

## Tesis de Posgrado

# Estudio del mecanismo de activación de la quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico en el hongo dimórfico *Mucor rouxii*

Pastori, Ricardo Luis

1983

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Pastori, Ricardo Luis. (1983). Estudio del mecanismo de activación de la quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico en el hongo dimórfico *Mucor rouxii*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1813\\_Pastori.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1813_Pastori.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Pastori, Ricardo Luis. "Estudio del mecanismo de activación de la quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico en el hongo dimórfico *Mucor rouxii*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1813\\_Pastori.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1813_Pastori.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACTIVACION DE  
LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE  
DE AMP CICLICO EN EL HONGO DIMORFICO  
MUCOR ROUXII

AUTOR: Ricardo Luis Pastori  
DIRECTOR: Dra. María Susana Di Bernardo de Passeron  
LUGAR DE TRABAJO: Departamento de Química Biológica  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (U.B.A.)

Tesis presentada para optar por el Título de

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

-1983-

1813  
Ej. 2

## AGRADECIMIENTOS

A la Directora de esta Tesis, Dra. Susana Di Bernardo de Passeron por brindarme la oportunidad de iniciarme en la investigación bioquímica y por sus enseñanzas, dedicación y apoyo constante en esta tarea.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Silvia Moreno, Nestor Kernén, Mauricio Seigelchifer, María L. Cantore, Cristina Paveto y Miguel Galvagno con los cuales he compartido gratos momentos de trabajo y camaradería.

A los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas por su generosa cooperación.

A los miembros del Departamento de Química Biológica por su desinteresada cooperación.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, a la Subsecretaría de Estado de Ciencia y Tecnología y a la Comisión Nacional de Energía Atómica por la ayuda económica brindada para poder realizar este trabajo.

Al personal de mantenimiento de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por su eficiente intervención para resolver diferentes problemas técnicos.

A los miembros del Programa de Regulación Hormonal y Metabólica (PRHOM, CONICET) por su estímulo y cooperación.

A Patricia Reynal de Harris por su eficiente colaboración en el área administrativa.

A la Sra. Alicia B. de Alcaráz y a las Srtas. Ema Balderramos y Noemí Argüello por haberme proporcionado una esmerada asistencia técnica.

Al Sr. Federico Rafael De Martino por su prolija labor dactilográfica y al Sr. Norberto Malarini y la Sra. Marcela Millara por la confección de los dibujos y gráficos que figuran en esta Tesis.

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

AMP <sub>c</sub>	3'-5' adenosina monofosfato cíclico
ATP	5' adenosina trifosfato
8-Az-AMP <sub>c</sub>	8-Azido-3'-5' adenosina monofosfato cíclico
Arg	Arginina
CM-Sephadex	Carboximetil Sephadex
cpm	cuentas por minuto
D.O.	densidad óptica
DEAE	dietilaminoetil
EDTA	etilendiamintetracetato
GMP <sub>c</sub>	3'-5' guanosina monofosfato cíclico
Gly	glicina
K	kilo Dalton
Leu	leucina
μmol	micromol
min	minutos
Mr	peso molecular
pmol	picomol
P	ortofosfato unido a proteína
P <sub>i</sub>	ortofosfato libre

Pipes	piperazina-N,N'-bis (2-ácido etanolsulfónico)
rpm	revoluciones por minuto
TCA	ácido tricloroacético
Tris	2-amino-2 (hidroximetil)-1,3 propanodiol
SDS	dodecilsulfato sódico
Ser	serina
Val	valina

## INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	1
I. FOSFORILACION Y DEFOSFORILACION DE PROTEINAS	2
II CLASIFICACION DE LAS QUINASAS DE PROTEINAS	4
A Quinasas de proteínas dependientes de $GMP_c$ .	5
B Quinasas de proteínas dependientes de $Ca^{2+}$ .	12
C Quinasas de proteínas dependientes de hemina.	15
D Quinasas de proteínas dependientes de ARN de doble cadena.	17
E Quinasas de proteínas dependientes del factor epidérmico de crecimiento (FEC).	18
F Quinasas de proteínas dependientes de políminas.	20
G Quinasas de proteínas independientes o sin modulador conocidos.	21
H Quinasas de proteínas dependientes de $AMP_c$ .	24
1- Metabolismo del $AMP_c$ .	25
2- Subunidad Regulatoria.	32
3- Subunidad Catalítica.	44
4- Autofosforilación	51
5- Mecanismo de activación de la quinasa de proteínas dependiente de $AMP_c$	53

III	AMP <sub>c</sub> y MUCOR ROUXII	59
IV	OBJETIVO DE LA TESIS	66
	<u>MATERIALES Y METODOS</u>	68
I	Lista de buffers utilizados.	69
II	PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO	70
II.1	Organismo.	70
II.2	Obtención de esporas y mantenimiento de la cepa.	70
II.3	Medio de cultivo.	72
II.4	Cultivos.	72
III	OBTENCION DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP <sub>c</sub> DE MUCOR.	72
IV	OBTENCION DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP <sub>c</sub> DE MUCOR.	75
V	PURIFICACION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP <sub>c</sub> DE MUCOR.	76
VI	OBTENCION DE LAS SUBUNIDADES CATALITICAS Y REGULATORIAS DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP <sub>c</sub> DE TIPO II DE CORAZON DE COBAYO.	77
VII	MEDICION DE LA ACTIVIDAD QUINASICA DE PROTEINAS.	79
VIII	MEDICION DE LA ACTIVIDAD RECEPTORA DE AMP <sub>c</sub> .	81

- VIII.1 Filtración por membranas de Nitrocelulosa .
- VIII.2 Equilibrio de diálisis.
- IX MARCACION POR FOTOAFINIDAD DE LA SUB-UNIDAD REGULATORIA DE LA HOLOENZIMA DE MUCOR .
- X ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.
- X.1 Preparación de los geles .
- X.2 Medición de actividades quinásicas y receptoras de AMP<sub>c</sub> en geles.
- X.3 Medición de la radiactividad en los geles .
- X.4 Determinación de pesos moleculares en geles de poliacrilamida.
- X.5 Autorradiografía de los geles.
- XI DETERMINACION Y CALCULO DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LA HOLOENZIMA Y DE SUS SUBUNIDADES.
- XI.1 Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa .
- XI.2 Filtración molecular por resinas de Sephacryl S-300.
- XI.3 Radio de Stokes.
- XI.4 Coeficiente de sedimentación.
- XI.5 Peso molecular.
- XI.6 Cociente friccional.
- XI.7 Parámetros de las proteínas marcadoras.

XII	OTRAS TECNICAS.	93
XII.1	Síntesis del ATP ( $\gamma$ -P <sup>32</sup> ).	93
XII.2	Dosaje de proteínas	93
XII.3	Determinación de las proteínas marcadoras en gradientes de sacarosa y geles.	95
XII.4	Medición de la radiactividad.	96
XIII	REACTIVOS.	97
	<u>RESULTADOS Y DISCUSION .</u>	99
I	PURIFICACION PARCIAL DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP <sub>c</sub>	100
II	DETERMINACION DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LA HOLOENZIMA Y DE SUS SUBUNIDADES.	101
II.1	Determinación de los coeficientes de sedimentación.	102
II.2	Determinación de los radios de Stokes.	104
II.3	Determinación del peso molecular.	104
II.4	Determinación del cociente friccional	106
III	MARCACION POR FOTOAFINIDAD DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP <sub>c</sub> DE M. ROUXII.	108
III.1	Control de la calidad del análogo radiactivo.	109

- III.2 Determinación de la  $A_{0.5}$  del 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) para la subunidad regulatoria de la quinasa de *M. rouxii*.
- III.3 Verificación del porcentaje de unión covalente formado en la fotólisis.
- III.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la subunidad regulatoria de la quinasa de *Mucor* con el 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) unido covalentemente.
- IV EXISTENCIA DE UN COMPLEJO TERNARIO HOLOENZIMA - AMP<sub>c</sub>.
- IV.1 Estudio de la interacción del AMP<sub>c</sub> con la holoenzima por filtración molecular.
- IV.2 Estudio de la existencia del complejo ternario utilizando gradientes de sacarosa.
- IV.3 Estudio de la existencia del complejo holoenzima-AMP<sub>c</sub> utilizando electroforesis en gels de poliacrilamida.
- IV.4 Estudio de la velocidad de disociación de los complejos holoenzima-AMP<sub>c</sub> y Subunidad regulatoria-AMP<sub>c</sub>.
- V COMPARACION DEL AMP<sub>c</sub> UNIDO A LA HOLOENZIMA Y A LA SUBUNIDAD REGULATORIA
- V.1 Actividad receptora de AMP<sub>c</sub> de la holoenzima, medida en condiciones disociantes y no disociantes
- V.2 Comparación entre la actividad receptora de AMP<sub>c</sub> medida por la técnica de filtración por membranas de nitrocelulosa y por equilibrio de diálisis.

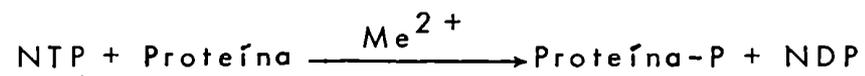
VI	EXISTENCIA DE DIFERENTES ESPECIES MOLECULARES EN EL MECANISMO DE DISOCIACION DE LA HOLOENZIMA.	137
VII	ESTUDIO DE LA INTERACCION ENTRE LAS SUBUNIDADES REGULATORIA Y CATALITICA DE LA QUINASA DE MUCOR	146
VII.1	Obtención de las subunidades regulatorias y catalíticas de Mucor y de corazón de cobayo	147
VII.2	Interacciones entre las subunidades regulatorias y catalíticas de ambos sistemas	153
VIII	MODELO DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP <sub>c</sub> DE MUCOR	160
	COMENTARIOS SOBRE EL MODELO	161
	CONCLUSIONES	166
	BIBLIOGRAFIA	171

## INTRODUCCION

## I. FOSFORILACION Y DEFOSFORILACION DE PROTEINAS

La fosforilación y defosforilación de proteínas era un fenómeno conocido desde hacía muchos años y fue como consecuencia de los trabajos realizados por KREBS y FISCHER (1, 2) que adquirió real importancia en la bioquímica. Actualmente se considera que al menos en sistemas eucariontes superiores es el principal mecanismo de regulación post-traduccional de procesos celulares que responden a estímulos hormonales y nerviosos.

El estado de fosforilación de una proteína dada, está controlado por la actividad de dos grupos de enzimas: las quinasas de proteínas y las fosfatasas de fosfoproteínas. La incorporación del grupo fosfato de un nucleósido trifosfato al aminoácido aceptor en el sustrato protéico esta catalizada por las quinasas de proteínas y puede representarse por la ecuación:



Siendo NTP en general ATP, aunque se conocen algunos casos en el cual el dador de fosfato es el GTP (3, 4)  $\text{Me}^{2+}$  representa un metal divalente, generalmente  $\text{Mg}^{2+}$  y

en ciertos casos  $Mn^{2+}$ .

La remoción del fosfato unido covalentemente a la proteína está catalizada por las fosfatasas de fosfoproteínas (5, 6) según la ecuación:



Un gran número de proteínas responsables del control de diferentes vías metabólicas y eventos regulatorios en la célula, son sustratos de las quinasas de proteínas, sufriendo como respuesta a esta modificación covalente, una profunda alteración en sus propiedades. Este cambio radical en la actividad de las proteínas como consecuencia de su fosforilación, se puede explicar por la alta energía libre de hidrólisis  $\Delta G^\circ$  que conserva la unión fosfato-proteína. La unión serina-fosfato en una proteína tiene un  $\Delta G^\circ = -6.5$  Kcal/mol. En las mismas condiciones la variación de la energía libre  $\Delta G^\circ$  de la unión serina-fosfato libre es de solo  $-2.9$  Kcal/mol (7). El clivaje de una unión proteína-fosfato proveería entonces una considerable cantidad de energía que podría ser utilizada para causar cambios conformacionales de importancia en la estructura proteica.

## II. CLASIFICACION DE LAS QUINASAS DE PROTEINAS.

Las quinasas de proteínas actúan en la célula como transductores, siendo las mediadoras de los efectos de moléculas, tales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{AMP}_c$  o  $\text{GMP}_c$  y que actúan como mensajeros de señales que provienen del exterior de la célula. Estas moléculas efectoras tienen la capacidad de unirse a las quinasas de proteínas para producir su posterior activación. La estructura de esta familia o grupos de quinasas de proteínas que responden a diversas moléculas activadoras, puede ser descrita con un esquema común que comprende dos zonas, dominios o subunidades en la molécula proteica, cada una con una función específica. Una zona, dominio o subunidad con capacidad receptora del efector y otra subunidad o zona catalítica, que es la responsable de la actividad fosforilante propiamente dicha. Según el grupo de quinasas de proteínas del cual se trate, dichas zonas o dominios pueden ocupar una porción de la misma cadena polipeptídica o ser cada una de ellas una subunidad diferente.

KREBS y BEAVO (8) hicieron una clasificación de las quinasas de proteínas según la molécula efectora de la cual

depende la actividad fosforilante. La tabla I muestra esta clasificación completada con algunos hallazgos posteriores (7).

TABLA I

Clasificación de las quinasas de proteínas

Categorí	Molécula efectora
A.	GMP <sub>c</sub>
B	Ca <sup>2+</sup>
C	ARN de doble cadena
D	Hemina
E	Factor epidérmico de crecimiento (FEC)
F	Poliaminas
G	Independientes o de modulador desconocido
H	AMP <sub>c</sub>

A- Quinasas de proteínas dependientes de GMP<sub>c</sub>

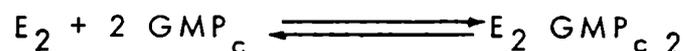
GREENGARD y KUO (9, 10) fueron los primeros en descubrir en artrópodos una actividad quinásica dependiente de la presencia de GMP<sub>c</sub>. Posteriormente fue encontrada

también en mamíferos (11, 12).

La purificación de las quinasas de proteínas dependientes de  $GMP_c$  de pulmón (13) y de corazón bovino (14), pusieron de manifiesto que la enzima es activada de manera específica por el nucleótido cíclico, estando las actividades catalítica y receptora de  $GMP_c$  en la misma cadena polipeptídica. Así lo demuestran los experimentos de proteólisis limitada con tripsina, que permiten obtener un fragmento de  $Mr=65$  K con ambas actividades. Si la proteólisis no es controlada se pueden obtener ambas actividades en fragmentos diferentes (15). La localización precisa de ambos dominios o zonas no ha sido aún dilucidada. Actualmente se sabe que la estructura polimérica de la enzima corresponde a la de un dímero de  $Mr=175-180$  K formado por dos subunidades iguales de  $Mr=79-82$  K, las cuales están unidas por puentes disulfuro (15, 17, 18).

Basándose en la estequiometría de la unión de  $GMP_c$  ( $H^3$ ) a la enzima homogénea eluída con el nucleótido radiactivo de dos tipos de columnas de afinidad; la 8-(2 aminoetil-amino- $AMP_c$  Sepharosa (20) y la 8-(2 aminoetil)-tio- $GMP_c$  Sepharosa (21), se concluyó que por cada mol de monómero

se une un mol de  $GMP_c$  según muestra la ecuación:



Los trabajos actuales están dirigidos al estudio de los sustratos específicos de esta enzima. Inicialmente se creyó que tendría una alta especificidad de sustratos dado los efectos fisiológicos opuestos que estaban asociados con un incremento del  $GMP_c$  utilizado, si se los compara con los desencadenados por un aumento en el contenido celular de  $AMP_c$  (22, 23). Sin embargo un análisis detenido de la especificidad de sustratos proteicos (24, 25) y de sustratos peptídicos (26) de la quinasa de proteínas dependientes de  $GMP_c$  muestra notables similitudes con la quinasa dependiente de  $AMP_c$ . Ambas enzimas pueden catalizar la fosforilación de proteínas tales como: histona, protamina, caseína, piruvato quinasa, fosfolamban, glucógeno sintetasa e inhibidor I de la fosfatasa de fosfoproteína, aunque la enzima dependiente de  $GMP_c$  lo hace con una velocidad menor que la dependiente de  $AMP_c$ . Otro grupo de sustratos proteicos de ambas enzimas son las proteínas  $G_1$  y  $G_2$  (27) del grupo de proteínas G del músculo liso, y la subunidad regulatoria de las quina

sas de proteínas dependientes de  $AMP_c$  de tipo I (28).

No se sabe si de todos estos sustratos alguno es fisiológico o si sólo son capaces de ser fosforilados in vitro. Los bajos niveles celulares de  $GMP_c$  hacen que el estudio de los efectos del  $GMP_c$  presente más dificultades que en el caso del  $AMP_c$ .

Hasta el momento no ha sido establecida unívocamente una relación precisa entre la fosforilación de algún sustrato proteico y un evento celular mediado por el  $GMP_c$ , si bien en trabajos recientes se observó que un número de proteínas no identificadas se fosforilan cuando preparaciones crudas de membrana de músculo liso y de linfocitos, son estimuladas con  $GMP_c$  y no cuando lo son con  $AMP_c$  (29-31).

La figura 1 muestra un modelo elaborado por FLOCKHART y CORBIN (7) sobre la estructura de esta enzima y su interacción con el  $GMP_c$ . El sitio AAS en ambas subunidades indica el sitio de autofosforilación, es decir de incorporación de un grupo fosfato intramolecularmente cuando la enzima es incubada con ATP en ausencia de  $GMP_c$ . S representa el sustrato proteico que va a ser fosforilado.

Este modelo se fundamenta en las siguientes evidencias

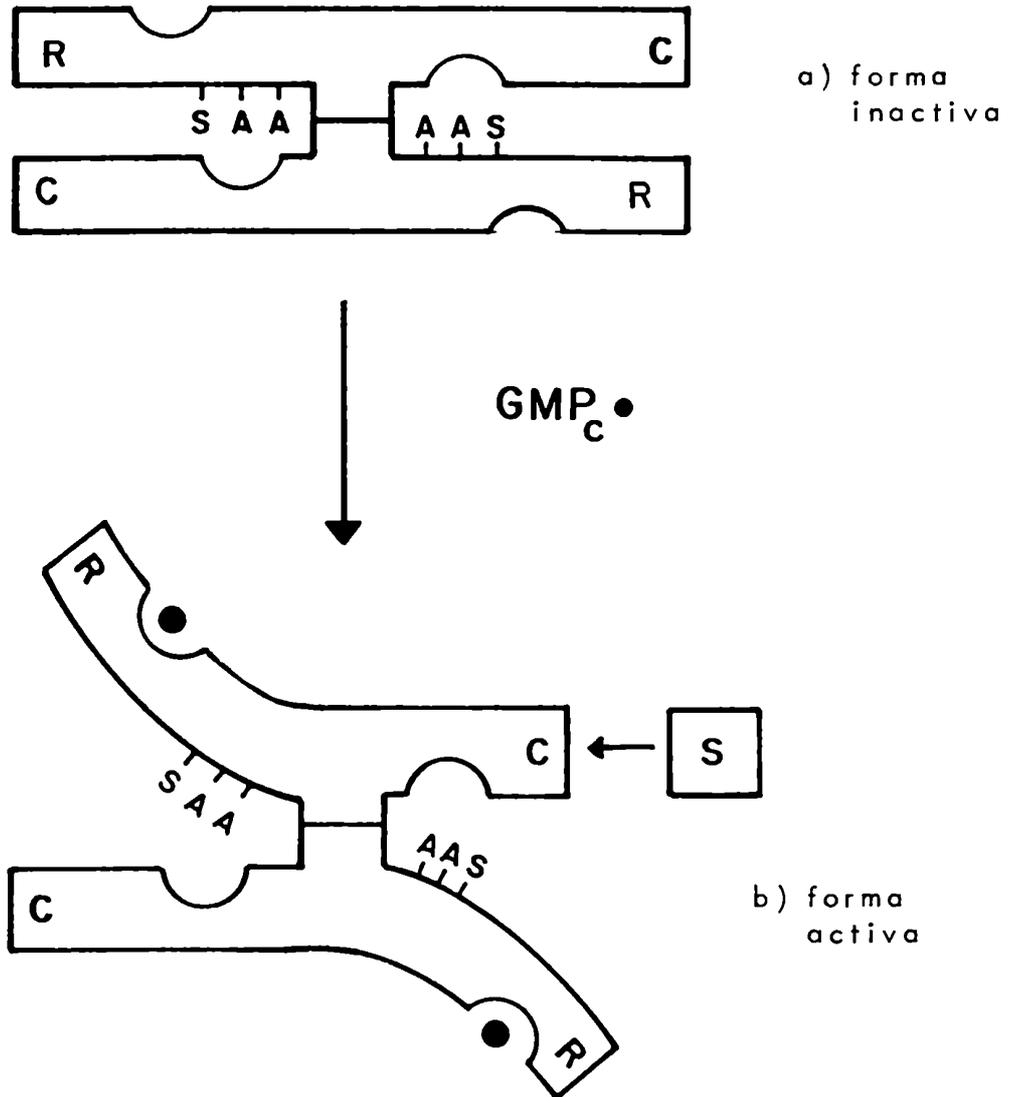


Figura 1: Modelo de FLOCKHART y CORBIN (7) para explicar la forma de interaccionar del GMP<sub>c</sub> con la quinasa de proteínas dependiente de GMP<sub>c</sub>

experimentales encontradas por diversos autores:

- 1.- El  $GMP_c$  estimula la actividad fosforilante pero inhibe la autofosforilación (17, 32).
- 2.- Bajas concentraciones de tripsina activan a la quinasa de proteína y anulan la propiedad de la enzima para autofosforilarse (17).
- 3.- El reactivo 1,3-butadiona que es un modificador del aminoácido arginina en las proteínas, bloquea la autofosforilación y estimula la acción fosforilante en ausencia de  $GMP_c$  solo si la modificación se hizo en presencia de  $GMP_c$ .
- 4.- El  $GMP_c$  no produce alteración del radio de Stokes.
- 5.- Utilizando el 5' p-fluorosulfonilbenzoil adenosina como marcador de afinidad del sitio de unión del ATP, la inhibición de la actividad fosforilante de la enzima no es afectada por el  $GMP_c$  (33).

En efecto, el modelo de la figura 1 es consistente con dichas evidencias experimentales. Cuando el  $GMP_c$  se une a la zona o dominio regulatorio de la molécula, se produce un cambio estérico en la misma, quedando la porción catalítica en condiciones de fosforilar al sustrato (forma b

de la figura 1). En la enzima activada, el sitio de autofosforilación cercano al dominio regulatorio no quedaría en una posición favorable para que la zona catalítica lo fosforile.

La activación por la tripsina también se explica con este modelo, ya que la tripsina ejerce su acción proteolítica sobre el dominio regulatorio, inhibiendo, por destrucción del sitio AAS, la posibilidad de fosforilación y dejando además expuesta la zona catalítica.

El reactivo 1,3-butadiona, modificador covalente del aminoácido arginina, bloquea lógicamente la autofosforilación al interaccionar con las argininas que están en el entorno de la serina fosforilable. Si esta modificación tiene lugar en presencia de  $GMP_c$  el dominio catalítico queda expuesto y como las argininas del sitio AAS quedan permanentemente modificadas al desaparecer el  $GMP_c$  activante, la molécula no puede volver a su estado original (forma a de la figura 1).

Finalmente si se utiliza el 5' p-fluorosulfonilbenzoil adenosina como marcador por afinidad del sitio del ATP en la zona catalítica, se anula irreversiblemente la capacidad fosforilante. El hecho de que esta modificación no se vea a

fectada por el  $GMP_c$ , corrobora que este sitio se encuentra expuesto en ambas formas de la enzima, la activada y la no activada.

#### B- Quinasas de proteínas dependientes de $Ca^{2+}$ .

Se conocen dos tipos de quinasas de proteínas que son activadas por  $Ca^{2+}$ ; la quinasa de la cadena liviana de la miosina y la fosforilasa quinasa. El laboratorio de PERRY (34) fue el primero en informar la fosforilación de la cadena liviana P, componente de la cabeza de la miosina. En un principio se pensó que la fosforilación era catalizada por la fosforilasa quinasa pero luego se descubrió que la responsable de la fosforilación era una enzima contaminante, que también era activada por concentraciones fisiológicas de  $Ca^{2+}$  (35). La quinasa de la cadena liviana de la miosina fue purificada a homogeneidad y se determinó su estructura, la cual resultó ser monomérica con un peso molecular de 80 K a 105 K según el músculo de donde se la aislara (36, 37).

Los principales sustratos de esta enzima in vivo son el  $ATP.Mg^{2-}$  como dador de fosfato y la cadena liviana de la miosina como sustrato proteico. Esta enzima al igual que

las otras puede autofosforilarse, precisando para ello de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina. El sitio de autofosforilación es el mismo que es fosforilado por la subunidad catalítica de la quinasa dependiente de  $\text{AMP}_c$  (38). La determinación de la secuencia primaria del sitio de autofosforilación de esta proteína obtenida de diversas fuentes (músculo esquelético de pollo y de conejo, buche de pollo y pechuga) muestran que tiene una estructura primaria común; Ser (p)-Asn-Val-Phe (7).

El componente regulatorio de esta enzima (37-39) tiene un  $\text{Mr}=17 \text{ K}$  y fue identificado como la calmodulina (inicialmente descubierta como una proteína termoestable que activaba una fosfodiesterasa de cerebro en presencia de bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ ) la cual es considerada actualmente como el principal receptor citoplasmático de  $\text{Ca}^{2+}$  en células superiores. El mecanismo de activación comprende primero la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a la calmodulina, y luego la combinación del complejo calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$  con la subunidad catalítica en una relación de uno a uno para formar de este modo la enzima capaz de fosforilar la cadena liviana de la miosina.

La fosforilasa quinasa es la enzima que convierte a la fosforilasa b a su forma activa a la fosforilasa a. Está formada por cuatro subunidades  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ , organizadas de forma tetramérica  $(\alpha, \beta, \gamma, \delta)_4$  con un Mr =  $1.3 \cdot 10^6$  (41, 42).

Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son fosforiladas por la subunidad catalítica de la quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> en dos residuos serínicos. Estas subunidades tienen una aparente función regulatoria, la subunidad  $\beta$  es fosforilada más rápido y está relacionada con un aumento en la actividad de la enzima. La subunidad  $\alpha$  no tiene relación directa con la actividad catalítica de la enzima, pero puede estimular la velocidad de defosforilación de la subunidad  $\beta$  (43).

La subunidad  $\gamma$  es la subunidad catalítica y fue purificada a homogeneidad a partir de músculo de conejo por tratamiento de la holoenzima con BrLi 1 M o ATP 100 mM a 0°C.

Aparentemente existe como un dímero de Mr = 42 K después de su aislamiento (44). La subunidad  $\delta$  tiene la capacidad de unir Ca<sup>2+</sup> y por determinación de la secuencia de aminoácidos fue identificada como la calmodulina (45).

Se desconoce el mecanismo de acción que sobre las subunidades  $\alpha$  o  $\beta$ , pueda tener la subunidad  $\delta$  luego de

unirse al  $\text{Ca}^{2+}$ .

Existe también un grupo muy interesante de quinasas de proteínas, ampliamente distribuidas en tejidos mamíferos, que son dependientes de la presencia de fosfolípidos y activables por  $\text{Ca}^{2+}$ .

Estas quinasas se activan por asociación reversible con fosfolípidos de la membrana en presencia de concentraciones micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  (46 - 48).

#### C- Quinasas de proteínas dependientes de hemina.

Al estudiar la síntesis de proteínas en reticulocitos de conejo y en sus lisados se observó que era dependiente del agregado de hemina (49). En un lisado sin agregado de hemina, la síntesis de proteínas tiene lugar por algunos minutos y luego decae abruptamente. Además esta inhibición de la síntesis proteica está caracterizada por la rápida desagregación de los polirribosomas (50). Esta inhibición tiene lugar a nivel de la iniciación de la síntesis de proteínas y es debida a la actividad de una quinasa de proteínas que fosforila específicamente la menor de las subunidades del factor de iniciación 2, el eIF-2 $\alpha$  (51, 52) impidiendo la

formación del complejo ternario eIF2-GTP-Met.<sub>t</sub>RNA y la subsiguiente unión a la subunidad ribosomal 40 S. La hemina actúa como un modulador negativo de la actividad de esta quinasa de proteínas, es decir su presencia inhibe la actividad fosforilante de la enzima y por lo tanto funciona la síntesis proteica. Esta quinasa de proteína ha sido designada como IRH (Inhibidor regulado por hemina) o RCH (Represor controlado por hemina) (53).

Este IRH o RCH ha sido purificado a homogeneidad y presenta un Mr= 80-95 K (53).

En ausencia de hemina el IRH es activado a partir de una forma inactiva (54). Existen evidencias indirectas que la conversión de la forma inactiva a la activa involucra un cambio conformacional (54) y que la hemina bloquea la conversión uniéndose a la especie inactiva (55).

Del tratamiento del IRH con reactivos sulfhidrúlicos se obtiene una forma de la enzima conocida como IRH irreversible, dado que no puede ser inhibido por la hemina (56). Ambas formas tienen pesos moleculares similares y presentan una cinética de inhibición de la síntesis proteica que es bifásica. La hipótesis de que el AMP<sub>c</sub> pudiera afectar al sisteu

ma por interacción de la subunidad regulatoria de la quinasa de proteína dependiente de  $AMP_c$  con la quinasa de  $eIF2\alpha$  dependiente de hemina ha sido totalmente descartada (57) y la inhibición que ocurre a altas concentraciones de  $AMP_c$  (10 mM) parece ser debida a un efecto de competición con el ATP (53).

#### D- Quinasas de proteínas dependientes de ARN de doble cadena.

Las quinasas de proteínas dependientes de ARN de doble cadena revisten un interés particular por el papel que tienen en la acción antiviral en células tratadas con interferón. Las primeras evidencias experimentales de su existencia se tuvieron cuando se vió que el citoplasma de células infectadas por poliovirus podía inhibir la síntesis de proteínas en lisado de reticulocitos. Subsecuentemente se demostró que el ARN de doble cadena de origen viral inhibía la iniciación de las cadenas polipeptídicas (58).

FARRELL (59) en 1977 descubrió que la inhibición se debía a la activación de una proteína quinasa que fosforilaba la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación 2  $eIF2$ , en un si-

tio que parece ser el mismo que fosforila la quinasa dependiente de hemina (60).

La enzima se purificó a homogeneidad a partir de lisados de reticulocitos de conejo y tiene un peso molecular de 67-70 K (61, 62). No se conoce el mecanismo por el cual el ARN de doble cadena activa a la quinasa de proteína, aunque en un primer paso el ARN de doble cadena se uniría a la quinasa (61-62).

#### E- Quinasas de proteínas dependientes del factor epidérmico de crecimiento (FEC).

El factor epidérmico de crecimiento (FEC), es una hormona peptídica mitogénica, es decir está íntimamente ligada a los procesos bioquímicos que llevan a la célula a crecer y a multiplicarse. Este factor se une a receptores específicos en la membrana de la célula e inicia un número diverso de respuestas celulares (63).

Algunas de estas ocurren inmediatamente a la unión de la hormona, cuando todavía está en la superficie de la célula, otras pueden requerir internalización o degradación del complejo hormona receptor. Una respuesta de mucho in -

terés es la estimulación rápida de la fosforilación de un número de proteínas asociadas a la membrana (64). Esta respuesta ha sido observada en diferentes líneas de células en cultivo (65-67).

El sistema de quinasa de proteínas dependientes de FEC más estudiado es el de las células A431, una línea celular de carcinoma epidérmico humano. Esta línea es particularmente útil por el gran número de receptores de FEC que tienen sus membranas. El mecanismo por el cual el FEC estimula la fosforilación aún no es conocido. Una particularidad de esta quinasa es que fosforila grupos tirosinas en el sustrato proteico, al igual que las quinasas de proteínas virales que se describen más adelante (68).

La actividad receptora de FEC y la actividad de quinasa de proteínas tienen diferentes estabilidades al calor (65) y diferente sensibilidad a la N-etilmaleimida (69), sugiriendo que son moléculas diferentes. Sin embargo la actividad quinásica copurifica con la actividad receptora de FEC en columna de afinidad de FEC unida covalentemente a una resina. Cuando el eluido de esta columna, se analiza por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS apa -

recen dos bandas principales de  $M_r = 170$  y  $150$  K, dependiendo de las cantidades relativas de cada proteína del método utilizado para aislarlo (69-70). Si este complejo receptor-quinasa se somete a electroforesis en condiciones no desnaturalizantes o a una cromatografía de lentil-lectina o a inmunoprecipitación con antisuero preparado contra la banda de  $M_r = 170$  K aislada de un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, copurifican las actividades quinásica y receptora de FEC, lo cual sugiere que ellas forman una sola molécula o están fuertemente asociadas (69).

Esta hipótesis se ve reforzada con los experimentos de marcación por afinidad usando 5-p-fluorosulfonilbenzoil-(8-C<sup>14</sup>) adenosina. Se observa que paralelamente a la inhibición de la actividad quinásica estimulable por FEC, hay incorporación de 5-p-sulfonilbenzoil (8-C<sup>14</sup>) adenosina en las bandas de  $M_r = 170$  y  $150$  K (69). Análogamente al sistema receptor del FEC, recientemente se descubrió que el receptor de la insulina, es él mismo una quinasa detirosina (71).

#### F- Quinasas de proteínas dependientes de poliaminas.

A partir de 1970 se produjo un gran incremento en

el número de estudios que se encararon sobre las poliaminas, en células eucariotas y procariotas y en sistemas in vitro. En estos trabajos se investigó su interacción sobre los ácidos nucleicos, enzimas y polímeros de todas clases. Se encontró que las poliaminas naturales alifáticas, espermina, putrescina y espermidina tienen efectos reguladores sobre un gran número de procesos celulares, tales como: ensamble viral, estructura y síntesis de ADN, actividades enzimáticas, procesos de transcripción y traducción, etc. (72).

KUEHN et al. (73) identificaron y caracterizaron u-na quinasa de proteínas de núcleos y nucleolos de Physarum polycephalum que fosforila una proteína no histónica de Mr= 70 K de manera específica. Esta actividad quinásica es depenudiente de la presencia de espermidina y espermina. Posteriormente los mismos autores aislaron una enzima con caracterís-ticas similares de espermatozoides de epidídimo bovino (74).

