

CARACTERIZACION DE LA INHIBICION DE LA ADENILILCICLASA  
DE OOCITOS DE Xenopus laevis POR LA PROGESTERONA.  
PAPEL DE LAS PROTEINAS REGULADORAS Ns Y Ni EN ESTA INHIBICION.

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Juan Arturo Olate Aravena



Junio, 1985

Profesor patrocinante: Dr. Jorge E. Allende

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N

T E S I S D E D O C T O R A D O

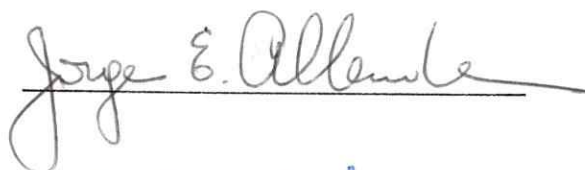
Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que  
la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Juan Arturo Olate Aravena

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de  
Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en  
el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de Mayo de 1985.

Patrocinante de Tesis:

Dr. Jorge E. Allende



Comisión Informante de Tesis:

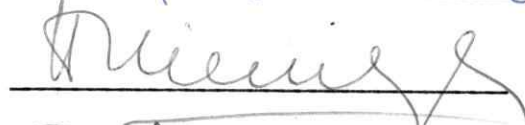
Dr. Miguel Bronfman



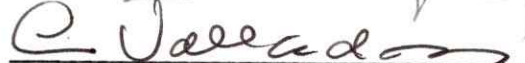
Dra. Elisa Marusic



Dr. Hermann Niemeyer



Dr. Luis Valladares





Esta tesis fue realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, División Ciencias Médicas Norte, de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Jorge E. Allende.



A mi esposa María Victoria  
A mis hijos Catalina y Juan  
A mis padres



## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:

Al Dr. Jorge Allende por su valiosa enseñanza y formación científica entregada.

A Catherine Connelly por sus valiosas críticas e ideas entregadas.

A todos mis compañeros de trabajo del laboratorio, en especial a Pilar Carvallo, por su amistad y constante apoyo entregado.

A José Mondaca por su dedicación en la confección de las figuras.

A Patricia Donoso por su excelente trabajo en la transcripción de esta tesis.



## INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
SUMMARY .....	xx
INTRODUCCION.....	1
A. PROGESTERONA Y LA MADURACION DE LOS OOCITOS DE ANFIBIO.....	1
B. NUCLEOTIDOS CICLICOS Y LA INICIACION DE LA MADURACION.....	2
1. Fluctuaciones en los niveles de cAMP.....	2
2. Participación del cAMP en la maduración meiótica.....	3
3. Mecanismos responsables de la disminución de los niveles de cAMP.....	6
C. CARACTERISTICAS DE LA ADENILILCICLASA PRESENTE EN MEMBRANAS DE CELULAS EUCARIONTES.....	8
1. Estructura de los componentes de la adenililciclase.....	10
2. Activación de Ns por nucleótidos de guanosina y Mg <sup>2+</sup> en ausencia de hormona.....	14
3. Activación de Ni por nucleótidos de guanosina y Mg <sup>2+</sup> en ausencia de hormona.....	20
4. Regulación de la actividad de la subunidad catalítica C por las proteínas Ns y Ni.....	21
5. Regulación de la actividad de la adenililciclase por hormonas.....	21
5.1. Parámetros afectados.....	24
5.2. Regulación de la estimulación de la adenililciclase por hormonas.....	26
5.3. Regulación de la inhibición de la adenililciclase por hormonas.....	30



6. Regulación de la unión de la hormona al receptor por nucleótidos de guanosina y $Mg^{2+}$ .....	31
7. Efectos de otros reguladores de la actividad de la adenililciclasa .....	32
7.1. Ión fluoruro.....	33
7.2. Forskolina.....	33
PROPOSITOS DE LA TESIS.....	34
MATERIALES Y METODOS.....	35
A. REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	35
B. PREPARACION Y PURIFICACION DE NUCLEOTIDOS.....	36
1. Síntesis de [ $\mu$ - $^{32}P$ ] ATP.....	36
2. Purificación de [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] ATP.....	40
3. Análisis y pureza radioactiva.....	41
4. Purificación de ATP no radioactivo .....	41
5. Purificación del sistema regulador de nucleótidos trifosfatos.....	42
6. Síntesis y purificación de [ $\mu$ - $^{32}P$ ] GTP.....	43
7. Síntesis y purificación de [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] GTP.....	43
8. Síntesis y purificación de GDPOx y GTPox.....	43
9. Síntesis y purificación de [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] GTPox.....	44
10. Síntesis y purificación de [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] NAD+.....	44
C. PREPARACION DE MEMBRANAS PLASMATICAS DE OOCITOS DE <u>Xenopus laevis</u> Y DE CELULAS FOLICULARES CON ACTIVIDAD ADENILILCICLASA.....	45
1. Obtención de ovario de <u>Xenopus laevis</u> .....	45
2. Obtención de oocitos y células foliculares.....	46
3. Fraccionamiento celular.....	46
D. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ADENILILCICLASA.....	48
E. PREPARACION DE FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS DE OOCITOS DE <u>Xenopus laevis</u> ACTIVADA POR CaM-Ca $^{2+}$ .....	50
F. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS DE MEMBRANAS DE OOCITOS.....	51
G. TRATAMIENTO DE LAS MEMBRANAS DE OOCITOS CON TOXINA <u>Bordetella pertussis</u> .....	52
1. Activación de la toxina del cólera.....	52
2. ADP-ribosilación de las membranas por toxina del cólera.....	52
3. Activación de la toxina de Bordetella pertussis.....	53
4. ADP-ribosilación de las membranas por toxina <u>B. pertussis</u> .....	53

H. TRATAMIENTO DE LAS MEMBRANAS DE OOCITOS CON GTPox y [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] GTPox.....	53
I. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS.....	54
J. CALCULO DE PARAMETROS CINETICOS EN LA ACTIVACION DE LA ADENILILCICLASA.....	55
K. DETERMINACION DE PROTEINAS.....	56
RESULTADOS.....	58
A. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS DE LA ADENILILCICLASA DE OOCITOS DE <u>Xenopus laevis</u> .....	58
1. Efecto de forskolina en la adenililciclase de oocitos y en la inhibición por progesterona.....	58
2. Efecto de la progesterona en la activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P y Mg <sup>2+</sup> .....	63
2.1. Cinética de activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P y Mg <sup>2+</sup> .....	63
2.2. Efecto de la concentración de Mg <sup>2+</sup> en la actividad de la adenililciclase y en la inhibición por la progesterona.....	64
3. Efecto del derivado de fenotiazina CAPP, en la actividad de la adenililciclase de oocitos.....	70
3.1. Efecto de CAPP, CaM en la actividad de la adenililciclase.....	72
3.2. Efecto de distintas concentraciones de CAPP, en la actividad de la adenililciclase y de la fosfodiesterasa de nucleotidos cíclicos.....	73
3.3. Efecto de CAPP en la actividad de la adenililciclase presente en membranas de oocitos y en células foliculares.....	77
3.4. Efecto de la progesterona en la inhibición de la adenililciclase por CAPP.....	77
3.5. Efecto de CAPP en la activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P.....	79
B. ESTUDIOS DE LAS PROTEINAS REGULADORAS DE LA ACTIVIDAD ADENILILCICLASA EN MEMBRANAS DE OOCITOS.....	79
1. Posible participación de Ni en la inhibición de la adenililciclase por la progesterona.....	82
1.1. ADP-ribosilación de las membranas de oocitos por la toxina de <u>Bordetella pertussis</u> .....	82
1.2. Efectos de la toxina de B. pertussis en la activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P y en la inhibición por la progesterona.....	83
1.3. Efecto de diferentes concentraciones de GMP.P(NH)P en la actividad de la adenililciclase estimulada por forskolina.....	89



1.4. Efecto de la adición de las proteínas Ni y Ns en la actividad de la adenililciclase de oocitos y en la inhibición por la progesterona.....	90
2. Estudios sobre la participación de Ns en la inhibición de la adenililciclase por la progesterona.....	94
2.1. ADP-ribosilación de las membranas de oocitos por la toxina del cólera.....	94
2.2. Efecto de la progesterona en la cinética de activación e histeresis de Ns por GMP.P(NH)P .....	97
2.3. Efecto de la progesterona en la activación de la proteína Ns por GMP.P(NH)P.....	97
2.4. Inactivación de la proteína Ns por un reactivo de afinidad, el 2'-3'-dialdehído GTP.....	101
2.4.1. Efecto de GDPOx y GTPox en la activación de la adenililciclase de oocitos.....	104
2.4.2. Efecto de AMP.P(NH)P en la inactivación de la adenililciclase por GTPox.....	105
2.4.3. Efecto de distintas concentraciones de GTPox y de tiempo de incubación en la inactivación de la adenililciclase.....	106
2.4.4. Efecto de GTPox en la activación de la adenililciclase por diferentes efectores.....	109
2.4.5. Efecto de GTPox en la inhibición de la adenililciclase por la progesterona.....	112
2.4.6. Efecto de la adición de la proteína Ns en la actividad de la adenililciclase en membranas tratadas con GTPox y en la inhibición por la progesterona.....	114
2.4.7. Marcación de las proteínas de membranas de oocitos con GTPox radioactivo.....	115
DISCUSION.....	120
A. PARTICIPACION DEL Ca <sup>2+</sup> Y DE LA CALMODULINA EN LA REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENILILCICLASE Y EN LA INHIBICION POR LA PROGESTERONA.....	120
B. POSIBLE PARTICIPACION DE LA PROTEINA REGULADORA Ni EN LA INHIBICION DE LA ADENILILCICLASE POR LA PROGESTERONA.....	124
C. PARTICIPACION DE LA PROTEINA REGULADORA Ns EN LA INHIBICION DE LA ADENILILCICLASE POR LA PROGESTERONA.....	130
CONCLUSIONES.....	142
BIBLIOGRAFIA.....	143

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Efecto de forskolina en la adenililciclase de oocitos.....	60
TABLA 2. Efecto de diferentes concentraciones de GMP.P(NH)P en las propiedades histeréticas de la adenililciclase.....	66
TABLA 3. Efecto de diferentes concentraciones de MgCl <sub>2</sub> en las propiedades histeréticas de la adenililciclase .....	69
TABLA 4. Efecto de Ca <sup>2+</sup> , calmodulina y CAPP en la adenililciclase de oocitos.....	74
TABLA 5. Efecto de CAPP en la activación de la adenililciclase de oocitos y de células foliculares.....	78
TABLA 6. Efecto de la ADP-ribosilación de las membranas de oocitos por la toxina de <u>B. pertussis</u> en la activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P y en la inhibición por la progesterona.....	86
TABLA 7. Efecto de las proteínas reguladoras Ni y Ns en la actividad de la adenililciclase y en la inhibición por la progesterona.....	93
TABLA 8. Efecto de la progesterona en las propiedades histeréticas de la adenililciclase.....	99
TABLA 9. Efecto de la progesterona en la activación de la proteína Ns por GMP.P(NH)P.....	102
TABLA 10. Efecto de la progesterona en membranas cyc <sup>-</sup> S40 complementadas con distintas concentraciones de Ns.....	103
TABLA 11. Efecto de GDPOx y GTPox en la activación de la adenililciclase de oocitos por GMP.P(NH)P y Forskolina.....	107

TABLA 12.	Efecto de GTPox en la activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P, forskolina, fluoruro y Mn <sup>2+</sup> .....	113
TABLA 13.	Efecto de GTPox en la inhibición por la progesterona.....	117

## LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

		Pág.
Esquema I.	Modelo simplificado de la disposición de los componentes de la adenililciclase en la membrana plasmática de la célula.....	11
Esquema II.	Estructura de los componentes de la adenililciclase de mamíferos.....	15
Esquema III.	Mecanismo de activación y desactivación de Ns por nucleótidos de guanósina y Mg <sup>2+</sup> .....	19
Esquema IV.	Mecanismo de activación y desactivación de Ni por nucleótidos de guanósina y Mg <sup>2+</sup> .....	22
Esquema V.	Modelo de la regulación de la actividad de la adenililciclase por las proteínas Ns y Ni.....	25
Esquema VI.	Síntesis enzimática de [ $\mu$ - <sup>32</sup> P] ATP.....	38
Esquema VII.	Posibles mecanismos de acción de la progesterona en el ciclo regulador de la activación y desactivación de la proteína Ns por nucleótidos de guanósina.....	141
Figura 1.	Curva de progreso de una enzima que presenta un período de latencia (fenómeno de histeresis) en el tiempo .....	57
Figura 2.	Efecto de forskolina en la actividad de la adenililciclase de oocitos.....	59
Figura 3.	Efecto de progesterona en la activación de la adenililciclase por forskolina y GMP.P(NH)P.....	61

