-CoA tioesterasa mitocondrial. Aunque este resultado parece contradictorio, se correlaciona con la detección de dos proteínas, una de 43 kDa en el citosol y en la matriz mitocondrial y otra de 55 kDa en la membrana mitocondrial, mediante experimentos de Western blot. Sin embargo, queda por determinarse la funcionalidad y la relación estructural entre ambas entidades moleculares detectadas en los diferentes compartimentos.

Aunque diversas proteínas han sido postuladas como intermediarias en la regulación de la síntesis de esteroides por hormonas tróficas, no se ha demostrado que exista una regulación hormonal aguda sobre la expresión del gen o sobre los niveles de su transcripto. En este trabajo, presentamos evidencias de la regulación aguda sobre transcripto de p43. Esta regulación es rápida y transitoria ya que ACTH modifica los niveles de ARNm de p43 en los minutos posteriores al estímulo, retornando luego a los valores basales. Nuestros resultados indican que ACTH puede ejercer su acción regulando tanto la estabilización del ARNm de p43 como la transcripción *de novo*.

El aumento en la abundancia del transcripto después del tratamiento con CHx sugiere que el mensajero que codifica a p43 es intrínsecamente inestable. Nuestros resultados prueban que la estabilización del ARNm es el proceso involucrado en la fase inicial de la esteroidogénesis mientras que la transcripción *de novo* la sostiene a largo plazo. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos con act.D que muestran que la adición de esta droga antes del estímulo con la hormona trófica no inhibe la síntesis de esteroides

en la fase aguda de la esteroidogénesis, aunque si lo hace en la fase crónica.

Teniendo en cuenta de que p43 es un componente obligatorio en el mecanismo esteroidogénico y que resulta idéntica a una acil-CoA tioesterasa, se puede postular por primera vez un rol fisiológico para esta clase de enzimas en la regulación de la síntesis de esteroides a través de la liberación de AA (Figura 44). Esta información plantea el nuevo desafío de investigar las relaciones entre las actividades de acil-CoA tioesterasa y la regulación hormonal de la esteroidogénesis.

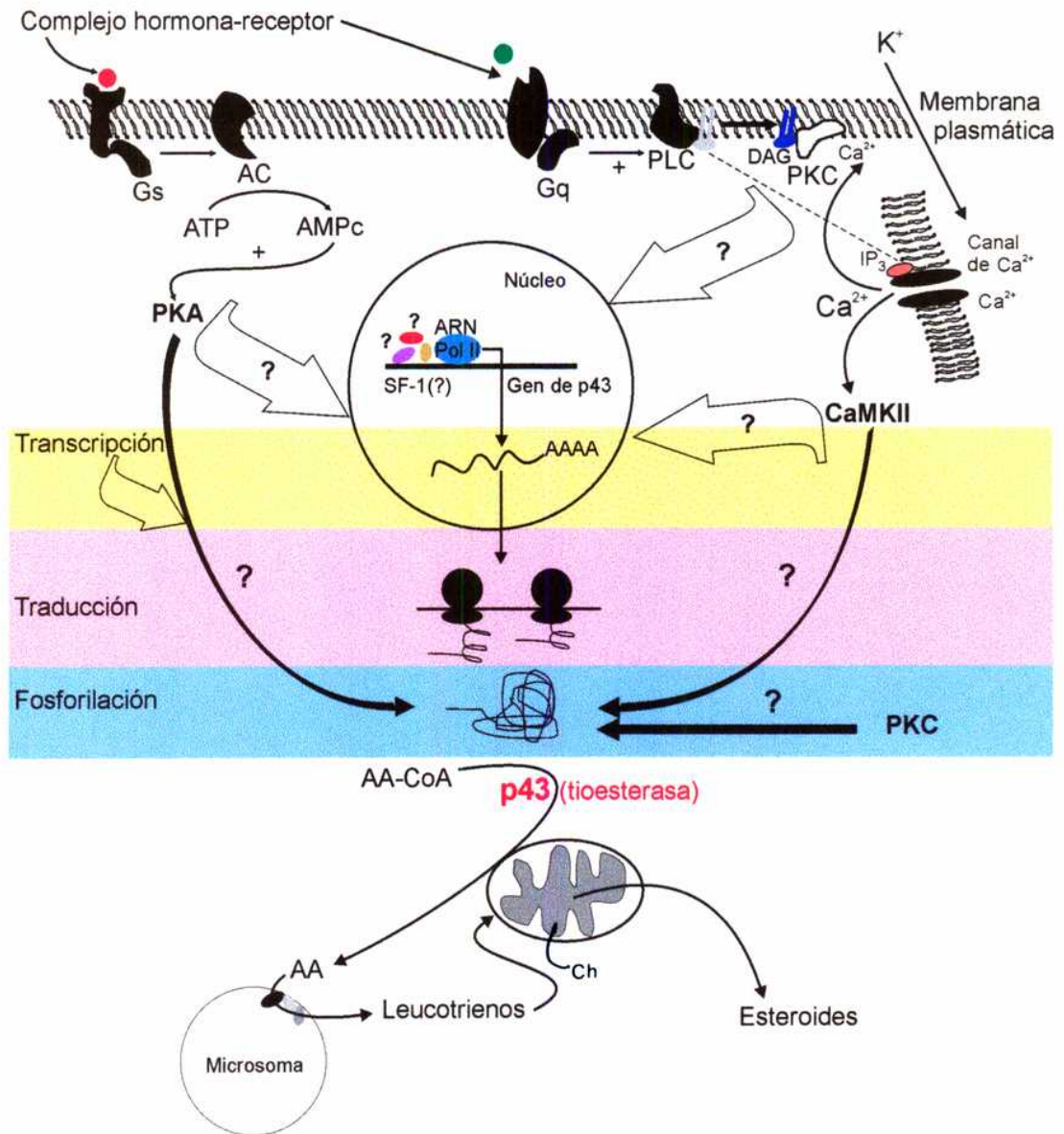


Figura 44. Mecanismo de acción de propuesto para p43. Gs, proteína G estimulatoria; Gq, proteína G tipo q; AC, adenilil ciclasa; PLC, fosfolipasa C; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína quinasa C; IP₃, inositol trifosfato; PKA, proteína quinasa dependiente de AMPc; CaMKII, proteína quinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina; SF-1, *steroidogenic factor 1*; AA, ácido araquidónico; AA-CoA, araquidonil-CoA.

BIBLIOGRAFIA

- Ackermann, E.J. y Dennis, E.A. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1259**: 125-136.
- Adashi, E. y Resnick, C. (1986) *J. Cell Biochem.* **31**: 217-225.
- Alberta, J.A., Epstein, L.F., Pon, L.A. y Orme-Johnson, N.R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 2368-2372.
- Almahbobi, G. y Hall, P.F. (1990) *J. Cell Sci.* **97**: 679-687.
- Almahbobi, G., Williams, L. y Hall, P.F. (1992a) *J. Cell Sci.* **101**: 383-393.
- Almahbobi, G., Williams, L. y Hall, P.F. (1992b) *Exp. Cell Res.* **200**: 361-369.
- Amara, S.G., Jonas, V., Rosenfeld, M., Ong, E. y Evans, R. (1982) *Nature* **298**: 240-244.
- Angulo, J., Ledoux, M. y McEwen, B.S. (1991) *J Neurochem.* **56**: 2033-2038.
- Anholt, R.R.H., DeSouza, E., Huhar, M. y Snyder, S.H. (1985) *Eur. J. Pharmacol.* **110**: 41-46.
- Arthur, J.R. y Boyd, G.S. (1976) *Eur. J. Biochem.* **49**: 117-127.
- Ascoli, M., Pignataro, O. y Segaloff, D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 6674-6681.
- Ascoli, M. y Segaloff, D. (1989) *Endocr. Rev.* **10**: 27-44.
- Ascoli, M. y Wang, H. (1991) *Mol. Endocrinol.* **4**: 80-90.
- Axelrod, J., Burch, R. y Jeselma C. (1988). *Trends in Neurosci.* **11**: 117-123.
- Axelrod, J. (1990) *Biochem. Soc. Trans.* **18**: 503-507.