#### G- Quinasas de proteínas independientes o sin modulador co- nocidos.

En este grupo están incluídas todas aquellas quina-sas de proteínas a las que aún no se les encontró un modula-

dor de su actividad y que se agrupan con el término de independientes o asociadas al nombre del sustrato que fosforilan. Tal es el caso de la quinasa de piruvato dehidrogenasa. Esta enzima en células de mamíferos es exclusivamente mitocondrial y cataliza la fosforilación en tres sitios de la piruvato decarboxilasa de un modo muy específico (75).

Otras quinasas de proteínas incluídas en este grupo son aquellas que tienen mayor preferencia por caseína que por histona como sustrato. Han sido purificadas quinasas de caseína de diversas fuentes tales como: levadura, células de tumor ascítico, hígado de rata y reticulocitos de conejo (7). Estas quinasas se denominan I y II según el orden de elución de una cromatografía en DEAE-celulosa, por analogía a las quinasas dependientes de AMP<sub>c</sub>, y son diferentes en su estructura polimérica y especificidad por el nucleósido trifosfato (7). Aún no se conoce la función que cumplen en el metabolismo celular.

Recientemente fue descubierta una nueva clase de quinasas de proteínas que fosforilan residuos de tirosina en los sustratos proteicos (76). La fosfotirosina no había sido detectada como constituyente de proteínas hasta que se ob-

servó que el aminoácido fosforilado por ciertas proteínas transformantes de origen viral era tirosina. Tal es el caso de los productos del gen VSA (virus de sarcoma de aves (76) y del RSV (virus de sarcoma de Rous y del VSF (virus de sarcoma felino (7)).

Las transformaciones malignas del VSA se deben a una proteína que es un producto del gen src y que se la conoce como pp60<sup>src</sup> (77, 78). Una gran variedad de experimentos indican que la pp60<sup>src</sup> es una quinasa de proteínas capaz de fosforilar proteínas en un residuo tirosina. Las células normales tienen un gen, el sarc, cuyo producto es una proteína análoga a la pp60<sup>src</sup>, llamada pp60<sup>sarc</sup> la cual también tiene actividad fosforilante de tirosina (79). La cantidad de fosfotirosina presente en las proteínas de células transformadas por RSV se incrementa de cinco a diez veces sobre la de células normales (80). La pp60<sup>src</sup> es ella misma una fosfoproteína que contiene dos sitios fosforilables. Una serina localizada en la parte media de la cadena polipeptídica y que puede ser fosforilada por quinasas de proteínas dependiente de AMP<sub>c</sub> y una fosfotirosina localizada en el extremo carboxilo terminal de la proteína (81). Ambos sitios de fosfori

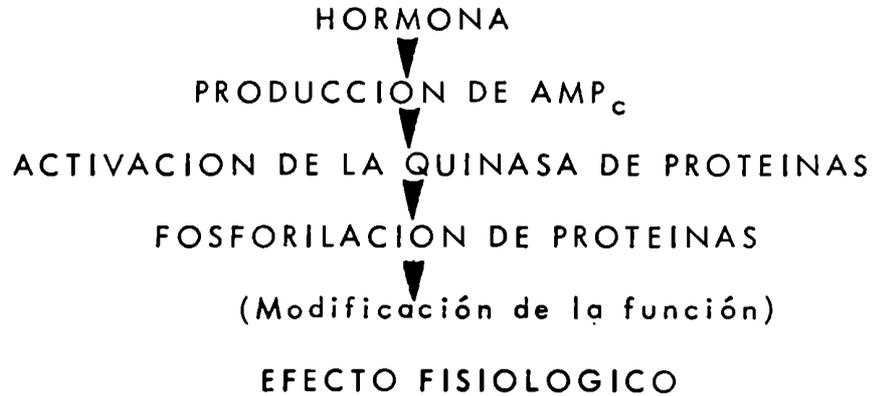
lación parecen regular la actividad enzimática. En extractos libres de células esta quinasa de proteína es capaz de fosforilar muchos sustratos, sin embargo in vivo pocos sustratos han sido identificados (81). Uno de éstos es la vinculina que es una proteína de Mr= 130 K asociada a las placas de adhesión celular y otras dos proteínas de embriones de pollo de 46 K y 28 K (82) que son fosforiladas cuando se infectan los mismos con RSV, y que fueron identificadas como las enzimas glucolíticas: enolasa y fosfoglicerato mutasa respectivamente.

No obstante que el fosfato unido a la tirosina representa sólo el 0.05% del total del fosfato resistente a la hidrólisis ácida en las proteínas de células animales, las quinasas de proteínas específicas para tirosina pueden ser una clase muy importante de enzimas regulatorias dado el papel que tienen en algunos tipos de transformaciones virales y posiblemente en otros mecanismos de transformación neoplásica de las células.

H- Quinasas de proteínas dependientes de AMP<sub>c</sub>

## 1- Metabolismo del AMP<sub>c</sub>

En 1957 SUTHERLAND (83), trabajando en el metabolismo del glucógeno, descubrió que el efecto activante de la epinefrina y del glucagón sobre la fosforilasa era debido a una molécula pequeña y termoestable, que resultó ser el AMP<sub>c</sub>. Posteriormente, el mismo SUTHERLAND (84) le asignó el papel de segundo mensajero, siendo el primer mensajero las hormonas encargadas de llevar la información desde el tejido donde se producen hasta la célula receptora. El segundo mensajero o AMP<sub>c</sub>, transmite esa información a la maquinaria celular. Las hormonas peptídicas, las catecolaminas y las prostaglandinas modifican los niveles intracelulares de AMP<sub>c</sub>. Por otra parte el AMP<sub>c</sub> y las quinasas de proteínas están presentes en concentraciones similares en todos los tejidos de mamíferos, aún en aquellos en los cuales el metabolismo del glucógeno es de poca importancia (85). Estos hechos llevaron a postular el siguiente esquema para el proceso de regulación hormonal de funciones celulares dependientes de AMP<sub>c</sub> (86):



El primer paso en este proceso es la unión de la hormona a un receptor específico que se encuentra en la superficie externa de la membrana plasmática. Esta interacción hormona-receptor lleva a la activación de la adenilato ciclasa. Esta enzima es la que cataliza la síntesis de  $AMP_c$  según la siguiente reacción  $ATP \xrightarrow{Mg^{2+}} AMP_c + PP_i$ . Las ciclasas de eucariontes superiores utilizan  $Mg^{2+}$ , mientras que las de organismos inferiores utilizan  $Mn^{2+}$ .

Salvo raras excepciones la adenilato ciclasa se encuentra asociada a la membrana citoplasmática (87). Como consecuencia de la activación de la adenilato ciclasa se produce un aumento de los niveles intracelulares de  $AMP_c$  y por consiguiente la activación de la quinasa de proteínas dependiente de  $AMP_c$ . Esto produce la fosforilación de algún sus-

trato a consecuencia de lo cual se modifica su función y por lo tanto hay un efecto fisiológico determinado. Las otras enzimas que regulan el metabolismo del AMP<sub>c</sub> son: la fosfodiesterasa (88, 89) que es la que cataliza la degradación del AMP cíclico según la reacción:



y la fosfatasa de fosfoproteínas que cataliza la hidrólisis del grupo fosfato en el sustrato proteico revirtiendo entonces el efecto fisiológico causado originalmente por la acción hormonal (5, 6).

Una predicción obvia inmediata de este modelo es que debe existir un gran número de sustratos para las quinasas de proteínas dependientes de AMP<sub>c</sub>, para explicar la gran diversidad de la acción hormonal en los diferentes tejidos. KREBS (90) propuso un número de requisitos que deben cumplirse para decidir si un efecto particular del AMP<sub>c</sub> es mediado por fosforilación proteica o no.

Los criterios de KREBS son los siguientes:

1) El tipo de célula involucrado en el efecto del AMP<sub>c</sub> con

tiene una quinasa de proteínas.

- 2) Existe un sustrato proteico que tiene una relación funcional con el proceso mediado por el  $AMP_c$ .
- 3) La fosforilación del sustrato altera su función in vitro.
- 4) El sustrato proteico se modifica in vivo en respuesta al  $AMP_c$ .
- 5) Existe una fosfatasa de fosfoproteínas capaz de revertir el proceso.

Hay tres efectos del  $AMP_c$  que hoy ya son clásicos para los cuales se cumplen todos los criterios anteriores: 1) la aceleración de la glucógenolisis, proceso en el cual ya ha sido demostrado la cadena de fosforilaciones que llevan a la activación de la glucógeno fosforilasa, 2) la inhibición de la síntesis de glucógeno por inactivación de la glucógenosintetasa (91-93) y 3) aumento de la lipólisis en tejido adiposo por activación de la lipasa (94).

Del grupo de las quinatas de proteínas descriptas hasta el presente, la que ha sido más extensa y exhaustivamente estudiada es la dependiente de  $AMP_c$ . Este tipo de enzima fue descripta por primera vez en 1968 (95, 96). En organis -



La distribución relativa de estas dos isoenzimas varía de especie en especie y de tejido en tejido (99). Recientemente se describió un subtipo de isoenzima II que es inmunodiferenciable, presente básicamente en el sistema nervioso central y en células neuroendocrinas (100).

Las diferentes propiedades físicas y químicas de las quinasas I y II están dadas por las distintas estructuras de las subunidades regulatorias que las integran ( $R_I$  y  $R_{II}$  respectivamente), siendo la subunidad catalítica la misma en las dos isoenzimas.

Las numerosas quinasas de proteínas dependientes de  $AMP_c$  que han sido caracterizadas, independientemente de su origen, muestran una gran similitud respecto de propiedades que se relacionan con la función biológica, tales como afinidad por el  $AMP_c$  y especificidad de sustrato.

Existen numerosos ejemplos en la literatura que muestran la semejanza de diferentes quinasas de proteínas (101-102). Refuerza esta hipótesis los experimentos en los que se demuestra la actividad de la enzima de un tejido sobre sus sustratos de otros tejidos y otros en los cuales se reconstituyen holoenzimas utilizando subunidades catalíticas y regulatorias

de diferente origen (102-104). La mayoría de las enzimas estudiadas tienen un peso molecular que oscila entre 140 y 160 K y un coeficiente de sedimentación de 6.8-7 S, (105-106). En eucariontes inferiores el número de trabajos que existen sobre estas enzimas es considerablemente menor, aunque en los últimos años se observa un interés creciente por el estudio de las enzimas en estos sistemas. Han sido descritas actividades quinásicas dependientes de AMP<sub>c</sub> y receptora de AMP<sub>c</sub> en varios organismos eucariontes inferiores. En Neurospora crassa (107-108) se describe una quinasa de proteínas dependiente de AMP<sub>c</sub> soluble de Mr= 118 K de estructura polimérica RC, con un peso molecular de 55 K para C y 57 K para la subunidad regulatoria. En Blastocladiella emersonii (109-112) existe solo una quinasa con características de las quinastas del tipo II en la fracción citosólica. En Coprinus macrorhizus (113-114) se describió en los extractos de micelio del hongo una actividad quinásica dependiente de AMP<sub>c</sub>, separable por filtración en geles de otras actividades quinásicas independientes del nucleótido cíclico. En levadura (115) se purificó unas 2.000 veces una quinasa de proteínas dependiente de AMP<sub>c</sub> de Mr= 230 K con una estructura polimérica

$R_2C_2$ . En Dictyostelium discoideum se detectaron dos quinasas de proteínas en los primeros estadios de su desarrollo (116) y en el estadio terminal de la diferenciación solo una con propiedades similares a las de la isoenzima I de eucariontes superiores (117). En Mucor rouxii (118-119) se describió una quinasa dependiente del  $AMP_c$  soluble en ambas formas micelio y levadura con algunas propiedades de las isoenzimas del tipo II, pero con ciertas particularidades respecto del comportamiento frente al  $AMP_c$ .

## 2 - Subunidad Regulatoria.

Las diferencias entre las propiedades físicas y químicas de las quinasas de proteínas I y II están dadas principalmente por diferencias existentes en las subunidades regulatorias (98, 120, 121). Mientras que las subunidades catalíticas son muy similares independientemente de su origen, las subunidades regulatorias difieren significativamente en sus pesos moleculares, fuerza iónica con la cual se eluyen de una columna de DEAE-celulosa, determinantes antigénicos (120) así como también en sus mapas peptídicos (121). La subunidad  $R_1$  tiene un tamaño uniforme en casi todos los tejidos de ma-

míferos con un  $Mr = 49 \text{ K}$  (122). Por el contrario la subunidad regulatoria  $R_{II}$  exhibe una cierta microheterogeneidad, aunque la forma predominante en la mayoría de las especies es la de  $Mr = 54 \text{ K}$  (122). WEBER et al. (123) identificaron por criterios inmunológicos una proteína de peso molecular  $50 \text{ K}$  como la única proteína receptora de  $AMP_c$  del tipo II en diversos tumores humanos. Posteriormente este mismo grupo la aisló en presencia de inhibidores de proteólisis y la caracterizó (124).

En los últimos años la purificación a homogeneidad de subunidades regulatorias de ambos tipos (I y II) de diversas fuentes permitió encarar su estudio estructural y de esta forma se pudo avanzar en la dilucidación del aspecto molecular de la activación de las quinasas de proteínas dependientes del  $AMP_c$ .

En contraste con la subunidad catalítica, la subunidad regulatoria es sumamente sensible a la degradación proteolítica (125-126). Sin embargo esta labilidad que por un lado dificulta enormemente la purificación de las mismas, proporcionó una herramienta muy útil para romper la molécula en diferentes fragmentos funcionales. La proteólisis produ

cida utilizando diversas proteasas, la caracterización de los fragmentos obtenidos y su relación con su estructura nativa, ha servido para definir la estructura general y funcional de zonas o dominios regulatorios en la molécula. TAYLOR (125), purificó a homogeneidad las subunidades regulatorias de las quinasas de proteínas I y II de músculo porcino. Este autor encontró que no obstante las diferencias estructurales existentes entre ellas, su comportamiento frente a la acción de las proteasas es muy similar.

Luego de someter a la subunidad regulatoria I a una proteólisis en condiciones controladas se generan dos fragmentos principales (127). El fragmento mas grande tiene un  $M_r = 35$  o  $31$  K según se emplee termolisina o quimiotripsina, y corresponde al extremo COOH terminal de la cadena polipeptídica y aunque retiene la capacidad receptora de  $AMP_c$ , no tiene la capacidad de dimerizarse con otra subunidad regulatoria ni la de inhibir la actividad enzimática de la subunidad catalítica. El otro fragmento corresponde al grupo  $NH_2$  terminal de la cadena nativa. Tiene un  $M_r = 11$  a  $12$  K y contiene la región de interacción para formar el dímero. No se obtiene el fragmento de  $31-35$  K cuando se somete a pro-

teólisis la holoenzima en lugar de la subunidad regulatoria, sugiriendo que este sitio se encuentra menos expuesto cuando la subunidad regulatoria se halla unida a la subunidad catalítica. En un trabajo posterior el mismo autor, demostró que el dímero que constituye la subunidad regulatoria en la isoenzima I está compuesto por dos protómeros unidos covalentemente por una unión disulfuro intercatenaria (128). Esta unión disulfuro está asociada al fragmento que corresponde a la región  $\text{NH}_2$  terminal de la cadena polipeptídica.

En la figura 2 se presenta un esquema de los fragmentos proteolíticos de la subunidad R del tipo I.

Los primeros estudios de la estequiometría de la unión del  $\text{AMP}_c$  a la subunidad regulatoria, dieron falsos resultados debido a un artificio introducido por el método de medición de la capacidad receptora de  $\text{AMP}_c$ . Posteriormente (98) se estableció que cada protómero une dos moléculas de  $\text{AMP}_c$ , dando un total de cuatro moles de  $\text{AMP}_c$  por mol de subunidad regulatoria. Paralelamente dos grupos (98, 129) mostraron evidencias de la existencia de dos poblaciones diferentes de sitios de unión del  $\text{AMP}_c$  a la proteína reguladora. Estos sitios conocidos como sitios 1 y 2 están presentes en la

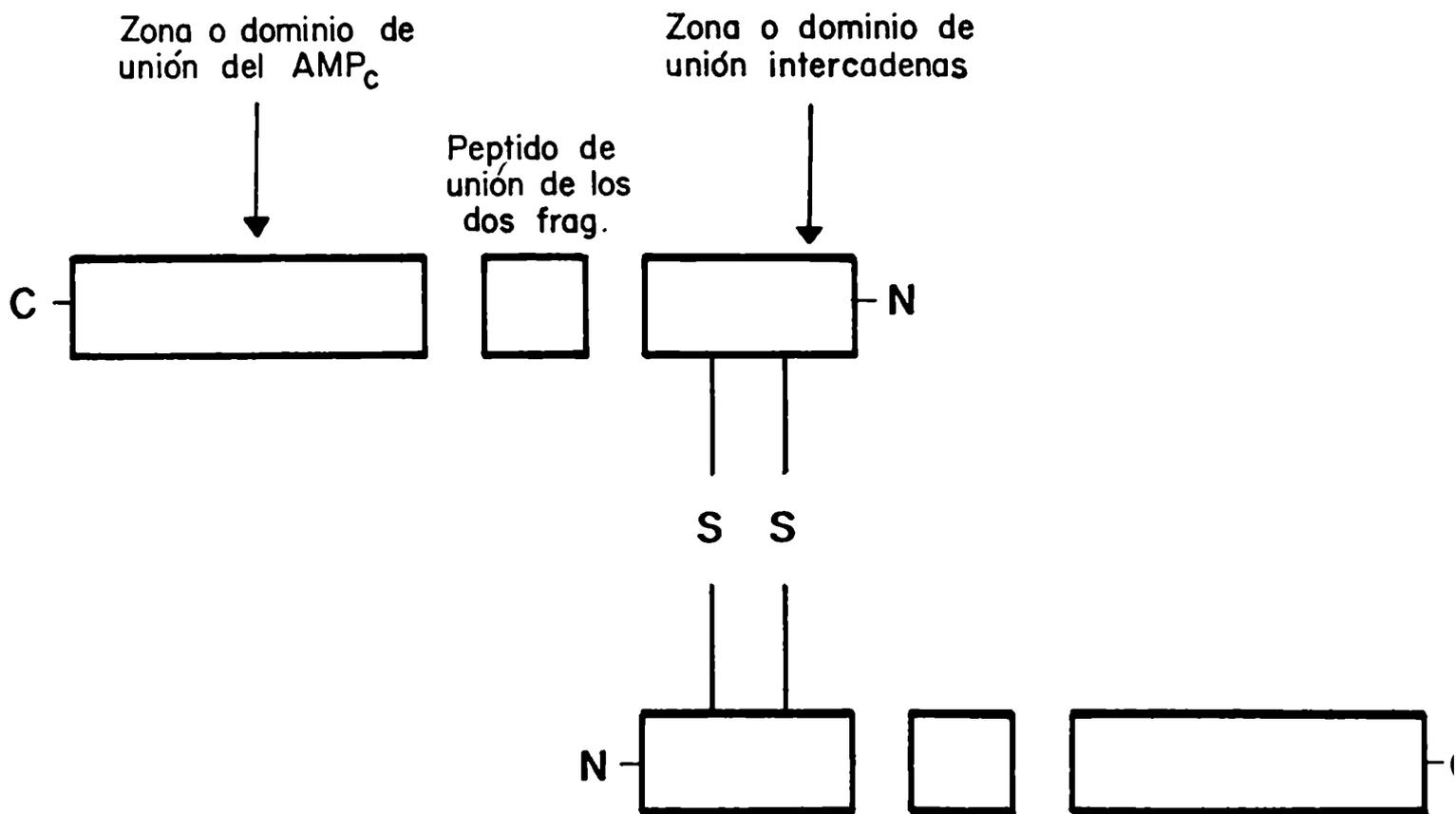


Figura 2: Esquema que muestra los diferentes fragmentos producidos al proteolizar la subunidad reguladora en diferentes condiciones (120-121).

mayoría de las isoenzimas I y II conocidas (130). Los estudios de disociación del complejo R-AMP<sub>c</sub> (131) indican que los sitios 1 y 2 de una isoenzima, son muy similares o tal vez iguales a los sitios 1 y 2 de la otra isoenzima.

La existencia de estos dos sitios fué detectada por estudios de la velocidad de intercambio isotópico del complejo R-AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) con un exceso de nucleótido frío. Utilizando subunidades regulatorias I y II purificadas de corazón bovino se encontró que la disociación de los complejos R-AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) ocurre en dos fases para cada una de las proteínas, indicando la presencia de dos poblaciones de sitios de unión. El sitio 1 es de intercambio lento y tiene una constante de velocidad de disociación de 0.045 m<sup>-1</sup> y 0.027 m<sup>-1</sup> para R<sub>I</sub> y R<sub>II</sub> respectivamente. El sitio 2, de disociación rápida, tiene una constante de velocidad de intercambio aproximadamente diez veces mayor: 0.237 y 0.252 m<sup>-1</sup> para las subunidades I y II. La proporción de los sitios 1 y 2 es de 50 % (131).

Otros autores estudiando la interacción del complejo R-AMP<sub>c</sub> (<sup>3</sup>H) con los filtros de nitrocelulosa en presencia de concentraciones variables de subunidad catalítica, presentan evidencias de la existencia de dos tipos de sitios diferentes

(132). Por otra parte las curvas bifásicas de apagado de fluorescencia del análogo 1, N<sup>6</sup>-eteno. AMP<sub>c</sub> al unirse a la subunidad regulatoria también sugieren diferentes sitios de unión del AMP<sub>c</sub> (133).

ØGREID et al. (134, 135) estudiaron en isoenzimas de corazón bovino la cinética de disociación del complejo R-AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>), llegando a conclusiones similares, con valores de constantes de velocidad parecidos a los anteriores. Estudiaron además la cinética de asociación del AMP<sub>c</sub> con los sitios 1 y 2 (136) encontrando que el sitio 1 (lento) tenía una constante de asociación mayor que la del sitio 2 (rápido), de tal modo que las constantes de afinidad de cada sitio son entonces parecidas. Esto, está de acuerdo con los resultados obtenidos al analizar los cambios producidos en los espectros de fluorescencia endógena de los grupos triptofano y de dicroísmo circular con U.V. cercano, al titular la subunidad regulatoria con AMP<sub>c</sub> (137).

Cuando se estudió la cinética del intercambio de AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) del complejo R-AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) con exceso de AMP<sub>c</sub> no radiactivo, la presencia de análogos no marcados con modificaciones en el C-6 o en el C-8 del núcleo purínico, permitió sa -

car conclusiones sobre la especificidad de cada tipo de análogo por los diferentes sitios de unión del AMP<sub>c</sub> (131, 138). Utilizando uno o otro tipo de análogos se obtuvieron curvas que variaban en el punto de intersección y no en la pendiente, es decir que los análogos tenían una relativa preferencia por los sitios 1 o 2 (131-138). Los análogos con modificaciones en el C-8 del anillo purínico, tienen una relativa preferencia por el sitio 1, mientras que los modificados en el C-6 prefieren el sitio 2. Se podría inferir que la unión al sitio 1 requiere la presencia de un grupo amino en el C-6 para formar una unión de puente de hidrógeno u otro tipo de interacción, o que un sustituyente en esa posición impone restricciones espaciales o estéricas. Con el mismo razonamiento se podría explicar la limitación en la unión al sitio 2 de los análogos modificados en el C-8. Si bien experimentalmente no se demuestra que el AMP<sub>c</sub> tenga una preferencia por alguno de los dos sitios en particular, no se puede descartar la posibilidad de que in vivo los sitios 1 y 2 reaccionen con formas estereoquímicas diferentes del AMP<sub>c</sub>. El postulado de que es tos sitios son intracatenarios implica que el dímero de la sub unidad regulatoria contiene dos cadenas idénticas. Experimen

talmente no se han encontrado dos cadenas de la subunidad regulatoria con diferentes propiedades receptoras de AMP<sub>c</sub>. CORBIN (7) presentó un modelo de las zonas o dominios en la subunidad regulatoria del tipo II, confeccionado en base a los resultados obtenidos por él y otros autores en experiencias de velocidad de intercambio isotópico con péptidos obtenidos por fragmentación proteolítica. Un fragmento de 16 K de la subunidad regulatoria del tipo I con capacidad receptora de AMP<sub>c</sub>, tiene el mismo comportamiento cinético de intercambio que el sitio 2 de la subunidad R intacta. Mientras que otro fragmento de 14 K derivado de la isoenzima II, presenta en presencia o ausencia de análogos del AMP<sub>c</sub>, un comportamiento de disociación del nucleótido, similar al que tiene el sitio 2 (130, 139) de la subunidad sin proteolizar.

Por otro lado cuando el 8-Azido-P<sup>32</sup>-AMP<sub>c</sub>, que se comporta como un análogo del sitio 1, se lo irradia con una luz de 254 nm, se fotoliza dando como producto un radical nitreno que es altamente reactivo y en presencia de la subunidad regulatoria se une covalentemente en el sitio para el cual el análogo tiene afinidad. Del tratamiento proteolítico de la subunidad R (140) con el 8-análogo covalentemente unido se

obtiene la marca asociada a un resto tirosina, vecino a un sitio de fosforilación cercano al carboxilo terminal de la cadena polipeptídica. El modelo aparece representado en la figura 3.

Estas evidencias cinéticas no son una prueba absoluta de que los fragmentos obtenidos por proteólisis, sean realmente cada uno de los sitios porque el comportamiento de un sitio aislado en un péptido puede ser diferente a cuando se encuentra en el dímero intacto. Por otra parte existen evidencias sobre interacciones entre los sitios de unión del  $AMP_c$  (138). Una función del sitio 1 por ejemplo, parece ser la de favorecer, una vez ocupado por el  $AMP_c$ , la unión del nucleótido en el sitio 2 o sea que existe cooperatividad entre los sitios (138).

No se conoce cual de los sitios es el responsable de la activación de la quinasa de proteínas. Experimentos en los cuales se usó  $IMP_c$ , que es un análogo con preferencia por el sitio 2 muestran que es más eficiente que el mismo  $AMP_c$ , en términos de moles unidos a la subunidad regulatoria por mol de subunidad catalítica liberada (138).

Las subunidades R de las quinasas dependientes de

ANAL C-8

ANAL. C-6

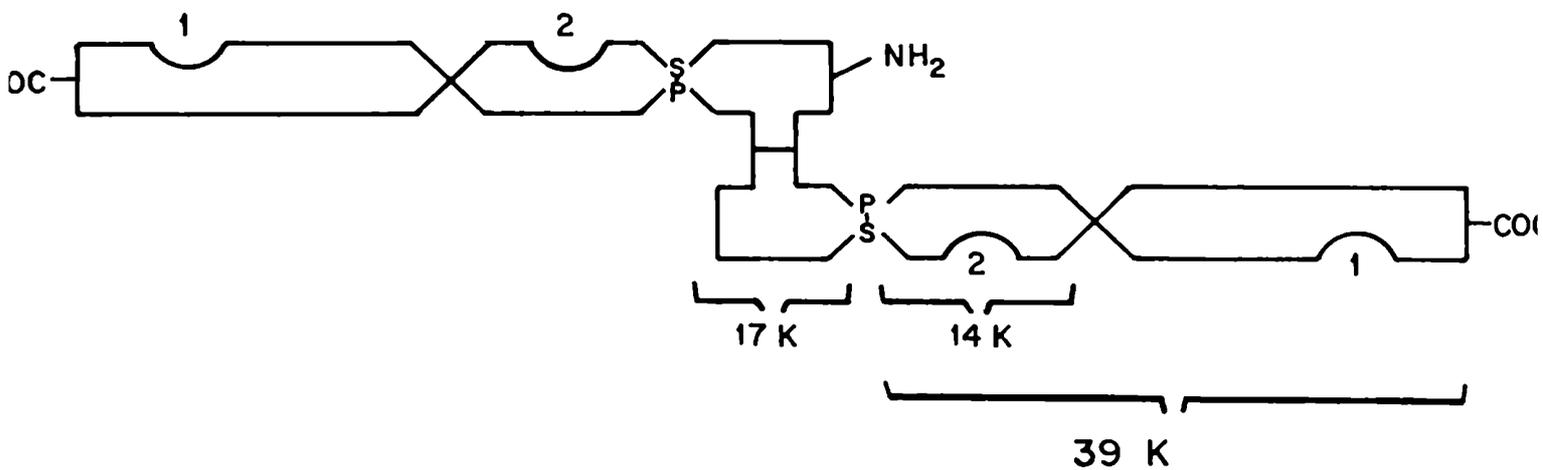
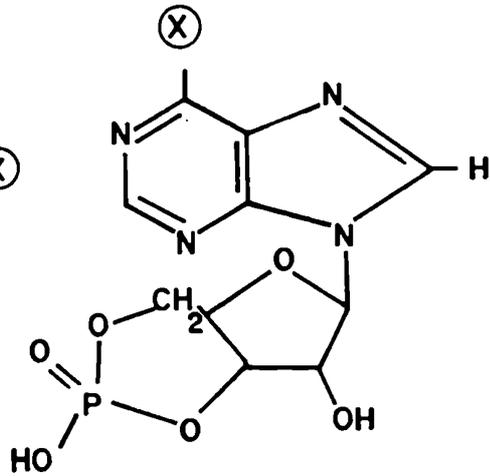
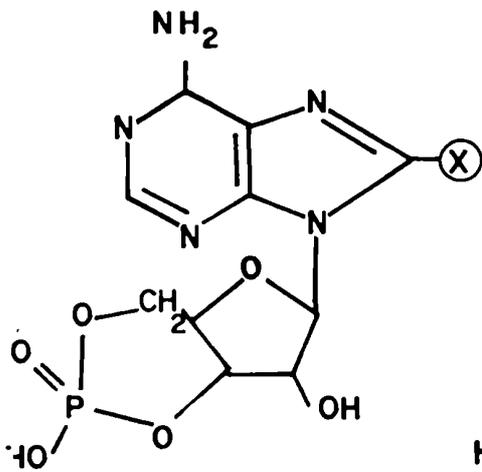


Figura 3: Modelo de zonas o dominios regulatorios en la subunidad regulatoria de la quinasa de proteína dependiente de AMP tipo II.

AMP<sub>c</sub> de eucariontes inferiores no han sido objeto de estudios tan minuciosos como los descritos mas arriba.

No obstante en los últimos años han aparecido numerosos trabajos sobre el tema. Se han caracterizado y en algunos casos purificado subunidades regulatorias de organismos inferiores. Por ejemplo de levadura se purificó y caracterizó una subunidad regulatoria de Mr= 56 (141) o 64 K (142). En el hongo C. macrorhizus también se detectó una subunidad regulatoria de 46 K, inmunológicamente diferente de las de eucariontes superiores (114), En M. racemosus se encontraron proteínas receptoras de AMP<sub>c</sub> de Mr= 52-58 K (144, 143).

En N. crassa (145) y en D. discoideum (146), se realizaron estudios más completos. En el primer caso siguiendo una metodología semejante a la utilizada por CORBIN (131, 138) se detectaron dos clases de sitios de unión del AMP<sub>c</sub> a la subunidad regulatoria, uno de disociación lenta y otro de disociación rápida, con propiedades semejantes respecto de los análogos modificados en el C-6 y C-8 a los de las enzimas de eucariontes superiores.

En D. discoideum se describió el mapeo de un sitio "estable" de unión del AMP<sub>c</sub>, criterio seguido según la es-

tabilidad que presenta el AMP<sub>c</sub> en los sitios de unión al interaccionar con filtros de nitrocelulosa. El criterio utilizado en este caso es el decrecimiento de la afinidad respecto del AMP<sub>c</sub> que presentan sus diferentes análogos. Esta disminución de afinidad se estandariza de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$G = -RT \frac{\ln [K] (\text{AMP}_c)}{[K] (\text{análogo})}$$

siendo las K las constantes de afinidad respectivas.

### 3- Subunidad Catalítica.

La subunidad catalítica de todas las quinazas de proteínas estudiadas hasta el momento es un monómero de Mr= 39 a 42 K. Esta proteína fue purificada a homogeneidad a partir de hígado y corazón bovino, corteza adrenal, músculo esquelético e hígado de conejo, mucosa gástrica porcina, músculo esquelético de rata y músculo esquelético porcino (7).

Contrariamente a la subunidad regulatoria, la subunidad catalítica aislada de la isoenzima I o de la isoenzima II de cualquiera de estas fuentes tiene similares propiedades químicas, físicas, catalíticas, inmunológicas así como igual

$K_m$  para el ATP, especificidad de sustrato y afinidad en la interacción con las subunidades I y II (7). Sin embargo utilizando la técnica de enfoque isoeléctrico en geles de poliacrilamida (147) se separaron tres formas de una subunidad catalítica homogénea.

Un hallazgo interesante es el de GAGELMAN et al. (148) quienes encontraron que las subunidades catalíticas de las isoenzimas I y II, se activan por un modulador proteico, resistente al ácido y termoestable que está presente en las preparaciones de los extractos y que es diferente al inhibidor de la subunidad catalítica descrito por WALSH (149). La subunidad catalítica tiene un rango de especificidad de sustrato muy amplio. Basándose en los criterios de BEAVO y KREBS (90), para decidir si un determinado efecto del  $AMP_c$  está mediado por fosforilación, FLOCKHART y CORBIN (7) hicieron una división de los sustratos en fisiológicos y no fisiológicos. Esta clasificación se muestra en la tabla II.

Según las evidencias acumuladas las bases moleculares para la especificidad de sustratos proteicos o peptídicos estudiados in vitro, son la presencia de dos aminoácidos básicos, especialmente arginina, vecinos a la serina o treonin

TABLA II

SUBSTRATOS DE LA PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE

AMP<sub>c</sub>

SUBSTRATOS FISIOLOGICOS	SUBSTRATOS PROBABLEMENTE FISIOLOGICOS	SUBSTRATOS NO FISIOLOGICOS
Fosforilasa quinasa	Histona	Caseína
Glucógeno sintetasa	Fosfolamban	RNA polimerasa (E.coli)
Lipasa sensible a hormona	Diglicérido lipasa	eiF-2 (E. coli)
Piruvato quinasa	Protamina	
Troponina I	Inhibidor de fosfatasa I	Péptidos artificiales
Subunidad regulatoria	Fosfofructoquinasa	Quinasa de proteína dependiente de GMP <sub>c</sub>
Colesterol esterasa	Transcriptasa reversa	
Acetil Co A carboxilasa	Proteína ribosomal S-6	
Tirosina hidroxilasa	HMG Co A reductasa quinasa	
ATP-citrato liasa		

na fosforilable (150, 151). El hecho de que no todos los péptidos sintéticos exhiban constantes de afinidad tan favorables como las observadas para las proteínas de las cuales derivan, sugiere que otros factores además de la estructura primaria influyen en la especificidad de sustrato (152).

