

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

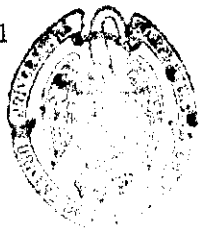


* 5 3 0 9 5 7 7 2 9 9 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

FOSFORILACION DEL FACTOR DE INICIACION DE SINTESIS DE PROTEINAS eIF-2 DE CORTEZA CEREBRAL

Tesis para optar al Grado de Doctor
en Ciencias Biológicas presentada por
Alberto Alcázar González.

Madrid, octubre de 1991



ARCHIVO

VºBº, la Directora

Dra. Matilde Salinas Aracil

Alberto Alcázar González

La presente Tesis ha sido realizada en el Departamento de Investigación del Servicio de Bioquímica del Hospital Ramón y Cajal en Madrid (mayo 1986-octubre 1991), con fondos aportados por la CAICYT (proyecto B23/85), Ministerio de Educación y Ciencia, y por el FISs (proyectos 86/789 y 89/1047), Ministerio de Sanidad y Consumo. Alberto Alcázar González agradece al FISs la concesión durante 1986-1990 de una beca (86/490) predoctoral en España. Parte de este trabajo ha sido publicado en:

Neurochem. Research 13, 829-836 (1988)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 153, 313-320 (1988)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 166, 1237-1244 (1990)

A mis familiares, amigos y compañeros
del Hospital Ramón y Cajal

- AGRADECIMIENTOS -

 Mi agradecimiento a la Dra. Matilde Salinas por la generosa formación científica que me ha aportado durante estos seis años de amistad y por la dirección de esta Tesis, a la cual ha dedicado todo su interés y confianza.

 A la Dra. Rosalía Rodríguez agradezco su deferencia como tutora de la presente Tesis.

 Agradezco a Cristina Cid y Juan López-Fando su constante estímulo, comentarios y sugerencias.

 A Elena Martín y Ana García, compañeras de laboratorio, agradezco su grato ambiente de trabajo y su interés por este trabajo.

 Mi reconocimiento a Fernando Soriano, Enrique Méndez, Antonio Sánchez y Rafael Martín del Río por su desinteresada colaboración técnica.

- INDICE -

INTRODUCCION	1
1. La síntesis de proteínas en células eucarióticas	3
2. El factor de iniciación eIF-2	5
3. Regulación de la síntesis de proteínas	8
Fosforilación del factor eIF-2	9
Otros mecanismos de regulación	11
4. Introducción a la fosforilación de proteínas y proteínas quinasas	12
Fosforilación de proteínas	12
Proteínas quinasas	14
5. Proteínas Quinasas relacionadas con el factor eIF-2 y la traducción	17
Proteína Quinasa controlada por hemina	17
Proteína Quinasa dependiente de RNA de doble cadena	18
Proteína Quinasa dependiente de AMP cíclico	19
Proteína Quinasa C	21
Quinasas dependientes de calcio y calmodulina	24
Caseínas Quinasas	27
S6 Quinasas	29
6. Proteínas Fosfatasas	29
7. Algunas consideraciones sobre la regulación de la sín- tesis de proteínas por fosforilación del factor eIF-2	30
8. Antecedentes, objetivos y plan de trabajo	33
MATERIALES Y METODOS	37
9. Obtención de materiales biológicos	39
10. Fraccionamiento subcelular	39
11. Ensayo de actividad eIF-2	40
12. Ensayo de actividad proteína quinasa	41

13. Fosforilación de proteínas in vitro	42
14. Electroforésis en gel de poliacrilamida	43
15. Autorradiografía y Fluorografía	45
16. Purificación del factor eIF-2	46
17. Purificación de Caseína Quinasa II	49
18. Purificación de Proteína Quinasa C	53
19. Purificación de Proteína Quinasa dependiente de AMP cíclico	56
20. Ensayo EEA y purificación de Proteína Quinasa I (PKI)	58
21. Digestión con tripsina y separación de fosfopéptidos	64
22. Análisis de fosfoaminoácidos	65
23. Transferencia e Inmunoprecipitación	66
24. Sistema de síntesis de proteínas in vitro de cerebro	66
25. Purificación de un inhibidor activado por N-etilma leimida	73
26. Otros materiales y metodología general	74
 RESULTADOS	 79
27. Obtención del factor de iniciación eIF-2	81
28. Purificación y caracterización de Caseína Quinasa II	81
Purificación	81
Estructura	86
Especificidad de donador de grupos fosfato	89
Propiedades cinéticas	89
Especificidad de sustratos y moduladores	90
Efecto de cationes, heparina y espermina	92
29. Purificación de las Proteínas Quinasas C y depen diente de AMP cíclico	94
30. Fosforilación del factor eIF-2 en la subunidad β por Caseína Quinasa II y las Proteínas Quinasas C y depen diente de AMP cíclico	95
31. Caracterización de la fosforilación de la subunidad β del factor eIF-2	95
32. Fosforilación del factor eIF-2 por HCl	101

33. Actividad quinasa que fosforila la subunidad α del factor eIF-2: actividad proteína quinasa I	102
34. Purificación de Proteína Quinasa I (PKI)	102
35. Fosforilación del factor eIF-2 en la subunidad α por Proteína Quinasa I	111
36. Caracterización de Proteína Quinasa I	111
Determinación de fosfoaminoácidos	111
Estructura y polimorfismo	112
Autofosforilación y efecto de magnesio	117
Propiedades cinéticas	117
Especificidad de sustratos endógenos y exógenos	122
Moduladores y dependencia de calcio y calmodulina	125
37. Proteína Quinasa I en la síntesis de proteínas y en la actividad del factor eIF-2	128
Efecto de PKI sobre la síntesis de proteínas	128
Actividad del factor eIF-2 y fosforilación por PKI	132
38. Inhibición de la síntesis de proteínas por un inhibidor activado por N-etilmaleimida (NAI)	134
 DISCUSION	 137
 39. El factor eIF-2 de cerebro	 139
40. Caracterización de Caseína Quinasa II	139
41. Fosforilación de la subunidad β del factor eIF-2 por tres proteínas quinasas	142
42. La fosforilación por HCl del factor eIF-2	144
43. Fosforilación en la subunidad α del factor eIF-2 por Proteína Quinasa I	144
44. Caracterización de Proteína Quinasa I como quinasa dependiente de calcio y calmodulina	146
45. Efecto sobre la síntesis de proteínas de Proteína Quinasa I	150
46. Fosforilación de diferentes factores eIF-2 por Proteína Quinasa I	152

47. Efecto en la síntesis de proteínas de un inhibidor activado por N-etilmaleimida	154
48. La regulación de la síntesis de proteínas en cerebro por fosforilación. Discusión general	155
CONCLUSIONES	159
49. Conclusiones	161
BIBLIOGRAFIA	163
50. Bibliografía	165

- ABREVIATURAS -

<u>a</u>	subunidad a de la proteína quinasa I
antiCaM	anticuerpos policlonales anticalmodulina
ATA	ácido aurintricarboxílico
<u>b</u>	subunidad b de la proteína quinasa I
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
CaM	calmodulina
cAMP	AMP cíclico
cGMP	GMP cíclico
cIF	fracción de factores de iniciación
CK II	caseína quinasa II
DAI	proteína quinasa activada por dsRNA
DG	diacilglicerol
dsI	idem DAI
dsRNA	RNA de doble cadena
DTT	ditiotreitól
EEA	ensayo de actividad proteína quinasa I
eEF	factor de elongación eucariótico
eIF	factor de iniciación eucariótico
eIF-2	factor de iniciación 2 eucariótico
eIF-2(P)	factor eIF-2 fosforilado
eIF-2 α	subunidad α del factor eIF-2
eIF-2 β	subunidad β del factor eIF-2
GEF	factor intercambiador de GDP/GTP, eIF-2B
HCI	proteína quinasa controlada por hemina
HCR	idem HCI
HEPES	ácido piperazin-N-N'bis(2-etanol)-sulfónico
Met-tRNA _i	metionil-tRNA de iniciación
NAI	inhibidor activado por N-etilmaleimida
NBT	azul de nitrotetrazolio
NEM	N-etilmaleimida
OPA	o-ftalaldehido
P	fosfato

p:p	relación peso:peso
p:v	relación peso:volumen
PAGE	electroforésis en gel de poliacrilamida
PK	proteína quinasa
PKA	proteína quinasa dependiente de AMP cíclico
PKC	proteína quinasa C
PKCaM	proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y CaM
PKI	proteína quinasa I
PKR	idem DAI
PL	fosfolípidos
PMS	sobrenadante posmitocondrial
PMSF	fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
PP	proteína fosfatasa
PS	fosfatidilserina
R	fracción microsomal lavada con 0,5 M de KCl
RNP	ribonucleoproteína
S-100	sobrenadante posmicrosomal
τ	gamma
TBS	tampón tris-salino
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N-N-N'-N'-tetrametilen-diamina
TFA	ácido trifluoroacético
TFP	trifluoperazina
TPCK	N-tosil-fenilalanil-clorometil cetona
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
U	unidades de absorción (A), o arbitrarias
v:v	relación volumen:volumen

INTRODUCCION

1. LA SINTESIS DE PROTEINAS EN CELULAS EUCARIOTICAS

La traducción o síntesis de proteínas consiste en la lectura de los codones del mRNA y en la construcción de cadenas polipeptídicas. Es un proceso que tiene lugar en el citosol celular, en el que se consume gran cantidad de energía de la célula y que está integrado con el resto de las rutas metabólicas. La traducción tiene lugar en tres etapas diferentes, en cada una de las cuales intervienen diferentes factores o moléculas que catalizan las reacciones específicas de los otros componentes que participan en este proceso. Las tres etapas son: iniciación, elongación y terminación.

a) Iniciación

La iniciación comienza con la lectura del codón de iniciación AUG, que codifica una metionina al principio del cistron. Este codón de iniciación sólo es reconocido por el anticodón de un aminoacil-tRNA, el Met-tRNA_i, que junto con GTP, ATP, varios factores de iniciación, mRNA y las subunidades ribosomales, forman el complejo de iniciación 80S (Figura I.). Esta etapa de iniciación de cadenas peptídicas se puede dividir en tres fases principales (1-4):

I. La subunidad ribosomal 40S junto con los factores de iniciación eIF-3, eIF-4C y eIF-2, este último como complejo ternario con el tRNA iniciador (Met-tRNA_i) y GTP, forma el complejo preiniciador 43S.

II. La asociación de este complejo con la partícula mRNP, incluyendo otra serie de factores de iniciación, como eIF-4A, -4B, -4E y -4F, la hidrólisis de ATP y el movimiento de la subunidad iniciadora ribosomal 40S al codón iniciador AUG del mRNA, con la posible salida de estos factores, forma el complejo preiniciador 48S.

III. La unión de la subunidad ribosomal 60S al complejo preiniciador 48S, que incluye el factor de iniciación eIF-5, la hidrólisis de GTP y la liberación de los factores de iniciación ligados anteriormente (eIF-3, -4C y eIF-2 con GDP), forma el complejo de iniciación 80S.

Los factores de iniciación son un grupo heterogéneo de proteínas compuestas de una o más (hasta 11) subunidades que son necesarias en las diferentes etapas de la iniciación, con un peso molecular en un rango desde 17 kDa (eIF-4C) a 700 kDa (eIF-3). Estos factores han sido revisados extensamente por algunos autores como Pain (1986) (2) y Rhoads (1988) (3).

b) Elongación y Terminación

En la etapa de elongación se produce la traducción de los codones del mRNA entre el triplete de iniciación y el de terminación. Esto se produce por una serie de reacciones en el complejo ribosomal 80S que se repiten para cada codón según son traducidos secuencialmente. De este modo, la cadena polipeptídica se va extendiendo desde su extremo N-terminal al C-terminal. En esta fase hay hidrólisis de GTP e intervienen todos los aminoacil-tRNAs y los factores de elongación eEF-1 y eEF-2 (1,5). El aminoacil-tRNA correspondiente al codón disponible ingresa en el sitio aceptor del ribosoma, y se liga a este sitio en una reacción catalizada por GTP y por el factor de elongación eEF-1. Una vez ocupado el sitio aceptor, se produce la formación del enlace peptídico entre el Met-tRNA_i, que se encuentra en el denominado sitio donador del ribosoma, y el nuevo aminoacil-tRNA del sitio aceptor, liberándose el tRNA deacilado del sitio donador y formándose un dipéptido ligado a tRNA en el lugar aceptor. A continuación, por acción de GTP y el factor de traslocación eEF-2, el ribosoma se mueve un triplete sobre el mRNA trasladándose el dipeptidil-tRNA al sitio donador, quedando el sitio aceptor libre y situado sobre el siguiente codón para la entrada del nuevo aminoacil-tRNA correspondiente.

El proceso de elongación se repite tantas veces como codones tiene el mRNA, y de esta manera se va formando la cadena peptídica. Este proceso tiene lugar hasta que el ribosoma llega a alguno de los codones de terminación UAA, UAG o UGA, para los cuales no hay ningún tRNA con su anticodón complementario (1). Entonces el sitio aceptor vacío es ocupado por el factor de terminación RF, el cual en presencia de GTP y mediante su hidrólisis, cataliza la reacción de terminación con la hidrólisis del enlace éster del peptidil-tRNA, liberándose de la cadena polipeptídica el tRNA deacilado y el ribosoma del mRNA.

2. EL FACTOR DE INICIACION eIF-2

El factor de iniciación eIF-2 es un requisito absoluto para la iniciación de la síntesis de proteínas en cada ciclo de la traducción (Figura I.) (4). El factor ha sido aislado y caracterizado en varias células eucarióticas, tales como reticulocitos, Artemia, germen de trigo, hígado, cultivos celulares, levadura, cerebro, Drosophila, Strongylocentrotus, etc. (1,6-8). El factor eIF-2 está compuesto de tres subunidades diferentes, denominadas α , β y τ ; con un peso molecular en su forma nativa de unos 145.000 y con masas moleculares relativas determinadas por electroforesis con SDS de 35.000 a 38.000 para α , de 48.000 a 52.000 para τ , y de 52.000 a 56.000 para β , si bien ésta subunidad tiene comportamientos anómalos (1, y referencias citadas anteriormente).

Su actividad está definida por la formación de complejos ternarios eIF-2·GTP·Met-tRNA_i y su posterior unión a la subunidad ribosomal 40S. Tanto la formación de complejos ternarios, como la aparición de complejos de preiniciación 43S, se han utilizado para la medida de la actividad eIF-2 tanto in vivo como in vitro (2). Se cree que el GTP interacciona con las subunidades β y τ , de este modo el eIF-2 es capaz de asociarse con el Met-tRNA_i (9,10). El último paso de la iniciación (formación del complejo

80S) precisa de la hidrólisis del complejo ternario ligado con GTP y ello produce la salida del eIF-2 probablemente como complejo eIF-2·GDP (2,11).

La afinidad del eIF-2 por GDP, en presencia de Mg^{2+} a las concentraciones existentes en la célula (1 mM), es de unas 100 a 400 veces mayor que para el GTP (2,11), de esta forma en cada ciclo de iniciación se produce un complejo eIF-2·GDP, incapaz de unir más GTP y Met-tRNA_i (2,4,11). Para comprender el mecanismo por el cual el eIF-2 es reactivado fué necesario el aislamiento y purificación de una actividad capaz de reciclar el eIF-2 por desplazamiento del GDP por GTP (2,12). Este factor intercambiador de nucleótidos de guanina o GEF, ha sido llamado también Co-eIF-2, eIF-2B o RF (Figura I.), y se han propuesto muchos mecanismos para explicar su acción e interacción con el eIF-2 (13-19).

El factor eIF-2 presenta una gran heterogeneidad en su distribución celular, ya que además de libre, unido al complejo ternario y a la subunidad 40S, y ligado al GEF; el eIF-2 ha sido encontrado asociado a la subunidad ribosomal 60S y a los ribosomas 80S, así como también se ha descrito su alta afinidad por mRNA y por el citoesqueleto (2,4).

Debido a su importante papel en la síntesis de proteínas, el factor eIF-2 se ha conservado a lo largo de la evolución (20). Además, por estar constituido por tres subunidades α , β y τ , ligar GTP y poseer un factor que cataliza el intercambio de los nucleótidos de guanina (el referido GEF), se le ha incluido, por algunos autores, dentro de las proteínas G (12,21,22), proteínas de gran importancia reguladora de la función celular (23,24).

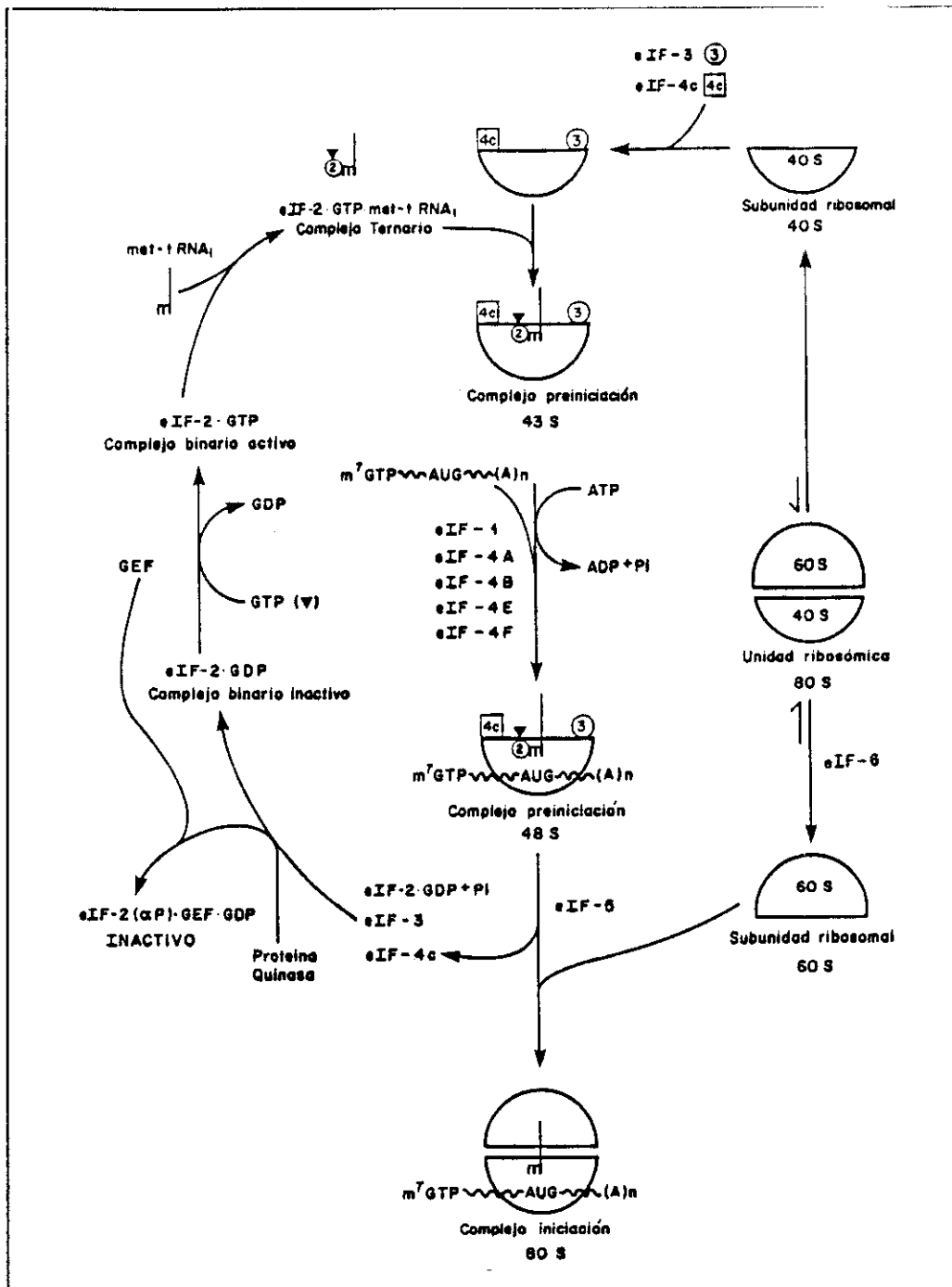


Figura I. Esquema de la etapa de iniciación de síntesis de proteínas en células eucarióticas y mecanismo del factor de iniciación $eIF-2$. eIF , factor de iniciación eucariótico; GEF, factor intercambiador de nucleótidos o $eIF-2B$. Tomado de referencias 2 y 43.

3. REGULACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS

La expresión génica se regula, tanto en procariotas como en eucariotas, a nivel de la transcripción. En los últimos veinte años se han acumulado resultados que indican un control de la expresión génica a nivel de la traducción (12,25,26). En las células eucarióticas, donde las poblaciones de mRNA se producen por mecanismos de procesamiento, transporte nucleocitoplásmico e incorporación a las llamadas ribonucleoproteínas mensajeras o mRNP, cambios medioambientales inducen frecuentemente modificaciones en los niveles de biosíntesis de proteínas y alteraciones en los niveles de transcripción (4). En respuesta a diferentes estados fisiológicos de la célula (cambios de energía, nutricionales, hormonales, fertilización, diferenciación celular o infección viral), así como en situaciones de estrés celular (calor, choque hipertónico, envenenamiento celular) (4,12,27,28), se ha descrito un control de la traducción, que puede ser de naturaleza cualitativa (afectando la traducción específica de determinados mensajeros) o bien cuantitativa con modificación de los niveles de traducción.

El control de la traducción, en la mayoría de los casos, se realiza en la iniciación de las cadenas peptídicas, en alguno de los elementos que intervienen en la compleja secuencia de sucesos que hemos descrito brevemente en el Capítulo 1, y que incluye junto al tRNA iniciador y a las subunidades ribosomales, unos diez factores de iniciación, ciertas señales importantes para la traducción del mRNA, como la estructura de la región 5'cap (una secuencia inicial no traducible y que se encuentra entorno a la región del codón iniciador AUG), y un número desconocido de proteínas asociadas a mRNA (2,4,12,25,28). A continuación analizaremos los mecanismos de control de la iniciación de la traducción, prestando especial atención a la fosforilación del factor eucariótico de iniciación 2 o eIF-2, por ser éste el tema central del presente trabajo.

FOSFORILACION DEL FACTOR eIF-2

Uno de los sistemas eucarióticos más eficientes de síntesis de proteínas in vitro es el lisado de reticulocitos de conejo, su estudio en los últimos veinte años, nos ha permitido conocer el proceso de la iniciación así como sus mecanismos de control (1,2,4,12,25). La síntesis de las cadenas de globina α y β representan más del 90% de la síntesis de proteínas en el lisado de reticulocitos, y es dependiente de hemina, el grupo prostético de la hemoglobina. En ausencia de hemina, los niveles de síntesis de proteínas caen por debajo del 10% del valor normal al cabo de 5 ó 10 minutos, debido al bloqueo de la iniciación de cadenas peptídicas, lo cual se acompaña de un incremento de la fosforilación de la subunidad α del eIF-2 (29,30). Dos residuos de serina en la subunidad α (en las posiciones 48 y 51) son los candidatos a ser el lugar de fosforilación, si bien recientemente se ha señalado que es la serina 51 la que se fosforila bajo condiciones de inhibición de la traducción (31-33).

Actualmente se conocen dos proteínas quinasas que fosforilan la subunidad α del factor eIF-2 (eIF-2 α) y dicha fosforilación se acompaña de la inhibición de la síntesis de proteínas; se las ha denominado genéricamente eIF-2 α quinasas. Ambas han sido purificadas en reticulocitos y es en este sistema donde la fosforilación de eIF-2 α produce la inhibición de la iniciación. Una es la proteína quinasa o inhibidor controlado por hemina (HCI), y la otra es la proteína quinasa o inhibidor activado por RNA de doble cadena (DAI) (25,26,34,35). HCI se inhibe por hemina y sólo se ha descrito en reticulocitos; DAI se activa con bajas concentraciones de RNA de doble cadena más ATP, se ha encontrado en algún otro tipo celular como en células HeLa y fosforila además proteínas histonas (4,25). En el Capítulo 5 se describen más detalladamente las características de estas dos proteínas. También se ha publicado la existencia de otra proteína quinasa que fosforila eIF-2 α en corteza adrenal llamada PK 380; se inhibe por poliaminas, pero no se ha descrito que disminuya la

iniciación de síntesis de proteínas (36).

El eIF-2 fosforilado en su subunidad α o eIF-2 α (P), no es inactivo como tal, pero impide que el factor pueda ser reciclado por el GEF después de ser liberado el complejo eIF-2 α ·GDP. El eIF-2 α (P)·GDP forma un complejo estable con el GEF, el cual es así secuestrado y no puede reciclar el eIF-2 restante no fosforilado presente en la célula (2,18,25). Asumiendo que en lisados de reticulocitos la relación entre el eIF-2 y el GEF es alta (2,25,37), se estaría de acuerdo con el hecho de que la fosforilación de sólo una fracción del eIF-2 α es suficiente para inhibir sustancialmente la traducción. Por ello, es importante comprobar cuál es la proporción eIF-2/GEF en otros tejidos o tipos celulares (2,4). Sobre este modelo, algunos autores (38) han indicado la participación adicional de una proteína denominada 67 kDa, la cual protegería a eIF-2 α de ser fosforilada.

Por otra parte, la subunidad β del eIF-2 puede ser fosforilada por varias proteínas quinasas, tales como la caseína quinasa II, quinasa II activada por proteasas y proteína quinasa C (39-42), pero sin que ello produzca aparentemente ningún efecto sobre la actividad del factor eIF-2 o sobre la síntesis de proteínas.

La fosforilación de eIF-2 en la subunidad α y β está contrarrestada por su defosforilación y el resultado es el estado de fosforilación, el cual sólo se modifica cuando se activa la respectiva quinasa. En lisados de reticulocitos de conejo, se han encontrado proteínas fosfatasas con especificidad para eIF-2 α (P) y eIF-2 β (P) (44,45), las cuales han sido purificadas y clasificadas como proteínas fosfatasas de tipo 1 y de tipo 2A (46,47), según la clasificación de estas proteínas por Cohen (48,49) (Capítulo 6). Hasta donde se conoce en la actualidad, las fosfatasas no están implicadas en ningún mecanismo de control, pero la accesibilidad del eIF-2 para su defosforilación se encuentra

afectada por su asociación con otras moléculas, como por ejemplo Met-tRNA_i o GEF (45). Por último, en el lisado de reticulocitos de conejo, la subunidad de 90 kDa de HCI se defosforila lentamente (25), mientras que DAI y eIF-2 α (P) son defosforiladas rápidamente, con una recuperación paralela de la traducción (50,51).

OTROS MECANISMOS DE REGULACION

La fosforilación del factor de iniciación eIF-2 se considera el principal punto de control de la traducción en células de mamíferos (2,4,12,25). Sin embargo, como puede observarse en la descripción de las fases de la iniciación y ha sido descrito en la bibliografía, otros puntos pueden ser susceptibles de controlar dicha traducción. A continuación indicamos algunos de ellos:

I. La actividad de las proteínas asociadas al mRNA. Las cuales podrían estar reguladas por fosforilación al ser fosforiladas por caseína quinasa II (ver más adelante), o diferir al menos entre el traduccionalmente activo mRNP polisomal y el traduccionalmente reprimido mRNP, libre en el citoplasma (52-54).

II. Variaciones estructurales de la región no codificadora 5' del mRNA, lo que influirá en la accesibilidad del codón de iniciación AUG (55).

III. La actividad de los factores de iniciación incluidos en el reconocimiento de la región 5'cap del mRNA eucariótico. Fundamentalmente de la subunidad de 25 kDa (eIF-4E) del factor eIF-4F, el cual parece estar regulado por fosforilación (3,28,56).

IV. La proteína ribosomal S6. Proteína de 31 kDa de la subunidad ribosomal 40S localizada en el dominio que contacta con el mRNA. Es una proteína que parece estar regulada por fosfo/-defosforilación y se la ha relacionado con el efecto de la

insulina y del factor de crecimiento epidérmico sobre el crecimiento celular y la estimulación de la síntesis de proteínas (26,57).

V. Otros factores de iniciación como el propio GEF o el eIF-3. El GEF, además de ser importantes sus niveles (ver anteriormente), se fosforila por caseína quinasa II al igual que el eIF-3, incrementándose su actividad (58,59).

VI. Las aminoacil-tRNA sintetetasas, enzimas encargadas de efectuar la carga de los aminoácidos sobre sus respectivos tRNAs, algunas de las cuales son fosfoproteínas, si bien no está clara su importancia sobre la síntesis de proteínas (26,60).

VII. Los factores de elongación eEF-1 y eEF-2, que también son susceptibles de fosforilación. Fundamentalmente tiene interés la fosforilación del eEF-2 por una proteína quinasa específica dependiente de Ca^{2+} y calmodulina, lo cual provoca la inhibición de la actividad de este factor (61-63).

Por último, no está establecido si todos estos mecanismos de control afectan al nivel total de la síntesis de proteínas, o si alguno de ellos ejerce un control específico de la traducción del mRNA (4,28).

4. INTRODUCCION A LA FOSFORILACION DE PROTEINAS Y PROTEINAS QUINASAS

FOSFORILACION DE PROTEINAS

La fosforilación de proteínas por proteínas quinasas es la base de un complejo mecanismo por el que señales extracelulares, tales como hormonas o neurotransmisores, a través de segundos mensajeros, producen una respuesta fisiológica celular coordinada (64,64a).

Las señales extracelulares se denominan primeros mensajeros, e incluyen hormonas, neurotransmisores e impulsos nerviosos, estos últimos en células excitables. Los primeros mensajeros interaccionan con receptores ligados a la membrana plasmática celular y alteran la concentración de unas pequeñas moléculas intracelulares: los segundos mensajeros. Estos segundos mensajeros activan o inhiben proteínas quinasas, que fosforilan restos de serina, treonina, y tirosina de numerosas proteínas. La fosforilación induce cambios conformacionales en las proteínas, que modifican sus propiedades biológicas y su función. Dicha modificación de proteínas producirá, bien directa o indirectamente, la respuesta fisiológica celular (Figura II.) (65,66).

Para que la fosforilación de proteínas sea un mecanismo de regulación completo debe ser reversible, y lo es gracias a la existencia de proteínas fosfatasas, que también poseen su propia regulación (Capítulo 6). La fosfo/defosforilación de proteínas, que también pueden ser enzimas, producida por proteínas quinasas y fosfatasas se considera el mecanismo de regulación celular más importante (48,67). Esta regulación se caracteriza por ser específica, de gran sensibilidad y flexibilidad, e inducir amplificación de la señal extracelular.

Entre los procesos biológicos en cuya regulación interviene la fosforilación de proteínas por proteínas quinasas, podemos citar: metabolismo del glucógeno y colesterol, transformación de señales extracelulares (factores de crecimiento e insulina, por ejemplo), organización del citoesqueleto, proceso y factores de transcripción, neurotransmisión y otros mecanismos neuronales, contracción muscular, procesos de visión, ciclo celular e infección viral, y traducción o síntesis de proteínas por fosforilación de factores de iniciación y proteínas ribosomales (26,68-72). Los efectos de la fosforilación de proteínas incluyen procesos biológicos a corto plazo, por fosforilación de proteínas preexistentes y que afectará a los procesos que determinan la función celular, y a largo plazo por la inducción de la síntesis

de nuevas proteínas mediante la regulación de fosfoproteínas que intervienen en el control de la expresión génica (73).

Los sistemas de fosforilación de proteínas son mucho más activos en tejido nervioso que en otros tejidos. El aumento de fosforilación en tejido nervioso se debe a un mayor número de distintas quinasas y a un mayor número de diferentes proteínas fosforilables (74). Así, la fosforilación de proteínas está implicada también en la regulación de diversos procesos, tales como síntesis de neurotransmisores, transporte axoplásmico, liberación de neurotransmisores, generación de potenciales postsinápticos, conductancia de canales iónicos, formación y movilidad neuronal, elaboración de procesos dendríticos y axonales, desarrollo y diferenciación de distintos tipos de neuronas, etc. (69,75,76).

PROTEINAS QUINASAS

Las proteínas quinasas son enzimas que catalizan la transferencia del grupo fosfato en posición γ del ATP a una proteína aceptora. Son fosforil-fosfotransferasas (ATP: proteína fosfotransferasas, EC 2.7.1.37) (77), y el resultado de esta reacción es una proteína fosforilada o fosfoproteína y ADP (78). La unión del grupo fosfato a la proteína o enzima, induce un cambio estructural en la misma que altera sus propiedades y características (79,80).

La fosforilación covalente de la proteína se realiza fundamentalmente sobre los grupos hidroxilo de serinas, treoninas o tirosinas en menor medida. En función del aminoácido fosforilado, las proteínas quinasas se han clasificado en serina/treonina quinasas o en tirosinas quinasas (81,82). A su vez las primeras se han subdividido en función de su activador, según sea: un segundo mensajero y el tipo de éste, un estímulo intracelular, o si es desconocido (72). Las tirosinas quinasas son activadas por

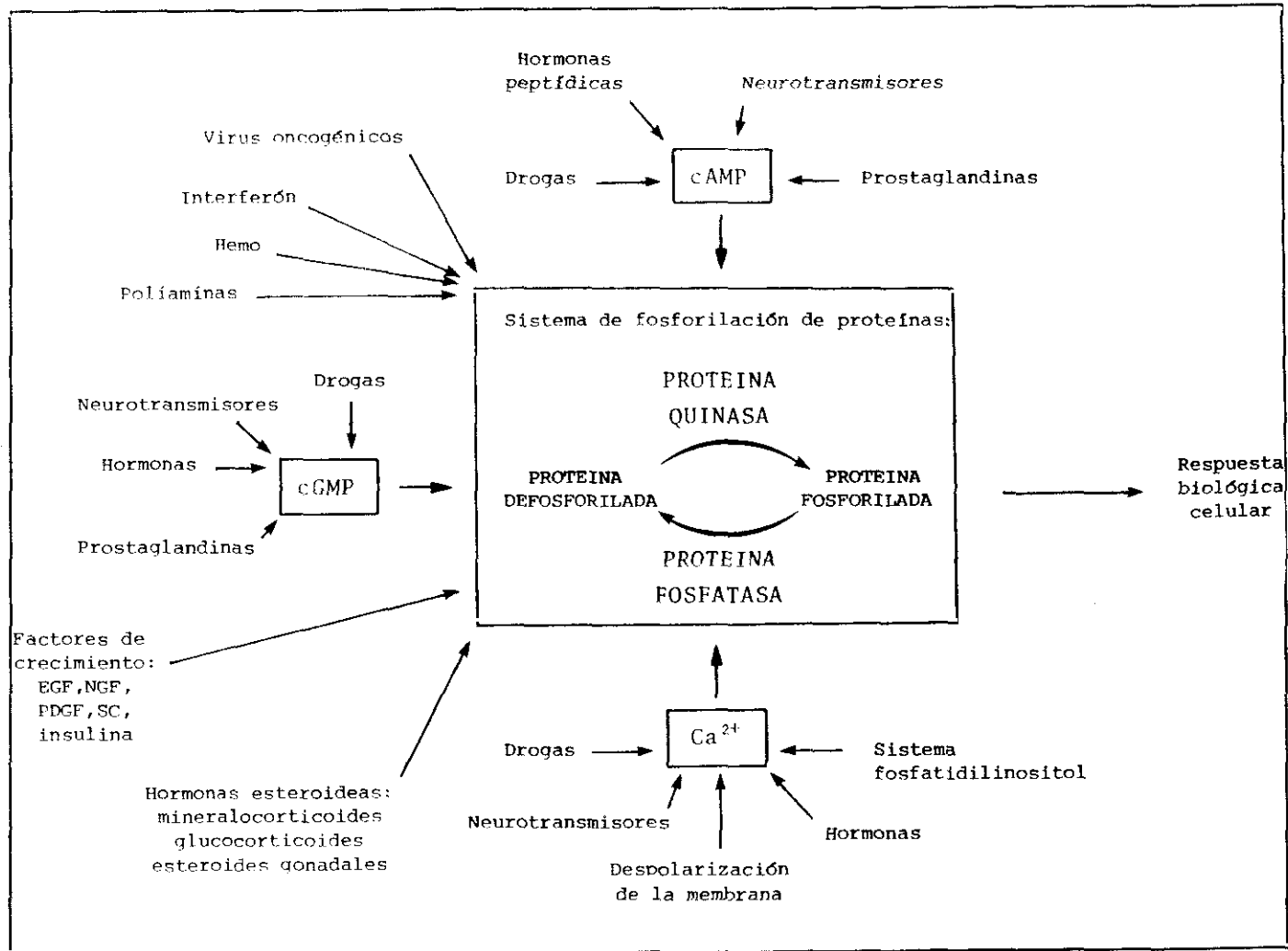


Figura II. Esquema de la fosforilación de proteínas como sistema mediador de la respuesta biológica celular producida por diversos agentes reguladores. cAMP, AMP cíclico; cGMP, GMP cíclico. Tomado de referencias 64 y 64a.

primeros mensajeros o han sido reconocidas como productos de oncogenes, dato este último de gran importancia para el futuro del estudio de las proteínas quinasas (83,84).

La primera proteína quinasa se purificó en 1959 (85). Desde entonces no se han dejado de descubrir nuevas proteínas quinasas y ha sido sobre todo a partir de 1980 cuando se ha producido una auténtica explosión en la identificación y reconocimiento de numerosas proteínas quinasas, a las que algún autor se ha referido como las 1001 quinasas (86). A ello han contribuido las técnicas de secuenciación y clonación, que han posibilitado demostrar la existencia de una similitud de secuencia en su dominio catalítico, por lo que derivarían de un ancestro común. Con ello se han podido establecer familias de proteínas quinasas (87-89).

Una de las causas de la relativa abundancia de proteínas quinasas reside en sus cualidades como elemento regulador. Las proteínas quinasas reciben una señal intracelular y la pueden amplificar fosforilando diversos sustratos, a la vez que están sometidas a una propia regulación. Por esta razón, se las ha comparado con los transistores de la electrónica analógica (86). Como ellos, reciben dos "entradas", la señal intracelular y su regulación, dando o no una única "salida" amplificada. Además, las proteínas quinasas pueden ir conectadas en "serie" o en "paralelo". Mas aún, algunas de ellas pueden compararse a circuitos integrados o chips de la electrónica digital (86), debido a que poseen varias vías de "entrada" o señales intracelulares y múltiples "salidas" o sustratos.

La regulación de las proteínas quinasas es muy variada. Hay enzimas de naturaleza homo o hetero-oligomérica constituidas por varias subunidades, siendo algunas de ellas las subunidades catalíticas y otras las reguladoras, presentando fenómenos de cooperatividad y de gran sensibilidad de respuesta a los mecanismos de regulación; otras quinasas en cambio son mono-

méricas, conteniendo dominios catalítico y regulador (89,90). Muchas proteínas se activan por ligandos que se unen a sus dominios reguladores, otras en cambio lo son por segundos mensajeros, y también pueden regularse positiva o negativamente por su propia fosforilación, o por fosforilación de otra proteína quinasa (66,72). Por último, se han descrito algunos inhibidores endógenos de quinasas, tales como seudosustratos y regiones intrínsecas de la secuencia primaria de quinasas, que podrían servir de inhibidores constitutivos de la actividad de la propia enzima (91,92).

En el capítulo siguiente se describen brevemente las principales proteínas quinasas que fosforilan el factor eIF-2 en otros tejidos diferentes de cerebro, así como aquellas quinasas relacionadas con el proceso de la traducción, comentando su localización, estructura, principales sustratos y regulación.

5. PROTEINAS QUINASAS RELACIONADAS CON EL FACTOR eIF-2 Y LA TRADUCCION

PROTEINA QUINASA CONTROLADA POR HEMINA

Denominada también inhibidor controlado por hemina (HCI) o represor controlado por hemina (HCR), sólo se ha encontrado en reticulocitos y fosforila específicamente la subunidad α del factor eIF-2, lo que en dicho sistema produce la inhibición de la síntesis de proteínas (4,25). La enzima purificada es de 95.000 Da, bajo condiciones no desnaturizantes da un peso de 140.000 a 160.000 y por filtración en gel valores de 300 a 350 kDa. Utiliza mejor ATP que GTP como donador de grupos fosfato y posee un único sustrato, que es la subunidad α del factor eIF-2, con una K_m de 0,5 μ M, aunque recientemente se ha descrito que también fosforila proteínas histonas (33,34,82). La subunidad de 95 kDa de la HCI se autofosforila, pero ni su activación, ni su actividad eIF-2 α quinasa, dependen de esta autofosforilación (4,82).

El mecanismo preciso de regulación de esta quinasa no está aún aclarado. La enzima en su activación pasa de un estado precursor ProHCl a otro activo o HCl, pero se desconoce la relación entre ambos sucesos. Sí se conoce, por el contrario, la inhibición por hemina de la activación de HCl y su actividad fosforiladora de eIF-2 α ; la hemina a una concentración de 5 μ M reduce la actividad de HCl a la mitad. La N-etil-maleimida activa irreversiblemente la enzima y el glutatión oxidado (GSSG) lo hace de manera reversible (93,94). Estos resultados sugieren que la forma inactiva de HCl posee ciertos grupos SH reducidos, mientras que la activa sería una configuración oxidada, siendo así sensible al deterioro del equilibrio de óxido-reducción. En lisados suplementados con hemina, la forma de HCl irreversible se induce por pH alcalino, por un incremento de la presión hidrostática o por elevación de la temperatura ("choque térmico") (25,95,96). La supresión de azúcares y fosfoazúcares en lisados de reticulocitos de conejo da lugar a la inhibición de síntesis de proteínas por activación de HCl, que puede ser revertida por la adición de NADPH, fosfoazúcares u otros sustratos ligantes de NADP⁺ (25,93). Por último, la interacción de la enzima con otras proteínas, tales como la espectrina, se considera de importancia en el control de HCl (97).

PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE RNA DE DOBLE CADENA

Se la ha llamado inhibidor activado por RNA de doble cadena o DAI (o también dsI). Esta enzima se localizó en reticulocitos, donde fosforila la subunidad α del factor de iniciación eIF-2 en el mismo sitio que la proteína quinasa HCl, produciendo la inhibición de la síntesis de proteínas (4,25). Posteriormente ha sido encontrada en células no eritrocitarias (98-100).

Su localización es principalmente de fracción microsomal. Además de la subunidad α del eIF-2, puede fosforilar proteínas histonas H2 de mamíferos (33,82). La proteína quinasa dependiente

de RNA de doble cadena (DAI o PKR) es monomérica, con un peso molecular de 68.000 a 72.000. Esta quinasa aparece como un precursor inactivo, el cual es activado por bajas concentraciones de RNA de doble cadena (dsRNA) en presencia de ATP (35,82). El proceso de activación se acompaña de su autofosforilación, que constituye un requisito previo y necesario para su activación (4,25).

Se induce por tratamiento con interferón α , β y τ (agente antiviral que disminuye la proliferación viral), aumentando su actividad unas diez veces, lo cual indica que DAI debe estar asociada con el estado antiviral inducido por el interferón (72,99). Esta hipótesis ha recibido apoyo por los datos obtenidos de las células HeLa infectadas con un mutante del adenovirus VA_I-RNA. En infecciones avanzadas, estas células producen un corte total de la síntesis de proteínas celulares y virales, a la vez que se produce la fosforilación del eIF-2 α ; se piensa que probablemente DAI es activada por los mRNAs de doble cadena producidos por la transcripción simétrica de ambas cadenas del DNA viral (72,99).

PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE AMP CICLICO

La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) es la mejor conocida. Se activa específicamente por concentraciones bajas de AMP cíclico, actuando como mediador de casi todos sus efectos fisiológicos conocidos.

Tiene una amplia distribución en los seres vivos, desde animales hasta hongos, incluyendo plantas y procariotas. En los tejidos animales se encuentran altos niveles de PKA, la mitad en fracción citosólica y la otra mitad en fracción de membrana (82). Su estructura es tetramérica, con dos subunidades reguladoras R y dos subunidades catalíticas C. Hay dos tipos de PKA denominadas tipo I y II. Ambas contienen idénticas subunidades catalíticas

pero diferentes subunidades reguladoras, nombradas como R_I y R_{II} y pertenecientes a los tipos I y II respectivamente. La subunidad C pesa 42.000 Da, R_I unos 45.000 Da y R_{II} alrededor de 40.000 Da. Esto da un peso total de la holoenzima R_2C_2 de 150 kDa y de 170 kDa. Asimismo, se ha encontrado una heterogeneidad en la misma subunidad R-II (82). De los dos tipos de PKA, la tipo II parece ser predominante en tejido neuronal (101). En su forma tetramérica la enzima es inactiva. Las dos subunidades reguladoras se encuentran unidas por puentes disulfuro dando un dímero, que se liga a las subunidades catalíticas inhibiéndolas. En presencia de AMP cíclico, éste se une a las subunidades reguladoras, causando la disociación del tetramero, liberando las subunidades catalíticas, las cuales son ya enzimáticamente activas. Se unen cuatro moléculas de AMP cíclico por molécula de PKA y su unión parece ser cooperativa. La fosforilación de R debe estar relacionada con la regulación de PKA, y cambios en la actividad de R deben modificar la actividad de PKA (102).