- Bacher, N., Zisman, Y., Berent, E. y Livneh, E. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**: 126-133.
- Bakke, M. y Lund, J. (1995) *Mol. Endocrinol.* **9**: 327-339.
- Bakker, G.H., Hoogerbrugge, J.W., Rommers, F. y van der Molen, H.J. (1983) *Mol. Cell Endocrinol.* **33**: 243-248.
- Balla, T. Baukal, A.J., Guillemette, G., Morgan, R.O. y Catt, K.J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 9323-9327.
- Balla, T., Guillemette, G., Baukal, A.J. y Catt, K.J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 9952-9955.
- Balla, T., Baukal, A.J., Hunyady, L. y Catt, K.J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 13605-13611.
- Ballou, L.M. y Fischer, E.H. (1986) en *Phosphoprotein Phosphatase in the Enzymes* (Boyer, P. y Krebs, E.G. eds.) Academic Press, New York. Vol **17**.
- Barbour, S.E. y Dennis, E.A. (1991) *Chemtracts-Biochemistry and Molecular Biology* **2**: 351-356.
- Barrett, P., Bollag W. y Rasmussen, H. (1988). *Hormones and their actions*. part II Elsevier Science Publishers. B. V. pp 211-229.
- Baukal, A.J., Balla, T., Hundayi, L., Hausdorff, W., Guillemette, G. y Catt, K.J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**: 6087-6092.
- Baukal, A.J., Guillemette, G., Rubin, R., Spat, A. y Catt, K.J. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**: 532-538.
- Beall, R. y Sayers, G. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* **148**: 70-76.
- Beebe, S.J. y Corbin, J.D. (1986) *Cyclic nucleotide-dependent protein kinases*. En: *The Enzymes*, (P. Boyer, E. Krebs eds.) **17A**:43-111.

- Beebe, S.J., Oyen, O., Sandberg, M. y Frosya, A. (1990) *Mol. Endocrinol.* **4**: 465-474.
- Bell, R. y Burns, D. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 4661-4664.
- Berg, O., Yu, B.Z., Rogers, J. y Jain, M. (1991) *Biochemistry* **30**: 7283-7297.
- Bernstein, K.E. y Alexander, R.W. (1992) *Endocr. Rev.* **13**: 381-386.
- Berridge, M.J. e Irvine, R.F. (1984) *Nature* **312**, 315-321.
- Besman, M.J., Yanagibashi, K., Lee, T., Kawamura, M., Hall, P.F. y Shively, J.E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 28-35.
- Betz, G. y Hall, P.F. (1987) *Endocrinology* **129**: 2547-2554.
- Bhat, M., Mueller-Harvey, I., Summer, I. y Goodenough, P. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1166**: 244-250.
- Birmingham, M., Kurlents, E., Lane, R., Muhlstock, B. y Traikov, H. (1960). *Can. J. Biochem.* **38**: 1077-1085.
- Boujrad, N., Hudson, J. y Papadopoulos, V. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5728-5731.
- Boujrad, N., Gaillard, J.L., Garnier, M. y Papadopoulos, V. (1994) *Endocrinology* **135**: 1576-1583.
- Braestrup, C. y Squires, R.F. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 3805-3809.
- Braley, L., Menachery, A., Brown, E.M. y Williams, G.H. (1986) *Endocrinology* **119**: 1010-1019.
- Bregman, D.B., Bhattacharya, N. y Rubin, C.S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 4648-4656.

-
- Bregman, D.B., Hirsch, A.H. y Rubin, C.S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 7207-7213.
 - Breitbart, R.E., Nguyen, H.T., Medford, R.M., Destre, A., Mehdavi, V. y Nadal-Ginart, B. (1985) *Cell* **41**: 67-82.
 - Brown, A.S., Hall, P.F., Shoyab, M. y Papadopoulos, V. (1992) *Mol. Cell Endocrinol.* **83**: 1-9.
 - Brown-Shimer, S., Johnson, K., Hill, D. y Bruskin, A.M. (1992) *Cancer Res.* **52**: 478-482.
 - Burgoyne, R. y Morgan, A. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **10**: 365-366.
 - Bylund, D. y Krebs, E.G. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**: 6355-6364.
 - Cali, J.J., Balcueva, E.A., Rybalkin, I. y Robishaw, J.D. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 24023-24027.
 - Camacho, A., Kowarski, A., Migeon, C. y Brough, A.J. (1968) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **28**: 153-161.
 - Camp, L. A. y Hofmann, S. L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 22566-22574.
 - Canónico, P., Schettini, G., Valdenegro, C.A., MacLeod, R.M. (1983) *Neuroendocrinol.* **37**: 212-217.
 - Capdevila, J., Marnett, L., Chacos, N., Prough, R.A. y Estabrook, R.W. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 767-770.
 - Capponi, A., Lew, P., Jornot, L., y Vallotton, M. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**: 8863-8869.
 - Capponi, A., Phyton, C. y Rossier, M. (1994) *Endocrine* **2**: 579-586.
 - Catt, K., Dufau, M. y Tsuruhara, T. (1972) *J. Clin. Endocrinol.* **34**: 123-132.

- Cavallero, S., Korneyev, A., Guidotti, A. y Costa, E. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10598-10602.
- Cavallero, S., Pani, L., Guidotti, A. y Costa, E. (1993) *Life Sci.* **53**: 1137-1147.
- Chanderbhan, R., Noland, B.J., Scallen, T. y Vahouny, G.V. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**: 8928-8934.
- Chanderbhan, R., Kharroubi, A.T., Noland, B.J., Scallen, T. y Vahouny, G.V. (1986) *Endocr. Res.* **12**: 351-360.
- Channon, J. y Leslie, C. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 5409-5413.
- Chapman, J., Waterhouse, T. y Michael, S. (1992) *Biol. Reprod.* **47**: 992-997.
- Chen, J., Martin, B.L. y Brautigan, D.L. (1992) *Science* **257**: 1261-1264.
- Chock, P.B. y Stadtman, E.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 2766-2770.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- Churchill, P. y Kimura, T. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**: 10443-10448.
- Clark, M., Conway, T., Shorr, R. y Crooke, S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 4402-4406.
- Clark, A.J.L., Balla, T., Jones, M.R. y Catt, K.J. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**: 1889-1898.
- Clark, B.J., Wells, J., King, S.R. y Stocco, D.M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 28314-28322.
- Clark, B.J., Soo, S., Caron, K., Ikeda, Y., Parker, K.L. y Stocco D.M. (1995) *Mol. Endocrinol.* **9**: 1346-1355.

- Clarck, J.D., Milona, N. y Knopf, J.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7708-7712.
- Clarck, J.D., Lin, L.L., Kriz, R.W., Ramesha, C.S., Sultzman, L.A., Lin, A.Y., Milona, N. y Knopf, J.L. (1991) *Cell* **65**: 1043-1051.
- Clarck, J.D., Schievella, A., Nalefski, E. y Lin, L.L. (1995) *J. Lipid Mediat. Cell Signal* **12**: 83-117.
- Cohen, P. y Cohen, P.T.W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 21435-21438.
- Cohen, P. (1991) *Methods Enzimol.* **201**:389-398
- Cohen, P. (1992) *Trends Biochem. Sci.* **17**: 408-413.
- Coleman, J. (1992) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**: 441-483.
- Connor, J., Cornwall, M. y Williams, G. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 2919-2927.
- Cooke, B., Lindh, L. y Janszen, F. (1976) *Biochem. J.* **160**: 439-446.
- Cooke, B., Janszen, F., van Driel, M. y van der Molen, H.J. (1979) *Mol. Cell Endocrinol.* **14**:181-189.
- Cooke, B., Dix, C., Maggee-Brown, R., Janszen, F. y van der Molen, H.J. (1981) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **14**: 593-597.
- Corbin, J.D., Sugden, P., West, L., Flockhart, D., Lincoln, T. y McCarthy, D. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**: 3997-4003.
- Coussens, L., Parker, P.J., Rhee, L., Yang-Feng, T., Chen, E., Waterfield, M., Francke, U. y Ullrich, A. (1986) *Science* **233**: 859-866.
- Cox, R.A. (1968) *Methods Enzymol* (Grossman, L. y Moldave, E., eds.) **12**, parte B, 120-129. Acedemic Press. Orlando, Florida.