Figura 4.	Cinética de la reacción de formación de cAMP en presencia de diferentes concentraciones de GMP.P(NH)P.....	65
Figura 5.	Cinética de la reacción de formación de cAMP en presencia de diferentes concentraciones de MgCl <sub>2</sub> .....	67
Figura 6.	Cinética de la reacción de formación de cAMP en presencia de MgCl <sub>2</sub> 0,1 mM.....	68
Figura 7.	Efecto de Mg <sup>2+</sup> en la activación de la adenililciclase en presencia y en ausencia de progesterona.....	71
Figura 8.	Efecto de CAPP en la activación de la adenililciclase y fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de oocitos.....	75
Figura 9.	Efecto de CAAP en la inhibición de la adenililciclase por progesterona.....	80
Figura 10.	Efecto de CAPP en la activación de la enzima por GMP.P(NH)P.....	81
Figura 11.	Análisis por autoradiografía de la incorporación de [ <sup>32</sup> P] ADP-ribosa en proteínas de membrana de oocito y en la proteína Ni catalizada por la toxina de <u>B. pertussis</u> .....	84
Figura 12.	Análisis por autoradiografía de la incorporación de [ <sup>32</sup> P] ADP-ribosa en proteínas de membrana de oocito y del efecto del pretratamiento de las membranas con la toxina de <u>B. pertussis</u> en esta incorporación .....	88
Figura 13.	Efecto de GMP.P(NH)P en la adenililciclase activada por forskolina.....	91
Figura 14.	Análisis por autoradiografía de la incorporación de [ <sup>32</sup> P] ADP-ribosa en proteínas de membrana de oocito y eritrocito humano catalizada por toxina del cólera.....	96
Figura 15.	Efecto de la progesterona en la cinética de activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P.....	98

Figura 16.	Efecto protector de AMP.P(NH)P en la inactivación de la adenililciclase por GTPox.....	108
Figura 17.	Efecto de GTPox en la actividad de la adenililciclase de oocitos.....	110
Figura 18.	Inactivación en el tiempo de la adenililciclase por GTPox.....	111
Figura 19.	Efecto de la adición de Ns exógeno en la actividad de la adenililciclase presente en membranas controles y tratadas con GTPox y en la inhibición por la progesterona.....	116
Figura 20.	Análisis por autoradiografía de la unión de [ $\alpha^{32}P$ ] GTPox a proteínas de membrana de oocito.....	118

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	: adenosina 5'-difosfato
AMP o 5'AMP	: adenosina 5'-monofosfato
AMP.P(NH)P	: adenosina 5'-[ $\beta$ - $\gamma$ -imido] trifosfato
3'AMP	: adenosina 3'-monofosfato
cAMP	: adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico .
ATP	: adenosina 5'-trifosfato
ATPasa	: ATP hidrolasa
CaM	: calmodulina
CAPP	: 2-cloro-10-(aminopropil) fenotiazina
cpm	: cuentas por minuto
d	: unidad de peso molecular (Dalton).
DEAE	: dietilaminoetil
DTT	: ditionitrosito
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	: ácido etilenglicol-bis-( $\beta$ -amino etileter)N'N'-tetraacético.
GMP	: guanosina 5'-monofosfato
GDP	: guanosina 5'-difosfato
GTP	: guanosina 5'-trifosfato
GTPox	: guanosina 2'-3'-dialdehído
3'GMP	: guanosina 3'-monofosfato

GTPasa	: GTP hidrolasa
GDP $\beta$ S	: guanosina 5'-[ $\beta$ -tio] difosfato
GMP.P(NH)P	: guanosina 5'-[ $\beta$ - $\gamma$ -imido] trifosfato
GTP $\mu$ S	: guanosina 5'-[ $\mu$ -tio] trifosfato
Hepes	: ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2 etanolsulfónico.
mA	: miliamper
NAD <sup>+</sup>	: nicotinamida adenina dinucleótido
NEM	: N-etilmaleimida
NMN	: nicotinamida mononucleótido
Ns	: proteína reguladora que participa en la activación de la adenililciclase.
Ni	: proteína reguladora que participa en la inhibición de la adenililciclase.
PEP	: fosfoenol piruvato
Pi	: fosfato inorgánico
PPi	: pirofosfato
TCA	: ácido tricloroacético
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminometano
V	: volt



## RESUMEN

El trabajo presentado en esta tesis está dirigido fundamentalmente a investigar el mecanismo por medio del cual la hormona esteroidea progesterona inhibe la actividad adenililciclase presente en las membranas de oocitos de Xenopus laevis. Esta inhibición tiene un gran interés fisiológico, pues trabajos previos han mostrado su relación con el proceso de inducción de la maduración meiótica causada por la progesterona.

La primera parte de esta tesis complementa estudios previos sobre el requerimiento de nucleótidos de guanosina en la inhibición hormonal.

Se estudió el efecto de  $Mg^{2+}$  en la activación de la enzima por GMP.P(NH)P, estableciéndose que este catión afecta la histeresis de la reacción enzimática. Sin embargo, se vio que la progesterona no afecta los requerimientos de  $Mg^{2+}$  para la activación de la enzima y que la inhibición causada por la progesterona, a su vez, no es modificada por la concentración de  $Mg^{2+}$  utilizada.

Se analizó también la posible regulación de la adenililciclase por calmodulina y calcio, como ha sido descrito en varios otros sistemas adenililciclase. Los resultados obtenidos demuestran que la actividad de la adenililciclase no depende de la presencia de  $Ca^{2+}$  libre y que la adición de calmodulina exógena no afecta significativamente la

actividad enzimática. En el curso de estos experimentos se observó una inhibición de la adenililciclasa por 2-cloro-10-(3-aminopropil) fenotiazina (CAPP), droga que une calmodulina en presencia de calcio y la inactiva. Un estudio detallado de esta inhibición demostró que ella es independiente de calcio y que afecta de diferente manera a la adenililciclasa, dependiendo del tipo de activador usado en el ensayo.

Estos resultados han sido interpretados como un efecto del derivado de fenotiazina sobre las propiedades de la membrana, como se ha descrito para otros sistemas adenililciclasa. Así, la proteína reguladora  $N_s$ , la cual participa en la activación de la enzima por  $GMP.P(NH)P$ , por  $F^-$  y toxina del cólera, sería más sensible a estos cambios que la subunidad catalítica  $C$ , la cual es activada por  $Mn^{2+}$  y forskolina. Por lo tanto, en el efecto causado por CAPP, parece descartada la participación de calmodulina y  $Ca^{2+}$  como ha sido propuesto por otros autores.

La segunda parte de esta tesis, que representa gran parte del trabajo realizado, se centró en el estudio de la posible participación de las proteínas reguladoras  $N_s$  y  $N_i$  en la inhibición de la adenililciclasa por la progesterona. Las pruebas obtenidas indican que a diferencia de todas las otras hormonas inhibidoras, (Angiotensina II, opiáceos, acetilcolina, somatostatina, etc.) la inhibición de la enzima por progesterona no se hace por intermedio de la proteína  $N_i$ . Los estudios más relevantes en este sentido son los obtenidos con la ADP-ribosilación de las membranas de oocitos por la toxina de Bordetella pertussis. Estos estudios demuestran que las membranas de

oocitos tienen una proteína de peso molecular de 41.000 d que comigra con la subunidad  $\alpha_i$  purificada de eritrocito humano y que se ADP-ribosila por la acción de la toxina de B. pertussis. Sin embargo, la ADP-ribosilación de esta proteína homóloga a Ni no afecta la inhibición causada por la progesterona. También, a diferencia de otras adenililciclasas que contienen Ni, no se observó inhibición de la enzima activada por forskolina, con bajas concentraciones de GMP.P(NH)P.

Por el contrario, el trabajo realizado en esta tesis aportó varias pruebas que indican una relación entre la inhibición causada por la progesterona y la activación de la adenililciclase por la proteína reguladora Ns y nucleótidos de guanosina. Con respecto a esto último, se pudo detectar una proteína con un peso molecular de 43.000 d en membranas de oocitos, que es ADP-ribosilada por la toxina del cólera. El peso molecular de esta proteína corresponde al descrito para la subunidad  $\alpha_s$  presente en otros sistemas adenililciclase.

La progesterona aumentó significativamente la histéresis de la reacción (latencia), aumentando por lo menos 2 a 3 veces el tiempo medio de activación de la enzima por el nucleótido de guanosina. La progesterona a su vez también disminuyó la velocidad en regimen estacionario de la enzima, pero en este caso el efecto hormonal fue revertido por altas concentraciones de GMP.P(NH)P.

El tratamiento de las membranas con 3',5'-dialdehído GTP(GTPox) afectó preferencialmente la participación de la proteína Ns la activación de la adenililciclase por varios efectores ( $F^-$  y GMP.(NH)P), indicando una posible inactivación de esta proteína por el derivado de GTP. La actividad remanente de la enzima medida en presencia de

GMP.P(NH)P es insensible a la inhibición por progesterona, sugiriendo una relación entre la proteína Ns y la acción hormonal. La adición de la proteína Ns purificada de eritrocitos humanos a membranas tratadas con GTPox restablece el 60% de la actividad original, pero no restituye la inhibición por progesterona. Esta incapacidad del Ns exógeno de transducir la acción hormonal también se observó en experimentos en los cuales se adicionó Ns a membranas no tratadas con GTPox, encontrándose que la actividad adicional no era susceptible a la progesterona. Concentraciones saturantes de Ns adicionado eliminan totalmente la inhibición causada por la progesterona.

Estos resultados apoyan la hipótesis que la progesterona inhibe la adenililciclase de oocito interfiriendo con la activación de esta enzima por la proteína reguladora Ns.

## SUMMARY

The work presented in this thesis is directed to investigate mainly the mechanism by which progesterone inhibits the membrane bound adenylylcyclase of Xenopus laevis oocytes. This inhibition is of physiological interest because previous work have shown its relation with the induction of the meiotic maturation of amphibian oocytes by progesterone.

The first part of this thesis complements previous studies on the requirement of guanine nucleotides for the hormonal inhibition.

Mg<sup>2+</sup> ion affects the histeresis of the enzymatic reaction however the concentration required for the activation of the enzyme is not affected by progesterone and the inhibition caused by this hormone is not modified by the Mg<sup>2+</sup> concentration.

The regulation of the oocyte adenylylcyclase by calciums ions and calmodulin was investigated also. The results obtained demonstrate that the adenylylcyclase activity does not depend on the presence of free calcium ions and that the addition of exogenous calmodulin, does not modify the enzymatic activity. In the course of these experiments it was observed that adenylylcyclase can be inhibited by the 2-chloro-10-(3-aminopropyl)phenotiazine (CAPP), a drug that binds calmodulin in the presence of calcium ions and inhibits its activity. Detailed studies showed that this inhibition is calcium

independent and that the adenylyl cyclase activity is affected in different ways, depending on the activator utilised in the assay.

These results have been interpreted to mean that the phenothiazine derivate affects in some manner the membrane properties, as has been found in other adenylyl cyclase systems. Thus, the  $N_s$  regulatory protein, which mediates the enzyme activation by GMP.P(NH)P, fluoride and cholera toxin, would be more sensitive to these changes than the catalytic subunit. Our data, therefore, do not support the proposals that relate the effect of phenothiazines on oocyte maturation to the possible activation of the adenylyl cyclase of these cells by calcium and calmodulin.

The second part of this thesis includes the major part of the work carried out and deals with the study of the possible participation of the proteins  $N_s$  and  $N_i$  in the mechanism of adenylyl cyclase inhibition by progesterone.

The data obtained indicate that the inhibition of oocyte adenylyl cyclase by progesterone differs from that of all other known inhibitory hormones in that it does not seem to be mediated by  $N_i$ . The most relevant results that support this conclusion are those obtained through the ADP-ribosylation of the oocyte membranes with Bordetella pertussis toxin. These studies establish that the oocyte membranes contain a protein of Mr 41,000 that co-migrates with pure  $N_i$  from human erythrocytes on SDS-polyacrylamide gels and that can be ADP-ribosylated by B. pertussis toxin. Nevertheless, the ADP-ribosylation of this "Ni-like" protein does not affect the inhibition of the enzyme

caused by progesterone. Oocyte adenylylcyclase also differs from other Ni-containing adenylylcyclases in that low concentrations of GMP.P(NH)P do not inhibit its activity measured in the presence of forskolin.

On the other hand, the work presented in this thesis provided several pieces of evidence that indicate that there exists a relationship between progesterone inhibition and the activation of the enzyme by Ns and guanine nucleotides. Here again, it was possible to detect in oocyte membranes the presence of a protein with Mr 43.000, like pure Ns from human erythrocytes, which could be ADP-ribosylated by cholera toxin.

Progesterone affected the activation of Ns by guanine nucleotides as seen by the fact that its presence significantly increased the hysteresis (latency) of the reaction with GMP.P(NH)P, increasing 2-3 fold the half time of enzyme activation. Progesterone also decreased the steady-state velocity of the enzyme, but in this case the hormonal effect could be reverted by high concentration of GMP.P(NH)P.

Reaction of the oocyte membrane with the 3',5'-dialdehyde of GTP (GTPox) preferentially affected the capacity of Ns to mediate the activation of adenylylcyclase by several effectors, like  $F^-$  and GMP.P(NH)P, indicating that this protein might have been inactivated by the guanine nucleotide analog. The remaining activity of the enzyme measured with GMP.P(NH)P is practically insensitive to progesterone inhibition, suggesting a close relationship between Ns activity and progesterone action. The addition of pure Ns from human erythrocytes to oocyte membranes treated with GTPox restores 60% of the original

activity but does not bring back progesterone inhibition. The incapacity of exogenous Ns to transduce the hormonal effect was also observed in experiments in which Ns was added to membranes not treated with GTPox. In this case also, the additional activity obtained was not susceptible to progesterone inhibition. However, excess exogenous Ns was able to eliminate the inhibition of progesterone mediated by the endogenous Ns. All of these findings support our hypothesis that the inhibition of oocyte adenylylcyclase is caused by interference with the activation of this enzyme by Ns.