Para estudiar la estructura del sitio activo de la subunidad catalítica se usaron reactivos modificadores de diferentes grupos. Entre estos reactivos se encuentran los modificadores de grupos sulfhidrúlicos, tales como: iodoacetamida, N-acetil maleimida, p-hidroximercuribenzoato (153) y el ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (154), todos los cuales destruyen la actividad enzimática. La enzima puede ser protegida parcialmente de estos reactivos por la presencia de ATP Mg (153). Estos datos indican la presencia de grupos sulfhidrúlicos cercanos al sitio activo, pero no prueban su participación directa en el mecanismo catalítico. Sí en cambio lo sugieren los experimentos de modificación y subsiguiente inactivación de la subunidad catalítica con análogos de afinidad de sustratos peptídicos, los cuales son capaces de llevar a cabo intercambio de grupos disulfuros con los grupos sulfhidrúlicos de la enzima (155).

Un gran número de análogos del ATP, modificados en diferentes partes de la molécula (anillo purínico, ribosa o grupo fosfato) proporcionaron una considerable información sobre el sitio de unión de este nucleótido. Surge de este tipo de estudios (156) que la subunidad catalítica tiene una alta afinidad por la purina, y que las modificaciones en el grupo fosfato del ATP afectan menos la unión a la proteína. Los análogos que están modificados en la ribosa tienen en cambio las mismas propiedades de unión que el ATP. Estos datos han servido para argumentar que la alta afinidad de la holoenzima de tipo I, por el ATP, era debido a que el sitio de unión del ATP en la isoenzima I estaba sobre la subunidad catalítica y no en la subunidad regulatoria. Esto fue confirmado con el uso de un análogo del ATP que es un marcador por fotoafinidad, el 8-Azido ATP-P<sup>32</sup>. Al fotolizar la holoenzima en presencia del análogo y posteriormente someterla a disociación se observa la marca asociada a la subunidad catalítica (157).

El mecanismo cinético de esta enzima está todavía por dilucidarse. Los estudios de velocidades iniciales realizados con la holoenzima y con la subunidad catalítica aisla

da son contradictorios, especialmente los que utilizan histona como sustrato (158-161). En estudios cinéticos con la holoenzima de cerebro bovino (158) se obtuvieron gráficos de doble recíprocas paralelos, indicativos de un mecanismo ping-pong, mientras que con la subunidad catalítica de músculo esquelético de conejo utilizando también histona como sustrato, se obtuvo gráficos de doble recíproca convergentes, típicos de los mecanismos secuenciales (159). La fosforilación de la histona H<sub>1</sub>, catalizada por subunidad catalítica de timo de ternero (160) sigue una cinética secuencial, aunque cuando la fosforilación está catalizada por la subunidad catalítica de cerebro porcino (161) parece seguir un mecanismo ping-pong, identificándose un complejo intermediario, enzima fosforilada (E-P). Se han realizado un número de estudios utilizando como sustrato al heptapéptido que corresponde a la secuencia de aminoácidos que conforman el entorno de la serina fosforilable en la piruvato quinasa de riñón porcino. Con este heptapéptido se eliminan una serie de problemas asociados con el uso de sustratos proteicos, por ejemplo: múltiples sitios de fosforilación y posible contaminación del sustrato con otras quinastas. Los resultados obtenidos de estos estudios

son mas coherentes, ya que tanto con subunidades catalíticas provenientes de corazón bovino (162), timo de ternera y músculo esquelético de conejo, la cinética de la fosforilación sigue un mecanismo secuencial. GRANOT y colaboradores (163-164) en base a una serie de mediciones físicas y cinéticas realizadas con la subunidad catalítica de músculo cardíaco bovino y utilizando el heptapéptido como sustrato, concluyeron que son dos los probables mecanismos cinéticos para la quinasa de proteínas; el secuencial ordenado en estado estacionario o el secuencial al azar en estado estacionario. Ninguno de los dos mecanismos puede ser descartado con las evidencias experimentales que se disponen actualmente. Recientemente en dos trabajos que se complementan entre sí, de KREBS (165) y WALSH (166), se estudiaron exhaustivamente los perfiles de inhibición por producto (ADP y heptapéptido fosforilado) y la inhibición "dead end" con el análogo no hidrolizable del ATP el AMP.PNP, el inhibidor de la subunidad catalítica y un análogo no fosforilable del heptapéptido, alanino substituído. Conjuntamente realizaron estudios de unión en equilibrio de sustratos e inhibidores a la subunidad catalítica. Empleando todos estos datos KREBS (165) postula

La existencia de un mecanismo en estado estacionario secuencial ordenado Bi-Bi, con entrada del ATP como primer sustrato, formación de un complejo ternario E-ATP-Heptapéptido al entrar el segundo sustrato y posterior liberación de los dos productos, ADP y Heptapéptido fosforilado.

#### 4- Autofosforilación.

Una diferencia muy importante entre las dos isoenzimas atribuible a las subunidades regulatorias es el diferente comportamiento de estas últimas frente al ATP. La quinasa de proteínas del tipo II tiene la propiedad de autofosforilarse, es decir incorporar el fosfato del ATP a su propia molécula mediante un mecanismo intramolecular (167). La fosforilación aumenta la afinidad de la enzima por el AMP<sub>c</sub>, es decir que la holoenzima fosforilada necesita concentraciones menores de AMP<sub>c</sub> para disociarse y viceversa, la reasociación de las subunidades después de la remoción del AMP<sub>c</sub> se lentifica notablemente si la holoenzima está fosforilada (168). La quinasa de proteínas del tipo I, por otro lado no es susceptible de autofosforilarse, si bien se encontró fosforilación de la subu

nidad regulatoria I in vitro catalizada por la quinasa de proteínas dependiente de  $GMP_c$  (169) en una línea celular de linfoma de ratón (170).

Otra propiedad de la holoenzima del tipo I es la de unir dos moles de ATP por mol de holoenzima, unión que disminuye sensiblemente su afinidad por el  $AMP_c$ , siendo este efecto opuesto al que tiene sobre la holoenzima II al autofosforilarse. (171)

La subunidad catalítica C puede catalizar la incorporación de dos moles de fósforo por mol de monómero de subunidad R (172, 173) y el monómero de C mismo puede incorporar dos moles de fosfato luego de incubarlo con ATP-Mg en ausencia de sustrato (147). No se conoce la función que pueda tener la autofosforilación de C. En el caso de la subunidad regulatoria, los dos sitios de fosforilación tienen dife - rente cinética, uno de ellos conocido como sitio 2, es fosfo rilado rápidamente aún a  $0^\circ$  (172). La fosforilación del sitio 2 es responsable de la disminución de la velocidad de reaso - ciación de la subunidad  $R_{II}$  con la subunidad catalítica (168).

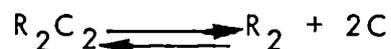
Recientemente un estudio de HOFMANN y colabora - dores sobre la fosforilación de la subunidad  $R_{II}$  de corazón

bovino (174) indica que la subunidad regulatoria contiene entre 1.2 y 2.7 moles de fosfato por mol de subunidad regulatoria y que estas fosforilaciones no ocurren sobre el sitio autofosforilable, sugiriendo que existe in vivo fosforilación en múltiples sitios que no son debidas a la subunidad catalítica, sino a quinasas independientes de  $AMP_c$ . Posteriormente el mismo autor encontró que la subunidad  $R_{II}$  puede ser fosforilada a una velocidad apreciable in vitro por la glucógeno sintetasa quinasa III y por la glucógeno sintetasa quinasa V, pero no por la glucógeno sintetasa quinasa IV o por la fosforilasa quinasa (175).

##### 5- Mecanismo de activación de la quinasa de proteínas dependiente de $AMP_c$ .

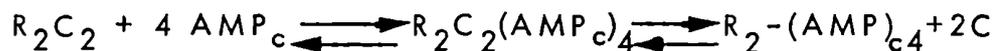
Fenomenológicamente la disociación de la quinasa de proteínas está perfectamente descrita, ya en los primeros trabajos sobre el tema (176). La activación de la enzima por el  $AMP_c$ , libera subunidades catalíticas activas. No obstante el mecanismo detallado de activación a nivel molecular no está aún completamente dilucidado.

La estructura polimérica de la holoenzima con dos grupos de subunidades diméricas organizadas molecularmente como un tetrámero permite un variado número de posibilidades teóricas para explicar la activación de la holoenzima. Existen básicamente dos trabajos (177-178) que con un enfoque teórico proponen diferentes modelos de equilibrios para explicar la interacción del AMP<sub>c</sub> con la holoenzima. De estos hay dos modelos principales que dominan la discusión de la activación de la enzima. En el primer modelo se postula que la holoenzima existe aún en ausencia de AMP<sub>c</sub> en un determinado equilibrio termodinámico con sus subunidades libres según la ecuación:



y que el AMP<sub>c</sub> se une con una gran afinidad a la subunidad regulatoria desplazando el equilibrio hacia la disociación. El segundo modelo considera que el AMP<sub>c</sub> se une primero a la holoenzima formando un complejo ternario, holoenzima-AMP<sub>c</sub> para después disociarse. La disociación sería producto de un gran cambio conformacional en la subunidad regulatoria, al unirse el AMP<sub>c</sub> a la quinasa de proteínas se debilitaría la

interacción entre las subunidades catalíticas y la subunidad regulatoria favoreciéndose la disociación. Según este segundo modelo también podría preexistir un equilibrio termodinámico de la holoenzima con sus subunidades, pero no tendría importancia para el mecanismo de activación. La ecuación que representa este segundo modelo es la siguiente:



Todas las evidencias reunidas hasta el presente indican que la activación se produce según este último esquema (179-180, 154). Estas evidencias son principalmente cinéticas; así HUANG (179) estudió la disociación del complejo  $R_2 AMP_c$  ( $H^3$ ) por intercambio isotópico con el nucleótido no marcado en presencia y ausencia de subunidad catalítica, encontrando que cantidades catalíticas de C aceleraban enormemente la velocidad del complejo  $R_2-(AMP_c)$  ( $H^3$ ). Estos resultados sólo pueden ser explicados por la formación de un complejo intermediario ternario  $AMP_c-R_2C_2$ .

En base a los estudios realizados con una holoenzima extraída de embriones de Drosophila melanogaster, otros autores (180) elaboraron un modelo cinético para explicar la

activación de la quinasa. Llevando a cabo transformaciones matemáticas llegaron a una ecuación única con la cual expresan los diferentes mecanismos de disociación posibles. Los valores experimentales que mejor se ajustan a esta ecuación según un programa computado, son los que corresponden a la existencia de un intermediario ternario.

Otro trabajo que presenta evidencias cinéticas sobre la formación de un complejo ternario es el de ARMSTRONG et al. (154). Estos autores titulan los grupos sulfhidrídicos en la holoenzima de corazón bovino con un reactivo de grupos SH, el ácido 5, 5' - ditiobis(2-nitro benzoico)(DTNB).

Los estudios de inactivación de la holoenzima muestran 1) la subunidad regulatoria inhibe la inactivación de la subunidad catalítica por el DTNB. 2) En presencia de concentraciones saturantes de AMP<sub>c</sub> cualquiera de las formas, fosforilada de la holoenzima presenta una marcada aceleración de la velocidad de inactivación, siendo la de la forma desfosforilada aún más rápida. Estos resultados sólo pueden explicarse en base a la existencia de una interacción entre la subunidad regulatoria y C aún en presencia de concentraciones saturantes de AMP<sub>c</sub>. Esta interacción está dada justamente en

el complejo ternario y debería estar en equilibrio termodinámico rápido con las subunidades libres. Los grupos SH en esta molécula ternaria estarían activados sobre la subunidad catalítica para reaccionar con el DTNB.

El trabajo, tal vez más convincente respecto al mecanismo de activación es el de KREBS (181), quien supone para simplificar el tratamiento matemático, que los pares RC de la holoenzima tetramérica son independientes e idénticos y que RC es inactivo en ausencia de  $AMP_c$ . Con esta hipótesis encuentra que el valor de  $t_{1/2}$  para la disociación en ausencia de  $AMP_c$  es extremadamente bajo, comparado con la disociación casi instantánea cuando está presente el nucleótido cíclico.

Un aspecto importante aún por dilucidar es el siguiente: cuántos y cuál o cuáles de los sitios de unión del  $AMP_c$  se requieren que estén ocupados para que se active la quinasa. Aunque algunos autores trataron tangencialmente el tema, no se tiene aún una respuesta adecuada para estas preguntas (131-137). Otra vía desarrollada paralelamente para enfocar el estudio de la disociación de la quinasa de proteínas es el estudio de las interacciones entre la subunidad R y la subuni

dad C. Trabajos anteriores (97-172) sugieren que la propiedad de la subunidad regulatoria para inhibir a la subunidad C se debe a que actúa como un análogo del sustrato, con alta afinidad que enmascara los sitios del sustrato proteico o peptídico en la subunidad catalítica. Las modificaciones en la subunidad R, tales como proteólisis trípica o tratamiento con reactivos específicos para argininas, anulan la actividad inhibitoria y la posibilidad de actuar como un sustrato aceptor de fosfato (172). Además estudios espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de velocidad de relajación de los protones del sustrato indican con precisión que es la unión del sustrato peptídico y no la del ATPMg la que es bloqueada por la subunidad regulatoria (182). Se sabe además que la unión de la subunidad regulatoria a C inhibe la actividad  $A_{te}$  pásica (154) la cual está íntimamente ligada a la subunidad catalítica (153), inhibiendo entonces la transferencia del fosfato al  $H_2O$ . Quiere decir que la subunidad R puede ejercer dos tipos de inhibición sobre la actividad catalítica. Uno, puede actuar como un análogo de sustrato, siendo un inhibidor competitivo de alta  $K_i$  del sustrato proteico y dos puede bloquear la capacidad de C de transferir un fosfato del ATP al  $H_2O$ .

### III- AMP<sub>c</sub> y MUCOR ROUXII.

Existe un cierto número de hongos que presenta una dualidad fenotípica en la forma de sus células. Dependiendo de las condiciones ambientales, pueden crecer bajo la forma de un micelio compuesto de filamentos largos y ramificados o como células levaduriforme. A éste fenómeno se lo denomina dimorfismo. Mucor es un género de hongos (clase: Zygomycetes, orden: mucorales) que tiene justamente esta propiedad. En presencia de aire y en medio sólido o líquido crece como un micelio cenocítico típico mientras que en una atmósfera pobre en O<sub>2</sub> presenta una morfología levaduriforme. Estas formas son interconvertibles reversiblemente, dependiendo este equilibrio biológico del medio en el cual se encuentre. Esta posibilidad de adaptación morfogenética de ciertas especies de Mucor a una atmósfera aeróbica o anaeróbica hace de Mucor un excelente modelo biológico para estudiar las bases bioquímicas de la diferenciación morfológica. Se ha enfocado el fenómeno del dimorfismo desde diferentes puntos de vista, estudiando: la influencia de los hidratos de carbono (183,184), el metabolismo respiratorio (185), la síntesis de proteínas (186) y su relación con el nivel de poliaminas (187). El a -

vance más importante en cuanto al esclarecimiento de las bases bioquímicas del fenómeno del dimorfismo en Mucor se debe a los estudios sobre el papel del AMP<sub>c</sub>.

LARSEN y SYPHERD (188), encontraron en M. racemosus que la adición de  $Bt_2AMP_c$  a cultivos aeróbicos del hongo inhibe el crecimiento apical y promueve el crecimiento levaduriforme. Por otra parte encontraron que las células levaduriformes poseen una concentración intracelular de AMP<sub>c</sub> mayor que la forma miceliar. Posteriormente PASSERON et al. (189) encontraron resultados similares en M. rouxii. LARSEN et al. y PASSERON y colaboradores (190) también demostraron que durante la aereación de un cultivo levaduriforme de M. racemosus y M. rouxii respectivamente los niveles de AMP<sub>c</sub> disminuyen y que esta disminución precede a la aparición de los tubos germinativos. Estos efectos morfogenéticos requieren de la presencia de un azúcar fermentable en los medios de cultivo.

De acuerdo a los conocimientos adquiridos hasta el presente, surge que la regulación del dimorfismo en Mucor es el resultado de una interacción compleja de factores ambientales y nutricionales en donde el AMP<sub>c</sub> desempeña sin lugar

a dudas un papel muy importante. Por consiguiente el estudio de su mecanismo de acción debe tenerse en cuenta en cualquier modelo de regulación del dimorfismo.

En la figura 4 se resume el efecto de los principales factores ambientales y nutricionales que participan en las transiciones dimórficas en M. rouxii.

El AMP<sub>c</sub> cumple un papel biológico de mucha importancia en la fisiología de otros organismos eucariontes inferiores. Fue descrito en los siguientes organismos: B. emersonii, en el cual se han relacionado los cambios en las concentraciones intracelulares del nucleótido con la citodiferenciación (191), también en N. crassa (192-193) y en D. discoideum (194) el AMP<sub>c</sub> es determinante de la morfología del hongo. En nuestro laboratorio desde hace varios años se estudian las diferentes enzimas relacionadas con el metabolismo del AMP<sub>c</sub> en M. rouxii.

La adenilato ciclasa fue aislada y caracterizada de fracciones particuladas de la forma filamentosa y levaduriforme del hongo (189). Esta actividad se puede separar de los fragmentos de pared celular por la acción de agentes tensioactivos y se la encuentra en una fracción membranosa que se

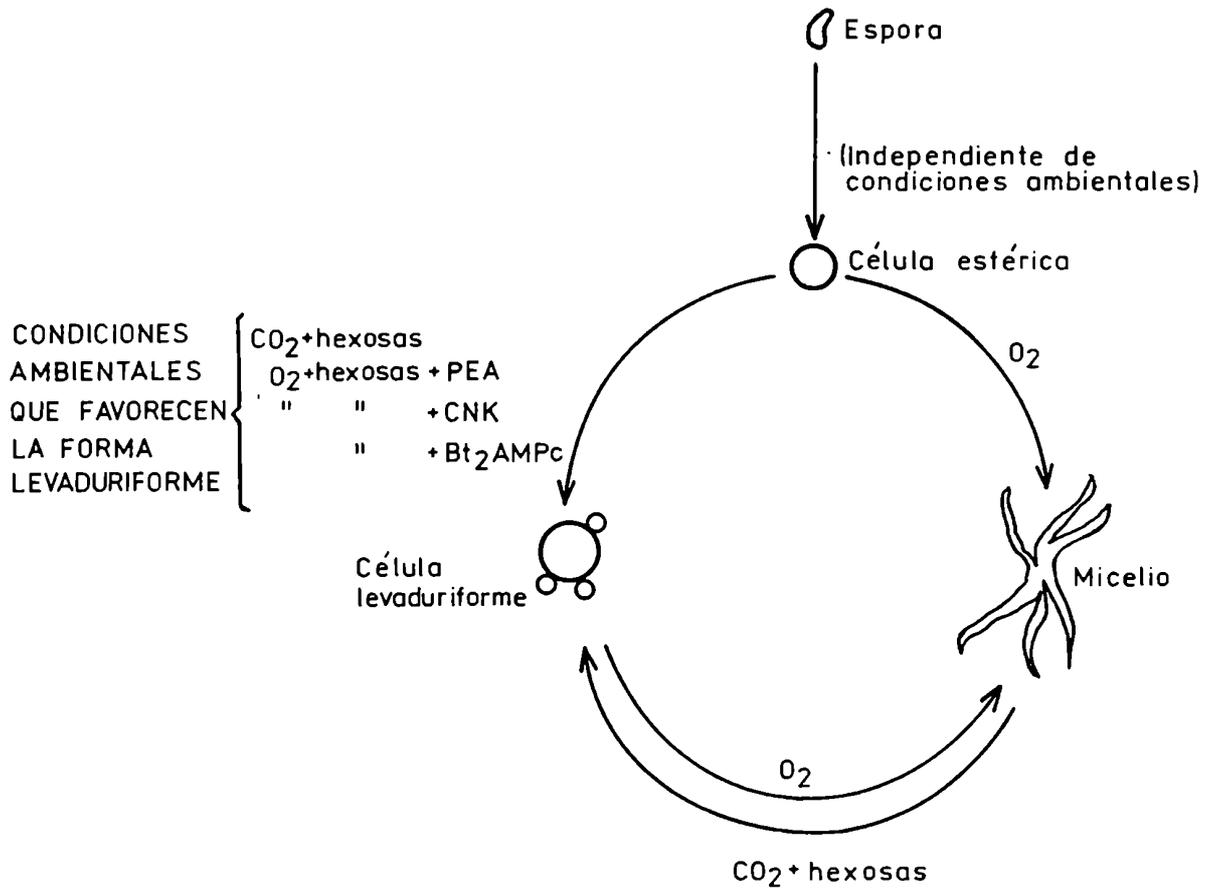


Figura 4: Ciclo de vida asexual, aeróbico y anaeróbico de M. rouxii. Condiciones ambientales y nutricionales que influyen sobre el dimorfismo.

dimenta a 100000 x g (195). Las propiedades cinéticas de la enzima unida a membrana son semejantes a las de las enzimas de otros eucariontes inferiores en cuanto al requerimiento de ion  $Mn^{++}$  y la insensibilidad a  $F^{-}$  y a nucleotidos de guanina. La actividad particulada pudo ser solubilizada por la acción de ClK 0.5 N. La enzima soluble tiene un peso molecular significativamente alto de 500 K (196).

Respecto de la fosfodiesterasa de  $AMP_c$ , se demostró la existencia de esta actividad en las dos formas del hongo, la cual fue estudiada exhaustivamente. La actividad de la fosfodiesterasa es en su mayor parte soluble y eluye de una columna de DEAE-celulosa a una concentración de 0,4 M de acetato de sodio como una especie única y específica para  $AMP_c$  (175). La  $K_m$  aparente para el  $AMP_c$  de la enzima parcialmente purificada es  $2,5 \mu M$ , valor que ubica a la enzima de M. rouxii entre las de alta afinidad por su substrato. Su peso molecular es de alrededor de 70.000 D (197).

Se encontró que preparaciones poco purificadas de fosfodiesterasa eran capaces de ser activadas por incubación con ATP.Mg y  $AMP_c$  y que dicha activación permanecía aún después de haber eliminado del medio los factores activantes

(198). Al avanzar en la purificación y separar la quinasa de proteína, la activación mediada por ATP.Mg y AMP<sub>c</sub> se hizo dependiente del agregado de quinasa de proteína exógena. Asimismo cuando las condiciones del ensayo favorecen la de fosforilación, la enzima activada recupera su actividad basal. La enzima es capaz de ser activada también por proteólisis controlada siendo la actividad máxima lograda comparable con la alcanzada por vía de la fosforilación. Ambas activaciones no son aditivas, sugiriendo que probablemente estos mecanismos involucren la misma zona de la molécula proteica (199).

Paralelamente a los trabajos anteriores, en el laboratorio se descubrió la existencia de al menos dos formas de fosfatasas de fosfoproteínas en la fracción soluble de la forma filamentosa de M. rouxii (200). Estas dos fosfatasas denominadas I y II, se diferencian por su requerimiento de catión divalente y tienen un peso molecular ligeramente diferente. La enzima I tiene un Mr= 40 K y su actividad es dependiente de la presencia de catión divalente, la forma II tiene un peso molecular de 30 K y es activa en ausencia de catión divalente. Estas formas de bajo peso molecular serían

semejantes a la subunidad catalítica aislada de tejidos superiores, la cual se encuentra en los tejidos asociada a proteínas reguladoras que le confieren un peso molecular mayor. Estas formas de alto peso molecular no han sido detectadas en M. rouxii.

Respecto de la quinasa de proteínas ya fueron comentados anteriormente (118-119) los trabajos del laboratorio en los cuales se describe una quinasa de proteínas dependiente de AMP<sub>c</sub>, soluble con propiedades semejantes a las quinasas del tipo II de eucariontes superiores pero con un singular comportamiento respecto a la interacción con el AMP<sub>c</sub>, ya que no se disocia solamente por acción del nucleótido sino que también necesita de la presencia de histona o protamina, que actúan como sustratos proteicos (201).

Un resumen de lo anterior permite verificar que en M. rouxii, se cumplen en parte los criterios propuestos por KREBS (90) para verificar fosforilación proteica dependiente de AMP<sub>c</sub> en un evento celular, dado que: existe una quinasa de proteínas dependiente de AMP<sub>c</sub> y también un sustrato fosforilado in vitro, como la fosfodiesterasa cuya función se modifica como consecuencia de la fosforilación dependiente de AMP<sub>c</sub>.

Lo singular de este proceso es la relación funcional que tiene el sustrato con el efecto mediado por  $AMP_c$ , dado que el sustrato mismo es justamente la enzima responsable de la degradación del nucleótido.

#### IV- OBJETIVO DE LA TESIS

De la introducción anterior surge claramente la necesidad extensiva a M. rouxii de estudiar bioquímica y estructuralmente a la quinasa de proteínas, para poder desenmarañar la regulación de los eventos morfogenéticos controlados por el  $AMP_c$ . En los trabajos previos del laboratorio (118-119, 201), se encaró la identificación de esta quinasa y su caracterización. Para continuar con su estudio estructural, se requiere un conocimiento preciso de la organización molecular de las diferentes subunidades que componen a esta enzima. El conocimiento de su estructura polimérica permitirá enfocar más claramente el estudio de su mecanismo de disociación. Un aspecto de primordial importancia para esclarecerlo es estudiar la interacción de la holoenzima con el nucleótido cíclico y con los dos sustratos; el ATP y la proteín

na fosforilable. Esto implica investigar la calidad de los sitios de unión del AMP<sub>c</sub> a la quinasa de proteínas, así como estudiar independientemente las propiedades de las subunidades regulatorias y catalíticas de esta enzima.

Con esta Tesis, se pretende justamente presentar un estudio, que pueda ayudar a dilucidar alguna de estas cuestiones.

## MATERIALES Y METODOS

## MATERIALES Y METODOS

### 1- Buffers utilizados.

- Buffer M: Tris - ClH 10 mM pH 7.3, EDTA 1,5 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM.
- Buffer C: Pipes 10 mM pH 6.3, EDTA 2 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM.
- Buffer C<sub>1</sub>: Pipes 10 mM p H 6.3, EDTA 2 mM, 2-mercaptoetanol 20 mM.

## II. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

### II.1. - Organismo

Durante el presente estudio se utilizó el hongo dimórfico Mucor rouxii (NRRL 1894), cepa original del Dr. C. W. Hesseltine (Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, Ill) cedida por el Dr. Roger Stork (Rice University, Houston, Texas).

### II.2. - Obtención de esporas y mantenimiento de la cepa.

Para la obtención de esporas se hizo crecer el hongo en medio de agar 5%-jugo de tomate (1:1). Los dos componentes del medio se autoclavarón por separado y se mezclaron en caliente; la mezcla se transvasó inmediatamente a botellas de Roux (50 ml en cada una) y se dejó solidificar. Las botellas se mantuvieron por 24 h. a 25° C como prueba de esterilidad. Transcurrido este tiempo se sembró en cada botella 2 ml de una suspensión de esporas de aproximadamente 100 esporas/ml y se incubaron a 30° C durante una noche. Al día siguiente se invirtieron las botellas y se mantuvie-

ron a 30° C durante 4-6 días, transcurridos los cuales se procedió a cosechar las esporas. Para efectuar la cosecha se agregó a cada botella 20 ml de agua destilada estéril y se raspó suavemente la superficie del cultivo con un ansa de vidrio para desprender las esporas de los esporangios. La suspensión así obtenida se filtró estérilmente por una malla de nylon para retener los trozos de medio o el micelio que pudieran haberse desprendido, y se recolectaron las esporas por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min. Las esporas se lavaron 3 veces por centrifugaciones y resuspensiones sucesivas, con agua destilada estéril. Finalmente se suspendieron en agua destilada estéril; se contó una alícuota de la suspensión en cámara cuentaglóbulos y se guardó la suspensión en fracciones de 3-4 ml en viales de vidrio estériles a 4° C.

En éstas condiciones las esporas permanecen viables por 1-2 meses.

Para mantener la cepa se inocularon, al mismo tiempo que las botellas de Roux, dos tubos en pico de flauta con medio agar-jugo de tomate; los tubos se incubaron igual que las botellas y una vez producida la esporulación se guardaron en heladera a 4° C.

### 11.3 - Medio de cultivo.

El micelio fue crecido en medio YPG (202) que contiene: extracto de levadura (Difco) 0,3%, peptona (Inorp tipo MC3) 1%, glucosa (Roux Ocefa) 3%. El pH se ajustó a 4,5 con ácido sulfúrico 5 N. La glucosa se autoclavó por separado.

### 11.4 - Cultivos.

Para obtener micelio de fase logarítmica tardía los cultivos se realizaron en erlenmeyers de 2 l. conteniendo 600 ml de medio YPG. El inóculo fue de  $3-5 \times 10^5$  esporas/ml y el cultivo se dejó crecer aeróbicamente con agitación constante durante 16-18 h a 28° C. El micelio se cosechó por filtración al vacío sobre papel Whatman N° 1 y se lavó sobre el filtro con agua destilada fría. Se escurrió la mayor parte del agua retenida presionando el micelio entre dos hojas de papel de filtro y se lo guardó cortado en trozos a -70° C hasta el momento de ser utilizado.

## III - OBTENCION DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP<sub>c</sub> DE MUCOR.

Todos los pasos se realizaron a 4°C. El micelio fue molido con nitrógeno líquido y el polvo obtenido se lo suspendió en tres volúmenes de buffer M. Se agitó suavemente la mezcla durante 30 min. y se la filtró por tela de algodón. El filtrado se centrifugó a 2.000 x g durante 10 min., se tomó el sobrenadante y se lo centrifugó a 100.000 x g. durante 60 min. Se conservó el sobrenadante (S<sub>100</sub>) y fué saturado hasta 45% con sulfato de amonio sólido y se dejó agitando la suspensión durante 20 min.; transcurrido este tiempo se centrifugó durante 15 min. a 12.000 x g.

El precipitado obtenido se disolvió en buffer M y se dializó contra 100 volúmenes del mismo buffer. El dializado se sembró en una columna de DEAE-celulosa, equilibrada con buffer M, manteniendo una relación de 10 mg de proteína/ml de resina empaquetada.

La elución se realizó con un gradiente lineal de 0-0.4 M de ClNa en buffer M cuyo volumen fue 10 veces el de la columna. Se recogieron fracciones de un volumen equivalente al décimo del volumen de la columna con un flujo de una fracción cada 5 min. Se juntaron las fracciones con actividad quinásica que eluyeron entre 0,16 y 0,25 M de ClNa y

la proteína se concentró por precipitación con sulfato de amonio sólido hasta una saturación del 80%. El precipitado obtenido se disolvió en buffer M y se lo sembró en una columna de Sephacryl S-300 de manera que el volumen sembrado no superara el 2% del volumen de la columna.

Se recogieron fracciones de un centésimo del volumen de la columna a un flujo de una fracción cada 10 min.

Se juntaron las fracciones con actividad de quinasa de proteínas dependiente de AMP<sub>c</sub>, y la proteína se concentró por diálisis contra una solución saturada de sulfato de amonio preparada en buffer M. El dializado se centrifugó 15 min. a 12.000 x g. y el precipitado se disolvió en buffer M, se dializó contra 100 volúmenes del mismo buffer y se guardó fraccionado en pequeños volúmenes a -20° C.

De esta forma se obtuvieron preparaciones enzimáticas que tenían una actividad específica entre 3.000 y 4.000 unidades/mg de proteína.

Una unidad de actividad enzimática se define como los pmoles de P transferidos a la histona en un minuto en las condiciones del ensayo que se describe más adelante.

IV.- OBTENCION DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP<sub>c</sub> DE MUCOR.

Se incubaron 1.200 unidades de holoenzima purificada hasta la etapa de Sephacryl S-300 según se describió en la sección III de Materiales y Métodos, en un volúmen final de 1.2 ml de buffer M conteniendo ClNa 0.5 M y AMP<sub>c</sub> 3  $\mu$ M durante 30 min. a 4°C. Al cabo de ese tiempo se sembró la mezcla en 6 gradientes de sacarosa 5-20% preparados en buffer M conteniendo albúmina 1 mg/ml y AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) 120 nM. Los gradientes se centrifugaron en un rotor SW 55Ti a 45.000 rpm durante 16 horas.

Los gradientes se fraccionaron uno sobre otro y se juntaron las fracciones con actividad receptora de AMP<sub>c</sub>, cuidando de descartar aquellas que tuviesen actividad quinásica. Las fracciones reunidas se dializaron contra buffer M y se concentraron utilizando un concentrador Minicon B-15.

La preparación de la subunidad regulatoria (que por el método de obtención tiene unido AMP<sub>c</sub>) se guardó a -20°C.

V- PURIFICACION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA DE LA  
QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP<sub>c</sub> DE  
MUCOR.

Salvo cuando se indique, todos los pasos de esta purificación se realizaron a 4° C. La preparación de holoenzima, proveniente de 150 g de micelio húmedo, parcialmente purificado hasta la etapa de filtración molecular se llevó a pH 6.3 con ácido acético 1 N, agregado lentamente, y la suspensión se dejó reposar durante 10 min. Al cabo de este tiempo se centrifugó durante 10 min. a 12.000 x g. Se tomó el sobrenadante y se dializó contra 100 volúmenes de buffer C. El dializado se sembró en una columna de CM-Sephadex equilibrada con el mismo buffer, manteniendo una relación de 3 mg de proteína/ml de resina empaquetada. Se recogió el percolado el cual se sembró en otra columna similar, juntando nuevamente el percolado. Este se sembró en una columna de afinidad de AMP<sub>c</sub>-agarosa de 1 ml equilibrada con buffer C<sub>1</sub>. Luego de la siembra se lavó con este buffer hasta que la concentración proteica en el eluido fuera menor de 0.030 mg/ml.