- Crivello, J. y Jefcoate, C.R. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **542**: 315-329.
- Crivello, J. y Jefcoate, C.R. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**: 8144-8151.
- Dada, L.A. (1996). Tesis Doctoral. Fac. de Cs. Exactas y Naturales. UBA.
- Daile, P. y Carnegie, P.R. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**: 852-858.
- Davis, J.O. (1975) en *Handbook of Physiology* (Blaschko, Sayer y Smith eds.) American Physiological Society **6**, sección 7, pp 77-106.
- Davis, J.S., Farese, R. y Clark, M.R. (1983) *Endocrinology* **112**: 2212.
- Davis, J.S., West, L. y Farese, R. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**: 1289.
- Davis, J.S., West, L. y Farese, R. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**: 15028.
- Davis, W.W. y Garren, L. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**: 805-810.
- Davis, W.W. y Garren, L. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**: 5153-5157.
- Deems, R., Eaton, B. y Dennis, E.A. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**: 9013-9020.
- Demaille, J.G., Peters, K.A. y Fischer, E.H. (1977) *Biochemistry* **16**, 3080-3086.
- Dennis, E.A. (1983) en *The Enzymes* (Boyer, P.D. ed.) Tercera edición **16**, pp 307-353, Academic Press, New York.
- Dennis, E.A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 13057-13060.
- DeSouza, E.B., Anholt, R., Murphy, K., Snyder, S. y Kuhar, M., (1985) *Endocrinology* **116**, 567-573.
- Diez, E. y Mong, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 14654-14661.

-
- Dix, C., Habberfield, A., Sullivan, M. y Cooke, B. (1984) *Biochem. J.* **219**, 529-537.
 - Doskeland, S.O., Maronde, E. y Gjertsen, B.T. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1178**: 249-258.
 - Dufau, M. L., Podestá, E. J. y Catt, K. J. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 1272-1275.
 - Edelman, A.M., Hunter, D.D., Hendrickson, A.E. y Krebs, E.G (1985) *J. Neurosci.* **5**: 2609-2617.
 - Edelman, A.M., Blumenthal, D.K. y Krebs, E.G. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 567-613.
 - Eipper, B.A., Mains, R.E. y Guenzi, D.C. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**:4121-4129.
 - Elliott, M., Goodfriend, T. y Jefcoate, C. (1993) *Endocrinology* **133**:1669-1677.
 - Elton, T.S., Stephan, C.C., Taylor, G.R., Kimball, M.G., Martin, M.M., Durand, J.N. y Oparil, S. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**: 1067-1073.
 - Engberg, S. T., Aoyama, T., Alexson, S. E. H., Hashimoto, T. y Svensson, L. T. (1997) *Biochem. J.* **323**: 525-531.
 - Epstein, L.F. y Orme-Johnson, N.R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**:19739-19745.
 - Exton, J.H. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 1-4.
 - Falany, C., Johnson, M., Barnes, S., Diasio, R. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 19375-19379.
 - Farese, R.V. (1966) *Endocrinology* **78**: 929-936.

-
- Feramisco, J.R., Glass, D.B., Krebs, E.J. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**: 4240-4245.
 - Ferguson, J.J. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* **57**: 616-617.
 - Ferguson J.J. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**: 2754-2759.
 - Ferguson, J.J. y Morita, Y. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* **87**: 348-350.
 - Finkielstein, C. V., Cymeryng, C., Paz, C., Neuman, M. I., Dada, L.A., Cornejo Maciel, M. F., Mele, P., Méndez, C. F., Maloberti, P., Solano, A., Schimmer, B. P. y Podestá, E. J. (1996) *Endocr. Res.* **22**:521-532.
 - Fischer, E.H., Charbonneau, H. y Tonks, N.K. (1991) *Science* **253**: 401-406.
 - Fischer, W.H., Kan, D., Jackson, B., Park, M. y Vale, W. (1991) *Microsequence analysis of proteins purified by gel electrophoresis. En Methods Neurosciences* (Conn, P.M. ed.) 64-75. Academic Press, New York.
 - Flint, A., Paladini, R.D. y Koshland, D.E. Jr. (1990) *Science* **249**: 408-411.
 - Flockhart, D. y Corbin, J. D. (1982) *Crit. Rev. Biochem.* **12**: 133-186.
 - Francis, S.H. y Corbin, J. (1994) *Ann. Rev. Physiol.* **56**: 237-272.
 - Fraser, R., Brown, J., Lever, A., Mason, P.A. y Robertson, J.I.S. (1979) *Clin. Sci.* **56**: 389-399.
 - Friedman, D.L. y Larner, J. (1963) *Biochemistry* **2**: 669-675.
 - Fujino, M., Hatanaka, C. y Nishimura, O. (1971) *Chem. Pharm. Bull.* **19**: 1066-1068.
 - Fukunaga, K., Yamamoto, H., Matsui, K., Higashi, K. y Miyamoto, E. (1982) *J. Neurochem.* **39**: 1607-1617.

- Furutani, M., Arai, S., Higashitsuji, M., Mise, M., Fukumoto, M., Takano, S., Nakashima, H., Imamura, M. y Fujita, J. (1995) *Biochem. J.* **311**: 203-208.
- Garnier, M., Boujrad, N., Ogwuegbu, S., Hudson, J.R. y Papadopoulos, V (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 22105-22112.
- Garren, L., Ney, R.L. y Davis, W.W. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**: 1443-1450.
- Garren, L., Davis, W.W. y Crocco, R. (1966) *Science* **152**: 1386-1388.
- Garren, L. (1968) en *Vitamins and Hormones* (Harris, R., Wool, I. y Loraine, J. eds.) **26**: 119-145 Academic Press, New York.
- Garton, A.J. y Tonks, N.K. (1994) *EMBO J.* **13**: 3763-3771.
- Gassama-Diagne, A., Rogalle, P., Fauvel, J., Willson, M., Klæbe, A. y Chap, H. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 13418-13424.
- García-Pérez, A. y Smith, W.L. (1984) *J. Clin. Invest.* **74**: 63-74.
- Gavel, Y. y von Heijne, G. (1990) *Protein Eng.* **4**: 33-37.
- Gilman A.G. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 615
- Gore-Langton, R.E. y Armstrong, D.T. (1988) en *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E. y Neill, J. eds.) p 331. Raven Press, New York.
- Gould, K.L. y Nurse, P. (1989) *Nature* **342**: 39-45
- Grahame-Smith, D., Bulcher, R., Ney, R. y Sutherland E. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**: 5535-5541.
- Griffin Green E. y Orme-Johnson, N.R. (1991) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **40**: 421-429.

-
- Grillo, C., Piroli, G., Gonzalez, S., Angulo, J., McEwen, B. y De Nicola, A. (1994) *Brain Res.* **657**: 83-91.
 - Gschwendt, M., Kittstein, W. y Marks, F. (1991) *Trends Biochem. Sci.* **16**: 167-169.
 - Guan, K. y Dixon, J.E. (1990) *Science* **249**: 553-556.
 - Guillemette, G., Balla, T., Baukal, A.J., Spat, A. y Catt, K.J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 1010-1015.
 - Guo, H. y Dammi, Z. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2500-2504.
 - Gwynne, J. y Mahaffee, D.D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 8141-8150.
 - Habenicht, A., Salbach, P., Goerig, M., Zeh, W., Janssen-Timmen, U., Blattner, C., King, W. y Glomset J. (1990) *Nature* **345**: 634-636.
 - Halkerston, I., Feinstein, M. y Hechler, O. (1966) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **122**: 896-900.
 - Hall, P.F., Charponnier, C., Nakamura, M. y Gabbiani, G. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**: 9080-9084.
 - Hall, P.F., Nakamura, M. y Mrotek, J.J. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **676**: 338-344.
 - Hallberg, B., Rayter, S.I. y Downward, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 3913-3916.
 - Hanks, S.K., Quin, A.M. y Hunter, T. (1988) *Science* **241**: 42-52.
 - Hannon, G.J., Casso, D. y Beach, D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1731-1735.
 - Hanukoglu, I. y Hanukoglu, Z. (1986) *Eur. J. Biochem.* **157**: 27-31.