La enzima solamente fosforila en serinas o treoninas. Entre los sustratos que fosforila se encuentran su propia subunidad R, la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2), sinapsina I (sitio 1), proteína III, DARPP-32, canal de sodio voltage-dependiente, canales de potasio, receptor nicotínico de acetilcolina, receptor β -adrenérgico, tirosina hidroxilasa, neurofilamentos, proteína básica de mielina, guanilato ciclasa, fosfodiesterasa, GABA-modulina, la proteína ribosomal S6 y el factor eIF-4B (59,81,103).

Las hormonas esteroideas (mineralocorticoides, glucocorticoides y esteroides gonadales) alteran el estado de fosforilación de la subunidad R. De igual modo, en cerebro, la corticosterona altera la fosforilación de R en el hipocampo. Todas las hormonas o neurotransmisores que producen un aumento de los niveles de AMP cíclico (por activación de adenilato ciclasa), por ejemplo la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormona luteinizante (LH), noradrenalina, adrenalina, glucagón o acetilcolina, así

como el efecto descrito del AMP cíclico como estimulador de la iniciación de la síntesis de proteínas, actúan a través de PKA (65,104). Alta actividad de PKA se corresponde con alta sensibilidad celular, por ello, las variaciones en los niveles de actividad de PKA serán uno de los mecanismos de regulación de la sensibilidad celular (81).

PROTEINA QUINASA C

La proteína quinasa C (PKC), originalmente denominada proteína quinasa dependiente de calcio y fosfolípidos, se suele relacionar con procesos de proliferación celular. Esta enzima está muy extendida en todo el reino animal, con heterogeneidad en la localización celular y en la función (83), y es muy abundante en algunos tejidos, sobre todo en cerebro, tanto en fracción citosólica como en fracción de membrana (105).

La proteína quinasa C es un monómero de 80.000 a 87.000 Da que posee dos dominios estructurales, un dominio regulador o hidrofóbico que liga calcio, fosfolípidos, diacilglicerol y ésteres de forbol, y un dominio catalítico o hidrofílico que liga ATP y los sustratos proteicos y es independiente de sus activadores. Ambos dominios se han deducido de su secuencia de aminoácidos (106,107). Por proteólisis limitada de la proteína nativa, se aísla el dominio regulador de 30.000 Da y el dominio catalítico de 50.000 Da (108), y tanto el fragmento catalítico de PKC como el fragmento regulador conservan sus propiedades específicas. La presencia de estos fragmentos en la célula puede tener consecuencias biológicas.

Los análisis de los clones de cDNA que codifican para PKCs revelan que ésta es una familia de isoenzimas de gran heterogeneidad molecular estrechamente relacionadas y codificadas por al menos tres genes diferentes (106,107,109). Las isoenzimas poseen unas propiedades físicas similares, así como la misma

regulación por fosfolípidos, calcio, diacilglicerol o ésteres de forbol. Sin embargo, difieren en los lugares de autofosforilación y en la inmunorreactividad frente a anticuerpos monoclonales (110,111). Por todo ello actualmente a la proteína quinasa C se la considera una familia de proteínas quinasas, denominando a las diferentes especies encontradas hasta hoy por α , β , β' , τ y δ (112). También se ha visto una diferente distribución de las isoenzimas de PKC en distintas regiones del cerebro y en diferentes tejidos (111,113). El hecho de su origen genético y su localización específica en ciertas regiones del cerebro y de ciertos tejidos, sugiere para cada isoenzima una específica función celular y una actividad.

PKC es una proteína multifuncional, que al igual que PKA, fosforila gran número de diferentes sustratos, algunos de ellos comunes a PKA y a PKCaM II (ver más adelante). Esta quinasa se considera el mayor sistema de fosforilación de proteínas (114). Fosforila en serinas y treoninas y es autofosforilable. Fosforila tirosina hidroxilasa, GABA-modulina, proteína básica de mielina, MAP-2, la proteína "87 kDa", la proteína B-50, la proteína ribosomal S6, eIF-4E, eIF-4B, eIF-3 y eIF-2 β (26,56,59,81,115).

Su activación requiere la presencia de calcio y fosfolípidos (PL), siendo el más eficaz fosfatidilserina (PS), pero si en el medio hay diacilglicerol (DG) la activación producida es máxima, debido a un aumento de la afinidad de la enzima por calcio (116). También se activa por proteólisis limitada producida por proteasas, siendo entonces independiente de calcio, PL o DG. El aumento en la concentración de calcio intracelular, producido por estimulación celular, activa PKC. En presencia de DG, sólo se precisa una concentración de calcio intracelular de 10^{-7} - 10^{-8} M (concentración existente en una célula excitable en estado de reposo) para activar PKC. Es decir, la activación fisiológica de PKC sólo precisa diacilglicerol y por esta razón se considera a este último el segundo mensajero de PKC (105). Hormonas y neurotransmisores como vasopresina, acetilcolina, serotonina,

etc., activan PKC via activación de una fosfolipasa C, la cual degrada fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, liberando DG que actúa sobre PKC (65).

Otros lípidos diferentes de los diacilglicerolos pueden intervenir en la activación o inhibición de la proteína quinasa C. Por ejemplo, la esfingosina (117) y los lisoesfingolípidos (118) inhiben la actividad de PKC, lo que sugiere que estos metabolitos de membrana funcionan como efectores negativos de los procesos celulares en los que interviene PKC. Como la acumulación de lisoesfingolípidos está relacionada con la esfingolipidosis, se ha sugerido que la inhibición de PKC debe participar en la toxicidad metabólica de estos compuestos y en sus manifestaciones patológicas (119). Ciertos lisofosfolípidos pueden regular de forma bifásica PKC, activan la enzima a bajas concentraciones y la inhiben a altas (119,120). Ello unido a la acción activadora sobre la enzima de ácidos grasos insaturados (oleico y araquidónico), sugiere la existencia de otros sistemas de señales para la activación de PKC, que implican la degradación de fosfolípidos de membrana, probablemente catalizada por fosfolipasa A₂ (83).

La proteína quinasa C se ha relacionado con fenómenos de proliferación celular. PKC fosforila el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el receptor de insulina, ambas estimuladoras del crecimiento celular; los ésteres de forbol, potentes agentes carcinogénicos, activan PKC; y se ha sugerido que productos de oncogenes como src y ros, degradarían fosfatidilinositol con la aparición de DG y la activación de PKC (121). Es pues altamente interesante esta relación de PKC con fenómenos de crecimiento celular normal y aberrante, por lo que esta proteína quinasa ha despertado un gran interés.

QUINASAS DEPENDIENTES DE CALCIO Y CALMODULINA

La calmodulina (CaM) es una proteína de bajo peso molecular, 17.000 Da y está presente en todo el reino animal (122). La calmodulina, al unirse al calcio (cuatro moléculas de Ca^{2+} por molécula de CaM), forma un complejo calcio/CaM que altera a otras proteínas celulares, como por ejemplo proteínas quinasas, activándolas y confiriéndolas una sensibilidad al calcio mediada por la calmodulina (48,123). Se conocen cinco tipos de quinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM, que han sido caracterizadas en sistemas de mamíferos y poseen una especificidad de sustratos muy diferente (123-126). Estas proteínas activadas por el complejo calcio/CaM, el factor limitante es la concentración de calcio libre intracelular. Dos de ellas, llamadas fosforilasa quinasa y quinasa de la cadena ligera de la miosina, están bien caracterizadas y se conocieron antes de saber que estaban reguladas por calcio mediado por calmodulina. Las otras tres enzimas han sido caracterizadas en base a las proteínas que fosforilaban y su función (la de las proteínas) se desconocía. Por esta razón, se las clasificó arbitrariamente como Ca^{2+} /CaM quinasas (PKCaM) de tipos I, II y III. Una de estas enzimas, la de tipo II, parecen ser importante en la transmisión sináptica, y la quinasa dependiente de calcio/CaM III, en la regulación de la síntesis de proteínas.

a) Proteína Quinasa dependiente de calcio y calmodulina II

Esta quinasa (PKCaM II) es muy abundante en cerebro (0.1% de la proteína total celular), se encuentra en axones, dendritas, soma, etc., y en fracción citosólica y de membrana (127). Se ha encontrado en todos los tejidos animales estudiados.

La enzima PKCaM II está formada por dos subunidades denominadas α y β de 50.000 Da y 61.000 Da respectivamente (81). PKCaM II consiste en una familia de isoenzimas que se diferencian en la proporción de subunidades α y β que las constituyen, y que

poseen un peso molecular de 250.000-650.000 en su forma molecular nativa (81,128-130). Así, por ejemplo, en corteza cerebral de rata la enzima se compone de una subunidad mayoritaria con una masa molecular relativa de 50.000 (subunidad α), y una subunidad minoritaria con 58.000-60.000 (subunidades β/β') de masa molecular relativa. Recientemente se ha encontrado que estas subunidades están codificadas por genes distintos, mientras que diferencias entre las subunidades β s se deben a distintas transcripciones del mismo gen (129,131).

La quinasa dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ II fosforila en serinas y treoninas y es autofosforilable. PKCaM II es diferente a la I por sus sustratos, así, fosforila los sitios 2 y 3 de la sinapsina I, proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2), proteína tau, tirosina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa, proteína básica de mielina, glucógeno sintetasa, hidroximetilglutaril-CoA reductasa, cadena ligera de la miosina y la proteína ribosomal S6 (81,132). La sinapsina I es su sustrato mejor conocido y se le asigna un papel regulador de la liberación de neurotransmisores, debido a su asociación con las pequeñas vesículas sinápticas en los terminales de las neuronas. In vitro, la fosforilación de sinapsina en su sitio 2 reduce la afinidad por las vesículas sinápticas y disminuye su capacidad de empaquetar la actina-F (128,133). Estos y otros estudios sugieren que la quinasa $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ II regula la liberación de neurotransmisores a través de la fosforilación de sinapsina I, debido probablemente a la alteración de la asociación de la vesículas sinápticas que contienen los neurotransmisores con el citoesqueleto (83).

La autofosforilación de la quinasa $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ II convierte a la enzima en poco regulable por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (128,129,134-136); este efecto se revierte por una fosfatasa (136). La conversión de la enzima en su forma independiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ está relacionada con la autofosforilación de una treonina por un mecanismo intramolecular. Dicho fenómeno se produce en las dos subunidades α y β , siendo Thr²⁸⁶ en α y Thr²⁸⁷ en β (137,138). Esta posición se

encuentra en una zona adyacente a la región donde se presupone que se liga la CaM en cada subunidad de la enzima, lo cual hace pensar que la autofosforilación altera estructural y funcionalmente a la enzima de forma equivalente a como ocurre con la unión de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (83). Varios estudios indican que el efecto de la formación de la enzima independiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ por autofosforilación, puede tener lugar con la fosforilación de sólo 3-4 subunidades de las 10-12 subunidades posibles, indicando un efecto cooperativo entre las subunidades fosforiladas y no fosforiladas (135,137). Resultados obtenidos de autofosforilación en otras serinas o treoninas (como por ejemplo Ser^{314} de la subunidad α) son controvertidos (139).

La generación de una forma de la enzima independiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, es de gran interés ya que sería un mecanismo por el cual permanecería activa después de que los niveles de calcio hayan retornado a su concentración basal (134-136). En general, a PKCaM II se le atribuye el papel de mediar el efecto del calcio, y en el caso de la enzima de cerebro, se piensa que es activada por la entrada de calcio ocasionada por la despolarización de la membrana, pudiendo jugar un papel de controlador de la plasticidad celular, incluyendo la síntesis de proteínas (83,135,140).

b) Proteína Quinasa dependiente de calcio y calmodulina III

Esta enzima ha sido la última proteína quinasa dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ identificada y no está completamente caracterizada. La enzima nativa posee una masa molecular relativa de 140.000 y parece consistir en una especie mayoritaria fosforilable con una masa molecular relativa de 95.000 y 85.000. PKCaM III parece fosforilar sólo en treoninas y una sola proteína, el factor de elongación 2 (eEF-2) (124,141), proteína que cataliza la traslocación del peptidil-tRNA en el ribosoma. Este factor es fosforilado con una estequiometría de 1 mol:1 mol. La fosforilación de eEF-2 inhibe su actividad in vitro, este efecto se revierte por defosforilación del eEF-2 por una fosfatasa 2A

(Capítulo 6) (124). El mecanismo exacto de la inhibición no se conoce, ya que no parece afectar a su actividad GTPasa, a la unión de GTP o a la unión al ribosoma. En cultivos celulares, la quinasa dependiente de Ca^{2+} /CaM III está regulada por una serie de factores que incluyen factores mitogénicos y de crecimiento, lo que sugiere que ésta proteína regula la síntesis de proteínas in vivo. Así, la estimulación de los fibroblastos con bradiquina causa una elevación transitoria del calcio intracelular, que activa PKCaM III y resulta en una fosforilación de eEF-2 (142).

CASEINAS QUINASAS

Son proteínas quinasas independientes que fosforilan sustratos ácidos como caseína o fosvitina. Se han descrito dos tipos fundamentalmente, caseína quinasa I (CK I) y caseína quinasa II (CK II). Recientemente se ha encontrado un tercero o caseína quinasa III (143,144).

a) Caseína Quinasa I

Es una proteína ampliamente extendida tanto en plantas como animales, se localiza tanto en fracción citosólica, como microsomal, mitocondrial y nuclear. Estructuralmente CK I es un monómero de 37.000 Da y se autofosforila, sin que ello modifique aparentemente su actividad. Utiliza preferentemente ATP y dependiendo del tipo de sustrato se activa por cationes monovalentes (143,145).

Tanto caseína quinasa I como la II son enzimas multipotenciales, con gran número de diferentes sustratos, sin producir, en la mayoría de ellos, cambios en la funcionalidad del mismo. CK I fosforila a la fosforilasa quinasa y polimerasa poliA produciendo su activación, por el contrario, la fosforilación de glucógeno sintetasa y aminoacil-tRNA sintetetas por esta enzima inhibe su actividad (146).

Se conoce muy poco sobre la regulación de esta proteína. CK I fosforila preferentemente en residuos de serina, y lo hace sobre dominios ácidos N-terminales (147). Es relativamente poco sensible a la inhibición por heparina, la cual es un potente inhibidor de CK II (145). Diferentes datos sugieren que el tratamiento con insulina o glucagón produce su activación in vivo (148).

b) Caseína Quinasa II

Está tan extendida como CK I, aunque es preferentemente citosólica. Esta enzima es de estructura tetramérica ($\alpha_2\beta_2$), con dos cadenas α de 42.000 Da y dos cadenas β de 26.000 Da, y a baja fuerza iónica forma agregados de gran peso molecular (149,150). Su subunidad α posee heterogeneidad y contiene el dominio catalítico, presentando homología con el de otras proteínas quinasas (143,151). No se conoce la función de la subunidad β , si bien es necesaria una relación $\alpha:\beta$ de 1:1 para llegar al óptimo de actividad de la enzima; además se autofosforila en dicha subunidad sin que ello parezca afectar a la actividad de la enzima (143). Utiliza tanto ATP como GTP como donador de grupos fosfato y se activa por cationes monovalentes (149).

CK II fosforila muchos de los sustratos de CK I y otros más, entre los que se puede citar RNA polimerasas I y II, espectrina, la subunidad R de PKA, calsecuestrina, etc. (143), y factores de iniciación de proteínas como GEF, eIF-3, eIF-4B, eIF-2 β o eIF-5 (26,58,59,152). Fosforila preferentemente en serinas que se encuentran en regiones ácidas del extremo C-terminal (153,154). Para la regulación de CK II se han propuesto una serie de componentes inhibidores, como heparina ó 2,3-difosfoglicerato, y activadores como poliaminas (145,155).

El interés por caseína quinasa II ha aumentado en los últimos tiempos ya que diferentes resultados la implican en la señal producida por factores de crecimiento y agentes mitogénicos

(156,157). Estos estudios sugieren que tanto CK II como la S6 quinasa (ver a continuación) son dos elementos importantes en el camino que conduce a la iniciación de los procesos de proliferación y crecimiento celular.

S6 QUINASAS

La proteína ribosomal S6 se fosforila por proteína quinasa dependiente de AMP cíclico, proteína quinasa C y por otras quinasas, denominadas S6 quinasas, las cuales han despertado interés debido a su estimulación por factores de crecimiento normal y aberrante (57,156,157). Algunos autores piensan que la S6 quinasa purificada de mamíferos es la misma que la denominada proteína quinasa II activada por proteasas (59,158). Actualmente se conocen tres S6 quinasas denominadas: S6 quinasa propiamente dicha la purificada de mamíferos y de 67 kDa, S6 quinasa II de Xenopus con 92 kDa, y pp70 de células 3T3. Se las considera intermediarias de las señales extracelulares de la proliferación celular y se sugiere que están reguladas por fosforilación a cargo de una S6 quinasa quinasa (157,159,160).

6. PROTEINAS FOSFATASAS

El nivel de fosforilación de una proteína depende de la actividad relativa de proteínas quinasas y fosfatasas, y si bien hoy día se conocen numerosas proteínas quinasas (como hemos señalado y descrito algunas de ellas anteriormente), ocurre lo contrario en el caso de proteínas fosfatasas, donde su conocimiento es mucho más reducido y reciente. Esto último se debe a que se encuentran en niveles muy bajos, pueden ir acompañadas de inhibidores con lo que su actividad es casi nula y deben tener gran especificidad de sustrato (49,161). Por todo ello, los ensayos utilizados en la actualidad casi no registran su actividad.

Se conocen fundamentalmente cuatro tipos de proteínas fosfatasa (PP) de residuos de serina y treonina, denominadas 1, 2A, 2B y 2C. Se distinguen por su actividad sobre fosforilasa quinasa y por el efecto de algunos activadores e inhibidores. La PP1 se inhibe por las proteínas inhibidoras 1 y 2 (I_1 e I_2) y defosforila la subunidad β de la fosforilasa. Las de tipo 2 no defosforilan esta subunidad y las 2B y 2C son dependientes de Ca^{2+} /calmodulina y Mg^{2+} respectivamente (49,162). PP1 y PP2A poseen gran número de sustratos conocidos, y regulan proteínas del metabolismo de lípidos y de glucosa, contractilidad muscular, síntesis de catecolaminas, eIF-2, etc. En cambio PP2B es mucho más específica y posee un reducido número de sustratos y PP2C también tiene numerosos sustratos pero se desconoce su papel fisiológico (162,163).

Analizando la secuencia de los dominios catalíticos de estas PP se ha encontrado una homología de un 50% entre PP1 y PP2A, y de un 40% con PP2B respecto a las dos anteriores. Así, se han establecido dos familias, una compuesta por PP2C y otra por PP1, PP2A y PP2B, en la que recientemente se han encontrado nuevos componentes, fosfatasa que se han denominado PPV, PPX, PPY y PPZ (161). Esto nos da idea de que las proteínas fosfatasa también están relacionadas entre sí y su actividad procede evolutivamente de un ancestro común.

7. ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LA REGULACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS POR FOSFORILACION DEL FACTOR eIF-2

Los resultados de estudios con lisado de reticulocitos de conejo ofrecen una visión clara del control de la traducción. Las eIF-2 α quinasa, activadas por una serie de señales fisiológicas y antagonizadas por eIF-2 α fosfatasa, regulan el nivel de fosforilación del eIF-2 α , que a su vez controla la disponibilidad de GEF para reciclar el eIF-2 (ver referencias citadas anteriormente). Este modelo ha dado base para discutir si podría ser

igual en el resto de las células eucarióticas. Esta última pregunta es importante puesto que el presente trabajo trata precisamente de responder, esta importante cuestión. Por ello vamos a exponer algunas consideraciones sobre el tema.

Los estudios realizados en otros tipos de células de mamífero (células HeLa, Daudi y 3T3) (98-100) sugieren la presencia de DAI, lo que corrobora la idea de que el modelo de reticulocitos pueda ser aplicable a otros tipos celulares. Sin embargo, no se han obtenido datos convincentes con respecto a una actividad eIF-2 α quinasa como HCI en ningún tipo celular, e incluso se ha sugerido que no exista (4,164). Es lógico pensar que la fosforilación de eIF-2 α controlada por hemina sea característica de las células eritrocitarias sintetizadoras de hemoglobina. Sin embargo, el conjunto de resultados que ligan la activación de HCI al pH, a mecanismos de oxido-reducción, al metabolismo de fosfo-azúcares, así como a metales pesados, al estado de sus grupos SH o su asociación a espectrina y a otra proteína relacionada con el choque térmico (25,93-97,165), sugieren que una actividad similar podría estar presente en otras células.

Los intentos de dar una respuesta clara y definitiva a la cuestión de si la fosforilación de eIF-2 es o no el principal control de la traducción en células de mamíferos, ha encontrado numerosos obstáculos como los citados a continuación:

I. Los sistemas in vitro de síntesis de proteínas de cultivos celulares o tejidos, diferentes de reticulocitos, muestran unos niveles y una regulación de la iniciación de síntesis de proteínas no comparable a los sistemas de iniciación in vivo (2,166).

II. La demostración de la existencia y caracterización de eIF-2 α quinasas en otras células o tejidos distinta a reticulocitos presenta una doble dificultad; en primer lugar el que

pueda encontrarse en pequeñas cantidades, y en segundo lugar que estas quinasas se encuentren en estado inactivo y se desconozca su posible modulador (164,167). La cantidad de eIF-2 α quinasa deberá ser superior en reticulocito, al tratarse de una célula anucleada en la que no existe regulación transcripcional, y los niveles de proteína quinasa son los producidos antes de la desnuclearización.

III. La cuantificación de la fosforilación de eIF-2 α en los casos de inhibición de la traducción ha sido laboriosa, debido a que los niveles basales de fosforilación de eIF-2 α difieren entre los tipos celulares y entre experimentos, en una relación no muy clara con los niveles de síntesis de proteínas (4).

IV. Un aspecto de la fosforilación del eIF-2 α , que debe ser considerado es su compartimentalización en las células y la localización citoplasmática del eIF-2 y del GEF (2,54). El eIF-2 tiene una distribución intracelular muy variada (Capítulo 2) que parece modificarse por su fosforilación (16,168). Este hecho podría tener consecuencias en la accesibilidad de las eIF-2 α quinasas, fosfatasas y GEF, siendo de importancia en el modelo de la secuestación de este último GEF.

V. Existen también grandes diferencias en la disponibilidad de GEF, por ejemplo, dependiendo del estado de diferenciación celular (2,169). Unos niveles altos de GEF activo en relación con la cantidad de eIF-2, podrían minimizar el papel de la fosforilación de eIF-2 α como sistema de regulación, de igual forma que unos niveles reducidos de GEF podrían incrementar la sensibilidad de la regulación de la síntesis de proteínas por la fosforilación de eIF-2 α . De un modo u otro, los niveles de GEF representarían un fino control del efecto de la fosforilación del eIF-2 α (2,4).

VI. Por último, el eIF-2 puede tener otros mecanismos de regulación diferentes al de su fosforilación en la subunidad α , siendo estos mecanismos más decisivos o importantes en algunos

tipos celulares o tejidos no eritroides. Así, se ha descrito la fosforilación (Capítulo 3) y ADP-ribosilación (30) de la subunidad β ; y diversas moléculas como Mg^{2+} , GTP/GDP, NADPH/NADP⁺, glucosa 6-fosfato, glutatión oxidado (GSSG) y ATP (11,170-174), pueden afectar a la capacidad del eIF-2 de formar complejos ternarios o a la afinidad entre el eIF-2 y el GEF.

Estas consideraciones están en contraposición con el modelo más aceptado generalmente, el cual propone (ver capítulos anteriores) que la única consecuencia de la fosforilación del eIF-2 α es el secuestro del GEF, lo que produce la interrupción total de la síntesis de proteínas. Desde el descubrimiento en reticulocitos de conejo del control de la trasducción por fosforilación de eIF-2 α , se han realizado grandes progresos en el conocimiento de los mecanismos de la iniciación de cadenas peptídicas y su control. Sin embargo, por las evidencias en otros tipos celulares, la afirmación: "la fosforilación del eIF-2 constituye el control principal de la traducción en células de mamíferos" debe considerarse entre comillas (4). Es necesario superar las barreras del mecanismo de interrelación entre eIF-2, GEF, eIF-2 α quinasas y fosfatasas para llegar al conocimiento de este sistema de regulación y a su posible generalización en células no eritroides.

8. ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Estudios realizados en diversos laboratorios, incluido el nuestro, empleando como animal experimental la rata y tanto in vitro como in vivo, indicaban que la síntesis de proteínas disminuía durante el desarrollo cerebral, y esta disminución parecía producirse a nivel de la iniciación (174a,174b). Utilizando fracciones crudas de factores de iniciación de cerebros de animales en distintas etapas del desarrollo, en nuestro laboratorio hemos mostrado la relación existente entre la actividad del factor de iniciación eIF-2 y la síntesis de

proteínas en tejido cerebral (169,175), y hemos indicado que la relación entre los niveles de factor eIF-2 (unido a ribosomas en forma de eIF-2·GDP·GEF, activo) y de eIF-2 fosforilado (citoplasmático en forma de eIF2(P)-GEF, inactivo) podría ser una de las bases para la regulación de la traducción durante el desarrollo cerebral (168,169). Hemos demostrado además, la existencia de actividades proteína quinasa responsables de la fosforilación del factor eIF-2 en las subunidades α y β en corteza cerebral (176,177).

Todos estos resultados obtenidos en nuestro laboratorio en los últimos seis años, nos impulsaron al estudio del atrayente mecanismo de la fosforilación del factor eIF-2 de cerebro en sus subunidades α y β , para conocer posteriormente su posible papel regulador de la iniciación de la síntesis de proteínas. Pretendemos así, un doble propósito: primero, avanzar en el conocimiento del mecanismo de la regulación de la síntesis de proteínas en cerebro; y segundo, estudiar si la regulación establecida en el sistema de reticulocitos, puede ser también aplicable al tejido cerebral.

Por todo ello, los OBJETIVOS del presente trabajo se centran en tres apartados:

- I. Estudio de la fosforilación del factor de iniciación eIF-2 de corteza cerebral en su subunidad β , por proteínas quinasas descritas en otros tejidos.
- II. Identificación, purificación y caracterización de una proteína quinasa que fosforile en la subunidad α de dicho factor en tejido cerebral.
- III. Estudio de la fosforilación del eIF-2 en su subunidad α , sobre un sistema in vitro de síntesis de proteínas de cerebro.

Para llevar a cabo estos objetivos se desarrolla el siguiente PLAN DE TRABAJO:

1. Purificación del factor eIF-2, como sustrato básico.
2. Purificación de proteínas quinasas susceptibles de fosforilar el factor eIF-2.
3. Estudio de las proteínas quinasas purificadas y de la fosforilación del eIF-2 por las mismas.
4. Preparación de un sistema in vitro de síntesis de proteínas de tejido cerebral.
5. Fosforilación en la subunidad α del eIF-2, por alguna de las quinasas anteriores, sobre el sistema de síntesis de proteínas.

Dadas las limitaciones de los sistemas de síntesis de proteínas in vitro, que reproducen con poca efectividad la situación in vivo, y a los escasos antecedentes sobre la existencia de posibles quinasas que fosforilen en la subunidad α del factor eIF-2 en tejidos animales, el último punto puede desbordar las ambiciones del presente trabajo.

MATERIALES Y METODOS

9. OBTENCION DE MATERIALES BIOLÓGICOS

El material biológico utilizado en este trabajo es fundamentalmente corteza cerebral de ternera. Este material, es obtenido del matadero GIRESA (Colmenar Viejo), recogido de animales recién sacrificados y conservado a 0-4°C hasta su procesamiento en el laboratorio unos 30 min después.

10. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Para la obtención de las distintas fracciones subcelulares, el tejido cerebral se homogeneiza, en proporción 1:3 (p:v) en un homogeneizador de vidrio-teflón con tampón isotónico o tampón H (Tris-HCl 20 mM, pH 7,6; NH₄Cl 100 mM; acetato magnésico 5 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM; y sacarosa 0,2 M); todo el proceso se realiza a 0-4°C. El homogenado se centrifuga a 17.000g durante 30 min obteniendo el sobrenadante posmitocondrial o PMS. Dicho sobrenadante se vuelve a centrifugar a 100.000g durante 150 min obteniéndose el sobrenadante posmicrosomal o S-100 y la fracción microsomal. Para obtener una fracción enriquecida en factores de iniciación, la fracción microsomal se resuspende en tampón H sin Mg²⁺ hasta una concentración de 60 U de A₂₆₀/ml, se lleva a una concentración final 0,5 M de KCl por adición de KCl 4 M, y se agita durante 90 min (175,178). Posteriormente se centrifuga a 100.000g durante 180 min y el sobrenadante constituye la denominada fracción cruda de factores de iniciación o cIF.

El sedimento obtenido anteriormente se resuspende en tampón H sin Mg²⁺ ni NH₄Cl, y se denomina fracción ribosomal o fracción R. Para la utilización de las fracciones S-100, cIF y R como sustratos proteicos fosforilables, estas fracciones son dializadas frente al tampón H sin Mg²⁺ y sin NH₄Cl durante 14 h. Todas estas fracciones se conservan a 4°C para su inmediata utilización o se congelan a -70°C durante no más de un mes.

11. ENSAYO DE ACTIVIDAD eIF-2

Consiste en la medida de la formación del complejo ternario entre [^3H]Met-tRNA_i, eIF-2 y GTP. El Met-tRNA_i se prepara como [^3H]Met-tRNA_i a partir de tRNA comercial de hígado de ternera, [^3H]Met y metionil-tRNA sintetasa de Escherichia coli. Esta última no reconoce las especies elongadoras de tRNA^{Met} de eucariotas, pero si puede cargar las especies iniciadoras de tRNA^{Met} de los mismos (179). La preparación de aminoacil tRNA sintetasa, necesaria para la obtención de Met-tRNA_i a partir de Met y tRNA_i^{Met} eucarióticos, se obtuvo de E. coli (MRE-600) mediante un procedimiento de purificación previamente descrito (179,180).

El Met-tRNA_i se prepara en un volumen final de 1 ml que contiene: tampón Tris-HCl 150 mM, pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; KCl 50 mM; DTT 1 mM; ATP 4 mM; tRNA 100 U de A_{260nm}/ml; [^3H]Met 50 μM , 30 Ci/mmol, 20.000 cpm/pmol; y aminoacil-tRNA sintetastas de E. coli 500 U.E./ml (una unidad enzimática o U.E. = pmol de [^3H]Met-tRNA_i incorporado/30 min). Esta mezcla de reacción se incuba a 37°C durante 30 min, deteniéndola por adición de 1 ml de fenol recientemente saturado (v:v) con acetato amónico 10 mM, pH 5,5 (175). La mezcla anterior se agita 3 min y se centrifuga a 700g durante 5 min, separándose dos fases, una superior o acuosa y otra inferior o fenólica. La fase acuosa se recoge, con cuidado de no contaminarla con la fase fenólica, y rápidamente se cromatografía en una columna de filtración SephadexTM G-25 (Pharmacia) de 1x30 cm, equilibrada en acetato amónico 10 mM, pH 5,5. La elución se realiza con el mismo tampón a un flujo de 30 ml/h y se registra a 280 nm, recogiendo fracciones de 1 ml cuya radiactividad se mide extrayendo una alícuota de 5 μl . El pico de las fracciones que corresponde al volumen de exclusión de la columna contiene [^3H]Met-tRNA_i, reuniéndose las fracciones que contienen más de 5.000 cpm. La actividad específica del [^3H]Met-tRNA_i se calcula midiendo su radiactividad y las unidades de A₂₆₀, y se expresa en pmol de [^3H]Met-tRNA_i/U de A₂₆₀. Se considera que la reacción ha transcurrido satisfactoriamente si el tRNA que ha

incorporado [^3H]Met supone alrededor del 1% del tRNA total. La preparación se reparte en alícuotas y es estable a -70°C al menos durante un año.

El ensayo de actividad eIF-2 o de formación de complejos ternarios se lleva a cabo en un volumen final de 100 μl que contiene: HEPES-Tris 20 mM, pH 7,6; KCl 100 mM; DTT 1 mM; seroalbúmina bovina 0,5 mg/ml; 3 pmol de [^3H]Met-tRNA_i, 20.000 cpm/pmol; GTP 1 mM; y de 0,5 a 60 μg de proteína de muestra en la que se quiere medir actividad eIF-2. La mezcla de reacción se incuba durante 10 min a 30°C y la reacción se detiene por adición de 2 ml de tampón de parada a $0-4^\circ\text{C}$ que contiene: Tris-HCl 20 mM, pH 7,6; KCl 100 mM; DTT 2 mM; y MgCl_2 10 mM. Las muestras se filtran rápidamente a través de filtros de nitrocelulosa con vacío de 400-500 mm de Hg, lavando dos veces con 4 ml del tampón de parada. Los filtros se digieren en 2 ml de líquido de centelleo durante 1 hora con agitación. La actividad eIF-2, como formación del complejo eIF-2·GTP·[^3H]Met-tRNA_i, se mide por diferencia de la radiactividad unida entre muestras incubadas en presencia y ausencia de GTP, y se expresa en pmol de [^3H]Met-tRNA_i/mg de proteína (6,175,181,182).

12. ENSAYO DE ACTIVIDAD PROTEINA QUINASA

La actividad proteína quinasa de una determinada fracción subcelular se valora por incorporación de ^{32}P procedente de [γ - ^{32}P]ATP a un sustrato proteico exógeno (caseína, fosvitina, histonas) añadido al efecto. La mezcla de reacción en un volumen final de 50 μl contiene: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; MgCl_2 5 mM; NaF 5 mM; [γ - ^{32}P]ATP 100 μM , 50 mCi/mmol, 100 cpm/pmol; sustrato exógeno 1,0 mg/ml; y hasta 50 μg de la fracción de proteína en la que se quiere medir la actividad proteína quinasa. Esta mezcla se preincuba 2 min a 30°C con agitación, la reacción se inicia al añadir [γ - ^{32}P]ATP y se mantiene durante 10 min a 30°C . Posteriormente, el contenido del ensayo se pipetea sobre tiras de

papel P-81 (Whatman) de 1,5x3 cm que inmediatamente se lavan con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p:v) en un volumen de 10-20 ml de TCA por cada 50 µl de mezcla de reacción aplicada a los papeles, agitando a continuación durante 10 min. Este lavado se repite de nuevo dos veces con TCA al 5%. Por último, los papeles se introducen en viales con 2 ml de líquido de centelleo, se agitan ligeramente y se determina su radiactividad (177,183).

Cuando las condiciones del ensayo así lo precisen, los activadores, inhibidores y cationes se añaden en la concentración deseada a la mezcla de reacción que se preincuba. Estos moduladores y su concentración se indicarán conjuntamente con sus resultados. Los blancos se realizan en los ensayos incubados en ausencia de muestra o fracción, y los resultados se expresan en pmol de ^{32}P incorporados/mg de proteína correspondiente a la fracción empleada.

13. FOSFORILACION DE PROTEINAS IN VITRO

La reacción de fosforilación es un ensayo de actividad proteína quinasa que se realiza en un volumen final de 50 µl que contiene: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; MgCl_2 5 mM; NaF 5 mM; y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 100 µM, 0,2-1 Ci/mmol, $400\text{-}2 \times 10^3$ cpm/pmol. En este medio se añaden como fuente de quinasa de 0,5 a 50 µg de proteína (dependiendo de si se trata de una fracción purificada o cruda) que contiene la actividad quinasa, y como sustratos hasta 5 µg de la proteína que se quiere fosforilar (sustrato exógeno: caseína, histona, eIF-2, etc.) o hasta 50 µg de una fracción cruda de proteínas (sustrato endógeno) (177,184). En este último caso, si dicha fracción es a la vez la que aporta la actividad proteína quinasa, tanto el sustrato como la proteína quinasa son endógenos, y la reacción de fosforilación es una "autofosforilación".

Los activadores, inhibidores y cationes, a la concentración deseada, se añaden antes de la preincubación. La mezcla de la

reacción se mantiene 2 min de preincubación a 30°C, se inicia añadiendo [γ -³²P]ATP y se incuba a la misma temperatura durante 0,5 a 20 min dependiendo de las características de la fosforilación. Si la fosforilación de las proteínas se va a analizar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, la reacción se detiene añadiendo 25 μ l de solución de parada, y realizada la electroforesis, el gel (teñido o no) se seca y se obtiene su autorradiografía (ver a continuación).

14. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Las muestras de proteínas obtenidas de las diferentes fracciones subcelulares, de los distintos pasos cromatográficos, de las reacciones de fosforilación, o de otras procedencias, se analizan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Algunas proteínas se estudian en su estado nativo, en cuyo caso la electroforesis se realiza en condiciones no desnaturizantes.

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realiza en presencia de SDS y en un sistema discontinuo, de acuerdo con el método establecido por Laemmli (185). El gel de poliacrilamida utilizado (de 1,5 mm de espesor y 13,5 cm de longitud) se compone de un gel concentrador (1,5 cm) del 5% (p:v) de acrilamida y 0,05% (p:v) de N,N'-metilen-bisacrilamida, y de un gel separador (12 cm) del 12% de acrilamida y 0,12% de N,N'-metilen-bisacrilamida. La electroforesis se desarrolla tal y como se describe en (186), introduciendo algunas modificaciones. Los geles se preparan en un tampón gel que contiene: Tris-HCl 0,5 M, pH 8,7; TEMED 0,17% (v:v); SDS 0,1% (p:v); y persulfato amónico 0,45 mg/ml como iniciador. El agua utilizada siempre es bidestilada-desionizada y filtrada con un filtro de 0,22 μ m.

Las muestras de proteínas a analizar se preparan en un volumen de 50 μ l, que contienen hasta 50 μ g de proteína, con una

concentración salina total que no excede de 250 mM. A este volumen de muestra se le añaden 25 μ l de solución de parada que contiene: Tris-HCl 186 mM, pH 6,8; SDS 9%; 2-mercaptoetanol 6% (v:v); glicerol 15% (p:v); y azul de bromofenol 0,025% (p:v). Una vez añadida la solución de parada, las muestras se calientan a 100°C durante 3 min y se aplican sobre el gel concentrador, o se congelan a -20°C hasta su posterior utilización. La electroforesis se realiza en un tampón de electroforesis que contiene Tris 25 mM-glicina 192 mM, pH 8,3 y SDS 0,1%; y se desarrolla a 45 mA/gel a corriente constante (unos 100 V), y durante 4 h con refrigeración (12°C a 15°C).

Los geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, se realizan "sin" SDS y con un sistema continuo como se describe en (186), introduciendo algunas modificaciones. El gel se prepara de las mismas dimensiones que el anterior pero con un 5% a 7% de acrilamida y un 0,05 a 0,07% de N,N'-metilenbisacrilamida. Dependiendo de las características de la muestra o proteína, el tampón gel a utilizar es Tris-HCl 0,5 M, pH 8,7 ó Tris-acetato 50 mM, pH 7,5; con el resto de idénticos componentes que el anterior, a excepción del SDS. En estas condiciones, a los 50 μ l de muestra se le añade una solución que sólo contiene glicerol 30% y azul de bromofenol 0,012% y se aplica inmediatamente sobre el gel. La electroforesis se realiza en Tris 25 mM-glicina 192 mM, pH 8,3 ó en Tris-acetato 50 mM, pH 7,5; dependiendo del tampón utilizado en el gel. Las condiciones de desarrollo (10 cm del gel) a corriente constante son 4 h a 40 mA/gel con refrigeración, y para el caso de una posterior extracción de las proteínas preservando su actividad biológica, 2 h de precorrida a 10 mA, 1 h a 10 mA y 16 h a 3 mA, todo ello a 4°C.

En el caso de la recuperación de proteínas con su actividad biológica, una vez finalizada la electroforesis, el gel se corta en fragmentos de 3 a 4 mm y se incuba en 100 μ l de Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 con 250 mM de KCl y seroalbúmina bovina 5 mg/ml durante 24 h a 4°C.

Concluida la electroforesis, y si las proteínas del gel no se quieren recuperar o transferir, el gel previamente fijado se tiñe con azul de Coomassie (R) o con la técnica de tinción de plata (187). Teñido el gel, éste se deshidrata con etanol al 45% (v:v) y se seca entre dos láminas de papel de celofán en un ambiente aireado. Una vez visualizadas en el gel las bandas correspondientes a las proteínas de la muestra, estas se estudian por densitometría a 570 nm, 450 nm o 540 nm, según el método de tinción y el densitómetro utilizado.

15. AUTORRADIOGRAFIA Y FLUOROGRAFIA

La autorradiografía consiste en la exposición de material biológico marcado radiactivamente y sobre un soporte, a una película fotográfica para rayos X. En nuestro caso, se trata de las proteínas fosforiladas con ^{32}P que se encuentran en geles de poliacrilamida (Capítulos 13 y 14). Estos geles, una vez fijados, teñidos o no teñidos, deshidratados y secados, se exponen durante 12-72 h a la película fotográfica de 24x30 cm (Agfa RX) en un chasis sin pantalla intensificadora. Después de este tiempo, la película se revela en un equipo automático obteniendo la autorradiografía. En ella se observan las bandas que corresponden a las proteínas marcadas con ^{32}P o proteínas fosforiladas (177,186). Estos resultados se analizan por densitometría a 800 nm ó 540 nm, proporcionándonos unos datos que se expresan en unidades arbitrarias.

Las intensidades de las bandas de proteínas marcadas también se pueden determinar por medida directa de su radiactividad (^{32}P incorporado). Una vez localizada la proteína marcada radiactivamente por medio de su autorradiografía, se corta su fragmento de gel correspondiente y se solubiliza en 2 ml de agua y 1 h a 50°C, siguiendo las instrucciones de NENTM (Du Pont) (188). A continuación se añaden 10 ml de líquido de centelleo, se agita después de reposar a temperatura ambiente y se mide su radiac-

tividad. Las cpm obtenidas, se pueden expresar en pmol, después de calcular el estandar utilizado (cpm/pmol) y suponiendo que todo el ^{32}P se ha solubilizado.

Si el isótopo utilizado es de menor energía que el ^{32}P , la impresión de la película fotográfica es lenta, como ocurre con el isótopo ^{35}S , utilizado en nuestros experimentos como [^{35}S]Met. En este caso, el marcaje radiactivo de las proteínas se visualiza mediante fluorografía (186). Esta técnica se realizó según las instrucciones de Amersham y en ella el gel teñido y deshidratado se incuba durante 30 min en 100 ml de AmplifyTM, se seca en papel Whatman 3MM con un secador de geles y se coloca en un chasis con la película fotográfica, en la que una vez revelada se obtiene la fluorografía donde ya se observan las proteínas marcadas.

La medida de la radiactividad se efectúa, bien directamente por centelleo líquido y Cerenkov, o bien indirectamente a través de autorradiografía y fluorografía. La medida por centelleo líquido se realizó con NormascintTM Cocktail-22 (Scharlau) para muestras acuosas, y en contadores Beckman LS 3800 y Pharmacia-LKB Rackbeta 1219. Los isótopos utilizados fueron [^3H]Met 85 Ci/mmol, [^3H]Leu 60-170 Ci/mmol, [^{35}S]Met 1465 Ci/mmol y [τ - ^{32}P]ATP 3 Ci/mmol, de Amersham y Nen Research Products. En las condiciones de experimentación utilizadas, las eficiencias fueron del 31% para el ^3H y del 91% para el ^{32}P . La medida por Cerenkov de ^{32}P se efectuó directamente sobre el medio acuoso en el que se encuentra la muestra (189).