Posteriormente se lavó la columna con buffer C<sub>1</sub> con-

teniendo ClNa 0.6 M y se colectaron fracciones de 0.3 ml. Luego de recoger tres fracciones se cerró la columna y se la incubó a 20°C durante 5 min. y se continuó eluyendo con el mismo buffer a temperatura ambiente, hasta que la actividad quinásica fuese despreciable. Las fracciones obtenidas se llevaron inmediatamente a 4°C. Se descartaron las fracciones con una alta relación de proteína/actividad enzimática y se juntaron todas las otras fracciones con actividad quinásica. Estas se dializaron contra buffer C durante 60 min. con cambios del buffer cada 20 min. El dializado se sembró en una columna de CM-Sephadex C-50 de 0.5 ml equilibrada con buffer C<sub>1</sub> la cual se lavó con 6 volúmenes del mismo buffer. La enzima se eluyó con una solución de ClNa 0.35 M preparada en buffer C<sub>1</sub>. Las fracciones con actividad quinásica se concentraron por diálisis contra sacarosa 2 M preparada en buffer C<sub>1</sub>. La preparación así obtenida se guardó a 4°C.

## VI- OBTENCION DE LAS SUBUNIDADES CATALITICAS Y REGULATORIAS DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP<sub>c</sub> DE TIPO II DE CORAZON DE COBAYO.

Se anestesiaron tres cobayos con éter etílico y se les

extrajeran los corazones (6.5 grs. totales). Estos se lavaron rápidamente con buffer M frío y se cortaron en trozos pequeños con una tijera. Se homogeneizó el tejido con 15 ml de buffer M, en un homogenizador Omnimixer-Sorvall a la máxima velocidad. El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa y el filtrado se centrifugó durante 10 min. a 2.000 x g. El sobrenadante obtenido se sometió a los mismos pasos de purificación que los empleados en la obtención de la holoenzima de Mucor, descritos en detalle en la sección III de Materiales y Métodos. Estos fueron los siguientes: 1) Obtención del S<sub>100</sub> 2) Precipitación con sulfato de amonio hasta un 45% de saturación. 3) Cromatografía en una columna de DEAE-celulosa. En este paso se juntaron las fracciones con actividad quinásica que corresponden a las fracciones eluidas entre 0.15 y 0.20 M ClNa, que es la zona del gradiente donde eluyen las quinasas del tipo II. 4) Se realizó una filtración molecular por Sephacryl S-300. Se obtuvo una preparación cuya actividad específica fue de 14.000 unidades/mg de proteínas.

Con el objeto de disociar la holoenzima en sus subunidades se incubó una alícuota de la preparación enzimática

conteniendo 100  $\mu\text{g}$  de proteína con  $\text{AMP}_c$  25  $\mu\text{M}$  durante un min. a 30°C.

Para separar ambas subunidades se realizó una cromatografía en una columna mixta de Sephadex G-25 de 4 ml sobre la cual se formó una capa de CM-Sephadex C 50 de 0.8 ml (203). La columna se equilibró con buffer C<sub>1</sub>.

Luego de sembrada la muestra se lavó la columna con el mismo buffer de modo de eluir la subunidad regulatoria que no se retiene en este tipo de columna. Se recogieron fracciones de 0.15 ml. Se juntó el volumen muerto conteniendo la subunidad regulatoria y se terminó de lavar la columna mixta con 5 ml de buffer. Luego se eluyó la subunidad catalítica con una solución de ClNa 0.4 M, preparada en buffer C<sub>1</sub>. Se recogieron fracciones de 0.15 ml y se guardaron aquellas con actividad quinásica. Ambas preparaciones, la de subunidad regulatoria y la de subunidad catalítica, se concentraron en un concentrador Minicon B-15 y se utilizaron inmediatamente de preparadas.

## VII- MEDICION DE LA ACTIVIDAD QUINASICA DE PROTEINAS.

Para la medición de la actividad quinásica de proteínas en presencia o ausencia de  $\text{AMP}_c$  1 M se utilizó una mez-

cla de incubación compuesta por buffer Tris-ClH 50 mM 7.3,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  10 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, ATP- $\gamma$ -( $\text{P}^{32}$ ) 0,1 mM (200-800 cpm / pmol) y como sustrato fosforilable 1.5 mg/ml de histona (tipo II S Sigma) o 0.25 mg/ml del heptapéptido aceptor del grupo fosfato (kemptido)\* en un volumen final de 0.1 ml. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 10 min a 30°C. Para separar el sustrato fosforilado del ATP- $\gamma$ -( $\text{P}^{32}$ ) sin reaccionar se procedió de dos maneras diferentes:

( ) Luego de la incubación se siguió el método descrito por ISHIKAWA (204), la reacción se detuvo sembrando la mezcla de incubación en papeles de fosfocelulosa de 2 cm x 2 cm, los cuales se lavaron con agua destilada cuatro veces consecutivas agitando suavemente durante cinco min cada vez y una última vez con etanol destilado. Se secaron los papeles con corriente de aire caliente y se contó la radiactividad de los mismos según se describe en la sección VII de Materiales y Métodos.

\* El kemptido cuya secuencia es Leu-Arg-Arg-Ser-Leu-Gly, constituye el núcleo fosforilable de la piruvato quinasa hepática y es uno de los mejores sustratos de las quinasas de proteínas dependientes de  $\text{AMP}_c$ .

b) Sólo cuando se utilizó histona como sustrato, se siguió al ternativamente el siguiente método (118): Se detuvo la reac ción enzimática por agregado de 20  $\mu$ l de albúmina de 50 mg/ml seguidos de 1 ml de TCA 10%. La suspensión se centrifugó 5 min a 5.000 rpm en una centrífuga clínica y se decantó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 0.2 ml de  $\text{PO}_4\text{HNaNH}_4$  1 M y la proteína se reprecipitó con 1 ml de TCA 10%. El procedimiento de centrifugación, resuspensión y reprecipitación se repitió dos veces más. La resuspensión final se realizó en 0.1 ml de HOK 1 N. Se sembró el total de cada muestra en un cuadrado de papel Whatman 3 de 2 x 2 cm que se secó en estufa.

Los papeles secos se contaron en solución centelladora de tolueno en un contador de centelleo líquido (ver con taje de radiactividad).

#### VIII- MEDICION DE LA ACTIVIDAD RECEPTORA DE AMP<sub>c</sub>.

La actividad receptora de AMP<sub>c</sub> se midió por dos mé todos diferentes: 1) Filtración por membranas de nitroceluloo sa y 2) Equilibrio de diálisis.

## 1- Filtración por membranas de Nitrocelulosa.

Las mezclas de incubación se efectuaron de dos modos diferentes:

- a) En un volumen de 50  $\mu$ l conteniendo AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) 120 nM buffer Tris-ClH 10 mM pH 7.3, y la alícuota de la muestra a ensayar (ensayo no activado).
- b) En las mismas condiciones que el anterior pero conteniendo además la mezcla de incubación 1.5 mg/ml de histona y ClNa 0.5 M con el fin de producir la disociación de la holoenzima. (ensayo activado).

Las incubaciones se llevaron a cabo durante 5 min a 30°C o 30 min a 4°C. Las mezclas de reacción se filtraron al vacío por membranas de nitrocelulosa (Schleicher y Schüll BA-15). Las membranas se lavaron con 20 ml de buffer Tris-ClH 20 mM pH 7.3, los filtros se secaron en estufa y se contó la radiactividad de los mismos en solución centelladora de tolueno. (Sección XII de Materiales y Métodos).

## 2- Equilibrio de diálisis.

Las mezclas fueron similares a las descritas anterioro

mente excepto que se realizaron en un volumen de 0.2 ml y no tenían AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>). Estas mezclas se dializaron contra 5 ml de buffer Tris-ClH 10 mM, pH 7.2 y AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) 120 nM. En el caso del ensayo activado (b) la solución de diálisis contenía además 1.5 mg/ml de histona y ClNa 0.5 M.

Las diálisis se llevaron a cabo durante 18 hs a 4°C. Transcurrido este tiempo, se tomaron alícuotas de 25 µl de las mezclas dializadas y de las soluciones de diálisis y se sembraron sobre filtros de nitrocelulosa, los cuales se secaron en estufa y se contó la radiactividad de los mismos como se describió en el caso anterior.

La diferencia entre la radiactividad medida en la alícuota de la mezcla de incubación y la medida en la alícuota de la solución de diálisis representa el AMP<sub>c</sub> unido a la proteína.

#### IX- MARCACION POR FOTOAFINIDAD DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA DE LA HOLOENZIMA DE MUCOR.

Se utilizó el método de HALEY con ligeras modificaciones (205). La pureza radioquímica del reactivo 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) se comprobó por cromatografía en capa delgada

en placas de celulosa, utilizando butanol: ácido acético: agua (5:3:2 v/v) como solvente de desarrollo. Se sembraron 0.7 pmol de 8-Az AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>).

Las incubaciones para realizar la fotomarcación se realizaron con 300 unidades de holoenzima parcialmente purificada hasta el paso de la Sephacryl S-300, en un volumen de reacción de 250  $\mu$ l en buffer M, con 8Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) 1  $\mu$ M en presencia o ausencia de AMP<sub>c</sub> 30  $\mu$ M. Las mezclas se preincubaron en oscuridad durante 30 min a 4°C. Seguidamente se fotolizaron con una fuente de radiación UV (Mineralight UVS-11) a 3 cm de distancia durante una hora a 4°C. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se sembró en una columna de Sephadex G-25 equilibrada con buffer M y se recogió el volumen muerto, que fue concentrado hasta un volumen de 60  $\mu$ l utilizando un concentrador Amicon B-15. Esta muestra se utilizó para realizar una corrida electroforética en gel de poliacrilamida con SDS según se describe en la sección X de Materiales y Métodos.

Para determinar el porcentaje de unión covalente formado durante la fotólisis se procedió como se describió anteriormente excepto que las preincubaciones se realizaron en

un volumen de 50  $\mu$ l utilizando 66 unidades de holoenzima .  
Luego de la fotólisis se procedió del siguiente modo: se agregaron a las muestras 10  $\mu$ l de albúmina de 50 mg/ml seguidos de 1 ml de TCA 10%. Se centrifugaron las mezclas a 5.000 rpm durante 5 min. y se descartó el sobrenadante. El precipitado se disolvió en 0.2 ml de  $\text{PO}_4\text{HNaNH}_4$  1 M se volvió a precipitar con TCA 10% y se recentrifugó. Este proceso se repitió dos veces más y finalmente el precipitado se redisolvió en 0.1 ml de HOK 1 N y se sembró en papeles Whatman 3 de 2 x 2 cm. Los papeles se secaron en estufa y, se sumergieron en solución centelladora de tolueno y se contó la radiactividad según se describe en la sección XII de Materiales y Métodos.

## X - ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

### 1 - Preparación de los geles.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se llevaron a cabo en tubos de vidrio de 7 x 120 mm o en geles planos verticales de 1.5 mm de espesor. Los geles en tubo tenían un gel separador de 5% de acrilamida y 0.2% de bis-

acrilamida y los geles planos uno de 7% de acrilamida y 0.2% de bisacrilamida. Ambos tipos de geles llevaron como gel concentrador uno de 5% de acrilamida y 1.25% de bisacrilamida. Los geles se prepararon siguiendo las instrucciones del manual de CANALCO (206). La composición del buffer de gelificación fue Tris-ClH 0.37 M pH 8.9 y la del buffer de corrida Tris-glicina 0.19 M pH 8.3 para los geles en tubo y para los geles planos el mismo buffer con el agregado de SDS 0.1%. Se utilizó como marcador del frente de corrida azul de bromofenol. Las corridas se realizaron a 4°C para los geles en tubo y a temperatura ambiente para los geles planos, a una intensidad de 2 mA por tubo o por siembra respectivamente hasta que el colorante llegara al gel separador. Posteriormente la corriente se elevó a 5 mA por tubo o por siembra y se continuó la corrida hasta que el colorante hubiera recorrido 10 cm desde el lugar de la siembra.

La tinción de las proteínas se realizó con Azul de Coomasie (0.24 gr/100 ml de una mezcla de Metanol: Acido Acético: H<sub>2</sub>O (5:1:5 v/v) durante 2 hs a 60°C. Después de la tinción los geles se lavaron con una mezcla de Metanol: Acido Acético:H<sub>2</sub>O (25:50:825 v/v) para eliminar el colo-

rante no fijado específicamente a las proteínas.

## 2- Medición de actividades quinásicas y receptoras de AMP<sub>c</sub> en geles.

La medición de la actividad fosforilante y receptora de AMP<sub>c</sub> se llevó a cabo en corridas electroforéticas en geles en tubo. Se cortó el gel en rodajas de 2 mm de espesor, cada una de las cuales se sumergió en 200  $\mu$ l de la siguiente mezcla de extracción: buffer Tris-ClH 20 mM pH 7.2, EDTA 2 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, albúmina 1 mg/ml y glicerol 20%. Los tubos se dejaron agitando suavemente durante toda la noche a 4°C. Se determinaron las actividades quinásicas y receptora de AMP<sub>c</sub> en alícuotas de 90  $\mu$ l de la solución de extracción, de la siguiente manera:

actividad quinásica: se agregaron 10  $\mu$ l de una solución que contenía ATP- $\gamma$ (P<sup>32</sup>) 500  $\mu$ M, histona 15 mg/ml y la mezcla se incubó durante 15 min a 30°C. Luego se procedió como se indicó para la medición de la actividad quinásica en la sección VII de Materiales y Métodos.

actividad receptora de AMP<sub>c</sub>: se agregaron 10  $\mu$ l de una so-

lución de AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) 2 μM y se procedió como se indicó para el ensayo de la actividad receptora de AMP<sub>c</sub> en la sección VIII de Materiales y Métodos.

### 3 - Medición de la radiactividad en los geles:

Las rodajas se sumergieron en 200 μl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% p/v y se calentaron en un baño a 100°C durante 20 min. para disolver el gel. Transcurrido este tiempo se trasvasó la solución a viales de plástico conteniendo solución centelleadora de tritón-tolueno y se contó la radiactividad de las mismas (ver sección XII de Materiales y Métodos).

### 4 - Determinación de pesos moleculares en geles de poli-acrilamida.

Se siguieron las instrucciones del manual de Canalco (206) para lo cual se incubaron las muestras problemas un min a 100°C en buffer Tris-ClH 50 mM pH 8 conteniendo SDS 1% y 2-mercaptoetanol 2% cuando se indica. Como marcador de pesos moleculares se utilizaron: β-Galactosidasa, Fosforilasa, albúmina y ovoalbúmina.

5 - Autorradiografía de los geles.

Los geles radiactivos planos se secaron sobre papel Whatman n° 3 en un secador de geles marca Pharmacia (GSD-4) con ayuda de calor y se pusieron a impresionar películas Kodak (X-Omat 5 FILM) con ayuda de una pantalla amplificadora Kodak, a  $-70^{\circ}\text{C}$  por un período de 4 a 10 días. Luego se procedió al revelado de la película.

XI - DETERMINACION Y CALCULO DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LA HOLOENZIMA Y DE SUS SUBUNIDADES.

1 - Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa.

Se utilizaron gradientes lineales de 5-20% (4.5 ml) de sacarosa preparados en buffer M, conteniendo según el experimento a realizar AMP<sub>c</sub> 100-200 nM, ClNa 0.5 M y albúmina 0.7 mg/ml.

Los gradientes se armaron con 4 capas de sacarosa de 20, 15, 10 y 5% una sobre otra, cada una de 1.14 ml y se dejaron reposar 2 horas a temperatura ambiente para que se formase el gradiente lineal. Luego se los llevó a  $4^{\circ}\text{C}$  inmediata

mente antes de sembrar la muestra junto con los marcadores. Una vez sembrados se corrieron los gradientes durante 16 horas a 40.000 rpm en un rotor SW 55 Ti a 4°C. Al terminar la corrida se recolectaron fracciones de 0.2 ml haciendo sifón desde el fondo del tubo. Las proteínas marcadoras utilizadas fueron: glucosa oxidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y citocromo C.

## 2 - Filtración molecular por resinas de Sephacryl S-300.

La filtración se realizó en una columna de Sephacryl S-300 de 1 cm de diámetro por 64 cm de altura, equilibrada con buffer M, cuando se quiso determinar el radio de Stokes de la holoenzima. Para la determinación del radio de Stokes de sus subunidades, la columna fue equilibrada con buffer M, AMP<sub>c</sub> 120 nM, ClNa 0.5 M y albúmina 0.7 mg/ml. Cada una de ellas fue eluída con el buffer de equilibrio a un flujo de 5 ml por hora, recogién dose fracciones de 0.5 ml. El volumen de exclusión se midió pasando por la columna Azul de dextrano mg/ml disuelto en buffer M conteniendo ClNa 0.5 M, para evitar fenómenos de adsorción. Las proteínas marcadoras utilizadas para la filtración en gel fueron:  $\beta$ -galactosidasa,

catalasa, peroxidasa y citocromo C.

### XI.3 - Radio de Stokes.

Para estimar el radio de Stokes de la quinasa de proteínas y de sus subunidades se utilizaron los datos de elución de la columna de Sephacryl S-300. El valor del radio de Stokes se obtuvo gráficamente, según el método de Laurent y Killander (207), representando  $(-\log K_{av})^{1/2}$  versus el radio de Stokes de las proteínas marcadoras. El  $K_{av}$  se define como la relación:

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

donde  $V_e$  = volumen de elución de la proteína.

$V_o$  = volumen de exclusión de la columna.

$V_t$  = volumen total de la resina.

### XI.4 - Coefficiente de sedimentación.

El coeficiente de sedimentación ( $S_{20,w}$ ) de la holoenzima y de sus subunidades se obtuvo a partir de los datos de sedimentación en gradientes de sacarosa. De la relación li-

neal obtenida al graficar la distancia recorrida por las proteínas marcadoras desde la superficie del gradiente en función de sus respectivos  $S$ , se obtuvo por interpolación en la recta los coeficientes de sedimentación de las proteínas incógnitas.

#### XI.5 - Peso molecular.

El peso molecular de la holoenzima y de las subunidades regulatorias y catalíticas fue calculado de acuerdo al método de Siegel y Monty (208) aplicando la fórmula:

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

donde  $N$  es el número de Avogadro;  $\eta_{20,w}$  es la viscosidad del agua a  $20^{\circ}\text{C}$  ( $1,1 \times 10^{-2}$  g/cm.seg),  $a$  es el radio de Stokes,  $S_{20,w}$  es el coeficiente de sedimentación,  $\bar{v}$  es el volumen específico parcial (se consideró  $\bar{v} = 0,74 \text{ cm}^3/\text{g}$ ) y  $\rho_{20,w}$  es la densidad del agua a  $20^{\circ}\text{C}$  ( $0,988 \text{ g/cm}^3$ ).

### XI.6 - Cociente friccional.

Para calcular el cociente friccional  $f/f_0$  se utilizaron los parámetros calculados antes ( $a$  y  $PM$ ) aplicando la fórmula de Siegel y Monty (208):

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

### XI.7 - Parámetros de las proteínas marcadoras.

Los valores de los parámetros de las proteínas marcadoras utilizadas en los gradientes de sacarosa y en la filtración en gel se resumen en la Tabla III.

## XII - OTRAS TECNICAS.

### XII.1- Síntesis del ATP ( $\gamma$ - $P^{32}$ ).

Para la síntesis de este nucleótido radiactivo se siguió en líneas generales la técnica de Glynn y Chappell (213) con las modificaciones introducidas por Chang et al (214).

### XII.2- Dosaje de proteína.

La proteína fue valorada por el método de Bradford

TABLA III

Parámetros hidrodinámicos y moleculares de las proteínas marcadas utilizadas.

Proteína	Coefficiente de Sedimentación S 20, w (S)	Radio de Stokes a (nm)	Peso molecular (*) (K)
$\beta$ -galactosidasa	15,9 (209)	6,8 (209)	520
Citocromo C	1,7 (209)	1,8 (209)	12,4
Catalasa	11,3 (209)	5,21 (209)	247
Peroxidasa	3,5 (210)	3,04 (**)	39,8 (210)
Fosfatasa alcalina	6,3 (211)	2,93 (**)	80 (211)
Glucosa oxidasa	8,3 (212)	4,18 (**)	152 (212)

(\*\*) Los valores del radio de Stokes (a) se obtuvieron de la fórmula  $a = k T / 6 \pi \eta_{20,w} \cdot D_{20,w}$  tomada de Haga y colaboradores (209) utilizando los valores de los coeficientes de difusión corregidos ( $D_{20,w}$ ) tabulados (212,210), donde k es la constante de Boltzman,  $\eta_{20,w}$  es la viscosidad del agua a 20°C y T es 293 K.

(\*) K = kilo Dalton.

(215), utilizando albúmina de suero bovino como patrón.

### XII.3- Determinación de las proteínas marcadoras en gradientes de sacarosa y geles

Catalasa: se midió la actividad enzimática valorando el sustrato no consumido ( $H_2O_2$ ) con solución de IK de acuerdo al método de Terenzi et al. (216).

Citocromo C: se valoró por espectrofotometría en el visible, midiendo la absorbancia a 410 nm.

Peroxidasa: se siguió la técnica descrita en el Manual de Worthington (217), midiendo el color desarrollado cuando la o-dianisidina se oxida al descomponerse el  $H_2O_2$  en presencia de la enzima.

Fosfatasa alcalina: se dosó midiendo a 410 nm el p-nitrofenol liberado al tratar p-nitrofenilfosfato con la enzima según la técnica descrita en el Manual de Worthington (217).

Glucosa Oxidasa: se midió según el método de Hugget y Nixon (218) con el sistema acoplado peroxidasa-o-dianisidina.

$\beta$ -Galactosidasa: se valoró siguiendo el método descrito en el Manual de Worthington (217) utilizando o-nitrofenil,  $\beta$ -D galactopiranosido como sustrato.

#### XII.4 - Medición de la radiactividad.

Para el conteo de las muestras radiactivas se utilizó un contador de centelleo líquido marca Packard Tricarb Mod. 3003. Las muestras resultantes del ensayo de quinasa, indistintamente del método empleado y las del ensayo de la actividad receptora de AMP<sub>c</sub>, se contaron en viales de plástico chicos con 3 ml de solución centelladora de tolueno apoyados sobre los viales standard del aparato.

La composición de la solución centelladora fué: 0.1 g de dimetil POPOP (1,4-bis 2 (4-metil-5-fenil oxazolil beneno), 4 g de PPO (2,5 -difeniloxazol) por litro de tolueno.

Para medir radiactividad en soluciones acuosas se utilizó una solución centelladora de Tritón:tolueno (1:4 v/v).

La radiactividad del P<sub>i</sub><sup>32</sup> se midió con una ganancia del 25% y con una ventana de 50-∞. La del H<sup>3</sup> se midió con 60% de ganancia y con una ventana de 50-1000.

### XIII - REACTIVOS.

El AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) (actividad específica 38 Ci/mmol) fue provisto por Radio Chemical Centre (Amersham) y el 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) (79 Ci/mmol) por ICN.

El P<sub>i</sub><sup>32</sup> en solución clorhídrica utilizado para la síntesis del ATP- $\gamma$  - (P<sup>32</sup>) se obtuvo de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Los siguientes reactivos fueron provistos por SIGMA: citocromo C, ovoalbúmina, las enzimas marcadoras, ATP, AMP<sub>c</sub>, 8az-AMP<sub>c</sub>, Tris, albúmina sérica cristalina, SDS, TCA, Kemptido, histona tipo II S, DEAE-celulosa microgranular, AMP<sub>c</sub>-agarosa (con el AMP<sub>c</sub> ligado a la resina por el C<sub>8</sub> a través de un brazo espaciador de 6 átomos de C). Quinasa de proteína de tipo II de corazón de bovino.

La acrilamida fue provista por BDH o Merck, la bisacrilamida por FLUKA y el Temed por EastmanKodak.

De Pharmacia (UPSALA) se obtuvieron las siguientes resinas: Sephadex G-25 de poro medio, CM-Sephadex C-50 y la Sephacryl S-300. Los concentradores Amicon B-15 de Amicon Corp. Lexington, Mass y las placas de celulosa de Merck.

El papel de fosfocelulosa utilizado fue marca Whatman y las membranas de nitrocelulosa de Schleicher & Schüll BA 85 de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro.

El resto de los reactivos utilizados fue de grado analítico.

## RESULTADOS Y DISCUSION

## I- PURIFICACION PARCIAL DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP<sub>c</sub>.

Para la purificación parcial de la quinasa de proteínas dependiente de AMP<sub>c</sub> se aplicó el procedimiento que figura detallado en la sección III de Materiales y Métodos.

Dicho método fue básicamente descrito en la Tesis Doctoral de S. Moreno (201) para la purificación parcial de la holoenzima proveniente de células levaduriformes y fue aplicado con ligeras variaciones. La modificación principal corresponde al paso de la filtración molecular, en el cual se reemplazó la columna de Sephadex G-200 por una de Sephacryl S-300. En esta resina la inclusión de la quinasa es más acentuada que en la Sephadex G-200 y la purificación obtenida fué mayor.

En la tabla IV a modo de ejemplo se presenta un cuadro de las diferentes etapas de purificación de la holoenzima obtenida a partir de 50 grs. de micelio.

Para los experimentos presentados en este trabajo se utilizó la holoenzima purificada hasta la etapa 4.

TABLA IV

Purificación de la quinasa de proteínas dependiente de AMP<sub>c</sub>

Fracción	Proteína Total (mg)	Actividad específica (unidades/mg prot.)	Purificación ( veces )	Rendim. %
1-S <sub>100</sub>	1625	67	1	100
2- Sulfato de Amonio	187	396	5.9	68
3- DEAE-celulosa	37.5	778	11.6	26.7
4- Sephacryl S-300	5.9	3300	50	18

II- DETERMINACION DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E  
HIDRODINAMICOS DE LA HOLOENZIMA Y DE SUS SUB-  
UNIDADES.

Para el cálculo de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> de M.rouxii y de sus subunidades regulatoria y catalítica, se utilizaron los datos de los coeficientes de sedimentación y radios de Stokes obtenidos por centrifugación en gradientes de sacarosa y filtración molecular en Sephacryl S-300 respectivamente.

## II. 1- Determinación de los coeficientes de sedimentación.

Las centrifugaciones en gradientes de sacarosa se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento general descrito en la sección XI de Materiales y Métodos.

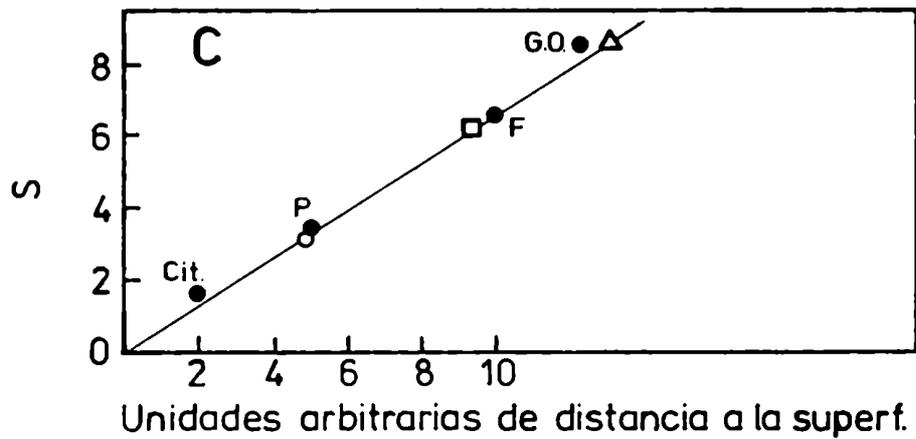
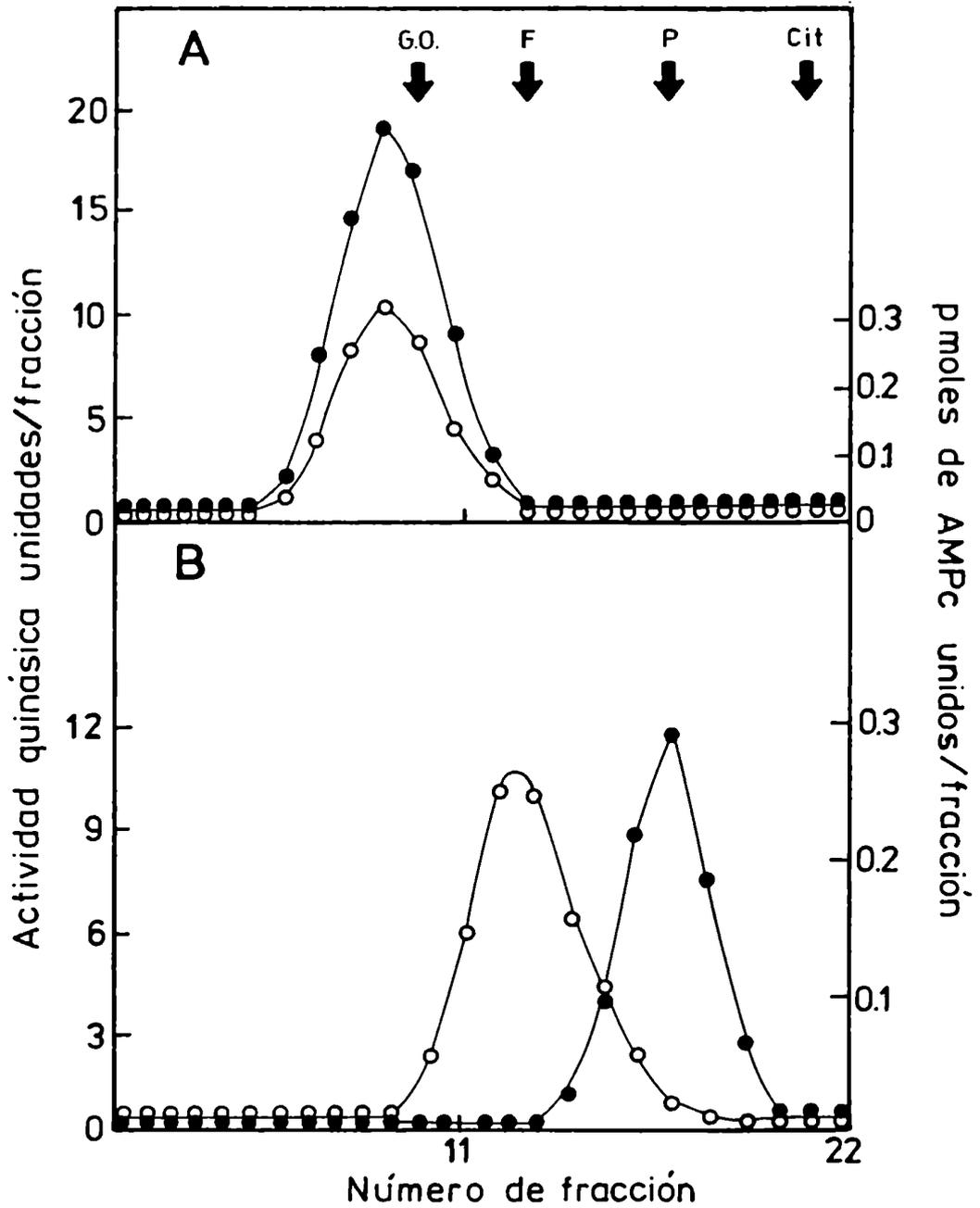
Para la obtención de los coeficientes de sedimentación de la subunidad regulatoria y de la subunidad catalítica se in cubió una alícuota apropiada de la preparación de holoenzima en condiciones disociantes, y el gradiente fue armado incluyen do en cada capa  $\text{ClNa}$  0.5 M y  $\text{AMP}_c$  120 nM para evitar la reasociación de las subunidades durante la corrida.

La figura 5 muestra las actividades quinásicas y recepto ra de  $\text{AMP}_c$  de la holoenzima (5 A) y de sus subunidades (5 B) y la posición de las proteínas marcadoras, indicada por flechas.

Por interpolación en la línea recta que relaciona las distancias recorridas por las proteínas marcadoras desde la super ficie del gradiente y sus respectivos coeficientes de sedimentación (gráfico 5 C) se obtuvo un valor para el coeficiente de sedimentación de la holoenzima de 8.5 S y de 6.2 y 3.2 S para las subunidades regulatoria y catalítica respectivamen te.

Figura 5.- Centrifugación en gradientes de sacarosa 5-20% de la holoenzima (A) y de sus subunidades regulatoria y catalítica (B). Se incubaron para el experimento de la figura 5 A 120 unidades de la preparación de holoenzima y 50 unidades para el experimento de la figura 5 B durante 1 min a 30°C en un volúmen final de 0.2 ml con los siguientes agregados: (A) ninguno, (B) 3 $\mu$ M de AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>), ClNa 0.5 M y 0.5 mg/ml de albúmina. El gradiente en (B) contenía ClNa 0.5 M, AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) 130 nM y albúmina 0.5 mg/ml.

En alícuotas adecuadas de cada fracción se midió la actividad quinásica utilizando histona como sustrato —●—. Para medir la actividad receptora de AMP<sub>c</sub> (-o-) se tomaron alícuotas de cada fracción y se procedió de la siguiente manera: en (A) se incubaron con AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) según se detalla en la sección VIII.1-a de Materiales y Métodos y en (B) se filtraron directamente por membranas de nitrocelulosa y se contó la radiactividad de las mismas. La figura 5 C muestra la relación entre los coeficientes de sedimentación ( $S_{20,W}$ ) y las distancias recorridas desde el sitio de siembra por las proteínas marcadoras (●), por la holoenzima ( $\Delta$ ) y por sus subunidades regulatoria ( $\square$ ) y catalítica (o). Como proteínas marcadoras se utilizaron: Glucosa oxidasa (GO), Fosfatasa alcalina (F), Peroxidasa (P) y Citocromo C (Cit).



## II-2 Determinación de los radios de Stokes.

Para determinar los radios de Stokes de la holoenzima y de sus subunidades se utilizó la filtración molecular en Sephacryl S-300 como se indicó en la sección XI de Materiales y Métodos. Para obtener las subunidades se incubó la holoenzima en condiciones disociantes y la columna estaba equilibrada con buffer M conteniendo ClNa 0.5 M y AMP<sub>c</sub> 120 nM. La figura 6 muestra el perfil de actividades obtenidas en ambos casos.

En el insertado de la misma figura se puede ver la relación entre el  $(-1 \log(K_{av}))^{1/2}$  y el radio de Stokes de las proteínas marcadoras y las posiciones correspondientes a la holoenzima y sus subunidades regulatorias y catalítica. Por interpolación se obtuvieron los siguientes radios de Stokes: holoenzima 6.5 nm, subunidad regulatoria 5.9 nm, y subunidad catalítica 2.8 nm.