-
- Harding, J.W., Cook, V.I., Miller-Wing, A.V., Hanesworth, J.M., Sardinia, M.F., Hall, K.L., Stobb, J.W., Swanson, G.N., Coleman, J.K.M., Wright, J.W. y Harding, E.C. (1992) *Brain Res.* **583**: 340-343.
 - Harris, G.W. (1955) *Neural Control of the Pituitary Gland*. London: Arnold.
 - Hashimoto, T., Morohashi, K., Takayama, K., Honda, S., Wada, T., Handa, H. y Omura, T. (1992) *J. Biochem.* **112**: 573-575.
 - Hauffa, P.T., Miller, W., Grumbach, M., Conte, F. y Kaplan, S.L. (1985) *Clin. Endocrinol.* **23**: 481-493.
 - Haynes, R. Jr., Koritz, S. y Peron, F. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**: 1421-1423.
 - Hazen, S.L., Stuppy, R.J. y Gross, R.W. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 10622-10630.
 - Hazen, S.L. y Gross, R.W. (1991) *Biochem. J.* **280**: 581-587.
 - Hechler, O., Zaffaroni, A., Jacobsen, R.P., Levy, H., Jeanloz, R., Schenker, V. y Pincus, G. (1951) *Rec. Prog. Horm. Res.* **6**, 215-246.
 - Hechler, O., Bar, H., Matsuba, M. y Soifer, D. (1969) *Life Sci.* **8**: 935-942.
 - Hirai, A., Tahara, K., Tamura, Y., Saito, H., Terano, T. y Yoshida, S. (1985) *Prostaglandins* **30**: 749-767.
 - Hirsch, A.H., Glantz, S.B., Li, Y., You, Y. y Rubin, C.S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 2131-2134.
 - Hofmann, K., Yanaihara, N., Lande, S. y Yajima, H. (1962) *J. Am. Chem. Soc.* **84**: 4470-4474.
 - Hofmann, K., Andreatta, R., Bohn, H. y Moroder, L. (1970) *J. Med. Chem.* **13**: 339-345.
 - Hofmann, K., Stehle, C. y Finn, F. (1988) *Endocrinology* **123**: 1355-1363.

-
- Holloway, C., Kenyon, C., Dowie, L., Corrie, J., Gray, C. y Fraser, A. (1989) *J. Steroid Biochem.* **33**: 219-225.
 - Honda, S.I., Morohashi, K.I. y Omura, T. (1990) *J. Biochem.* **108**: 1042-1049.
 - Huang, K.P., Chan, K., Singh, T., Nakabayashi, H. y Huang, F.L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**: 12134-12140.
 - Hubbard M.J. y Cohen P. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**:172-177.
 - Hunter, T. y Cooper, J.A. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 897-930.
 - Hunter, T. (1987) *Cell* **50**: 823-829.
 - Hunter, T. (1994) *Semin. Cell Biol.* **5**: 367-376.
 - Hunyady, L., Kayser, S., Cragoe, E.J., Balla, I., Balla, T. y Spat, A. (1988) *Am. J. Physiol.* **254**: C744-C750.
 - Ingebritsen, T.S. y Cohen, P. (1983a) *Eur. J. Biochem.* **132**: 255-261.
 - Ingebritsen, T.S. y Cohen, P. (1983b) *Science* **221**:331-337.
 - Ishizuka, T., Daidoh, H., Morita, H., Mune, T., Miura, A., Suwa, T., Shibata, T., Yamada, K., Itaya, S., Kajita, K. y Yasuda, K. (1997) *Endocr. J.* **44**: 661-670.
 - Iwai, N. e Inagami, T. (1992) *FEBS Letts.* **298**: 257-260.
 - Iyegar R. (1993) *FASEB J.* **7**:768-775.
 - Jahnsen, T., Hedin, L., Kidd, V.J., Beattie, W.G., Lohmann, S.M. y Walter, U. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**:12352-12361.
 - Janszen, F., Cooke, B. , van Driel, M. y van der Molen, H.J. (1976) *FEBS Letts* **71**: 269-272.

- Janszen, F., Cooke, B. y van der Molen, H.J. (1977) *Biochem. J.* **162**: 341-346.
- Jarvis, M.F., Gessner, G.W. y Ly, C.Q. (1992) *Eur. J. Pharmacol.* **219**: 319-322.
- Jefcoate, C.R., DiBartolomeos, M., Williams, C.A. y McNamara, B.C. (1987) *J. Steroid Biochem.* **27**: 721-729.
- John, M.E., John, M.C., Boggaram, V., Simpson, E.R. y Waterman, M.R. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 4715-4719.
- Johnson, E., Capponi, A. y Vallotton, M. (1989) *J. of Endocrinology* **122**:391-402.
- Jones, D.B., Marante, D., Williams, B.C. y Edwards, C.R.W. (1987) *J. Endocr.* **112**: 253-258.
- Kakar, S.S., Sellers, J.C., Devor, D.C., Musgrove, L.C. y Neill, J.D. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**: 1090-1096.
- Kambayashi, Y., Bardhan, S., Takahashi, K., Tzuzuki, S., Inui, H., Hamakubo, T. e Inagami, T. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 24543-24546.
- Karaboyas, G. y Koritz, S. (1965) *Biochemistry* **4**: 462-468.
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M. y Satoh, T. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 349-400.
- Keinanen, K., Kellokumpu, S., Metsikko, M. y Rajaniemi, H. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 7920-7927.
- Keller, G.A., Scallen, T.J., Clarke, D., Maher, P.A., Krisans, S.K. y Singer, S.J. (1989) *J. Cell Biol.* **108**: 1353-1361.
- Kemp, B.E., Graves, D., Benjamini, E. y Krebs, E.G. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**: 4888-4894.

- Kemp, B.E. y Pearson, R.B. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**: 342-346.
- Kemp, B.E., Parker, M.W., Hu, S., Tiganis, T. y House, C. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**: 440-443.
- Kennelly, P. y Krebs, E.G. (1991) *J. Biol. Chem* **266**: 15555-15558.
- Kim, E. y Wyckoff, H. (1991) *J. Mol. Biol.* **218**: 449-464.
- Kinnally, K.W., Zorov, D.B., Antonenko, Y.N., Snyder, S.H., McEnery, M.W. y Tedeschi, H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1374-1378.
- Kirschenbaum, M.A., Lowe, A., Trizna, W. y Fine, L.G. (1982) *J. Clin. Invest.* **70**: 1193-1204.
- Kishimoto, A., Kajikawa, N., Shiota, M. y Nishizuka, Y. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**: 1156-1164.
- Knighton, D., Zheng, J., Eyck, L., Ashford, V., Xuong, N., Taylor, S. y Sowadski, J. (1991) *Science* **253**: 407-414.
- Knopf, J.L. *et al.* (1986) *Cell* **46**: 491-502.
- Koch, A., Anderson, D.A., Moran, M.F., Ellis, C. y Pawson, T. (1991) *Science* **252**: 668-674.
- Koesling, D., Boheme, E. y Schultz, G. (1991) *FASEB J* **5**, 2785-2791.
- Kojima I., Kojima K., Kreutter, D. y Rasmussen H. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**: 14448-14457.
- Kojima, I., Kojima, K. y Rasmussen H. (1985a). *Endocrinology* **117**: 1057-1066.
- Kojima, I., Kojima, K. y Rasmussen, H. (1985b) *J. Biol. Chem.* **260**: 4248-4256.

- Kojima, I., Kojima, K. y Rasmussen, H. (1985c) *Endocrinology* **117**: 1057-1066.
- Kojima I., Shibata, H. y Ogata, E. (1986a) *FEBS Letts.* **204**: 347-351.
- Kojima I., Shibata, H. y Ogata, E. (1986b) *Biochem. J.* **237**: 253-258.
- Kojima, I., Awamura, N. y Shibata, H. (1994) *Biochem. J.* **297**: 523-528.
- Kovanen, P., Goldstein, J., Chappell, D. y Brown, M.S. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**: 5591-5598.
- Kramer, R.M., Roberts, E.F., Manetta, J. y Putnam, J.E. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 5268-5272.
- Krebs, E.G. (1985) *Biochem. Soc. Trans.* **13**: 813-820.
- Krebs, E.G., Graves, D. y Fisher, E.H. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**: 2867-2873.
- Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H.A., Tang, W., Feinstein, P.G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R.R. y Gilman, A. (1989) *Science* **244**: 1558-1564.
- Kudo, I., Murakami, M., Hara, S. e Inoue, K. *Biochim. Biophys. Acta* **177**: 217-231.
- Laforgia, S., Morse, b., Levy, J., Barnea, G., Ganniz-Weston, L., Harris, C., Drabkin, H., Patterson, D., Croce, C.M., Schlessinger, J. y Huebner, K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5036-5040.
- Lambeth, J., Seybert, D. y Kamin, H. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**: 7255-7264.
- Lang, U. y Vallotton, M.B. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 8047-8050.
- Lapetina, E.G. (1982) *Trends Pharmacol. Sci.* **3**: 115-118.