16. PURIFICACION DEL FACTOR eIF-2

El factor de iniciación 2 fué obtenido a partir de cerebro de ternera, basándonos en el método previamente descrito por este laboratorio para cerebro de rata (6), introduciendo diversas modificaciones. El proceso de purificación se realiza a 0-4°C y es como sigue: 2,6 kg de corteza cerebral de ternera se

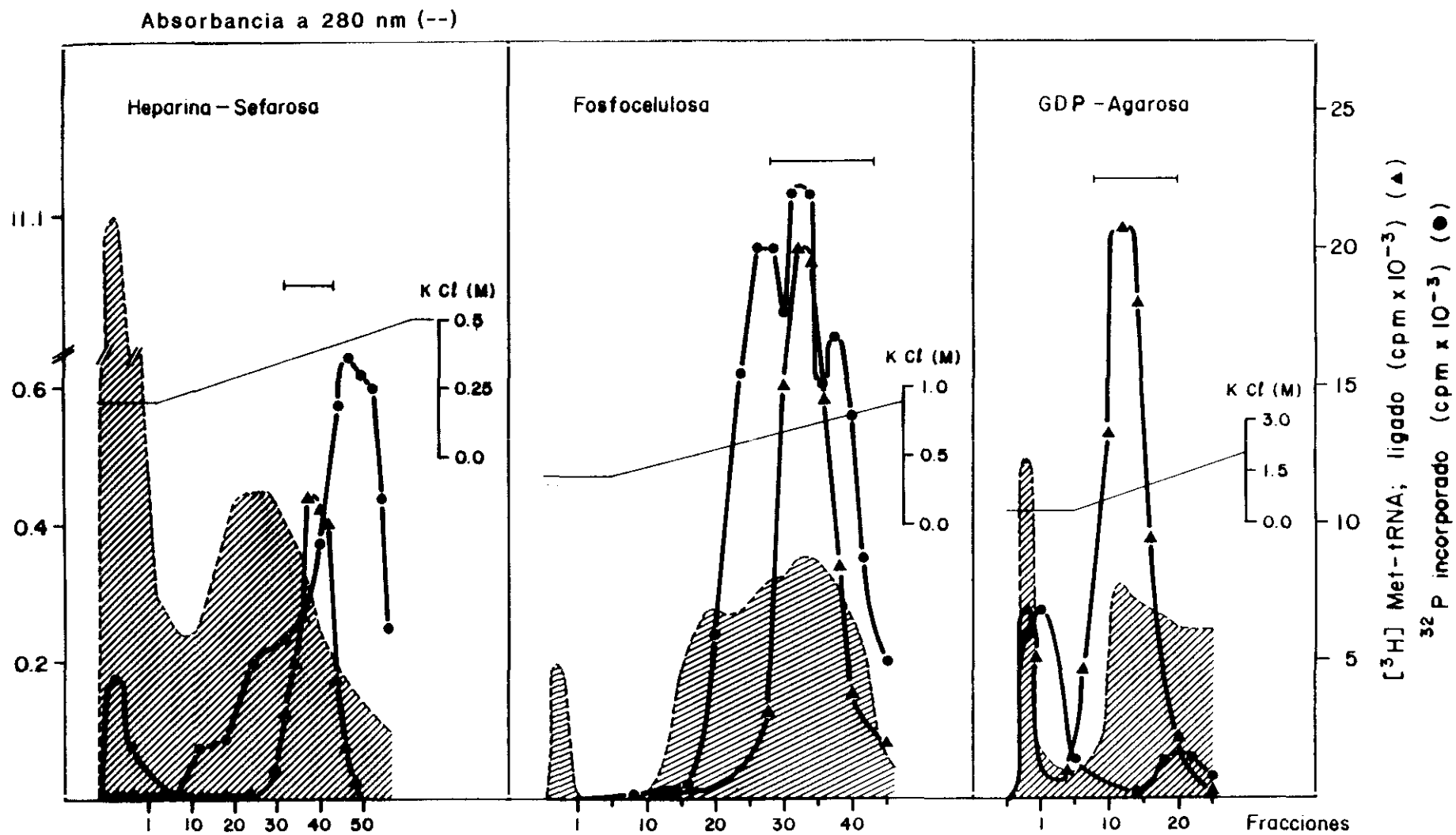


Figura 1. Esquema de purificación del factor eIF-2 de cerebro. (▲) actividad eIF-2 dependiente de GTP. (●) actividad caseína quinasa medida como se describe en el Capítulo 17.

homogeneizan en tampón H tal y como se describe en el Capítulo 10, obteniendo la fracción cIF (2,9 gramos de proteína), la cual se fracciona con sulfato amónico del 30% al 70% y se dializa durante 12 h frente a tampón A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,6; DTT 1 mM; EDTA 0,2 mM; PMSF 1 mM; y glicerol 10% (p:v)) con 0,2 M de KCl. Posteriormente, para disminuir la cantidad de material a purificar, se modificó el rango del fraccionamiento, pasando a ser del 35% al 60% de sulfato amónico en las mismas condiciones.

El segundo paso de purificación consiste en una cromatografía en una columna de heparina-SefarosaTM (Pharmacia) (3x8 cm) equilibrada en tampón A con 0,2 M de KCl (Figura 1.). La muestra dializada procedente del corte sulfato amónico se carga en la columna a un flujo de 35 ml/h y se eluye con un gradiente lineal (12 volúmenes de columna) de 0,2-0,5 M de KCl en tampón A a 70 ml/h. Se recogen fracciones de 10 ml que se valoran con el ensayo de actividad eIF-2 y de actividad caseína quinasa (Capítulos 11 y 17). Las que presenta actividad eIF-2 se reúnen, concentran (por ultrafiltración) y ajustan a 0,35 M de KCl en tampón A. Esta muestra se aplica a continuación sobre una columna de Fosfocelulosa P11 (Whatman) (1,5x4,5 cm) equilibrada en tampón A con 0,35 M de KCl a 25 ml/h, y se eluye con un gradiente lineal (5 volúmenes) de KCl 0,35-1,0 M en tampón A al mismo flujo. Se recogen fracciones de 1 ml y aquellas con actividad son reunidas, concentradas y ajustadas a 0,35 M de KCl en tampón A. Seguidamente, esta fracción se carga a 4 ml/h sobre una columna de GDP-agarosa (Sigma) (1x6 cm) equilibrada en tampón A con 0,35 M de KCl y es eluida con un gradiente lineal (5 volúmenes) de KCl 0,35-3,0 M en tampón A a 8 ml/h. Las fracciones obtenidas de 0,5 ml se ensayan para eIF-2, y las que presentan actividad se reúnen y concentran en tampón A con KCl menor de 250 mM.

Con objeto de aumentar el rendimiento y rentabilizar más el trabajo de obtención del eIF-2, imprescindible como proteína sustrato y objeto central de estudio en la presente Tesis, se

modificó posteriormente el último paso de purificación en GDP-agarosa. Así, la muestra procedente de Fosfocelulosa se ajustó a una concentración de 0,15 M de KCl en tampón A y se cargó en la columna de GDP-agarosa equilibrada con 0,15 M de KCl en el mismo tampón a 4 ml/h. Después de lavar la columna con tampón A de KCl 0,15 M a 8 ml/h, el factor eIF-2 ligado a GDP-agarosa se eluye con un segundo lavado de 1,5 M KCl en tampón A al mismo flujo, recogiendo fracciones de 0,5 ml. Con este procedimiento el rendimiento obtenido se eleva unas 4 veces, mientras que la purificación se mantiene sobre el mismo rango que con el método anterior.

17. PURIFICACION DE CASEINA QUINASA II

El ensayo enzimático de actividad caseína quinasa se realiza de acuerdo a procedimientos previamente establecidos (Capítulo 12) en un volumen final de 50 μ l que contiene: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; MgCl₂ 5 mM; NaF 5 mM; [γ -³²P]ATP 100 μ M, 50 mCi/mmol, 100 cpm/pmol; como sustrato exógeno 1,0 mg/ml de caseína o fosvitina; en ausencia y presencia de heparina 5 μ g/ml; y hasta 40 μ g de proteína. Una unidad de actividad caseína quinasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 nmol de ³²P a caseína o fosvitina por 10 min de incubación. Los resultados se expresan en cpm o en unidades/mg.

La caseína quinasa II de cerebro fué identificada y purificada por un sencillo y nuevo método descrito en nuestro laboratorio, por modificación de los de otros autores para otros sistemas (149). El tejido de partida fué corteza cerebral de ternera y todos los pasos se realizan a 0-4°C. El tejido cerebral (960 g) se homogeneiza 1:3 (p:v) en una batidora con tampón: Tris-HCl 20 mM, pH 7,6; EDTA 2 mM; EGTA 5 mM; PMSF 1 mM; 2-mercaptoetanol 7 mM; y azida sódica 0,02%. La homogeneización se efectúa a máxima velocidad y durante 1 min seguido de un periodo de enfriamiento y de nuevo otro minuto de homogeneización. A

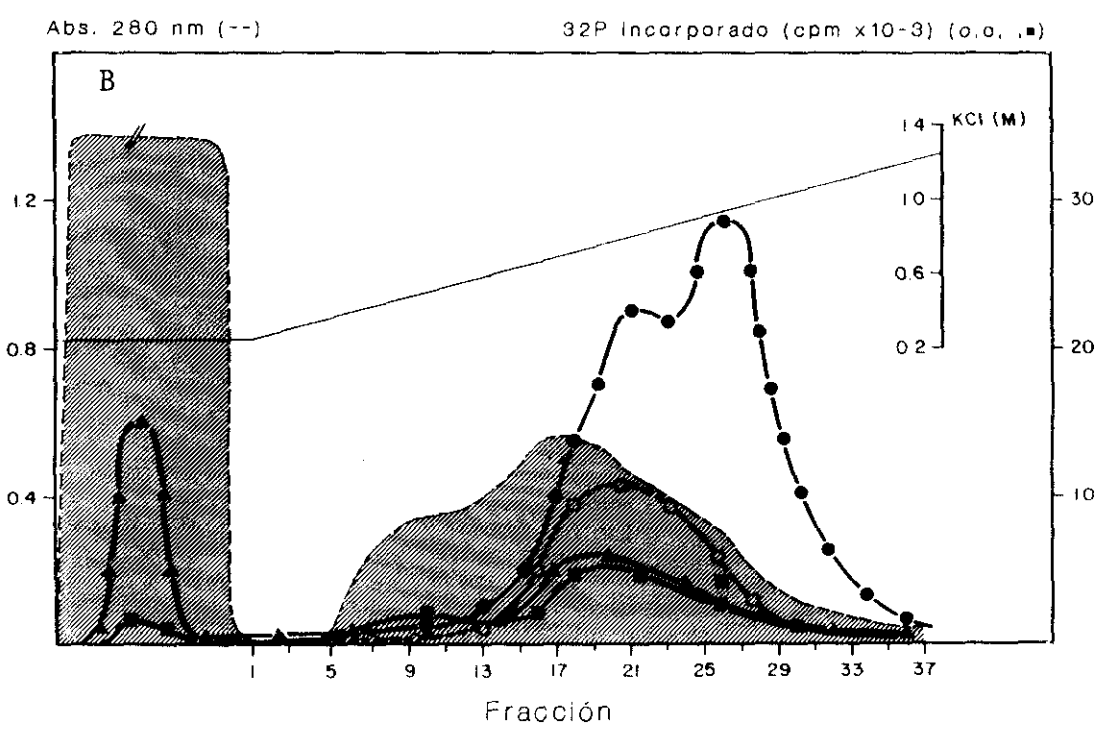
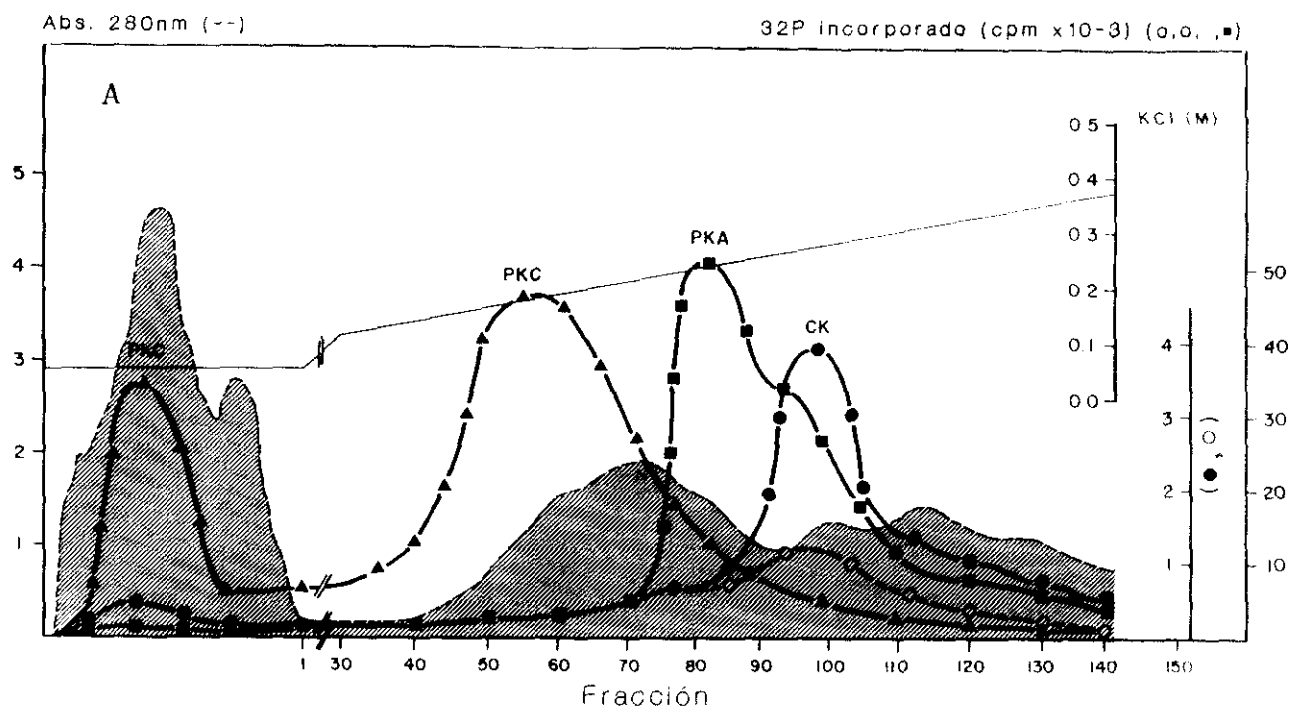
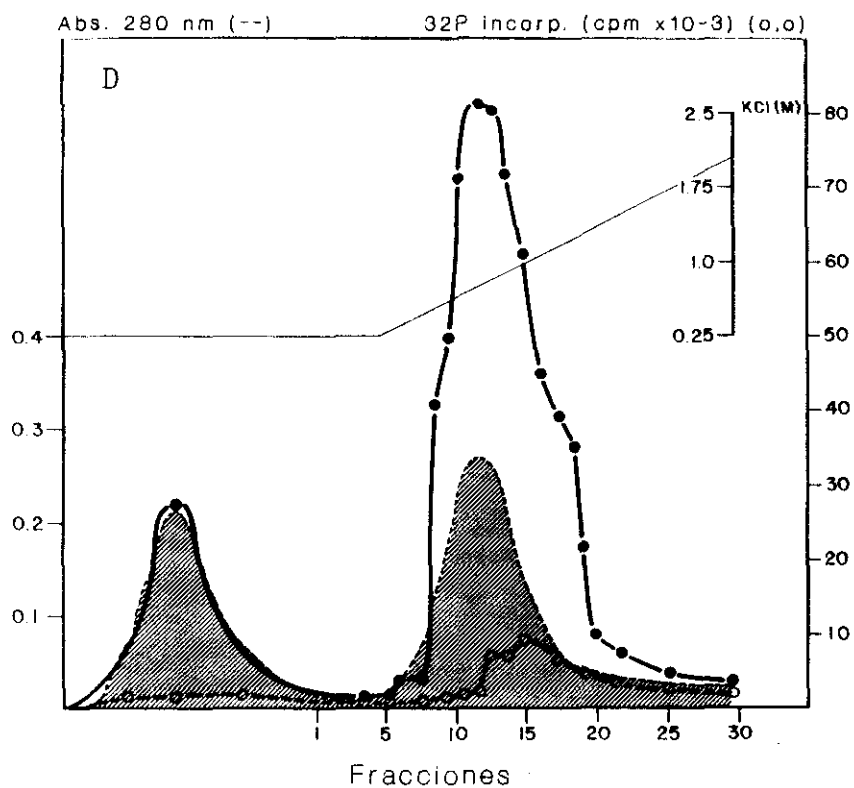
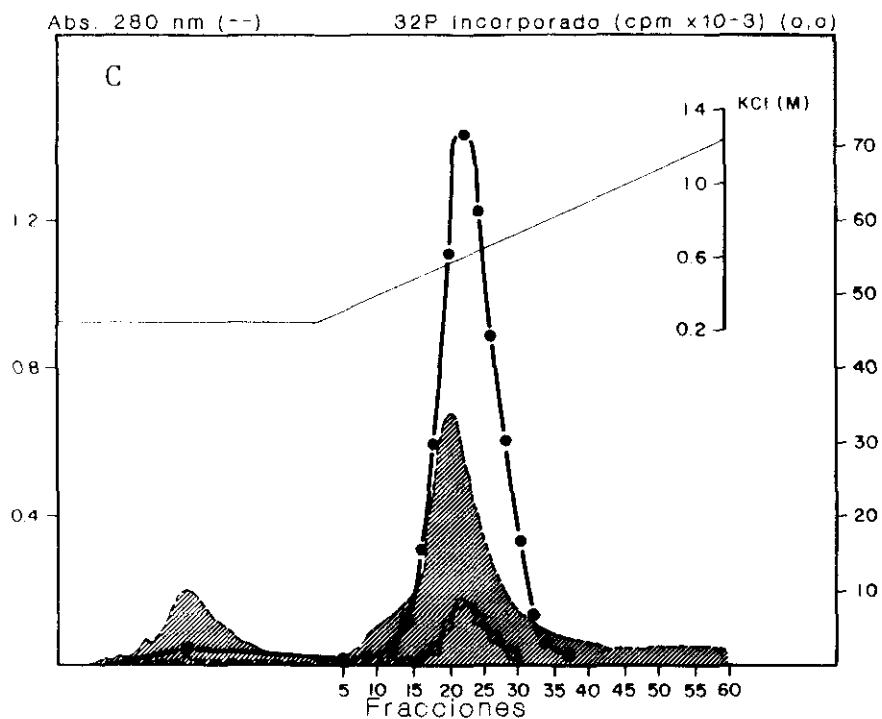


Figura 2. Purificación de Caseína Quinasa II por cromatografías en DEAE-celulosa (A), Fostocelulosa P11 (B), fosvitina-Sefarosa (C) y ATP-agarosa (D). El ensayo de actividad proteína quinasa se realizó con alícuotas de 10 ó



2,5 μl y en presencia de: (●,○) caseína 1mg/ml; (○) heparina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; (▲) histona H1 1mg/ml, Ca^{2+} 0,5mM y fosfolípidos 0,3mg/ml; (■) histonas 1mg/ml y AMP cíclico 10 μM .

continuación, se centrifuga a 17.000g durante 30 min y el sobrenadante resultante se centrifuga posteriormente a 100.000g durante 60 min recogiendo de nuevo el sobrenadante.

La mitad de este sobrenadante (1400 ml) se lleva a 50 mM de KCl y se carga en una columna de DEAE-celulosa DE52 (Whatman) (5x50 cm), equilibrada con tampón B (Tris-HCl 20 mM, pH 7,6; EDTA 1 mM; EGTA 2 mM; PMSF 0,05 mM; 2-mercaptoetanol 7 mM; y azida sódica 0,02%) con 50 mM de KCl y a un flujo de 300 ml/h. La columna se lava con 2.000 ml de tampón B con 50 mM de KCl y se eluye con 4.000 ml de un gradiente lineal de 50 mM a 0,5 M de KCl en tampón B (Figura 2.A). Las fracciones obtenidas, de 20 ml cada una, se recogen para la realización del ensayo de actividad quinasa. Todo este proceso se repite de nuevo con la otra mitad del sobrenadante restante.

Las fracciones que contienen la actividad caseína quinasa de las dos cromatografías son reunidas, ajustadas a una concentración de KCl 0,25 M y aplicadas a una columna de Fosfocelulosa (1,6x5 cm), equilibrada en tampón B con KCl 0,25 M, a un flujo de 25 ml/h. La columna es lavada con 10 ml de tampón B con 0,25 M de KCl y es eluida con 80 ml de un gradiente lineal 0,25-1,25 M de KCl en el mismo tampón (Figura 2.B). Se recogen fracciones de 2 ml y se ensayan para actividad caseína quinasa. Con el gradiente se obtienen dos picos de actividad caseína quinasa, el primero de los cuales se descarta por su menor inhibición por heparina.

Las fracciones de la columna de Fosfocelulosa con actividad caseína quinasa, son llevadas a 0,25 M de KCl por sucesivas diluciones y concentraciones por ultrafiltración con tampón B. A continuación, la purificación de la caseína quinasa se realiza mediante cromatografías de afinidad. Se probaron tres diferentes ligandos: heparina, caseína y fosvitina, siendo esta última la de mejor purificación y rendimiento. La fosvitina-SefarosaTM 4B (Pharmacia) se preparó de acuerdo con las instrucciones del

fabricante y en este proceso la cantidad de fosvitina ligada al gel de Sefarosa 4B fué del 45%. La muestra se aplica a una columna de fosvitina-Sefarosa 4B (1x2 cm) a un flujo de 6 ml/h, se lava con 2 ml de tampón B con 0,25 M de KCl y se eluye con 30 ml de un gradiente lineal de KCl 0,25-1,25 M en tampón B. Las fracciones de 0,5 ml son recolectadas para su ensayo de actividad proteína quinasa y el perfil de elución se muestra en la Figura 2.C.

Las fracciones activas se concentran, se igualan a 0,25 M de KCl como se ha descrito anteriormente, y se aplican a una columna de ATP-agarosa (Pharmacia) (1x1,5 cm) equilibrada con tampón B de KCl 0,25 M a un flujo de 6 ml/h. La elución se realiza con 16 ml de un gradiente lineal de KCl 0,25-2,5 M en tampón B. La Figura 2.D muestra que con este procedimiento se eluye la mayor parte de la actividad quinasa, reuniéndose las fracciones 10-15, las cuales son concentradas y conservadas a 4°C (en tampón B con glicerol al 10% y una concentración de KCl no inferior a 250 mM) para su utilización en la caracterización de la enzima.

18. PURIFICACION DE PROTEINA QUINASA C

El ensayo enzimático de actividad proteína quinasa C se realiza de acuerdo a procedimientos previamente descritos (Capítulo 12), en un volumen final de 50 μ l que contiene: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; MgCl₂ 5 mM; NaF 5 mM; [γ -³²P]ATP 100 μ M, 50 mCi/mmol, 100 cpm/pmol; como sustrato exógeno 1,0 mg/ml de histona H1 (III-S, Sigma No.H-5505); y en presencia y ausencia de 0,5 mM Ca²⁺ más 15 μ g de fosfolípidos (Sigma No.B-1627, con un 80-85% de fosfatidilserina) como activadores específicos de PKC. En esta mezcla de reacción se añaden hasta 50 μ g de proteína que contiene la actividad proteína quinasa C que se quiere ensayar y se incuba un tiempo de 10 min. Los resultados se expresan en pmol de ³²P incorporados a histona en 10 min de incubación por mg (pmol ³²P/mg) o en cpm.

La proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos o C (PKC) de cerebro, fué purificada según procedimiento previamente descrito (184) con algunas modificaciones (Figura 3.). Unos 390 g de corteza cerebral de ternera se homogeneizaron por el método anteriormente descrito en el Capítulo 10. El S-100 obtenido con este método se precipita con un 70% de sulfato amónico y se dializa durante 14 h frente a un tampón: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; 1 mM de EGTA; 1 mM de EDTA; y 1 mM de DTT. La muestra una vez dializada, se lleva a una concentración de 2 mM de Cl_2Ca y 2 mM de Cl_2Mg y se carga en una columna de fenil-SefarosaTM (Pharmacia) (2x16 cm) equilibrada en tampón D (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; 0,1 mM de Cl_2Ca ; y 1 mM de DTT) a 40 ml/h. Después de lavar la columna con el mismo tampón, se efectúa al mismo flujo otro lavado (a) de tampón D con 1,0 M de NaCl, y a continuación un último lavado (b) con tampón E (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; 1 mM de EGTA; y 1 mM de DTT), recogiendo estas últimas fracciones de 5 ml y ensayando su actividad proteína quinasa C. Las fracciones más activas se reúnen y se concentran, reduciendo su concentración residual de NaCl hasta su práctica eliminación.

La muestra anterior se añade a una columna de DEAE-celulosa (1,6x3 cm) a 25 ml/h equilibrada en tampón E y se eluye con un gradiente lineal (4 volúmenes de columna) de 0,0-0,5 M de NaCl en tampón E a 30 ml/h. Se recogen fracciones de 1 ml y se ensaya su actividad quinasa C, reuniendo las fracciones con actividad, concentrándolas y reduciendo su NaCl hasta su práctica eliminación. Esta fracción se carga a 4 ml/h sobre una columna de ATP-agarosa (1x4 cm) equilibrada en tampón E, la cual se lava con idéntico tampón, posteriormente se lava con tampón E de NaCl 2,5 M a 8 ml/h (c), y se recogen fracciones de 1 ml. Después de ensayar su actividad quinasa C, ésta se encuentra en la fracción no ligada a ATP-agarosa debido a que la proteína quinasa C de nuestra fracción se encuentra "inactivada" y por tanto sin afinidad por ATP. Con este método, PKC se conserva concentrada a -70°C en tampón E con 10% de glicerol y 0,05% de Triton X-100.

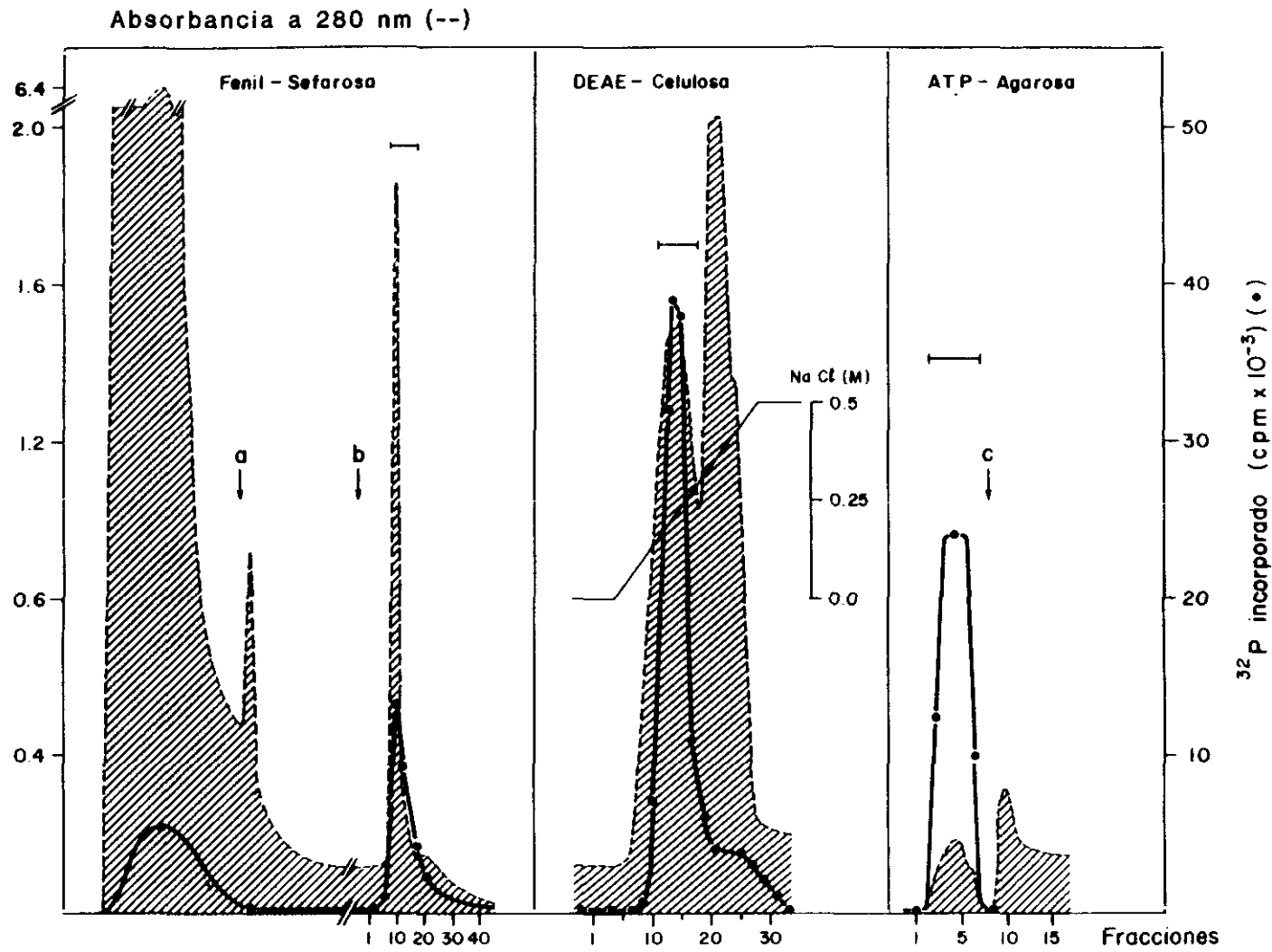


Figura 3. Esquema de purificación de la Proteína Quinasa C (PKC) de cerebro. (●) actividad proteína quinasa C.

19. PURIFICACION DE PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE AMP CICLICO

El ensayo enzimático de actividad proteína quinasa dependiente de AMP cíclico se realiza de acuerdo a procedimientos previamente descritos (Capítulo 12), en un volumen final de 50 μ l que contiene: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; $MgCl_2$ 5 mM; NaF 5 mM; [γ - ^{32}P]ATP 100 μ M, 50 mCi/mmol, 100 cpm/pmol; como sustrato exógeno 1,0 mg/ml de histonas (II-AS, Sigma No.H-7755); y en presencia o ausencia de 10 μ M de AMP cíclico. En esta mezcla de reacción se añaden hasta 50 μ g de proteína que contiene la actividad proteína quinasa A. Los resultados se expresan en pmol de ^{32}P incorporados a histona en 10 min de incubación por mg (pmol ^{32}P /mg) o en cpm.

La purificación de proteína quinasa dependiente de AMP cíclico ó A (PKA) (subunidad catalítica) de cerebro se realizó según procedimientos previamente descritos (190) con algunas modificaciones. El tejido de partida fueron 430 g de corteza cerebral de ternera, homogeneizados en tampón H y obteniendo el sobrenadante S-100 conforme a lo descrito en el Capítulo 10. A este sobrenadante se le añade un 70% de sulfato amónico y el precipitado, tras su resuspensión, se dializa durante 18 h en tampón F (tampón fosfato 10 mM, pH 6,8; 0,1 mM de DTT y 1 mM de EDTA). La muestra de proteína dializada se carga en una columna de DEAE-celulosa (3x16,5 cm) equilibrada en el mismo tampón a 90 ml/h y posteriormente, la columna se lava (8 volúmenes de columna) con tampón F 55 mM al mismo flujo. A continuación, se procede a un segundo lavado (a) de 0,5 volúmenes con tampón F 45 mM conteniendo 55 μ M de AMP cíclico, seguido de otro lavado (b) de 3 volúmenes con el mismo tampón pero sin AMP cíclico y a idéntico flujo. Se recogen fracciones de 10 ml desde que la A_{280} disminuye a la mitad (como consecuencia de la disminución de la molaridad del tampón F de 55 a 45 mM) hasta que aumenta claramente la relación A_{260}/A_{280} (unos 2 volúmenes de columna, como consecuencia del inicio de la elución del AMP cíclico de la columna). Mediante el ensayo de actividad para PKA, se comprueba que dicha actividad eluye en el intervalo de fracciones indicado (Figura 4.).

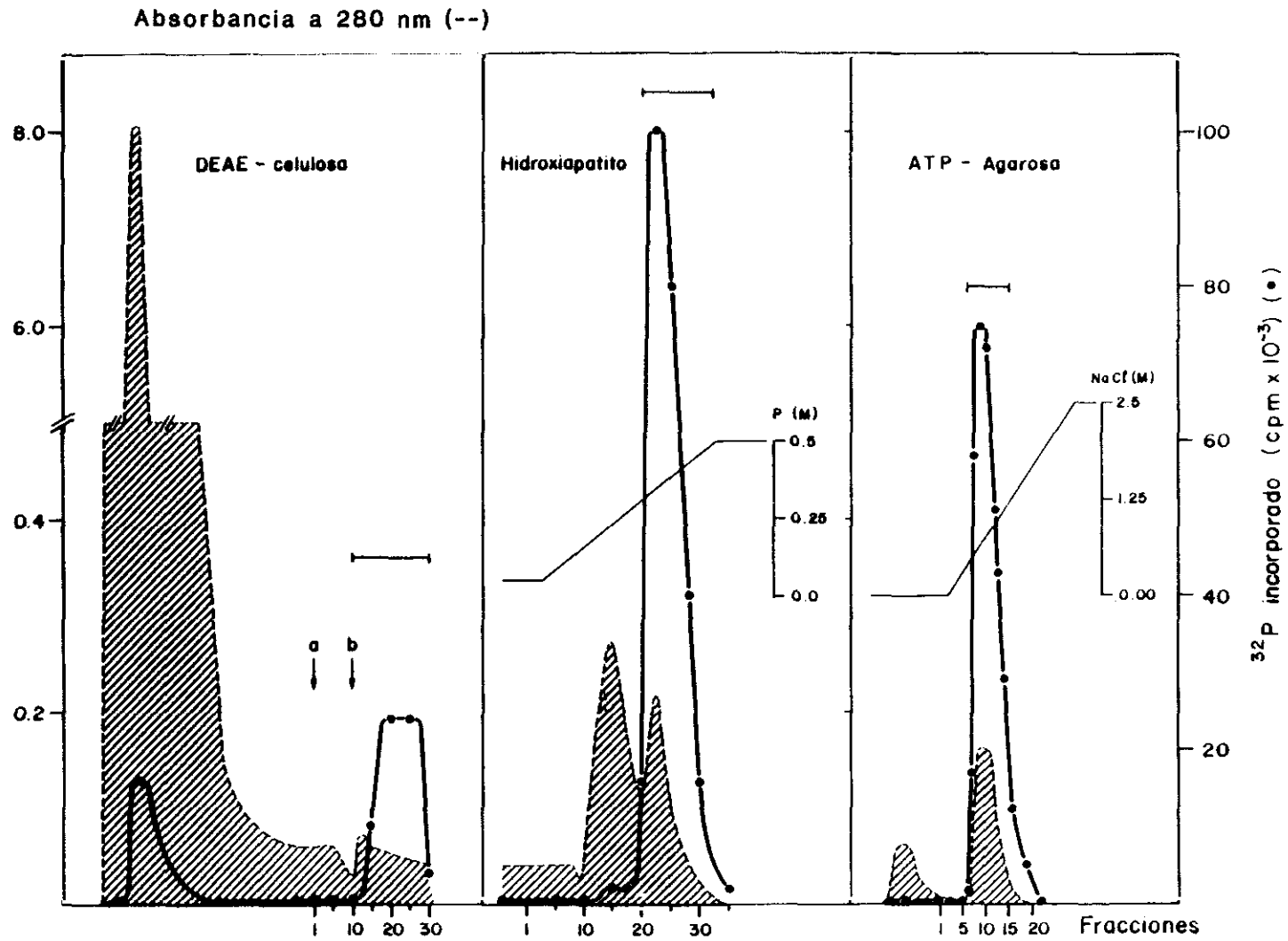


Figura 4. Esquema de purificación de la Proteína Quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) de cerebro. (●) actividad proteína quinasa A.

Estas fracciones se cargan en una columna de Hidroxiapatito (Bio-Rad) (1,5x3 cm) equilibrada en tampón F 45 mM a un flujo de 18 ml/h, y se eluye con un gradiente lineal (6 volúmenes) de tampón F 45 mM a 500 mM a un flujo de 25 ml/h, recogién dose fracciones de 1 ml. Tras el ensayo de actividad quinasa, las fracciones elegidas se concentran y ajustan a un tampón F 45 mM. Dicha muestra, se carga a 5 ml/h en una columna de ATP-agarosa (1x2 cm) equilibrada en tampón F 45 mM y se eluye con un gradiente lineal (de 6,5 volúmenes) de 0 a 2,5 M de NaCl en tampón F 45 mM y a 10 ml/h, recogiendo fracciones de 0,5 ml. Tras el ensayo de actividad quinasa, las fracciones con más actividad proteína quinasa A se reúnen y concentran, se llevan a NaCl menor de 100 mM y 20% de sacarosa, y se conservan a -70°C hasta su utilización.

20. ENSAYO EEA Y PURIFICACION DE PROTEINA QUINASA I (PKI)

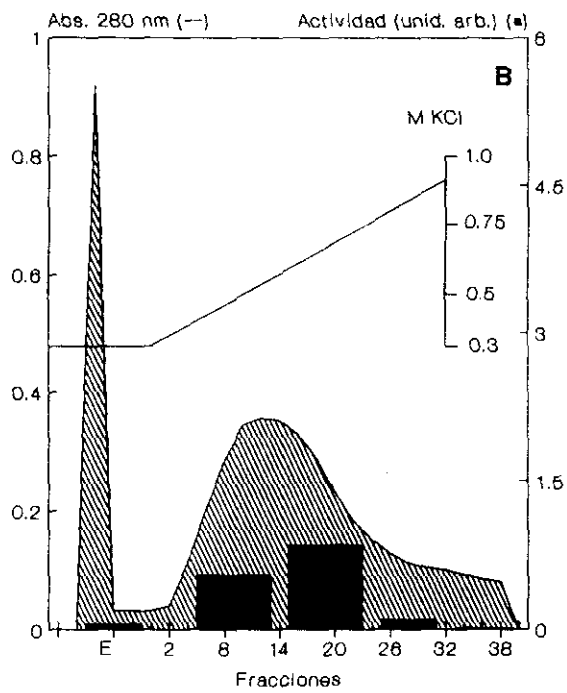
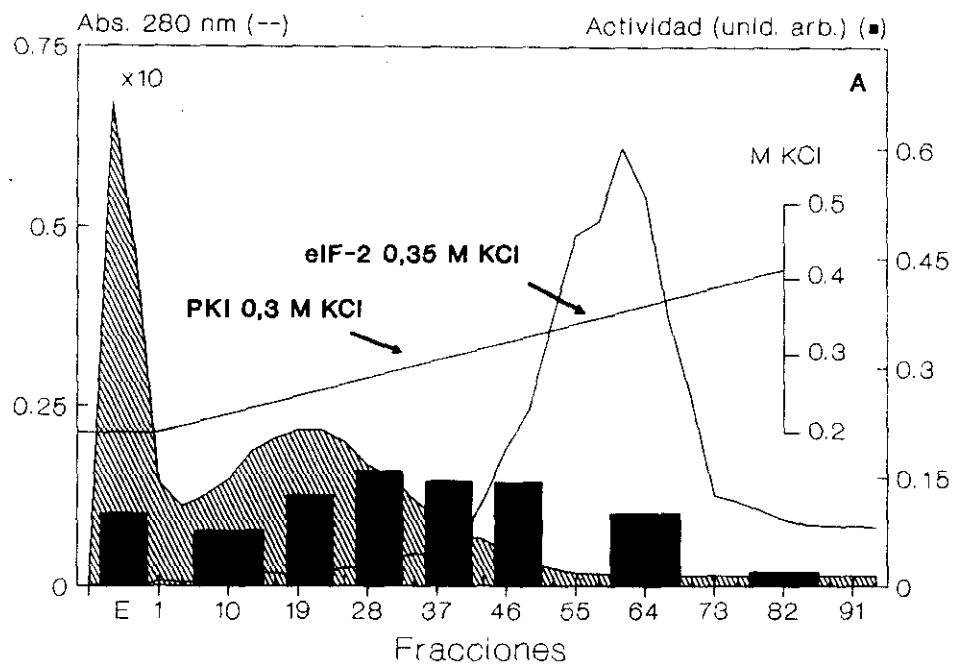
El ensayo de la actividad quinasa que fosforila el factor de iniciación eIF-2 en la subunidad α o actividad proteína quinasa I es un ensayo que combina varias de las técnicas anteriormente expuestas (Capítulos 13 a 15). Esta actividad, al ser reducida y muy específica para el factor eIF-2 (de trabajosa obtención y que requiere todo un proceso de completa purificación, Capítulo 16), no se pudo valorar con el ensayo de actividad proteína quinasa descrito en el Capítulo 12, al no proporcionar la suficiente sensibilidad, no ser totalmente específico y ser particularmente "caro" al requerir cantidades relativamente altas de sustrato, esto es, de eIF-2. Por esta razón, se recurrió a un ensayo mucho más sensible, específico y que economiza sustrato o eIF-2; aunque, tiene como desventaja su gran laboriosidad.

Básicamente, este ensayo de actividad proteína quinasa I, al que denominaremos Ensayo de Electroforesis y Autorradiografía o EEA, consiste en la fosforilación in vitro del eIF-2 en su subunidad α por la actividad quinasa a valorar, su posterior electroforesis en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS y

la obtención de su correspondiente autorradiografía, donde se visualiza y se mide dicha actividad. El ensayo se realiza en un volumen final de 50 μ l que contiene: HEPES-KOH 50 mM, pH 7,5; acetato potásico 150 mM; acetato magnésico 5 mM; 0,32 M de sacarosa; [γ - 32 P]ATP 25-50 μ M, 2-4 Ci/mmol, $4-8 \times 10^3$ cpm/pmol; y como sustrato, de 0,15 a 1,0 μ g de eIF-2 purificado. Sobre esta mezcla se añaden hasta 50 μ g de fracción proteica en la que se quiere valorar la actividad quinasa I que fosforila eIF-2 en la subunidad α , o de 0,05 a 0,15 de fracción altamente purificada de dicha actividad (ver a continuación). Después de 2 min de preincubación a 30°C, la reacción se inicia con la adición de [γ - 32 P]ATP y se incuba durante 10 min a la misma temperatura. En este ensayo, la utilización de un tampón y un medio distinto al de los ensayos ya descritos, se debe a un intento de reproducir las condiciones del sistema in vitro de síntesis de proteínas (Capítulo 24).

Una vez incubada la mezcla de reacción, ésta se detiene añadiendo 25 μ l de solución de parada (Capítulo 14) y se analiza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, realizada tal y como se ha descrito en el mismo capítulo. Los geles son lavados, deshidratados y secados para la obtención de su correspondiente autorradiografía (Capítulo 15). La identificación de la fosforilación en la subunidad α del eIF-2 o actividad proteína quinasa I, se realiza por comparación con un patrón introducido en el ensayo que contiene eIF-2 purificado.

Efectuada la identificación de la actividad proteína quinasa I, ésta se estudia por densitometría y/o medida de la radiactividad por extracción del gel de la banda α del factor eIF-2, para su posterior análisis cualitativo y cuantitativo. Los datos obtenidos correspondientes a la actividad proteína quinasa I, se expresan en unidades arbitrarias, si proceden de la densitometría, y en cpm o pmol incorporados (con un estándar de ≈ 5500 cpm/pmol) si proceden de la medida de su radiactividad. También se puede dar una actividad específica si dichos datos los expresamos por μ g ó mg de proteína que contiene la propia actividad quinasa I.



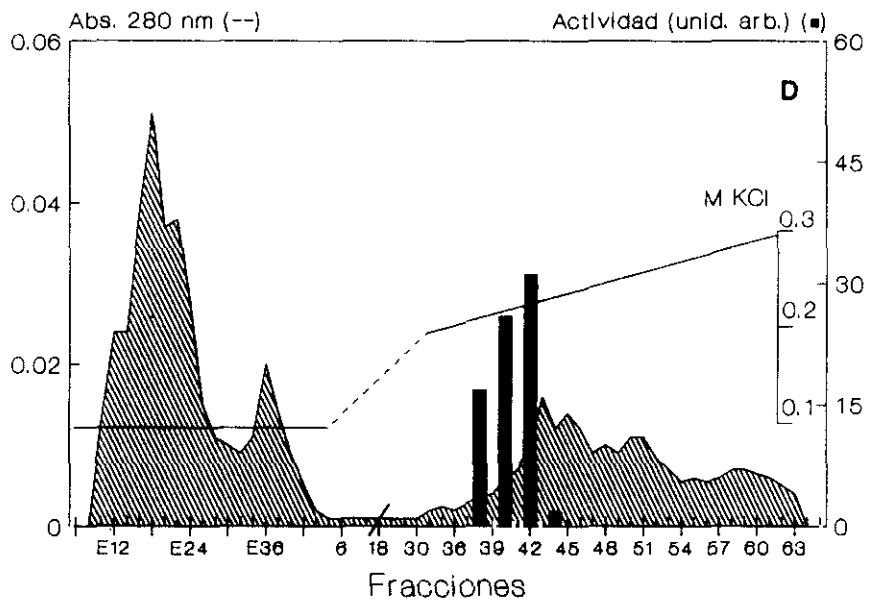
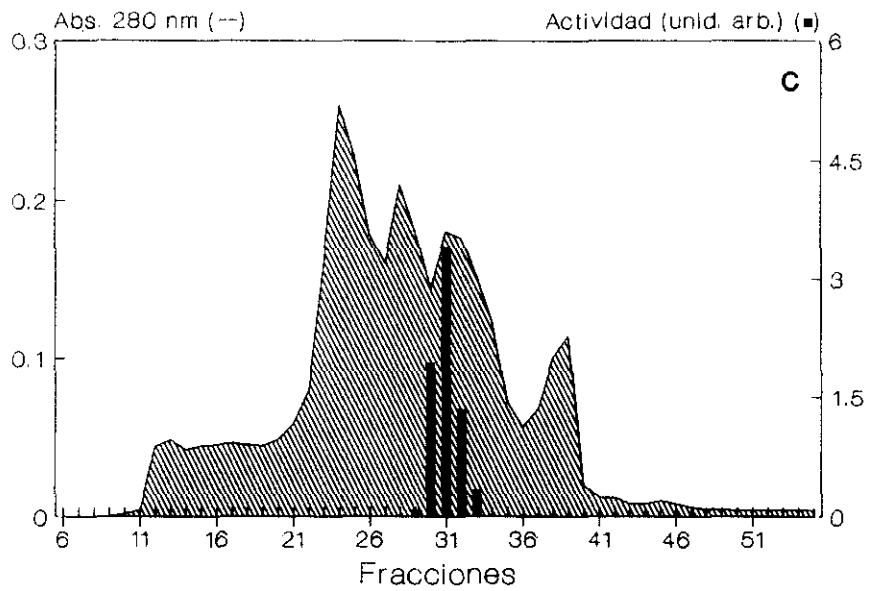


Figura 5. Purificación de Proteína Quinasa I por cromatografía en heparina-Sefarosa (A), Fosfocelulosa P-11 (B), Superosa 6 (C) y DEAE-5PW (D). La actividad PKI (■) se realizó con alícuotas de 10 ó 15 μ l y en presencia de 0.3 μ g de eIF-2. (-) actividad eIF-2 (máximo 10.000 cpm).