## II-3 Determinación del peso molecular.

Una vez conocidos los coeficientes de sedimentación y el radio de Stokes de la quinasa y de sus subunidades y su-

Figura 6.- Filtración en columnas de Sephacryl S-300 (1 x 64' cm) de la holoenzima (6 A) y de sus subunidades regulatoria y catalítica (6 B). Se incubaron 60 unidades de una preparación de holoenzima en un volumen final de 1 ml durante 1 min a 30°C con los siguientes agregados: (A) ninguno, (B) AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) 2 μM, ClNa 0.5 M y albúmina 0.5 mg/ml. La columna en (B) fue equilibrada con AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) 120 nM, ClNa 0.5 M y albúmina 0.5 mg/ml. La filtración se desarrolló como se indicó en la sección XI de Materiales y Métodos. En alícuotas de las fracciones eluidas se midió la actividad quinásica, con histona como sustrato (-●-). La actividad receptora de AMP<sub>c</sub> (-○-) se midió con el método descrito en la sección VIII-(1-a) de Materiales y Métodos en el experimento de la figura 6 A, y en el de la 6 B por filtración directa de una alícuota por membranas de nitrocelulosa. La flecha indica el volumen muerto de la columna. En el gráfico insertado se muestra la relación entre el  $(-\log K_{av})^{1/2}$  y el radio de Stokes de las proteínas marcadoras (○) que fueron cromatografiadas en un experimento independiente. (▲) Subunidad catalítica, (●) subunidad regulatoria y (■) holoenzima.

Como proteínas marcadoras se utilizaron: β-Galactosidasa (β-Gal), Catalasa (Cat), Peroxidasa (P) y Citocromo C (Cit).



poniendo que el volumen específico parcial es semejante al de las proteínas globulares solubles (0.74 ml/g ), se estimaron los pesos moleculares utilizando la ecuación planteada en la sección XI de Materiales y Métodos. Los pesos moleculares calculados fueron: holoenzima 255 K, subunidad regulatoria 169 K y subunidad catalítica 41 K.

#### II. 4- Determinación del cociente friccional.

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

Los valores obtenidos fueron: holoenzima 1.54, subunidad regulatoria 1.61 y subunidad catalítica: 1.2.

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

Los valores hallados de los parámetros moleculares e hidrodinámicos indican que la holoenzima de M. rouxi es una molécula grande y asimétrica. Los datos que se encuentran

TABLA V

Parámetros moleculares e hidrodinámicos de la holoenzima y de sus subunidades.

	$S_{20,w}$ S	$a$ n m	PM K	$f/f_0$
holoenzima	8.5	6.5	255	1.54
subunidad regulatoria	6.2	5.9	169	1.61
subunidad catalítica	3.2	2.8	41	1.2

en la bibliografía para la mayoría de las quinasas de proteínas dependientes de  $AMP_c$  de eucariontes superiores oscilan alrededor de: 160 K para el peso molecular y entre 6.5 y 7.3 S para el coeficiente de sedimentación (105-106). En organismos eucariontes inferiores tampoco se encuentran valores tan altos, a excepción del valor informado por SY(115) de 130 K para la holoenzima de levadura de panadería.

Estos valores altos para la holoenzima de Mucor son debidos a la subunidad regulatoria, dado que los valores de la subunidad catalítica son similares a los de las subunidades catalíticas de enzimas de eucariontes superiores (7). La sub-

unidad regulatoria de la holoenzima de M. rouxii tiene un peso molecular y un coeficiente de sedimentación sorprendentemente altos, si se tiene en cuenta que en organismos superiores las subunidades regulatorias tienen un peso molecular que oscila entre 98 y 112 K según el tipo de isoenzima de la cual se trate.

La asimetría de la holoenzima también es consecuencia de la asimetría de la subunidad regulatoria, dado que como se puede ver en la tabla V la subunidad catalítica tiene un  $f/f_0$  cercano a la unidad.

De los pesos moleculares obtenidos para la holoenzima y para las subunidades regulatoria y catalítica y por analogía con las quinasas de eucariontes superiores, se puede proponer para la holoenzima de Mucor una estructura polimérica del tipo  $R_x C_2$  formada por dos subunidades catalíticas y una subunidad regulatoria.  $R_x$  expresa la posibilidad de que la subunidad regulatoria misma sea un oligómero.

### III - MARCACION POR FOTOAFINIDAD DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP<sub>c</sub> DE M. ROUXII.

Como se vió en la sección anterior, los métodos hasta aquí utilizados permitieron conocer el coeficiente de sedimentación, el radio de Stokes y por lo tanto calcular el peso molecular de la subunidad regulatoria, pero nada podemos saber sobre su estructura polimérica. Para poder dilucidar si ésta proteína es un monómero o un oligómero, se utilizó la marcación por fotoafinidad. La subunidad regulatoria es susceptible de ser marcada radiactivamente a través de la formación de una unión covalente por fotoafinidad con un análogo del AMP<sub>c</sub>, el 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>). Por exposición a radiación ultravioleta se produce la fotólisis del grupo azido, generándose un radical nitreno, altamente reactivo, que se une covalentemente en el sitio receptor del nucleótido de la subunidad regulatoria. Con el análogo radiactivo covalentemente unido, se puede estudiar la estructura polimérica de la subunidad regulatoria, analizando el perfil de radiactividad luego de una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes.

### III.1- Control de la calidad del análogo radiactivo.

Para controlar la calidad del 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) se u-

utilizó cromatografía en capa delgada tal como se describió en la sección IX de Materiales y Métodos. Se realizaron tres tipos de controles. En el primero se cromatografió directamente el reactivo comparando su movilidad con un standad de 8-azido-AMP<sub>c</sub> no radiactivo. Mediante el revelado por UV y el perfil de radiactividad obtenida al cortar la placa en sección de 0.3 cm y contar la radiactividad de las fracciones, se encontró que ambos compuestos tenían un  $R_f = 0.58$ .

En el segundo control, se corrió el reactivo previamente fotolizado, utilizando también como marcador el reactivo no radiactivo y fotolizado en las mismas condiciones. Se vió que el pico de  $R_f = 0.58$  desaparecía en ambos casos, transformándose en un pico principal de  $R_f = 0.42$ .

El tercer control consistió en sembrar el análogo radiactivo en la placa de celulosa y luego fotolizar la misma. Se encontró que un 18% del reactivo queda en el origen de la corrida, indicando que se descomponía y podría formar uniones covalentes.

III.2- Determinación de la  $A_{0.5}$  del 8-Az-AMP<sub>c</sub> ( $P^{32}$ ) para la subunidad regulatoria de la quinasa de *M. rouxii*.

Para realizar la marcación de la subunidad regulatoria con el 8 Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) en condiciones de saturación de los sitios receptores para el nucleótido fue preciso obtener la A<sub>0.5</sub> para el análogo, es decir la concentración del nucleótido que satura la mitad de los sitios de una cierta cantidad de proteína receptora. Las incubaciones se realizaron con una cantidad fija de proteína (10 unidades de holoenzima) y concentraciones crecientes de 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>), durante una hora a 4° C, como se indicó para la medición de la actividad receptora de AMP<sub>c</sub> en la sección VIII de Materiales y Métodos (método activado). En la figura 7 se puede observar la actividad receptora de 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) en función de la concentración de este nucleótido. Se puede ver que la concentración del análogo que satura la mitad de los sitios presentes es de 250 nM. Por trabajos previos en el laboratorio se sabía que la A<sub>0.5</sub> para el AMP<sub>c</sub> era de 30 nM (119). De estos resultados se deduce que la afinidad de la subunidad regulatoria es de 8 veces menor para el análogo que para el AMP<sub>c</sub>.

### III.3- Verificación del porcentaje de unión covalente formado en la fotólisis.

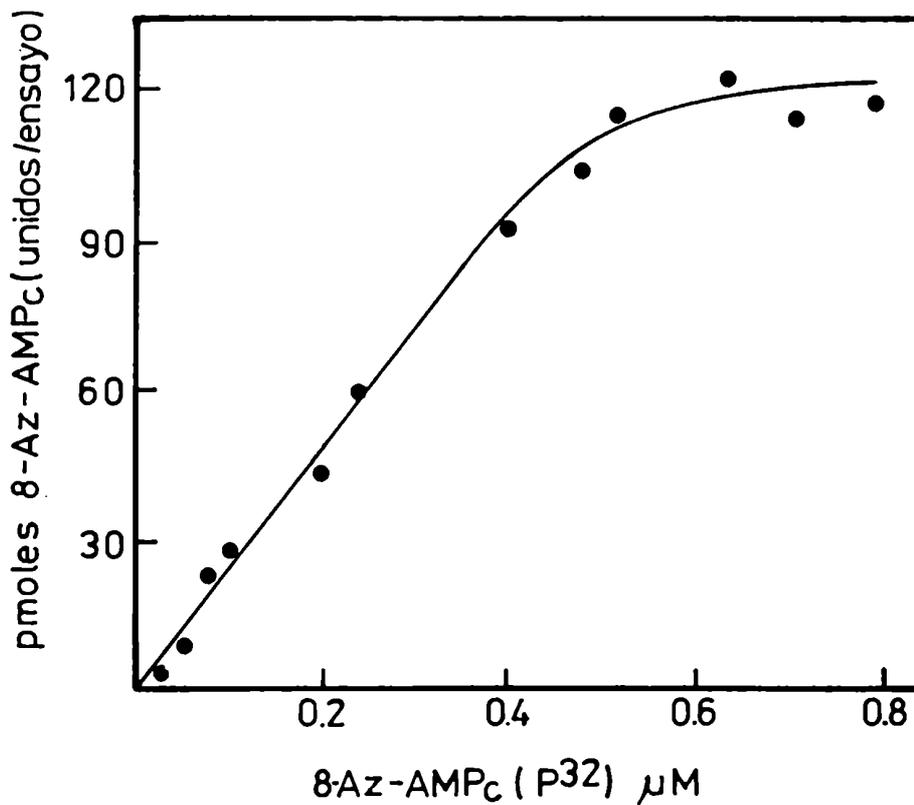


Figura 7: Saturación de la actividad receptora de 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) de la subunidad reguladora de la holoenzima de M.rouxii. Se incubaron 10 unidades de holoenzima en un volumen final de 50 μl, conteniendo histona 1.5 mg/ml y ClNa 0.5 M, y las concentraciones de 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) indicadas en cada punto en el gráfico. Se incubaron las mezclas durante una hora a 4°C y al cabo de este tiempo se filtraron por membranas de nitrocelulosa, y se contó la radiactividad de las mismas.

Con el objeto de conocer los pmoles de 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) unidos covalentemente a la proteína que debían sembrarse para realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, se estudió la proporción de unión covalente y específica del 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) a la subunidad regulatoria.

Se tomó como criterio de formación de uniones covalentes, las moléculas de 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) que permanecieron unidas a la proteína después de precipitar la proteína con TCA 10%. Como control se utilizó la quinasa de proteínas de AMP<sub>c</sub> de tipo II de corazón bovino, para la cual ya fue estudiada la eficiencia y especificidad de la fotomarcación (219).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VI.

Se deduce de ello que la eficiencia de fotomarcación específica para la enzima de Mucor es muy baja, sólo del 10%, comparada con la holoenzima de corazón de bovino.

#### III. 4- Electroforesis en gel de poliacrilamida de la subunidad regulatoria de la quinasa de Mucor con el 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) unido covalentemente.

Para conocer la estructura oligomérica de la subuni-

TABLA VI

Unión del 8-Az-AMP<sub>c</sub> a la quinasa de proteínas dependiente de AMP<sub>c</sub> de Mucor y de corazón bovino.

	8-Az-AMP <sub>c</sub> (P <sup>32</sup> )	AMP <sub>c</sub>	hν (254nm)	TCA	fentomoles de 8-Az-AMP <sub>c</sub> (P <sup>32</sup> ) unidos
a	+				110
M.rouxii	b			+	0
	c		+	+	12
	d	+	+	+	0.6
corazón bovino	e				280
	f			+	0
	g		+	+	220
	h	+	+	+	115

Se preincubaron y fotolizaron con 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) 66 unidades de holoenzima de Mucor y 13 unidades de holoenzima de tipo II de corazón bovino con las indicaciones especificadas en la tabla y de acuerdo a lo descrito en la sección IX de Materiales y Métodos.

dad regulatoria y determinar el peso molecular de los probables monómeros, se sometió a la subunidad regulatoria de la holoenzima de Mucor a la fotomarcación con 8-Az-AMP<sub>c</sub>(P<sup>32</sup>) (Materiales y Métodos, sección IX) y posteriormente se realizó una electroforesis en gel plano de poliacrilamida con SDS.

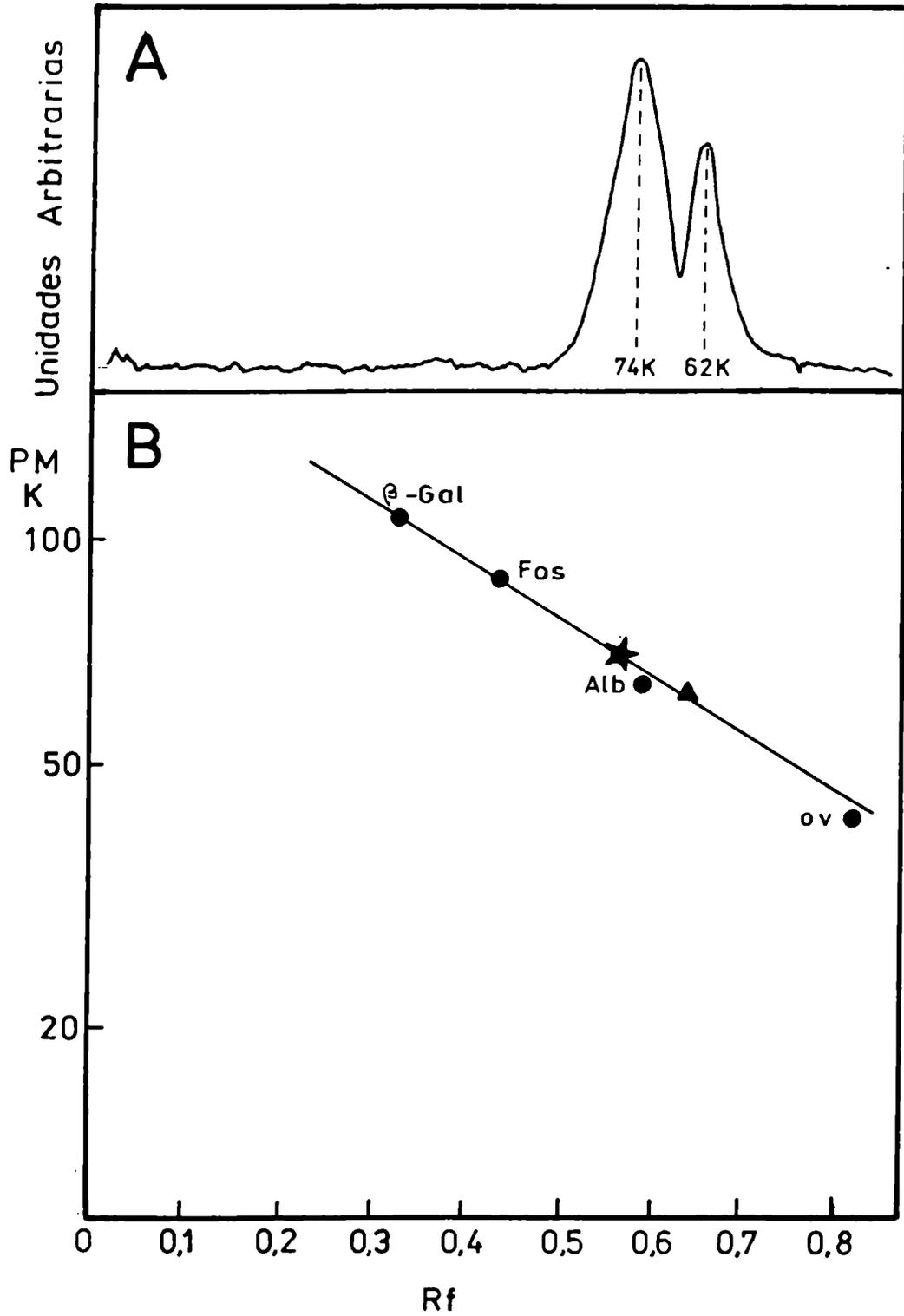
Para esto se realizaron tres incubaciones que fueron procesados según se describió en la sección X de Materiales y Métodos. En una de ellas se obvió la presencia de 2-mercaptoetanol, con el objeto de estudiar la existencia de uniones covalentes disulfuro entre los posibles monómeros de la subunidad regulatoria. Finalizada la corrida se procedió a secar el gel y una parte del mismo, conteniendo una calle donde se había sembrado una muestra tratada con la mezcla desnaturalizante completa, se cortó en tiras de tres mm de ancho y se contó la radiactividad de las mismas. El resto del gel se autorradiografió.

La figura 8 A muestra la densitometría de la autorradiografía. Se obtuvieron en ambos casos dos bandas con un  $R_f = 0.58$  y  $0.67$  correspondientes a pesos moleculares de 74 y 62 K respectivamente según surge de la interpolación en

Figura 8.- Electroforesis en gel plano de poliacrilamida (7 %) de la subunidad regulatoria de la quinasa de proteínas dependiente de AMP<sub>c</sub>, marcada por fotoafinidad.

Se incubaron y fotolizaron 200 unidades de holoenzima con 8-Az-AMP<sub>c</sub> (P<sup>32</sup>) como se describió en Materiales y Métodos en la sección IX. Finalizada la corrida se secó el gel y se lo autorradiografió. En (A) se muestra la densitometría de la autorradiografía y en (B) la relación entre el logaritmo PM (expresados en K), de las proteínas marcadoras y los R<sub>f</sub> de las mismas. Proteínas marcadoras (●): (β-Gal) β-Galactosidasa, (Fos) Fosforilasa, (Alb) Albúmina, (ov) ovoalbúmina.

\* y ▲ bandas de 74 y 62 K respectivamente con el a nálogo radiactivo unido.



el gráfico que relaciona el logaritmo del PM de las proteínas marcadoras con los  $R_f$  correspondientes (figura 8 B). Estos resultados indican que no existen uniones disulfuro entre los monómeros de la subunidad regulatoria. En la figura 9 se muestra el perfil obtenido al cortar el gel seco en tiras de 3 mm y contar la radiactividad de las mismas según se explicó anteriormente. El histograma muestra nuevamente dos picos con  $R_f$  0.58 y 0.67 coincidentes con las bandas de la autorradiografía.

La existencia de dos bandas con el análogo radiactivo unido se puede deber a lo siguiente:

- 1) Proteólisis endógena de la subunidad regulatoria. Previamente en el laboratorio se había observado que durante el aislamiento de la subunidad regulatoria, ésta era muy sensible a la proteólisis endógena, produciéndose fragmentos proteolíticos que conservaban la capacidad receptora de  $AMP_c$ . Por lo cual la proteína de 62 K podría provenir de la proteína de 74 K por proteólisis de la misma.
- 2) Diferente grado de fosforilación. SY y colaboradores (142) encontraron que el grado de fosforilación de la subunidad regulatoria de la holoenzima de levadura de panadería

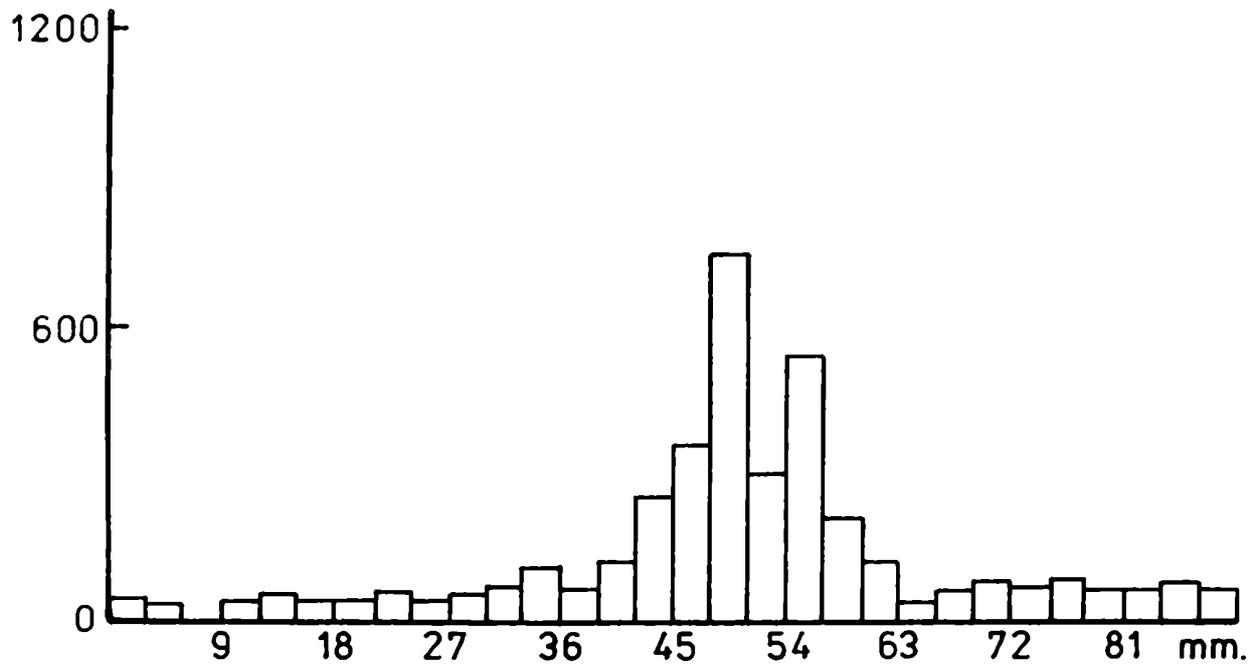


Figura 9: Perfil de radiactividad obtenido cuando una parte del gel descrito en la leyenda de la figura 8, se cortó en tiras de 3 mm de ancho y se contó la radiactividad de las mismas, según se describió en Materiales y Métodos en la sección XII.

disminuye su movilidad en geles de poliacrilamida con SDS, con lo cual ambas bandas podrían ser la misma proteína con diferente grado de fosforilación.

- 3) Una posibilidad que no se puede desechar con los datos experimentales que se disponen, si bien sería realmente sorprendente, es la existencia de dos subunidades con peso molecular diferente.

Descartando esta última posibilidad y teniendo en cuenta el peso molecular obtenido para la subunidad regulatoria no disociada (ver capítulo III de Resultados) se puede deducir una estructura dimérica para la subunidad regulatoria.

Se puede afirmar entonces que la quinasa de Mucor es un tetrámero ( $R_2C_2$ ) formado por dos subunidades catalíticas (C) y un dímero de subunidad regulatoria (R).

#### IV - EXISTENCIA DE UN COMPLEJO TERNARIO HOLOENZI - MA - AMP<sub>c</sub>

En trabajos previos realizados en el laboratorio (118-119, 201) se había observado que la quinasa de proteínas de-

pendiente de AMP<sub>c</sub> de Mucor, no era disociada por preincubación con concentraciones micromolares de AMP<sub>c</sub> en un amplio rango de concentraciones enzimáticas (50-2000 unidades/ml) a diferencia de lo que ocurre con las holoenzimas de organismos eucariontes superiores, que en esas condiciones se disocian completamente.

Cuando además de AMP<sub>c</sub>, en la preincubación estaban presentes algunos de sus sustratos proteicos (histona o protamina) o en presencia de alta fuerza iónica (ClNa 0.5 M) se producía la disociación de la holoenzima.

#### IV.1- Estudio de la interacción del AMP<sub>c</sub> con la holoenzima por filtración molecular.

Se utilizaron columnas de Sephacryl S-300 de 0.8 x 22 cm. Se sembraron alícuotas de la enzima tratadas de dos maneras diferentes. Una alícuota fue incubada con AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) 2 μM y la columna fue equilibrada con AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) 120 nM y la otra alícuota se incubó en condiciones disociantes con ClNa 0.5 M y AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) 2 μM y la columna utilizada fue equilibrada con ClNa 0.5 M y AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) 120 nM para evitar la reasociación de las subunidades.

Como se puede observar en la figura 10 A la actividad receptora de AMP<sub>c</sub> medida por filtración directa a través de membranas de nitrocelulosa, cocromatografía con la actividad quinásica con un radio de Stokes de 6.5 nm. Esto indica que hay AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) unido a la holoenzima. En el experimento de la figura 10 B se observa que la subunidad regulatoria se separa completamente de la subunidad catalítica.

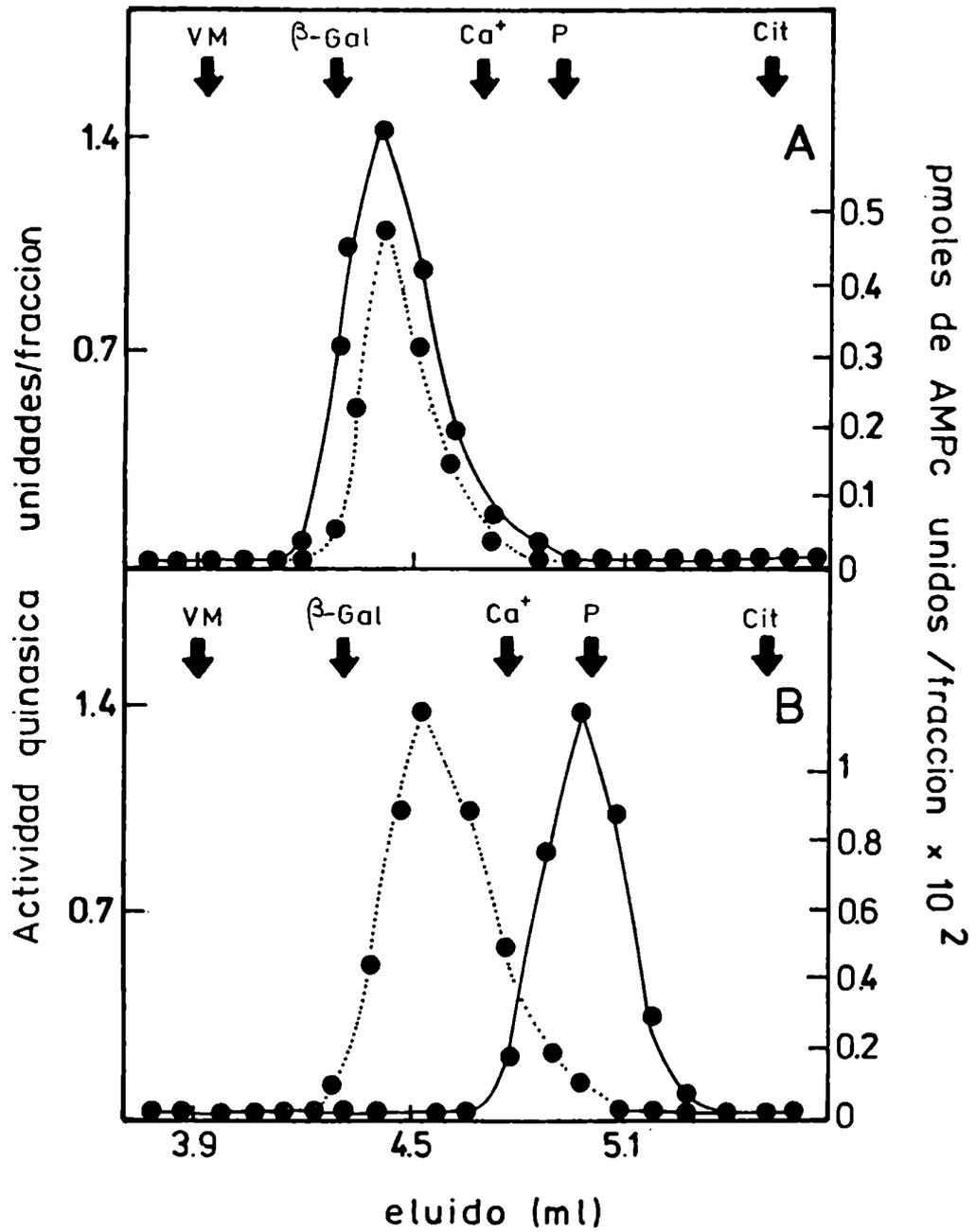
#### IV.2- Estudio de la existencia del complejo ternario utilizando gradientes de sacarosa.

Para estudiar la interacción del AMP<sub>c</sub> con la holoenzima, se utilizaron gradientes isocinéticos de sacarosa aprovechando la diferencia entre los coeficientes de sedimentación de la holoenzima y de la subunidad regulatoria (ver capítulo II de Resultados).

La figura 11 muestra el perfil de sedimentación obtenido cuando 4 alícuotas de la holoenzima de Mucor fueron sometidas a diferentes condiciones de preincubación.

Figura 10.- Complejo ternario holoenzima-AMP<sub>c</sub> visualizado por filtración a través de una columna de Sephacryl S-300. Se realizaron dos incubaciones con 3 unidades de holoenzima en un volumen final de 100  $\mu$ l de buffer M conteniendo AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) 2  $\mu$ M, durante 5 min a 30°C con los siguientes agregados: (A) ninguno en la mezcla de incubación. La columna fue equilibrada con AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) 120 nM, (B) ClNa 0.5 M y albúmina 0.7 mg/ml en la mezcla de incubación. La columna fue equilibrada con ClNa 0.5 M, AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) 120 nM y albúmina 0.7 mg/ml.

Las mezclas de reacción se sembraron en columnas de 0.8 cm x 22 cm y se recogieron fracciones de 170  $\mu$ l. La actividad quinásica (—●—) se midió utilizando kemptido como sustrato como se indicó en la sección VII de Materiales y Métodos. La actividad receptora de AMP<sub>c</sub> (—●—) se determinó por filtración directa de una alícuota adecuada por membranas de nitrocelulosa. Las flechas indican el volumen muerto de la columna y el volumen de elución de las proteínas marcadoras descritas en la figura 6.

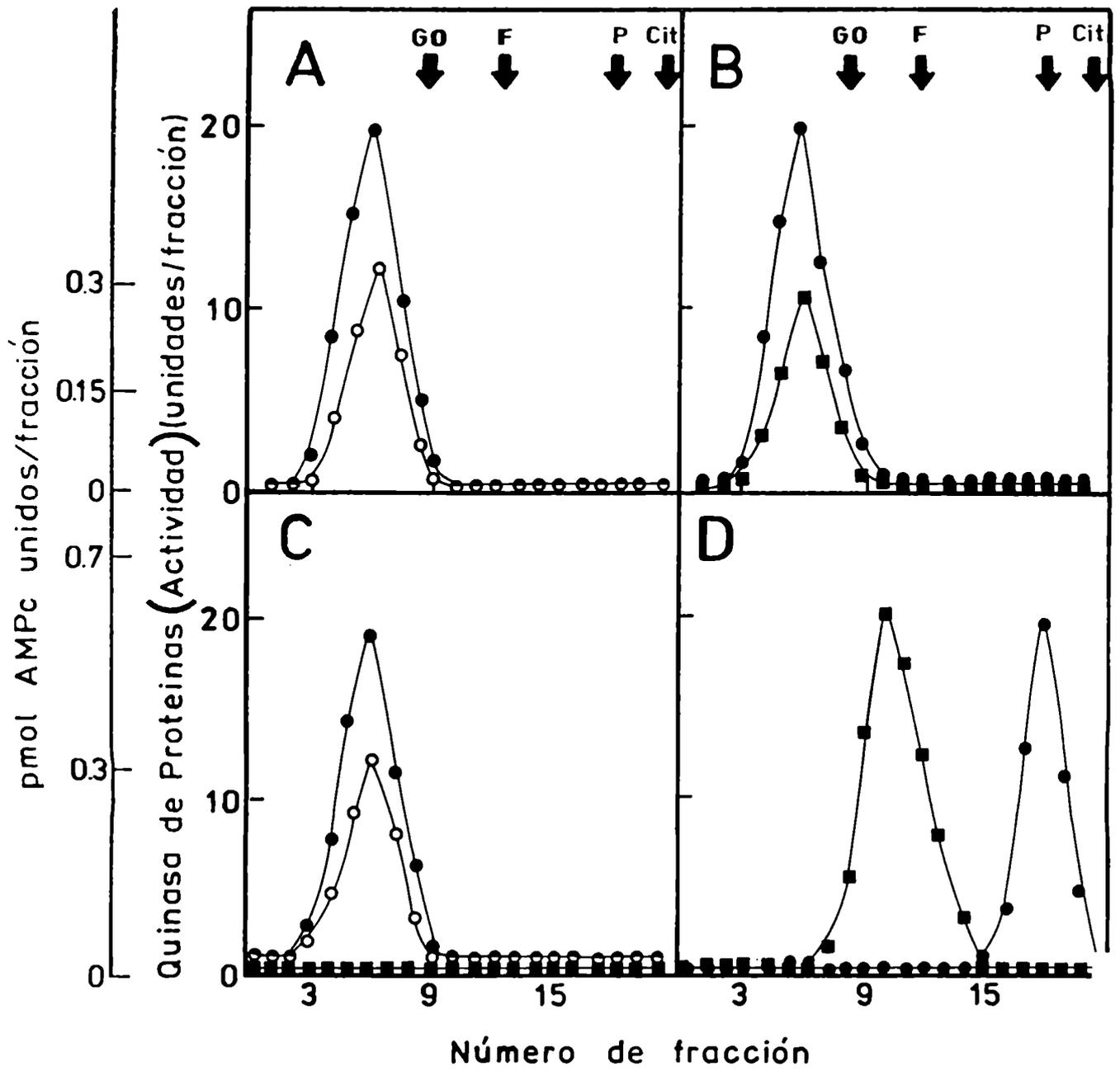


Una de ellas (figura 11 A) en la cual no se hicieron agregados ni en la preincubación ni en el gradiente, fue el control. Otra alícuota se preincubó con concentraciones saturantes de  $AMP_c (H^3)$  y el gradiente también fue equilibrado con  $AMP_c (H^3)$  (figura 11 B). Una tercera alícuota fue preincubada con  $AMP_c (H^3)$ , pero el gradiente no fue equilibrado con el nucleótido (figura 11 C).

La cuarta alícuota se preincubó en condiciones de disociación total con  $AMP_c (H^3)$  y  $ClNa$  0.5 M y corrida en un gradiente equilibrado también con  $ClNa$  0.5 M y  $AMP_c (H^3)$  (figura 11 D). Se puede observar en la figura 11 B que la actividad catalítica sedimenta en la misma posición que en el control (figura 11 A), acompañada por un pico con radiactividad detectable por filtración directa de las fracciones del gradiente por membranas de nitrocelulosa, indicando que hay  $AMP_c (H^3)$  unido a la holoenzima.