-
- Lapetina, E.G., Billah, M.M. y Cuatrecasas, P. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**: 5037-5040.
 - Lee, H.L.C., Shangold, G., Larsen, A.L. y Schreiber, J.R. (1989) *Fertil Steril* **52**: 958-962.
 - Le Goascogne, C., Robe, P., Guezou, M., Sananes, N., Baulieu, E.E. y Waterman, M. (1987) *Science* **237**:1212-1215.
 - Leiser, M., Rubin, C.S., y Erlichman, J. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**:1904-1908.
 - Leslie, C, Voelker, D., Channon, J.Y., Wall. M. y Zelarney, P.T. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **963**: 476-492.
 - Leslie, C (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 11366-11371.
 - Levorse, J.M., Tilly, J. y Johnson, A.L. (1991) *J. Reprod. Fertil* **92**: 159-162.
 - Li, C.H., Meienhofer, J., Schnabel, E., Chung, D., Lo, T.B. y Ramachandran, J. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* **83**: 4449-4457.
 - Li, X., Warren, D.W., Gregoire, J. , Pedersen, R.C. y Lee, A.S. (1989) *Mol. Endocrinol.* **3**: 1944-1952.
 - Lin, D., Gitelman, S., Saenger, P. y Miller, W.L. (1991) *J. Clin. Invest.* **88**: 1955-1962.
 - Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J.F., Clarck, B.J., Stocco, D.M., Saenger, P., Rogol, A. y Miller, W.L. (1995) *Science* **267**: 1828-1831.
 - Lin, S.Y. y Goodfriend, T.L. (1970) *Am. J. Physiol.* **218**: 1319-1328.
 - Lin, L., Lin, A.Y. y Knopf, J.L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6147-6151.

- Lindquist, G., Svensson, L.T. y Alexson, S.E.H. (1998) *Eur. J. Biochem* **251**: 631-640.
- Liscum, L., Dahl, N.K., (1992) *J. Lipid Res.* **33**: 1239-1254.
- Lobo, M.V., Mendoza, R.R. y Marusic, E.T. (1990) *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* **35**: 29-33.
- Lowitt, S., Farese, R., Sabir, M. y Root, A. (1982) *Endocrinology* **111**: 1415-1417.
- Lowry, O. , Rosebrough, N. Farr, A. y Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem* **193**: 265-273.
- Macho, L. y Saffran, M. (1967) *Endocrinology* **81**: 179-185.
- Mackie, C., Richardson, M. y Schulster, D. (1972) *FEBS Letts.* **23**: 345-348.
- MacKintosh, C. y MacKintosh, R.W. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**: 444-448.
- Majerus, P.W., Connolly, T.M., Deckmyn, H., Ross, T.S., Bross, T.E., Ishii, H., Bansal, V.S. y Wilson, D.B. (1986) *Science* **234**: 1519-1526.
- Malter, J.S. (1989) *Science* **246**: 664-666.
- Mandon, E., Gomez Dumm, I. y Brenner, R. (1986) *Lipids* **21**: 401-404.
- Maniatis, T., Sambrook, J. y Fritsch, E.F. (1989) En *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- Manjunath, P. y Sairam, M.R. (1985) *Methods Enzimol., Peptide Action*, Part I. (Birnbauer, L. y O'Malley, B.W., eds.) pp. 725-735. Academic Press, London.

-
- Marais, R., Nguyen, O., Woodgett, J.R. y Parker, P.J. (1990) *FEBS Letts.* **277**: 151-155.
 - Marcus, A.J., Safier, L.B., Ullman, H.L., Islam, N., Broekman, M.J., Falck, J.R., Fischer, S. y von Schacky, C. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**: 2223-2229.
 - Marsh, J.M. (1975) *Adv. Cyclic. Nucl. Res.* **6**: 137-199.
 - Martin, B. y Graves, D.J. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**: 14545-14550.
 - Mauro, L. y Dixon, J. E. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**: 151-155.
 - McAllister, J.M. y Hornsby, P.J. (1987) *Endocrinology* **121**: 1908-1910.
 - McAllister, J.M. y Hornsby, P.J. (1988) *Endocrinology* **122**: 2012-2018.
 - McEney, M.W., Snowman, A., Trifiletti, R. y Snyder, S.H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 3170-3174.
 - McEney, M.W., Dawson, T., Verma, A., Gurley, D. y Snyder, S.H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 23289-23296.
 - McGuinness, T.L., Lai, Y., Greengard, P., Woodgett, J.R. y Cohen, P. (1983) *FEBS Letts.* **163**: 329-334.
 - McGuinness, T.L., Lai, Y. y Greengard, P., (1985) *J. Biol. Chem.* **260**: 1696-1704.
 - McKnight, G.S. (1991) *Curr. Opin. Cell. Biol.* **3**: 213-217.
 - McLean, M.P., Puryear, T.K., Khan, I., Azhar, S., Billheimer, J.T., Orly, J. y Gabori, G. (1989) *Endocrinology* **125**: 1337-1344.
 - McNamara, B. y Jefcoate, C.R. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **275**: 53-62.
 - McPhail, L.C., Clayton, C.C. y Snyderman, R. (1984) *Science* **224**: 622-625.

- Megli, F.M., De Lisi, A., van Amerongen, A., Wirtz, K. y Quagliariello, E. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **861**: 463-470.
- Mele, P., Dada, L.A., Paz, C., Cymeryng, C., Cornejo Maciel, M.F., Neuman, M.I., Finkielstein, C.V., Méndez, C. y Podestá, E.J. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1310**: 260-268.
- Mellon, S.H. (1994) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**:1003-1008.
- Mendelson C., Dufau M., Catt K. (1975) *Biochim. Biophys Acta* **411**: 222-230.
- Mertz, L. y Pedersen, R. (1989) *Endocr. Res.* **15**: 101-115.
- Mertz, L. y Pedersen, R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 15274-15279.
- Metz, S.A., Fujimoto, W.Y. y Robertson, R.P. (1982) *Endocrinology* **111**: 2141-2143.
- Mikami, K., Omura, M., Tamura, Y. y Yoshida, S. (1990) *J. Endocrinology* **125**: 89-96.
- Minegishi, T., Delgado, C. y Dufau, M. (1989) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1470-1474.
- Moger, W. (1991) *Endocrinology* **128**: 1414-1418.
- Montminy, M.R., Sevarino, K.A., Wagner, J.A., Mandel, G. y Goodman, R.H. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6682-6686.
- Mountjoy, K.G., Robbins, L.S., Mortrud, M.T. y Cone, R.D. (1992) *Science* **257**: 1248-1251.
- Mroteck, J.J. y Hall, P.F. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**: 891-896.