En la purificación de proteína quinasa I (PKI) se partieron de 2,7 kg de tejido fresco de cerebro de ternera, el cual se homogeneizó 1:4 (p:v) en tampón de homogeneización H (tampón H), el mismo que el empleado en la purificación del factor eIF-2 (Capítulos 10 y 16). Después se procedió de forma similar que en la purificación del factor eIF-2, es decir: se realizaron sucesivas centrifugaciones para la obtención del sobrenadante posmitocondrial PMS y del sobrenadante posmicrosomal S-100, el cual fué congelado a -70°C hasta su posterior utilización. Los 8,25 l de S-100 obtenidos, después de su descongelación, se fraccionaron mediante una precipitación con sulfato amónico del 30% al 60% y se dializaron en tampón C (Tris-HCl 20 mM, pH 7,6; 1 mM de EDTA; 7 mM de 2-mercaptoetanol; 0,5 mM de PMSF; y un 10% (p:v) de glicerol) con 0,2 M de KCl durante 12 h, obteniendo así la fracción SA, la cual se diluye con el mismo tampón de diálisis, hasta obtener una concentración de proteína ≤ 30 mg/ml.

La mitad del volumen final obtenido de la fracción SA (450 ml totales) se carga en una columna de heparina-Sefarosa (3x16 cm) equilibrada en tampón C con 0,2 M de KCl y a un flujo de 70 ml/h. Después de un lavado realizado en idénticas condiciones que la carga, la columna se eluye con un gradiente lineal, de 0,2 a 0,5 M de KCl en tampón C de 13 volúmenes de columna al mismo flujo, y se recogen fracciones de 14 ml. Dichas fracciones se ensayan para actividad eIF-2 y alícuotas reunidas en grupos se ensayan también para actividad proteína quinasa I (ensayo EEA) (Figura 5.A). Las fracciones que contienen las actividades eIF-2 y PKI se reúnen por separado, destinando las primeras para la purificación del factor eIF-2 y las segundas para la continuación de la purificación de PKI. Estas últimas fracciones (alrededor de 17), después de reunidas, se concentran y constituyen la fracción H, la cual se comprueba por conductividad que se encuentra a 0,3 M de KCl.

A continuación, ésta fracción se carga sobre una columna de Fosfocelulosa de 1,6x8 cm equilibrada en tampón C con 0,3 M de

KCl y a un flujo de 20 ml/h. La columna es lavada con el mismo tampón, y se eluye con un gradiente lineal 0,3-1,0 M de KCl en tampón C de 10 volúmenes de columna a igual flujo, recogiendo fracciones de 4,5 ml. Después de realizar el ensayo de actividad PKI (EEA) (Figura 5.B), las fracciones con mayor actividad se concentran al mínimo volumen posible, denominándose fracción P. Estas dos cromatografías descritas, se realizan una segunda vez para procesar el volumen restante de fracción SA.

Con las dos fracciones P reunidas se realiza una cromatografía de alta resolución utilizando una columna de filtración SuperosaTM 6 (Pharmacia) de 1x30 cm. Sobre esta columna se cargan 400 µl de fracción P, que se eluyen con tampón C de KCl 100 mM, a un flujo de 0,3 ml/min y recogiendo fracciones de 0,5 ml. Se realizaron sucesivas cromatografías para procesar la totalidad de la fracción P, efectuando el ensayo de actividad EEA sólo en una de ellas puesto que el procedimiento es altamente reproducible (Figura 5.C).

Las fracciones de mayor actividad PKI de las cromatografías en Superosa 6, se reúnen (denominándose fracción S) y se cargan sobre una columna de alta resolución Protein-PakTM DEAE-5PW (Waters) de 0,8x7,5 cm. Esta columna, equilibrada en tampón C con 0,1 M de KCl a un flujo de 0,3 ml/min, se eluye con un gradiente 0,1-0,5 M de KCl de 210 min (17 volúmenes de columna) en tampón C y al mismo flujo, recogiendo fracciones de 0,5 ml (Figura 5.D). Después de realizar el ensayo de actividad EEA, las fracciones con actividad PKI y las adyacentes a éstas, se congelaron a -70°C para su posterior utilización. Las dos fracciones que presentaron mayor actividad y mayor pureza de PKI, denominadas fracción D, fueron las empleadas en los experimentos y ensayos que se describen en los próximos capítulos de este trabajo. La purificación obtenida de PKI (de unas 2000 veces) y su rendimiento (del 0,1%), serán tratadas en el Capítulo 34 de Resultados. La proteína quinasa I de cerebro, purificada por este método, se encuentra libre de otras actividades proteína quinasa.

21. DIGESTION CON TRIPSINA Y SEPARACION DE FOSFOPEPTIDOS

Para comprobar las posibles diferencias entre las fosforilaciones producidas por distintas quinasas sobre el mismo sustrato, se recurre al análisis de fosfopéptidos obtenidos por hidrólisis parcial del sustrato fosforilado. La fosforilación por proteínas quinasas del sustrato, en nuestro caso eIF-2, se realiza de acuerdo al método descrito en el Capítulo 13.

La reacción de fosforilación se detiene añadiendo ácido tricloroacético (TCA) frío hasta una concentración final del 10% (p:v). A continuación se añaden 0,2 mg de albúmina y 1 ml de TCA frío al 10%, que tras agitación se centrifuga 5 min en una microfuga a máxima velocidad. El sedimento obtenido se resuspende en 100 µl de NaOH 0,2 M frío, que tras su agitación se lava con 1 ml de TCA frío al 5% con posterior centrifugación. Por último, el precipitado se resuspende en 1 ml de etanol:éter frío en proporción 1:1 y 1:3 (v:v), que tras agitación y centrifugación se lleva a sequedad a 30°C.

La hidrólisis parcial de la muestra fosforilada, se realiza por medio de una digestión con tripsina (tratada con TPCK). La mezcla o precipitado anterior se disuelve en 100 µl de tampón N-etil-morfolina 0,2 M, pH 8,2, y se añade tripsina (0,1 mg/ml) con una relación proteína:tripsina 20:1 (p:p). Esta mezcla se incuba durante 12 h a 37°C, después de la cual se lleva a 0,1% (p:v) de ácido trifluoroacético (TFA) y se conserva a -20°C hasta su posterior utilización. El estudio de los fosfopéptidos obtenidos con la digestión trípica se realiza por HPLC en fase reversa y su identificación mediante la radiactividad incorporada (191,192). Para la separación de los péptidos tríplicos se utiliza una columna Nova-PackTM C₁₈ (Waters) (5 µm, 3,9x150 mm) y con un gradiente variable de 0-80% (v:v) de acetonitrilo en TFA al 0,1% y un flujo de 0,5 ml/min. Con esta elución se recogen fracciones de 1 ml en las cuales se mide su radiactividad por radiación Cerenkov. La radiactividad final

incorporada se obtiene restando el valor que corresponde al ensayo efectuado sin eIF-2, el cual se toma como blanco de cada experimento.

22. ANALISIS DE FOSFOAMINOACIDOS

Inicialmente se realiza la fosforilación del eIF-2 por proteína quinasa I mediante las condiciones del ensayo EEA, tal y como se describe en el Capítulo 20. La incubación del ensayo de fosforilación (50 μ l) se detiene añadiendo 2 ml de H₂O fría. A continuación, el exceso de [γ -³²P]ATP se elimina con sucesivas diluciones (hasta 2 ml) y posteriores concentraciones (hasta 150 μ l) de la muestra realizados en microconcentradores. La muestra final, unos 150 μ l, se liofiliza y se hidroliza con HCl 6 M durante 2 horas a 110°C en vacío (193). El hidrolizado obtenido, una vez desecado, se resuspende en 25 μ l de H₂O y se somete a reacción con o-ftalaldehído (OPA).

Parada esta reacción, los correspondientes derivados de OPA se analizan inmediatamente por HPLC en fase reversa mediante una columna Ultrasphere-ODSTM C₁₈ (Beckman) (4,6x150 mm) y según el método descrito en (194). Se utiliza un detector de fluorescencia Gilson Spectra-Glo con una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 425 nm. La identificación de los fosfoaminoácidos se realiza midiendo la radiactividad obtenida cada 0,5 min de elución, y comparándola con una mezcla de estándares compuesta de fosfoserina, fosfotreonina y fosfotirosina, cuyos correspondientes derivados con OPA se analizaron en idénticas condiciones. La radiactividad final se obtiene restando los valores obtenidos de ensayos efectuados con sólo eIF2 o PKI, los cuales constituyen el blanco de la reacción.

23. TRANSFERENCIA E INMUNOPRECIPITACION

La inmunoprecipitación se realiza en membranas de nitrocelulosa de 0,22 μm con muestras procedentes de electroforesis y transferidas a dichas membranas. La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se realiza como se describe en el Capítulo 14, y su transferencia a la membrana de nitrocelulosa se efectúa durante 2 h a 0,8 mA/cm² en un sistema semiseco MultiphorTM II (Pharmacia-LKB). El rendimiento de la transferencia obtenida fue superior al 50%.

La membrana de nitrocelulosa con la muestra transferida, se incuba con anticuerpos policlonales específicos y posteriormente se revela. Todo el proceso se realiza a temperatura ambiente (22°C) y según métodos descritos con algunas modificaciones (195, 196). La membrana, una vez secada, se lava 10 min con tampón TBS (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 y NaCl 150 mM); se bloquea con TBS al 1% (p:v) de albúmina durante 1 h; a continuación se incuba toda una noche con el anticuerpo específico diluido 1:100 ó 1:50 (v:v) en TBS; se lava tres veces con TBS durante 10 min; posteriormente se incuba 1 h con anticuerpos anti-IgG conjugados con fosfatasa alcalina diluida 1:1.500 en TBS; y se lava otras tres veces con TBS unos 10 min. La membrana se seca de nuevo y se revela durante 30 min, según el método del sistema ProtoBlotTM (Promega), con una mezcla de NBT/BCIP en Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, 100 mM de NaCl y 5 mM de Cl₂Mg. El revelado se para con H₂O, seguidamente la membrana se lava de nuevo con H₂O y por último se seca para conservación y estudio de la muestra o proteína coloreada. Como control, se realiza un ensayo en ausencia de anticuerpos y otro en ausencia sólo de proteína.

24. SISTEMA DE SINTESIS DE PROTEINAS IN VITRO DE CEREBRO

Se han descrito varios sistemas libres de células obtenidos a partir de tejido cerebral, tanto en nuestro laboratorio como en

otros. Sin embargo, los valores de incorporación medidos en estos sistemas son mucho menores comparados con los obtenidos in vivo y la iniciación de la traducción de mRNA endógenos es baja (197, 198). Por ello nuestro primer paso se centró en la optimización del sistema de síntesis de proteínas de tejido cerebral, partiendo de un sobrenadante posmitocondrial de cerebro de rata, en el que se realizaron las siguientes modificaciones:

- I. Eliminación del ión Cl^- , el cual inhibe la etapa de iniciación.
- II. Tejido de animal lactante con mayor velocidad de síntesis.
- III. Homogeneización del tejido 1:2 (p:v), aumentando así la concentración del mismo y favoreciendo la incorporación.
- IV. Una concentración de aminoácidos de 25 a 50 μM , para evitar una carga inadecuada de tRNAs debido a las altas K_m de algunas aminoacil-tRNA sintetasas y para que el sistema sea además independiente de la concentración endógena de aminoácidos.
- V. Altas concentraciones de ATP, GTP y sistema regenerador de energía, puesto que los sistemas libres de células de mamíferos pierden su actividad rápidamente si los nucleótidos no se mantienen en los niveles adecuados.
- VI. Una temperatura de 30°C en lugar de 37°C, para aumentar el tiempo durante el cual el sistema permanece activo.

El nivel de síntesis de proteínas obtenido con las nuevas condiciones (Figuras 6.A y 6.B) es mayor que los descritos anteriormente y similar a los obtenidos con cultivos celulares (Tabla I) (166, 199, 200). Su actividad de síntesis de proteínas debida a la iniciación es de un 40 a un 50%, según señalan los datos de

TABLA I. Valores de síntesis de proteínas en sistemas in vitro de cerebro

<u>Animales</u>	<u>Conc. Leu (µM)</u>	<u>Incorporación Leu</u>		<u>Inhibición ATA</u>
		<u>cpm x 10⁻³/mg</u>	<u>pmol/mg PMS</u>	<u>pmol/mg</u>
Adulto*	3,4	274	12,0	8,0
Lactante*	5,3	648	44,6	34,5
Adulto	29,4	165	31,3	13,3
Lactante	31,3	522	105,1	54,1

El ensayo de síntesis de proteínas se realiza como se describe en este Apartado, con un tiempo de incubación de 45 min. El inhibidor ATA (75µM) se añade a los 5 min de incubación. Los valores calculados representan la media de seis experimentos y todos ellos con una S.E.M. menor del 10%.

* Según referencia 198.

inhibición obtenidos con edeina y ácido aurintricarboxílico (ATA) (Figura 6.C y Tabla I). Dicho sistema inicia la traducción de mRNAs tanto endógenos como exógenos, ya que la adición de mRNA de globina se traduce en la síntesis de una proteína que comigra con un patrón de globina comercial (Figura 7.). Esta síntesis de globina se inhibe completamente en presencia de los inhibidores de iniciación citados anteriormente.

En resumen, el método del ensayo de síntesis de proteínas de cerebro in vitro, es el que se describe a continuación. Como material biológico de partida se utiliza un sobrenadante posmitocondrial PMS de tejido fresco de cerebro de rata lactante (entre 4 y 10 días de edad). Dicho tejido se homogeneiza a 0-4°C en proporción 1:2 (p:v) con un tampón de homogeneización isotónico (HEPES-KOH 50 mM, pH 7,5; acetato potásico 140 mM; acetato magnésico 4 mM; DTT 2,5 mM; y sacarosa 0,32 M) y se centrifuga durante 10 min a 11.000g obteniendo el sobrenadante PMS, que es inmediatamente conservado en alícuotas a -70°C hasta un mes.

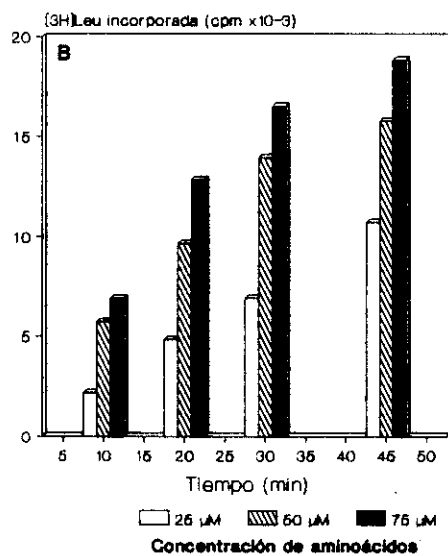
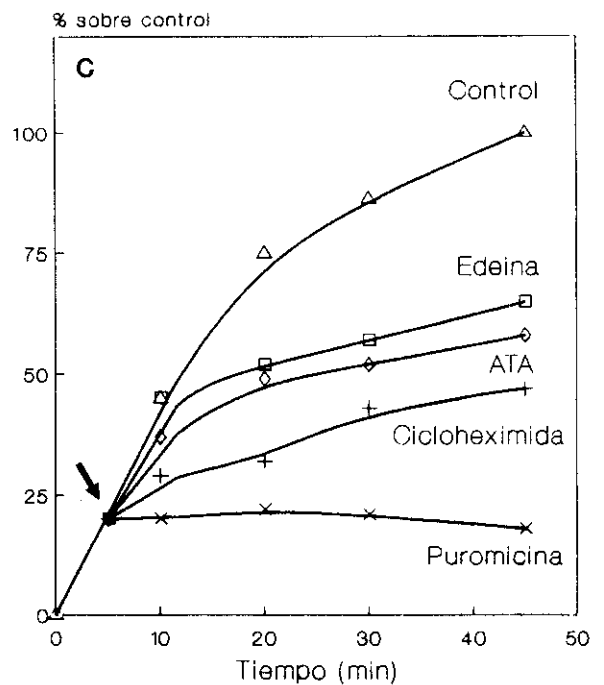
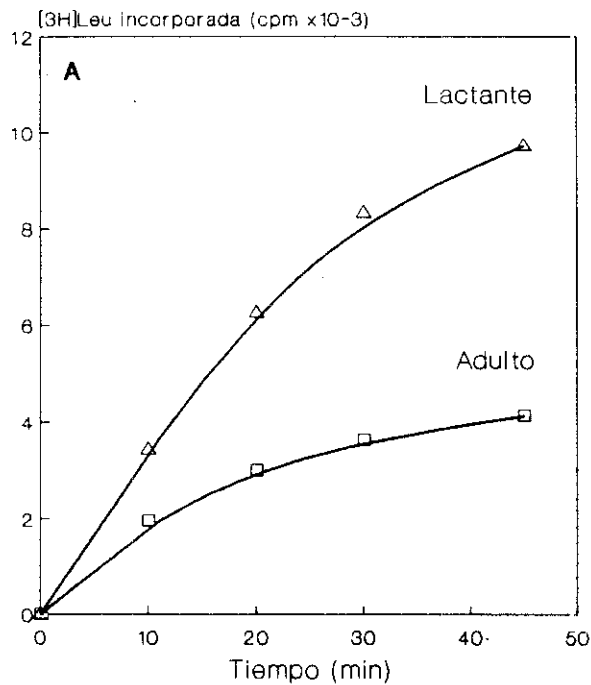


Figura 6. Síntesis de proteínas en un sistema in vitro de cerebro en función del tiempo. (A) Determinación de síntesis de proteínas en sobrenadante pos-mitocondrial obtenido de tejido cerebral de animales lactantes y adultos. La medida se realizó por incorporación de [3H]Leu a proteínas. (B) Síntesis de proteínas en función de la concentración de aminoácidos. Los valores se determinaron del experimento anterior correspondiente a animales lactantes, en presencia de 25, 50 y 75 μM de una mezcla de 20 aminoácidos. (C) Determinación de síntesis de proteínas en presencia de inhibidores. Los inhibidores edeína (75 μM), ácido aurintricarboxílico (ATA, 75 μM), cicloheximida (20 μM) y puromicina (25 μM), se añadieron a los 5 min de incubación (→). La medida de síntesis de proteínas se expresa en % sobre el control, tomado del experimento anterior a 25 μM de aminoácidos y considerando 100% el valor a 45 min.

El ensayo se realiza en un volumen de 50 μ l que contiene:

PMS 1,5-2,0 mg/ml (10 μ l)

HEPES-KOH 50 mM, pH 7,5

acetato potásico 150 mM

acetato magnésico 5 mM

DTT 0,5 mM

sacarosa 0,32 M

ATP 1 mM

GTP 0,75 mM

fosfocreatina 5 mM

fosfocreatina quinasa 0,1 mg/ml

mezcla de 20 aminoácidos, a 25 μ M cada uno

[³H]Leu 200 μ Ci/ml, 6,4 Ci/mmol, \approx 5.000 cpm/pmol.

..... - - -

Toda esta mezcla de reacción se incuba a 30°C extrayendo alícuotas de 10 μ l a tiempos de 10, 20, 30 y 45 min. La reacción se para añadiendo 1 ml de H₂O fría (0-4°C), a continuación se añaden 0,5 ml de KOH 1 M con 2 mg/ml de leucina durante 20 min a 37°C, para hidrolizar los aminoacil-tRNAs formados, y se precipita con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) frío al 25% (p:v) con 2 mg/ml de leucina durante 30 min a 0°C. Posteriormente, se filtran sobre filtros de fibra de vidrio con vacío de 400-500 mm de Hg, lavando tres veces con 2 ml de TCA frío al 10%. Los filtros se digieren en 2 ml de líquido de centelleo durante 1 hora con agitación.

La actividad de síntesis de proteínas se mide como incorporación de [³H]Leu a proteínas a los distintos tiempos de incubación, restando la obtenida a tiempo cero. Se puede expresar en cpm incorporadas, en pmol de [³H]Leu ó pmol de [³H]Leu/mg incorporados, y en % tomando como 100% el control incubado a 45 min.

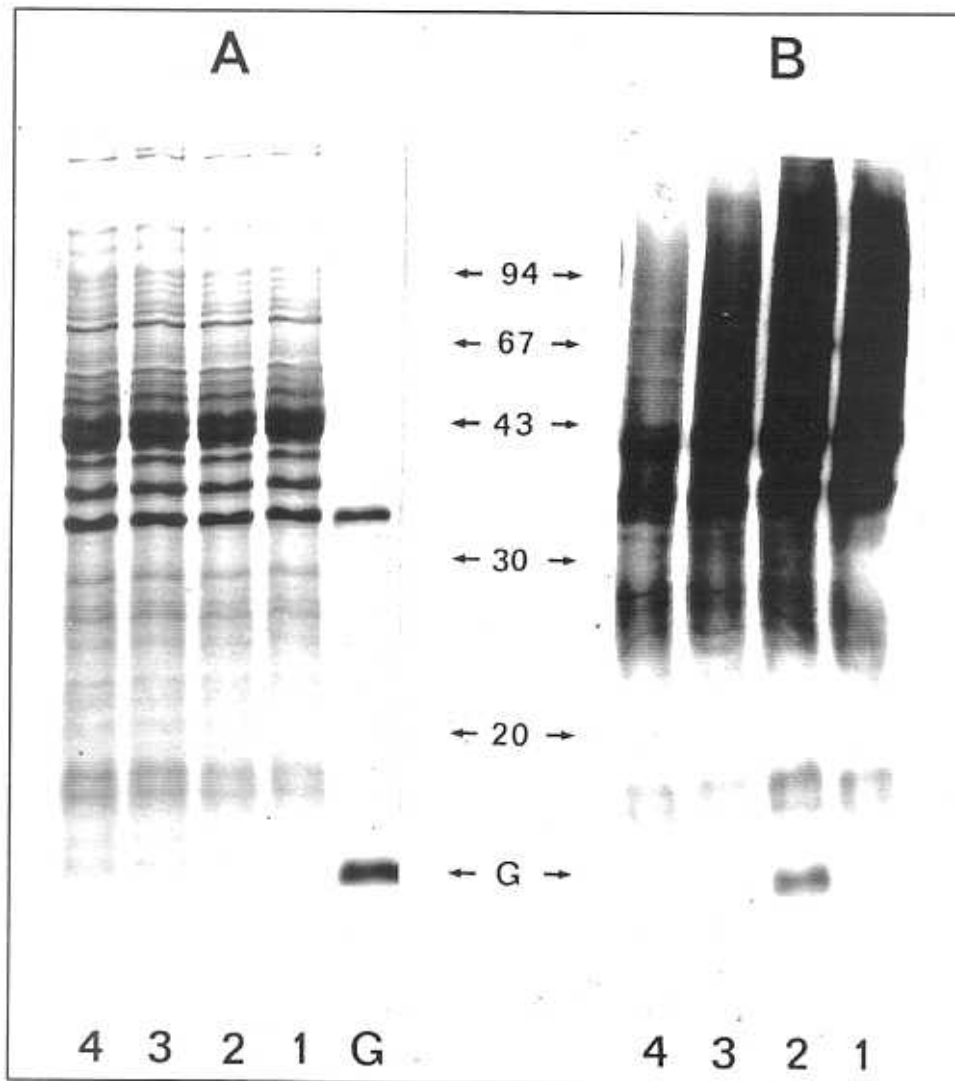


Figura 7. Traducción in vitro de mRNAs endógenos y exógeno por el sistema de síntesis de proteínas de cerebro. **(A)** electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS del sistema de síntesis de proteínas. **(B)** fluorografía del experimento anterior. El sistema de síntesis de proteínas se incubó en presencia de $[^{35}\text{S}]\text{Met}$ 500 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ durante 45 min, añadiendo mRNA exógeno o inhibidores al inicio de la reacción. Línea 1, sistema de síntesis de proteínas de cerebro con mRNAs endógenos; línea 2, experimento anterior con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de mRNA de globina; línea 3, experimento anterior en presencia de 75 μM de edeína; línea 4, experimento 2 en presencia de 75 μM de ATA. Las flechas indican la posición de los estándares de peso molecular utilizados ($\text{Mr} \times 10^{-3}$) y de la globina comercial purificada de eritrocitos de conejo (G).

25. PURIFICACION DE UN INHIBIDOR ACTIVADO POR N-ETILMALEIMIDA

Se realizó un tratamiento con N-etilmaleimida en algunas muestras de fracción S-100 y de cromatografías con DEAE-celulosa y Fosfocelulosa, previamente a su ensayo en el sistema de síntesis de proteínas (Capítulo 24). Dichas muestras fueron incubadas en presencia de 5 mM de N-etilmaleimida (NEM) durante 10 min a 30°C. Después de la incubación, el exceso de NEM se neutralizó con 10 mM de 2-mercaptoetanol y la fracción así tratada fué añadida al ensayo de síntesis de proteínas.

La purificación de éste inhibidor se inició con 370 mg de fracción posmicrosomal S-100, los cuales se aplicaron a una columna de DEAE-celulosa (2 x 16 cm) equilibrada en un tampón que contiene: Tris-HCl 20 mM, pH 7,6; EDTA 0,1 mM; PMSF 0,5 mM; 2-mercaptoetanol 7 mM; y un 10% de glicerol. La muestra se eluye con un gradiente 0,0-0,5 M de KCl en el mismo tampón a un flujo de 30 ml/h, recogiendo fracciones de 2,5 ml. Estas fracciones fueron reunidas de cuatro en cuatro y concentradas por ultrafiltración. Alícuotas de ellas fueron tratadas con N-etilmaleimida, según el procedimiento anteriormente descrito, y ensayadas en el sistema de síntesis de proteínas (Figura 8.A).

Las fracciones anteriores que producían una inhibición de la síntesis de proteínas, se reunieron y se ajustaron a 0,2 M de KCl, aplicándolas en una columna de Fosfocelulosa P11 (1 x 13 cm) equilibrada en el mismo tampón a 0,2 M de KCl. La muestra se eluye a un flujo de 10 ml/h con dicho tampón a 1,0 M de KCl. Las muestras no ligada y la ligada a la columna se concentraron, y alícuotas de ellas se trataron con NEM y se ensayaron en el sistema de síntesis de proteínas (Figura 8.B). A continuación, la actividad inhibitoria de síntesis de proteínas, fracción no ligada a Fosfocelulosa, se trató con NEM y se ajustó a 0,2 M de KCl, repitiendo de nuevo la cromatografía anterior. Las fracciones no ligadas y ligadas a Fosfocelulosa se concentraron, se ajustaron a 0,2 M de KCl y se ensayaron en el sistema de síntesis

de proteínas (Figura 8.C). La actividad inhibitoria de dicha síntesis se encontró en las fracciones ligadas a la columna, y corresponde a lo que denominamos inhibidor activado por N-etilmaleimida o NAI.

26. OTROS MATERIALES Y METODOLOGIA GENERAL

a) Cálculo de masas moleculares relativas

La inclusión del detergente aniónico SDS en las electroforesis permite el cálculo de pesos moleculares, al existir una relación lineal entre las movilidades electroforéticas de las proteínas y el logaritmo de sus pesos moleculares (201). Para ello se construye una recta patrón con estándares de proteínas de pesos moleculares conocidos y en relación a ellos se calcula el de nuestra proteína, por lo que se debe hablar de cálculo de pesos o masas moleculares relativas (M_r). Los estándares utilizados son: fosforilasa b de 94.000 Da, albúmina de 67.000 Da, ovalbúmina de 43.000 Da, anhidrasa carbónica de 30.000 Da, inhibidor de tripsina de 20.100 Da y α -lactalbúmina de 14.400 Da; todos ellos de Pharmacia.

Mediante una filtración en gel en condiciones no desnaturizantes, se puede calcular también el peso molecular relativo de una proteína en su estado nativo, al ser lineal la relación entre la elución de las proteínas y el logaritmo de sus pesos moleculares (202). La filtración se realiza sobre una columna de alta resolución SuperosaTM 6 (Pharmacia) a un flujo de 0,3 ml/min. En este caso la recta patrón se realiza con una mezcla de los siguientes estándares: tiroglobulina de 669.000 Da, ferritina de 440.000 Da, lactato deshidrogenasa de 140.000 Da, anhidrasa carbónica de 30.000 Da y lisozima de 14.300 Da.

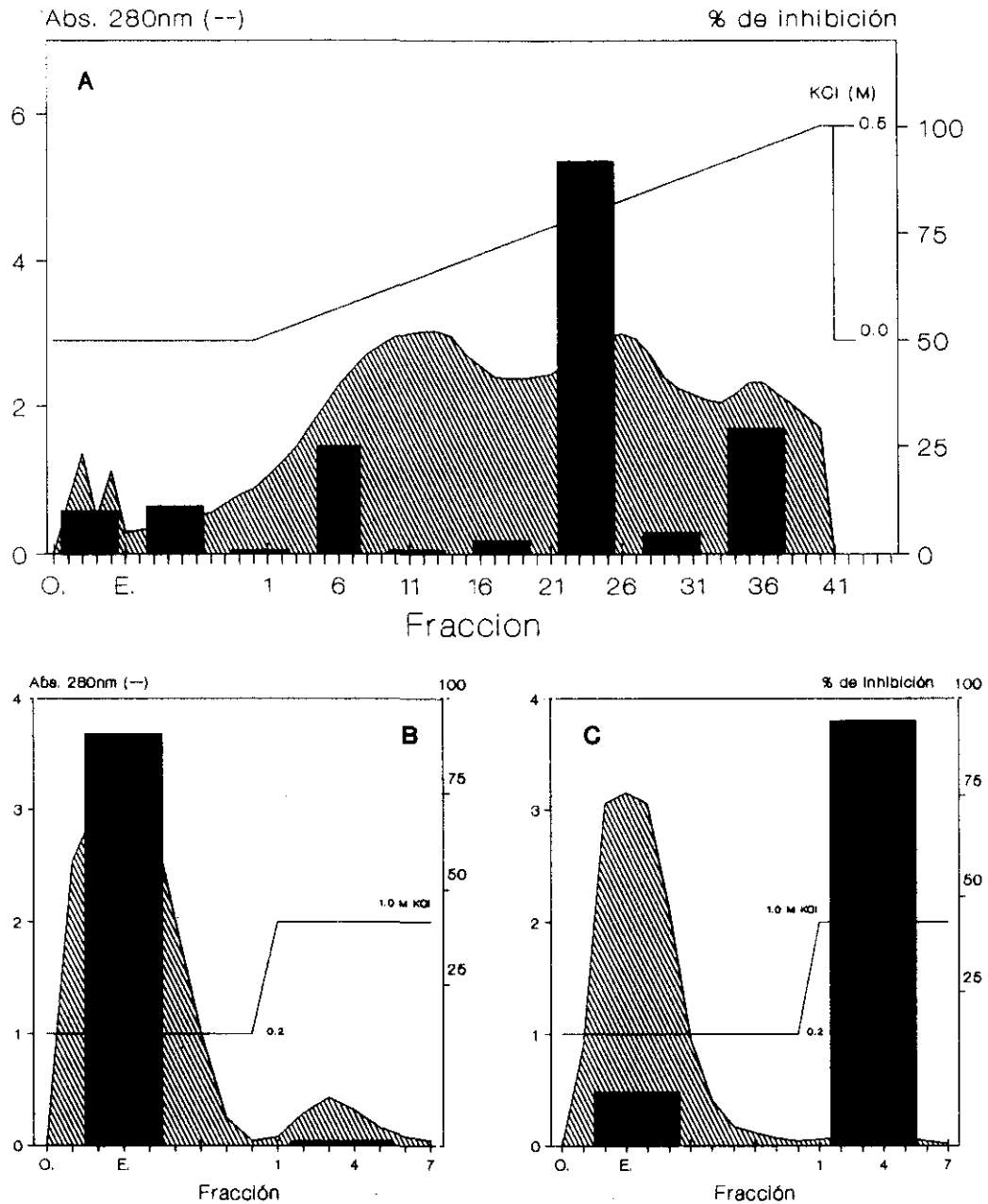


Figura 8. Purificación del inhibidor activado por N-etilmaleimida o NAI por cromatografías en DEAE-celulosa (**A**) y Fosfocelulosas P11 (**B,C**). La actividad NAI (■) se realizó con alícuotas de 3 ó 5 μ l por inhibición de incorporación de [3 H]Leu a proteínas en 45 min y expresándolo en %. (**A,B**) alícuotas preincubadas con N-etilmaleimida. (**C**) muestra incubada con N-etilmaleimida antes de su cromatografía

b) Centrifugación y Ultracentrifugación

Las centrifugaciones se efectuaron con refrigeración a 4°C en centrifugas Beckman J-21B (rotores JA-14 y JA-20) y Sorvall RC-5 (rotores GSA y SS-34). Las ultracentrifugaciones se realizaron a la misma temperatura en centrifugas Beckman L5-50 y L7-55 y rotores 50 Ti y 50.2 Ti.

c) Concentración

La concentración de las muestras se realizó principalmente por ultrafiltración en células de Amicon con membrana PM10 y atmósfera de N₂, y en microconcentradores CentriconTM 10 (Amicon) para volúmenes menores de 2 ml.

d) Conductividad

Los datos de concentración iónica se realizaron midiendo la conductividad con un conductímetro Crison 525, convirtiéndola a molaridad por interpolación en una curva estandar obtenida con el mismo ión.

e) Densitometría y Espectrofotometría

Las medidas espectrofotométricas y densitometrías se realizaron en aparatos Beckman DU-6 y DU-8B, E-C 910 y 934 Software, LKB Uvicor SD y Pharmacia UV-M.

f) Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realiza según el método de Bradford (203) utilizando albúmina de suero bovino como estándar. También se efectuó la determinación de proteínas por densitometrías de geles de poliacrilamida en presencia de SDS teñidos con plata, y empleando albúmina como patrón. Los datos obtenidos definen una representación lineal con un coeficiente

de regresión de 0,99 análogo al resultado con el método de Bradford.

g) Diálisis

Las diálisis se realizan en al menos 100 veces el volumen de la muestra, durante 12-14 h a 4°C con agitación suave y en tripas de un límite de exclusión de 12 a 14 kDa (tratadas previamente con 10 mM de EDTA y 0,1 M de carbonato sódico durante 10 ó 20 min a 100°C). La muestra ya dializada se centrifuga a 700g durante 5 min para eliminar posibles precipitados.

h) Fraccionamiento con sulfato amónico

El porcentaje de saturación de sulfato amónico a utilizar se añade en frío, lentamente, y vigilando el pH. Después de una agitación suave de 30 min a 4°C, se centrifuga a 17.000g durante 30 min, el precipitado final se resuspende en el volumen deseado del tampón a utilizar y se dializa frente al mismo tampón a 4°C.

i) Otros productos bioquímicos y reactivos

Sales y ácidos orgánicos e inorgánicos, colorantes, material de electroforesis, proteínas, metabolitos, etc., de Bio-Rad, Boehringer Mannheim, Carlo Erba, Merck, Panreac, Pharmacia-LKB, P.L. Biochemicals, Promega, Scharlau y Sigma.

RESULTADOS

27. OBTENCION DEL FACTOR DE INICIACION eIF-2

La obtención del factor eIF-2 se realizó como está descrito en el Capítulo 16 de Materiales y Metodos. Con el eIF-2 purificado de la fracción cIF por este método se construye la Tabla II, en ella se muestra que el factor se purifica unas 300 veces con un rendimiento del 1,1%. Con la modificación posterior del método indicada en dicho capítulo el rendimiento se elevó al 4,5%. También se realizó la purificación del eIF-2 existente en el sobrenadante posmicrosomal o fracción S-100. Dicha purificación se efectuó con el mismo esquema anterior, partiendo de 37 g de sobrenadante S-100, con una actividad específica de 0,35 U/mg, y obteniendo una purificación de unas 3100 veces con un rendimiento de 1,8%.

El factor eIF-2 purificado de la fracción cIF se muestra en la Figura 9., se compone de las tres subunidades α , β y τ , y está completamente libre de fosforilación endógena. La subunidad α es la menor con 39.000 de peso molecular relativo, seguida de τ con 50.000 y β de 54.000. El análisis desitométrico de la electroforesis con SDS del eIF-2 nos da una relación entre las subunidades $\beta:\tau:\alpha$ de 1:1:0,8-1, confirmándonos su estructura $\alpha\beta\tau$ con un peso en su forma nativa de unos 143.000. La pureza obtenida fué entre un 95% y un 99%. La pureza del factor obtenido de la fracción S-100 sólo se aproximó a un 95%, por lo que dicho eIF-2 no se ha empleado en los experimento de esta Tesis.

28. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE CASEINA QUINASA II

PURIFICACION

El sobrenadante posmicrosomal procedente de cerebro de ternera es sometido a cromatografía en DEAE-celulosa y en ella se identifican las actividades proteína quinasa por la incorporación de ^{32}P a caseína (en presencia y ausencia de heparina,

TABLA II
Purificación del factor eIF-2 de corteza cerebral

<u>Fracción</u>	<u>Proteína (mg)</u>	<u>Actividad Total*</u>	<u>Actividad Específica#</u>	<u>Rendim. (%)</u>	<u>Purif.</u>
cIF	2904	4065	1,4	100	1
Sulfato Amónico	1898	4426	2,3	109	1,6
Heparina Sefarosa	46	2241	49,2	55	35
Fosfoce-lulosa	4,8	982	204,7	24	146
GDP-Agar.	0,1	43	431,2	1,1	308

* Una unidad de actividad se define como 1 pmol de Met-tRNAi incorporado por 10 min
Expresado en unidades de actividad/mg

Capítulo 17 de Materiales y Métodos), histona H1 en presencia de calcio y fosfolípidos, e histonas en presencia de AMP cíclico (Figura 2.A). Esta cromatografía nos diferencia un pico de actividad quinasa en el material no ligado a la columna y tres picos de actividad quinasa en el material eluido con el gradiente. La actividad presente en el material no ligado y en el primer pico eluido con el gradiente (0,15 a 0,22 M de KCl), el cual es activado en presencia de calcio y fosfolípidos, corresponde al perfil de elución descrito para la proteína quinasa C (PKC) (204). La actividad proteína quinasa dependiente de AMP cíclico se eluye en el segundo pico a una concentración de 0,22 a 0,28 M de KCl, tal y como ha sido descrito por Hathaway y Traugh (149) e identificado como la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) de tipo II. El tercer pico, con una actividad quinasa independiente de AMP cíclico o de calcio/fosfolípidos (0,25 a 0,30 M de KCl) y con alta inhibición por heparina (80%), es identificado como caseína quinasa II (CK II), y muestra un patrón similar de elución que la descrita en reticulocitos de

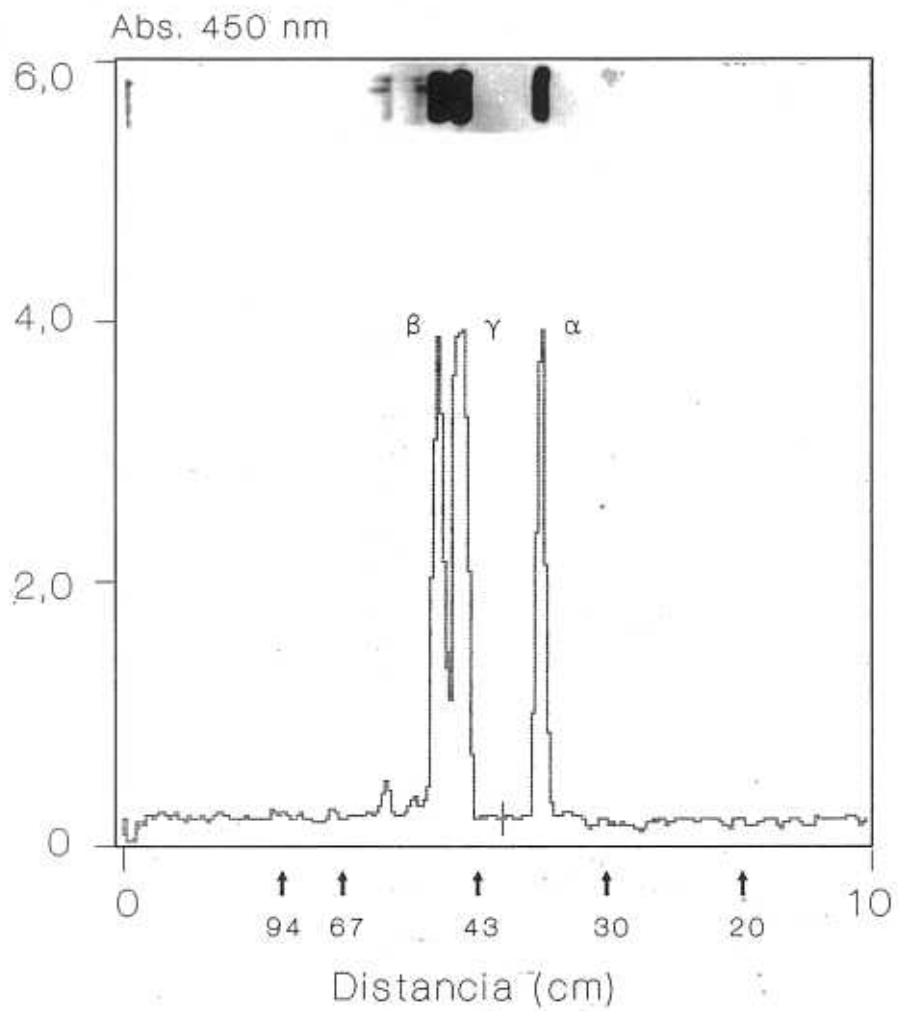


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y densitometría de eIF-2 (1 μ g) purificado de corteza cerebral. Las flechas indican las posiciones de los estándares de peso molecular utilizados ($M_r \times 10^{-3}$).

conejo (149). Sin embargo, no se han encontrado otras actividades proteínicas descritas por estos autores (proteína quinasa dependiente de AMP cíclico de tipo I y caseína quinasa I).

Estas mismas tres actividades proteínicas se ensayan en la cromatografía sobre Fosfocelulosa, pero sólo la actividad caseína quinasa eluye en ésta columna (Figura 2.B). La mayor parte del material no es adsorbido por la columna, y es en esta fracción donde se localiza la actividad quinasa dependiente de AMP cíclico. Con el gradiente eluyen dos picos de actividad caseína quinasa (de 0,75 a 1,025 M de KCl), descartándose sus primeras cinco fracciones por su baja inhibición con heparina. Según todo este procedimiento, en los dos últimos pasos de purificación sólo está presente la actividad caseína quinasa II.

La cromatografía en fosvitina-Sefarosa nos muestra un sólo pico (de 0,5 a 0,7 M de KCl) de actividad caseína quinasa con una inhibición por heparina del 88%, este pico de actividad eluye muy próximo al pico de proteína eluida (Figura 2.C). El perfil de elución de la actividad caseína quinasa de la cromatografía en ATP-agarosa se muestra en la Figura 2.D. En ella los picos de proteína y actividad eluyen de 0,5 a 1,0 M de KCl con una inhibición por heparina cercana al 100%. Una pequeña proporción de la actividad quinasa eluye con el material no ligado a la columna, fenómeno que continúa repitiéndose empleando menor cantidad de muestra, por lo que este hecho no se debe a saturación de la columna. La enzima purificada por este procedimiento pierde actividad rápidamente, y puede ser conservada a 4°C durante dos semanas a una concentración de al menos 1 mg/ml y en presencia de KCl 0,25 M.

La Tabla III resume la purificación de caseína quinasa II de cerebro de ternera. En ella se observa que la enzima se purifica unas 3.000 veces, obteniéndose entorno al 9% de rendimiento y se encuentra libre de otras actividades proteínicas.

TABLA III
Purificación de Caseína Quinasa II de cerebro

<u>Fracción</u>	<u>Proteína (mg)</u>	<u>Actividad Total*</u>	<u>Actividad Específica#</u>	<u>Purif.</u>
Sobrenadante	15.792	7.201	0,4	1
DEAE-Celulosa	1.984	7.023	3,5	8
Fosfocelulosa	11	1.387	126	276
Fosvitina-Sefarosa	3	1.001	351	770
ATP-Agarosa	0,5	633	1.376	3.018

* Una unidad de actividad se define como la incorporación de 1 nmol de fosfato a caseína por 10 min
Expresado en unidades de actividad/mg

ESTRUCTURA

La CK II purificada es analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y en ella se observan tres bandas mayoritarias con unas masas moleculares relativas de 42.000 (α), 38.000 (α') y 27.000 (β) (Figura 10.) con una relación de 2,6:1,0:1,3 para las subunidades α : α' : β respectivamente y un grado de pureza del 87% en la preparación de la enzima. Cuando la enzima se incuba con [γ - ^{32}P]ATP y se analiza con electroforesis y posterior autorradiografía, sólo se detecta ^{32}P asociada exclusivamente con la proteína de 27.000.

También se realizó electroforesis en condiciones no desnaturizantes seguida de extracción y medida de su actividad, para ver su peso molecular en su estado funcional. Los resultados se muestran en la Figura 11. y nos dan un peso molecular para la holoenzima entre 500.000 y 650.000, que responderían a distintos estados de agregación.