## INTRODUCCION

### A. PROGESTERONA Y LA MADURACION MEIOTICA DE LOS OOCITOS DE ANFIBIO.

La división celular es una propiedad intrínseca de los sistemas biológicos, es un proceso altamente ordenado, gobernado por complejos controles que operan en forma secuencial y específica. Los factores que controlan la división celular están siendo estudiados intensamente, utilizándose para ello diferentes enfoques y sistemas. Uno de estos enfoques utiliza oocitos de anfibio totalmente crecidos, detenidos en la etapa de profase de la primera división meiótica. Estos oocitos responden a la hormona esteroïdal progesterona, reiniciando la meiosis, la cual continúa hasta alcanzar la etapa de metafase de la segunda división meiótica. En esta última etapa, los oocitos nuevamente se detienen esperando ser fertilizados para iniciar la embriogénesis. A este proceso, gatillado por una hormona, y que resulta en la formación de un oocito activable, se le denomina maduración meiótica.

Para el investigador interesado en estudiar este ejemplo muy especial de división celular y los mecanismos moleculares que participan en el proceso de maduración, los oocitos de anfibio ofrecen una serie de ventajas sobre otros sistemas celulares. Una de estas ventajas es su gran tamaño (1,4 mm de diámetro), el cual es 500.000

veces más grande que el de una célula somática normal y facilita grandemente su manipulación. Este gran tamaño también permite utilizar al oocito para realizar la técnica de microinyección, como una manera de estudiar la regulación de la división celular y el mecanismo de la acción hormonal. Otra ventaja del oocito, es su sincronización fisiológica. Los oocitos plenamente desarrollados (estado VI, según Dumont, 1972) están todos detenidos en la profase de la primera división meiótica y por acción de la hormona esteroideal pasan sincrónicamente en 18 horas a la metafase de la segunda división meiótica. Esta perfecta sincronización fisiológica permite analizar la regulación de las diferentes etapas que participan en el proceso de división meiótica celular. Esta característica del oocito también facilita el análisis del mecanismo de acción de la hormona esteroideal y, como veremos más adelante, la respuesta sincronizada del oocito al esteroide ha permitido identificar un nuevo mecanismo en la acción de una hormona esteroideal.

Solamente en los últimos diez años ha habido un gran interés de usar el proceso de maduración en oocitos como un modelo para estudiar la acción de la hormona. Las pruebas que existen y demuestran la participación de una hormona esteroideal en el proceso de maduración están revisadas en los artículos de Maller y Sadler (1981), Masui y Clarke (1979) y también en la tesis de Xavier Jordana (1982).

## B. NUCLEOTIDOS CICLICOS Y LA INICIACION DE LA MADURACION.

### 1. Fluctuaciones en los niveles de cAMP.

A comienzos de la década de los setenta, una serie de trabajos

mostraron que el tratamiento de los oocitos con metilxantinas o papaverina inhibían la maduración inducida por la progesterona (Allende y col., 1977; Bravo y col., 1978; Morril y col., 1982). Estos compuestos inhiben la actividad de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos proveniente de varias fuentes, aumentando las concentraciones de cAMP intracelulares. Estos resultados fueron interpretados como una indicación de que niveles altos de cAMP inhibían el proceso de maduración. La posibilidad de que esta inhibición se debiera a efectos laterales de estos compuestos parecía imposible, pues la degradación de cAMP microinyectado en el oocito era inhibida por concentraciones de teofilina como lo era también en preparaciones parcialmente puras de fosfodiesterasa de oocitos (Allende y col., 1977; Morril y col., 1982). Estas conclusiones fueron reafirmadas por los resultados obtenidos del análisis de las fluctuaciones de niveles de cAMP en etapas iniciales del proceso de maduración. Es así, como se encontró una rápida disminución en los niveles de cAMP (entre un 40% y 60%) en los primeros minutos después de haber expuesto los oocitos a la acción de la progesterona, con un retorno a los niveles basales en etapas posteriores de la maduración (Morril y col., 1977; Speaker y Budcher, 1977; Bravo y col., 1978; Maller y col., 1979; Schoderet-Slatkine y col., 1982).

## 2. Participación del cAMP en la maduración meiótica.

Toda las pruebas recogidas a partir de numerosos estudios indican que en las células eucarióticas, el cAMP ejerce su acción exclusivamente a través de la activación de proteína-quinasa dependientes de

cAMP (Krebs, 1972). La activación consiste en la disociación de un complejo inactivo en subunidades catalíticas libres activas y en subunidades reguladoras que tienen unido cAMP. La adición de la subunidad reguladora a la subunidad catalítica resulta en una reasociación de estas proteínas y formación de una holoenzima inactiva. Numerosas son las pruebas que apoyan la idea que una baja en la concentración de cAMP y una disminución en la fosforilación de proteínas celulares estarían involucradas en la inducción de la maduración por la progesterona.

De ellas se destacan las siguientes:

- a) La maduración inducida por la progesterona es inhibida por la microinyección de la subunidad catalítica de la proteína-quinasa dependiente de cAMP y es inducida, en ausencia de progesterona, por la microinyección de la proteína reguladora de la proteína-quinasa (Maller y Krebs, 1977).
- b) La microinyección del inhibidor de la proteína-quinasa dependiente de cAMP induce la maduración en ausencia de progesterona (Huchon y col., 1981a).
- c) Progesterona disminuye los niveles de la subunidad catalítica libre de la proteína-quinasa en oocitos (Masaracchia y col., 1979).
- d) Toxina del cólera, un activador de la adenililciclase, inhibe la maduración del oocito inducida por la progesterona (Schorderet-Slatkine y col., 1978; Maller y col., 1979).
- e) Presencia de una proteína-quinasa dependiente de cAMP en oocitos con propiedades similares a las descritas en otros sistemas y cambios

de actividad en esta proteína durante el proceso de maduración (O'Connor y Smith, 1979; Cartaud y Ozon, 1981; Flockhart y Corbin, 1982).

f) Inhibición de la maduración meiótica por compuestos que inhiben la caída de los niveles de cAMP, como lo son los inhibidores de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (Bravo y col., 1978).

Todos estos antecedentes han llevado a postular un modelo para el proceso de maduración del oocito en el cual una fosfoproteína sujeta a regulación por una proteína-quinasa dependiente de cAMP mantendría al oocito detenido en la profase de la primera división meiótica. La desfosforilación de esta fosfoproteína inhibidora de la maduración sería necesaria y suficiente para inducir la maduración. El nivel de fosforilación de este inhibidor sería controlado por el balance entre actividades fosforilantes y desfosforilantes. De las evidencias presentadas anteriormente, se deduce fácilmente que la progesterona causaría una disminución en la velocidad de fosforilación dependiente de cAMP. Como consecuencia inmediata de esto se puede pensar entonces que el nivel de la fosfoproteína es controlado principalmente por el grado de fosforilación. Sin embargo se ha visto en oocitos, al igual que en otros sistemas, que la actividad fosfatásica también puede ser controlada por cAMP, a través de un inhibidor de fosfatasas, el cual sería activo al estar fosforilado (Huchon y col., 1981b; Faulkes y Maller, 1982; Ernst y col., 1982).

Evidentemente que el mecanismo molecular es todavía más complejo, pues existen pruebas que muestran aumentos transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en el proceso de inducción de la maduración por progesterona. Esto indudablemente indica la posible participación de la calmodulina y productos de degradación del fosfatidilinositol en la posterior activación de otras proteínas-quinasas y enzimas (Berridge e Irvine, 1984).

### 3. Mecanismos responsables de la disminución de los niveles de cAMP.

La mayoría de los estudios sobre la acción de las hormonas esteroideas sugiere que sus efectos hormonales se hace por intermedio de proteínas receptoras, que fundamentalmente regularían la velocidad de transcripción de genes específicos (Gorski y Gannon, 1976). Este modelo general de acción está basado en numerosos trabajos de investigación, pero que han sido realizados en unos pocos sistemas experimentales. El oocito es un sistema, el cual es totalmente diferente, donde la progesterona está relacionada con sistemas que regulan los niveles de cAMP citosólicos. La pregunta que se origina inmediatamente es ¿cómo es regulada la disminución de los niveles de cAMP por la progesterona?. La respuesta a esta interrogante ha tratado de encontrarse mediante el estudio de los dos sistemas enzimáticos que participan en la síntesis y degradación del cAMP y que son la adenililciclase y la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos. La disminución de cAMP observada en el oocito podría explicarse entonces por una inhibición de la adenililciclase, por una activación de la fosfodiesterasa o por ambos efectos debidos a la acción de la progesterona.

Con respecto a la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, los estudios realizados en el laboratorio de Jorge y Catherine Allende no han encontrado prueba alguna de activación directa de esta enzima por la progesterona. Se ha encontrado in vitro, sin embargo, una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de oocitos que es activada por calmodulina y  $Ca^{2+}$  (Echeverría y col., 1981; Orellana y col., 1981; Orellana, 1983; Orellana y col., 1984; Jedlicki, 1984).

Con respecto a la adenililciclase, los trabajos realizados por el grupo de Allende y el de Maller y Baulieu han demostrado que esta enzima está unida a la membrana del oocito y es inhibida por concentraciones fisiológicas de progesterona (Jordana y col., 1981b; Sadler y Maller, 1981; Finidori-Lepicard y col., 1981).

Estos análisis junto a estudios posteriores han definido las principales características de esta enzima y su inhibición por la progesterona (Jordana y col., 1981a; Jordana y col., 1981b; Jordana y col., 1982; Finidori-Lepicard y col., 1982a; Finidori-Lepicard y col., 1982b; Sadler y Maller, 1983) las cuales pueden resumirse así:

- a) Existe una actividad de adenililciclase en fracciones de membranas plasmáticas de oocitos.
- b) La adenililciclase de oocitos es activada por una serie de efectores que también activan la enzima de otros sistemas, como son fluoruro, nucleótidos de guanósina,  $Mn^{2+}$  y toxina del cólera.
- c) La adenililciclase de oocitos es inhibida por la progesterona en forma saturable, reversible y específica para el esteroide y para el tejido .

- d) La inhibición de la enzima requiere la presencia de nucleótidos de guanosina. En este aspecto ha habido alguna discrepancia entre los resultados de distintos grupos, pero las evidencias obtenidas recientemente por Jordana (1982) son concluyentes en este aspecto.
- e) Durante la oogénesis, la actividad de la adenililciclase, el grado de activación de la enzima por el nucleótido de guanosina y el grado de inhibición de la enzima por la progesterona aumentan.
- f) Existencia de un posible receptor de membrana para progesterona. Los resultados en relación a este punto no son aún concluyentes (Sadler y Maller, 1982; Blondeau y Baulieu, 1984).

Los datos presentados anteriormente tienen el interés de constituir las primeras pruebas de un mecanismo de acción de una hormona esteroïdal que implica una modificación de la actividad de la adenililciclase y todo el sistema del segundo mensajero cAMP. Esto hace análoga la acción de la progesterona en el oocito a la acción de otras hormonas y efectores no esteroïdales que inhiben la adenililciclase en otros tejidos.

Como el propósito fundamental de esta tesis es profundizar el estudio del mecanismo por el cual progesterona inhibe a la adenililciclase presente en oocitos, conviene describir lo que se conoce actualmente sobre la adenililciclase presente en la membrana de células de mamífero y su regulación hormonal.

### C. CARACTERÍSTICAS DE LA ADENILILCICLASE PRESENTE EN MEMBRANAS DE CELULAS EUCARIONTES.

Los componentes de la adenililciclase, sus propiedades y características moleculares han sido revisadas recientemente por Ross y



Gilman (1980), Limbird (1981), Cooper (1982), Gilman (1984) y también por Jordana (1982) en su tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias .

Las investigaciones realizadas en los últimos tres años han demostrado que la adenililciclase sensible a hormonas peptídicas y otros ligandos es un sistema más complicado de lo que se pensó originalmente y estaría compuesto al menos por tres tipos de proteínas embebidas en la membrana plasmática.

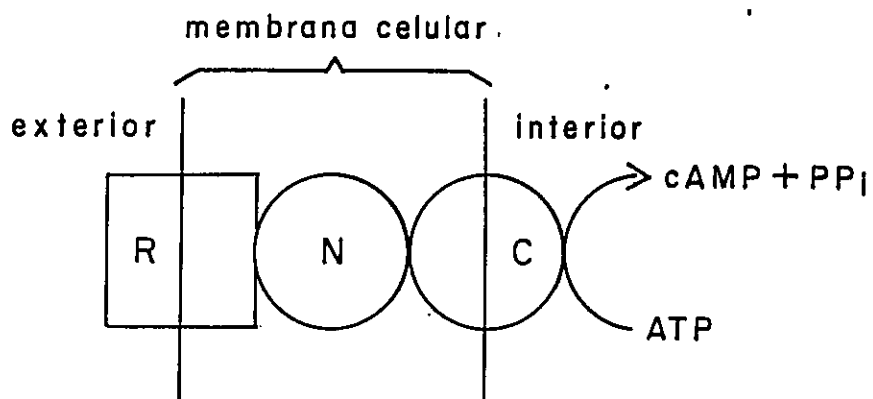
En 1970 Rodbell y col.(1971a, 1971b) descubrieron que los nucleótidos de guanosina eran cofactores esenciales para la estimulación hormonal de las adenililciclasas. Como consecuencia de estas observaciones Rodbell propuso que la señal iniciada por la hormona y que regulaba la formación del cAMP, podía ser ejecutada a través de la membrana por la participación de tres componentes. Un discriminador, el que determinaba la especificidad hormonal de la señal, un traductor, el cual transformaba la información dada por el discriminador y un amplificador formado por el sistema efector. Actualmente se sabe que el discriminador es el receptor hormonal (R), el cual confiere la especificidad hormonal al sistema, uniéndose con alta afinidad a la hormona o ligando. El traductor es una proteína reguladora (N), la cual tiene el sitio de unión del nucleótido de guanosina, su función es dependiente de GTP y regula la actividad de la subunidad catalítica. Esta proteína N es regulada a su vez por R en presencia de la hormona. Por esta razón N es un traductor de la señal externa que llega a la célula. El amplificador es la proteína responsable de

la reacción catalítica que convierte al sustrato ATP en cAMP y pirofosfato como productos y ha sido denominada subunidad catalítica C. El esquema I muestra en una forma simplificada los componentes de la adenililciclase.