Si el gradiente no estaba equilibrado con  $AMP_c (H^3)$  (figura 11 C), la actividad catalítica muestra el mismo perfil, pero no se observa un pico de  $AMP_c (H^3)$  unido a proteína. Sin embargo la actividad receptora de  $AMP_c$  puede

Figura 11.- Detección del complejo ternario holoenzima -AMP<sub>c</sub> en gradientes de sacarosa. Se preincubaron 120 unidades de holoenzima durante 1 min a 30°C en un volumen final de 0.2 ml con los siguientes agregados: (A) ninguno, (B) AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) 2 μM en la mezcla de preincubación y 0.13 μM de AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) en el gradiente, (C) AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) 2 μM en la mezcla de preincubación y (D) AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) 2 μM, ClNa 0.5 M y albúmina 0.5 mg/ml en la mezcla de preincubación y AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) 120 nM, ClNa 0.5 M y albúmina 0.5 mg/ml en el gradiente. Para medir la actividad quinásica (-●-) se ensayaron alícuotas adecuadas de cada fracción, utilizando histona como sustrato. La actividad receptora de AMP<sub>c</sub> (-○-) se midió como se indicó en la sección VIII (método 1-a) de Materiales y Métodos. En aquellos gradientes que tenían AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>), la actividad receptora se midió por filtración directa de una alícuota apropiada a través de membranas de nitrocelulosa (-■-). Se utilizaron las proteínas marcadoras descritas en la figura 5.



ser detectada en la misma posición que la actividad quinásica si se incuban las fracciones con  $AMP_c (H^3)$  según se indicó en la sección VIII -1.a de Materiales y Métodos (figura 11 C). La figura 11 D muestra el perfil de sedimentación obtenido cuando la holoenzima se disoció totalmente. El  $AMP_c (H^3)$  unido a la subunidad regulatoria no se pierde luego de una diálisis exhaustiva y cromatografía en DEAE-celulosa indicando que el  $AMP_c (H^3)$  está fuertemente unido a la proteína (resultados no mostrados). Estos resultados contrastan con los obtenidos del gradiente de la figura 11 C en el cual no se detecta el complejo holoenzima- $AMP_c$  al no estar equilibrado el gradiente con  $AMP_c (H^3)$ . Estos resultados indicarían una gran diferencia de afinidad por el  $AMP_c$ , entre la subunidad regulatoria y la holoenzima.

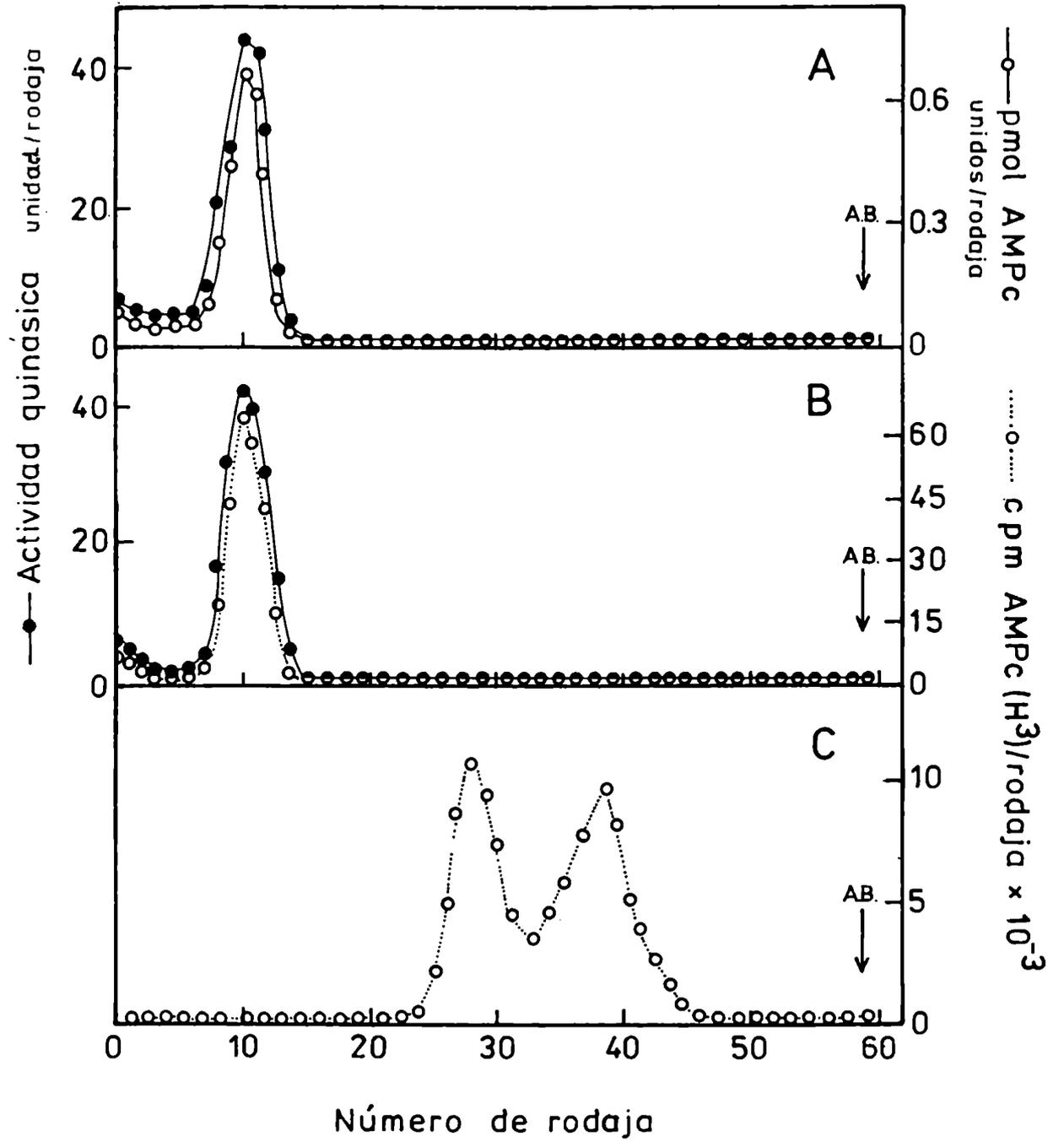
IV - 3. Estudio de la existencia del complejo holoenzima- $AMP_c$  utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida.

Cuando la quinasa de proteínas dependiente de  $AMP_c$  se somete a electroforesis en gel de acrilamida se ob-

serva un solo pico con actividad quinásica y receptora de  $AMP_c$  con un  $R_f$  de 0.17 (figura 12 A). Si paralelamente se corre un gel con la misma siembra y se tiñe con azul de co-masina, se observa que hay una banda discreta que migra con el mismo  $R_f$ . Esta banda desaparece por completo si la enzima se disocia previamente a la corrida con  $ClNa$  y  $AMP_c$ . (resultados no mostrados).

Si se preincuba la quinasa con una concentración saturante de  $AMP_c$  ( $H^3$ ) y se la somete a una corrida electroforética se obtiene el perfil de actividades de la figura 12B. Se observa que la actividad catalítica migra en la misma posición que el control y una significativa cantidad de  $AMP_c$  ( $H^3$ ), estimada por medición de la radiactividad de medias rodajas, comigra con la actividad catalítica. Estos resultados muestran claramente que se formó un complejo ternario entre el  $AMP_c$  ( $H^3$ ) y la holoenzima. El  $AMP_c$  ( $H^3$ ) libre migra como un pico muy agudo acompañando el colorante azul de bromofenol, indicador del frente de corrida. Sorprendentemente se observa el  $AMP_c$  ( $H^3$ ) en el complejo, aún en ausencia de  $AMP_c$  ( $H^3$ ) en el reservorio catódico. La explicación de que la unión  $AMP_c$ -holoenzima resista la corrida electro

Figura 12.- Estudio del complejo ternario, holoenzima-AMP<sub>c</sub> por electroforesis en gel de poliacrilamida. Se sembraron 500 unidades de holoenzima, preincubadas en un volumen de 200  $\mu$ l durante 1 min a 30°C con los siguientes agregados: (A) ninguno, (B) 150 nM de AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>). El gel C fue sembrado con 200  $\mu$ l de solución de subunidad regulatoria-AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) que llevan 200.10<sup>3</sup> cpm de (H<sup>3</sup>). Terminada la electroforesis, los geles se cortaron en rodajas de 2 mm y la rodaja entera (A) o media rodaja (B) se dejaron agitando suavemente en buffer de extracción, se midió la actividad quinásica utilizando histona como sustrato (-●-). En el experimento de la figura 12 A la actividad receptora de AMP<sub>c</sub>(-○-)fué medida según se descubrió en la sección VIII, 1-(a) de Materiales y Métodos. El AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) unido a proteína (---○---) en los geles B y C se estimó por disolución de media rodaja (B) o una rodaja entera (C) en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (p/v) y contaje de la radiactividad según se indicó en Materiales y Métodos (sección XII).



forética y no una centrifugación en un gradiente de sacarosa (ver sección IV-2 de Resultados), tal vez se deba a las enormes diferencias en la dilución a la cual se encuentra el complejo en ambas condiciones y a la diferente difusión del complejo en un gel de poliacrilamida y en una solución de sacarosa. El pico de radiactividad de ( $H^3$ ) detectado en la posición de la holoenzima no representa  $AMP_c (H^3)$  unido a la subunidad regulatoria dado que este complejo binario sometido a una corrida electroforética muestra dos picos principales anchos con un  $R_f$  de 0.42 y 0.6 (figura 12 C). Aparentemente el pico de 0.6 de  $R_f$  se podría deber a  $AMP_c (H^3)$  unido a la subunidad regulatoria parcialmente proteolizada, tal como fue descrito para subunidades regulatorias de holoenzimas de eucariontes superiores, cuyos fragmentos proteolíticos tienen capacidad receptora de  $AMP_c$  (125-126).

La subunidad catalítica fue imposible de detectar usando este sistema de corrida, muy probablemente debido a que esta proteína es básica (ver capítulo VII de Resultados y Métodos) y podría tener un punto isoeléctrico lo suficientemente alto como para no entrar al gel al pH que se usó en la corrida electroforética.

IV.4- Estudio de la velocidad de disociación de los comple-  
jos Holoenzima-AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) y Subunidad regulatoria-  
AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>).

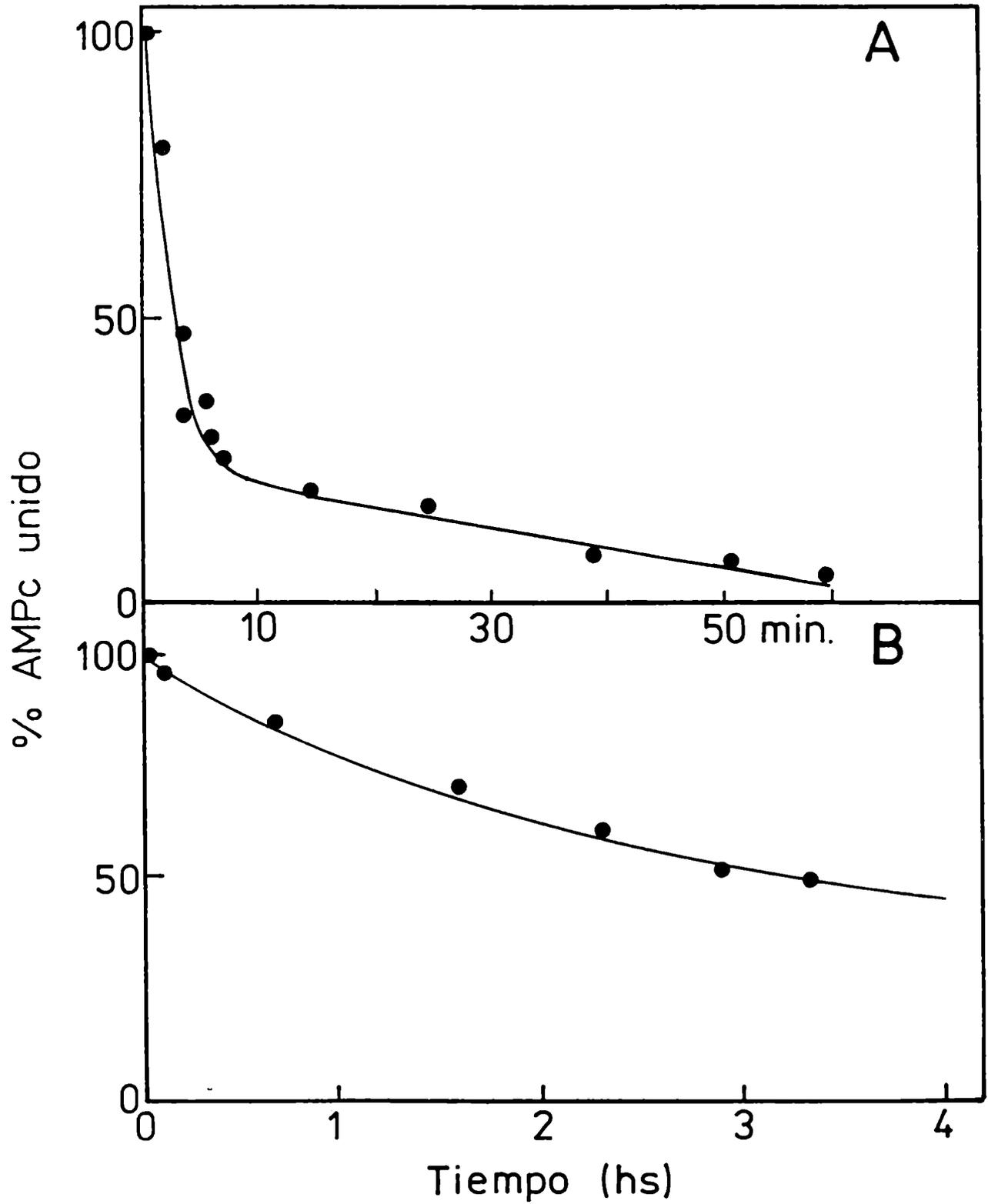
En la sección IV.2- se vió que el complejo ternario holoenzima-AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) no se podía detectar en un gradiente de sacarosa a menos que este estuviese equilibrado con AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>). Por el contrario el AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) permaneció unido a la subunidad regulatoria aún después de una diálisis y posterior cromatografía por DEAE-celulosa.

Estos resultados sugieren una diferencia importante en los valores de las constantes de disociación de ambas especies. Para cuantificar esta diferencia se realizó un estudio cinético de intercambio isotópico. Se midió la velocidad de intercambio del AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) unido a la holoenzima o a la subunidad regulatoria, con un exceso del nucleótido no marcado. En la figura 13 A se muestra el AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) unido remanente en función del tiempo de incubación con el nucleótido no marcado.

Los detalles experimentales están explicados en la leyenda de la figura 13. En (A) se muestra el intercambio

Figura 13.- Velocidad de disociación de los complejos holoenzima-AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) y subunidad regulatoria-AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>).

(A) 500 unidades de holoenzima, preincubadas durante 60 min a 4°C con 60 nM de AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>), fueron incubadas en un volumen final de 1.3 ml de buffer M, conteniendo 1 mg/ml de albúmina, con AMP<sub>c</sub> no marcado 540 nM. (B) Una alícuota de una preparación de subunidad regulatoria (ver sección V de Materiales y Métodos) (250.000 cpm de AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) unido) en un volumen final de 1.3 ml de buffer M conteniendo albúmina 1 mg/ml, se incubaron con AMP<sub>c</sub> no marcado 10 μM. Se tomaron alícuotas de 75 μl de cada muestra a los tiempos indicados y se determinó el AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) unido por filtración por membranas de nitrocelulosa. El 100% representa 14.000 cpm en ambos casos.



del nucleótido del complejo ternario holoenzima-AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) y en (B) el intercambio de la subunidad regulatoria-AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>).

Se puede observar que, el intercambio de la holoenzima es muy rápido, con un  $t_{1/2}$  (tiempo en el cual la actividad original se reduce al 50%) de 2.5 min. (figura 13 A). Los datos presentados en la figura 13 B muestran claramente un intercambio isotópico lento del AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) unido a la subunidad regulatoria, siendo su  $t_{1/2}$  de 210 min.

Los resultados del intercambio isotópico de la subunidad regulatoria y de la holoenzima, junto con los resultados obtenidos en los estudios de la interacción entre el AMP<sub>c</sub> y la holoenzima, utilizando técnicas de filtración molecular, gradientes de sacarosa y electroforesis en geles de poliacrilamida, avalan la existencia de una especie ternaria holoenzima-AMP<sub>c</sub> que se produce al interaccionar la holoenzima con el AMP<sub>c</sub>.

#### V- COMPARACION DEL AMP<sub>c</sub> UNIDO A LA HOLOENZIMA Y A LA SUBUNIDAD REGULATORIA.

V. 1- Actividad receptora de AMP<sub>c</sub> de la holoenzima, medida en condiciones disociantes y no disociantes.

Cuando se mide la capacidad receptora de AMP<sub>c</sub> de la quinasa de proteínas en condiciones disociantes y no disociantes, por el método de filtración por membranas de nitrocelulosa, se obtuvieron los resultados expuestos en la Tabla VII.

TABLA VII

Actividad receptora de AMP<sub>c</sub> de la holoenzima medida en condiciones disociantes y no disociantes.

Agregados	AMP <sub>c</sub> (H <sup>3</sup> ) μM	AMP <sub>c</sub> (H <sup>3</sup> ) unidos (cpm)
1.-	0.12	4205
2.- 1.5 mg/ml de histona	0.12	8512
3.- 1.5 mg/ml de histona, 0,5 M ClNa	0.12	8437
4.- 0.5 M ClNa	2	8580

9 unidades de holoenzima, fueron incubadas durante 60 min a 4°C con las adiciones indicadas en la Tabla. El AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) unido fue medido por el método de filtración por membranas de nitrocelulosa (método 1. sección VIII de Materiales y Métodos).

El experimento 1 representa el AMP<sub>c</sub> unido a la holoenzima, los experimentos 2, 3 y 4 representan el AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) unido a la subunidad regulatoria ya que las condiciones de preincubación son de disociación total. Los resultados de la tabla VII muestran que independientemente de las condiciones utilizadas para obtener la disociación de la holoenzima en sus subunidades, el AMP<sub>c</sub> unido a la subunidad regulatoria es siempre el doble de la cantidad unida a la holoenzima.

Algunos autores encontraron que ciertos policationes como el sulfato de protamina y la histona aumentan la retención del AMP<sub>c</sub> unido a la proteína en filtros de nitrocelulosa (220-221). Se quiso verificar entonces si el aumento de actividad receptora que se muestran en los experimentos 2 y 3 de la tabla VI podrían ser atribuidos a este artificio o al desenmascaramiento de nuevos sitios de unión del AMP<sub>c</sub> a la subunidad regulatoria, los cuales en la holoenzima estarían ocultos o con una configuración particular que anularía la afinidad de los mismos por el AMP<sub>c</sub>.

Para ello se corrieron en gradientes de sacarosa 5-20% alícuotas de la holoenzima y de la holoenzima disociada (figura 14 A y B) y se midió la actividad receptora de

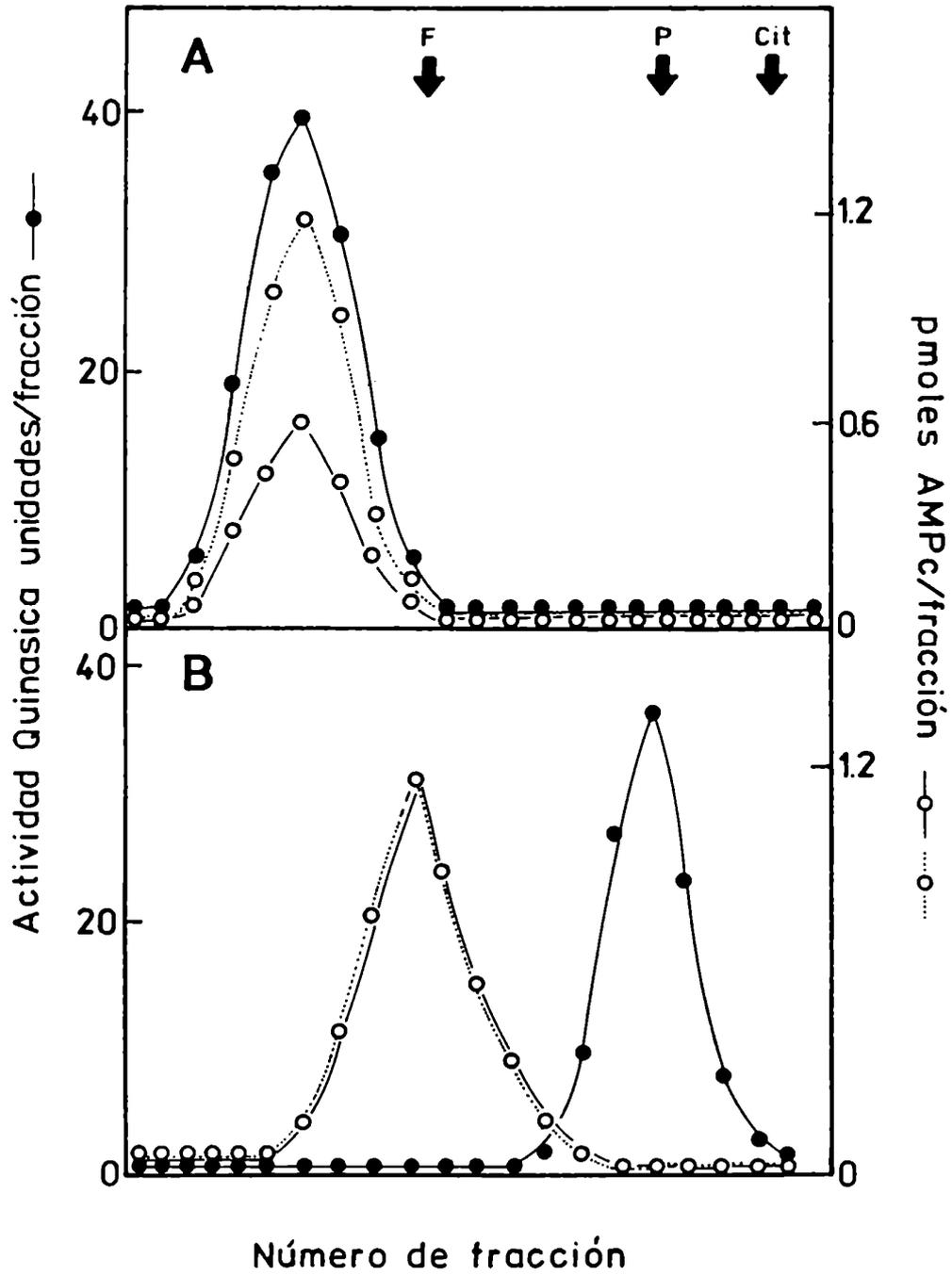
AMP<sub>c</sub> en presencia y ausencia de histona utilizando el método de filtración por membranas de nitrocelulosa. La figura 14 B muestra que el agregado de histona en el ensayo no modifica la capacidad receptora de AMP<sub>c</sub> de la subunidad regulatoria. Por el contrario en la figura 14 A se observa un incremento en la actividad receptora de AMP<sub>c</sub> de la holoenzima cuando ésta se ensaya en presencia de histona. Se puede observar en este caso que el área del pico es aproximadamente el doble del obtenido al ensayar la capacidad receptora de AMP<sub>c</sub> sin histona. Este incremento se interpreta como la duplicación de los sitios de unión del nucleótido en la subunidad regulatoria, que al estar formando la holoenzima permanecerían ocultos o sin afinidad por el AMP<sub>c</sub> y no se debían a algún artificio que introducía la presencia de histona en el ensayo.

V.2- Comparación entre la actividad receptora de AMP<sub>c</sub> medida por la técnica de filtración por membranas de nitrocelulosa y por equilibrio de diálisis.

En las subunidades regulatorias de las holoenzimas de eucariontes superiores existen dos clases de sitios de

Figura 14.- Influencia de la presencia de histona en el ensayo de medición de la capacidad receptora de AMP<sub>c</sub> de la holoenzima y de la subunidad regulatoria después de centrifugadas en gradientes de sacarosa.

Se realizaron dos incubaciones con alícuotas de la holoenzima (250 unidades) durante 1 min a 30°C en un volumen de 0.2 ml de buffer M con los siguientes agregados: (A) ninguno, (B) ClNa 0.5 M y AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) 2 μM. El gradiente en B se equilibró con ClNa 0.5 M y AMP<sub>c</sub>(H<sup>3</sup>) 150 nM. La actividad quinásica (-●-) se midió utilizando histona como sustrato (sección VII de Materiales y Métodos). En A la actividad receptora de AMP<sub>c</sub> se midió utilizando el ensayo no activado(-o-) y el ensayo activado (...o...) según se describió en la sección VIII-1 de Materiales y Métodos. En B la actividad receptora de AMP<sub>c</sub> se midió por filtración directa de una alícuota de cada fracción por membranas de nitrocelulosa (-o-) o después de una preincubación de la alícuota con 1.5 mg/ml de histona durante 15 min a 4°C(...o...)



unión del  $AMP_c$ , que se diferencian por la velocidad de disociación que presentan cada uno de ellos (ver Introducción). Algunos autores han informado previamente (97, 134) que la medición de la actividad receptora de  $AMP_c$ , utilizando la técnica de filtración por membranas de nitrocelulosa está sujeta a errores debido a que no detecta una clase de sitios de unión del  $AMP_c$  a la proteína por interacción entre la subunidad regulatoria y la membrana de nitrocelulosa. Para investigar la posibilidad de que en Mucor sucediera algo similar, se midió la actividad receptora de  $AMP_c$  de la holoenzima y de la subunidad regulatoria por equilibrio de diálisis evitando de este modo el uso de la membrana de nitrocelulosa.

En la tabla VIII se muestran los resultados obtenidos al comparar la actividad receptora de  $AMP_c$  por ambos métodos.

#### TABLA VIII

Actividad receptora de  $AMP_c$  de la holoenzima y de la subunidad regulatoria medida por equilibrio de diálisis y por filtración a través de membranas de nitrocelulosa.

<u>Experimento</u>	<u>cpm (H<sup>3</sup>) de AMP<sub>c</sub> unidos/alicuotas (25 μl)</u>	<u>Equilibrio de diálisis</u>	<u>Membranas de nitrocel.</u>
A (holoenzima)	4277		3900
B (Subunidad regulatoria)	8126		7313

---

Dos alícuotas de la holoenzima (35 unidades) en un volumen de 200 μl se dializaron contra 5 ml de buffer M conteniendo 120 nM de AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) (A), o contra la misma solución pero conteniendo además 1.5 mg/ml de histona y ClNa 0.5 M. Los detalles técnicos de la medición y el cálculo de AMP<sub>c</sub> (H<sup>3</sup>) unido a la proteína se describieron en la sección VIII parte 2 de Materiales y Métodos.

---

Los resultados de la Tabla VIII muestran claramente que no hay diferencias en el AMP<sub>c</sub> unido a la proteína medida por ambos métodos, no observándose por lo tanto pérdida de AMP<sub>c</sub> unido a la holoenzima o a la subunidad regulatoria cuando se utiliza el método de la filtración por membranas de nitrocelulosa.

## VI- EXISTENCIA DE DIFERENTES ESPECIES MOLECULARES EN EL MECANISMO DE DISOCIACION DE LA HOLOENZIMA.

Trabajos previos realizados en el laboratorio (201)

habían demostrado que la holoenzima se disocia en presencia de  $AMP_c$  y de algunos de sus sustratos proteicos (histona o protamina) o por interacción con el nucleótido cíclico en presencia de alta fuerza iónica.

Se quiso entonces estudiar la influencia que tendría en la disociación de la holoenzima, el  $AMP_c$  en presencia del sustrato dador del grupo fosfato (ATP). Para ello se calculó la  $A_{0.5}$ , es decir la concentración de  $AMP_c$  que satura la mitad de los sitios totales de unión del  $AMP_c$  a la proteína, por medición de la actividad receptora de  $AMP_c$  en alícuotas de enzima incubadas en tres condiciones diferentes.

En un grupo de alícuotas se midió la actividad receptora de  $AMP_c$  de la holoenzima sin ningún agregado en la incubación. En otras alícuotas se incubó la holoenzima en condiciones de formación del complejo ternario pero con una concentración fija de ATP y de  $Cl_2Mg$  y un último grupo de alícuotas de la preparación de holoenzima fueron incubadas en condiciones de disociación total.

Los gráficos de las figuras 15 A, B y C muestran respectivamente las curvas de saturación de la actividad receptora de  $AMP_c$  medida en las tres condiciones descriptas.

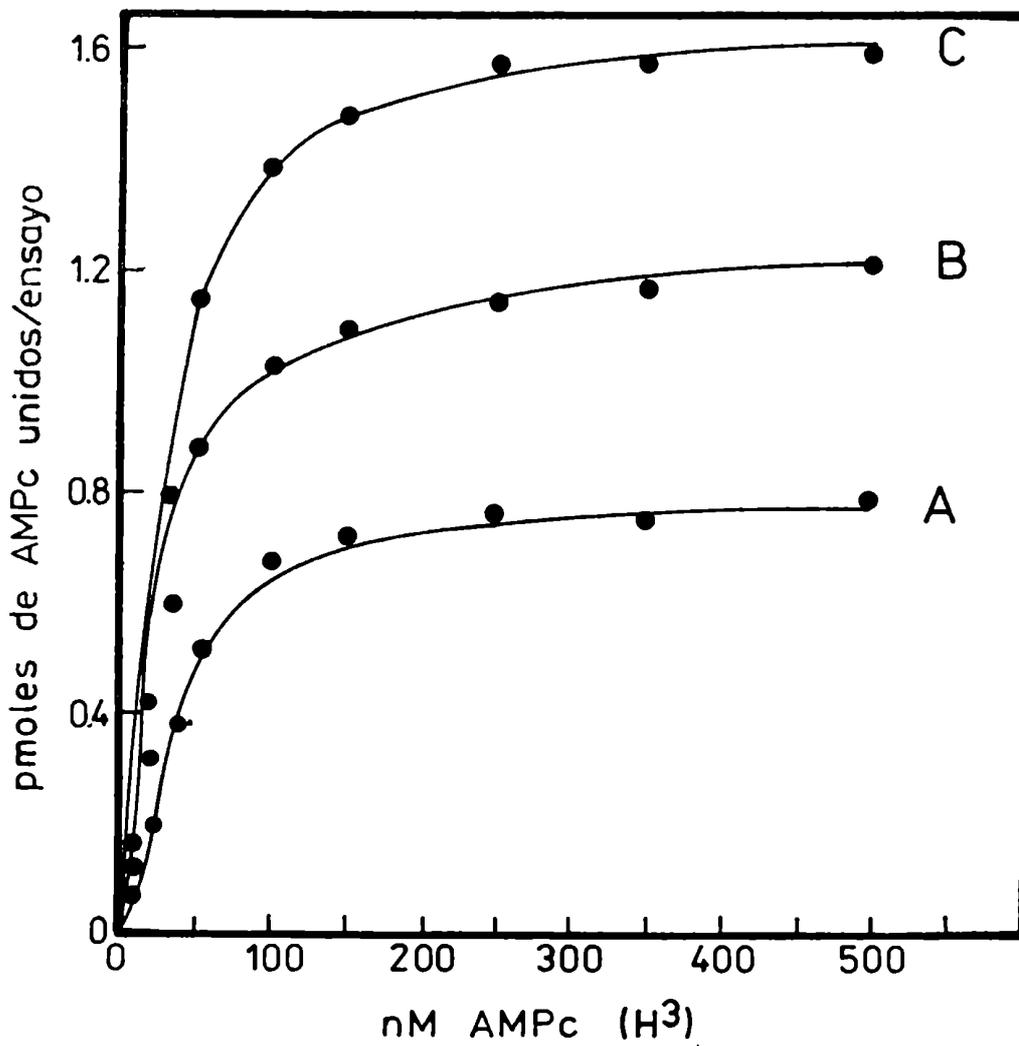


Figura 15: Efecto del ATP.Mg en la capacidad receptora de  $\text{AMP}_c$  de la holoenzima de Mucor. Se incubaron 20 unidades de holoenzima en un volumen final de  $50 \mu\text{l}$  de buffer M durante 60 min a  $4^\circ\text{C}$  con cantidades variables de  $\text{AMP}_c(\text{H}^3)$  y los siguientes agregados: (A) ninguno, (B) ATP 5 mM y  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  5 mM y (C) histona 1,5 mg/ml y  $\text{ClNa}$  0.5 M. La actividad receptora de  $\text{AMP}_c$  se midió en todos los casos por filtración a través de membranas de nitrocelulosa según se indicó en la sección VIII-1 de Materiales y Métodos.

Se puede observar que las tres curvas muestran una misma  $A_{0.5}$ . La variación en cambio está dada por el número máximo de pmoles de  $AMP_c$  que une la cantidad de holoenzima utilizada. En la curva C la cantidad máxima de pmoles de  $AMP_c$  unidos es el doble de los obtenidos en la curva A, estos resultados refuerzan los obtenidos en las secciones anteriores, es decir que la holoenzima forma con el  $AMP_c$  un complejo ternario y al disociarse se duplica la actividad receptora de  $AMP_c$ . En la curva B se llega a un valor de pmoles de  $AMP_c$  unidos, intermedio entre los dos anteriores. Estos resultados sugieren que la incubación con ATP.Mg y  $AMP_c$  no logra disociar la holoenzima totalmente, aunque se desmascararían nuevos sitios de unión del  $AMP_c$  a la subunidad regulatoria de la holoenzima.