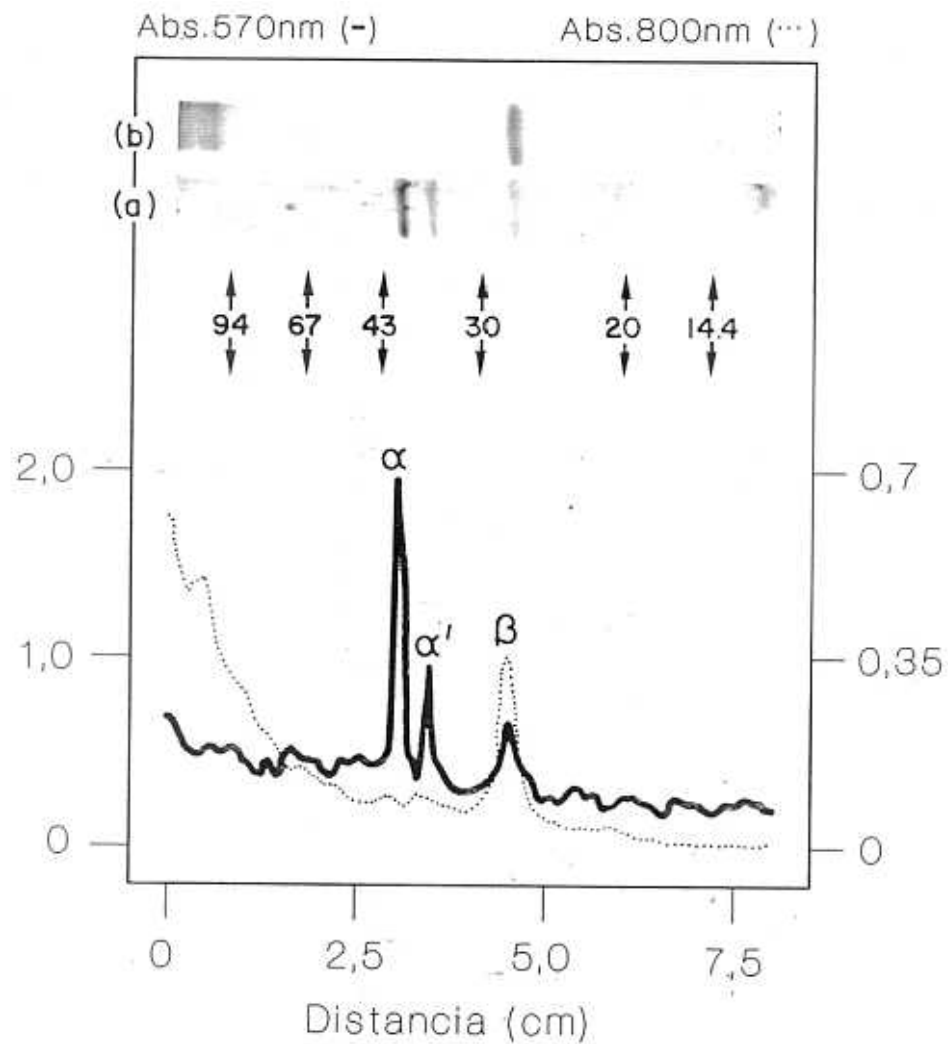


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y densitometría de Caseína Quinasa II (5 μ g) purificada de cerebro e incubada en presencia de [T-32P]ATP. (-) densitometría del gel **(a)**. (···) densitometría de su autorradiografía **(b)**. Las flechas indican las posiciones de los estándares de peso molecular utilizados ($M_r \times 10^{-3}$).

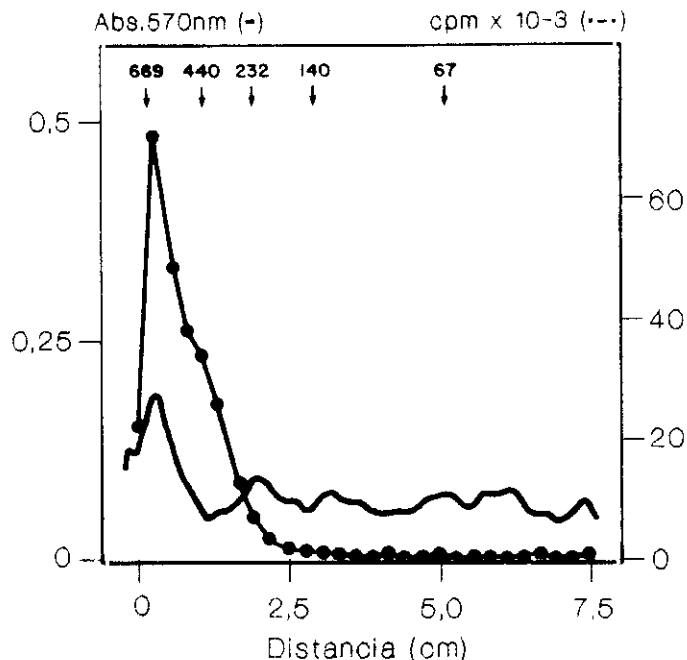


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante de Caseína Quinasa II purificada (10 μ g). (-) Densitometría del gel. (---) Actividad proteína quinasa de la enzima medida con posterioridad a su extracción del gel. Las flechas indican los estándares utilizados (Mr x 10⁻³).

ESPECIFICIDAD DE DONADOR DE GRUPOS FOSFATO

Una de las principales diferencias entre la caseína quinasa I y la II es el hecho de que CK II emplea como donador de grupos fosfato tanto ATP como GTP, mientras que caseína quinasa I sólo puede utilizar ATP (143). Como se muestra en la Figura 12. cuando la actividad específica del donador de grupos fosfatos ATP se reduce por incremento de las concentraciones de ATP o GTP, la disminución de la incorporación de ³²P es sólo ligeramente menor con GTP que con ATP, lo cual indica que la enzima purificada utiliza ambos nucleótidos como sustratos.

PROPIEDADES CINÉTICAS

Los parámetros cinéticos se determinan con medidas de la actividad quinasa variando las concentraciones de ATP en presencia de diferentes niveles de aceptores de grupos ³²P como

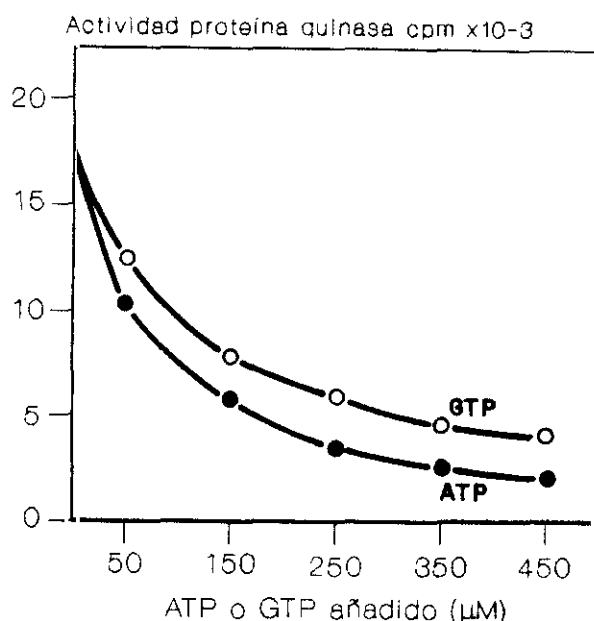


Figura 12. Especificidad de donador de grupos fosfato de Caseína Quinasa II. La actividad de la enzima purificada (0,37μg) se midió con caseína (5 mg/ml) como sustrato. La reacción fué incubada durante 1 min y la actividad específica del [T-32P]ATP (50mCi/mmol) fué reducida con la adición de ATP o GTP.

fosvitina y caseína (datos no mostrados) y viceversa. El resultado del análisis usando fosvitina como aceptor de grupos fosfato se muestra en la Figura 13. Las constantes cinéticas para la reacción catalizada por CK II se obtienen según representación de Lineweaver-Burk (205). La K_m calculada para ATP es de 12,5 μM y 25,1 μM empleando como sustratos fosvitina o caseína (datos no mostrados) respectivamente. La enzima presenta una mayor afinidad por fosvitina ($K_m = 0,91$ mg/ml) que por caseína ($K_m = 1,43$ mg/ml). Por el contrario, la V_{max} de la reacción es mayor para caseína (479 nmol/min/mg) que para fosvitina (315 nmol/min/mg proteína) como sustrato.

ESPECIFICIDAD DE SUSTRATOS Y MODULADORES

Para probar que CK II es la única proteína quinasa presente en nuestra preparación y que es independiente de diversos activadores, hemos realizado ensayos de actividad quinasa con

$1/V \times 1000 \text{ (pmol/min)}^{-1}$

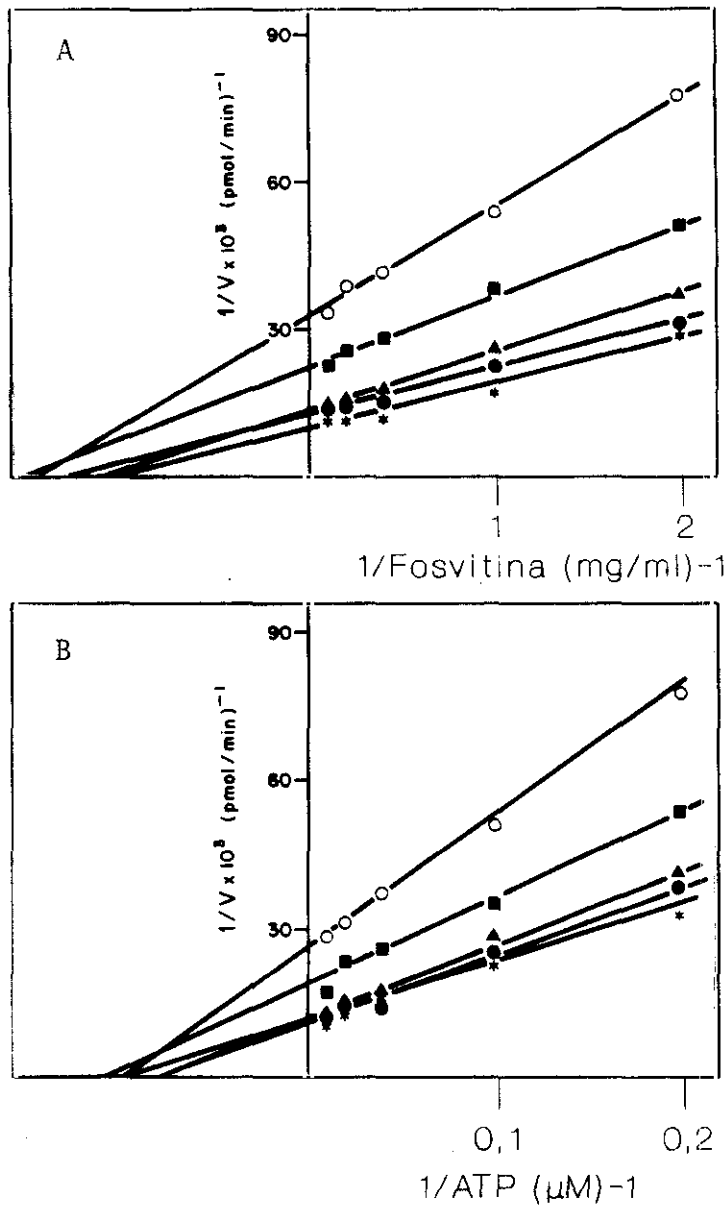


Figura 13. Representación de Lineweaver-Burk para el cálculo de las constantes cinéticas de Caseína Quinasa II con fosvitina y ATP. La reacción se realizó con 0,37 μg de enzima purificada y 1 min de incubación. (A) Dobles inversos de la reacción dependiente de fosvitina y a distintas concentraciones de ATP (5, 10, 25, 50 y 100 μM). (B) Dobles inversos de la reacción dependiente de ATP y a diferentes concentraciones de fosvitina (0,5, 1, 2,5, 5 y 10 mg/ml).

TABLA IV
Especificidad de CK II de sustratos y moduladores

<u>Sustratos</u>	<u>Moduladores</u>	<u>Concentración</u>	<u>Actividad*</u>	
			<u>S-100</u>	<u>CK II</u>
Caseína	-	1 mg/ml	13,3	420,2
	heparina	5 µg/ml	7,4	21,0
Fosvitina	-	1 mg/ml	26,8	494,5
	heparina	5 µg/ml	6,7	9,9
Histonas	-	1 mg/ml	51,9	11,6
	cAMP	10 µM	235,1	11,7
	cGMP	20 µM	143,2	8,8
	polyIC	4 µg/ml	60,2	8,5
Histona H1	-	1 mg/ml	98,2	17,1
	calcio	0,5 mM	94,3	19,3
	+ PL	+0,3 mg/ml	137,5	17,9

* La actividad se expresa como el total de pmol de fosfato incorporados por 10 min. Los sustratos son fosforilados en presencia y ausencia de los diferentes moduladores con fracción citosólica (S-100, 28 µg) y CK II purificada (0,55 µg).

diversos sustratos y moduladores empleando S-100 y CK II purificada. Como se muestra en la Tabla IV, de los sustratos empleados; la fosvitina y la caseína son mucho más activos como aceptores de grupos ^{32}P , que las histonas ensayadas. Por otra parte, también puede observarse que todos los moduladores estudiados afectan a las diferentes actividades proteína quinasa presentes en la fracción S-100 (excepción hecha por la calmodulina debido a su inactivación durante el proceso de purificación). Sin embargo, en estos mismos experimentos realizados con la enzima purificada CK II, solamente con la heparina se observa un claro efecto inhibitor, no encontrándose ningún efecto con la adicción de nucleótidos cíclicos, calcio y calmodulina, calcio y fosfolípidos o poli(I)·poli(C).

EFFECTO DE CATIONES, HEPARINA Y ESPERMINA

La reacción catalizada por la quinasa requiere la presencia de cationes divalentes. La óptima actividad quinasa se ha encon-

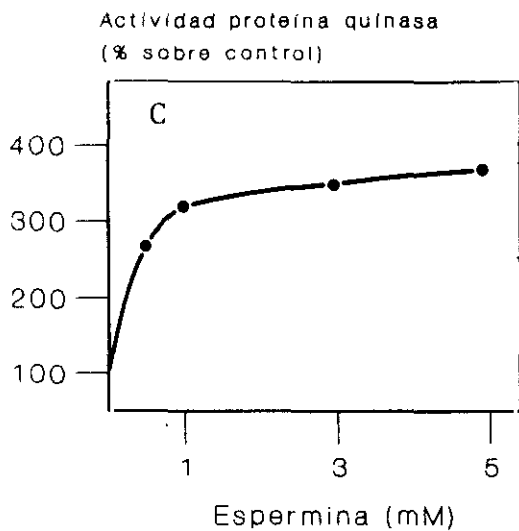
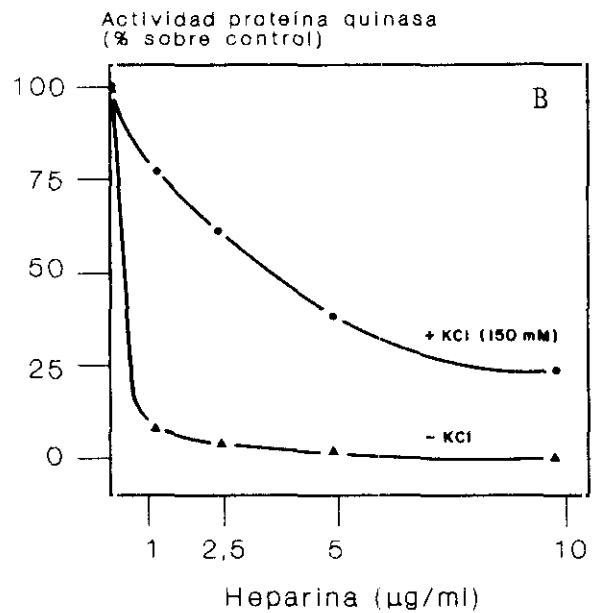
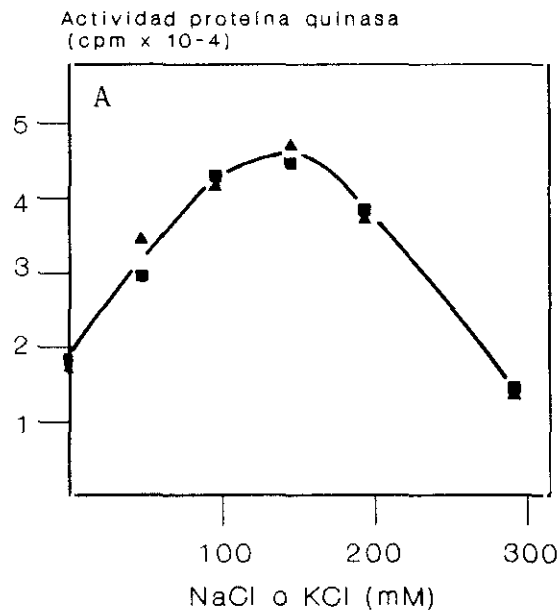


Figura 14. Efecto de cationes, heparina y espermina sobre la actividad de Caseína Quinasa II. La actividad de la enzima purificada (0,37 µg) se midió con caseína como sustrato (5 mg/ml) y 1 min de incubación. (A) Efecto de NaCl (▲) o KCl (■). (B) Efecto de heparina en ausencia (▲) y presencia (●) de 150 mM de KCl. (C) Efecto de espermina en presencia de 5 mM de Mg²⁺ del ensayo.

trado con concentraciones de Mg^{2+} entre 5 y 10 mM usando caseína como sustrato (datos no mostrados). La caseína quinasa II de cerebro de ternera se estimula progresivamente hasta 150 mM de KCl o NaCl (Figura 14.A), concentraciones superiores disminuyen esta activación y valores superiores a 400 mM producen inhibición (datos no mostrados).

Una de las principales características de la caseína quinasa II es su inhibición producida por heparina (149). Como puede verse en la Figura 14.B, CK II de cerebro es casi completamente inhibida por concentraciones de heparina de 1 μ g/ml (92%). En presencia de KCl 150 mM la misma concentración de heparina produce solamente una inhibición del 23% en la actividad de la enzima.

Las poliaminas han sido señaladas como estimuladoras de caseínas quinasas (155), por ello hemos estudiado su efecto en la actividad de CK II de cerebro. Como se muestra en la Figura 14.C, en presencia de 5 mM de Mg^{2+} , la espermina a una concentración de 1 mM incrementa tres veces la actividad de CK II.

29. PURIFICACION DE LAS PROTEINAS QUINASAS C y DEPENDIENTE DE AMP CICLICO

Con el método de purificación para proteína quinasa C (PKC), descrito en el Capítulo 18 de Materiales y Métodos (Figura 3.), se obtiene un rendimiento de un 1,5% y una purificación de unas 200 veces. La PCK purificada de cerebro se encuentra libre de otras actividades proteína quinasa.

La purificación de proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) se describe en el Capítulo 19 del apartado anterior (Figura 4.). Con el método descrito, PKA se purifica unas 550 veces, con un rendimiento del 10% y se encuentra libre de otras actividades proteína quinasa.

30. FOSFORILACION DEL FACTOR eIF-2 EN LA SUBUNIDAD β POR CASEINA QUINASA II Y PROTEINAS QUINASAS C Y DEPENDIENTE DE AMP CICLICO

Los densitogramas de la autorradiografías, obtenidos en la incubación de las proteínas quinasas CK II, PKC y PKA con eIF-2 en presencia de [τ - 32 P]ATP y posterior separación en electroforesis con SDS (Figura 15.), muestran a la misma escala el diferente grado de fosforilación de la subunidad β producido por las tres distintas proteínas quinasas. Así, CK II fosforila dicha subunidad en mucha mayor medida que PKC y ésta más que PKA. La integración de dichos picos de fosforilación de la subunidad β producida por las quinasas CK II, PKC y PKA dan una relación 17,5:3,7:1,0 respectivamente. La fosforilación de esta última proteína quinasa (PKA), a pesar de ser mucho menor, no ofrece dudas cuando se sobreexpone la autorradiografía (Figura 15. cuadro PKA"s"), donde también se puede observar la autofosforilación de la propia PKI.

31. CARACTERIZACION DE LA FOSFORILACION DE LA SUBUNIDAD β DEL FACTOR eIF-2

Para determinar si la fosforilación del eIF-2 de cerebro por las tres proteínas quinasas mencionadas tiene lugar en los mismos o diferentes lugares, el factor marcado radiactivamente es analizado por mapas de fosfopéptidos tripsicos en HPLC (Figura 16.). Cada proteína quinasa da un patrón diferente de fosfopéptidos. El mapa de eIF-2 fosforilado por CK II presenta 2 fosfopéptidos mayoritarios (h, j) y 4 minoritarios (b, e, g, i), mientras que PKC contiene principalmente uno (h) además de 4 secundarios (b, c, d, g) y por último, PKA que sólo muestra cuatro fosfopéptidos (a, c, d, f). Ello nos indicaría, al menos, la fosforilación de eIF-2 β por cada una de las distintas quinasas estudiadas (CK II, PKC y PKA) en 1 o más sitios, y en diferentes y específicas posiciones, si bien también poseen

TABLA V. Radiactividad ^{32}P en los fosfopéptidos tríplicos obtenidos de la fosforilación de eIF-2

<u>Pico:</u>	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>d</u>	<u>e</u>	<u>f</u>	<u>g</u>	<u>h</u>	<u>i</u>	<u>j</u>	<u>Relación#</u>
CK II		344*			564		521	6647	413	3182	20,3
PKC		111	109	110			175	720			2,1
PKA	143		207	121		104					1,0

* Los valores representan las cpm incorporadas en cada fosfopéptido

La relación se calcula con los datos normalizados de las cuentas totales, considerando a PKA como la unidad

posiciones comunes. Los picos * y ** no se consideran fosfopéptidos de la digestión tríplica de la fosforilación del eIF-2, debido a que corresponden al volumen eluido del material no ligado a la columna y al lavado final respectivamente.

La Tabla V muestra las cpm incorporadas en los picos separados por HPLC y obtenidos de la fosforilación del eIF-2 para cada una de las proteínas quinasas ensayadas. La recuperación total de las cpm incorporadas mantiene una relación de 20,3:2,1:1,0 para CK II, PKC y PKA respectivamente; relación muy similar a la obtenida en los densitogramas de la fosforilación de la subunidad β (Capítulo 30).

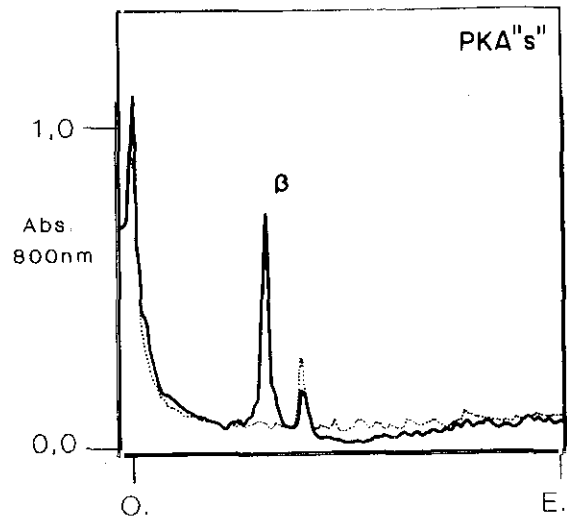
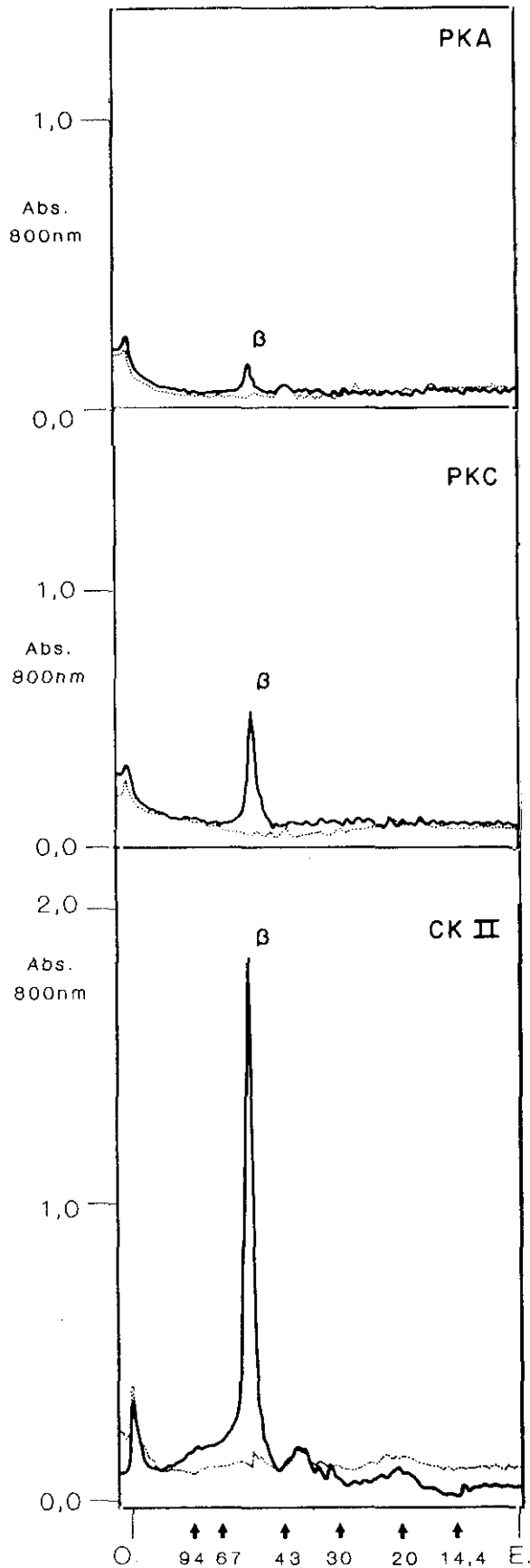


Figura 15. Autorradiogramas de las electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS del factor eIF-2, incubado con las proteínas quinasas CK II, PKC y PKA en presencia de [^{32}P]ATP. La reacción se realizó en presencia (-) y ausencia (..) de eIF-2 (1,5 μg) purificado, 0,5 μg de la correspondiente proteína quinasa purificada y 2 min de incubación. **PKA "s"** indica la sobreexposición del experimento de PKA. O. origen y E. final del gel. Las flechas indican las posiciones de los estándares de peso molecular utilizados ($\text{Mr} \times 10^{-3}$).

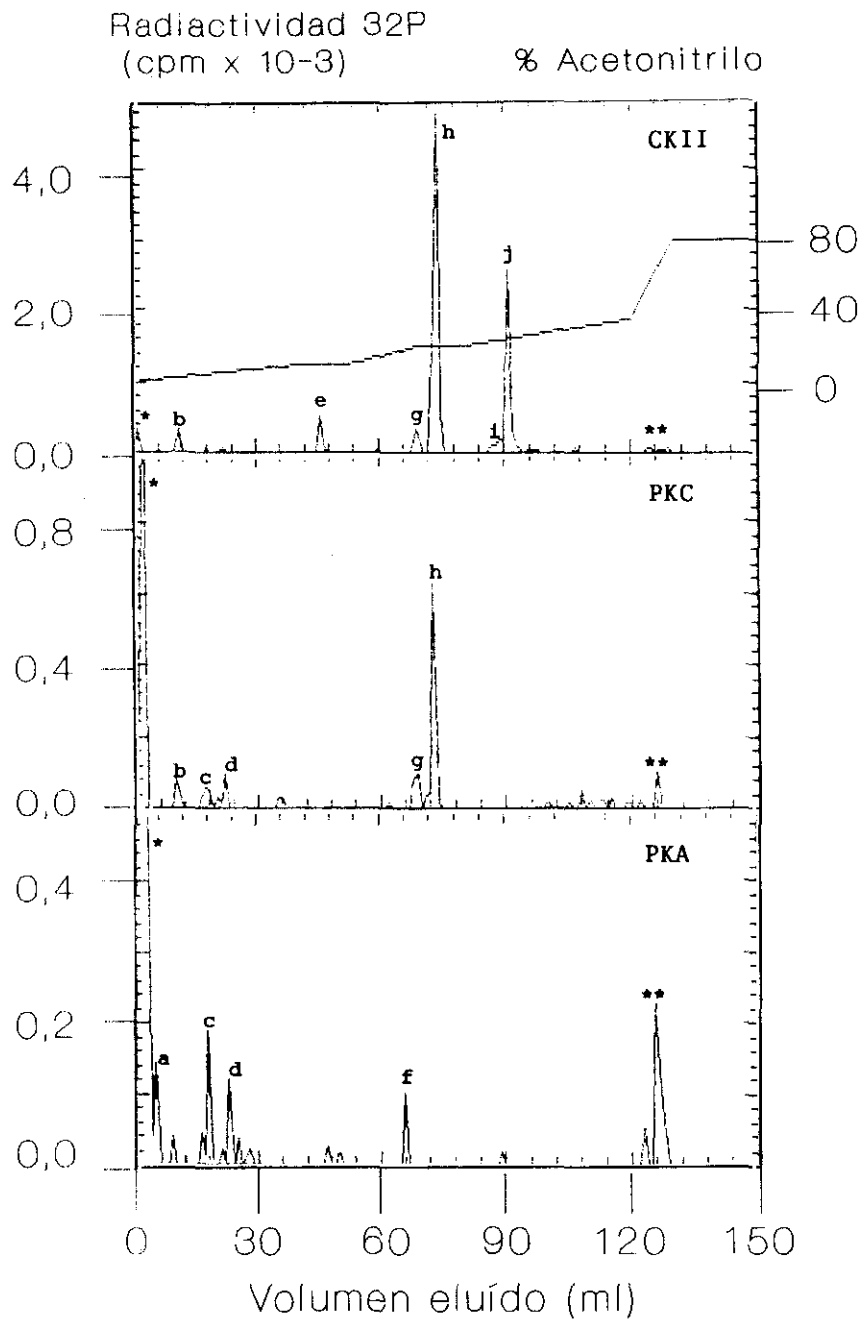


Figura 16. Separación mediante HPLC de la digestión con tripsina del factor eIF-2 fosforilado por las proteínas quinasas CK II, PKC y PKA. La reacción se realizó con 0,5 μg de la correspondiente quinasa purificada, 2 min de incubación y en presencia y ausencia de eIF2 (4,5 μg) purificado, este último blanco de cada experimento y restado en el cromatograma. (a-j) fosfopéptidos, no se consideran los de <100 cpm. (*) material no ligado y (**) lavado final.

32. FOSFORILACION DEL FACTOR eIF-2 POR HCI

El inhibidor controlado por hemina (HCI) es capaz de fosforilar la subunidad α del eIF-2 de cerebro, en las mismas condiciones que las del experimento del Capítulo 30 (Figura 17.). Ello nos informa de dos hechos: (i) la subunidad α del eIF-2 purificado de cerebro es susceptible de ser fosforilada por la proteína quinasa HCI de reticulocitos; y (ii) las proteínas quinasas CK II, PKC y PKA son específicamente eIF-2 β quinasas. La fosforilación de la subunidad β producida por HCI es debida a una contaminación de caseína quinasa II que contiene dicha preparación (206). La proteína quinasa HCI fué purificada de reticulocitos de conejo y generosamente cedida por el Dr. C. De Haro.

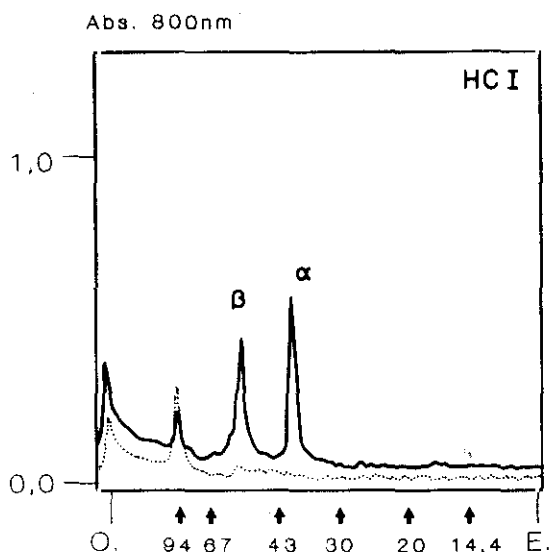


Figura 17. Autorradiograma de la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de eIF-2 incubado con HCI en presencia de [T-32P]ATP. La reacción se realizó en presencia (-) y ausencia (..) de eIF-2 (1,5 μ g) purificado, 0,5 μ g de HCI y 2 min de incubación. O. origen y E. final del gel. Las flechas indican las posiciones de los estándares de peso molecular utilizados ($M_r \times 10^{-3}$).

33. ACTIVIDAD QUINASA QUE FOSFORILA LA SUBUNIDAD α DEL FACTOR DE INICIACION eIF-2: ACTIVIDAD PROTEINA QUINASA I

Mediante el ensayo de actividad que llamamos EEA, que consiste en la fosforilación del factor eIF-2 y su resolución mediante electroforesis y autorradiografía (Capítulo 20 de Materiales y Métodos), se trató de encontrar una actividad proteína quinasa que fosforilara la subunidad α de dicho factor eIF-2 en tejido cerebral. Esta actividad, a la que denominamos actividad proteína quinasa I, se midió primeramente en dos fracciones: S-100 o sobrenadante posmicrosomal y cIF obtenida del lavado con alta concentración de sal de la fracción microsomal.

La medida de la actividad proteína quinasa I en las fracciones S-100 y cIF resulta problemática, ya que debido a la baja actividad que poseen ambas fracciones los resultados dados por el EEA se encuentran en el límite de detección de este ensayo. Así, por ejemplo, los datos de actividad PKI obtenidos con S-100 se mueven entre una actividad no detectable y una actividad de un 11% sobre su actividad basal (Figura 18.A línea S100 y 18.B), dependiendo de la actividad específica del [γ - 32 P]ATP empleado en el ensayo de EEA. Por esta razón, las medidas de actividad quinasa I en S-100 y cIF se realizaron con fracciones purificadas parcialmente (mediante cromatografías en columnas con heparina-Sefarosa y Fosfocelulosa) en idénticas condiciones. Los resultados obtenidos de este modo señalaron una mayor actividad en la fracción proveniente de S-100 que en la proveniente de cIF, si bien se comprobó la existencia de actividad quinasa I también en esta última fracción cIF (datos no mostrados).

34. PURIFICACION DE PROTEINA QUINASA I (PKI)

La purificación de la proteína quinasa I (PKI) consta de un fraccionamiento subcelular por centrifugación del que se obtiene

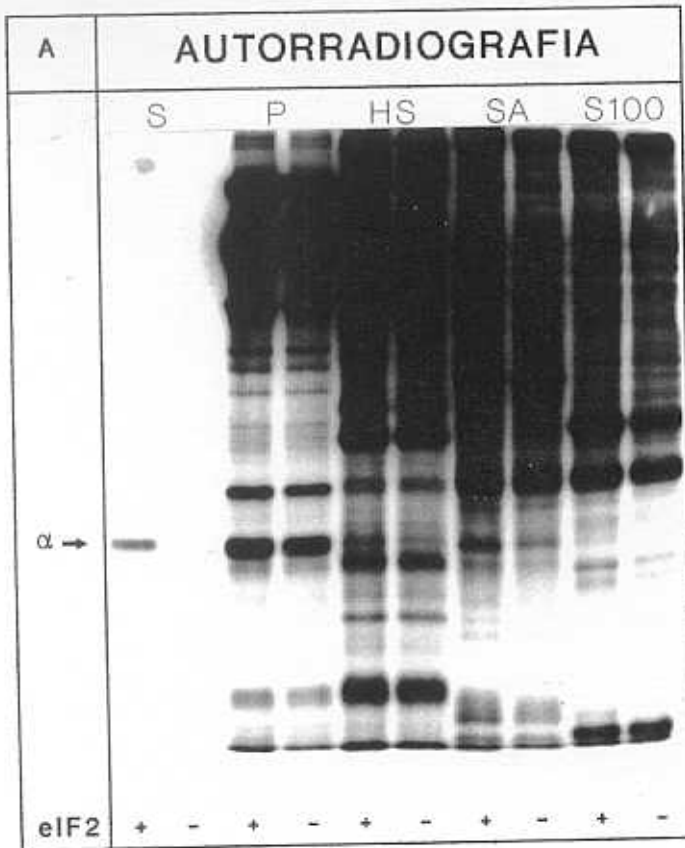
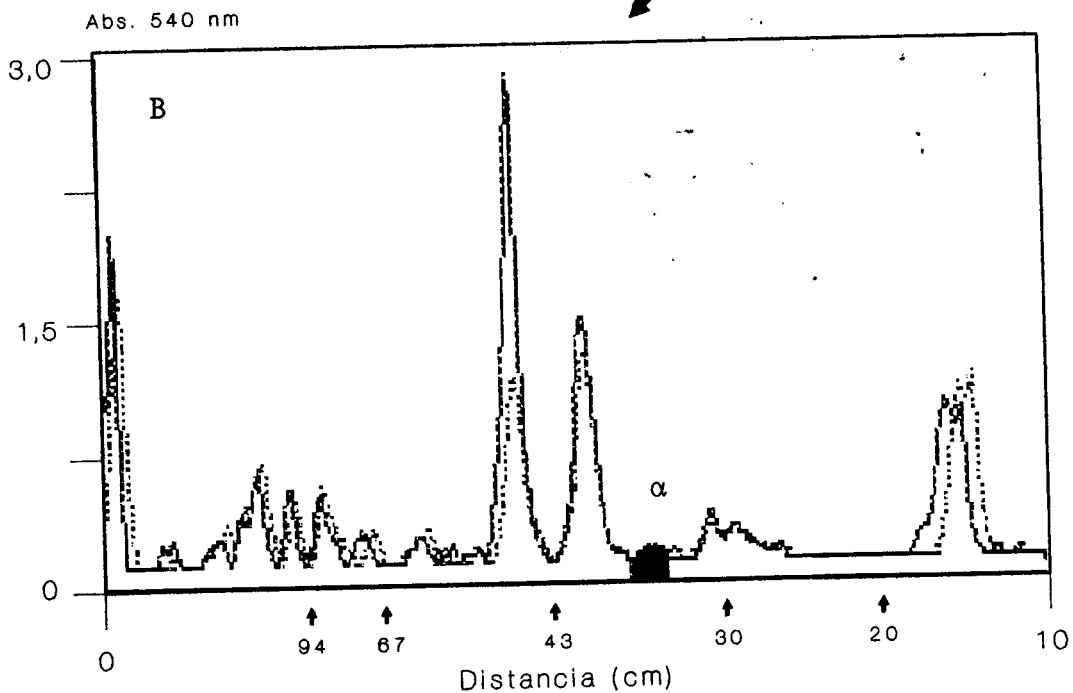


Figura 18. Fosforilación de eIF-2 en la subunidad α con diferentes fracciones. **(A)** autorradiografía de electroforésis en gel de poliacrilamida con SDS. S-100, sobrenadante posmicrosomal; SA, sulfato amónico; HS, heparina-Sefarosa; P, Fosfocelulosa; S, Superosa. La reacción se realizó de acuerdo con el ensayo EEA, descrito en el Capítulo 20 de Métodos, en ausencia (-) y presencia (+) de eIF-2 (0,15 μ g) purificado. **(B)** autorradiograma de la fracción S-100 del experimento anterior. (-) representa +eIF-2 y (..) representa -eIF-2. El area indica la posición del incremento de fosforilación de eIF-2 α . Las flechas señalan las posiciones de los estándares de peso molecular utilizados ($M_r \times 10^{-3}$).



un S-100, una precipitación del mismo con sulfato amónico y de cuatro cromatografías en columna (Capítulo 20 de Materiales y Métodos). Las distintas cromatografías se combinan aprovechando sus diferentes propiedades para aumentar su selectividad y en definitiva rentabilizar al máximo la purificación de PKI. Así, se utiliza inicialmente una columna de afinidad (heparina-Sefarosa, Figura 5.A) altamente selectiva, la cual elimina la mayor parte del material no deseado, eluyendo nuestra proteína PKI en un rango de 0,25 a 0,35 M de KCl. Después, se conjugan dos intercambios iónicos opuestos, primero uno catiónico (Fosfocelulosa, en la que PKI aparece a una concentración entre 0,5 y 0,7 M de KCl; Figura 5.B) y otro aniónico (DEAE-5PW, en la que presenta actividad en el intervalo 0,22-0,24 M de KCl; Figura 5.D), lo cual da una alta selectividad del material final resultante. Entre ambos, se realiza una filtración en gel (Superosa 6, Figura 5.C) que separa por otro principio distinto, el tamaño molecular, y equilibra adecuadamente el medio para realizar el siguiente intercambio iónico. Además, las dos últimas cromatografías (Superosa 6 y DEAE-5PW) están realizadas con cromatografía líquida de alta resolución, la cual optimiza apreciablemente la purificación de proteína quinasa I.

En la Figura 18.A se muestra la actividad de PKI en las fracciones obtenidas de los distintos pasos de purificación de la enzima. Las fracciones de esta purificación procedente de la cromatografía en DEAE-5PW con actividad quinasa I, se analizaron por medio de electroforesis en presencia de SDS (Figura 19.) y el resultado concluyó que la actividad proteína quinasa I estaba asociada con dos bandas electroforéticas denominadas a y b. Identificamos a estas dos bandas como la proteína quinasa I o PKI, siendo la fracción 40 de esta cromatografía la de mayor pureza y actividad y la empleada mayoritariamente en los experimentos de la presente Tesis. Esta fracción junto con la 41 constituirán la denominada fracción D.

TABLA VI
Purificación de Proteína Quinasa I de cerebro

Fracción	Proteína (mg)	Actividad Total*	Actividad Específica#	Rendim. (%)	Purif.
S-100	37950	18975	0,5	100	1
Sulfato Amónico	13185	31644	2,4	167	4,8
Heparina Sefarosa	168	1243	7,4	7,0	14,8
Fosfoce-lulosa	9,2	299	32,4	1,5	64,8
Superosa	0,8	117	144	0,6	288
DEAE-5PW	0,02	21	1040	0,1	2080

 * Una unidad de actividad se define como 1 pmol de fosfato incorporado en eIF2 . en el ensayo EEA con 0,15 µg de eIF2
 # Expresado en unidades de actividad/mg

Con el método anteriormente expuesto se confecciona la Tabla VI de purificación de proteína quinasa I. En dicha tabla se estima la purificación en algo más de 2.000 veces y el rendimiento en un 0,1% aproximadamente. Pensamos que este bajo rendimiento se debe a: (i) que por la naturaleza del ensayo de actividad de PKI (EEA) debido al propio desconocimiento de sus posibles activadores y/o moduladores, sólo se detecta aquella fracción que se encuentra en estado "activo" capaz de fosforilar al factor de iniciación eIF-2; (ii) la propia laboriosidad del ensayo EEA, que obliga a la sucesiva congelación-descongelación del material biológico durante el proceso de purificación, con la consiguiente degradación y pérdida de actividad del mismo; y (iii) que a fin de obtener una mayor pureza, se elimina en la cromatografía de heparina-Sefarosa una parte de la actividad quinasa I (Figura 5.A). En cuanto al valor de purificación obtenido, éste se puede apreciar visualmente en las Figuras 18.A y 19. Sin embargo, hay que señalar que este valor de purificación

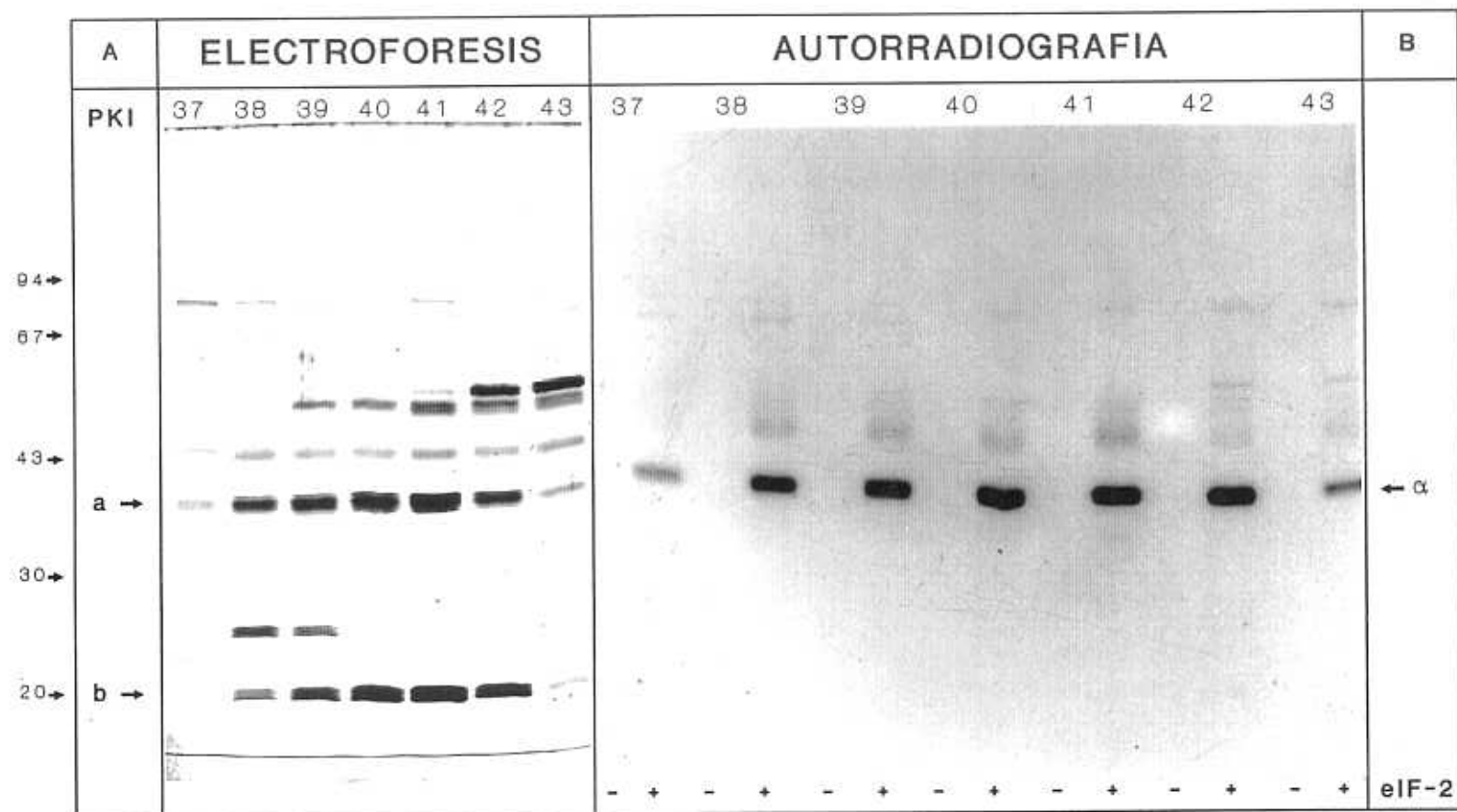


Figura 19. Electroforesis y autorradiografía de las fracciones de DEAE-5PW. **(A)** electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y posterior tinción con plata de las fracciones 37 a 43 (30 μ l) de la cromatografía en DEAE-5PW. **(B)** autorradiografía de las fracciones (15 μ l) del experimento anterior, previamente incubadas en ausencia (-) y presencia (+) de eIF-2 (0,3 μ g) para el ensayo EEA de actividad proteína quinasa I. Las flechas se indican como en la figura anterior.