-
- Mukhin, A., Papadopoulos, V., Costa, E. y Krueger, K.E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9813-9816.
 - Muerhoff, A., Griffin, K., Johnson, E. (1992) *J. Biol. Chem* **267**: 19051-19053.
 - Murakami, K. y Routtenberg, A. (1985) *FEBS Letts.* **192**: 189-193.
 - Nabeshima, Y., Fujii-Kuriyama, Y., Muramatsu, M. y Ogata, K. (1984) *Nature* **308**: 333-338.
 - Nadler, M., Natarajan, R. y Stern, N. (1987) *J. Clin. Invest.* **80**: 1763-1769.
 - Nagy, L. y Freeman, D.A. (1990) *Endocrinology* **126**: 2267-2276.
 - Nairn, A.C., Hemmings, H. y Greengard, P.A. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 931-976.
 - Nakai, K. y Kanehisa, M. (1992) *Genomics* **14**: 897-911.
 - Nakamura, M., Watanuki, M. y Hall, P.F. (1978) *Mol. Cell Endocrinol.* **12**: 209-219.
 - Naor, Z. (1991) *Mol. Cell Endocrinol.* **80**: C181-C186.
 - Naor, Z., Kiesel, L., van der Hock, J. y Catt, K.J. (1985) *J. Steroid Biochem.* **23**: 711-717.
 - Neher, R., Milani, A. , Solano, A. y Podestá, E. J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 1727-1731.
 - Neufeld, E.J. y Majerus, P.W. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**: 2461-2467.
 - Ney, R.L., Ogata, E., Shimizu, N., Nicholson, W.E. y Liddle, G.W. (1965) *Structure-function relationships of ACTH and MSH analogues*. En: *Proceedings of the second International Congress of Endocrinology* (Taylor. S. ed) Amsterdam: Excerpta Medica Foundation, pp 1184-1191.

- Ney, R.L., Hochella, N., Grahame-Smith, D., Dexter, R. y Bulcher, R. (1969) *J. Clin. Invest.* **48**: 1733-1739.
- Nigg, E.A., Hilz, H., Eppenberger, H.M. y Dutly, F. (1985) *EMBO J.* **4**:2801-2806.
- Niidome, T., Kitada, S., Shimokata, K., Ogishima, T. e Ito, A. (1994) *J. Biol. Chem* **268**: 24719-24722.
- Nishizuka, Y. (1988) *Nature* **334**: 661-665.
- Nocito, M., Roy, G., Villar, L., Palacios, C., Serrano, A., Alvarez-Cermeño, J. y Gonzalez-Porqué, P. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1299**: 17-22.
- Ohba, T., Rennert, H., Pfeifer, S., He, Z., Yamamoto, R., Holt, J., Billheimer, J. y Strauss, J.F. (1994) *Genomics* **24**: 370-374.
- Ohno, Y., Yanagibashi, K., Yonezawa, Y., Ishiwatari, S. y Matsuba, M. (1983) *Endocrinol. Jpn.* **30**: 335-338.
- Ouimet, C., McGuinness, T.L. y Greengard, P. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 5604-5606.
- Papadopoulos, V., Mukhin, A.G., Costa, E. y Krueger, K.E. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 3772-3779.
- Papadopoulos, V., Berkovic, A., Krueger, K.E, Costa, E. y Guidotti, A. (1991a) *Endocrinology* **129**: 1481-1488.
- Papadopoulos, V., Nowzari, F. y Krueger, K.E. (1991b) *J. Biol. Chem.* **266**: 3682-3687.
- Papadopoulos, V. y Brown, A.S. (1995) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**: 103-110.
- Parissenti, A.M., Parker, K.L. y Schimmer, B.P. (1993) *Mol. Endocrinol.* **7**: 283-290.

- Parsons, T.F., Strickland, T.W. y Pierce J.G. (1985) *Methods Enzimol., Hormone Action*, Part I. (Birnbaumer, L. y O'Malley, B.W., eds.) pp. 736-749. Academic Press, London.
- Payet, M., Benabderrazike, M. y Gallo Payet, N. (1987) *Endocrinology* **121**: 875-880.
- Paz, C., Dada, L. A., Cornejo Maciel, M. F., Mele, P. G., Cymeryng, C. B., Neuman, M. I., Méndez, C. F., Finkielstein, C. V., Solano, A. R., Park, M., Fischer, W. H., Towbin, H., Scartazzini, R. y Podestá, E. J. (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**: 709-716.
- Paz, C. (1996). Tesis Doctoral. Fac. de Cs. Exactas y Naturales, UBA.
- Pedersen, R. y Brownie, A, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:1882-1886.
- Pedersen, R. (1984) *Endocr. Res.* **10**: 533-561.
- Pedersen, R. y Brownie, A. (1987) *Science* **236**: 188-190.
- Pedersen, R. (1987) *J. Steroid Biochem.* **27**: 731-735.
- Penhoat, A., Jaillard, C. y Sáez, J.M. (1993) *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **44**: 21-27.
- Perkins, L., Larsen, L. y Perrimon, N. (1992) *Cell* **70**: 225-236.
- Petersson, F., Andersson, R., Asonberg, A. y Hammar, M. (1988) *Int. J. Androl.* **11**:179-183.
- Pfeifer, S., Furth, E., Ohba, T., Chang, Y., Rennert, H., Sakuragi, N., Billheimer, J.T. y Strauss, J.F. (1993) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **47**: 167-172.
- Pfeuffer, E., Mollner, S. y Pfeuffer, T. (1991) . *Methods Enzimol.* **195**: 83-91.

- Pingel, J. y Thomas, M.L. (1989) *Cell* **58**: 1055-1065.
- Plesniak, L., Boegeman, S., Segelke, B. y Dennis, E.A. (1993) *Biochemistry* **32**: 5009-5016.
- Podestá, E.J., Dufau, M. y Catt, K. (1976a) *Molec. Cell Endocrinol* **5**: 109-122.
- Podestá, E.J., Dufau, M. y Catt, K. (1976b) *FEBS Letts.* **70**: 212-216.
- Podestá, E.J., Dufau, M., Solano, A. y Catt, K. (1978a) *J. Biol. Chem.* **235**: 8994-9001.
- Podestá, E.J., Dufau, M., y Catt, K. (1978b) *Biochemistry* **17**: 1566-1573.
- Podestá, E.J., Milani, A., Steffen, H. y Neher, R. (1979) *Biochem. J.* **180**: 355-363.
- Podestá, E.J., Milani, A., Steffen, H. y Neher, R. (1980) *Biochem. J.* **186**: 391-397.
- Podestá, E.J., Sánchez, M.L. y Solano, A.R. (1984) *Recent Progress in Cellular Endocrinology of the Testis.* **123**: 277-286.
- Podestá, E.J., Solano, A., Attar, R., Sánchez M.L. y Molina y Vedia, L. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 3986-3990.
- Podestá, E.J., Solano, A. y Sánchez, M.L. (1986) *Endocrinology* **119**: 989-997.
- Podestá, E.J., Solano, A. y Lemos, J. (1991) *J. Molec. Endocrinol.* **6**: 269-279.
- Pon, L.A. y Orme-Johnson, N.R. (1986a) *J. Biol. Chem.* **261**: 6594-6599.
- Pon, L.A., Hartigan, J.A. y Orme-Johnson, N.R. (1986b) *J. Biol. Chem.* **261**, 13309-13316.

- Privalle, C.T., Crivello, J.F. y Jefcoate, C.R. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 702-706.
- Puglielli, L., Rigotti, A., Greco, A., Santos, M. y Nervi, F. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 18723-18726.
- Qiu, Z., Carvalho, M. y Leslie, C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 24506-24513.
- Quinn, S., Cornwall, M. y Williams, G. (1987) *Endocrinology* **120**: 903-914.
- Rae, P., Gutman, U., Tsao, J. y Schimmer, B.P. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1896-1900.
- Raikhinstein, M., Zohar, M. y Hanukoglu, I. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1220**: 329-332.
- Ramachandran, J., Muramoto, K., Kenez-Keri, M., Keri, G., Buckley, D.I. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 3967-3970.
- Ramachandran, J. (1984) *Endocr. Res.* **10**: 347-363.
- Rehfeldt, W., Hass, R. y Goppelt-Struebe, M. (1991) *Biochem. J.* **276**: 631-636.
- Rennert, H., Amsterdam, A., Billheimer, J. y Strauss, J.F. (1991) *Biochemistry* **47**: 11280-11285.
- Resko, J.A., Norman, G.D., Neswender, G.D. y Spies, H.G. (1974) *Endocrinology* **94**: 128-135.
- Reynolds, L., Hughes, L., Louis, A., Kramer, R.A. y Dennis, E.A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1167**: 272-280.
- Rhee, S.G. y Choi, K. (1992) *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **26**: 35-60.