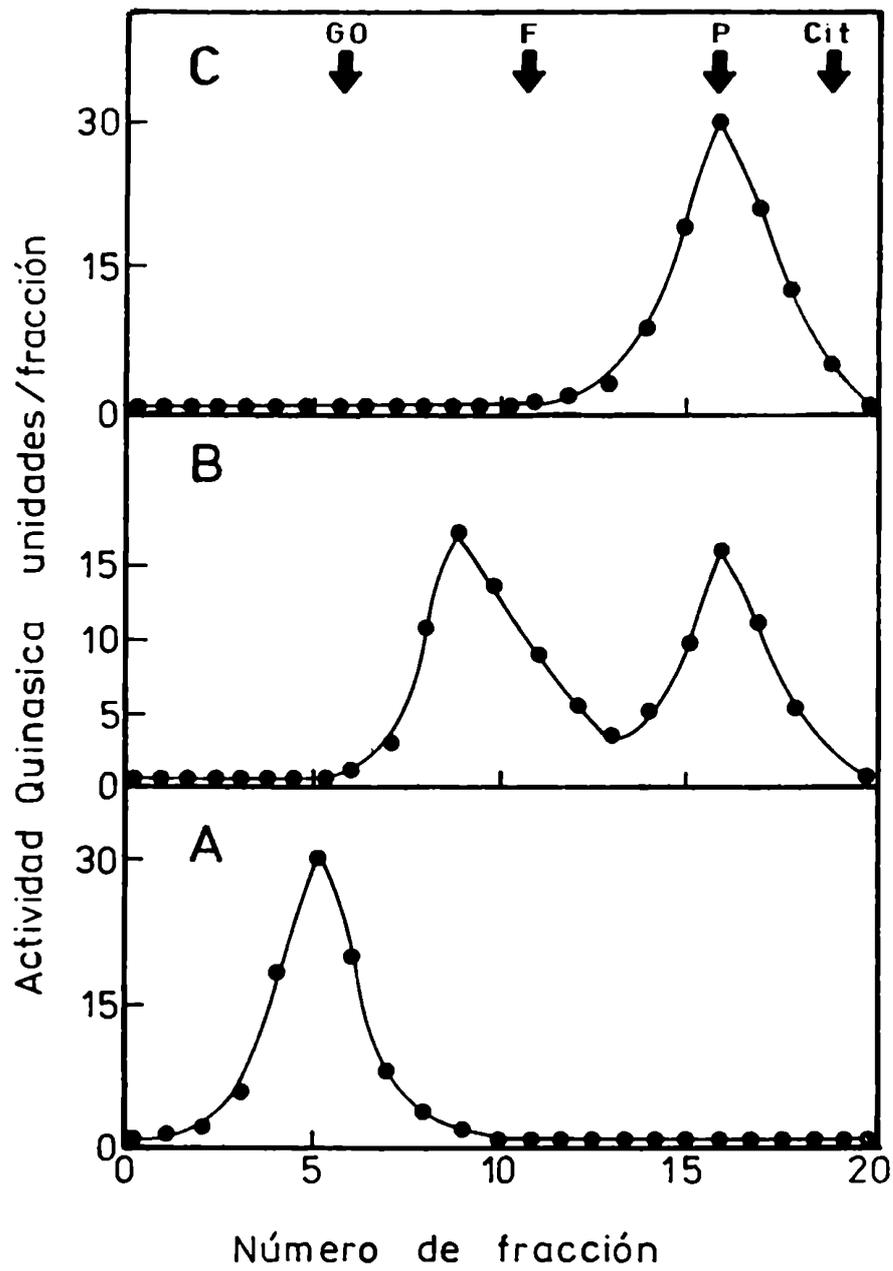
Para investigar más profundamente esta posibilidad se centrifugaron gradientes de sacarosa en los cuales se sembraron alícuotas de la preparación de holoenzima incubada en las mismas condiciones que las de la figura 15 A, B y C, excepto que se utilizó una concentración fija y saturante de  $AMP_c$  no radiactivo.

La figura 16 muestra los perfiles de actividad fos

fototransferásica de los gradientes de sacarosa. En los gráficos A y C aparecen los picos de actividad quinásica de coeficientes de sedimentación 8.5 y 3.2 S que corresponden a la holoenzima y a la subunidad catalítica respectivamente. En el gráfico B se observa un pico de actividad quinásica que sedimenta a 6.85 S y otro con un coeficiente de sedimentación de 3.2 S perteneciente a la subunidad catalítica. Puede observarse además que el área de los picos de 6.85 y 3.2 S representa cada uno aproximadamente el 50% del total de la actividad del pico (de holoenzima) del gradiente A.

Para estudiar la dependencia de  $AMP_c$  de la actividad quinásica de la especie de 6.85 S, se recogieron las fracciones correspondientes a este pico, se dializaron exhaustivamente y se midió la actividad quinásica en presencia y ausencia de  $AMP_c$ , obteniéndose un cociente de activación (actividad sin  $AMP_c$ /actividad con  $AMP_c$ ) de 0.05 lo cual confirma que esta especie de 6.85 S es dependiente de  $AMP_c$ .

Estos resultados parecen indicar que una especie intermedia en el mecanismo de disociación de la holoenzima se formó al interaccionar la quinasa con el  $AMP_c$  en presencia de ATP y  $Cl_2Mg$ . Se intentó entonces, utilizando siem-



pre gradientes de sacarosa, encontrar perfiles de actividad quinásica que mostraran todas las posibles diferentes especies que pudiesen formarse durante la disociación de la holoenzima de Mucor. Para esto se utilizaron incubaciones con diferentes relaciones de holoenzima,  $AMP_c$  y fuerza iónica, e incubaciones con relaciones variables entre holoenzima,  $AMP_c$  y kemptido. Este heptapéptido es el núcleo fosforilable de casi todos los sustratos proteicos de las quinasas de proteínas dependientes de  $AMP_c$  y su secuencia primaria fue descrita en la sección VII de Materiales y Métodos. Cuando se mide la actividad quinásica en una preparación de holoenzima utilizando kemptido como sustrato, el margen de la cantidad de holoenzima en el cual la reacción de fosforilación es lineal es bastante mas restringido que cuando se utiliza histona como aceptor del fosfato (Resultados no mostrados). Esto muy probablemente se debe a que la histona tiene una mayor capacidad de provocar la disociación de la holoenzima que el heptapéptido. De tal modo al usar kemptido junto con el  $AMP_c$  se logran condiciones propicias para obtener disociaciones incompletas.

Los gráficos de la figura 17 A y A' muestran los

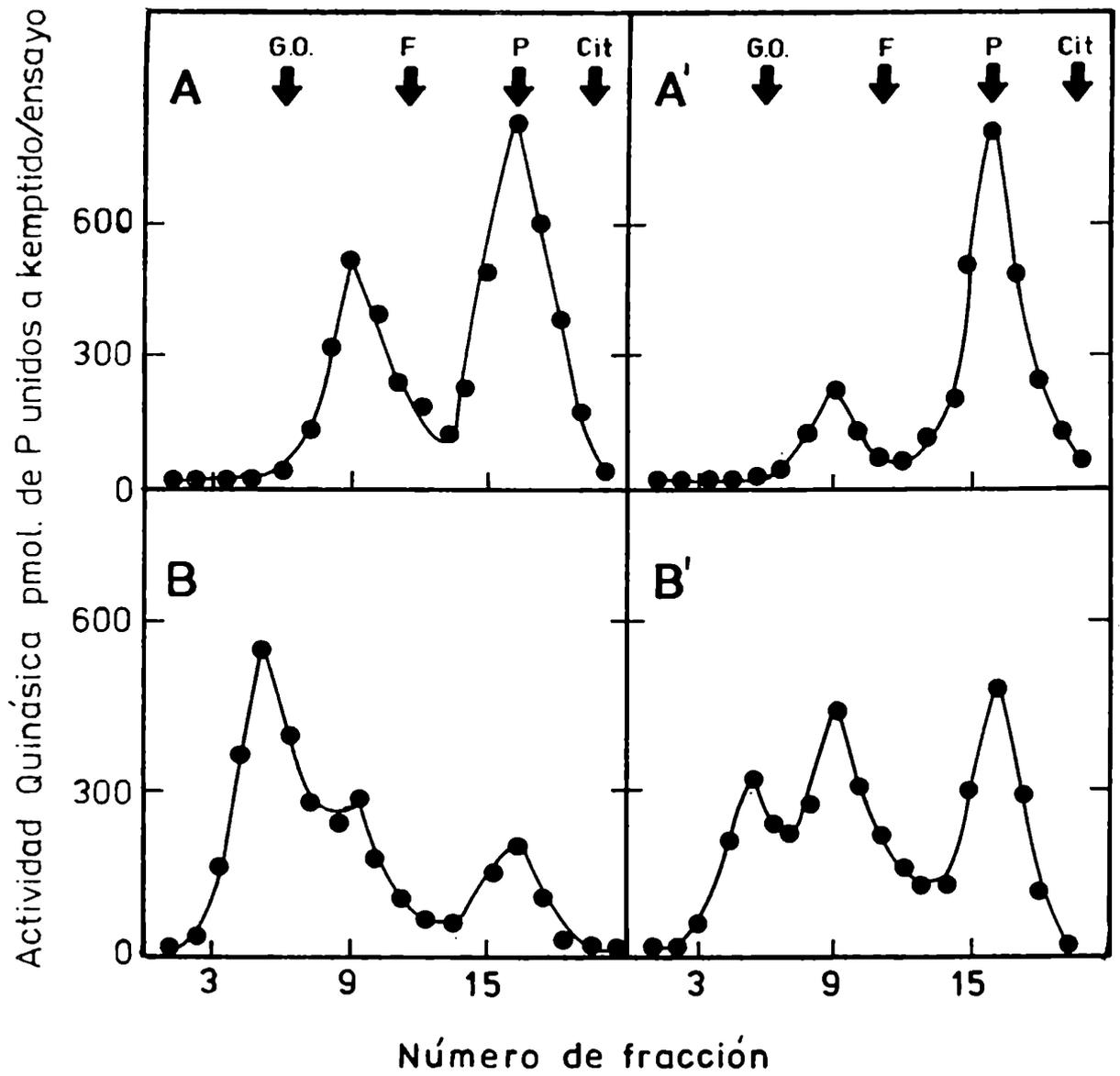
perfiles de actividad quinásica obtenidos al incubar con las mismas concentraciones de  $ClNa$  y  $AMP_c$  dos alícuotas de holoenzima conteniendo la del gráfico A, 5 veces más enzima que la del gráfico A'. Se puede observar que en el gráfico A' en el cual las condiciones para la disociación son mas favorables que en A, el área del pico de la subunidad catalítica constituye el 80% de la actividad quinásica total del gradiente, mientras que en el gradiente de la figura 17 A las proporciones obtenidas son 40% para la especie de 6.85 S y un 60% para la subunidad catalítica.

Los gráficos 17 B y B' muestran los perfiles de actividad quinásica, obtenidos al incubar la holoenzima con una relación diferente de holoenzima a concentración de kemptido y  $AMP_c$ . En ambos gráficos aparecen picos de actividad quinásica con 8.5, 6.85 y 3.2 S pertenecientes a la holoenzima, especie intermedia y subunidad catalítica respectivamente. En B' en el cual la relación de concentración de  $AMP_c$  y kemptido es 5 veces mayor que en B respecto de la holoenzima, se puede observar que el área del pico de 8.5 S se reduce, al mismo tiempo que se incremento la de los otros dos picos.

Figura 17.- Diferentes especies moleculares formadas en el mecanismo de disociación de la holoenzima, visualizadas en gradientes de sacarosa.

Se realizaron dos incubaciones en un volumen final de 0.2 ml de buffer M con ClNa 0.5 M, albúmina 0.7 mg/ml y AMP<sub>c</sub> 200 nM, durante 1 min a 30°C con las siguientes cantidades de holoenzima: A 1.5 unidades, A' 0.3 unidades. Ambos gradientes fueron equilibrados con ClNa 0.5 M, albúmina 0.5 mg/ml y AMP<sub>c</sub> 200 nM.

En B y B' las mezclas se incubaron en un volumen final de 0.2 ml de buffer M con albúmina 0.5 mg/ml, kemptido 0.25 mg/ml y AMP<sub>c</sub> 2 μM, conteniendo 1 y 0.2 unidades de holoenzima respectivamente. Los gradientes fueron equilibrados con AMP<sub>c</sub> 120 nM, albúmina 0.5 mg/ml y kemptido 0.25 mg/ml. La actividad quinásica se midió en alícuotas apropiadas de cada fracción utilizando kemptido como sustrato según se detalló en la sección VII de Materiales y Métodos. Se utilizaron las proteínas marcadoras descriptas en la figura 5.



Los resultados de estos experimentos sugieren la existencia de una especie intermedia en el mecanismo de disociación de la holoenzima en sus subunidades regulatoria y catalítica. Esta especie tiene actividad quinásica dependiente de AMP<sub>c</sub>. Si bien no se determinó su radio de Stokes se puede calcular aproximadamente su peso molecular utilizando la relación de Martin y Ames (222):

$$\frac{M}{M_x} = \left[ \frac{S}{S_x} \right]^{3/2}$$

siendo M y M<sub>x</sub> y S y S<sub>x</sub> los pesos moleculares y los coeficientes de sedimentación de la proteína de referencia y de la incógnita respectivamente.

Tomando como referencia los valores de peso molecular y coeficientes de sedimentación obtenidos para la subunidad regulatoria en el capítulo anterior se calculó un peso molecular para esta especie de aproximadamente 200 K que podría corresponder a la especie trimérica R<sub>2</sub>C.

## VII- ESTUDIO DE LA INTERACCION ENTRE LAS SUBUNIDADES REGULATORIA Y CATALITICA DE LA QUINASA DE MUCOR

La existencia del complejo ternario holoenzima  $AMP_c$  y su relativa estabilidad, o dicho en otras palabras la dificultad para disociar la holoenzima de Mucor por  $AMP_c$  aún a concentraciones altas del nucleótido (201) indujeron a encarar el estudio de la interacción entre las subunidades que constituyen esta holoenzima.

Una forma de estudiar esta interacción es estudiar la reacción de reasociación de las subunidades de la holoenzima de Mucor y compararla con la reasociación entre las subunidades regulatoria y catalítica de un organismo superior, así como también estudiar las reasociaciones entre subunidades heterólogas. El objetivo de estudiar y comparar estas diferentes interacciones entre las subunidades de ambos sistemas, es tratar de explicar el comportamiento peculiar de la holoenzima de Mucor frente al  $AMP_c$ .

#### VII. 1- Obtención de las subunidades regulatorias y catalíticas de Mucor y de corazón de cobayo.

Como holoenzima de un organismo eucarionte superior se utilizó la quinasa de tipo II de corazón de cobayo. La forma de obtención de la holoenzima y de sus subunidades

se detalló en la sección VI de Materiales y Métodos. El fundamento del método se basa en la disociación de la holoenzima por  $AMP_c$  y posterior separación de las subunidades por pasaje por una columna mixta de Sephadex G-25 sobre la cual se montó una de CM-Sephadex C-50. La subunidad regulatoria no se absorbe debido a que es una proteína ácida y se obtiene en el volumen muerto de la columna, mientras que la subunidad catalítica, que es una proteína básica se absorbe en la resina de intercambio catiónico y se la obtiene casi homogénea por elución de la columna con fuerza iónica alta. La obtención de la subunidad regulatoria de la holoenzima de Mucor se describió en la sección V de Materiales y Métodos. Para ello se disoció la holoenzima con  $AMP_c$  y a alta fuerza iónica (ClNa 0.5 M) y se separaron las subunidades por centrifugación en un gradiente de sacarosa 5-20% equilibrado con  $AMP_c$  y ClNa para evitar la reasociación de las subunidades durante la corrida.

La obtención de la subunidad catalítica de Mucor presentó varias dificultades. El hecho de no poder disociar la holoenzima con  $AMP_c$  sin utilizar alta fuerza iónica impidió utilizar el esquema clásico seguido para todas las holo-

enzimas de eucariontes superiores que sí son disociadas por el  $AMP_c$ . La necesidad de utilizar alta fuerza iónica en la disociación excluyó el uso de resinas de intercambio iónico, ya que cualquier intento de bajar la fuerza iónica para absorber la proteína en la resina, produce la reasociación de sus subunidades.

La utilización de una columna de Sephacryl S-300 o de gradientes de sacarosa no fue viable debido principalmente a que la subunidad catalítica es muy lábil cuando se encuentra muy diluída y en ambos métodos se dan condiciones de alta dilución, además de que insumen un tiempo considerablemente alto.

La obtención de la subunidad catalítica por disociación de la holoenzima con  $AMP_c$  e histona o protamina y posterior purificación de la subunidad catalítica por la resina de intercambio catiónico también presentó dificultades.

La presencia de estas proteínas fuertemente básicas modifica el punto isoeléctrico de ciertas proteínas de la preparación de tal modo que luego de disociar la holoenzima tienen afinidad por la resina de intercambio catiónico, contaminando la preparación de la subunidad catalítica (resulta

dos no mostrados).

La singularidad de la holoenzima de Mucor de formar un complejo ternario estable con el AMP<sub>c</sub> planteó la posibilidad de utilizar la resina de afinidad AMP<sub>c</sub>-agarosa pensando en que no se iba a producir la disociación in situ, sino que en este caso la holoenzima se uniría al AMP<sub>c</sub> ligado a la matriz covalentemente y se podría disociar la holoenzima unida utilizando alta fuerza iónica. Como muestra la figura 18, el método funcionó como se previó. La holoenzima fue retenida por la resina AMP<sub>c</sub>-agarosa, no detectándose actividad quinásica en el percolado.

La subunidad catalítica se eluyó por pasaje de buffer con alta fuerza iónica, quedando en estas condiciones la subunidad regulatoria retenida en la columna.

La flecha en el gráfico de la figura 18 indica la fracción a partir de la cual se comenzó la elución con buffer de alta fuerza iónica, y las barras acotan las fracciones con actividad quinásica que se recogieron. La purificación de la subunidad catalítica se completó por cromatografía en una resina de intercambio catiónico según se describió en Materiales y Métodos. En la tabla IX se muestra un cuadro de purificación de la subunidad catalítica.

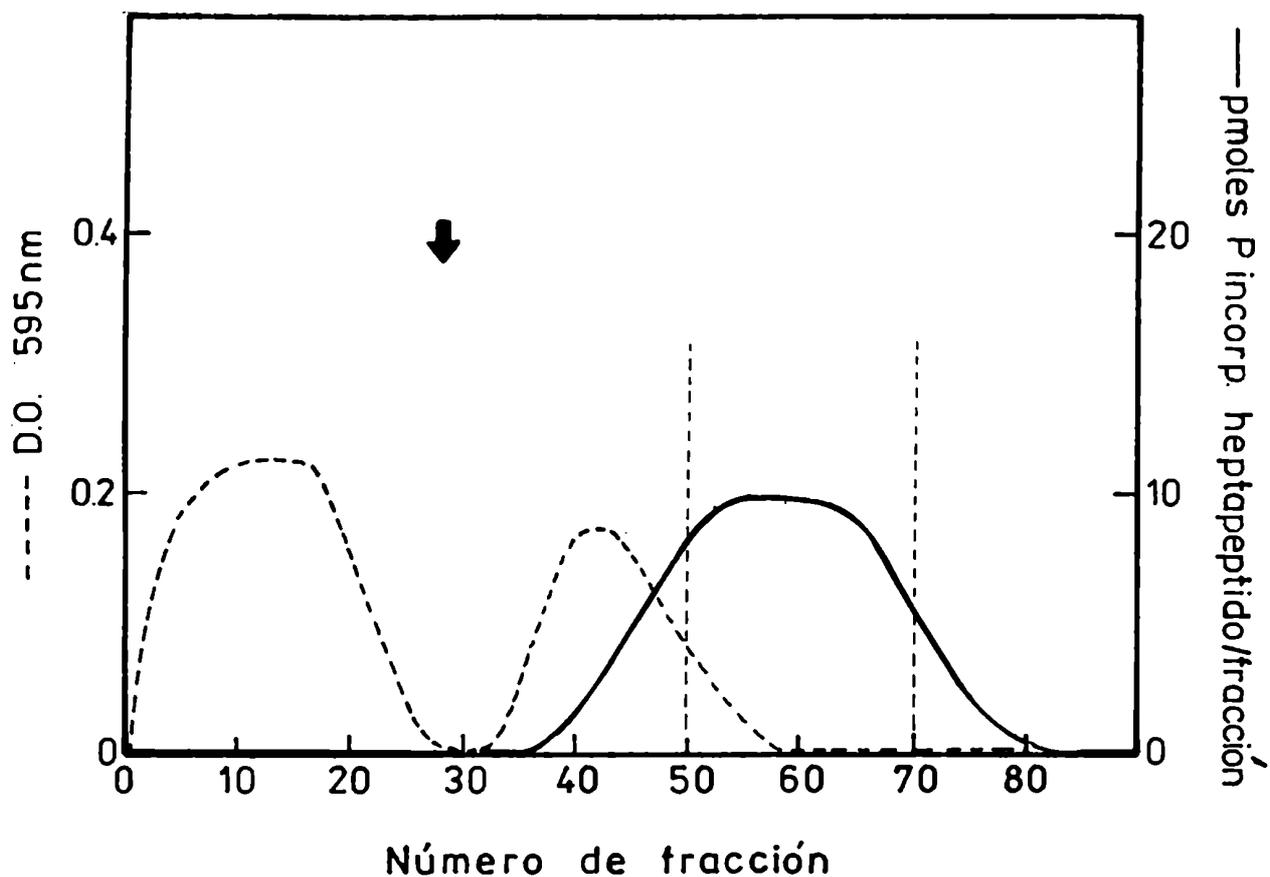


Figura 18: Perfil de actividad quinásica en una columna de AMP<sub>c</sub>-agarosa. Se sembró el percolado proveniente de una columna de CM-Sephadex C-50, como se detalló en la sección IV de Materiales y Métodos. La actividad quinásica se midió en alícuotas adecuadas de cada fracción, utilizando kemptido como sustrato, con el método descrito en Materiales y Métodos. (Sección VII).

TABLA IX

Purificación de la subunidad catalítica de la holoenzima de  
Mucor.

(La purificación y el rendimiento se expresan respecto del S-100 que es el primer paso de purificación de la holoenzima).

Etapas	Proteína total ( mg )	Rend. ( % )	Purif.	pmoles de P unidos al kemptido/mg de proteína
Sephacryl S-300	8.1	18	50	$31 \times 10^3$ *
Precipitación a pH = 6.3	5.2	18	77.5	$48 \times 10^3$
Percolado CM- Sephadex C-50	3.3	18	122	$75 \times 10^3$
AMP <sub>c</sub> -agarosa	0.40	14.6	820	$508 \times 10^3$
CM-Sephadex C-50	0.01	7.0	16700	$10.4 \times 10^6$

Estos datos corresponden a la preparación de subunidad catalítica partiendo de 150 g de micelio (peso húmedo).

\* pmoles de P incorporados al sustrato heptapéptido en 10 min de reacción determinados según se detalla en la sección VII de Materiales y Métodos.

La preparación de subunidad catalítica no está purificada a homogeneidad no obstante estar purificada 16.000 veces respecto del S-100. Si se la somete a una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, aparece una banda principal con un peso molecular de 40 K, acompañada de varias bandas menores con pesos moleculares que van entre 45 y 60 K (resultados no mostrados).

#### VII.2- Interacciones entre las subunidades regulatorias y catalíticas de ambos sistemas.

Una vez que se obtuvieron las subunidades regulatorias y catalíticas de las holoenzimas de Mucor y de corazón bovino se estudiaron las interacciones homólogas y heterólogas. El estudio consistió en determinar el grado de reasociación entre las subunidades, por incubación de una cantidad fija de subunidad catalítica con concentraciones crecientes de subunidad regulatoria. Para ello una vez transcurrido un tiempo de reacción suficiente para llegar al equilibrio, se midió la actividad quinásica remanente.

El gráfico 19 muestra las curvas de inhibición de la actividad quinásica de las subunidades catalíticas de Mucor

y de corazón de cobayo, por las subunidades regulatorias de ambos sistemas.

La afinidad entre las subunidades se estimó en base a la constante de equilibrio de la reacción de reasociación de las subunidades cuya ecuación es:

$$(1) \quad K_{eq} = \frac{(R_2C_2)}{(R_2)(C)^2}$$

Siendo  $R_2C_2$  la concentración de holoenzima en el equilibrio y  $(R_2)$  y  $(C)$  las concentraciones de subunidades regulatoria y catalítica respectivamente, libres en el equilibrio.

En realidad utilizar la ecuación (1) no es totalmente correcto en este caso porque por el método de obtención de las subunidades regulatorias de ambos sistemas, éstas tienen  $AMP_c$  unido con lo cual la constante de equilibrio correcta sería:

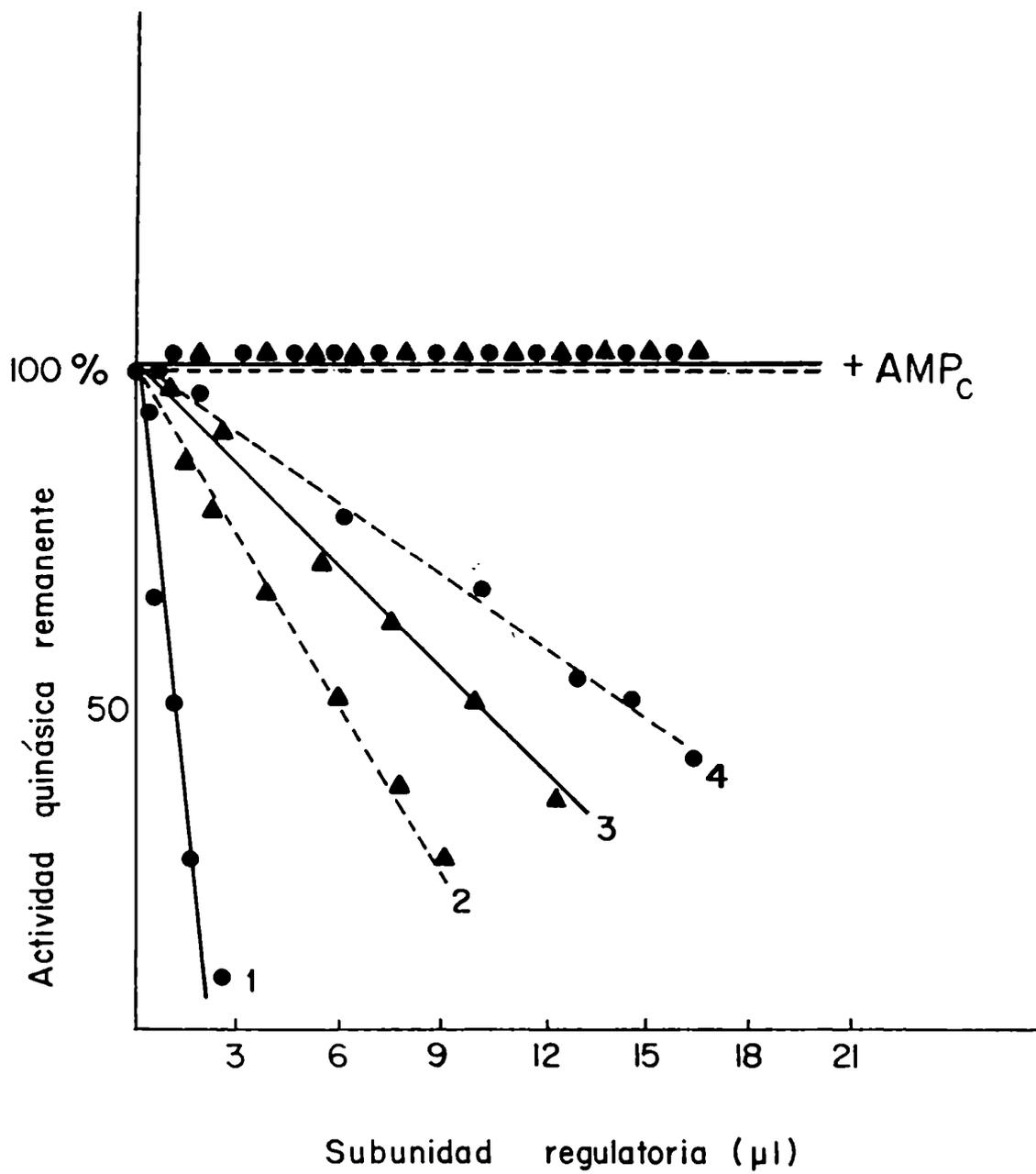
$$K'_{eq} = K_a \cdot K_b = \frac{(R_2C_2) \cdot (AMP_c)^x}{R_2 - (AMP_c)_x (C)^2}$$

donde  $K_a$  es la constante de equilibrio de la reacción de formación del complejo ternario partiendo de subunidad catalí-

Figura 19.- Inhibición de la actividad quinásica de las subunidades catalíticas de Mucor y de corazón de cobayo por las subunidades regulatorias homólogas y heterólogas. Alícuotas de las subunidades catalíticas de Mucor (—) y de corazón de cobayo (---) se incubaron con cantidades crecientes de subunidad regulatoria de Mucor (●) y de corazón de cobayo (▲) durante 20 min. a 4°C en un volumen final de 80  $\mu$ l, conteniendo albúmina 1 mg/ml, 2-mercaptoetanol 20 mM, EDTA 2 mM y buffer Tris-ClH 10 mM pH 7.2. Al cabo de este tiempo se agregó ATP- $\gamma$ - ( $P^{32}$ ) y se midió la actividad quinásica utilizando kemptido como sustrato según se describió en la sección VII de Materiales y Métodos. La línea horizontal en 100 % indica la actividad quinásica medida en presencia de AMP<sub>c</sub> 15  $\mu$ M.

Las alícuotas de subunidades catalíticas de Mucor y de corazón de cobayo transferían 49 pmoles de P al kemptido en 10 min. de reacción como se describió en la sección VII de Materiales y Métodos.

Cada  $\mu$ l de la preparación de las subunidades regulatorias unían  $6 \cdot 10^{-2}$  pmoles de AMP<sub>c</sub>.



cay de subunidad regulatoria con  $AMP_c$  unido y  $K_b$  la constante de equilibrio de la reacción de disociación del complejo ternario en holoenzima libre y  $AMP_c$ . No obstante que la ecuación (1) no nos permite obtener valores absolutos, sirve en cambio para tener valores relativos de las constantes de equilibrio de las cuatro reacciones de reasociaciones estudiadas.

Teniendo en cuenta entonces esta simplificación, y las ecuaciones de conservación de la masa:

$$(R_2)_T = (R_2C_2) + (R_2)$$

$$(C)_T = (R_2C_2) + (C)$$

Siendo  $(C)_T$  la concentración de subunidad catalítica de la cual se parte y  $(R_2)_T$  la concentración de subunidad regulatoria agregada en cada punto. Reemplazando en (1) queda:

$$(2) \quad K_{eq} = \frac{(C)_T - (C)}{[(R_2)_T - (C)_T - C] \cdot (C)^2}$$

con lo cual la constante de afinidad queda expresada en función de los datos experimentales.

Aplicando la ecuación (2), con los datos experimentales representados en la figura 19 se pueden obtener las siguientes relaciones entre los valores de las constantes de equilibrio de las cuatro reacciones de reasociación estudiadas:

$$1) K_1 K_2 K_3 K_4 \quad y$$

$$2) K_1 = 6 K_2$$

$$K_1 = 17 K_4$$

$$K_2 = 1.8 K_3$$

Siendo  $K_1$  y  $K_2$  las constantes de equilibrio de la reacción de reasociación de las subunidades regulatorias y catalíticas de Mucor y de corazón de cobayo respectivamente.

$K_3$  es la constante de equilibrio de la formación de la holoenzima heteróloga con subunidad regulatoria de corazón de cobayo y subunidad catalítica de Mucor, y  $K_4$  corresponde a la constante de equilibrio de la reacción de formación de la holoenzima heteróloga con subunidad regulatoria de Mucor y subunidad catalítica de corazón de cobayo.

De los resultados obtenidos se puede concluir:

a) La afinidad entre las subunidades de la holoenzima de

Mucor es 6 veces mayor que la afinidad entre las subunidades de la holoenzima de tipo II de corazón de cobayo.

- b) La subunidad regulatoria de corazón de cobayo tiene mayor afinidad por su propia subunidad catalítica que por la subunidad catalítica de la quinasa de Mucor.
- c) La afinidad de la subunidad regulatoria de Mucor por la subunidad catalítica homóloga es mayor que la heteróloga es decir, con subunidad regulatoria de Mucor y subunidad catalítica de corazón de cobayo.

Estos resultados podrían explicar parcialmente la formación de un complejo ternario holoenzima- $AMP_c$  estable con la enzima de Mucor mientras que en las holoenzimas de eucariontes superiores el  $AMP_c$  las disocia sin dificultad y el complejo ternario si bien está demostrado que se forma, sólo puede ser detectado indirectamente mediante estudios cinéticos (ver Introducción).

La singularidad de la holoenzima de Mucor, vendría dada no sólo por las características de su subunidad regulatoria, sino también por las de su subunidad catalítica lo cual explicaría la baja afinidad de la subunidad regulatoria de Mucor por la subunidad catalítica de corazón de cobayo. Si

ambas subunidades catalíticas fueran muy semejantes, la inhibición de la actividad quinásica de la subunidad catalítica de corazón de cobayo debería ser parecida a la obtenida en la inhibición de la subunidad catalítica de Mucor por la propia subunidad regulatoria.

En este estudio se hicieron dos suposiciones: La primera es que ambas subunidades catalíticas, la de Mucor y la de corazón de cobayo tienen igual número de recambio, es decir procesan un número igual de moléculas de sustratos por minuto por centro activo de enzima. Esto se basa en que las subunidades catalíticas provenientes de muy diversas fuentes no presentan diferencias cinéticas apreciables (7). La segunda suposición fue que la holoenzima de Mucor une el mismo número de moles de AMP<sub>c</sub> por mol de subunidad regulatoria, que el que unen la subunidad regulatoria de holoenzimas de eucariontes superiores, para todas las cuales sí se estudió la estequiometría de unión del nucleótido cíclico.

En todos los casos estudiados, que son muchos, la estequiometría resultó ser de 4 moles de AMP<sub>c</sub>/mol de subunidad regulatoria. Constituye una excepción la subunidad regulatoria obtenida de levadura de panadería, para la cual

HIXSON y KREBS (33) encontraron que la estequiometría era de dos moles de  $AMP_c$  / mol de subunidad regulatoria.

En el caso de que en Mucor se uniera un número menor de moles de  $AMP_c$  por mol de subunidad regulatoria, las diferencias de afinidad serían menores, si por el contrario el número de moles de  $AMP_c$  unidos fuese mayor, las diferencias encontradas en el experimento se exaltarían, pero en cualquiera de los casos las diferencias cualitativas observadas seguirían siendo válidas.

#### VIII- MODELO DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE $AMP_c$ DE MUCOR.

En base a las evidencias experimentales presentadas en esta Tesis, y en trabajos anteriores realizados en el laboratorio (201) se propone un modelo (figura 20) que explique el comportamiento de la holoenzima frente al  $AMP_c$  así como la interacción entre sus subunidades regulatoria y catalítica.