#### 1. Estructura de los componentes de la adenililciclase.

Para entender el mecanismo por el cual el complejo hormona-receptor modifica la actividad de la adenililciclase, se describirán las propiedades funcionales y estructurales de los componentes de este sistema. En el año 1975, Bourne y col., describieron el aislamiento de una línea celular de linfoma denominada S49, la cual era deficiente en actividad adenililciclase. Este defecto fue caracterizado por Ross y Gilman en 1977 y se vio que estas células carecían del componente regulador N, pero tenían una actividad catalítica y receptores funcionales. Con este hallazgo Ross y Gilman confirieron una identidad molecular al concepto del traductor propuesto anteriormente por Rodbell. Este componente regulador de la actividad de la adenililciclase ha sido denominado indistintamente N, G/F o G, pero en esta tesis se usará la denominación N.

La actividad de la adenililciclase está sujeta tanto a un control positivo (activación) como a un control negativo (inhibición) por las hormonas y los nucleótidos de guanosina (Jakobs y col., 1981; Londres y col., 1981; Cooper, 1982). Es así como actualmente se sabe que la activación y la inhibición de la adenililciclase se hace mediante dos proteínas reguladoras N distintas, las cuales actúan sobre la subunidad catalítica C, que es común. Ambas proteínas reguladoras unen  $Mg^{2+}$  y nucleótidos de guanosina. Una de ellas, denominada  $N_s$



Esquema I. Modelo simplificado de la disposición de los componentes de la adenililciclase en la membrana plasmática de la célula.  
R=receptor hormonal; N=proteína reguladora; C=subunidad catalítica.

(Rodbell, 1980; Codina y col., 1984a), es la responsable de la activación de la adenililciclase por la hormona en una forma dependiente de  $Mg^{2+}$  y nucleótidos de guanosina. La otra proteína reguladora, denominada Ni (Hildebrandt y col., 1983) participa en la inhibición de la adenililciclase por la hormona también en una forma dependiente de  $Mg^{2+}$  y nucleótidos de guanosina (Birnbaumer y col., 1983; Jakobs y col., 1983).

Ambas proteínas reguladoras N han sido purificadas a partir de varios tipos de células y han mostrado ser similares en su estructura y en su función (Northup y col., 1980; Bokoch y col., 1983; Codina y col., 1984a; Bokoch y col., 1984; Katada y col., 1984a,b y c). Ellas están formadas por tres subunidades denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\mu$  y unen GTP y sus análogos (Northup y col., 1982; Bokoch y col., 1983; Bokoch y col., 1984). Ambas son sustratos para la actividad ADP-ribosiltransferasa de toxinas bacterianas (Northup y col., 1980; Bokoch y col., 1983; Codina y col., 1983; Bokoch y col., 1984), las dos interactúan con  $Mg^{2+}$  y son GTPasas (Iyengar, 1981; Hildebrandt y Birnbaumer, 1983; Birnbaumer y col., 1983; Brandt y col., 1983; Sunyer y col., 1984) y tienen un peso molecular de 100.000 d en condiciones no desnaturalantes (Codina y col., 1984a). El tratamiento de ellas con  $Mg^{2+}$  y análogos no hidrolizables de GTP, tales como GMP.P(NH)P y GTP $\gamma$ S, causan una disociación del trimero  $\alpha\beta\mu$ . Este proceso resulta en una subunidad libre, proveniente de Ns o Ni, con el nucleótido de guanosina unido a ella ( $\alpha_s^G$  o  $\alpha_i^G$ ) y un complejo que parece estar formado por las subunidades  $\beta\mu$  (Howlett y col., 1979; Sternweis y col., 1981; Hanski y col., 1981; Northup y col., 1983; Hildebrandt y col., 1984;

Katada y col., 1984a).

Las subunidades  $\alpha_s$  y  $\alpha_i$  difieren en varios aspectos:

a)  $\alpha_s$  es ADP-ribosilada por la toxina del cólera (Gill y Meren, 1978; Johnson y col., 1978; Lai y col., 1981; Scheifer y col., 1982; Malbon y Greenberg, 1982), mientras que  $\alpha_i$  es ADP-ribosilada por la toxina de Bordetella pertussis (Katada y Ui, 1982a; Katada y Ui, 1982b; Nurayama y Ui, 1983; Bokoch y col., 1983; Codina y col., 1983).

b) En la mayoría de los tejidos,  $\alpha_s$  muestra una heterogeneidad de tamaño, siendo la forma predominante de un peso molecular entre 42.000 y 43.000 d y otras formas presentes en menores cantidades con un peso molecular entre 51.000 y 52.000 d (Gill y Meren, 1978; Johnson y col., 1978; Northup y col., 1980; Lai y col., 1981; Schleifer, y col., 1982; Malbon y Greenberg, 1982). En cambio  $\alpha_i$ , tiene un peso molecular de 41.000 d, indicando una sola forma de esta proteína (Katada y Ui, 1982a; Katada y Ui, 1982b; Murayama y Ui, 1983; Bokoch y col., 1983; Codina y col., 1983).

c) Las estructuras primarias de  $\alpha_s$  y  $\alpha_i$  son diferentes según se ha demostrado por análisis de digestión trípica de estas subunidades (Mannin y Gilman, 1983; Codina y col., 1984a).

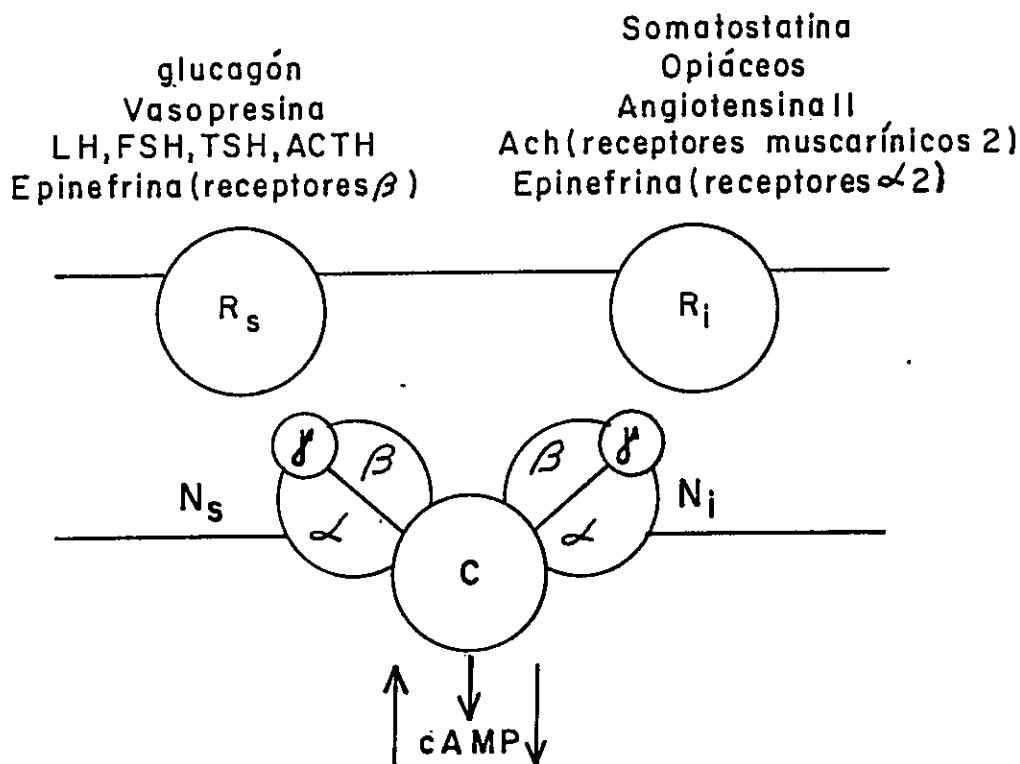
Con respecto a las subunidades  $\beta$  de Ns y Ni, se ha encontrado que son indistinguibles entre sí por análisis de composición de aminoácidos y digestión con proteasas (Manning y Gilman, 1983; Codina y col., 1984a) y tienen ambas un peso molecular de 35.000 d (Northup y col., 1980; Codina y col., 1984a).

Las subunidades  $\mu$  descubiertas recientemente (Hildebrandt y col., 1984; Bokoch y col., 1984), tienen un peso molecular entre 5.000 y 10.000 d. Su función no está clara y tampoco se sabe si son iguales o diferentes entre sí, o si existe más de una subunidad  $\mu$  por dímero .

La subunidad catalítica C es la encargada de convertir el sustrato activo de la adenililciclase, el Mg-ATP, en cAMP y pirofosfato. Sobre la subunidad C se sabe muy poco y aunque algunos investigadores han logrado separarla físicamente de las proteínas Ns y Ni, aún no ha sido posible purificarla debido a su gran inestabilidad (Bender y Neer, 1983; Northup y col., 1983). Se ha visto que la proteína C puede ser activada por la proteína Ns y también en algunos tejidos por la proteína calmodulina (Strittmatter y Neer, 1980; Salter y col., 1981). En ausencia de la proteína N, el sustrato preferencial de la proteína C es Mn-ATP, pero cuando está acoplada a la proteína N utiliza Mg-ATP (Ross y Gilman, 1977; Bender y Neer, 1983). En células de linfoma  $cyc^-$  S49, que carecen de Ns, se ha visto que la subunidad catalítica puede ser activada por forskolina (Seamon y Daly, 1981). El esquema II muestra un modelo simplificado de la composición estructural de la adenililciclase de mamíferos.

2. Activación de Ns por nucleótidos de guanosina y  $Mg^{2+}$  en ausencia de hormona.

Actualmente se sabe que la activación de la subunidad catalítica C por Ns se debe a la interacción de la subunidad  $\alpha_s$  con la subunidad catalítica C (Northup y col., 1980). La activación de Ns necesita la presencia de nucleótidos de guanosina (GTP y análogos no



Esquema II. Estructura de los componentes de la adenililciclase de mamíferos.

LH= hormona luteinizante; FSH=hormona folículo-estimulante; TSH=hormona tiroide-estimulante; ACTH=hormona adrenocorticotrópica; Ach=acetilcolina;  $R_s$ =receptor estimulador;  $R_i$ =receptor inhibidor;  $N_s$ =proteína reguladora que participa la activación de la adenililciclase.  $N_i$ =proteína reguladora que participa en la inhibición de la adenililciclase.

hidrolizables) y de iones  $Mg^{2+}$  (Howlett y col., 1979; Strittmatter y Neer, 1980; Iyengar, 1981). Estudios recientes utilizando tanto la proteína Ns purificada, como la proteína Ns separada físicamente de la subunidad catalítica C en membranas solubilizadas o la proteína Ns asociada a la subunidad catalítica C en membranas intactas, han mostrado que:

a) La activación de la proteína Ns por el nucleótido de guanosina es una reacción lenta, que presenta un período de retardo en el tiempo (histeresis) y que es dependiente de la concentración de  $Mg^{2+}$  (Iyengar y Birnbaumer, 1981; Iyengar, 1981; Northup y col., 1983). A concentraciones fisiológicas de  $Mg^{2+}$  (alrededor de 0,5 mM) la activación de Ns por el análogo GMP.P(NH)P es muy lenta, pero es acelerada y aumenta en grado, cuando las concentraciones de  $Mg^{2+}$  son mayores (Iyengar y Birnbaumer, 1981; Iyengar, 1981).

b) La velocidad de activación de Ns también depende de la naturaleza del nucleótido de guanosina utilizado (Birnbaumer y col., 1980). La velocidad de activación de Ns por GMP.P(NH)P es menor que la velocidad obtenida al utilizar GTP, pero el análogo no hidrolizable causa un mayor grado de activación que el GTP. Se ha propuesto que este efecto se debe a la naturaleza no hidrolizable del enlace imidodifosfato de este análogo (Londos y col., 1974).

c) El GTP es hidrolizado por preparaciones intactas de membranas y por la proteína Ns purificada (Cassel y Selinger, 1976; Cassel y Selinger, 1977; Hildebrandt y Birnbaumer, 1983; Cerione y col.; 1984; Brandt y Ross, 1985).



d) La subunidad  $\alpha_s$  es ADP-ribosilada por la toxina del cólera, tratamiento que potencia su activación por GTP. Se ha propuesto que esta ADP-ribosilación inhibiría la actividad GTPásica de Ns (Gill y Meren, 1978).

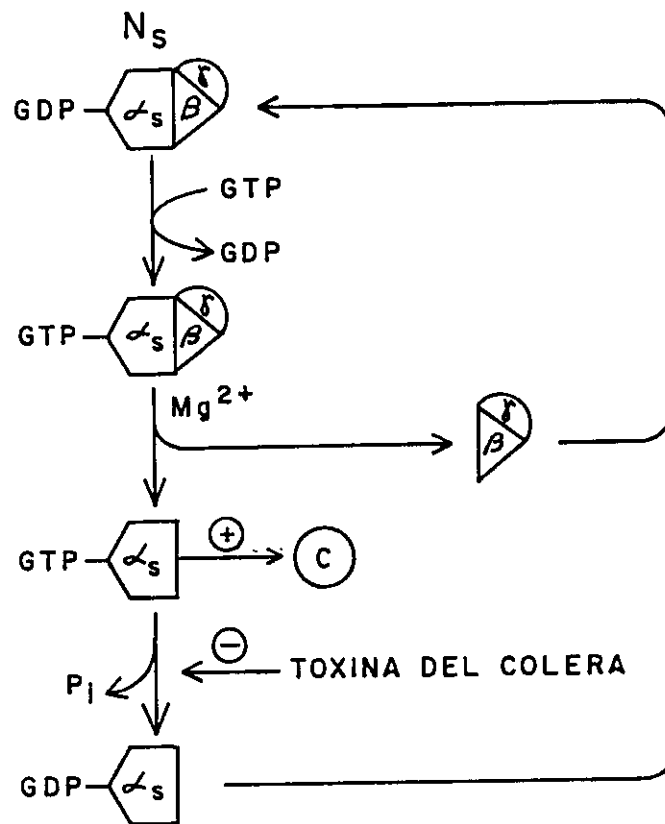
e) La activación de la proteína Ns por un análogo no hidrolizable de GTP y  $Mg^{2+}$ , conduce a una disminución en el tamaño de Ns, lo cual se debe a la disociación de las subunidades  $\beta_s$  y  $\mu$  de la subunidad  $\alpha_s$  unida al nucleótido (Northup y col., 1983; Codina y col., 1984b). Este proceso de disociación también puede ser causado por el ión fluoruro y  $Mg^{2+}$  (Sternweis y col., 1981; Hildebrandt y col., 1982).