-
- Rice, D.A., Aitken, L.D., Vanderbark, G.R., Mouw, A.R., Franklin, A., Schimmer, B.P. y Parker, K.L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**:14011-14015.
 - Rice, D.A., Kirkman, M.S., Aitken, L.D., Mouw, A.R., Franklin, A., Schimmer, B.P. y Parker, K.L. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 11713-11720.
 - Robinson-Steiner, A.M. y Corbin, J.D. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**:1032-1040.
 - Roesler, W.J., Vanderbark, G.R. y Hanson, R.W. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**: 9063-9066.
 - Rommerts, F., Cooke, B. y van der Molen, H. (1974) *J. Steroid Biochem.* **5**:279-2859
 - Rommerts, F. y Cooke, B. (1988) en *New Comprehensive Biochemistry: Hormones and their actions* (Cooke, B., King, R. y van der Molen, H.J., eds.) Elsevier, Amsterdam. **2**: 163-191.
 - Rossier, M.F., Capponi, A. y Vallotton, M.B. (1988) *Mol. Cell Endocrinol.* **57**: 163-168.
 - Rossier, M.F., Capponi, A. y Vallotton, M.B. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 14078-14084.
 - Sackett, D.L. y Wolff, J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **888**: 163-170.
 - Sáez, J., Durand, P. y Cathiard, A. (1984) *Mol. Cell. Endocrinol.* **38**: 93-102.
 - Sáez, J. (1994) *Endocr. Rev.* **15**: 574-626.
 - Saffran, M., Schally, A.V. y Benfley, B.G. (1955) *Endocrinology* **57**: 439-444.
 - Sahyoun, N., Le Vine, H. y Cuatrecasas, P. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4311-4315.

-
- Sakai, Y., Yanase, T., Okabe, Y., Hara, T., Waterman, M.R., Takayanagi, R., Haji, M. y Nawata, H. (1994) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**: 1198-1201.
 - Sala, G., Hayashi, K., Catt, K.J. y Dufau, M. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**: 3861-3865.
 - Sandberg, K., Ji, H., Clark, A.J.L., Shapira, H. y Catt, K.J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 9455-9458.
 - Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.
 - Saruta, T., Cook, R. y Kaplan, M.N. (1972) *J. Clin. Invest.* **51**: 2239-2245.
 - Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, s., Iwai, N., Murray, J.J., Hasegawa, M., Matsuda, Y. e Inagami, T. (1991) *Nature* **351**: 230-233.
 - Sayers, G., Sayers, M.A., Fry, E.G., White, A. y Long, C. (1944) *Yale J. Biol. Med.* **16**:361-392.
 - Sayers, G., Sayers, M.A., Liang, T. y Long C. (1946) *Endocrinology* **38**:1-9.
 - Schwartz, J. y Lipmann, F. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**: 1996-2005.
 - Schwartzman, M., Abraham, N., Masferrer, J., Dunn, M. y McGiff, J.C. (1987) *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* **17A**: 78-83.
 - Schwartzman, M., Liberman, E. y Raz, A. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**: 2329-2333.
 - Schimmer, B.P., Ueda, K. y Sato, G.H. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**: 806-810.
 - Schulman, H. (1984) *J. Cell Biol.* **99**: 11-19.
 - Schulster, D. (1974) *Mol. Cell Endocrinol.* **1**: 55-64.

-
- Schulster, D., Richardson, M. y Palfreyman, J.W. (1974) *Mol. Cell Endocrinol.* **2**:17-29.
 - Schwyzer, R., Schiller, P., Seelig, S. y Sayers, G. (1971) *FEBS Letts* **19**: 229-231.
 - Scott, D.L., Otwinowski, Z., Gelb, M. y Sigler, P.B. (1990) *Science* **250**: 1563-1566.
 - Scott, D.L., White, S., Browning, J.L., Rosa, J.J., Gelb, M. y Sigler, P.B. (1991) *Science* **254**: 1007-1010.
 - Scott, J.D., Stofko, R.E., McDonald, J.R., Comer, J.D., Vitalis, E.A. y Mangili, J.A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 21561-21566.
 - Seelig, S., Sayers, G., Schwyzer, R. y Schiller, P. (1971) *FEBS Letts* **19**: 232-234.
 - Seelig, S. y Sayers, G. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* **154**:230-239.
 - Segaloff, D. y Ascoli, M. (1993) *Endocr. Rev.* **14**:324-347.
 - Sharp, J., White, D., Chiou, X., Goodson, T., Gamboa, G.C., McClure, D., Burgett, S., Hoskins, J., Skatrud, P.L., Sportsman, J.R., Becker, G.W., Kang, L., Roberts, E. y Kramer, R.M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 14850-14853.
 - Shenolikar, S. (1994) *Annu. Rev. Cell. Biol.* **10**: 55-86.
 - Shibata, H., Ogishima, T., Mitani, F., Suzuki, H., Murakami, M., Saruta, T. e Ishimura, Y. (1991) *Endocrinology* **128**: 2534-2539.
 - Shima, S., Mitsunaga, M. y Nakao, T. (1972) *Endocrinology* **90**: 808-814.
 - Shin S. y Sato G.H. (1971) *Biophys Res. Commun.* **45**: 501-507.
 - Shultz, L., Schweitzer, P.A., Rajan, T.V., Yi, T., Ihle, J.N., Matthews, R.J., Thomas, M.L. y Beier, D.R. (1993) *Cell* **73**: 1445-1454.

-
- Sibley, D.R., Benovic, J.L., Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1987) *Cell* **48**: 913-922.
 - Simpson, E.R. y Boyd, G.S. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**: 10-17.
 - Simpson, E.R. y Boyd, G.S. (1967) *J. Biochem.* **2**: 275-285.
 - Simpson, E.R., McCarthy, J.L. y Peterson, J.A. (1979) *J. Biol. Chem.* **253**: 3135-3139.
 - Singh, S. *et al* (1988) *Nature* **334**: 708-710.
 - Simon, M.I., Strathmann, M.P. y Gautam, N. (1991) *Science* **252**: 802-808.
 - Solano, A.R., Dada, L.A., Sardaños, M.L., Sánchez, M.L. y Podestá, E.J. (1987) *J. Steroid Biochem.* **27**: 745-751.
 - Solano, A.R., Dada, L.A. y Podestá, E.J. (1988) *J. Mol. Endocr.* **1**: 147-154.
 - Southern, E. M. (1975) *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
 - Stanley, K. (1983) *Nucleic Acids Res.* **11**: 4077-4091.
 - Steinberg, R., Cauthron, R.D., Symcox, M.M. y Shuntoh, H. (1993) *Mol. Cell Biol.* **13**: 2332-2341.
 - Stern, N., Yanagawa, N., Saito, F., Hori, M., Natajara, R., Nadler, J. y Tuck, M. (1993) *Endocrinology* **133**: 843-847.
 - Stevens, V.L., Xu, T. y Lambeth, J.D. (1993) *Eur. J. Biochem.* **216**: 557-563.
 - Stocco, D.M. y Kilgore, M.W. (1988) *Biochem. J.* **249**: 95-103
 - Stocco, D.M. y Chen, W. (1991) *Endocrinology* **128**: 1918-1926.
 - Stocco, D.M. y Clark, B.J. (1991) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **46**: 337-347.

- Stocco, D.M. y Ascoli, M. (1993) *Endocrinology* **132**: 959-967.
- Stocco, D.M. y Clark, B.J. (1993) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **46**: 337-347.
- Studier, F.W. y Mosfatti, B. (1986) *J. Mol. Biol.* **189**: 113-117.
- Studier, F.W., Rosenberg, A., Dunn, J. y Dubendorff, J.W. (1990) *Methods Enzymol.* **185**: 60-89.
- Sulimovici, S., Bartoov, B. y Lunenfeld, B. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **321**: 27-40.
- Sullivan, M., y Cooke, B. (1986) *Biochem. J.* **236**: 45-51.
- Sun, H. y Tonks, N.K. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**: 480-485.
- Svensson, L. T., Wilcke, M. y Alexson, S. E. H. (1995) *Eur. J. Biochem.* **230**: 813-820.
- Svensson, L. T., Engberg, S. T., Aoyama, T., Usuda, N., Alexson, S. E. H. y Hashimoto, T. (1998) *Biochem. J.* **329**: 601-608.
- Swanson, G.N., Hanesworth, J.M., Sardinia, M.F., Coleman, J.K.M., Wright, J.W., Hall, K., Millerwing, A., Stobb, J., Harding, E.C. y Harding, J.W. (1992) *Regul. Pept.* **40**: 409-419.
- Tabor, S. y Richardson, C.C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 47-67.
- Tait, J., Taut, S.A.S., Bell, J., Hyatt, P. y Williams, B.C. (1980) *J. Endocrinol.* **87**: 11-27.
- Takio, K., Smith, S., Krebs, E.G., Walsh, K. y Titani, K. (1984) *Biochemistry* **23**: 4200-4206.
- Tauton, O., Roth, J. y Pastan, I. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**: 1-7.