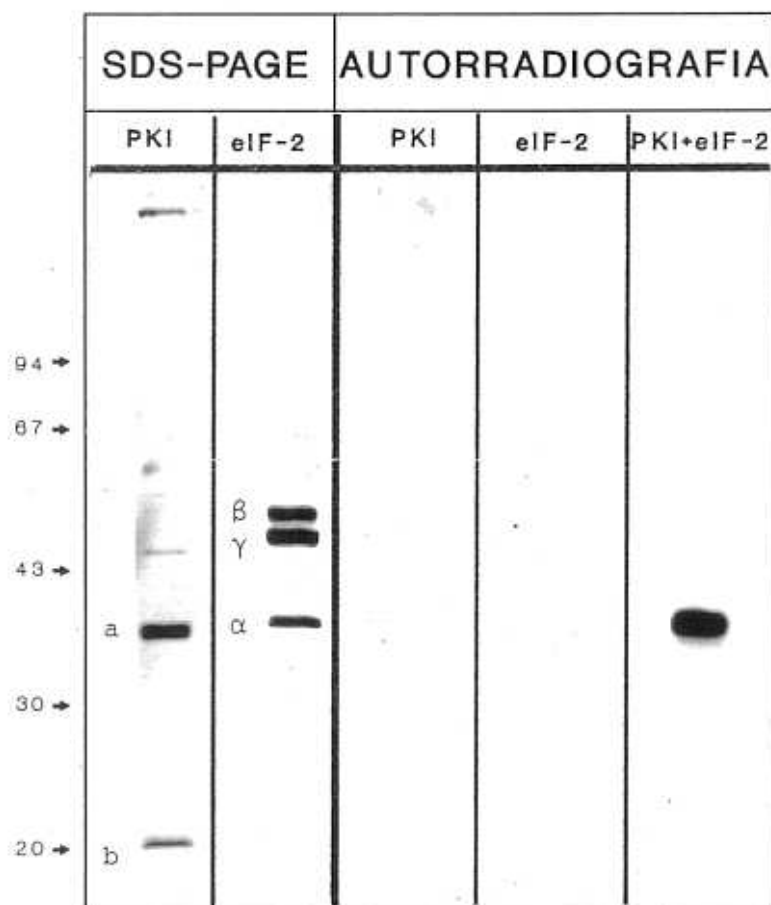


Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) de Proteína Quinasa I (PKI) y eIF2 y fosforilación del factor eIF2 por PKI. La electroforesis se efectuó con 0,3 μ g de PKI (15 μ l de la fracción 40 de la cromatografía en DEAE-5PW) y 1 μ g de eIF-2 purificado. La reacción de fosforilación se realizó de acuerdo al ensayo EEA con PKI (0,1 μ g) y eIF-2 (0,3 μ g) purificados. Las flechas indican las posiciones de los estándares de peso molecular utilizados ($M_r \times 10^{-3}$).

es relativo, puesto que además de estar afectado por las razones anteriormente expuestas (i a iii), está definido por el valor de la actividad PKI en la fracción S-100, valor que se encuentra en el límite de detección del ensayo (Figura 18.B).

35. FOSFORILACION DEL FACTOR eIF-2 EN LA SUBUNIDAD α POR PROTEINA QUINASA I

En la Figura 20. se observa que las autofosforilaciones de proteína quinasa I y de eIF-2 de cerebro son negativas, sin embargo, la mezcla de ambas en presencia de [γ - ^{32}P]ATP produce la fosforilación del factor eIF-2 en su subunidad α , siendo por tanto la primera una proteína quinasa a la que hemos denominado proteína quinasa I (PKI). Este es el punto de partida para diferenciar PKI de otras proteínas quinasas, las cuales o no fosforilan el factor o lo hacen en su subunidad β (ver anteriormente). Sus características y la incorporación de ^{32}P en la subunidad α de eIF-2 se tratarán en próximos capítulos.

36. CARACTERIZACION DE PROTEINA QUINASA I

DETERMINACION DE FOSFOAMINOACIDOS

Una vez fosforilado el factor eIF-2 en su subunidad α por PKI, se procedió a la identificación de los aminoácidos fosforilados. Para ello se realizó un análisis de fosfoaminoácidos mediante hidrólisis ácida, obtención de derivados con o-ftalaldehído (OPA) y su separación en HPLC en fase reversa paralela a la cuenta de su radiactividad (Capítulo 22 de Materiales y Métodos). Los resultados se muestran en la Figura 21., y en ella se observa que el único fosfoaminoácido es serina, por lo que la proteína quinasa I puede ser clasificada como una serina quinasa.

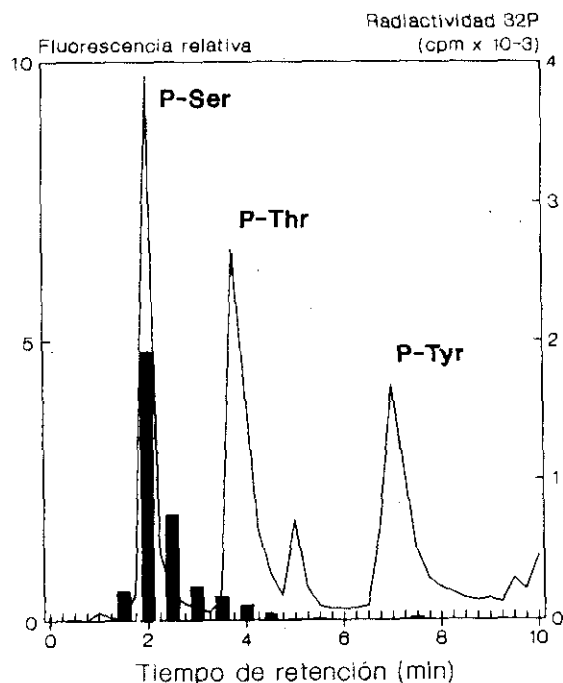


Figura 21. Determinación de fosfoaminoácidos en HPLC de factor eIF-2 fosforilado por PKI. (-) representa la fluorescencia relativa de P-Ser, P-Thr y P-Tyr derivados con o-ftalaldehído. (■) Indica la radiactividad ^{32}P incorporada en eIF-2 antes de la hidrólisis y derivación. La reacción de fosforilación se realizó con 1 μg de eIF-2 y 0,1 μg de PKI, de acuerdo con el ensayo de EEA, descrito en el apartado de Métodos (Capítulo 20).

ESTRUCTURA Y POLIMORFISMO

La proteína quinasa I se compone de dos subunidades: una denominada a, con un peso molecular relativo de 39.000, y otra menor b, de unos 20.000. El análisis densitométrico de la electroforesis de PKI (fracción 40 de la cromatografía de DEAE-5PW) (Figura 22.) nos da una pureza del 93% y una relación entre las subunidades a:b de 3:1. Esta relación nos darían un peso total para la holoenzima de 137.000 y nos haría pensar en una estructura para PKI de a_3b . Con el tiempo, la relación a:b pasa a ser de 2,5:1 debido probablemente a la aparición de una estructura a_2b formada por degradación parcial de a, obteniendo así una mezcla de ambas y el cociente de 2,5 para la relación entre a y b. Esta última forma, es la utilizada en todos los experimentos de PKI y la que se toma como control.

Las características de PKI como holoenzima, es decir, en su estado nativo, se estudian mediante filtración en gel con una

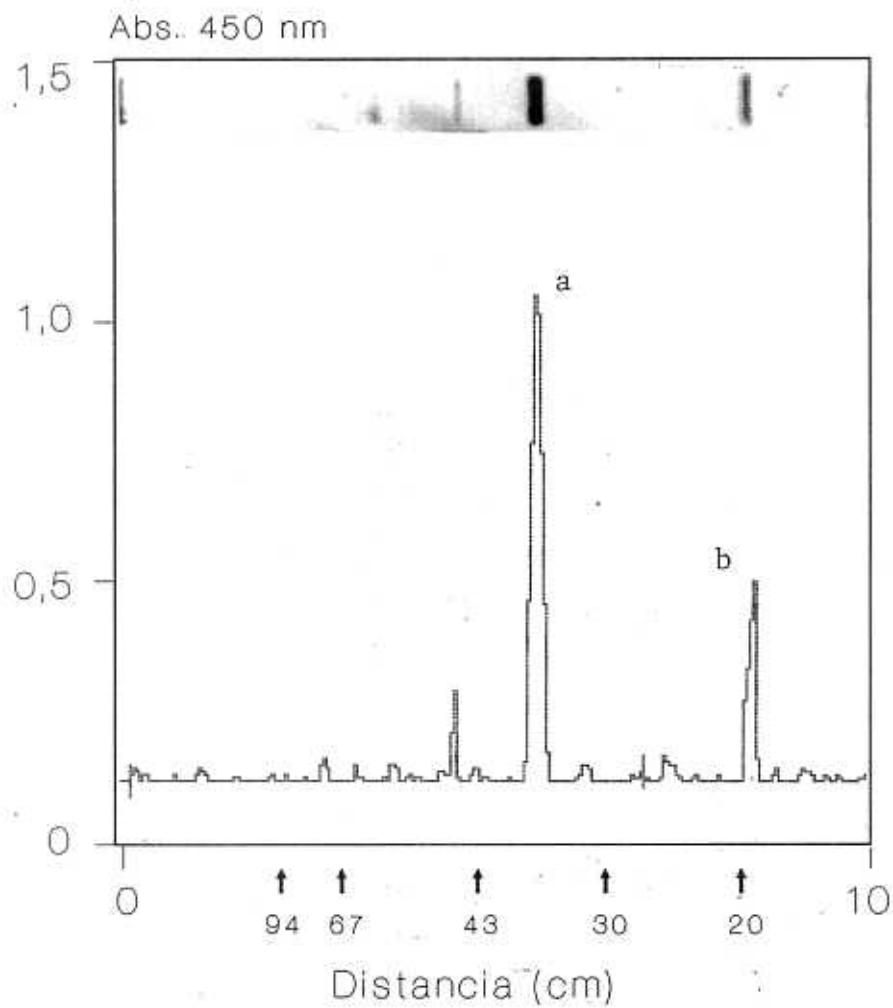


Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y densitometría de PKI (0,3 μ g) purificada de corteza cerebral. Las flechas indican las posiciones de los estándares de peso molecular utilizados ($M_r \times 10^{-3}$).

columna Superosa 6 debidamente calibrada. El resultado dió una masa molecular para la holoenzima de PKI de 120.000 a 140.000 (Figura 23.), lo cual nos daría una composición de sus subunidades de a_3b o de a_2b_3 , coincidiendo la primera de ellas con los resultados obtenidos del análisis electroforético de las subunidades de PKI. Por lo tanto podemos pensar en PKI como una holoenzima compuesta de tres subunidades a y una subunidad b (a_3b), sin dar lugar a agregados de mayor peso molecular o a subagregados más pequeños, al menos en lo que a su forma activa (forforiladora en eIF-2 α) se refiere. El hecho de dar un tipo de holoenzima, sin otras asociaciones entre ellas que den lugar a agregados u otras estructuras, se comprobó mediante una electroforesis en condiciones no disociantes de PKI, la cual dió una sola banda de proteína (datos no mostrados).

Como se ha descrito en el Capítulo 35, el último paso de purificación de PKI es una cromatografía en DEAE-5PW. La observación de los patrones electroforéticos correspondientes a las fracciones de PKI (Figura 19.), parece indicar que no todas las fracciones poseen igual relación entre las subunidades a y b. Por análisis densitométrico de dichas fracciones se comprueba que efectivamente PKI presenta cierta heterogeneidad en la composición de sus subunidades, variando ésta según se ha podido cuantificar, desde una relación a:b de 6:1 hasta otra de 1,5:1 para las fracciones 38 a 42 respectivamente. Además, se establece una relación entre la composición de las subunidades de PKI y su actividad (Figura 24.), siendo mayor esta actividad cuando el cociente $b/(a+b)$ aumenta, indicativo de un enriquecimiento de PKI en su subunidad b. Para los datos expresados en %, se toma como control o 100% la proteína quinasa I utilizada en el resto de los experimentos, y que posee una relación a:b de 2,5:1 según indicamos anteriormente.

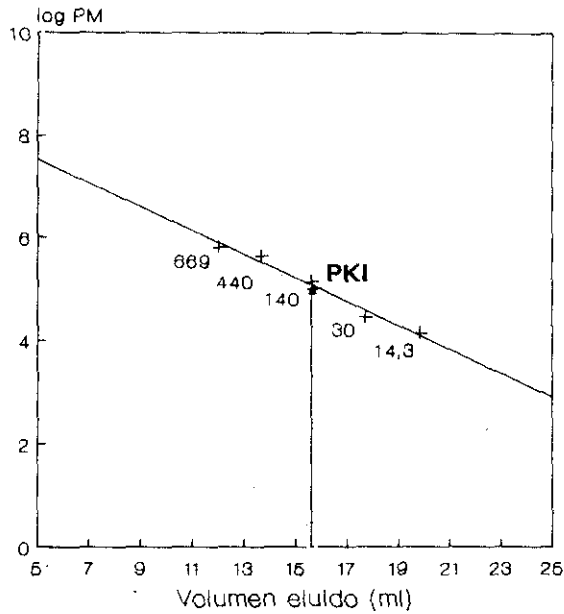


Figura 23. Peso molecular de la Proteína Quinasa I por exclusión molecular de alta resolución. La cromatografía se realizó con una columna calibrada de Superosa 6 en un medio no desnaturizante. (•) señala la posición de la elución de PKI. (+) indica las posiciones de los marcadores de peso molecular utilizados ($M_r \times 10^{-3}$). PM, peso molecular.

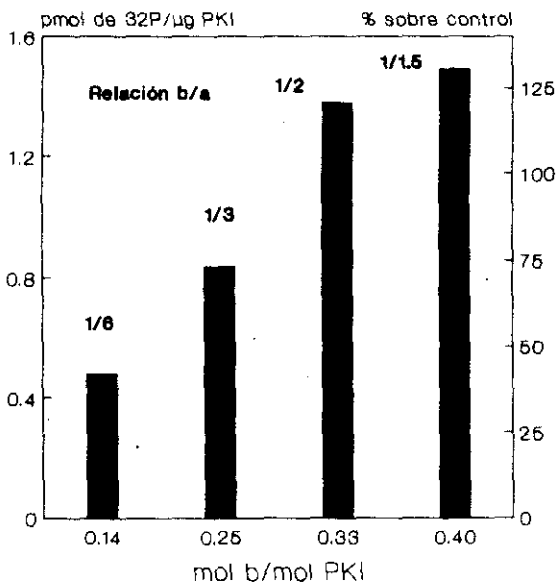


Figura 24. Variación de la actividad de PKI en relación con la proporción entre sus subunidades. El ensayo EEA de actividad PKI se realizó con 0,3 μg de eIF-2 purificado y se expresa en pmol de ^{32}P incorporado en eIF-2 α por μg de PKI. Como control se considera la actividad de la fracción 40 de la purificación en DEAE-5PW de PKI, con una relación b/a de 1/2,5. (a y b) subunidades de PKI.

AUTOFOSFORILACION Y EFECTO DE MAGNESIO

En las condiciones de ensayo descritas en el capítulo anterior y realizadas a 5 mM de magnesio, la proteína quinasa I no posee autofosforilación. La autofosforilación de una proteína quinasa se considera como una regulación de la propia quinasa y es un tema de gran interés e importancia. Cuando el ensayo EEA se realizó a 1 mM de magnesio, pudimos observar la autofosforilación de PKI (Figura 25.A). Esta fosforilación es débil (de un 5% con respecto a la fosforilación en eIF-2 α realizado a 5 mM) y hay que visualizarla tras una sobreexposición de la autorradiografía.

Seguidamente hemos estudiado la concentración idónea de Mg²⁺ a la cual PKI posee su máxima actividad, realizando la fosforilación de eIF-2 α a concentraciones de Mg²⁺ de 1, 2 y 5 mM. La máxima fosforilación se obtuvo a 1 mM (Figura 25.B), siendo menor a 2 mM e inferior a 5 mM, por tanto, el óptimo de magnesio para PKI lo situamos en 1 mM. La actividad a esta concentración de Mg²⁺ es de un 150% con respecto a la de 5 mM que se toma como 100%. Sin embargo los ensayos se siguieron realizando a 5 mM de Mg²⁺, tal y como está descrito en Materiales y Métodos para el ensayo de EEA (Capítulo 20), por dos motivos: (i) que a 1 mM de magnesio PKI presenta autofosforilación, la cual al ser en su subunidad "a" y coincidir con eIF-2 α nos enmascararía los resultados de fosforilación de la propia eIF-2 α ; (ii) debido a que como se ha descrito en Materiales y Métodos (Capítulo 24), la concentración óptima de magnesio en el sistema de síntesis de proteínas es de 5 mM, y el efecto de PKI sobre eIF-2 en dicho sistema constituye uno de los fines del presente trabajo.

PROPIEDADES CINÉTICAS

En la Figura 26.A se representa la actividad proteína quinasa I frente a concentraciones crecientes de sustrato (eIF-2) y en ella se observa que la actividad aumenta progresivamente

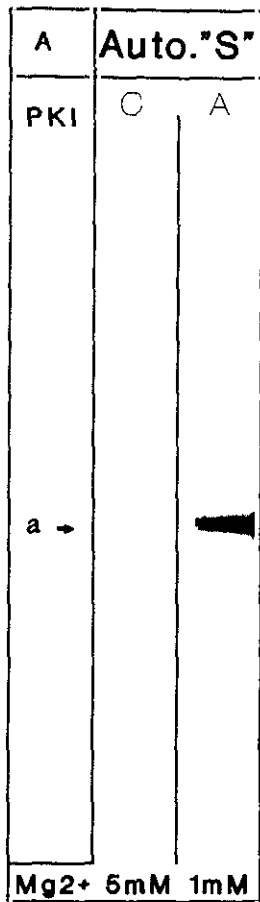
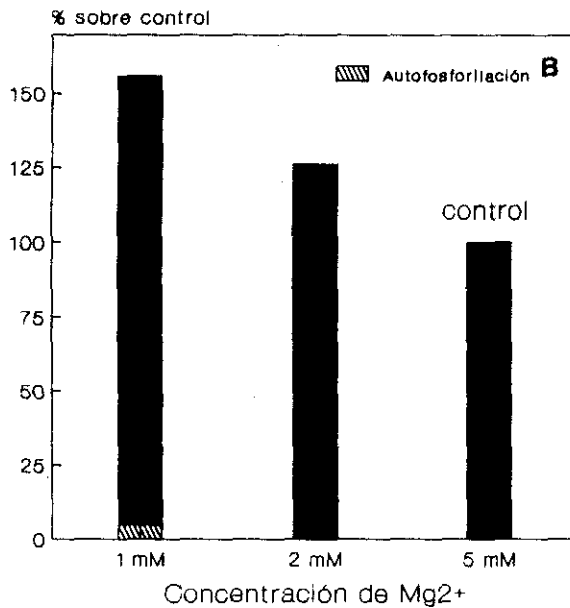


Figura 25. Autofosforilación y efecto de magnesio de Proteína Quinasa I. (A) autorradiografía, con sobreexposición ³²P, de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de PKI. La enzima (0,1 µg) se incubó previamente en las condiciones del ensayo EEA a 1 mM (A, autofosforilación) y 5 mM de magnesio (C, control). (B) actividad PKI a diferentes concentraciones de magnesio. La actividad se midió por incorporación de ³²P en eIF-2α en el ensayo EEA del experimento anterior, realizado con eIF2 (0,3 µg) purificado a 1 mM, 2 mM y 5 mM de magnesio (control).



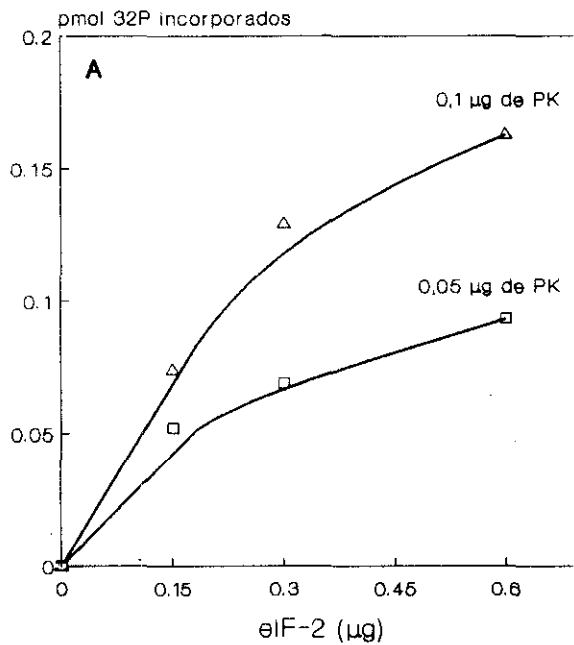
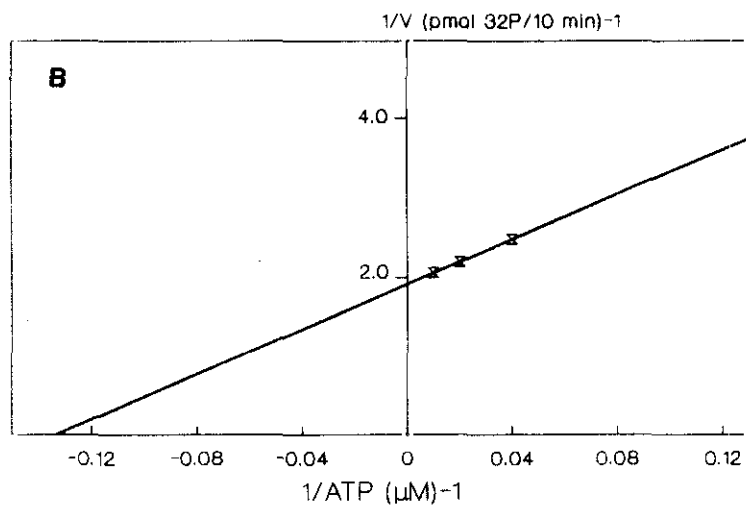


Figura 26. Propiedades cinéticas de Proteína Quinasa I (PKI). La actividad de PKI se midió por incorporación de ^{32}P en eIF-2 α , en el ensayo EEA. (A) curva de sustrato eIF-2 a la concentración indicada de eIF2 y PKI purificados. (B) representación de Lineweaver-Burk para el cálculo de la constante cinética de proteína quinasa I para ATP con eIF2. La reacción se realizó con 0,6 µg de eIF-2 purificado y 0,05 µg de enzima purificada, según el ensayo EEA. Se representan los dobles inversos de la reacción dependiente de ATP.



cuando la cantidad de eIF-2 es mayor. Sin embargo, no se llega a saturación de este último con las cantidades empleadas, ni tampoco se calcula la K_m para eIF-2 por ser un sustrato de laboriosa obtención y existencias limitadas. Por ello, el ensayo de actividad de PKI es dependiente de la cantidad de eIF-2 utilizada y sólo podrán compararse aquellos experimentos realizados a la misma concentración de sustrato, la cual se indica al pie de cada resultado.

La curva de concentración de ATP para proteína quinasa I, llega a la V_{max} entre 50 y 100 μM . Calculando la K_m mediante dobles recíprocos de los datos anteriores (representación de Lineweaver-Burk (205), Figura 26.B) se obtiene un valor de 7,5 μM ; dicha representación a pesar de disponer de pocos datos dió un excelente ajuste ($r=0,9998$). El valor es de similar rango al de otras quinasas e inferior a las concentraciones utilizadas en el ensayo de actividad PKI ($[\text{ATP}] \gg K_{m\text{ATP}}$). Estas últimas son por tanto condiciones idóneas para que la reacción sea de orden cero respecto a este sustrato, es decir, independiente de la concentración de ATP.

Si estamos valorando y caracterizando una actividad enzimática, debemos trabajar en condiciones de linealidad, ya que supone la no existencia de limitaciones en la actividad de nuestra enzima debidas a su concentración empleada. La Figura 27.A muestra la relación lineal existente entre la actividad de PKI y su concentración, a dos cantidades de eIF-2. Ello indica una adecuada disponibilidad de sustrato en los rangos de concentración de PKI utilizados.

Se realizaron curvas de tiempo de incubación para la actividad PKI por un doble motivo: primero para verificar y optimizar las condiciones del ensayo; y segundo, para ver si este ensayo era continuo y estable en el tiempo, ya que en caso contrario se podría pensar en la existencia de alguna proteína fosfatasa. Los resultados de la fosforilación de eIF-2 por PKI entre 1 y 20 min,

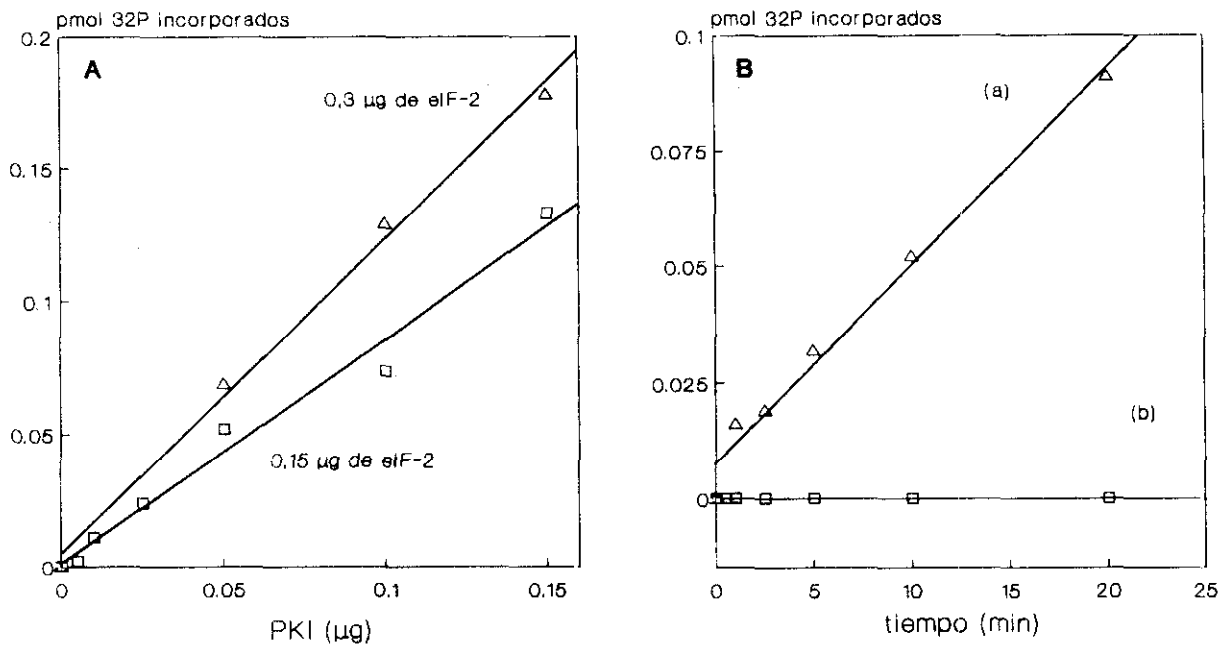


Figura 27. Propiedades cinéticas de Proteína Quinasa I (PKI) (II). La actividad de PKI se midió por incorporación de ^{32}P en eIF2 α en el ensayo EEA. **(A)** curva de enzima o PKI a la concentración indicada de eIF2 y PKI purificados. **(B)** curva de tiempo de la reacción de PKI. La reacción del ensayo EEA se realizó en presencia (a) y ausencia (b) de eIF-2 (0,15 μg) y con 0,05 μg (a) y 0,1 μg (b) de PKI, a los tiempos indicados.

se muestran en la Figura 27.B. y como puede observarse, la incorporación es lineal a lo largo del tiempo. Ello posibilita la expresión del resultado obtenido dividido por el tiempo de incubación e indicaría la inexistencia de posibles proteínas fosfatasa. También se observa que el tiempo de 10 min de incubación utilizado inicialmente en los ensayos, es idóneo, puesto que nos proporciona una buena incorporación sin una dilación excesiva del ensayo. Como control del anterior experimento, y para comprobar si PKI se autofosforila a otros tiempos diferentes del empleado en el ensayo de EEA, se realizó la incubación de PKI en ausencia de eIF-2 entre 0,5 y 20 min (Figura 27.B), observándose que no hay autofosforilación de PKI a ninguno de los tiempos ensayados.

ESPECIFICIDAD DE SUSTRATOS ENDOGENOS Y EXOGENOS

La fosforilación del factor eIF-2 en la subunidad α por la proteína quinasa I, no significa que no pueda tener otros sustratos endógenos acordes con su localización y con la posible función de proteína quinasa I y su fisiología. Para ello se comprobó la actividad PKI en tres fracciones subcelulares: una fracción citosólica o S-100, otra fracción rica en factores de iniciación o cIF, y una más denominada fracción ribosomal o R con proteínas ribosomales y asociadas a ribosomas (para datos sobre su obtención, ver el Capítulo 10 de Materiales y Métodos). La elección de estas tres fracciones se debe a que las fracciones S-100 y cIF presentan actividad PKI (Capítulo 33), y a que la fracción R se encuentra en el entorno del S-100 y es donde se localiza la fracción cIF.

Los experimentos se efectuaron realizando el ensayo de actividad de PKI, sustituyendo el factor eIF-2 por cada una de las tres fracciones descritas anteriormente, siendo el control la fosforilación obtenida "sin" añadir PKI. Los resultados se muestran en la Figura 28.A. Se comprueba que en las fracciones S-100

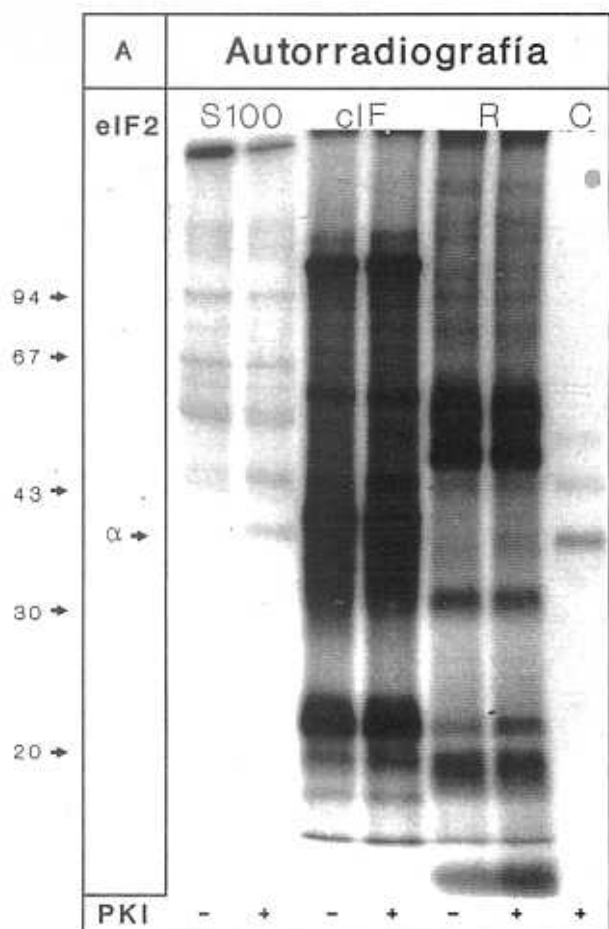
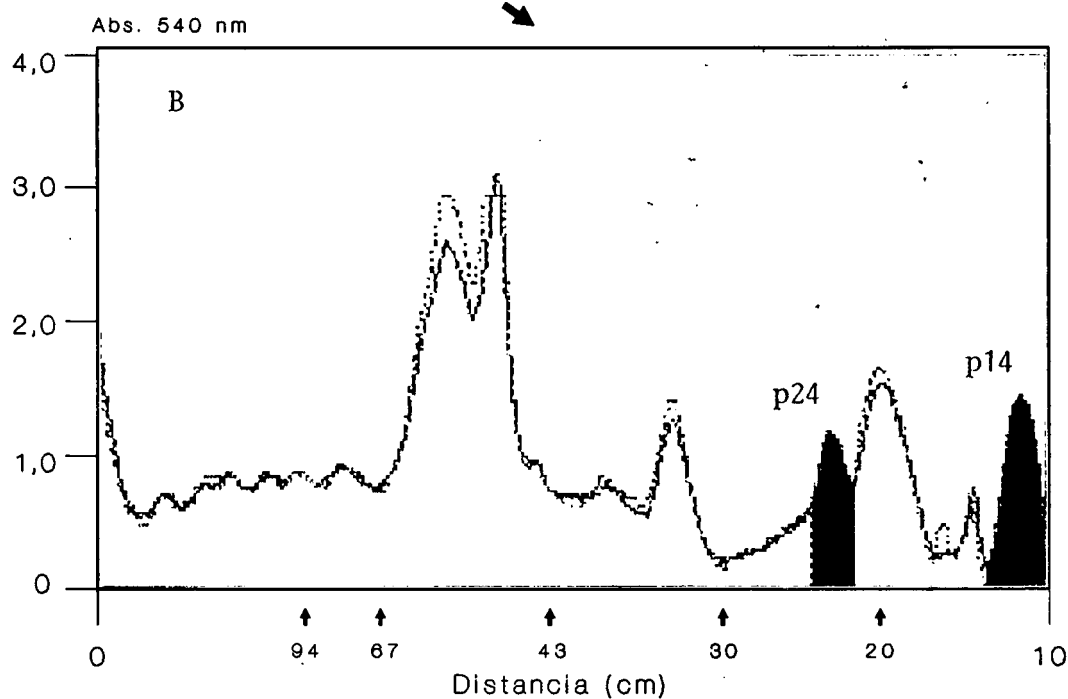


Figura 28. Fosforilación de fracciones subcelulares por Proteína Quinasa I. **(A)** autorradiografía de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. S-100, sobrenadante posmicrosomal; cIF, fracción de factores de iniciación; R, fracción ribosomal; C, control, con 0,3 μg de eIF-2 y 0,05 μg PKI. La reacción se realizó de acuerdo con el ensayo EEA, en ausencia (-) y presencia (+) de PKI (0,1 μg) purificada y 50 μg de la correspondiente fracción subcelular. **(B)** autorradiograma de la fracción R del experimento anterior. (-) representa -PKI y (+) representa +PKI. Las áreas indican las posiciones de los incrementos de fosforilación de otras proteínas diferentes de eIF-2 α . Las flechas señalan las posiciones de los estándares de peso molecular utilizados ($M_r \times 10^{-3}$).



y cIF sólo hay un sustrato, que coincide con la posición de la subunidad α del factor eIF-2. Sin embargo, en la fracción R, aparecen dos sustratos endógenos además del que coincide con la posición de eIF-2 α . Estos sustratos poseen unas masas moleculares relativas de 14.000 y 24.000 aproximadamente (Figura 28.B). Dichos sustratos no coinciden con ningún contaminante de PKI, identificados como dos proteínas de 47.000 y 80.000 aproximadamente.

La proteína quinasa I descrita hasta ahora, puede corresponderse con otra proteína quinasa conocida anteriormente, o por el contrario tratarse de una nueva quinasa. Por ello comprobamos primeramente si PKI era capaz de fosforilar unos sustratos ampliamente generalizados para la mayor parte de las proteínas quinasas. Estos sustratos son: caseína (proteína ácida característica de las denominadas caseínas quinasas), histonas (fracción de proteínas básicas fácilmente fosforilables por quinasas dependientes de nucleótidos) e histona H1 (otra fracción de histonas fácilmente fosforilable por las quinasas dependientes de calcio y fosfolípidos) (81,177). Ninguno de estos sustratos es fosforilado por PKI (datos no mostrados), por lo que no cabe clasificarla inicialmente como ninguna de las quinasas citadas anteriormente.

MODULADORES Y DEPENDENCIA DE CALCIO Y CALMODULINA

Se probaron distintos moduladores sobre la proteína quinasa I para comprobar la posible modificación de su actividad. Se utilizaron moduladores (activadores o inhibidores) específicos de diferentes proteínas quinasas conocidas para, en el caso de que efectivamente se viera afectada la actividad de PKI, relacionar aquellas con ésta. Así, se añadieron al ensayo de actividad PKI (EEA): heparina (inhibidor específico de caseína quinasa II), AMP cíclico (activador específico de proteína quinasa dependiente de AMP cíclico), GMP cíclico (activador específico de proteína

quinasa dependiente de GMP cíclico) y poli(I)·poli(C) (como activador de proteína quinasa dependiente de RNA de doble cadena). Los resultados se muestran en la Figura 29.A y en ellos se observa que ningún modulador produce el efecto esperado y sólo el GMP cíclico y poli(I)·poli(C) inhiben ligeramente, por lo que no se puede establecer ninguna relación entre las proteínas quinasas citadas y PKI.

Otro tipo de proteínas quinasas características son las dependientes de calcio, particularmente las quinasas dependientes de Ca^{2+} y calmodulina y proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos o C. Por ello comprobamos el efecto de calcio, calmodulina (CaM) y fosfolípidos (concretamente fosfatidilserina), sobre la actividad de PKI. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 29.B. Se observa un ligero aumento con Ca^{2+} , efecto que se anula e incluso produce inhibición al añadir EGTA, un agente quelante de Ca^{2+} . Estos dos efectos nos indican ya una dependencia de calcio de la actividad PKI. La conjunción de calcio y calmodulina incrementa el efecto de PKI, y sin embargo la trifluoperazina (TFP), un inhibidor específico de las proteínas dependientes de Ca^{2+} y CaM, inhibe la reacción, lo cual nos indica un efecto dependiente de calcio y CaM. Por último, vemos que también el Ca^{2+} con fosfatidilserina (PS) aumenta casi hasta duplicarlo el efecto de PKI, y nos hace pensar también en una dependencia por parte de PKI de Ca^{2+} y PS.

Según se ha descrito en la bibliografía (25), la integridad de los grupos SH puede intervenir en el estado de fosforilación de eIF-2 α . Por ello, nos pareció interesante averiguar el efecto en la actividad de PKI de agentes que actúan sobre estos grupos. Los agentes fueron: ditioneitol (DTT), N-etilmaleimida (NEM), glutatión oxidado (GSSG) y hemina. Los resultados se muestran en la Figura 29.C, y en ella es de destacar que GSSG, NEM y hemina, todos ellos modificadores de grupos SH, inhiben la actividad de PKI de menor a mayor medida respectivamente. Por el contrario, el DTT, preservador de dichos grupos, es activador de PKI.

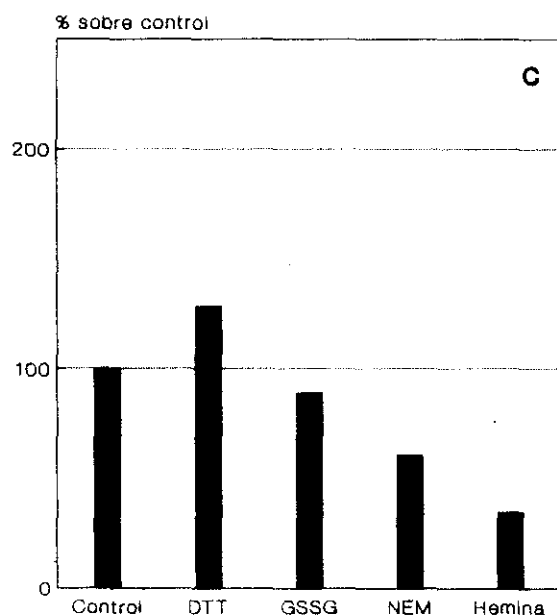
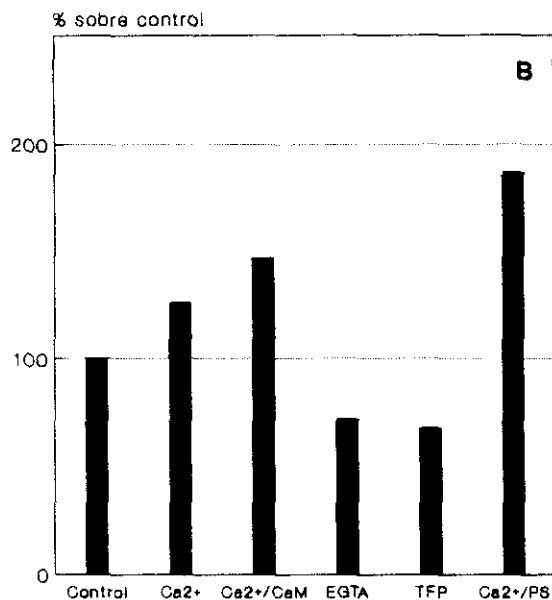
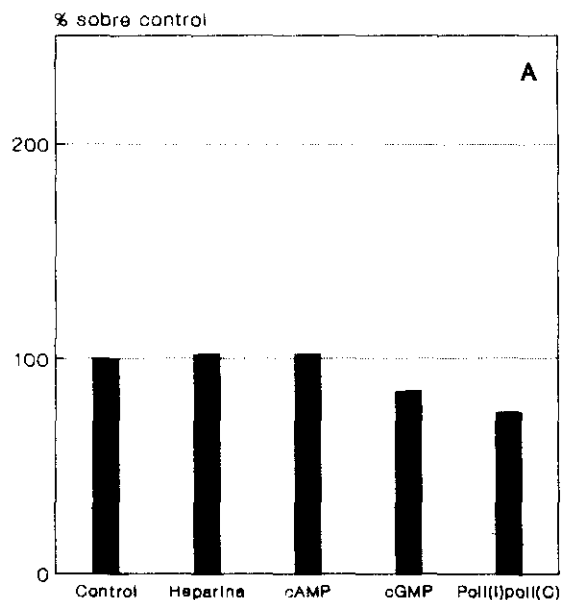


Figura 29. Efecto de moduladores en la actividad de Proteína Quinasa I. La actividad PKI se midió por incorporación de ³²P en eIF-2 α en el ensayo EEA, con 0,3 μ g de eIF2 y 0,05 μ g de PKI purificados. Control, sin adición de moduladores. **(A)** efecto de los siguientes moduladores añadidos: Heparina, 5 μ g/ml; cAMP, AMP cíclico 10 μ M; cGMP, GMP cíclico 10 μ M; Pol(I),pol(C) 2 μ g/ml. **(B)** efecto de moduladores dependientes de calcio: Ca²⁺, 0,5 mM; Ca²⁺/CaM, calcio 0,5 mM más calmodulina 0,35 μ M; EGTA, 5 mM; TFP, trifluoperazina 0,1 mM; Ca²⁺/PS, calcio 0,5 mM más fosfatidilserina 0,3 mg/ml. **(C)** efecto de moduladores que modifican grupos sulfhidrilo: DTT, ditioneitol 2 mM; GSSG, 2 mM; NEM, N-etilmaleimida 5 mM; Hemina, 20 μ M.

Tres de los datos obtenidos anteriormente: (1) PKI contiene una subunidad b con un peso molecular de alrededor de 20.000, (2) un enriquecimiento relativo de esta subunidad produce un aumento en su actividad (Capítulo 36), y (3) calcio y CaM activan y tri-fluoperazina inhibe la actividad de PKI; nos sugirieron una atrayente hipótesis: ¿Puede ser calmodulina la subunidad b de PKI y la propia PKI una quinasa dependiente de calcio y CaM?