Los datos presentados anteriormente han llevado a postular que la activación lenta de Ns por los nucleótidos de guanosina esta gobernada por una etapa limitante de velocidad en el proceso que conduce a Ns desde un estado no disociado (trimero) a un estado disociado. La posibilidad que la etapa limitante en la activación sea la disociación del GDP y su recambio por GTP, parece estar limitada al sistema de eritrocito de pavo (Abramowitz y col., 1980), pues no ha sido encontrada para la mayoría de los otros sistemas de adenililciclase estudiados. En estos últimos sistemas, la etapa limitante sería posterior a la unión del nucleótido y estaría determinada solamente por el "nivel de disociación" de Ns. Así, en presencia de GTP, la proteína Ns desarrollaría un ciclo continuo y unidireccional, donde la proteína Ns une GTP, es disociada en un proceso dependiente de  $Mg^{2+}$ , para posteriormente ser hidrolizado el GTP por la actividad GTPásica de Ns, quedando Ns en un estado desactivado con GDP unido a ella.

Finalmente tendría lugar un rápido intercambio de GDP por GTP. En condiciones fisiológicas de  $Mg^{2+}$  (0,5 mM) o con concentraciones más altas de este catión (5-10 mM), las velocidades de activación, disociación de Ns, y de desactivación (hidrólisis de GTP) de Ns determinarían el "nivel de Ns activado".

Contrariamente a esto, al sustituir el GTP por un análogo no hidrolizable, como GMP.P(NH)P o  $GTP\mu S$ , se interrumpe el ciclo descrito anteriormente debido a que no se hidroliza el nucleótido de guanosina y se establece un equilibrio entre las formas inactivas (trimeros) y activas de Ns. Este equilibrio dependerá de la velocidad de disociación de la forma Ns-GMP.P(NH)P y de la velocidad de disociación del nucleótido activador desde el sitio de unión. En estas condiciones el aumento de la velocidad y del grado de activación de Ns por concentraciones crecientes de  $Mg^{2+}$  (descrita en el punto 2a), se debería a un desplazamiento del equilibrio hacia la forma disociada (activa) de Ns causada por el  $Mg^{2+}$ . Esto ha sido confirmado por Codina y col., (1984b), trabajo en el cual se demuestra que Ns en presencia  $Mg^{2+}$  sufre un cambio conformacional desde un estado en el que la unión del nucleótido es rápida y reversible, a uno en el cual el nucleótido no se disocia fácilmente. Posteriormente la proteína Ns sufre el proceso de disociación en sus subunidades (descrito en el punto 2e).

En el esquema III se presenta un modelo de activación y desactivación de Ns por nucleótidos de guanosina y  $Mg^{2+}$ . Con respecto a este modelo, no hay demostraciones directas si la reacción de disociación de las subunidades ocurre con GTP, si es obligatoria la disociación para que la subunidad catalítica C sea estimulada y si



Esquema III. Mecanismos de activación y desactivación de Ns por nucleótidos de guanósina y  $Mg^{2+}$ .

⊖ = inhibición;  $P_i$  = fosfato inorgánico.  
 La especie  $\alpha_s$ -GTP sería la que interactúa con C y la activa. La función de la subunidad  $\beta$  no es conocida aún.

sucede en el microambiente lipídico de la membrana.

La  $K_m$  aparente de la proteína Ns por GTP (o sus análogos) es alrededor de  $1 \mu\text{M}$  (Limbird, 1981). En condiciones fisiológicas, las concentraciones de GTP intracelulares son alrededor de  $100 \mu\text{M}$ , por lo tanto Ns estaría siempre saturada con GTP. Dos factores contribuyen al hecho que, bajo condiciones fisiológicas y en ausencia de la hormona estimuladora, la proteína Ns (subunidad  $\alpha_s$ ) no estimule a la subunidad catalítica C en forma permanente. El primer factor es que la proteína Ns sea una GTPasa, por lo tanto esta proteína está hidrolizando constantemente el nucleótido activador. El segundo factor es que las concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  necesarias para activar a la proteína Ns en ausencia de la hormona son alrededor de  $5-10 \text{ mM}$  (Iyengar, 1981), las cuales son 10 a 20 veces más grandes que la concentración intracelular de  $\text{Mg}^{2+}$ , que es de  $0,5 \text{ mM}$ . En el caso de eritrocito de pavo la disociación del GDP es extremadamente lenta y por lo tanto constituye en este sistema otra barrera a la persistente estimulación por GTP (Abramowitz y col., 1980). Como ya se ha mencionado anteriormente, este no es el caso para el sistema de adenililciclase de mamífero, donde el GDP se disocia rápidamente de la proteína Ns (Abramowitz y Birnbaumer, 1982; Iyengar y Birnbaumer, 1981).

3. Activación de Ni por nucleótidos de guanosina y  $\text{Mg}^{2+}$  en ausencia de hormona.

Como vimos anteriormente, la proteína reguladora Ni se asemeja bastante a la proteína reguladora Ns, no sólo estructuralmente sino que también funcionalmente. Estudios realizados en membranas

carentes de la proteína Ns (células de linfoma cyc<sup>-</sup> S49) y en membranas de plaquetas, han mostrado que Ni:

a) Es activada por nucleótidos de guanosina en presencia de Mg<sup>2+</sup> (Hildebrandt y col., 1982; Jakobs y col., 1983; Hildebrandt y Birnbaumer, 1983; Bokoch y col., 1984), siendo el GTP menos activo que sus análogos no hidrolizables (Hildebrandt y col., 1982; Bokoch y col., 1984).

b) La proteína Ni también tiene actividad GTPásica (Sunyer y col., 1984).

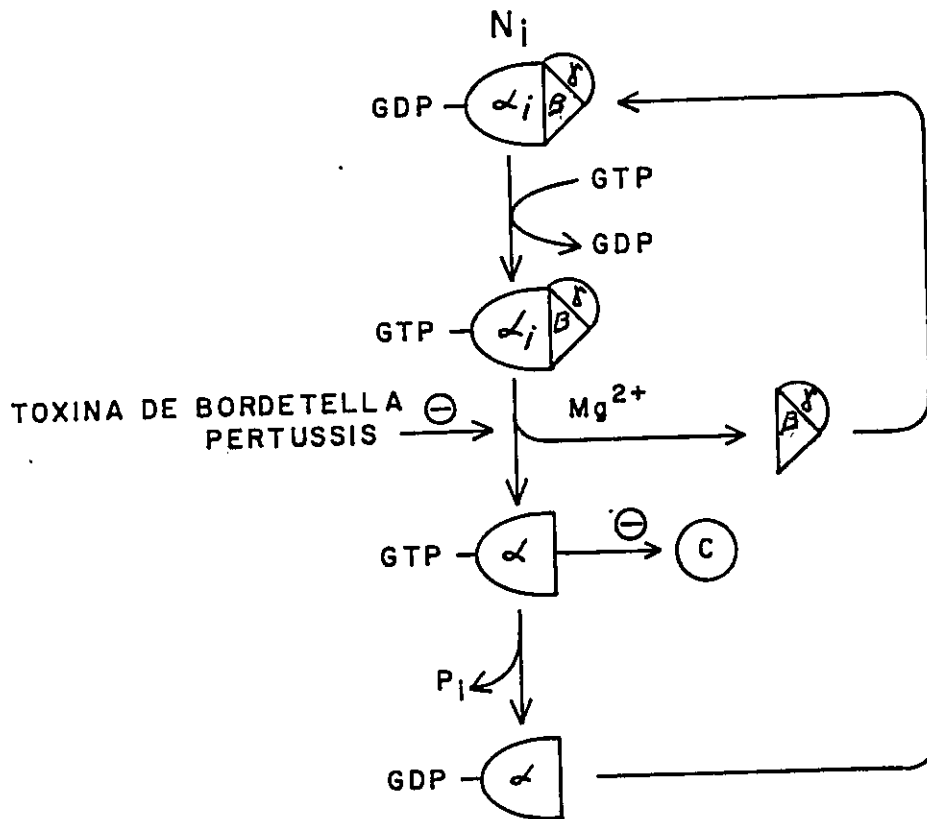
c) En presencia de análogos de GTP y Mg<sup>2+</sup>, la proteína Ni sufre una disociación, dando origen a la subunidad  $\alpha_i$  con el nucleótido de guanosina unido a ella ( $\alpha_i^G$ ) y a un dímero  $\beta\mu$  (Bokoch y col., 1983; Hildebrandt y col., 1984; Katada y col., 1984a).

d) La toxina de Bordetella pertussis ADP-ribosila a la subunidad  $\alpha_i$ . Esta modificación covalente no potencia la activación de Ni por GTP, sino que previene la disociación de la proteína Ni (Hildebrandt y col., 1983; Katada y col., 1984b).

En el esquema IV se muestra un modelo para la activación de la proteína Ni por nucleótidos de guanosina y Mg<sup>2+</sup>.

4. Regulación de la actividad de la subunidad catalítica C por las proteínas Ns y Ni.

El conocimiento que se tiene actualmente de la estructura y función de las proteínas reguladoras Ns y Ni, han permitido estudiar el mecanismo íntimo de interacción entre Ns y Ni, entre Ns y Ni y la subunidad catalítica C y como estas interacciones pueden estar regulando la actividad de la adenililciclase. Los estudios realizados



Esquema IV. Mecanismos de activación y desactivación de Ni por nucleótidos de guanosina y Mg<sup>2+</sup>.

$\ominus$  = inhibición; Pi = fosfato inorgánico.

La especie  $\alpha_i$ -GTP sería la que interactúa con C y la inactiva. La función de la subunidad  $\mu$  no es conocida aún.

sobre este problema son recientes y pueden resumirse así: a) La subunidad  $\beta_s$  purificada proveniente de hígado de conejo, al interactuar con la proteína Ns, disminuye la activación de Ns por  $GTP\gamma S$  y  $Mg^{2+}$  y acelera la velocidad de desactivación de Ns previamente activada por  $F^-$  y  $Mg^{2+}$  (Northup y col., 1982).

b) La subunidad  $\beta_i$  purificada proveniente de hígado de rata, al igual que  $\beta_s$ , causa la desactivación de Ns y también inhibe la actividad de la adenililciclase cuando se adiciona esta subunidad a membranas de plaquetas humanas (Katada y col., 1984a; Katada y col., 1984b).

c) La proteína Ni puede inhibir la actividad de la subunidad catalítica C de la adenililciclase, sin afectar el estado de activación de Ns y este efecto es no competitivo con respecto a la actividad de Ns (Hildebrandt y col., 1984).

Estos estudios han llevado a postular que la activación de la adenililciclase por Ns estaría dada por la interacción de la subunidad  $\alpha_s$  con la subunidad catalítica C. La inhibición, sin embargo, estaría dada al menos por dos mecanismos:

1. La subunidad  $\beta_i$  proveniente de la disociación de Ni, interactuaría con la subunidad  $\alpha_s$ , revertiendo la etapa de disociación (activación) de Ns por formación de un dímero del tipo  $\alpha_s\beta_i$  inactivo. Este mecanismo de inhibición obedecería a un proceso gobernado por la ley de acción de masas y sería posible debido a la igualdad entre las subunidades  $\beta_s$  y  $\beta_i$ .

2. La subunidad  $\alpha_i$  proveniente de la disociación de Ni interactuaría con la subunidad catalítica C, a través de un sitio diferente al que utilizaría  $\alpha_s$ , e inhibiría la actividad de C. Estos dos

mecanismos operando simultáneamente se muestran en el esquema V.

En él se puede ver que las proteínas Ns y Ni se disocian en presencia de análogos de nucleótidos de guanosina y  $Mg^{2+}$ . El proceso de disociación es relativamente lento, y como veremos más adelante, puede ser acelerado por el agonista apropiado unido a su receptor. La disociación de Ns resulta en una estimulación de la subunidad catalítica C por la subunidad  $\alpha_s$ . La disociación de Ni inhibe la actividad catalítica como consecuencia de la interacción de la subunidad  $\beta_i$  proveniente de Ni con la subunidad  $\alpha_s$  libre (①, esquema V) y/o de la interacción directa de la subunidad  $\alpha_i$  con la subunidad catalítica C (②, esquema V).