- Taylor, S.S., Buechler, J. y Yonemoto, W. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 971-1005.
- Temple, R. y Wolff, J. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**: 2691-2698.
- Timmermans, P., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.A. y Smith, R.D. (1993) *Pharmacol. Rev.* **45**: 205-251.
- Toner-Webb, J., van Patten, S., Walsh, D. y Taylor, S.S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 25174-25180.
- Tremblay, A. y Lehoux, J.G. (1992) *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* **41**: 799-808.
- Tremblay, A., Waterman, M.R., Parker, K.L. y Lehoux, G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 2245-2251.
- Trzeciak, W., Simpson, E., Scallen, T., Vahouny, G. y Waterman, M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 3713-3720.
- Tuckey, R.C. y Atkinson, H.C. (1989) *Eur. J. Biochem.* **186**: 255-259.
- Tuckey, R.C. (1992) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **42**: 883-890.
- Tugwood, J.D., Issemann, I., Anderson, R.G., Bundell, K., McPheat, W. y Green, S. (1992) *EMBO J.* **11**: 433-439.
- Tuls, J., Geren, L., Lambeth, J. y Millett, F. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 10020-10025.
- Turk, J., Colca, J., Kotagal, N. y McDaniell, M.L. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **794**: 125-136.
- Uhler, M.D., Carmichael, D., Lee, D.C., Chrivia, J., Krebs, E.G. y McKnight, G.S. (1986a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 1300-1304.

- Uhler, M.D., Chrivia, J. y McKnight, G.S. (1986b) *J. Biol. Chem.* **261**: 15360-15363.
- Vahouny, G.V., Chanderbhan, R., Noland, B.J., Irwin, D., Dennis, P., Lambeth, J.D. y Scallen, T. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**: 11731-11737.
- Vahouny, G.V., Dennis, P., Chanderbhan, R., Fiskum, G., Noland, B.J. y Scallen, T. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**: 509-515.
- van Amerongen, A., van Noort, M., van Beckhoven, J., Rommerts, F., Orly, J. y Wirtz, K. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1001**: 243-248.
- van Amerongen, A., Demel, R., Westerman, J. y J., Wirtz, K. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1004**: 36-43.
- van Etten, R. y Hickey, M. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* **183**: 150-159.
- van Noort, M., Rommerts, F., van Amerongen, A. y Wirtz, K. (1988) *Mol. Cell Endocrinol.* **56**: 133-138.
- van Voorhis, B., Dunn, M., Falck, J., Bhatt, R., van Rollins, M. y Snyder, G.D. (1993) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **76**: 1555-1559.
- Veldhuis, J. y Klase, P.A. (1982) *Endocrinology* **111**: 1-8.
- Verger, R., Mieras, M. y de Haas, G.H. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**: 4023-4034.
- Verma, A. y Snyder, S.H. (1989) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **29**: 307-322.
- Vernikos-Danellis, J. y Hall, M. (1965) *Nature* **207**: 766-768.
- Vlaskova, M. y Knepel, W. (1984) *Neuroendocrinology* **39**: 334-342.
- von Heijne, G. (1994) *Subcell. Biochem.* **22**: 1-9.

-
- Wada, H., Ohno, S., Kubo, K., Taya, C., Tsuji, S., Yonehara, S. y Suzuki, K. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**: 533-538.
 - Walsh, D.A. y Glass, D.B. (1991) *Methods Enzymol.* **201**: 304-316.
 - Wang, H. y Ascoli, M. (1990) *Molec. Endocrinol.* **4**: 80-90.
 - Warden, C. H., Mehrabian, M., He, K. Y., Yoon, M. Y., Diep, A., Xia, Y. R., Wen, P. , Svenson, K. L., Sparkes, R. S. y Lusic, A. J. (1993) *Genomics* **18**: 295-307.
 - Waterston, R., Martin, C., Craxton, M., Huynh, C., Coulson, A., Hillier, L., Durbin, R., Green, P., Shownkeen, R., Halloran, N., Metzstein, M., Hawkins, T., Wilson, R., Berks, M., Du, Z., Thomas, K., Thierry-Mieg, J. y Sulston, J. (1992) *Nature Genet.* **1**: 114-123.
 - Wery, J.P., Schevitz, R.W., Clawson, D., Bobbit, L., Dow, E., Gamboa, G., Goodson, T., Herman, R., Kramer, R., McClure, D., Mihelich, E., Putman, J., Sharp, J., Starck, D., Teater, C., Warrick, M. y Jones, N. (1991) *Nature* **352**: 79-82.
 - Wetsel, W., Khan, W., Merchenthaler, L., Rivera, H., Halpern, A., Phung, H.M., Negro-Villar, A. y Hannun, Y.A. (1992) *J. Cell Biol.* **117**: 121-133.
 - Whitebread, S., Mele, M., Kamber, B., y de Gasparo, M. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**: 284-291.
 - Whorton, A.R., Young, S.L., Data, J.L., Barchowsky, A. y Kent, R.S. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **712**: 79-87.
 - Wierenga, R.K. y Hol, W.G.J. (1983) *Nature* **302**: 842-844.
 - Wijkander, J. y Sundler, R. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**: 118-124.
 - Williams, G. y Braley, L. (1977) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **45**: 55-64

- Wilson, R. *et al.* (1994) *Nature* **368**: 32-38.
- Wilson, T.E., Mouw, A.R., Weaver, C.A., Milbrandt, J. y Parker, K.L. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**: 861-868.
- Witkowski, A., Witkowska, H. E. y Smith, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 379-383.
- Wolf, R.A. y Gross, R.W. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**: 7295-7303.
- Woodcock, E.A. y Jhonston, C.I. (1984) *Endocrinology* **115**: 337-341.
- Woodford-Thomas, T., Rhodes, J. y Dixon, J.E. (1992) *J. Cell Biol.* **117**: 401-414.
- Woodgett, J.R., Gould, K.L., Hunter, T. (1986) *Eur. J. Biochem.* **161**: 177-184.
- Yago, N. e Ichii, S. (1969) *J. Biochem.* **65**: 215-224.
- Yamamoto, R., Kallen, C., Babalola, G., Rennert, H., Billheimer, J.T. y Strauss, J.F. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 463-467.
- Yamauchi, T. y Fujisawa, H. (1993) *Eur. J. Biochem.* **132**: 15-21.
- Yamazaki, T., Higuchi, K., Kominami, S. y Takemori, S. (1996) *Endocrinology* **137**: 2670-2675.
- Yanagibashi, K., Ohno, Y., Kawamura, M. y Hall, P.F. (1988) *Endocrinology* **123**: 2075-2082.
- Yanagibashi, K., Ohno, Y., Nakamichi, N., Matsui, T., Hayashida, K., Takamura, M., Yamada, K., Tou, S. y Kawamura, M. (1989) *J. Biochem.* **106**: 1026-1029.
- Yoshimasa, T. *et al.* (1987) *Nature* **327**: 67-70.

- Yu, L. y Dennis, E.A. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 8757-8763.
- Zetterquist, O., Ragnarsson, U., Humble, E., Berglund, L. y Engursson, L. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**: 696-703.
- Zhang, B., Marcus, S., Sajjadi, F., Alvarez, K. Reddi, J., Subramani, S., Rachubinski, R. y Capone, J.P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7541-7545.
- Zhuo, S., Clemens, J., Stone, R. y Dixon, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 26234-26238.
- Zoller, M.J., Kerlavage, A. R. y Taylor, S.S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**: 2408-2412.



Dr. ERNESTO J. PODESTA
PROF. REG. TIT. DTO. BIOQ.
FAC. DE MEDICINA (UBA)