Para responder a estas dos preguntas se realizaron unos experimentos llevados a cabo con anticuerpos policlonales comerciales frente a calmodulina (antiCaM). Previamente se realizó un patrón electroforético de PKI junto a CaM comercial. El resultado se muestra en la Figura 30.A y se observa como la subunidad b de PKI comigra con el estandar de CaM, lo cual sugiere ya una posible relación entre ambas. Realizamos una inmunoprecipitación de PKI, transferida de una electroforesis en gel de poli-acrilamida con SDS sobre nitrocelulosa, con antiCaM, y en él se identificó a la subunidad b como reaccionante frente a antiCaM (Figura 30.A). Por tanto podemos afirmar que la subunidad menor de PKI es la calmodulina.

En las Figuras 30.B y 30.C se prueba el efecto de antiCaM a dos concentraciones sobre la actividad de PKI. Se observa cómo se inhibe casi totalmentea dicha actividad. Por tanto, esta actividad es dependiente de calmodulina y PKI se puede considerar como una proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina.

37. PROTEINA QUINASA I EN LA SINTESIS DE PROTEINAS Y EN LA ACTIVIDAD DEL FACTOR eIF-2

EFEECTO DE PKI SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS

Uno de los puntos de mayor interés del presente trabajo es si la actividad de PKI, a través de la fosforilación en el factor eIF-2, tiene algún efecto sobre la síntesis de proteínas en un

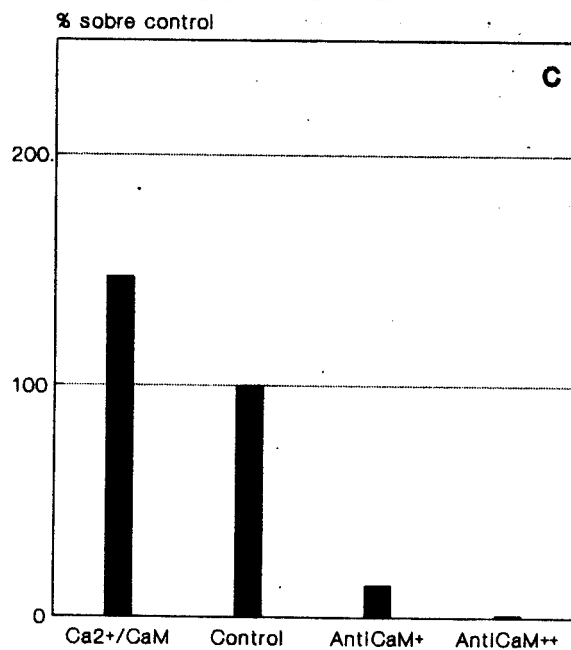
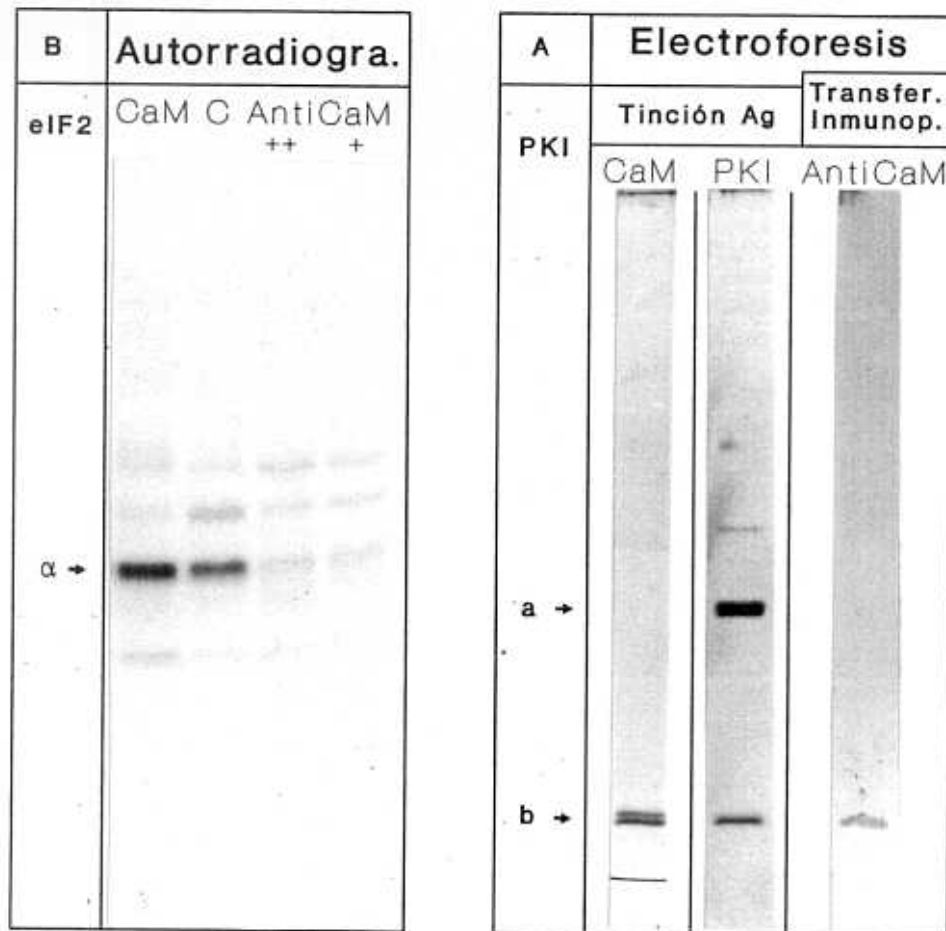


Figura 30. Dependencia de la Proteína Quinasa I (PKI) de calcio y calmodulina. **(A)** electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de PKI, tinción de plata y transferencia a nitrocelulosa. CaM, calmodulina (0,15 μ g); PKI, (0,3 μ g); AntiCaM, inmunoprecipitación de PKI (0,5 μ g) con suero anticalmodulina (dilución 1/50 v/v) transferido a nitrocelulosa. **(B)** autorradiografía de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de la actividad PKI con calcio más calmodulina y suero anticalmodulina. La reacción se realizó de acuerdo con el ensayo EEA con 0,3 μ g de eIF2 y 0,05 μ g de PKI purificados. C, control; CaM experimento control en presencia de 0,5 mM de calcio y 0,35 μ M de modulina; AntiCaM, experimento control preincubado con 0,5 μ l (+) y 1 μ l (++) de suero anticalmodulina durante 30 min a 25°C. **(C)** actividad PKI medida por incorporación de ³²P en eIF2 α en el ensayo EEA del experimento B y expresada en % sobre control.

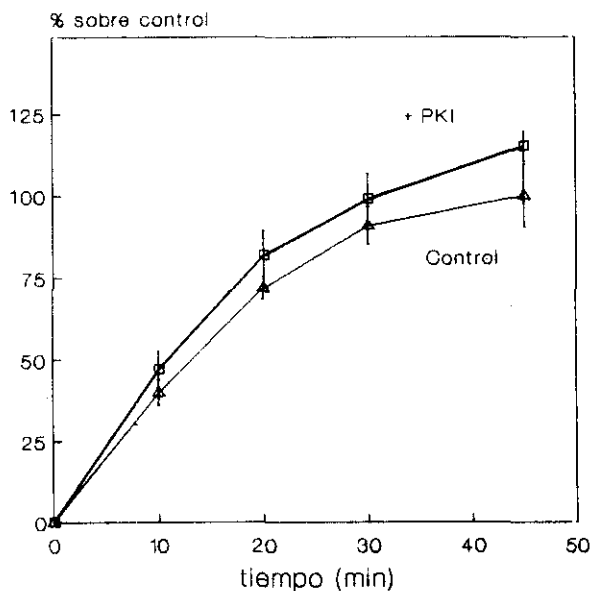


Figura 31. Efecto de Proteína Quinasa I en la síntesis de proteínas in vitro en función del tiempo. La medida de síntesis de proteínas se realizó por incorporación de $[^3\text{H}]\text{Leu}$ en un sobrenadante posmitocondrial, tal y como se describe en el apartado de Métodos (Capítulo 24) y se expresa en % sobre el control a 45 min. El experimento se realizó en ausencia (Control) y presencia de 0,15 μg de Proteína Quinasa I (+PKI). Cada punto representa la media de tres experimentos, indicando su correspondiente S.E.M.

sistema in vitro. Para ello primero hubo que desarrollar un sistema de síntesis de proteínas in vitro, libre de células y de tejido cerebral, el mismo tejido de procedencia que PKI y eIF-2. Las condiciones de ensayo, así como sus parámetros de incorporación, nivel de iniciación, etc., se describen en el Capítulo 24 correspondiente a Materiales y Métodos.

Posteriormente, procedimos a realizar la medida de la síntesis de proteínas, en presencia y ausencia de PKI, expresada en pmol de $[^3\text{H}]\text{Leu}$ incorporada y representada en tantos por ciento con respecto a la máxima incorporación obtenida. Recordamos que las condiciones de ensayo de PKI ya se establecieron a partir de las condiciones del ensayo de síntesis de proteínas, por lo que era de esperar que PKI funcionara correctamente. Los resultados se muestran en la Figura 31., y en ellos se observa que la síntesis de proteínas no se ve afectada significativamente por PKI. Sólo aumenta ligeramente el nivel de síntesis de proteínas con respecto al control. Lo cual manifiesta que no hay ninguna inhibición de dicha síntesis por efecto de PKI.

ACTIVIDAD DEL FACTOR eIF-2 Y FOSFORILACION POR PKI

Para comprobar si PKI modifica la actividad del factor eIF-2, se realizó el ensayo de actividad de eIF-2 (o ensayo de formación de complejos ternarios; Capítulo 11 de Materiales y Métodos) después de fosforilar el factor con PKI, utilizando como control su valor normal sin fosforilar. Se utilizó la fracción cIF como aportadora de eIF-2, debido a que los factores eIF-2 purificados perdían casi totalmente su actividad en el medio de incubación de la reacción de fosforilación, y no por efecto de su fosforilación por PKI (datos no mostrados). Sin embargo, la fracción cIF no veía afectada su actividad eIF-2 con dicha incubación. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 32. y en ella se observa que la fosforilación del eIF-2 por PKI incrementa significativamente ($p < 0,05$) la actividad del primero, medida con [^3H]Met-tRNA_i en presencia de GTP.

Por otra parte, estudiando varios eIF-2 obtenidos de diferentes purificaciones, llegamos a establecer otra interesante relación entre el factor eIF-2 y PKI. Estos factores poseían distinta actividad en la formación de complejos ternarios y tratamos de ver si variaba con ello su nivel de fosforilación producido por PKI. Los factores habían sido purificados de igual forma, y sus diferencias en la actividad eran las lógicas derivadas del distinto tejido de partida y de las variaciones en su conservación.

Como se observa en la Figura 33., existe una relación lineal entre la actividad del factor eIF-2 y la fosforilación producida por PKI. Es decir, que la mayor actividad de un factor se corresponde con una mayor fosforilación, o lo que es lo mismo, que la fosforilación del eIF-2 es dependiente de su actividad. Esto introduce un nuevo parámetro en las medidas de actividad PKI, la actividad del propio sustrato a utilizar. En los experimentos mostrados en esta Tesis, todos los experimentos se realizaron con el mismo tipo de factor (indicado en la Figura 33.), salvo

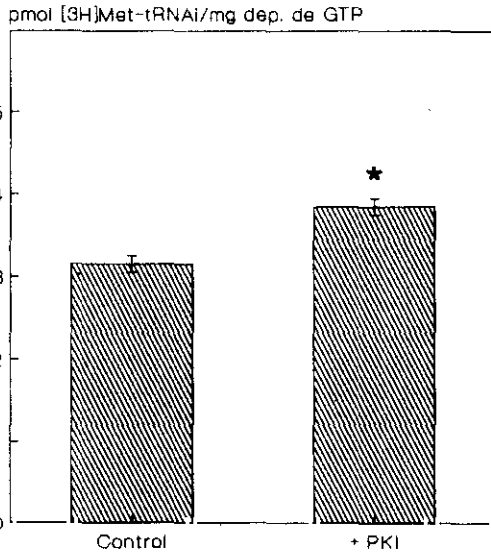


Figura 32. Efecto de Proteína Quinasa I en la actividad de formación de complejos ternarios del factor de iniciación eIF-2. La medida de la actividad del factor se realizó por incorporación de [3H]Met-tRNAi dependiente de GTP, en una fracción de factores de iniciación o fracción eIF (50 µg), tal y como se describe en el apartado de Métodos (Capítulo 11), y se expresa por mg de dicha fracción. El experimento se realizó en ausencia (Control) y presencia de 0,1 µg de Proteína Quinasa I (+PKI). Cada valor representa la media de tres experimentos, indicando su correspondiente S.E.M. (*) p<0,05.

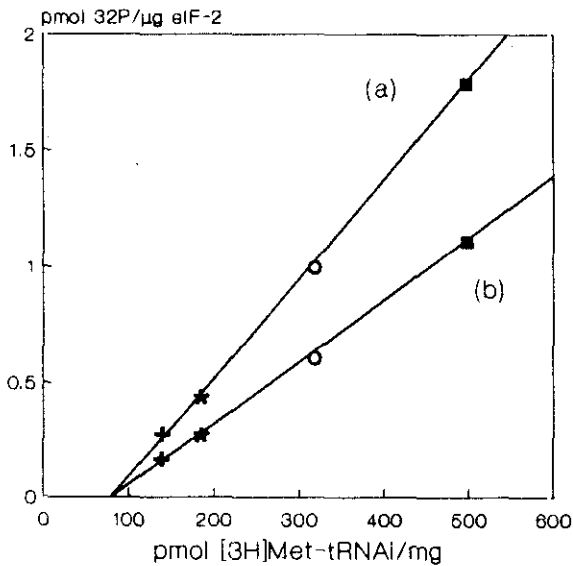


Figura 33. Actividad Proteína Quinasa I en función de la actividad del factor de iniciación eIF-2. La medida de la actividad PKI se realizó por incorporación de ^{32}P en el ensayo EEA en la subunidad α de cada eIF-2 empleado, y se expresa por µg de dicho factor. La actividad del eIF-2 se realizó por incorporación de [3H]Met-tRNAi dependiente de GTP medida en cada eIF-2, y se expresa por mg de dicho factor. El experimento se efectuó con diferentes eIF-2 (+,*,o,■) purificados y con 0,1 µg (a) y 0,05 µg (b) de PKI purificada. (*) factor eIF-2 utilizado en el presente trabajo.

r=0.999

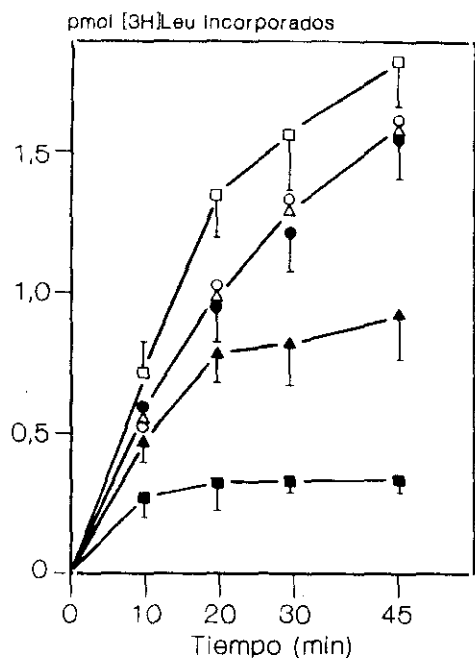


Figura 34. Identificación de un inhibidor de síntesis de proteínas en sobrenadante posmicrosomal S100 activado por N-etilmaleimida (NEM). La medida de síntesis de proteínas se realizó por incorporación de $[^3\text{H}]\text{Leu}$ en un sobrenadante posmitocondrial, tal y como se describe en el apartado de Métodos (Capítulo 24), y a los tiempos indicados. (o) control, sin adiciones; (●) control más el tampón de preincubación con NEM; (Δ, □) experimento control con 50 y 100 μg de fracción S-100 respectivamente; (▲, ■) experimento control con 50 y 100 μg de fracción S-100 preincubada en presencia de NEM. Cada punto representa la media de 8-10 experimentos, indicando su correspondiente S.E.M.

indicación contraria a este sentido. Se calcularon los pmol de ^{32}P incorporados por mg de factor eIF-2 y minuto de incubación, obteniéndose unos datos de 182 pmol $^{32}\text{P}/\text{mg}/\text{min}$ con 0,1 μg de PKI para el factor de mayor actividad. Si suponemos que cada molécula de eIF-2 incorpora una sola molécula de ^{32}P , se puede calcular el porcentaje de pmol de ^{32}P sobre el total de los pmol de eIF-2 contenidos en el ensayo (valor 100%), dando unos resultados de un 26% en 10 min en el ensayo EEA, fosforilándose entonces solamente ese porcentaje de las moléculas de eIF-2.

38. INHIBICION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS POR UN INHIBIDOR ACTIVADO POR N-ETILMALEIMIDA (NAI)

La N-etilmaleimida es un agente que reacciona con los grupos SH y activa irreversiblemente HCl, produciendo la inhibición de la síntesis de proteínas en reticulocitos (25,94). Por ello tratamos fracciones posmicrosomales o S-100 con N-etilmaleimida (NEM) y observamos la presencia de una actividad inhibidora de síntesis de proteínas de cerebro en dichas fracciones (Figura 34.).

TABLA VII
Purificación del inhibidor NAI de corteza cerebral

<u>Fracción</u>	<u>Proteína (mg)</u>	<u>ID-50* (μg)</u>	<u>Purificación</u>
Sobrenadante S-100	370	50	1
DEAE-celulosa	24,5	7,5	6,7
Fosfocelulosa	16,5	5,0	10
NAI	0,07	0,35	143

* ID-50 representa los μ g de fracción de proteína necesarios para inhibir la síntesis de proteínas un 50%. La actividad del inhibidor se mide con el sistema de síntesis de proteínas descrito en el Capítulo 24 de Métodos.

A continuación, tratamos de purificar dicha actividad mediante cromatografías en DEAE-celulosa y Fosfocelulosa P11 (Capítulo 25 de Materiales y Métodos), obteniendo una fracción a la que denominamos inhibidor activado por N-etilmaleimida o NAI (Figura 8.). Este inhibidor eluye con KCl 0,275-0,313 M en DEAE-celulosa y sólo se liga a Fosfocelulosa P11 a una concentración de 0,2 M de KCl, una vez modificado por el agente NEM. La Tabla VII resume la purificación de NAI, con la cual se enriquece su actividad unas 150 veces. El análisis de NAI mediante electroforesis con SDS, mostró un variado patrón de proteínas (datos no mostrados), por lo que esta purificación puede calificarse como parcial.

La adición de la fracción NAI al sistema de síntesis de proteínas produce una inhibición bifásica, que aumenta al incrementar la cantidad de NAI añadido (Figura 35.). La inhibición causada por NAI es revertida al añadir eIF-2 purificado (Figura 36.), lo cual establece una relación entre la inhibición producida por NAI y el factor eIF-2. Sin embargo esta relación no es debida a fosforilación, ya que NAI no produce ningún efecto sobre la fosforilación del factor eIF-2, dato este último no mostrado debido a que NAI, eIF2 y los dos juntos, no poseen fosforilación.

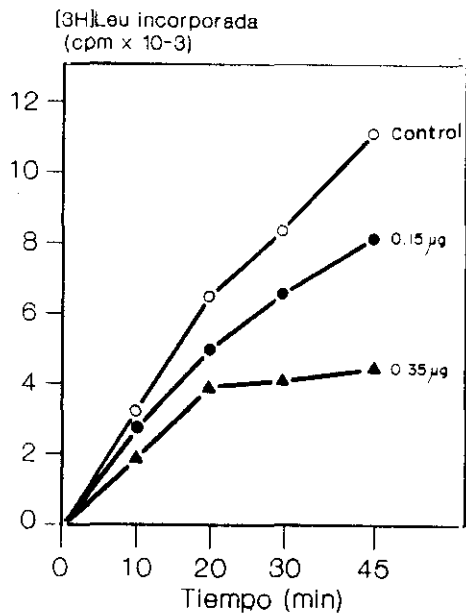


Figura 35. Inhibición de la síntesis de proteínas in vitro por el inhibidor activado por N-etilmaleimida (NAI). La medida de síntesis de proteínas se describe en la figura anterior. El inhibidor NAI se añadió al inicio de la incubación del sistema de síntesis de proteínas, en las cantidades indicadas.

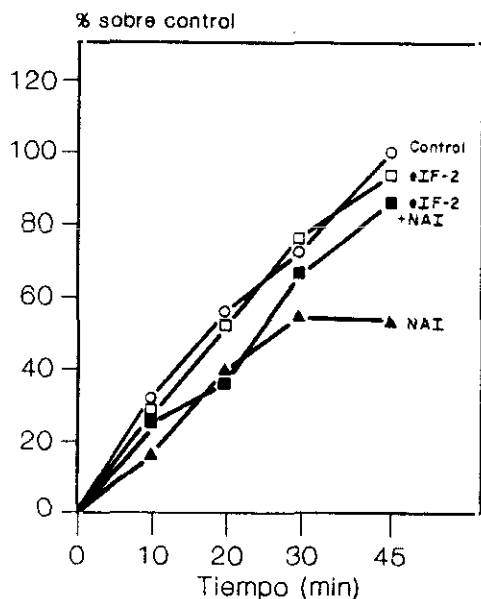


Figura 36. Reversión de la inhibición de la síntesis de proteínas producida por NAI, por el factor de iniciación eIF-2. La medida de síntesis de proteínas se describe en la figura anterior, y se expresa en % sobre el control a 45 min. (○) control, sin adiciones; (▲) control más 0,5 µg de NAI; (□) control más 0,6 µg de eIF-2; (■) experimento control con 0,5 µg de NAI y 0,6 µg de eIF-2. Cada valor representa la media de tres experimentos con una S.E.M. menor de un 10%.

DISCUSSION

39. EL FACTOR eIF-2 DE CEREBRO

El factor eIF-2 de cerebro obtenido por nuestro método de purificación (Capítulo 27 de Resultados) coincide por su composición de subunidades, peso molecular y actividad, con la mayor parte de eIF-2 purificados en otras células o tejidos descritos en la bibliografía (1,7,8,207-210). Este método multiplica por 15 el valor de purificación obtenido con nuestro método anterior (6), y se caracteriza por utilizar en su etapa final una cromatografía de alta afinidad o GDP-agarosa. Nos proporciona un factor eIF-2 de tejido cerebral altamente purificado, óptimo para la realización de los experimentos de esta Tesis y para futuros trabajos como la obtención de anticuerpos o estudios cinéticos.

Una de las principales dificultades en la purificación del factor eIF-2 de cerebro es la constante presencia de actividad caseína quinasa, proteína muy ubícua, con gran número de sustratos endógenos y de gran actividad en cerebro. Por esta razón se realiza un seguimiento de dicha actividad durante su purificación. A pesar de ello, alguna preparación de eIF-2 posee trazas de caseína quinasa II, por lo que en algunos resultados aparece una débil fosforilación en la subunidad β del eIF-2. Fosforilación que por otro lado se inhibe con heparina (potente inhibidor de caseína quinasa II) y que no afecta a la fosforilación de α .

40. CARACTERIZACION DE CASEINA QUINASA II

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, ya indicaban una posible fosforilación de eIF-2 β por caseína quinasa II (CK II) (176). Estudios preliminares de caseína quinasa II en cerebro de mamífero mostraban su existencia y una parcial purificación de la enzima, refiriéndola como fosvitina quinasa (211,212). Sin embargo, la enzima no estaba caracterizada ni se había purificado a homogeneidad. Por ello hemos realizado una

parcial caracterización debido además al interés que nos merece por poseer gran número de sustratos, entre ellos factores pertenecientes a la maquinaria de síntesis de proteínas, por ser una enzima multipotencial cuya función permanece desconocida, y por estar llamada a participar en el control del crecimiento celular (26,82,143,153). Estas razones son el por qué de la no caracterización de la proteína quinasa C y de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico purificadas también en este trabajo, puesto que son enzimas en las que los conocimientos actuales sobre sus características y su función (112,113,123,213-215 y 82,83,102,216-218), sobrepasan las posibilidades de estudio de nuestro laboratorio.

Primeramente realizamos un estudio regional de la actividad caseína quinasa en cerebro, resultando ser la corteza cerebral la de mayor actividad e inhibición por heparina (resultados no mostrados), y por ello la elegida para la purificación de la enzima. Uno de los problemas encontrados en el proceso de purificación de la enzima de tejido cerebral, ha sido su alto contenido en otras actividades quinasas. El ensayo de estas otras actividades se ha empleado para la purificación y caracterización de CK II.

En el presente trabajo aportamos un nuevo y sencillo método de purificación para esta proteína (Capítulo 28 de Resultados), con el que se obtiene una enzima altamente purificada y caracterizada como caseína quinasa tipo II semejante a la descrita en reticulocitos (149). En el primer paso de purificación, la cromatografía en DEAE-celulosa, se ensayan las principales actividades proteína quinasa, como quinasa C, dependiente de AMP cíclico y la propia caseína quinasa, siendo eliminada la primera de ellas. En fosfocelulosa se elimina la actividad dependiente de AMP cíclico y los dos picos de actividad caseína quinasa inhibidos por heparina eluidos en la columna, son similares a los resultados obtenidos por otros autores en hígado y corteza adrenal, y explicados como correspondientes a diferentes

isoenzimas o a una heterogeneidad de la enzima (151,219). La fracción protéica ligada a la Fosfocelulosa presenta gran fosforilación endógena, con una inhibición por heparina de sólo el 50% (resultados no mostrados). Este hecho debe explicar la actividad residual encontrada en presencia de AMP cíclico y calcio más fosfolípidos, así como la correlación entre el pico de actividad caseína quinasa y la inhibición por heparina. En los dos últimos pasos de purificación, fosvitina-Sefarosa y ATP-agarosa, el pico de proteína ligada a la columna coincide con un único pico de actividad caseína quinasa.

El análisis de la enzima purificada en electroforesis en presencia de SDS nos muestra tres bandas mayoritarias α , α' y β , con una relación de 2,6:1,0:1,3 respectivamente, siendo la subunidad β autofosforilable en presencia de ATP. Estas características coinciden con las descritas en otros tejidos o sistemas como timo, Drosophila, Artemia, próstata, levadura, hígado o Xenopus (220-225), sin embargo, esta relación cambia con el tiempo, y así al cabo de un mes a 4°C la subunidad α decrece, α' se incrementa y β permanece constante. La disminución de la subunidad α es equivalente al incremento de α' más dos nuevas bandas con una masa molecular relativa de 36.000 y 34.000; estos cambios en la composición son paralelos a una disminución de la actividad de la enzima del 60% (resultados no mostrados). Se puede pensar que la subunidad α sufre proteólisis limitante, de forma análoga a la producida por la digestión con tripsina (221,223). Purificaciones de CK II en otros tejidos señalan proporciones $\alpha+\alpha':\beta$ de 1:1 o de 3:1 (221), esta última equivalente a la de nuestra preparación.

Caseína y fosvitina han sido descritos como buenos sustratos exógenos para CK II (222-224). Nuestros estudios cinéticos demuestran que la fosvitina es mejor sustrato para la enzima de cerebro por su menor K_m ; no obstante, dado que la V_{max} para caseína es mayor que para fosvitina, se pueden obtener resultados aparentemente contradictorios.

Algunas caseínas quinasas II de otros tejidos son estimuladas por concentraciones de sales, mientras que otras son inhibidas (149,221), nuestros resultados confirman los primeros, con una estimulación de la actividad de tres veces, a una concentración de KCl o NaCl de 150 mM, e inhibición a concentraciones superiores de 400 mM. Es interesante la disminución de la inhibición por heparina en presencia de concentraciones óptimas de KCl. Este efecto no ha sido manifestado por otros autores y puede ser el responsable de la menor inhibición mostrada por la heparina durante el procedimiento de purificación.

41. FOSFORILACION DE LA SUBUNIDAD β DEL FACTOR eIF-2 POR TRES PROTEINAS QUINASAS

En la introducción describíamos que eIF-2 β podía ser fosforilada por proteína quinasa C, quinasa II activada por proteasas y caseína quinasa II (59,226,227). La fosforilación de la subunidad β por caseína quinasa II y proteína quinasa C (PKC) ha sido señalada por varios autores en sistemas de reticulocitos (39,42,226,227), sin embargo descartaban la posibilidad de una fosforilación por parte de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA). Sorprendentemente, en nuestro trabajo mostramos la fosforilación de la subunidad β del eIF-2 de cerebro por PKA (Capítulos 30 y 31 de Resultados). Algunos de estos autores señalaban también una menor efectividad por parte de CK II con respecto a PKC en dicha fosforilación de β (39), criterio tampoco compartido por otros autores (42) ni por nosotros en virtud de los resultados que aquí se muestran.

En la fosforilación de la subunidad β producida por caseína quinasa II y por proteína quinasa C, se han identificado los sitios de fosforilación en las posiciones Ser² para CK II y Ser¹³ para PKC (26,228,229) del extremo N-terminal. Nuestros datos del análisis de fosfopéptidos muestran la diferente localización de

los aminoácidos fosforilados por dichas quinasas. También indican que podía haber posiciones comunes, hecho posiblemente producido por la proximidad de los restos fosforilados. Por otra parte, eIF-2 β ha sido descrita como una subunidad muy sensible a proteólisis (230,231), razón por la cual hemos encontrado otros fosfopéptidos de dicha subunidad.

La función de la fosforilación de la subunidad β no se conoce hoy día, ya que β no modifica la actividad del eIF-2 in vitro y no es un elemento indispensable en la formación de complejos de iniciación (2,4,230). A pesar de que la subunidad β participa en la interacción con el GTP (9,10,232) y es capaz de sufrir ADP-ribosilación por la toxina colérica (30,232), tampoco se ha encontrado que una deficiencia en esta subunidad incapacite al eIF-2 para la formación de complejos ternarios o su unión a la subunidad 40S (9,208,209,233). Más recientemente, se ha sugerido que la modificación de eIF-2 β debe producir una pequeña estimulación de la unión del Met-tRNA_i a la subunidad ribosomal 40S (40) o debe afectar a la fosforilación de la subunidad α (39,234). También se ha indicado que eIF-2 β pudiera intervenir en la interacción con el GEF, al encontrarse una relación entre esta subunidad y el contenido de GDP ligado a eIF-2 (30,208,235). Por último, otros autores a partir de la clonación y secuenciación de eIF-2 β a la que asignan un peso molecular de 38 kDa, atribuyen un papel esencial a esta subunidad β por su participación en el reconocimiento del codón de iniciación AUG (236,237).

La subunidad β y su fosforilación, deberán ser motivo de un mayor estudio por la controversia existente sobre su papel y funcionalidad. Dichos estudios podrían ir dirigidos en dos direcciones:

- I. El posible y diferente papel regulador de estas tres quinasas, las cuales podrían modificar su actividad, alterando la funcionalidad del factor eIF-2 e interviniendo en el control de la síntesis de proteínas.

II. La posibilidad de diferencias en la funcionalidad de la subunidad β entre eIF-2 de distintos tejidos. Hecho apoyado por la variabilidad estructural encontrada en dichos factores consistente en la ausencia en ocasiones de subunidad β (1,7,207-209), y por la heterogeneidad de la propia subunidad β dada la existencia de subtipos β_H y β_L en algunos tipos celulares o tejidos incluido cerebro (196,230,235,238).

42. LA FOSFORILACION POR HCl DEL FACTOR eIF-2

La fosforilación de eIF-2 α de cerebro por HCl (Capítulo 32 de Resultados) responde a un comportamiento general de los eIF-2 de diferentes tipos celulares o tejidos. Así, los factores de Drosophila, Strongylocentrotus, germen de trigo, músculo, hígado, levadura, cultivos celulares o Artemia (7,8,207,210,239-242), son fosforilados en su subunidad menor o α por HCl.

43. FOSFORILACION EN LA SUBUNIDAD α DEL FACTOR eIF-2 POR PROTEINA QUINASA I

En los capítulos anteriores hemos visto como algunas de las proteínas quinasas conocidas, son capaces de fosforilar el factor eIF-2 de cerebro en su subunidad β , pero ninguna lo hace sobre la subunidad α . Sin embargo ésta subunidad sí puede ser fosforilada por la proteína eIF-2 α quinasa existente en reticulocitos (HCl).

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraban la existencia en tejido cerebral de fosforilación en la subunidad α del eIF-2 (176,177), y proponían a una proteína quinasa endógena responsable de dicha fosforilación. La existencia de eIF-2 α fosforilado o la presencia de actividades quinasas responsables de dicha fosforilación, ha sido descrita también en numeros tipos celulares, además, por supuesto, de reticulocitos. Esta fosfo-

rilación de la subunidad α suele aparecer o modificarse frente a una serie de agentes objeto de estudio. Así, se ha detectado eIF-2 α fosforilado en condrocitos con insulina (243), en células L de ratón por infección de mengovirus (244), en células de ovario de hamster en respuesta a una elevación de temperatura (245), en células HeLa por efecto de agentes químicos o calentamiento (246,247), en células Ehrlich con calentamiento, carencia de aminoácidos o factores de crecimiento (248,249), y en hepatocitos en respuesta a privación de aminoácidos (250). Sin embargo, en ninguno de estos sistemas se ha conseguido aislar, purificar o caracterizar la proteína quinasa responsable de la fosforilación de eIF-2 α .

En tejido cerebral se ha tomado como material de partida, o fuente de actividad quinasa fosforiladora de eIF-2 α (Capítulos 34 y 35), el sobrenadante posmicrosomal S-100, el cual representa a la fracción citosólica celular. La elección de esta fracción se debe en primer lugar, a que es en el citosol de la célula donde se han descrito la mayor parte de las actividades proteína quinasa (81-83), y en segundo lugar, por haber encontrado en esta fracción mayor actividad que en la fracción cIF, la cual también se probó no sólo por ser muy rica en factores de iniciación, incluyendo el factor eIF-2, sino por contener también otras proteínas quinasas. De la fracción S-100 hemos purificado una proteína quinasa a la que denominamos proteína quinasa I o PKI, que fosforila en la subunidad α del factor eIF-2. En otros tipos celulares o tejidos se han descrito, además de las conocidas HCI y DAI, dos proteínas quinasas capaces de fosforilar en eIF-2 α , estas son una proteína quinasa PK 380 de corteza adrenal (36,251,252), y caseína quinasa II (CK II) de Artemia (8,210,253).

44. CARACTERIZACION DE PROTEINA QUINASA I COMO QUINASA DEPENDIENTE DE CALCIO Y CALMODULINA

La proteína quinasa I mayoritariamente obtenida se compone de dos subunidades: a de 39.000 y b de 20.000 de masas moleculares relativas, dando una estructura para la holoenzima de a_3b con un peso cercano a 140.000 (Capítulo 36). La calmodulina (CaM), al igual que ocurre en la fosforilasa quinasa (82,143), es parte integral de la enzima, constituyendo la subunidad menor b.

Estas características moleculares diferencian PKI del resto de proteínas quinasas dependientes de calcio y CaM, ya que la quinasa dependiente de calcio y CaM tipo I ha sido descrita como un monómero de 37.000 a 39.000 de masa molecular relativa sin formar estados de mayor asociación (125), la tipo II posee subunidades de 50 a 60 kDa que componen holoenzimas de 250 a 650 kDa (132,254), la tipo III y la quinasa de la cadena ligera de la miosina poseen subunidades de 90 kDa y de 80 a 130 kDa respectivamente (255,256 y 82,123), y por último, la fosforilasa quinasa se compone de cuatro tipos distintos de subunidades de 145, 128, 45 y 17 kDa (82,143).

PKI puede presentarse con distinta composición de subunidades a y b, dando una variabilidad como holoenzima y manifestando una heterogeneidad. Sin embargo, no forma otras asociaciones o agregaciones, sino que dichas estructuras holoenzimáticas vienen definidas por la relación entre sus subunidades. Esta heterogeneidad en la composición de sus subunidades también está presente en la quinasa dependiente de calcio y CaM tipo II (132,133,254), pero realmente no sabemos si corresponde a diversos estados funcionales de PKI o si es producto del método de purificación empleado. En cualquier caso, es conveniente realizar las siguientes puntualizaciones: (i) la actividad de PKI es mayor si la proporción relativa de su subunidad b es más alta, y esta actividad aumenta hasta que la relación a:b se aproxima a 1:1; (ii) puesto que la diferente composición de las subunidades

de PKI produce una distinta actividad de la misma, hay que señalar que todos los experimentos de esta Tesis están realizados con el mismo tipo de PKI, de relación entre sus subunidades a:b de 3-2,5:1 y que es el mayoritariamente obtenido; (iii) el hecho de que PKI presente esta heterogeneidad en la composición de sus subunidades a y b no contradice los resultados obtenidos con la filtración en gel, ya que están referidos solamente al tipo de PKI mayoritariamente obtenido y utilizado en esta Tesis, y de cualquier modo, nos pone de manifiesto que PKI no forma agregados de mayor peso molecular.

La actividad de PKI es dependiente de Mg^{2+} , se autofosforila en la subunidad mayor o a y su K_m para ATP es del orden de μM , propiedades todas ellas comunes a la mayoría de las quinasas descritas (81-83). La autofosforilación de su subunidad a nos confirma que PKI responde a similares características de otras proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} y CaM, como las tipo I y II, y nos sugiere la idea de que como en éstas, sea la subunidad ligante de calmodulina (125,132,133).

La proteína quinasa I fosforila al eIF-2 exclusivamente en aminoácidos de serina. Este dato diferencia claramente PKI de la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina tipo III, la cual sólo fosforila en residuos de treonina (26,124). PKI no fosforila caseína e histonas. Las histonas son malos sustratos para las quinasas dependientes de Ca^{2+} y CaM, y la caseína tampoco es un buen sustrato, siendo sólo y póbaramente fosforilada por la quinasa dependiente de calcio y CaM tipo II (132,257,258); por lo que era esperado el resultado negativo de PKI.

En la identificación inicial de moduladores de PKI se observó una ausencia de efecto de heparina, AMP cíclico, GMP cíclico y poli(I)·poli(C). Ello está de acuerdo con la ausencia de fosforilación de caseína, sustrato de caseína quinasa II, y de proteínas histonas, sustrato de las quinasas activadas por los tres últimos moduladores citados anteriormente.

La proteína quinasa I posee calmodulina y es por tanto, dependiente de calcio y calmodulina. Así, calcio 0,5 mM produce una ligera activación, que se aumenta al añadir CaM. Lógicamente, un agente quelante del calcio como es EGTA, a una concentración de 5 mM produce inhibición, al igual que 0,1 mM de trifluoperazina, un inhibidor específico de proteínas dependientes de Ca^{2+} y CaM. El hecho de que PKI posea calmodulina endógena (la subunidad b) explica que las activaciones no sean tan altas como cabría esperar, puesto que por las condiciones del ensayo de actividad PKI (ensayo EEA), ésta ya se ha purificado en estado "activado". De igual modo, sus inhibidores específicos no la inhiben totalmente, porque tanto EGTA como TFP interaccionan fundamentalmente con calcio y calmodulina libres respectivamente (259,260), mientras que PKI se encuentra con Ca^{2+} y CaM ligados. La actividad de PKI con una relación b:a próxima a 1 tiene un valor de un 135%, cercano al de la activación por Ca^{2+} y CaM (147%). Es decir, la máxima actividad de PKI se produce cuando la relación entre CaM (tanto de calmodulina endógena o b, como exógena) y la subunidad a es ≥ 1 mol:mol, mecanismo similar al descrito para las quinasas dependientes de calcio y CaM tipos I y II (125,133). De otra parte, los anticuerpos frente a calmodulina sí producen una total inhibición de PKI, debido a su fuerte afinidad y a la precipitación del antígeno (CaM) (261,262).

El calcio y fosfatidilserina (PS) producen una activación significativa sobre la actividad PKI que fosforila en eIF-2 α . Este aumento pensamos que no es debido a una posible actividad quinasa C ya que PKI no fosforilaba histona H1, buen sustrato de dicha actividad, sino que lo relacionamos con tres posibles efectos descritos en la bibliografía. Uno es el hecho de que la fosfatidilserina, en presencia de calcio y CaM, activa la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /CaM tipo I (125). Dos, en reticulocitos, el calcio y PS aumentan la fosforilación de eIF-2 α (263,264); y tres, el eIF-2 en presencia de PS puede formar un complejo que altera sus propiedades, siendo su efecto similar al producido por eIF-2 α (P) (265,266).

Los agentes que modifican los grupos SH, como GSSG, N-etilmaleimida o hemina, inhiben la actividad de PKI. Lógicamente la acción del DTT, conservador de dichos grupos, es contraria a los anteriores. Estos agentes se han descrito en la bibliografía como modificadores de la fosforilación de eIF-2 α o del propio eIF-2 (25,93,94,173), y por ello no sabemos si el efecto observado se debe al propio factor o se produce sobre la actividad enzimática de PKI. Actualmente se conoce que la N-etilmaleimida inhibe la actividad de la quinasa dependiente de Ca²⁺ y CaM tipo II (PKCaM II) (129). Por otra parte, los moduladores no producen ninguna modificación en la propia fosforilación del factor o en la autofosforilación de PKI.

Se estudiaron otros posibles sustratos endógenos de PKI en las fracciones S-100, cIF y R. En presencia de PKI, las dos primeras fracciones sólo incrementan la fosforilación en la posición de eIF-2 α , ello nos hace pensar en una gran especificidad de PKI por el sustrato eIF-2 α . Es posible también que parte del aumento de fosforilación fuera debido a la propia PKI, cuya subunidad a coincide con la posición de eIF-2 α . Este efecto, podría ser causado por un estímulo en la propia autofosforilación de PKI, debido por ejemplo a una disminución de la concentración de Mg²⁺ libre, o a una fosforilación por parte de otra actividad proteína quinasa presente en dichas fracciones. Así, se conoce la fosforilación de fosforilasa quinasa por PKA, PKC y PKCaM II, y de la quinasa de la cadena ligera de la miosina por PKA (82,126,254).

En la fracción R sí se identifican algunos sustratos de PKI, con masas moleculares relativas entorno a 14.000 y 24.000 y que por tratarse de la fracción ribosomal, podrían identificarse con alguna proteína ribosomal o subunidad de los factores de síntesis de proteínas. Fosfoproteínas de fracción microsomal o ribosomal y de similares pesos moleculares han sido extensamente descritos en la bibliografía (26,267-272). Arriesgándonos, podríamos identificar la de mayor peso molecular como el factor eIF-4E (Capítulo 3 de Introducción) (26,28,56,59), lo cual sugeriría que PKI es

una proteína muy específica, que intervendría en la regulación de la maquinaria de la síntesis de proteínas.

Por último, dos consideraciones: primera, que si identificamos a la subunidad b como calmodulina y por tanto el activador de proteína quinasa I, tenemos que considerar a la proteína a como la subunidad enzimática o catalítica; y segundo que por tanto en todo este trabajo se purifica, caracteriza y describe una enzima, PKI, "activa" endógenamente, lo cual no excluye su existencia en forma "inactiva" en otras fracciones y con otras características.

45. EFFECTO SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS DE PROTEINA QUINASA I

Una vez realizado el estudio de la fosforilación del factor eIF-2 por proteínas quinasas in vitro, incluyendo aspectos como niveles de fosforilación, condiciones óptimas, cinética, características moleculares y caracterización de las propias quinasas, se plantea la necesidad de trasladar su estudio al medio donde desarrollan su actividad. Este medio no es más que un sistema de síntesis de proteínas, el cual supone pasar a un mecanismo con un grado de mayor complejidad al intervenir otros muchos elementos. Por ello, si nuestro interés está centrado en la verificación de los resultados obtenidos en los ensayos in vitro y ver su efecto en este sistema, y en definitiva, comprobar si la fosforilación del factor en su subunidad α desempeña algún papel regulador, debemos contar con un sistema de síntesis de proteínas que sea sensible a tales modificaciones y que sea lo más fisiológico posible. De aquí la importancia del sistema desarrollado in vitro y descrito en el Capítulo 24 de Materiales y Métodos.

La primera conclusión de los resultados obtenidos (Capítulo 37) es que no existe ninguna inhibición de la síntesis de proteínas, y podría pensarse que la fosforilación del factor eIF-2 es simplemente un efecto obtenido in vitro sin conse-

cuencias fisiológicas. Sin embargo, en este punto quisiéramos exponer una serie de consideraciones, algunas de ellas ya avanzadas en el Capítulo 7 de Introducción:

I. A pesar de reproducir en el ensayo de fosforilación del eIF-2 las condiciones del sistema de síntesis de proteínas (Capítulos 20 y 24), en éste último hay otras muchas moléculas, proteínas fosfatasas (49,162), otros sustratos (56-63,267-272) ¿competidores?, ¿posibles inhibidores de PKI?, etc., que pueden disminuir o inhibir la fosforilación de PKI en eIF-2.

II. Podría ocurrir que el eIF-2, al participar y ser parte integrante de la maquinaria de síntesis de proteínas, adoptara una localización (por ejemplo, asociado a las subunidades 40S y 60S, mRNA o proteínas del citoesqueleto) (2,4) que le hiciera inaccesible para PKI.