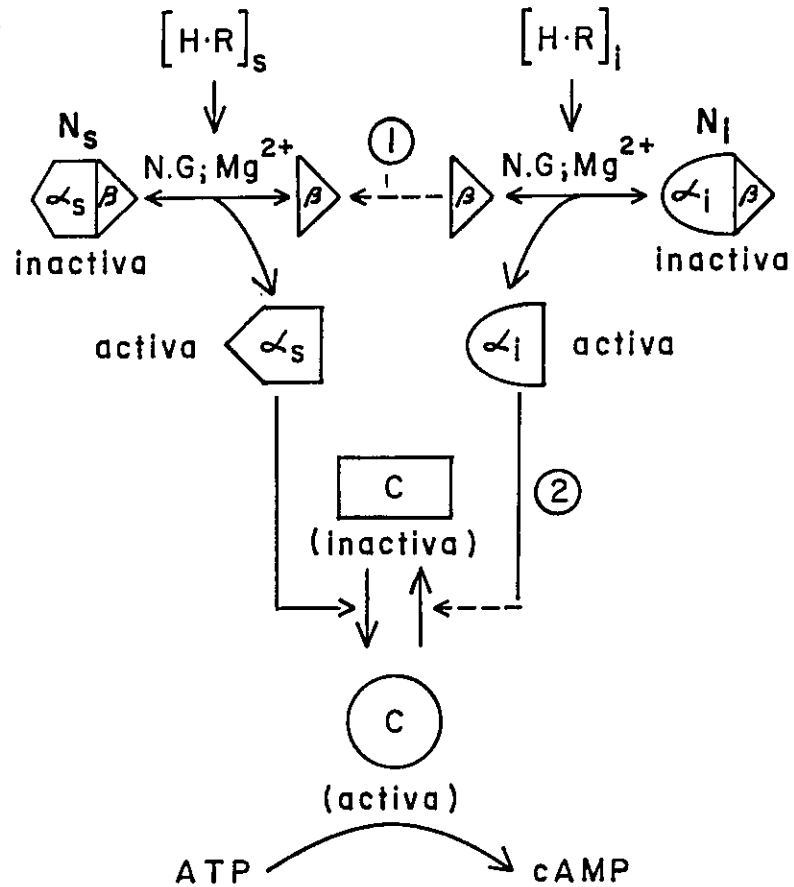
Cuando el nucleótido de guanosina (GTP) se une a Ns o Ni, la disociación es esencialmente irreversible en presencia de  $Mg^{2+}$ . La estimulación o inhibición persistente de la actividad de la adenililciclase resulta de la predominancia de uno u otro efecto. Como la disociación de Ni ocurre a niveles bajos de  $Mg^{2+}$  (Katada y col., 1984a; Bokoch y col., 1984; Katada y col., 1984b), la actividad de la adenililciclase en condiciones fisiológicas estaría disminuida y representaría la actividad basal de la enzima. La actividad neta de la adenililciclase en un instante cualquiera estaría dada por el grado de disociación de las proteínas Ns y Ni, lo cual a su vez es controlado por los complejos hormona-receptor respectivos.

## 5. Regulación de la actividad de la adenililciclase por hormonas.

### 5.1. Parámetros afectados.

La adición de una hormona a membranas que contienen el sistema completo de la adenililciclase (complejo NsNiC) produce tres





Esquema V. Modelo de la regulación de la actividad de la adenililciclase por las proteínas  $N_s$  y  $N_i$ .

$[H-R]_s$  = complejo hormona-receptor estimulador;  $[H-R]_i$  = complejo hormona-receptor inhibidor; N.G. = nucleótido de guanosina; C = subunidad catalítica.

Tomado de Katada y col., (1984c).

efectos importantes que pueden medirse en forma independiente:

- a) Cambio de la actividad de la adenililciclase, la cual es dependiente de GTP (Rodbell y col., 1974; Ross y col., 1977; Iyengar y col., 1980).
- b) Cambio de la actividad hidrolítica de GTP (GTPasa) de baja  $K_m$  (Cassel y Selinger, 1976; Cassel y Selinger, 1977).
- c) Cambio en la liberación o en el intercambio del nucleótido de guanosa (Cassel y Selinger, 1978).

La estimulación de la actividad de la enzima por una hormona o ligando (glucagón, isoproterenol, hormona luteinizante, etc.) se ha observado frecuentemente. La estimulación de la actividad GTPásica y liberación de nucleótidos ha sido más difícil de estudiar debido a la presencia de otros sistemas enzimáticos y sistemas reguladores en la membrana que también utilizan nucleótidos de guanosa.

La adición de una hormona inhibidora de la actividad también afecta los tres parámetros anteriormente nombrados. Sin embargo, ella disminuye la actividad de la adenililciclase.

## 5.2. Regulación de la estimulación de la adenililciclase por hormonas.

- a) Aumento de la afinidad de la proteína  $N_s$  por el  $Mg^{2+}$ .

Estudios realizados sobre el modo de acción de hormonas estimuladoras, tales como la hormona luteinizante, glucagón y ligandos  $\beta$ -adrenérgicos, en varios sistemas incluyendo cuerpo lúteo, células de linfoma S-49, eritrocitos e hígado (Strittmatter y Neer, 1980; Iyengar, 1981; Iyengar y Birnbaumer, 1982; Codina y col., 1984b) han mostrado que la activación de la subunidad catalítica se debe a un

incremento en la activación de Ns por el nucleótido de guanosina (Birnbaumer y col., 1980; Iyengar y col., 1980; Iyengar, 1981; Iyengar y Birnbaumer, 1982).

Estudios realizados posteriormente en membranas en las cuales la subunidad catalítica C ha sido inactivada y en sistemas de adenililciclase reconstituidos, mostraron que la activación de Ns por el complejo hormona-receptor puede ocurrir en ausencia de la subunidad catalítica C (Citri y Schram, 1980; Neufeld y col., 1980; Pedersen y Ross, 1982). Utilizando el sistema adenililciclase de hígado sensible a glucagón, se ha visto que el complejo hormona-receptor eleva los niveles de la forma activa (disociada) de Ns, acelerando la "reacción de activación", principalmente por aumento de afinidad de la proteína Ns por el ión  $Mg^{2+}$  (Iyengar y Birnbaumer, 1982). De esta manera la proteína Ns queda totalmente saturada por el catión bivalente a las concentraciones fisiológicas de  $Mg^{2+}$  (0,5 mM). Este proceso en ausencia de la hormona, requiere de concentraciones mucho mayores de  $Mg^{2+}$ . Como se mencionó anteriormente, la saturación de Ns por  $Mg^{2+}$ , lleva a una activación más rápida de Ns y por lo tanto a un aumento en la disponibilidad de la especie activa.

b) Estimulación del intercambio de nucleótidos de guanosina.

Estudios realizados con membranas de eritrocitos de pavo han demostrado que la adición de  $[^3H]$  GTP a estas membranas lleva a una acumulación del  $[^3H]$  GDP unido y que este  $[^3H]$  GDP unido se libera cuando se adiciona la hormona estimulante isoproterenol (Cassel y Selinger, 1978). Resultados similares han sido obtenidos con membranas de plaquetas, en las cuales la activación hormonal de Ns resulta

en un aumento en la liberación de  $[^3\text{H}]\text{GMP.P(NH)P}$  previamente unido a estas membranas (Michel y Lefkowitz, 1982). Aunque este tipo de análisis no se ha realizado con la proteína Ns purificada, los antecedentes hasta el momento sugieren que el intercambio de nucleótidos presente en el ciclo regulatorio de Ns (ver esquema III), no es la etapa limitante en condiciones basales, aunque podría pasar a ser una etapa limitante secundaria en presencia de concentraciones saturantes de  $\text{Mg}^{2+}$ .

Los dos efectos promovidos por el complejo hormona-receptor, aumento en la afinidad por el  $\text{Mg}^{2+}$  y aumento en el intercambio de nucleótidos, pueden ser esenciales para el incremento de la forma activa de Ns y por lo tanto para la máxima activación de la adenililciclase. El sistema adenililciclase de mamífero presente en tejidos de reproducción, parece pertenecer a esta clase de sistema. Así por ejemplo, la hormona gonadotrófica humana (hCG) y la hormona luteinizante (LH), aumentan la afinidad de Ns por el  $\text{Mg}^{2+}$  en un factor de 3 y estimulan la liberación de  $\text{GMP.P(NH)P}$  previamente unido a membranas de células de Leydig (Dufau y col., 1980).

c) Estimulación de la hidrólisis de GTP.

Como hemos visto, la estimulación de Ns por el complejo hormona-receptor, conduce a un aumento de la actividad del ciclo regulador de la proteína Ns (ver esquema III) por los mecanismos descritos anteriormente. Esto necesariamente debe estar ligado a un aumento de la hidrólisis del GTP. Aunque este proceso ha sido difícil de estudiar debido a la actividad GTPásica de otras proteínas de membrana, actualmente se sabe que la hidrólisis del GTP de baja Km

está asociada a la proteína Ns. Las evidencias que existen para relacionar esta actividad GTPásica de baja Km con la proteína Ns son:

1. La hidrólisis del GTP es aumentada por la hormona estimuladora.
2. La toxina del cólera inhibe la hidrólisis del GTP, dejando a la proteína Ns con el GTP unido permanentemente a ella.
3. Los análogos no hidrolizables de GTP, tales como el GMP.P(NH)P, estimulan a la adenililciclase en mejor forma que GTP.

La estimulación de la hidrólisis de GTP por la hormona fue descubierta en membranas de eritrocitos de pavo, utilizando ligandos  $\beta$  adrenérgicos (Cassel y Selinger, 1976; Cassel y Selinger, 1977). Este aumento de la hidrólisis de GTP es inhibida por antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos, confirmando de esta manera la dependencia hormonal de este fenómeno. Posteriormente se ha observado este aumento de la hidrólisis del GTP debido a la acción hormonal en otros sistemas de adenililciclase, por ejemplo, en membranas de plaquetas y monocitos (Bitonti y col., 1980; Michel y Lefkowitz, 1982; Aktories y col., 1982).

Estudios de reconstitución realizados recientemente en liposomas, utilizando Ns purificado a partir de membranas de eritrocitos humano y el receptor  $\beta$ -adrenérgico purificado a partir de eritrocito de rana o de pulmón de cobayo, han mostrado que ambos componentes interaccionan en la bicapa lipídica y que la proteína Ns hidroliza GTP en respuesta a un agonista  $\beta$ -adrenérgico (Cerione y col., 1984). Estos estudios tienen la importancia de demostrar por primera vez que Ns es una GTPasa, que esta actividad está bajo control hormonal y que no es necesario otro componente proteico para observar este efecto.

### 5.3. Regulación de la inhibición de la adenililciclase por hormonas.

Se han descrito varios receptores para hormonas y ligandos inhibidores que estimulan la activación de la proteína Ni e inhiben la actividad de la subunidad catalítica C de la adenililciclase. Entre ellos se puede nombrar los receptores opiáceos (Sharma y col., 1975; Blume y col., 1979), los receptores muscarínicos (Murad y col., 1962), el receptor para somatostatina (Jakobs y col., 1983), los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (Jakobs y col., 1976; Yamazaki y col., 1982) y el receptor para angiotensina y dopamina (Jard y col., 1981; Cote y col., 1982).

A diferencia de los receptores estimuladores, los receptores inhibidores no parecen afectar la actividad de Ni alterando su afinidad por  $Mg^{2+}$ , debido a que Ni tiene una afinidad aparente por el catión bivalente en el rango micromolar, es decir mucho más baja que Ns (Hildebrandt y Birnbaumer, 1983). Los receptores inhibidores, al igual que los receptores estimuladores, aumentan la reacción de intercambio de nucleótidos de guanosina. Esto ha sido establecido claramente para receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos en membranas de plaquetas y eritrocitos (Aktories y Jakobs, 1981), para prostaglandina E en membranas de adipocitos (Aktories y col., 1982), para somatostatina en membranas de células de linfoma cy<sup>c</sup> S49 (Jakobs y col., 1983) y para opiáceos en membranas de neuroblastona y glioma (Koski y Klee, 1981; Burns y col., 1983).

En todos estos sistemas la hidrólisis de GTP debida a la hormona inhibidora es aditiva a la hidrólisis de GTP causada por la acción de

la hormona estimuladora. Esta aditividad apoya en gran medida el hecho que las proteínas Ns y Ni sean proteínas diferentes e independientes una de otra en su regulación por GTP y el receptor hormonal.

6. Regulación de la unión de la hormona al receptor por nucleótidos de guanosina y  $Mg^{2+}$ .

Se ha visto que la unión de un ligando agonista produce la activación de la proteína Ns o de la proteína Ni y el antagonista bloquea este efecto. Estos hallazgos han hecho surgir la idea que los receptores deberían existir en dos estados, uno inactivo y otro activo. Los agonistas, bajo condiciones apropiadas, actuarían estabilizando la forma activa, mientras que los antagonistas favorecerían la formación de la forma inactiva. En membranas aisladas se ha visto que la capacidad de la hormona para activar el receptor y causar la activación de la adenililciclase está estrechamente relacionada con la presencia del ión  $Mg^{2+}$  y nucleótidos de guanosina. Las pruebas que vinculan la unión de la hormona al receptor con la unión del nucleótido de guanosina a la proteína Ns provienen de estudios realizados en membranas plasmáticas de hígado por Rodbell y col. (1971a). Estos autores analizando la interacción de una hormona radiactiva ( $^{125}I$ -glucagón) con su receptor en estas membranas, mostraron que GTP y GTP $\gamma$ S causan una reducción en la afinidad del receptor por el agonista, que es concomitante con la activación de la adenililciclase. Esta reducción en la afinidad del receptor por el agonista causada por la adición del nucleótido de guanosina ha sido observada en la mayoría de los sistemas de adenililciclase estudiados, indicando de esta manera que el

receptor puede acoplarse a la proteína Ns y la unión de la hormona al receptor sería reversible (Lefkowitz y col., 1976; Maguire y col., 1976). Es importante hacer notar que este efecto no ha sido posible de ver con antagonistas.