Los fundamentos experimentales de este modelo

- 1) Los estudios de la estructura polimérica de la holoenzima, así como de sus propiedades moleculares y las de sus subunidades.
- 2) La existencia de un complejo ternario al interaccionar la holoenzima con el  $AMP_c$ .
- 3) La duplicación del número de sitios de unión del  $AMP_c$  al disociarse la holoenzima.
- 4) Los estudios cinéticos de intercambio isotópico del complejo ternario holoenzima- $AMP_c$  ( $H^3$ ) y de la subunidad regulatoria- $AMP_c$  ( $H^3$ ).
- 5) La existencia de una especie molecular de coeficiente de sedimentación de 6.85 (S) en el proceso de disociación de la holoenzima, con actividad quinásica dependiente de  $AMP_c$ , con un peso molecular aproximado de 200 K y que une un número de moléculas de  $AMP_c$  intermedio entre los que une la holoenzima y la subunidad regulatoria libre.
- 6) Los estudios de la interacción entre las subunidades catalíticas y regulatorias de las holoenzimas de Mucor y de corazón de cobayo.

#### COMENTARIOS SOBRE EL MODELO

Las dos hendiduras dibujadas en la subunidad ca

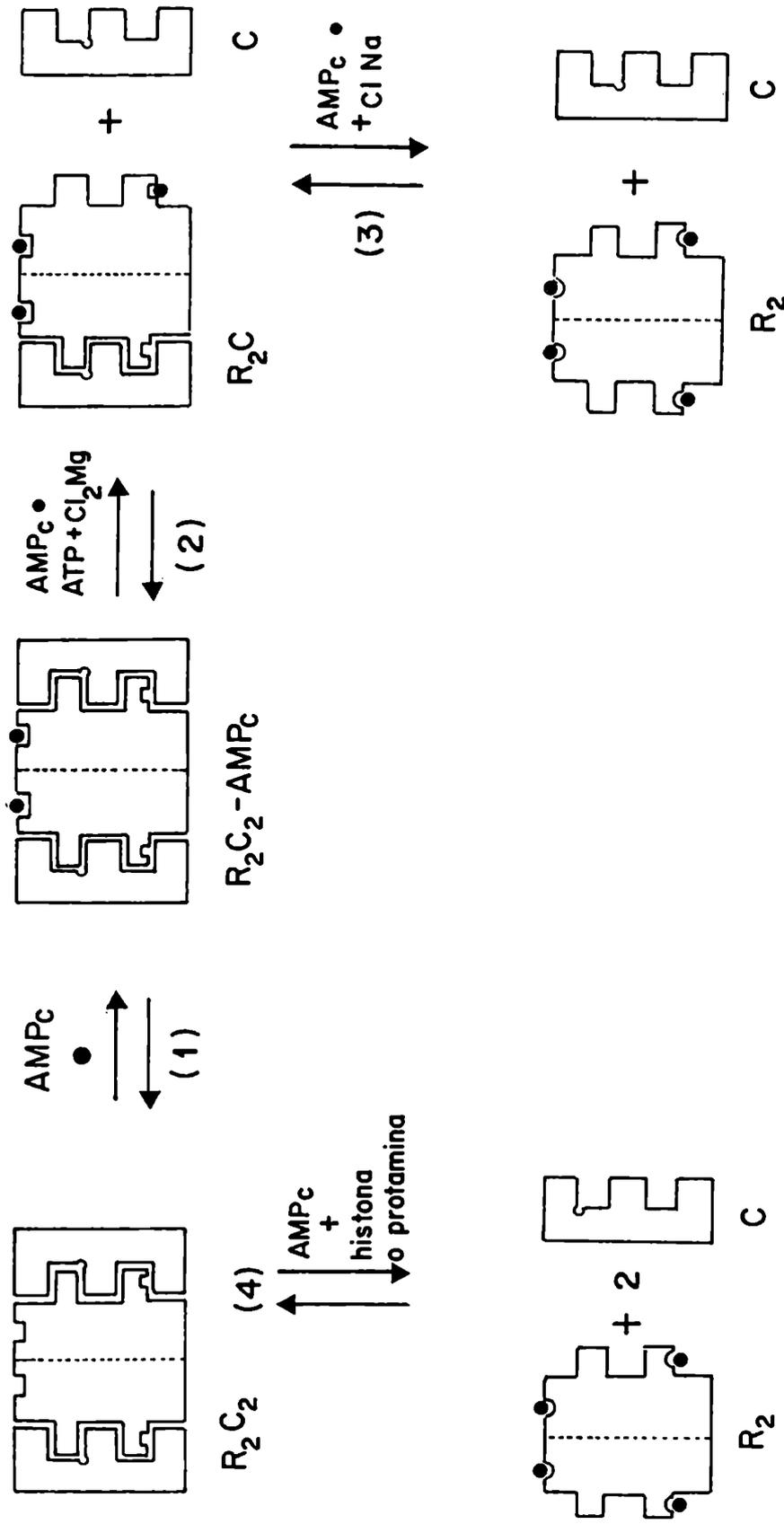


Figura 20: Modelo de la quinasa de proteínas dependiente de  $AMP_c$  de M.rouxii y de su posible mecanismo de disociación.

talítica de Mucor expresan la posibilidad de un gran número de contactos atómicos con la subunidad regulatoria correspondiente, lo que redundará en una  $K_{eq}$  de la formación de la holoenzima de Mucor mayor que para la holoenzima de co razón de cobayo.

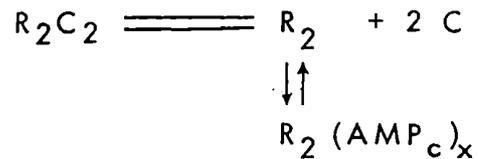
Las diferentes geometrías de los sitios de unión del  $AMP_c$  a la holoenzima y a la subunidad regulatoria libre, dan cuenta de la mayor estabilidad de los sitios al disociarse, aunque no implican que sean equivalentes. La geometría adjudicada al tercer sitio es arbitraria dado que no se hicieron estudios de intercambio isotópico con la especie de 6.85S.

Se supuso que el número de sitios de unión del  $AMP_c$  es de 4 moles por mol de subunidad regulatoria de Mucor por analogía con las subunidades regulatorias de organismos superiores.

El equilibrio (4) expresa la posibilidad de que en presencia de histona o protamina el mecanismo de disociación siga un camino totalmente diferente, dado que ambas proteínas si bien son excelentes sustratos, son además muy básicos e interaccionan fuertemente con la subunidad regulatoria (118) pudiendo esto alterar significativamente la interacción

de la holoenzima con el AMP<sub>c</sub>.

La posibilidad de que la holoenzima estuviera en equilibrio con sus subunidades y que este equilibrio se desplazara hacia el lado de los productos al interaccionar el AMP<sub>c</sub> con la subunidad regulatoria según el siguiente esquema:



se descarta, porque el complejo  $R_2 (AMP_c)_x$  tiene una constante de disociación 100 veces menor que la del complejo ternario holoenzima -  $(AMP_c)_x/2$  y no obstante aumentando la concentración de AMP<sub>c</sub> en un rango extenso no se observa disociación y sí en cambio formación del complejo ternario.

La secuencia de equilibrios 1-2 y 3 del modelo parece adecuada para representar el mecanismo de disociación de la holoenzima, porque no obstante estar deducidos de dos experimentos diferentes: formación del complejo ternario holoenzima-AMP<sub>c</sub> y existencia de la especie de 6.85 S, parece poco probable que el AMP<sub>c</sub> forme el complejo ternario con la holoenzima como una reacción secundaria al me-

canismo de disociación, dado que incluso con sólo AMP<sub>c</sub> (en muy alta relación frente al de la holoenzima) se puede llegar hasta los equilibrios 1 y 2 (resultados no mostrados).

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- 1.- La quinasa de proteínas dependiente de AMP<sub>c</sub> se sometió a varios pasos de purificación que incluyeron, la obtención del S<sub>100</sub>, precipitación por sulfato de amonio, cromatografía por DEAE-celulosa y filtración molecular en Sephacryl S-300. Al final de esta última etapa se obtuvo una preparación enzimática purificada 50 veces respecto del homogenado original.
- 2.- Utilizando técnicas de centrifugación en gradientes de sacarosa, filtración molecular y marcación por fotoafinidad, se estudió la estructura polimérica de la holoenzima. Se encontró que ésta tiene una estructura tetramérica (R<sub>2</sub>C<sub>2</sub>) al igual que las quinasas de organismos eucariontes superiores. Dicha estructura está formada por una subunidad regulatoria dimérica (R<sub>2</sub>) y dos subunidades catalíticas presumiblemente unidas a cada uno de los monómeros de la subunidad regulatoria. Las propiedades moleculares de la subunidad regulatoria. Las propiedades moleculares de la subunidad catalítica son semejantes a las descritas en los diferentes sistemas eucariontes superiores, mientras que la subunidad regulatoria tiene un coe

ficiente de sedimentación y un peso molecular considerablemente mayor que el de las subunidades regulatorias de organismos eucariontes superiores.

- 3.- Por primera vez se presentan evidencias físicas de la existencia de un complejo ternario holoenzima-AMP<sub>c</sub> formado al interaccionar la holoenzima de Mucor con el AMP<sub>c</sub>. Los estudios cinéticos de intercambio isotópico revelaron que el complejo ternario tiene una constante de disociación 100 veces mayor que la que tiene la subunidad regulatoria con el AMP<sub>c</sub> unido.
- 4.- Se determinó que el número de moléculas de AMP<sub>c</sub> que une la subunidad regulatoria es el doble de los que se unen a la holoenzima al formarse el complejo ternario holoenzima-AMP<sub>c</sub>. Este desenmascaramiento de nuevos sitios de unión del AMP<sub>c</sub> a la proteína está vinculado con la disociación de la holoenzima.
- 5.- Se encontró que en el proceso de disociación de la holoenzima se forma una especie molecular cuya actividad quinásica es dependiente de la presencia de AMP<sub>c</sub> y que une un número de moléculas de AMP<sub>c</sub> intermedio entre los que une la holoenzima y la subunidad regulatoria.

Esta especie molecular tiene un coeficiente de sedimentación de 6.85 S con un peso molecular aproximado de 200 K y podría corresponder a la especie trimérica  $R_2C$ .

- 6.- Se describe un método de purificación de la subunidad catalítica a partir de la holoenzima de Mucor. Este método se fundamenta en la particularidad de la holoenzima de formar un complejo ternario estable con el  $AMP_c$ , lo cual permitió utilizar una cromatografía de afinidad con  $AMP_c$ -agarosa para lograr la separación absoluta de sus subunidades.
- 7.- Se estudiaron las interacciones homólogas y heterólogas entre las subunidades regulatorias y catalíticas de Mucor y de un organismo eucarionte superior (corazón de cobayo).

Estos estudios revelaron que la afinidad de la subunidad regulatoria de Mucor por la subunidad catalítica homóloga es mucho mayor que por la subunidad catalítica heteróloga y que la afinidad entre las subunidades regulatorias y catalíticas de la holoenzima de corazón de cobayo.

Esta alta afinidad sería consecuencia no sólo de la particularidad de la subunidad regulatoria sino también de las características de la subunidad catalítica de Mucor.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'R. P. A.' with a flourish.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. J. G.' with a flourish.

BIBLIOGRAFIA

- 01.- Krebs, E.G. y Fischer, E.H. (1956) Biochim. Biophys. Acta 20, 150.
- 02.- Krebs, E.G., Graves, D.J. y Fischer, E.H. (1959) J. Biol. Chem. 234, 2867.
- 03.- Rodnight, R., Lavin, B.E. (1964) Biochem. J. 93, 84
- 04.- Traugh, J.A., Mumby, M., Traut, R.R. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 1311.
- 05.- Nimmo, H.G. y Cohen, P. (1977) Adv. Cyc. Nuc. Res., 8, 145.
- 06.- Lee, E.Y.C., Silberman, S.R., Ganapathi, M.K., Petrovic, S. y Paris, H. (1980) Adv. Cyc. Nuc. Res., 13, 95.
- 07.- Flockhart, D.A. y Corbin, J.D. (1982) C.R.C. Critical Reviews in Biochemistry, 12, 133.
- 08.- Krebs, E.G. y Beavo, J.A. (1979) Ann. Rev. Biochem., 48, 923.
- 09.- Kuo, J.F., Greengard, P. (1970) J. Biol. Chem. 245, 2493.
- 10.- Kuo, J.F. y Greengard, P. (1970) J. Biol. Chem. 246, 7159.
- 11.- Hofmann, F., Sold, G. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 1100
- 12.- Nakazawa, K. y Sano, M. (1975) J. Biol. Chem. 250, 7415.
- 13.- Lincoln, T.M., Dills, W.L. y Corbin, J.D. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4269.

- 14.- Flockerzi, V., Speicherman, N. y Hofmann, F. (1978) J.Biol. Vhem. 253, 3395.
- 15.- Inoev, M. Kishimoto, A., Takai, Y. y Nishizaka, Y. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4476
- 16.- Gill, G.N., Holdy, K.E., Walton, G.M. y Kanstein, C. B. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3918.
- 17.- Lincoln, T.M., Flockhart, D.A. y Corbin, J.D. (1978) J. Biol. Chem. 253, 6002.
- 18.- Monken, C.E. y Gill, G.N. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7067.
- 19.- Kuo, J.F., Patrick, J.G. y Seery, V.L. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 996.
- 20.- Ramseyer, J., Kanstein, C.B., Walton, G.M. y Gill, G. N. (1976) Biochim. Biophys. Acta 446, 358.
- 21.- Dills, W.L., Beavo, J.A., Bechtel, P.J., Meyer, K.R., Sakai, L.J. y Krebs, E.G. (1976) Biochemistry 15, 3724.
- 22.- Goldberg, N.D. y Haddox, M.K. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 823.
- 23.- Goldberg, N.D., O'Dea, R.F. y Haddox, M.K. (1973) Adv. Cyc. Nuc. Res. 3, 155.
- 24.- Lincoln, T.M. y Corbin, J.D. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 3239.
- 25.- Khoo, J.C., Sperry, P.J., Gill, G.N. y Steinberg, D. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4843.
- 26.- Glass, D.B. y Krebs, E.G. (1979) J. Biol. Chem. 254, 9728.
- 27.- Casnellie, J.E., Ives, H.E., Jamieson, J.D. y Greengard, P. (1980) J. Biol. Chem. 255, 3770.

- 28.- Geahlen, R.L. y Krebs, E.G. (1980) J. Biol. Chem. 255, 9375.
- 29.- Casnellie, J.E. y Greengard, P. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 71, 1891.
- 30.- Schlichter, D.J., Casnellie, J.E. y Greengard, P. (1978) Nature, 273, 61.
- 31.- Johnson, E.M. y Haddon, J.W. (1975) Science, 187, 1198.
- 32.- de Jonge, H.R. y Rosen, O.M. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2780.
- 33.- Hixson, C.S. y Krebs, E.G. (1981) J. Biol. Chem. 256, 1122.
- 34.- Perrie, W.T., Smillie, L.B. y Perry, S.V. (1973) Biochem. J. 135, 151.
- 35.- Pires, E., Perry, S.V. y Thomas, M.A.W. (1974) FEBS Le H 41, 292.
- 36.- Daniel, J. y Adelstein, R.S. (1976) Biochemistry 15, 2370.
- 37.- Nair, A.C. y Perry, S.V. (1978) Biochem. J. 179, 89.
- 38.- Wolf, H. y Hofmann, F. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 5852.
- 39.- Yazawa, M. y Yagi, K. (1977) J. Biochem. 82, 287.
- 40.- Cheung, W.Y. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 533.
- 41.- Cohen, P. (1973) Eur. J. Biochem. 34, 1.
- 42.- Hayakawa, T., Perkins, J.P., Walsh, D. y Krebs, E.G. (1973) Biochemistry, 12, 567.

- 43.- Cohen, P. (1980) Molecular Aspects of Cellular regulation Vol. 1, Cap. 1, pág. 5 Elsevier/Nort Holland Biomedical Press.
- 44.- Skuster, J.R., Cahn, K.F.J. y Graves, D.J. (1980) J. Biol. Chem. 255, 2203.
- 45.- Grand, R.J.A., Shenolikar, S. y Cohen, P. (1981) Eur. J. Biochem. 113, 359.
- 46.- Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Mori, T. y Nishizuka, Y. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3692.
- 47.- Takai, Y., Kishimoto, A., Mori, T. y Nishizuka, Y. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 1218.
- 48.- Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1980) J. Biol. Chem.
- 49.- Bruns, G.P. y London, I.M. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 236.
- 50.- Adamson, S.D., Herbert, E. y Kemp, S.F. (1969) J. Mol. Biol. 42, 247.
- 51.- Traschsel, H. (1977) Cell, 11, 187.
- 52.- Levin, D.H., Ranu, R.S., Ernst, V. y London, I.M. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3112.
- 53.- Traschel, H., Ranu, R.S. y London, I.M. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3654.
- 54.- Gross, M. y Rabinovitz, M. (1972) Biochim. Biophys. Acta 287, 340.
- 55.- Gross, M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 366, 319.
- 56.- Ranu, R.S. y London, I.M. (1979) Methods. Enzymol., 60, 485.

- 57.- Levin, D., Ernst, V. y London, I.M. (1979) J. Biol. Chem. 254, 7935.
- 58.- Ehrenfeld, E. y Hunt, T. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 1075.
- 59.- Ratner, L., Slattery, E. y Lengyel, P. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5893.
- 60.- Ranu, R.S. Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 1437.
- 61.- Grosfeld, H. y Ochoa, S. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 6526.
- 62.- Petryshyn, R., Levin, D.H. y London, I.M. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 1190.
- 63.- Carpenter, G. y Cohen, S. (1979) Annu. Rev. Biochem. 48, 193.
- 64.- Carpenter, G., King, L. Jr. y Cohen, S. (1978) Nature, 276, 409.
- 65.- Carpenter, G., King, L. Jr. y Cohen, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4884.
- 66.- Fernandez - Pol, J.A. (1981) Biochemistry, 20, 3907.
- 67.- Fernández - Pol, J.A. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9742.
- 68.- Haigler, H., Ash, J.F., Singer, S.J. y Cohen, S. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3317.
- 69.- Buhrow, S.A., Cohen, S. y Staros, J.V. (1982) J. Biol. Chem. 257, 4019.
- 70.- Chinkers, M. (1982).
- 71.- Kasuga, M., Anders, K. y Kahn, R. (1982) Science 215, 185.

- 72.- Advances In Polyamine Research. Vol. 1, Raven Press, New York, (1978).
- 73.- Atmar, V.J., Kuehn, G.D. y Casillas, E.R. (1981) J. Biol. Chem. 256, 8275.
- 74.- Daniels, G.R., Atmar, V.J. y Kuehn, G.D. (1981) Biochemistry 20, 2582.
- 75.- Sugden, P.H., Kerbey, A.L., Randle, P.J., Waller, C.A. y Reid, K.B.M. (1979) Biochem. J. 181, 419.
- 76.- Hunter, T. y Sefton, B.M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 1311.
- 77.- Purchio, A.F., Erikson, E., Brugge, J.S. y Erikson, R.L. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1567.
- 78.- Beemon, K. y Hunter, T. (1978) J. Virol. 28, 551.
- 79.- Collet, M.S., Brugge, J.S. y Erikson, R.L. (1978) Cell. 15, 1363.
- 80.- Sefton, B.M., Hunter, T., Beemon, K. y Eckhart, W. (1980) Cell 20, 807.
- 81.- Erikson, E. y Erikson, R.L. (1980) Cell 21, 829.
- 82.- Cooper, J.A. y Hunter, T. (1983) J. Biol. Chem. 258, 1109.
- 83.- Rall, T.W., Sutherland, E.W. y Berthet, L. (1957) J. Biol. Chem. 224, 463.
- 84.- Robinson, G., Butcher, R. y Sutherland, E.W. (1971) Cyclic AMP. Academic Press. N.Y.
- 85.- Kuo, J.F. y Greengard, P. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 64, 1349.
- 86.- Krebs, E.G. (1972) Curr Top Cell. Reg. 5, 99.

- 87.- Pohl, S.L., Birnbaumer, L. y Rodbell, M. (1969) *Science* 164, 566.
- 88.- Sutherland, E.W. y Rall, T.W. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 1077.
- 89.- Drummond, G.I. y Perrot-Yee, S. (1961) 236, 1126.
- 90.- Krebs, E.G. (1973) *Endocrinology. Proceedings of the 4th. International Congress. Excerpta Medica- Amsterdam.*
- 91.- Friedman, D. y Larner, J. (1963) *Biochemistry* 2, 669.
- 92.- Schlender, K., Wei, S. y Villar-Palasi, C. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 191, 272.
- 93.- Soderling, T., Hickenbottom, J., Reimann, E., Hunkeler, F., Walsh, D. y Krebs, E.G. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 6817.
- 94.- Huttunen, J., Steinberg, D. y Mayer, S. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67, 290.
- 95.- Walsh, D., Perkins, J. y Krebs, E.G. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 3763.
- 96.- Angan, T. (1968) *Science* 162, 63.
- 97.- Corbin, J.D., Sugden, P.H., West, L., Flockhart, D.A., Lincoln, T.M. y Mc Carthy, D. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4569.
- 98.- Hofmann, F., Beavo, J.A., Bechtel, P.J. y Krebs, E.G. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 7795.
- 99.- Corbin, J.D., Keely, S. y Park, C.R. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 218.
- 100.- Erlichman, J., Savkar, D., Fleischer, N. y Rubin, C.S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 8179.

- 101.- Kuo, J.F., Krueger, B.K., Sanes, J.R. y Greengard, P. (1971). *J. Biol. Chem.* 246, 7303.
- 102.- Yamamura, H., Inoue, Y., Shimomura, R. y Nishizuka, Y. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46, 589.
- 103.- Huttunen, J., Steinberg, D. y Mayer, S. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67, 290.
- 104.- Corbin, J., Reiman, E., Walsh, D. y Krebs, E.G. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 4849.
- 105.- Gill, G.N. y Garren, L.D. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 786.
- 106.- Reimann, F.M., Walsh, D. y Krebs, E.G. (1971) 246, 1986.
- 107.- Judewickz, N.D., Glikin, G.C. y Torres, H. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 206, 87.
- 108.- Glikin, G.C., Judewicz, N.D. y Torres, H. (1982) *Molecular and Cellular Biochemistry* 46, 121.
- 109.- Juliani, M.H., Brochetto, M.R. y Da Costa Maia, J. C. (1979) *Cell Differentiation* 8, 421.
- 110.- Silverman, P.M. (1978) *J. Bacteriol.* 135, 976.
- 111.- Brochetto, - Braga, M.R., López Gómez, S. y da Costa Maia, J.C. (1982) *Archiv. Biochem. Biophys.* 217, 295.
- 112.- López Gómez, S., Juliani, M.H., da Costa Maia y Rangel-Aldao, R. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 6972.
- 113.- Uno, I. y Ishikawa, T. (1981) *J. Biochem.* 89, 1275.
- 114.- Uno, I. y Ishikawa, T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 334, 354.

- 115.- Sy, J. y Roselle, M. (1981) *Febs Lett.* 135, 93.
- 116.- Sampson, J. (1977) *Cell* 11, 173.
- 117.- Gunzburg, J. y Veron, M. (1982) *The Embo Journal* 1, 1063.
- 118.- Moreno, S. y Passeron, S. (1980) *Archiv. of Biochem. y Biophys.* 199, 321.
- 119.- Moreno, S. Paveto, C. y Passeron, S. (1977) *Archives of Biochem y Biophys.* 178, 1.
- 120.- Rosen, O.M. y Erlichman, J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 7788.
- 121.- Zoller, M.J., Kerlavage, A.R. y Taylor, S.S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 2408.
- 122.- Døskeland, S.O. y Ogreid, D. (1981) *Int. J. Biochem.* 13, 1.
- 123.- Weber, W., Schwach, G., Schröder, H. y Hilz, H. (1981) *Cold Spring Harbor Conf. on Cell Proliferation* 8, 125.
- 124.- Weber, W., Schwach, G. y Hilz H. (1982) *Biochem Biophys. Res. Commun.* 104, 1134.
- 125.- Potter, R.L., Stafford, P.H. y Taylor, S. (1978) *Archiv. Biochem. Biophys.* 190, 174.
- 126.- Weber, W. y Hilz. H. (1978) *Eur. J. Biochem.* 83, 215.
- 127.- Potter, R.L. y Taylor, S.S. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 9706.
- 128.- Zick, S.K. y Taylor, S.S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2287.
- 129.- Døskeland, S.O. (1978) *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 83, 542.

- 130.- Rannels, S.R. y Corbin, J.D. (1980) J. Cycl. Nucl. Res. 6, 201.
- 131.- Rannels, S.R. y Corbin, J.D. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7085.
- 132.- de Wit, R.J.W. y Hoppe, J. (1981) FEBS Lett. 127, 9.
- 133.- La Porte, D.C., Builder, S.E. y Storme, D.R. (1980) J. Biol. Chem. 255, 2343.
- 134.- Øgreid, D. y Døskeland, S.O. (1980) FEBS. Lett. 121, 340.
- 135.- Øgreid, D. y Døskeland, S.O. (1981) FEBS Lett. 129, 282.
- 136.- Øgreid, D. y Døskeland, S.O. (1981) FEBS Lett. 129, 287.
- 137.- Smith, S.B., White, H.D., Siegel, J.B. y Krebs, E.G. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1591.
- 138.- Rannels, S.R. y Corbin, J.D. (1981) J. Biol. Chem. 256, 7871.
- 139.- Rannels, S.R. y Corbin, J.D. (1979) J. Biol. Chem. 254, 8605.
- 140.- Kerlavage, A.R. y Taylor, S.S. (1982) J. Biol. Chem. 257, 1749.
- 141.- Hixson, C.S. y Krebs, E.G. (1980) J. Biol. Chem. 255, 2137.
- 142.- Sy, J. y Roselle, M. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 2874.
- 143.- Forte, J.W. y Orłowski, M. (1980) Experimental Mycology 4, 78.

- 144.- Orlowsky, M. (1980) Arch. Microbiol. 126, 133.
- 145.- Trevillyan, J.M. y Pall, M. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3978.
- 146.- de Wit, R.J.W., Arents, J.C., van Driel, R. (1982) FEBS Lett. 145, 150.
- 147.- Peters, K.A., De maille, J.G. y Fischer, E.H. (1977) Biochemistry, 16, 5691.
- 148.- Gagelman, M., Obst. C y Kinzel, V. (1982) Biochem. International 5, 317.
- 149.- Walsh, D.A., Ashby, C.D., González, C., Coking, D., Fischer, E.H. y Krebs, E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5977.
- 150.- Kemp, B.E., Bylund, D.B., Huang, T.S. y Krebs, E.G. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3448.
- 151.- Kemp, B.E., Benjamini, E. y Krebs, E.G. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1038.
- 152.- Kemp, B.E. (1979) J. Biol. Chem. 254, 2638.
- 153.- Sudgen, P.H., Holladay, L.A., Reinman, E.H. y Corbin, J.D. (1976) Biochem. J. 159, 409.
- 154.- Armstrong, R.N. y Kaiser, E.T. (1978) Biochemistry 17, 2840.
- 155.- Bramson, H.N., Thomas, N., Matsueda, R. Nelson, N., Taylor, S.S. y Kaiser, E.T. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10575.
- 156.- Hoppe, J., Freist, W., Marutzky, R. y Shaltiel, S. (1978) Eur. J. Biochem. 90, 427.
- 157.- Hoppe, J. y Freist, W. (1979) Eur. J. Biochem. 93, 141.

- 158.- Moll, G.W. y Kaiser, E.T. (1976) J. Biol. Chem. 261, 3993.
- 159.- Matsuo, M., Chang, L., Huang, C. y Villar Palasi, C. (1978) FEBS Lett. 87, 77.
- 160.- Pomerantz, A.H., Allfrey, V.G., Merrifield, R.B. y Johnson, E.M. (1977) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 74, 4261.
- 161.- Kochetkov, S.N., Bulargina, T.V., Sashehniko, L. P. y Severin, E.S. (1977) Eur. J. Biochem. 81, 111.
- 162.- Bolen, D.W., Stingelin, J., Bramson, H.N. y Kaiser, E.T. (1980) Biochemistry 19, 1176.
- 163.- Granot, J., Mildvan, A.S., Bramson, H.N., Thomas, N. y Kaiser, E.T. (1981) Biochemistry 20, 602.
- 164.- Armstrong, R.N., Kando, J. y Kaiser, E.T. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA .
- 165.- Whitehouse, S., Feramisco, J.R., Casnellie, J.E., Krebs, E.G. y Walsh, D. (1983) J. Biol. Chem. 258, 3693.
- 166.- Whitehouse, S. y Walsh, D.A. (1983) J. Biol. Chem. 258, 3682.
- 167.- Hofmann, F., Beavo, J.A., Bechtel, P.J. y Krebs, E.G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 7795.
- 168.- Rangel-Aldao, R. y Rosen, O.M. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3375.
- 169.- Geahlen, R. y Krebs, E.G. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1164.
- 170.- Steinberg, R.A. y Agard, D.A. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10731.

- 171.- Hoppe, J. y Wagner, K.G. TIBS.
- 172.- Flockhart, D.A., Watterson, D.M. y Corbin, J.D. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4435.
- 173.- Takio, K., Walsh, K.A., Neurath, H., Smith, S.B., Krebs, E.G. y Titani, K. (1980) FEBS Lett. 114, 83.
- 174.- Rymond, M. y Hofmann, F. (1982) Eur. J. Biochem. 25, 395.
- 175.- Hemmings, B.A., Aitken, A., Cohen, P., Rymond, N. y Hofmann, F. (1982) Eur. J. Biochem. 127, 473.
- 176.- Beavo, J.A., Bechtel, P.J. y Krebs, E.G. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 241.
- 177.- Ogez, J.R. y Segel, I.H. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4551.
- 178.- Boeynaems, J.M. y Dumont, J.E. (1977). Moll. Cell. Endocrinol. 7, 275.
- 179.- Chau, V., Huang, L., Romero, G.U., Biltonen, R.L. y Huang, C. (1980) Biochemistry 19, 924.
- 180.- Tsuzuki, J. y Kiger, J.A. (1978) Biochemistry 17, 2969.
- 181.- Builder, S.E., Beavo, J.A. y Krebs, E.G. (1980) J. Biol. Chem. 255, 3514.
- 182.- Granot, J., Mildvan, A.S., Hiyama, K., Kondo, H. y Kaiser, E.J. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4569.
- 183.- Bartnicki-García, S. (1968) J. Bacteriol. 96, 1586.
- 184.- Friedenthal, M., Epstein, A. y Passeron, S. (1974) J. Gen. Microbiol. 82, 15.
- 185.- Paznokas, J.L. y Sypherd, P. (1975) J. Bacteriol. 124, 134.

- 186.- Orlowsky, M. y Sypherd, P.S. (1977) J. Bacteriol. 132, 204.
- 187.- Inderlied, C.B., Cihlar, R.S. y Sypherd, P.S. (1980) J. Bacteriol. 141, 699.
- 188.- Larsen, A. y Sypherd, P.S. (1974) J. Bacterid 117, 432
- 189.- Paveto, C., Epstein, A. y Passeron, S. (1975) Archiv. Biochem. Biophys. 169, 449.
- 190.- Cantore, M.L., Galvagno, M.A. y Passeron, S. (1983) Cell Biology International Reports, en prensa.
- 191.- Maia, J.C. y Camargo, E. (1974) Cell Differ 3, 147.
- 192.- Scott, W. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2995.
- 193.- Terenzi, H.F., Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1974) Biochem. Biophys. Res. Com. 58, 990.
- 194.- Loowis, W.F. (1972) Nature, New Biol. 240, 6.
- 195.- Cantore, M.L., Galvagno, M.A. y Passeron, S. (1980) Archiv. Biochem. Biophys. 199, 312.
- 196.- Cantore, M.L. y Passeron, S. (1982) Archiv. Biochem. Biophys. 219, 1.
- 197.- Galvagno, M.A. (1981) Tesis Doctoral Universidad de Buenos Aires.
- 198.- Galvagno, M.A., Moreno, S.M., Cantore, M.L. y Passeron, S. (1979) Biochim. Biophys. Res. Com. 89, 779.
- 199.- Galvagno, M.A., Moreno, S.M. y Passeron, S. (1982) Archiv. Biochem. Biophys. 214, 573.
- 200.- Seigel chiffer, M. y Passeron, S. (1983) Archiv. Bichem. Biophys. (en prensa).

- 201.- Moreno, S.M. (1979) Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- 202.- Bartnicki-García, S. y Nickerson, W.J. (1962) J. Bacteriol. 84, 829.
- 203.- Rangel-Aldao, R. (1979) Archiv. Biol. Med. Exp. 12, 283.
- 204.- Uno, I. y Ishikawa, T. (1981) J. Biochem. 89, 127.
- 205.- Haley, B.E. (1975) Biochem, 14, 3852.
- 206.- Canalco, Sage Kit (1980) Miles Laboratories.
- 207.- Laurent, T.C. y Killander, J. (1964) J. Chromatog. 14, 317.
- 208.- Siegel, L.M. y Monty, K. (1966) Biophys. Acta, 112, 346.
- 209.- Haga, T., Haga, K. y Gilman, A.G. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5776.
- 210.- Cecil, R. y Ogston, A.G. (1948). Biochem. J. 42, 229.
- 211.- Cecil, R. y Ogston, A.G. (1951). Biochem. J. 49, 105.
- 212.- Garen, A. y Levinthal, C. (1960) Biochim. Biophys. Acta 38, 470.
- 213.- Glynn, I. y Chappell, J. (1964) Biochem. J. 90, 147.
- 214.- Chang, K., Marcus, M. y Cuatrecasas, P. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6854.
- 215.- Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248.
- 216.- Terenzi, H.F., Rosellino, E. y Passeron, S. (1971) Eur. J. Biochem. 18, 342.

- 217.- Worthington Enzyme Manual (1972) Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey.
- 218.- Hugget, A. St. G. y Nixson, D.A. (1957) Biochem. J. 66, 12.
- 219.- Rangel-Aldao, R., Kupiec, J.W. y Rosen, O. (1979) J. Biol. Chem. 254, 2499.
- 220.- Sugden, P.H. y Corbin, J.D. (1976) Biochem. J. 159, 423.
- 221.- Talmadge, K.W., Küng, W. y Eppenberger, U. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 545.
- 222.- Martin, R y Ames, B. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1372.
- 223.- Hartl, T.F. y Roskoski, R. (1982) Biochemistry, 21, 5175.