III. Otra posibilidad es que el efecto no fuera de inhibición, es decir, que la fosforilación por PKI en eIF-2 causara una modificación molecular sobre el factor diferente a la producida por HCl o DAI en reticulocitos, que no ocasionara el atrapamiento del GEF, y por consiguiente no inhibiera la síntesis de proteínas. Esta diferente modificación podría estar apoyada por la existencia de distintos factores eIF-2 (de variada composición molecular y con o sin subunidad β) (6-8,207-209) y de más de una localización de la fosforilación sobre eIF-2 α (31,32,273,274).

IV. Si los niveles de GEF activo o la relación GEF/eIF-2 fueran mayores en tejido cerebral que en reticulocitos, no se produciría el secuestro total del GEF al fosforilarse eIF-2 α y la síntesis de proteínas no se detendría (2,4). Desafortunadamente, no conocemos el contenido en GEF de nuestras preparaciones, cuantificación laboriosa y difícil que requiere la purificación de GEF de cerebro y obtención de anticuerpos, y que supera las pretensiones del presente trabajo.

V. Por último, quizás el efecto buscado de inhibición de la síntesis de proteínas existe, pero nuestro sistema no es lo suficientemente sensible para su detección. Es decir, en nuestro sistema de síntesis de proteínas el nivel de iniciación es de un 40% a un 50%, que puede ser insuficiente para la detección de la inhibición buscada. La no disponibilidad de eficientes sistemas de síntesis de proteínas in vitro, con excepción del de reticulocitos, es un impedimento para los estudios de la regulación de los mismos (2,166,200).

46. FOSFORILACION DE DIFERENTES FACTORES eIF-2 POR PROTEINA QUINASA I

La actividad de eIF-2, previamente incubado en presencia de PKI más ATP (Capítulo 37), y medida como formación de complejos ternarios con [³H]Met-tRNA_i y GTP, da como resultado un incremento del 22% sobre dicha actividad. Actualmente se cree que el eIF-2 α fosforilado no produce ningún efecto per se sobre la actividad del factor (2,4,25). De este modo, el eIF-2 de cerebro y su fosforilación no se comporta como cabría esperar, pero sí estaría de acuerdo con el efecto no inhibitor observado sobre la síntesis de proteínas. Incluso, si bien no es significativo, PKI aumenta ligeramente el nivel de síntesis de proteínas, que podría explicarse por el efecto estimulador de la actividad del eIF-2, del mismo modo que la fosforilación de factor eIF-4E produce una estimulación en la síntesis de proteínas (56,275-277).

La relación entre actividad eIF-2 y su fosforilación establece una dependencia por parte de PKI de la actividad biológica del eIF-2. Es decir, la fosforilación sólo adquiere sentido cuando el factor es activo. La integridad molecular del eIF-2, y su actividad como reflejo de aquella, ha sido señalada por otros autores como necesaria para la fosforilación por HCl del eIF-2 de reticulocitos (234,278). Con el factor de cerebro de

máxima actividad fosforilado por PKI, y suponiendo que se incorpora un ^{32}P por molécula de eIF-2, se obtienen 0,26 mol P/mol eIF-2, valor claramente inferior a los 0,8-1,0 mol P/mol eIF-2 obtenidos con eIF-2 de reticulocitos por HCl in vitro (32,241, 242). Por último, de estos resultados se desprenden dos consecuencias; primera, un factor eIF-2 inactivo, obtenido por el mismo procedimiento de purificación, no sería fosforilado por PKI; segunda, los bajos valores de fosforilación obtenidos con PKI sobre eIF-2 de cerebro pueden ser debidos a que la eficiencia de la reacción es baja y/o que el resto de eIF-2 se encuentra ya fosforilado.

De los resultados anteriores, se deduce el interés que puede tener la fosforilación de eIF-2 de reticulocitos (eIF-2_r) por parte de PKI. Dicha fosforilación fué amablemente realizada por el Dr. C. De Haro, siendo su resultado negativo (206). La no fosforilación del factor eIF-2_r por PKI, aunque parece sorprendente, no lo es tanto, ya que también caseína quinasa II de Artemia no fosforila eIF-2 α de reticulocitos, y sí lo hace en eIF-2 α de otras procedencias (8,210). La fosforilación de PKI debe producirse en un sitio diferente al de HCl, pudiendo pensarse entonces que PKI no fosforila eIF-2_r porque ya lo está, por la acción de otra actividad eIF-2 α quinasa distinta de HCl (¿análoga a PKI?) existente en reticulocitos, posibilidad y existencia afirmada por algunos autores (167,273,274). Ello tiene una consecuencia importante: si la fosforilación no es como la de HCl, su mecanismo y funcionalidad podría ser diferente, y por tanto, sus efectos fisiológicos tampoco serían los mismos. En otras palabras, al ser diferente la fosforilación de PKI en eIF-2 α de la producida por HCl, es lógico pensar que no conduzca a la inhibición de la síntesis de proteínas.

47. EFECTO EN LA SINTESIS DE PROTEINAS DE UN INHIBIDOR ACTIVADO POR N-ETILMALEIMIDA

Ante la ausencia de efecto sobre la síntesis de proteínas de la fosforilación de eIF-2 por PKI, se trató de encontrar una actividad similar a HCI por tratamiento con N-etilmaleimida de nuestras fracciones de cerebro, y purificarla utilizando como ensayo de su actividad la inhibición de síntesis de proteínas. El tratamiento con N-etilmaleimida, como activador irreversible de la proteína quinasa HCI (ver Introducción) (25,34,94), y su ensayo de inhibición de síntesis de proteínas en reticulocitos, ha sido utilizado como método de purificación de HCI (279,280). Los resultados muestran (Capítulo 38) la existencia de un inhibidor de síntesis de proteínas activado por N-etilmaleimida o NAI, y de una relación entre el inhibidor y el factor eIF-2. No conocemos si dicha relación es consecuencia de un efecto de NAI sobre eIF-2, o si NAI actúa a otro nivel y esta acción es compensada por el efecto de nuevo eIF-2. En cualquier caso, NAI no actúa por fosforilación del eIF-2, aunque pensamos que su acción se sitúa en la etapa de iniciación.

En definitiva, hemos encontrado en tejido cerebral, una inhibición de síntesis de proteínas activada por N-etilmaleimida, que es revertida por eIF-2 e independiente de su fosforilación. La existencia de inhibidores de síntesis de proteínas relacionados con el factor eIF-2 ha sido descrita en la bibliografía (281-284). Estos inhibidores poseen un variado rango de pesos moleculares (de 1 a 100 kDa) y características (tanto termoestables como termolábiles) según los distintos autores, y aunque algunos de ellos establecen la relación con la fosforilación de eIF-2 α , esta relación no es directa y sólo se observa en fracciones no purificadas.

La N-etilmaleimida es un conocido agente que actúa sobre los grupos SH, alterando la formación de puentes disulfuro de forma análoga al efecto producido por el glutatión oxidado (GSSG) o la

presencia de oxígeno. Todos estos agentes han sido descritos como inhibidores de la síntesis de proteínas, actuando sobre HCI y el propio eIF-2 (25,93,94,173,285). La hipótesis de que cambios en el nivel de oxido-reducción alteren el estado de los grupos SH de NAI, y éste, bien directamente o a través del factor eIF-2, inhiba la síntesis de proteínas, se presenta muy atractiva. Se precisa por tanto un estudio de NAI hasta su identificación, así como de su mecanismo de acción, para contribuir a un mejor conocimiento del control de la traducción.

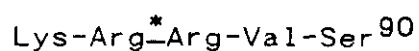
48. LA REGULACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN CEREBRO POR FOSFORILACION. DISCUSION GENERAL

En el presente trabajo, hemos identificado cuatro proteínas quinasas que fosforilan en el factor eIF-2. Tres de ellas tienen por sustrato la subunidad β de dicho factor: una quinasa definida como independiente (caseína quinasa II), otra dependiente de calcio (proteína quinasa C) y de forma más minoritaria, la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico. La última quinasa la denominamos proteína quinasa I (PKI) y fosforila en la subunidad α del eIF-2. Esta PKI es muy diferente de HCI o DAI tanto por sus características moleculares como por sus moduladores y sustratos, y los resultados obtenidos se alejan del modelo establecido actualmente con las eIF-2 α quinasas HCI y DAI en reticulocitos, lo cual genera una controversia que comentaremos en este capítulo.

La fosforilación producida por PKI podría efectuarse en una localización diferente de la establecida para HCI o DAI, que fosforilan sólo en el residuo Ser⁵¹ produciendo inhibición de la traducción (31,231,286,287). Así, parece probada la existencia de un segundo sitio, que algunos autores identifican con la posición Ser⁴⁸ (31,32,273,274,289). Estudiando la secuencia de eIF-2 α (33,290), aparecen otras dos regiones de interés: los residuos 52-57:

Arg-Arg-Arg-Ile-Arg-Ser⁵⁷

y las posiciones 86-90:



Ambas son ricas en aminoácidos básicos, coincidiendo con los requerimientos de las proteínas quinasas dependientes de calcio y CaM, que precisan un aminoácido básico (*) tres residuos anteriores por el extremo N-terminal a la posición de fosforilación, y similar a la quinasa calcio/CaM tipo I, que necesita tres aminoácidos básicos dos residuos anteriores por el extremo N-terminal a la posición de fosforilación (83,231). Los residuos Ser⁵⁷ y Ser⁹⁰ podrían ser candidatos a la fosforilación por PKI.

La diversidad de estructura y características moleculares existente en los factores eIF-2 purificados de diversos tipos celulares, tejidos u organismos (1,6-8,207-209), consistentes en una ausencia de la subunidad β y en variaciones de su composición molecular, podría ser causa de las diferentes características del eIF-2 de cerebro con respecto al de reticulocitos, las cuales le harían sensible a la actividad de PKI. También se ha descrito la existencia de subproductos de eIF-2 α y de polipéptidos asociados a dicha subunidad, todos ellos con un peso molecular muy próximo al de la propia subunidad α (7,207,231,291). Si bien, los resultados del presente trabajo no han delatado la presencia de estos componentes, no se descarta la posibilidad de su existencia comigrando con eIF-2 α .

Otro factor a tener en cuenta es la heterogeneidad existente también en la subunidad β del eIF-2 en algunos tejidos, incluido cerebro en el que hemos encontrado dos subunidades β que difieren en su punto isoeléctrico y peso molecular (196,230,235,238). Se ha sugerido que la estructura terciaria o cuaternaria debe intervenir en la fosforilación de eIF-2 α , ya que la integridad molecular es necesaria para dicho mecanismo (231,234,278). Si la presencia de la subunidad β se precisa para la fosforilación de eIF-2 α y si esta subunidad en tejido cerebral es heterogénea, alguna de estas eIF-2 β podría modificar específicamente la

estructura terciaria o cuaternaria del eIF-2 de manera que su subunidad α fuera entonces accesible a PKI. Esta hipótesis estaría apoyada por la relación existente entre la actividad del factor, reflejo de su estructura, y la fosforilación de PKI; y podría explicar además su menor nivel de fosforilación en el caso de que el contenido en ese tipo particular de eIF-2 β fuera bajo.

En realidad la comparación con HCI y el sistema de reticulocitos presupone considerar a esta proteína quinasa el modelo a reproducir, algo más que discutible ya que está demostrada la especificidad de HCI solamente para reticulocitos (2,4,164,167,292). Nuestros resultados han sido obtenidos con tejido cerebral, un sistema de mayor complejidad donde no tiene sentido la regulación por hemina y cuya regulación debe ser muy diferente y desconocida (69,74-76). Los datos presentados constituyen una prueba de su diferencia, de un lado la fosforilación del eIF-2 por PKI no supone una inhibición en la síntesis de proteínas, de otro la N-etilmaleimida no es un activador de una proteína quinasa que inhibe síntesis de proteínas y sin embargo sí activa un inhibidor de dicha síntesis de proteínas.

En el momento actual, y con los pocos datos existentes en sistemas no eritroides, no creemos en la inutilidad de las fosforilaciones existentes sobre el factor eIF-2, tanto en su subunidad α como β . El estudio de la fosforilación de eIF-2 β no ha tenido el interés que merece por los resultados negativos obtenidos inicialmente, al quererlos asemejar con los logrados en eIF-2 α . Pero, precisamente sus anómalas características y el desconocimiento de su función, deberían motivarnos para su estudio con una óptica alejada de la aplicada para eIF-2 α .

En cuanto a la fosforilación de PKI, no queremos olvidar la importancia que puede tener el Ca^{2+} como mensajero en la regulación de la traducción, a través de proteínas quinasas específicas, y por qué no, también por medio de PKI. La síntesis

de proteínas parece ser específicamente dependiente de calcio, ya que la disminución de este mensajero produce la inhibición de la traducción. En estos sistemas, la adición de calcio promueve la acumulación de complejos 43S (subunidades ribosomales 40S con el complejo ternario eIF-2·GTP·Met-tRNA_i), por lo que el efecto del calcio se sitúa a nivel de la iniciación (293-295). Sin embargo, en contraste con las células nucleadas de mamíferos, los reticulocitos no parecen ver afectada su iniciación por calcio (295). Estos resultados, que demuestran una regulación de la síntesis de proteínas dependiente de Ca²⁺, se ven apoyados por los ya conocidos de las proteínas eIF-4B, -4E, eEF-2 y S6 que son fosforiladas por quinasas dependientes de calcio (26,57,59).

Por último, en el presente trabajo se muestra la fosforilación en eIF-2β por proteína quinasa C y en eIF-2α por una quinasa dependiente de calcio y calmodulina (PKI) en tejido cerebral. Ambos resultados relacionan, por una doble vía, el Ca²⁺ con el factor de iniciación eIF-2, siendo necesarios más estudios para conocer si las proteínas quinasas PKC y PKI, ejercen un control positivo sobre el factor eIF-2 de cerebro y actúan de mediadoras en la respuesta al calcio de la iniciación de la traducción.

CONCLUSIONES

49. CONCLUSIONES

1. Las proteínas quinasas Caseína Quinasa II, Proteína Quinasa C y Proteína Quinasa dependiente de AMP cíclico purificadas de corteza cerebral, fosforilan in vitro específicamente el factor eIF-2 del mismo tejido, en su subunidad β .
2. Una proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina no descrita y purificada de corteza cerebral, a la que denominamos Proteína Quinasa I, fosforila in vitro el mismo factor eIF-2 en la subunidad α .
3. En las condiciones del sistema in vitro de síntesis de proteínas de cerebro, la Proteína Quinasa I no produce inhibición de la traducción.
4. En la fracción citosólica de tejido cerebral, existe un inhibidor de síntesis de proteínas activado por N-etilmaleimida, cuyo efecto se revierte con la adición de eIF-2 purificado del mismo tejido. El inhibidor no fosforila a dicho factor en ninguna de sus subunidades.

BIBLIOGRAFIA

50. BIBLIOGRAFIA

1. Moldave K. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 1109-1149
2. Pain V.M. (1986) *Biochem. J.* 235, 625-637
3. Rhoads R.E. (1988) *Trends Biochem. Sci.* 13, 52-56
4. Sarre T.F. (1989) *BioSystems* 22, 311-325
5. Moldave K. (1990) *Methods Enzymol.* 182, 809-818
6. Calés C., Salinas M. and Fando J.L. (1985) *J. Neurochem.* 45, 1298-1302
7. Mateu M.G., Vicente O. and Sierra J.M. (1987) *Eur. J. Biochem.* 162, 221-229
8. Dholakia J.N., Xu Z., Hille M.B. and Wahba A.J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 19319-19323
9. Bommer U.-A. and Kurzchalia T.V. (1989) *FEBS Lett.* 244, 323-327
10. Han A.A., Heugten V. and Voorma H.O. (1990) *Mol. Biology Reports* 14, 63
11. Panniers R., Rowlands A.G. and Henshaw E.C. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 5519-5525
12. Proud C.G. (1986) *Trends Biochem. Sci.* 11, 73-77
13. Salimans M., Goumans H., Amesz H., Benne R. and Voorma H.O. (1984) *Eur. J. Biochem.* 145, 91-98
14. Bagchi M.K., Chakravarty I., Datta B., Chakrabarti D. and Gupta N.K. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14976-14981
15. Matts R.L., Levin D.H. and London I.M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1217-1221
16. Gross M., Wing M., Rundquist C. and Rubino M.S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 6899-6907
17. Manchester K.L. (1987) *Int. J. Biochem.* 19, 245-251
18. Rowlands A.G., Panniers R. and Henshaw E.C. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 5526-5533
19. Dholakia J.N. and Wahba A.J. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 546-550
20. Merrick W.C., Dever T.E., Kinzy T.G., Conroy S.C., Cavallius J. and Owens C.L. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1050, 235-240
21. Wessling-Resnick M., Kelleher D.J., Weiss E.R. and Johnson G.L. (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 473-477
22. Bourne H.R., Sanders D.A. and McCormick F. (1991) *Nature* 349, 117-127
23. Gilman A.G. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56, 615-49
24. Birnbaumer L. (1990) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 675-705
25. Ochoa S. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 223, 325-349
26. Hershey J.W.B. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 20823-20826
27. Ilan J. (1987) en *Translational regulation of gene expression*. Plenum Press, New York
28. Clemens M. (1987) *Nature* 330, 699-700
29. Ranu R.S. and London I.M. (1979) *Methods Enzymol.* 60, 459-484
30. Jagus R., Crouch D., Konieczny A. and Safer B. (1982) *Curr. Top. Cel. Regul.* 21, 35-63
31. Kudlicki W., Wettenhall R.E., Kemp B.E., Szyszka R., Kramer G. and Hardesty B. (1987) *FEBS Lett.* 215, 16-20
32. Kramer G. (1990) *FEBS Lett.* 267, 181-182
33. Proud C.G., Colthurst D.R., Ferrari S. and Pinna L.A. (1991) *Eur. J. Biochem.* 195, 771-779

34. Trachsel H., Ranu R.S. and London I.M. (1979) *Methods Enzymol.* 60, 485-495
35. Petryshyn R., Levin D.H. and London I.M. (1983) *Methods Enzymol.* 99, 346-362
36. Kuroda Y., Merrick W.C. and Sharma R.K. (1982) *Science* 215, 415-416
37. Rowlands A.G., Montine K.S., Henshaw E.C. and Panniers R. (1988) *Eur. J. Biochem.* 175, 93-99
38. Datta B., Chakrabarti D., Roy A.L. and Gupta N.K. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3324-3328
39. Tuazon P.T., Merrick W.C. and Traugh J.A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10954-10958
40. De Paoli-Roach A.A., Roach P.J., Pham K., Kramer G. and Hardesty B. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 8871-8874
41. Tahara S.M. and Traugh J.A. (1982) *Eur. J. Biochem.* 126, 395-399
42. Schatzmann R.C., Grifo J.A., Merrick W.C. and Kuo J.F. (1983) *FEBS Lett.* 159, 167-170
43. Martín E. (1988) Tesina de Grado de Licenciatura. Fac. Ciencias. Univ. Autónoma, Madrid
44. Crouch D. and Safer B. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 7918-7924
45. Deborah Crouch and Safer B. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 10363-10368
46. Szyszka R., Kudlicki W., Kramer G., Hardesty B., Galabru J. and Hovanessian A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 3827-3831
47. Chen S.-C., Kramer G. and Hardesty B. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 7267-7275
48. Cohen P. (1985) *Eur. J. Biochem.* 151, 439-448.
49. Shenolikar S. and Nairn A.C. (1991) *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 23, 1-122
50. Petryshyn R., Levin D.H. and London I.M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6512-6516
51. Redpath N. and Proud C.G. (1990) *Biochem. J.* 272, 175-180
52. Thoen C., Van Hove L., Piot E. and Slegers H. (1984) *Biochem. Biophys. Acta* 783, 105-113
53. Spirin A.S. and Ajtkhozhin M.A. (1985) *Trends Biochem. Sci.* 10, 162-165
54. Ryazanov A.G., Ovchinnikov L.P. and Spirin A.S. (1987) *BioSystems* 20, 275-287
55. Herman R.C. (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14, 219-222
56. Morley S.J., Dever T.E., Etchison D. and Traugh J.A. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 4669-4672
57. Kozma S.C., Ferrari S. Thomas G. (1989) *Cell. Signalling* 1, 219-225
58. Dholakia J.N. and Wahba A.J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 51-54
59. Tuazon P.T., Merrick W.C. and Traugh J.A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 2773-2777
60. Clemens M. (1983) *Nature* 302, 110
61. Janssen G.M.C., Maessen G.D.F., Amons R. and Moller W. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 11063-11066
62. Ryazanov A.G., Shestakova E.A. and Natapov P.G. (1988) *Nature* 334, 170-173
63. Redpath N.T. and Proud C.G. (1989) *Biochem. J.* 262, 69-75
64. Alcázar A. (1986) Tesina de Grado de Licenciatura. Fac. C. Biológicas, Univ. Complutense, Madrid
- 64a. Nestler E.J. and Greengard P. (1989) en *Basic neurochemistry*. Siegel G. et al. (eds.) Raven Press. pp.375
65. Berridge M.J. (1985) *Investigación y Ciencia* 12, 112-122.
66. Cohen P. (1988) *Proc. R. Soc. Lond.* 234, 115-144
67. Krebs E.G. (1985) *Biochem. Society Transactions* 13, 813-820.

68. Shenolikar S. (1987) *J. Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Res.* 11, 531-541
69. Greengard P. (1987) *Molec. Neurobiol.* 1, 81-119
70. Fun B.K. (1985) en *Molecular mechanisms of transmembrane signalling.* Cohen P. and Houslay M.D. (eds.) Elsevier. Vol.4, pp.183-214
71. Freeman R.S. and Donoghue D.J. (1991) *Biochemistry* 30, 2293-2302
72. Leader D.P. and Katon M. (1988) *J. Gen. Virol.* 69, 1441-1464
73. Goelet P., Castellucci V.F., Schacher S. and Kandel E.R. (1986) *Nature* 322, 419-422
74. Nestler E.J. and Greengard P. (1984) en *Protein Phosphorylation in the Nervous System.* Wiley, New York
75. Browning M.D., Haganir R. and Greengard P. (1985) *J. Neurochem.* 45, 11-23
76. Hemmings H.C., Nairn A.C., McGuinness T.L., Haganir R.L. and Greengard P. (1989) *FASEB J.* 3, 1583-1592
77. Hardie D.G. (1983) en *Methods of enzymatic analysis.* Bergmeyer H.U.(ed.) Verlag Chemie. Vol III, p.474
78. Vener A.V. (1990) *BioSystems* 24, 53-59
79. Perutz M.F. (1988) *Nature* 336, 202-203
80. Sprang S.R., Acharya K.R., Goldsmith E.J., Stuart D.I., Varvill K., Fletterick R.J., Madsen N.B. and Johnson L.N. (1988) *Nature* 336, 215-221
81. Nairn A.C., Hemmings H.C. and Greengard P. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 931-976.
82. Edelman A.M., Blumenthal D.K. and Krebs E.G (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56, 567-613
83. Blackshear P.J., Nairn A.C. and Kuo J.F. (1988) *FASEB J.* 2, 2957-2969
84. Hunter T. and Cooper J.A. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 897-930
85. Krebs E.G., Graves D.J. and Fischer E.H. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 2867-2873
86. Hunter T. (1987) *Cell* 50, 823-829
87. Hanks S.K., Quinn A.M. and Hunter T. (1988) *Science* 241, 42-52
88. Bairoch A. and Claverie J.-M. (1988) *Nature* 331, 22
89. Taylor S.S. (1987) *BioEssays* 7, 24-29
90. Schlichter D., Miller H. and Wicks W.D. (1986) *J. Cyclic Nucleotide and Protein Phospho. Res.* 11, 149-154
91. Soderling T.R. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 1823-1826
92. Aitken A., Ellis C.A., Harris A., Sellers L.A. and Toker A. (1990) *Science* 344, 594
93. Palomo C., Vicente O., Sierra J.M. and Ochoa S. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 239, 497-507
94. Chen J.-J., Yang J.M., Petryshyn R., Kosower N. and London I.M. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 9559-9564
95. De Benedetti A. and Baglioni C. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 338-342
96. Szyszka R., Kramer G. and Hardesty B. (1989) *Biochemistry* 28, 1435-1438
97. Kudlicki W., Fullilove S., Read R., Kramer G. and Hardesty B. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 9695-9701
98. Galabru J. and Hovanessian A. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 15538-15544
99. Hovanessian A. (1989) *J. Interferon Res.* 9, 641-647
100. Petryshyn R., Chen J.-J. and London I.M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1427-1431
101. De Camilli P. (1984) *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 17, 489-499.

102. Taylor S.S., Bubis J., Toner-Webb J., Saraswat L.D., First E.A., Buechler J.A., Knighton D.R. and Sowadski J. (1988) *FASEB J.* 2, 2677-2685
103. Burkhard S.J. and Traugh J.A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 14003-14008
104. Brostrom M.A., Chin K.-V., Cade C., Gmitter D. and Brostrom C.O. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 16515-16523
105. Nishizuka, Y. (1986) *Science* 233, 305-312.
106. Parker P.J., Coussens L., Totty N., Young S., Chen E., Stabel S., Waterfield M.D. and Ulrich A. (1986) *Science* 233, 853-859
107. Coussens L., Parker P., Rhee R., Yang-Feng T., Chen E., Waterfield M.D., Francke U. and Ulrich A. (1986) *Science* 233, 859-866
108. Lee M.-H. and Bell R.M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 14867-14870
109. Ono Y., Kikkawa U., Ogita K., Fuji T., Kurokawa T., Asaoka Y., Sekiguchi K., Ase K., Igarashi K. and Nishizuka Y. (1987) *Science* 236, 1116-1120
110. Huang K.-P., Nakabayashi H. and Huang F.L. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8535-8539
111. Huang F.L., Yoshida Y., Nakabayashi H. and Huang K.-P. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 15714-15720
112. Kikkawa U., Kishimoto A. and Nishizuka Y. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58, 31-44
113. Nishizuka Y. (1988) *Nature* 334, 661-665
114. Kuo J.F., Schatzman R.C., Turner R.S. and Mazzei G.J. (1984) *Mol. Cell. Endocrinol.* 35, 65-73.
115. Le Peuch C.J., Ballester R. and Rosen O.M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6858-6862
116. Bell R.M. (1986) *Cell* 45, 631-632.
117. Hannun Y.A., Loomis C.R., Merrill A.H. and Bell R.M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 12604-12609
118. Hannun Y.A. and Bell R.M. (1987) *Science* 235, 670-674
119. Oishi K., Raynor R.L., Charp P.A. and Kuo J.F. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 6865-6871
120. Feinstein M.B. and Halenda S.P. (1988) *Experientia* 44, 101-104
121. Nishizuka Y. (1989) *Cancer* 63, 1892-1903
122. Manalan A.S. and Klee C.B. (1984) *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 18, 227-278
123. Lukas T.J., Haiech J., Lau W., Craig T.A., Zimmer W.E., Shattuck R.L., Shoemaker M.O. and Watterson D.M. (1988) *Cold Spring Harbor Symposia vol. LIII*, 185-193
124. Nairn A.C. and Palfrey H.C. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 17299-17303
125. Nairn A.C. and Greengard P. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 7273-7281
126. Bartelt D.C., Moroney S. and Wolff D.J. (1987) *Biochem. J.* 247, 747-756
127. Ouimet C.C., McGuinness T.L. and Greengard P. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5604-5608.
128. Cohen P. (1988) *Mol. Aspects. Cell. Regul.* 5, 145-194
129. Schulman H. (1988) *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 22, 39-112
130. McGuinness T.L., Lai Y. and Greengard P. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 1696-1704.
131. Bulleit R.F., Bennet M.K., Molloy S.S., Hurley J.B. and Kennedy M.B. (1988) *Neuron* 1, 63-72
132. Fujisawa H. (1990) *BioEssays* 12, 27-30

133. Colbran R.J., Schworer C.M., Hashimoto Y., Fong Y.-L., Rich D.P., Smith M.K. and Soderling T.R. (1989) *Biochem. J.* 258, 313-325
134. Saitoh T. and Schwartz J.H. (1985) *J. Cell. Biol.* 100, 835-842
135. Miller S.G. and Kennedy M.B. (1986) *Cell* 44, 861-870
136. Lai Y., Nairn A.C. and Greengard P. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4253-4257
137. Lai Y., Nairn A.C., Gorelick F. and Greengard P. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5710-5714
138. Theil G., Czernik A.J., Gorelick F., Nairn A.C. and Greengard P. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6337-6341
139. Hashimoto Y., Schworer C.M., Colbran R.J. and Soderling T.R. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 8051-8055
140. Gressner A.M. (1983) *Horm. Metabol. Res.* 15, 159-160
141. Ryazanov A.G. (1987) *FEBS Lett.* 214, 331-334
142. Palfrey H.C., Nairn A.C., Muldoon L.L. and Villereal M.L. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 9785-9792
143. Tuazon P.T. and Traugh J.A. (1991) *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 23, 123-164
144. Singh T. (1989) *FEBS Lett.* 243, 289-292
145. Hathaway G.M., Tuazon P.T. and Traugh J.A. (1983) *Methods Enzymol.* 99, 308-317.
146. Pendergast A.M. and Traugh J.A. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 11769-11774
147. Donella-Deana A., Grankowski N., Kudlicki W., Szyszka R., Gasior E. and Pinna L.A. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 829, 180-187
148. Akatsuka A., Singh T.J., Nakabayashi H., Lin M.C. and Huang K.P. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 3239-3242
149. Hathaway G.M. and Traugh J.A. (1983) *Methods Enzymol.* 99, 317-331
150. Glover C.V.C. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 14349-14354
151. Qi S.L., Yukioka M., Morisawa S. and Inoue A. (1986) *FEBS Lett.* 203, 104-108
152. Ghosh S., Chevesich J. and Maitra U. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 5134-5140
153. Holmes C.F.B., Kuret J., Chisholm A.A.K. and Cohen P. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 870, 408-416
154. Walton G.M., Spiess J. and Gill G.N. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 4745-4750
155. Hathaway G.M. and Traugh J.A. (1984) *Arch. Biochim. Biophys.* 233, 133-138
156. Ralph R.K., Darkin-Rattray S. and Schofield P. (1990) *BioEssays* 12, 121-124
157. Weiel J.E., Ahn N.G., Seger R. and Krebs E.G. (1990) *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 24, 182-195
158. Traugh J.A. and Pendergast A.M. (1986) *Nucleic Acid Res.* 33, 195-230
159. Gregory J.S., Boulton T.G., Sang B.-C. and Cobb M.H. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 18397-18401
160. Erikson R.L. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 6007-6010
161. Cohen P.T.W., Brewis N.D., Hughes V. and Mann D.J. (1990) *FEBS Lett.* 268, 355-359
162. Cohen P. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58, 453-508
163. Cohen P., Holmes C.F.B. and Tsukitani Y. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 98-102
164. Pal. J.K., Chen J.-J. and London I.M. (1991) *Biochemistry* 30, 2555-2562
165. Hurst R., Schatz J.R. and Matts R.L. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 15939-15945

166. Clemens M.J. (1987) en *Transcription and translation*. Hames B.D. and Higgins S.J. (eds.) IRL Press, Oxford. pp.231-270
167. Sarre T.F., Hermann M. and Bader M. (1989) *Eur. J. Biochem.* 183, 137-143
168. Calés C., Fando J.L., Alcázar A. and Salinas M. (1988) *Neuroscience Lett.* 87, 271-276
169. Calés C., Salinas M. and Fando J.L. (1985) *FEBS Lett.* 190, 307-310
170. Hucul J.A., Henshaw E.C. and Young D.A. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 15585-15591
171. Colin A.M., Brown B.D., Dholakia J.N., Woodley C.L., Wahba A.J. and Hille M.B. (1987) *Developmental Biology* 123, 354-363
172. Gross M., Rubino M.S. and Starn T.K. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 12486-12492
173. Kan B., London I.M. and Levin D.H. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 15652-15656
174. Gonsky R., Lebediker M.A., Harary R., Banai Y. and Kaempfert R. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 9083-9089
- 174a. Roberts S., Lajtha A. and Gispen W.H. (1977) en *Mechanism, regulation and special functions of protein synthesis in the brain*. Elsevier. Vol.2
- 174b. Reinis S. and Goldman J.M. (1980) en *The development of the brain*. Thomas, Springfield
175. Calés C., Fando J.L., Azuara C. and Salinas M., (1986) *Mech. Ageing Dev.* 33, 147-156
176. Calés C., Fando J.L., Fernández T., Alcázar A. and Salinas M. (1985) *Neurosc. Lett.* 61, 333-337
177. Alcázar A., Fando J.L., Azuara C., Galea E. and Salinas M. (1986) *Int. J. Dev. Neuroscience* 4, 525-535
178. Voorma H.O., Thomas A., Goumans H., Amesz H. and Van der Mast C. (1979) *Methods Enzymol.* 60, 124-135
179. Wagner T. and Sprinzl M. (1979) *Methods Enzymol.* 60, 615-628
180. Calés C. (1985) Tesis Doctoral. Fac. Farmacia, Univ. Complutense, Madrid
181. Gupta N.K. (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 15-18
182. Clemens M., Pain J. and Proud C. (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 55
183. Roskoski R.Jr. (1983) *Methods Enzymol.* 99, 3-6
184. Walsh M.P., Valentine K.A., Ngal P.K., Carruthers C.A. and Hollenberg M.D. (1984) *Biochem. J.* 224, 117-127
185. Laemmli U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685
186. Hames B.D. (1986) en *Gel electrophoresis of proteins*. IRL Press, Oxford, pp 1-92
187. Marshall T. (1984) *Anal. Biochem.* 136, 340-346
188. Nen (1988) en *Aqueous solubilizer general instructions*. Research Tips, Nen Research Products, Du Pont
189. Lkb (1985) en *Radioisotopes for analysis with liquid scintillation counting*. Pharmacia-LKB, Wallac.
190. Reiman E.M. and Beham R.A. (1983) *Methods Enzymol.* 99, 51-55
191. Beemon K. and Hunter T. (1978) *J. Virol.* 28, 551-556
192. Juhl H. and Soderling T.R. (1983) *Methods Enzymol.* 99, 37-48
193. Hunter T. and Sefton B.M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1311-1315
194. Lerma J., Herranz A.S., Herreras O., Abraira V. and Martin del Río R. (1986) *Brain Res.* 384, 145-155
195. Hawkes R. (1986) *Methods Enzymol.* 121, 484-49100
196. Martín E., Montero T., Alcázar A., García A, Fando J.L. and Salinas M.(1991) *Neurochem.Research* 16,749-755

197. Fando J.L. and Wasterlain C.G. (1980) *Neurochem. Research* 5, 197-207
198. Cosgrove J.W. and Rapoport S.I. (1986) *Neurochem. Research* 11, 1289-1301
199. Kimball S.R., Everson W.V., Flaim K.E. and Jefferson L.S. (1989) *Am. J. Physiol.* 256, C28-C34
200. Salinas M., Alcázar A., Martín E., Azuara C. and Fando J.L. en *Endocrine and biochemical development of the fetus and neonate*. Plenum P., New York. pp.207-211
201. Shapiro A.C., Viñuela E. and Maizel J.V. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815-820
202. Pharmacia (1985) en *Gel filtration theory and practice*. Pharmacia Biotechnology, Uppsala.
203. Bradford M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254
204. Kikkawa U., Minacuchi R., Takai Y. and Nishizuka Y. (1983) *Methods Enzymol.* 99, 288-298
205. Michal G. (1983) en *Methods in enzymatic analysis*. Bergmeyer H.U. (ed.) Verlag Chemie. Vol.I, pp.86-104
206. De Haro C. (1990) comunicación personal
207. Clarke R.D. and Ranu R.S. (1987) *Mol. Cel. Biochem.* 74, 129-135
208. Kimball S.R., Everson W.V. Myers L.M. and Jefferson L.S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 2220-2227
209. Suzuki H. and Mukoyama E.B. (1988) *Agric. Biol. Chem.* 52, 1397-1408
210. Mehta H.B., Dholakia J.N., Roth W.W., Parekh B.S., Montelaro R.C., Woodley C.L. and Wahba A.J. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 6705-6711
211. Kumon A. and Ozawa M. (1979) *FEBS Lett.* 108, 200-204
212. Murakami N.Y., Matsumura S. and Kumon A. (1983) 95, 651-660
213. Roth B.L., Mehegan J.P., Jacobowitz D.M., Robey F. and Iadarola M.J. (1989) *J. Neurochem.* 52, 215-221
214. Huang K.-P. (1989) *Trends Neurochem. Sci.* 12, 425-431
215. Nishizuka Y., Endo T. and Tanaka C. (1990) *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* vol. 24
216. Kinzel V., Hotz A., Fonig N., Gelmann M.G., Pyerin W., Reed J., Kubler D., Hofmann F., Obst C., Gensheimer H.P., Goldblatt D. and Shaltiel S. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 253, 341-349
217. Kennedy M.B. (1987) *Nature* 329, 15-16
218. Riabowol K.T., Fink J.S., Gilman M.Z., Walsh D.A., Goodman R.H. and Feramisco J.R. (1988) *Nature* 336, 83-86
219. Inoue A., Tei Y., Qi S.-L., Higashi Y., Yukioka M. and Morisawa S. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 398-403
220. Dahmus G.K., Glover C.V.C., Brutlag D.L. and Dahmus M.E. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 9001-9006
221. Thoen C. and Slegers H. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 825, 268-279
222. Goueli S.A., Ferkul K.M. and Ahmed K. (1986) *Int. J. Biochem.* 18, 875-884
223. Meggio F., Grankowski N., Kudlicki W., Szyszka R., Gasior E. and Pinna L.A. (1986) *Eur. J. Biochem.* 159, 31-38
224. Mulner-Lorillon O., Marot J., Cayla X., Pouhle R. and Belle R. (1988) *Eur. J. Biochem.* 171, 107-117
225. Zandomeni R., Zandomeni M.C. and Weinmann R. (1988) *FEBS Lett.* 235, 247-251
226. Gonzatti M.I. and Traugh J.A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 15266-15272
227. Gonzatti M.I. and Traugh J.A. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 134-139
228. Clark S.J., Colthurst D.R. and Proud C.G. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 968, 211-219

229. Clark S.J., Ashford A.J., Price N.T. and Proud C.G. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 1010, 377-380
230. Price N.T., Nakielny S.F., Clark S.J. and Proud C.G. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 1008, 177-182
231. Colthurst D.R., Campbell D.G. and Proud C.G. (1987) *Eur. J. Biochem.* 166, 357-363
232. Merrick W.C., Abramson R.D., Anthony D.D., Dever T.E. and Caliendo A.M. (1987) en *Translational regulation of gene expression*. Ilan J. (ed.) Plenum P., New York. pp.265-286
233. Mitsui K.-I., Datta A. and Ochoa S. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4128-4132
234. Roberts R.C. and Ranu R.S. (1986) *FEBS Lett.* 209, 162-164
235. Dholakia J.N. and Wahba A.J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 10164-10170
236. Pathak V.K., Nielsen P.J., Trachsel H. and Hershey J.W.B. (1988) *Cell* 54, 633-639
237. Donahue T.F., Cigan A.M., Pabich E.K. and Valavicius B.C. (1988) *Cell* 54, 621-632
238. Duncan R. and Hershey J.W.B. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 5493-5497
239. Proud C.G. and Pain V.M. (1982) *FEBS Lett.* 143, 55-59
240. Suzuki H., Kishio N., Morozumi K., Ichimori K. and Mukoyama E.B. (1985) *J. Biochem.* 97, 1061-1066
241. Ahmad M.F., Nasrin N., Bagchi M.K., Chakravarty I. and Gupta N.K. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 6960-6965
242. Salimans M., Posno M., Benne R. and Voorma H.O. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 825, 384-392
243. Towle C.A., Mankin H.J., Avruch J. and Treadwell B.V. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 134-140
244. De Stefano J., Olmsted E., Panniers R. and Lucas-Lenard J. (1990) *J. Virol.* 64, 4445-4453
245. Clemens M.J., Galpine A., Austin S.A., Panniers R., Henshaw E.C., Duncan R., Hershey J.W.B. and Pollard J.W. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 767-771
246. Duncan R.F. and Hershey J.W.B. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 256, 651-661
247. Duncan R.F. and Hershey J.W.B. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 1467-1481
248. Scorsoni K.A., Panniers R., Rowlands A.G. and Henshaw E.C. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 14538-14543
249. Montine K.S. and Henshaw E.C. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 1014, 282-288
250. Everson W.V., Flaim K.E., Susco D.M., Kimball S.R. and Jefferson L.S. (1989) *Am. J. Physiol.* 256, C18-C27
251. Kuroda Y. and Sharma R.K. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 601-610
252. Kuroda Y., Merrick W.C. and Sharma R.K. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 213, 271-275
253. Mateu M.G., Maroto F.G., Vicente O. and Sierra J.M. (1989) *Biochem. Biophys. Acta* 1007, 55-60
254. Schulman H. and Lou L.L. (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14, 62-66
255. Kigoshi T., Uchida K. and Morimoto S. (1989) *J. Steroid Biochem.* 32, 381-385
256. Nilsson A., Carlberg U. and Nygard O. (1991) *Eur. J. Biochem.* 195, 377-383
257. Yamauchi T. and Fujisawa H. (1986) *Biochem. Biophys. Acta* 886, 57-63
258. Sato H., Yamauchi T. and Fujisawa H. (1990) *J. Biochem.* 107, 802-809
259. Kuo J.F., Andersson R.G.G., Wise B.C., Mackerlova L., Salomonsson I., Brackett N.L., Katoh N., Shoji M. and Wrenn R.W. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7039-7043
260. Sobieszek A. (1989) *Biochem. J.* 262, 215-223
261. Clausen J. (1974) en *Immunochemical techniques for the identification...*, North-Holland. Vol.1, pp.405-407

262. Tijssen P. (1985) en Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier, Amsterdam. vol.15, pp.123-125
263. De Haro C., Herreros A.G. and Ochoa S. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6843-6847
264. Herreros A. G., De Haro C. and Ochoa S. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3119-3123
265. De Haro C., Herreros A.G. and Ochoa S. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6711-6715
266. Peláez F. and De Haro C. (1989) FEBS Lett. 250, 523-528
267. Francis T.A. and Roberts S. (1982) Biochem. J. 208, 289-300
268. Schrama L.H., Weeda G., Edwards P.M., Oestreicher B., and Schotman P. (1984) Biochem. J. 224, 747-753
269. Schrama L.H., Frankena H., Edwards P.M. and Schotman P. (1984) Neurochem. Res. 9, 1267-1281
270. Famulski K.S. and Carafoli E. (1984) Eur. J. Biochem. 141, 15-20
271. Heidenreich K.A. and Toledo S.P. (1989) Endocrinology 125, 1458-1463
272. Fawell E.H., Boyer I.J., Brostrom M.A. and Brostrom C.O. (1989) J. Biol. Chem. 264, 1650-1655
273. Jagus R. and Safer B. (1987) J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res. 11, 557-570
274. Maurides P.A., Akkaraju G.R. and Jagus R. (1989) Anal. Biochem. 183, 144-151
275. Haas D.W. and Hagedorn C.H. (1991) Arch. Biochem. Biophys. 284, 84-89
276. Rychlik W., Rush J.S., Rhoads R.E. and Waechter C.J. (1990) J. Biol. Chem. 265, 19467-19471
277. Lazaris-Karatzas A., Montine K.S. and Sonenberg N. (1990) Nature 345, 544-547
278. Grace M., Ralston R.O., Banerjee A.C. and Gupta N.K. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6517-6521
279. Ranu R.S. and Roberts R.C. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 110, 951-958
280. Jackson R.J. and Hunt T. (1985) Biochem. Biophys. Acta 826, 224-228
281. De Haro C., Manne V., De Herreros A.G. and Ochoa S. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3134-3137
282. Konno S., Borelli T.J. and Wu J.M. (1986) J. Biol. Chem. 261, 5010-5017
283. Gaitero F., Limas G.G., Méndez E. and De Haro C. (1988) FEBS Lett. 236, 479-483
284. Ransone L.J. and Dasgupta A. (1988) J. Virol. 62, 3551-3557
285. Kelly F.J. (1988) Biochem. J. 249, 609-612
286. Pathak V.K., Schindler D. and Hershey J.W.B. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 993-995
287. Price N.T. and Proud C.G. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1054, 83-88
288. Price N.T., Welsh G.I. and Proud G.G. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 993-999
289. Wettenhall R.E., Kudlicki W., Kramer G. and Hardesty B. (1986) J. Biol. Chem. 161, 12444-12447
290. Ernst H., Duncan R.F. and Hershey J.W.B. (1987) J. Biol. Chem. 262, 1206-1212
291. Schafer M.P., Fairwell T., Parker D.S., Knight M., Anderson W.F. and Safer B. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 255, 337-346
292. Petryshyn R., Rosa F., Fagard R., Levin D. and London I. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 891-899
293. Chin K.-V., Cade C., Brostrom C.O., Galuska E.M. and Brostrom M.A. (1987) J. Biol. Chem. 262, 16509-16514
294. Kumar R.V., Wolfman A., Panniers R. and Henshaw E. (1989) J. Cell Biol. 108, 2107-2115
295. Brostrom C.O. and Brostrom M.A. (1990) Annu. Rev. Physiol. 52, 577-590