El ión  $Mg^{2+}$  al parecer es necesario para observar este efecto, ya que en ausencia de  $Mg^{2+}$  el GTP no produce la disociación del agonista desde el receptor y la adición de  $Mg^{2+}$  causa un aumento en la unión del agonista (Williams y col., 1978; Bird y Maguire, 1978).

Utilizando las adenililciclasa sensible a glucagón y agonistas  $\beta$ -adrenérgicos no se sabe aún como los nucleótidos de guanosina afectan la afinidad del ligando, pero los estudios realizados respecto al ión  $Mg^{2+}$  indican que posiblemente este catión induce la forma activa del receptor y por lo tanto con una gran afinidad por el agonista.

## 7. Efectos de otros reguladores de la actividad de la adenililciclasa.

### 7.1. Ión Fluoruro.

La adición de fluoruro de sodio (NaF) a membranas plasmáticas, activa a la adenililciclasa. El efecto de NaF no se observa en las membranas de células de linfoma cyc<sup>-</sup> S49 (carentes de la proteína Ns), pero se restablece al suplementar estas membranas con la proteína Ns purificada, indicando que la acción del ión  $F^-$  es a nivel de la proteína Ns. Recientemente se ha encontrado que el  $F^-$  requiere del ión aluminio ( $Al^{3+}$ ) para actuar (Sternweis y Gilman, 1982). La acción del ión  $F^-$  se asemeja a la de los análogos no hidrolizables de GTP, pues lleva a la proteína Ns a un estado de activación permanente y causa una disociación de la proteína Ns en sus componentes (Howlett y Gilman, 1980; Northup y col., 1983). No se sabe cual subunidad



de la proteína Ns interactúa con el ión  $F^-$ . Generalmente la activación de Ns por el ión  $F^-$  no requiere de nucleótidos de guanosina (Codina y col., 1984b), aunque en membranas de eritrocito de pavo es necesaria la presencia de GTP (Downs y col., 1980).

Actualmente se ha demostrado que el ión  $F^-$  también activa a la proteína Ni y causa su disociación en ausencia de nucleótidos de guanosina (Hildebrandt y col., 1982; Katada y col., 1984a). En presencia de nucleótidos de guanosina el ión  $F^-$  inhibe la actividad GTPásica de Ni, siendo este probablemente uno de los mecanismos por el cual el  $F^-$  activa a la proteína Ni (Sunyer y col., 1984).

## 7.2. Forskolina.

Este compuesto es un diterpeno extraído de la planta Coleus forskohlii, que activa todas las adenililciclasas hasta ahora estudiadas (Seamon y Daly, 1983). Esta activación es independiente de la presencia de la proteína reguladora Ns y se debe a la acción directa de este compuesto sobre la subunidad catalítica C. Las pruebas que apoyan esta idea provienen de estudios en los cuales la actividad de la adenililciclase de membranas de células de linfoma  $cyc^-$  S49 es activada por forskolina (Seamon y Daly, 1981).

También preparaciones de subunidad catalítica C provenientes de cerebro e hígado de conejo, exentas de las proteínas reguladoras Ns y Ni, son activadas por forskolina (Ross, 1982). Además, la subunidad catalítica C ha sido purificada por cromatografía de afinidad utilizando forskolina como ligando unido a la resina (Pfeuffer y Metzger, 1982), indicando con esto una interacción directa de la proteína C con forskolina.

## PROPOSITOS DE ESTA TESIS.

Como hemos visto en la INTRODUCCION y ha sido demostrado por Xavier Jordana (1982), la actividad de la adenililciclase presente en membranas plasmáticas de oocitos de Xenopus laevis es inhibida por la hormona esteroideal progesterona. El mecanismo por el cual se realiza esta inhibición no ha sido esclarecido aún.

De acuerdo con estos antecedentes los objetivos o propósitos de esta tesis están dirigidos principalmente a resolver esa interrogante a través de los siguientes planteamientos:

1. Profundizar la caracterización de la adenililciclase de oocitos, con el objeto de conocer más detalladamente este complejo sistema y facilitar de esta manera la comprensión de hallazgos posteriores.
2. Analizar directamente la presencia de los componentes reguladores Ns y Ni en las membranas de oocitos y estudiar su participación en la inhibición de la adenililciclase por la progesterona.

Producto de la investigación realizada para lograr estos objetivos, son los RESULTADOS que se presentan en esta tesis. Gran parte de ellos han sido publicados (Olate y col., 1983; Jordana y col., 1984; Olate y col., 1984; Olate y col., 1985).

## MATERIALES Y METODOS

### A. REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

3'AMP, cAMP, ADP, AMP.P(NH)P, colagenasa (tipo IA), 2'-desoxiadenosina, DTT, EDTA, EGTA, epinefrina, espermina, fosfo-diesterasa de nucleótidos cíclicos (corazón de bovino: 0,2 U/mg de proteína), fosfocreatina, fosfoenolpiruvato,  $\alpha$ -D(+)-glucosa, 3'GMP, GMP.P(NH)P, GTP, hexoquinasa (tipo C-301 de levadura), imidazol (grado I), -mercaptoetanol, mioquinasa (grado V de músculo de porcino), NEM, peryodato de sodio, piruvato-quinasa (tipo II de músculo de conejo) y seroalbúmina de bovino fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. 3-fosfogliceraldehído-deshidrogenasa (de levadura), L- $\alpha$ -fosfoglicerol-deshidrogenasa (de músculo de conejo), 5' guanosinamonofosfato-quinasa (de cerdo), lactato deshidrogenasa (de corazón de porcino), NAD<sup>+</sup> pirofosforilasa, nucleasa P<sub>1</sub>, 5'-nucleotidasa (de serpiente) piruvato-quinasa (de músculo de conejo), polinucleótido-quinasa (de *E. coli* infectada con fago T<sub>4</sub>), timidina, y fosfotriosa-isomerasa (de músculo de conejo) fueron obtenidas de Boehringer Mannheim. También fueron obtenidas de esta compañía NAD<sup>+</sup> y NMN. Forskolina, L- $\alpha$ - fosfoglicerol (grado A), creatina-fosfoquinasa (grado A de músculo de conejo) y progesterona fueron adquiridos en Calbiochem Behring Corp. Glicerol y sacarosa fueron obtenidos de J. T. Baker Chemical Corp. Trietilamina, alumina neutra, etanol, etilenglicol y placas

cromatográficas de polietilen-iminocelulosa de E. Merck A.G. Darnstadt. DEAE-Sephadex A-25, Sephadex G-10 y Sephadex G-25 se obtuvieron de Pharmacia Fine Chem. Dowex AG 50W-X4 (200-400 mallas) y Dowex AG1-X8 (200-400 mallas) Dowex 1-X4 de Bio Rad. Piruvato de sodio, polinucleótido-quinasa (de E. coli infectada con fago T<sub>4</sub>) fueron obtenidos de PL-Biochemicals. Sales inorgánicas (grado analítico) se obtuvieron de May and Baker, Mallinckrodt, Merck y Sigma.

[2,8-<sup>3</sup>H] cAMP, líquido de centelleo "Atomlight" y <sup>32</sup>Pi fueron obtenidos de New England Nuclear. <sup>32</sup>Pi también fue obtenido de la Comisión Chilena de Energía Nuclear. CAPP y otras fenotiazinas se obtuvieron del Psychopharmacology Research Branch, National Institute of Mental Health, NIH, Bethesda, Md., U.S.A. Calmodulina pura de cerebro de bovino es donación de la Dra. C. Klee, NIH, Md., U.S.A. Las proteínas puras reguladoras de la actividad de la adenililciclase, N<sub>s</sub> y N<sub>i</sub>, así como la toxina de Bordetella pertussis son donación del Dr. Lutz Birnbaumer, Baylor College of Medicine, Houston, Tx., U.S.A. La toxina del cólera se obtuvo de Schwartz-Mann.

Las hembras adultas de Xenopus laevis fueron adquiridas en South African Snake Farm, Cape Province, R.S.A. y mantenidas en tanques a 22° con períodos constantes y alternados de 12 horas de luz y oscuridad.

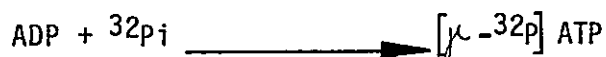
## B. PREPARACION Y PURIFICACION DE NUCLEOTIDOS.

### 1. Síntesis de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP.

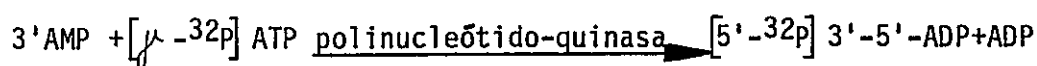
Se usó el procedimiento de Walseth y Johnson (1979). En este método tanto la síntesis de [<sup>32</sup>P] 5'AMP como su transformación en

$[\mu\text{-}^{32}\text{p}]$  ATP son enzimáticas, de acuerdo con las siguientes etapas y reacciones:

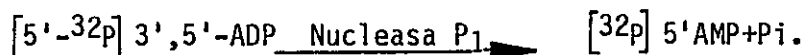
Etapa A) Síntesis de  $[\mu\text{-}^{32}\text{p}]$  ATP: ver esquema VII.



Etapa B) Fosforilación del 3'-AMP en posición 5'.



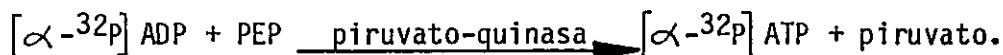
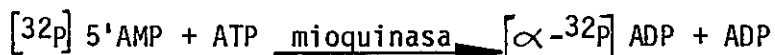
Etapa C) Eliminación de grupo fosfato de la posición 3'.



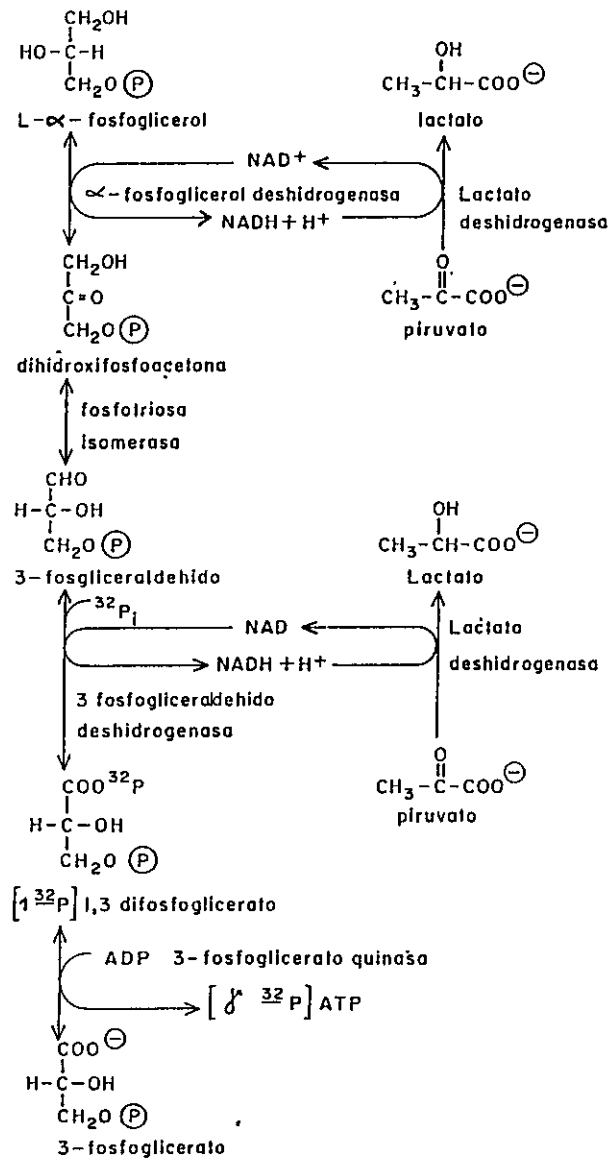
Etapa D) Eliminación del  $[\mu\text{-}^{32}\text{p}]$  ATP remanente que no reaccionó en la etapa B



Etapa E) Síntesis de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]$  ATP.



El procedimiento experimental era el siguiente: la solución ácida (HCl 2N) de  $^{32}\text{p}_i$  (50-100 mCi) se llevaba a pH 8,0-8,5 con NaOH 2N. La etapa A de síntesis de  $[\mu\text{-}^{32}\text{p}]$  ATP se realizaba incubando el  $^{32}\text{p}_i$  a



Esquema VI . Síntesis enzimática de  $[\mu\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ .

30° por una hora en un medio con la siguiente composición: Tris-HCl 80 mM, pH 9,0; DTT 10 mM;  $\alpha$ -L-fosfoglicerol 0,2 mM;  $\text{NAD}^+$  0,8 mM;  $\text{MgCl}_2$  20 mM; ADP 0,08 mM; piruvato de sodio 1,7 mM (recién preparado); fosfoglicerol-deshidrogenasa 14  $\mu\text{g/ml}$  (0,8 unidades); fosfotriosa-isomerasa 140  $\text{ng/ml}$  (0,7 unidades); 3-fosfogliceraldehído-deshidrogenasa 14  $\mu\text{g/ml}$  (1,1 unidades); 3-fosfoglicerato-quinasa 1,4  $\mu\text{g/ml}$  (0,6 unidades) y lactato-deshidrogenasa 7  $\mu\text{g/ml}$  (3,5 unidades). El volumen final de reacción era de aproximadamente 1,0 ml. Las enzimas nombradas anteriormente suspendidas en sulfato de amonio se mezclaban previamente en la proporción adecuada y se centrifugaban a 1.000 x g por diez minutos. El residuo se resuspendía en Tris-HCl 50 mM, pH 9,0; DTT 1 mM y se adicionaba a la mezcla de reacción. Esta se detenía por calentamiento a 100° durante dos minutos. Luego se agregaban 40  $\mu\text{l}$  de espermina 0,1 M, 60  $\mu\text{l}$  de 3'-AMP 50 mM, 30 unidades de polinucleotido-quinasa (10  $\mu\text{l}$ ) y se incubaba la mezcla por 6 horas y media a 35° (etapa B). A continuación se agregaban 50  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de acetato de sodio 1M pH 5,5 y 50  $\mu\text{l}$  de nucleasa  $\text{P}_1$  (50 unidades) y se incubaba la mezcla por una hora a 33° (etapa C). La reacción se detenía por calentamiento a 100° durante dos minutos. Se agregaban luego 20  $\mu\text{l}$  de glucosa 60 mM y 6  $\mu\text{l}$  de hexoquinasa (2 unidades) y se incubaba a 35° por una hora (etapa D). Para la última etapa (etapa E), se mezclaban 15 unidades de piruvato-quinasa y 120 unidades de mioquinasa. Ambas enzimas suspendidas en sulfato de amonio se centrifugaban a 1.000 x g durante diez minutos y el residuo se resuspendía en una mezcla que contenía 40  $\mu\text{l}$  de KCl 2M; 75  $\mu\text{l}$  de PEP

0,1 M; 2  $\mu$ l de ATP 40,8 mM; 75  $\mu$ l de Tris-HCl 1 M, pH 7,4; y 100  $\mu$ l de agua bidestilada. Esta mezcla se agregaba a la mezcla total de reacción y se incubaba a 35° durante una hora (etapa E). La reacción se detenía por calentamiento a 100° durante dos minutos. Este procedimiento permite obtener entre un 70-80% de radioactividad incorporada al ATP.

## 2. Purificación de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP.

El [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP sintetizado por el método descrito anteriormente se purificaba por cromatografía en una columna de DEAE-Sephadex A-25 (15 cm de altura por 0,8 cm de diámetro) previamente equilibrada con NaHCO<sub>3</sub> y lavada con agua bidestilada. La columna se eluía con un gradiente continuo de bicarbonato de trietilamina, pH 7,5 entre 0 y 1 M (volumen total de 200 ml). Se colectaban fracciones de aproximadamente 6 ml. Se colocaba una alícuota (1  $\mu$ l) de cada fracción sobre un filtro de fibra de vidrio, los filtros se secaban y contaban en un contador de centelleo líquido con 3 ml de mezcla de centelleo Atomlight. Se juntaban las fracciones correspondientes al último pico de radioactividad, las cuales contienen el [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP (este eluye a concentración de bicarbonato de trietilamina de 0,60 a 0,75 M), y se llevaban a sequedad en un evaporador rotatorio. El residuo se resuspendía en 5 ml de metanol y se llevaba nuevamente a sequedad. Este proceso se repetía dos veces y finalmente el [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP se resuspendía en un volumen apropiado de agua bidestilada. El producto final contenía alrededor de un 96% de la radioactividad en ATP, 2 a 3% en ADP y un 1% en AMP.



### 3. Análisis y pureza radioactiva de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP.

La determinación de la pureza radioactiva de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP, del rendimiento de la incorporación de radioactividad en ATP y la caracterización del compuesto presente en cada una de las etapas de la síntesis y en los picos radiactivos de la cromatografía en DEAE-Sephadex A-25 se realizaban usando cromatografía ascendente en placas de polietileno-iminocelulosa. Se realizaba una primera corrida hasta 6 cm del origen usando como solvente formiato de sodio 2 M, pH 3,5 y luego una segunda corrida hasta 20 cm del origen usando como solvente formiato de sodio 4 M, pH 3,5. Las posiciones de los patrones de AMP, ADP, ATP, 3'-AMP y 3',5'-ADP se determinaban exponiendo la placa a radiación de luz ultravioleta de onda corta. La radiactividad asociada a cada trozo del cromatograma se analizaba colocando cada trozo seco en 3 ml de la mezcla de centelleo y usando un contador de centelleo líquido. Este método permitía obtener una buena separación de los nucleótidos en aproximadamente 1,5 horas. Las distancias relativas de migración de los patrones ( $R_f$ ) eran de aproximadamente 0,30 a 0,35 para el ATP; 0,5 a 0,6 para el ADP y el 3',5'-ADP; 0,70 para el 3'AMP y 0,75 a 0,80 para el 5'-AMP.

### 4. Purificación del ATP no radioactivo.

El requerimiento de nucleótidos de guanosina trifosfatos en la activación como en la inhibición de la adenililciclase por hormonas o neurotransmisores ha llevado a tomar precauciones en el uso de ATP comercial, debido a la contaminación de este por nucleótidos de guanosina. Es importante entonces purificar el ATP comercial y eliminar nucleótidos de guanosina contaminantes en las preparaciones de

membranas o en los sistemas regeneradores de ATP (Kimura y Nagata, 1977; Birnbaumer y col., 1979; Iyengar y col., 1980).

Todo el ATP utilizado en esta tesis fue purificado por cromatografía en DEAE-Sephadex A-25 de acuerdo a la técnica descrita por Birnbaumer y col., (1979) con algunas modificaciones y que se detalla a continuación. El ATP (100  $\mu$ moles, sal disódica de músculo de equino) se neutralizaba con NaOH 2N y se colocaba en una columna de DEAE-Sephadex A-25 (16 cm de altura por 1,7 cm de diámetro) equilibrada con bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) y lavada con agua bidestilada. Los nucleótidos se eluían con un gradiente lineal de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  entre 0 y 1 M, se recogían fracciones de 6 ml y se determinaba en ellas la absorción a 260 nm, conductividad y naturaleza del nucleótido. Las fracciones con una absorción mayor que 1,0 se juntaban y se liofilizaban. El residuo seco se resuspendía en 15 ml de agua bidestilada y se evaporaba a sequedad en un evaporador rotatorio. Se repetía 5 veces esta operación y el ATP purificado se resuspendía en un volumen adecuado de agua bidestilada para obtener una solución aproximadamente 40 mM. La concentración de ATP se determinaba espectrofotométricamente utilizando para ello el coeficiente de extinción molar de  $15,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}/\text{cm}$  a pH 7,0.

##### 5. Purificación del sistema regenerador de nucleótidos trifosfatos.

a) Fosfocreatina. Se agregaba 50 mg de carbón activado y la mezcla se agitaba (cada 1 minuto) durante 10 minutos a 4°. El carbón activado se removía por centrifugación en frío durante 10 minutos a 15.000 rpm. El sobrenadante se filtraba utilizando papel filtro Whatman N°2 y finalmente el compuesto se recuperaba por liofilización.

b) Creatina-fosfoquinasa. La enzima era purificada por filtración en columna de Sephadex G-25 (5 cm de altura por 1,5 cm de diámetro). La columna era lavada con 25 ml de agua bidestilada a 4°. 2,5 ml de la enzima (10 mg/ml, exenta de sulfato de amonio por centrifugación) era aplicada a la columna. Se eluía con 3,5 ml de agua bidestilada y la proteína era obtenida en este volumen. Finalmente se determinaba la concentración de proteínas y se preparaba una solución de sistema regenerador cinco veces concentrada (5X) que contenía fosfocreatina 20 mM y 2 mg/ml de creatina-fosfoquinasa.

#### 6. Síntesis y purificación de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP.

El  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  GTP se sintetizaba por el mismo procedimiento descrito anteriormente para la síntesis del  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP (etapa A) pero en este caso se utilizaba GDP en vez de ADP. La purificación del nucleótido se realiza por el método descrito para el  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP.

#### 7. Síntesis y purificación de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP.

El  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  GTP se sintetizaba generalmente a partir de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP utilizando las mismas etapas descritas anteriormente para la síntesis de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP pero con las siguientes variaciones: en la etapa B se utilizaba 3'GMP en vez de 3'AMP y en la etapa E se utilizaba 5' guanosina monofosfato-quinasa en vez de mioquinasa. El resto de las condiciones eran idénticas. La purificación del nucleótido se realizaba por el método ya descrito.

#### 8. Síntesis y purificación de $\text{GDP}_{\text{ox}}$ y $\text{GTP}_{\text{ox}}$ .

Se utilizó el método de Easterbrook-Smith y col., (1976). El procedimiento era el siguiente: se solubilizaba 0,1 mmol del nucleótido respectivo (GDP o GTP) en 1,5 ml de agua bidestilada y se llevaba a pH

8,2 con NaOH 2N. Se agregaba a la solución 0,11 mmoles de peryodato de sodio y después de 2 horas a 4° y en la oscuridad se detenía la reacción agregando un exceso de etilenglicol (10 µl de una solución concentrada). La mezcla se colocaba en una columna de Sephadex G-10 (100 cm de largo por 1 cm de diámetro) previamente lavada y equilibrada con agua bidestilada. La columna se eluía con agua bidestilada, se colectaban fracciones de 1 ml y se determinaba en cada una de ellas la absorción a 258 nm y presencia del ión yodato. Para ello se mezclaba 1 gota de cada fracción con 1 gota de una solución de KI al 5% y una gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6N. Las fracciones contaminadas con el ión yodato presentaban un color café después de la reacción y eran descartadas. El resto de las fracciones con una absorción mayor que 1,0 se juntaban y liofilizaban. El residuo seco se resuspendía en un volumen adecuado de agua bidestilada y la concentración de GDPox y GTPox se determinaba espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción molar de  $14,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}/\text{cm}$  a pH. 7,0. La pureza de los análogos se determinaba por cromatografía en placas de polietilen-iminocelulosa utilizando como solvente cloruro de litio 1,2 M.

#### 9. Síntesis y purificación de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{GTPox}$ .

La síntesis y purificación de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{GTPox}$  se realizaba por el procedimiento descrito anteriormente para el nucleótido frío, utilizando como nucleótido inicial para la síntesis  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{GTP}$ .

#### 10. Síntesis y purificación de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{NAD}^+$ .

Para la síntesis de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{NAD}^+$  se utilizó el método descrito por Cassel y Pfeuffer, (1978). Con este procedimiento se preparaba

NAD<sup>+</sup> marcado con <sup>32</sup>Pi en la parte de la molécula correspondiente al AMP a partir de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP y NMN utilizando la enzima NAD<sup>+</sup>-pirofosforilasa. La mezcla de reacción contenía: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP (150 mCi/mmol) 80 mM; NMN 20 mM; NAD<sup>+</sup>-pirofosforilasa (0.48 unidades/ml); MgCl<sub>2</sub> 2 mM; 50  $\mu$ l de sistema regenerador 5X y amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,4. La mezcla se incubaba 5 minutos a 37° y se colocaba en una columna de Dowex AG1-X8 (4 cm de largo por 0,8 cm de diámetro) equilibrada con agua bidestilada. La elución se realizaba primeramente con ácido fórmico 0,01 N (2 veces con 2 ml), con lo cual eluía el NMN y posteriormente con ácido fórmico 0,1 N (8 veces con 1 ml). Estas últimas 8 fracciones que contenían el [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] NAD eran evaporadas a sequedad y se resuspendían en 1 ml de agua bidestilada. El rendimiento generalmente era de un 80-90% y la preparación era de una pureza de 95-98% analizada por cromatografía en placas de polielileniminocelulosa. Como solvente para la cromatografía se usaba NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,15 M y los R<sub>f</sub> eran de 0,54 para el NAD<sup>+</sup>; 0,30 para el AMP; 0,10 para el ADP y 0,34 para ADP-ribosa.

### C. PREPARACION DE MEMBRANAS PLASMATICAS DE OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS Y DE CELULAS FOLICULARES CON ACTIVIDAD ADENILILCICLASA.

#### 1. Obtención de ovario de Xenopus laevis.

Hembras adultas se anesthesiaban por hipotermia a 4°, el ovario se extraía quirúrgicamente y se cortaba en pequeños trozos. Los trozos de ovario se lavaban con una solución salina de Barth para anfibios y se mantenían en esta solución a 4°. La composición de la solución Barth era: Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; MgSO<sub>4</sub> 0,82 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,74 mM; KCl 1,0 mM; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,33 mM; NaCl 88 mM; NaHCO<sub>3</sub> 2,4 mM, penicilina 0,1 mM

y sulfato de estreptomicina 0,1 mM.

## 2. Obtención de oocitos y células foliculares.

Los oocitos desfoliculados y las células foliculares se obtuvieron por el procedimiento enzimático.

Trozos pequeños de ovario (10-15 oocitos) se incubaban en un volumen final de 50 ml con agitación suave a 25° durante tres horas en una solución que contenía: CaCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 110 mM, Hepes 10 mM pH 8,0 y 2 mg/ml de colagenasa. El tejido ovárico se lavaba exhaustivamente con solución Barth para eliminar la colagenasa y se disociada dejando oocitos libres y células foliculares en suspensión. Los oocitos de diferentes tamaños eran separados con la ayuda de mallas de nylon (Nitex) (Burzio y Koide, 1977). Los oocitos de más de 700 µm de diámetro que eran filtrados con la malla de 700 µm correspondían a los estados IV, V y VI descritos por Dumont (1972). Posteriormente se separaban manualmente los oocitos de estado IV (700 a 900 µm de diámetro) de los oocitos de estado V y VI (1.000 a 1.300 µm de diámetro). En todos los experimentos sólo se utilizaron los oocitos de estado V y VI.

Las capas de células foliculares se removían de la suspensión inicial (aprovechando que sedimentaban más lentamente que los oocitos) y se concentraban por centrifugación a 1.000 x g por diez minutos.

## 3. Fraccionamiento celular.

Todas las manipulaciones se realizaban a 4°. Los oocitos se homogeneizaban en un volumen de una solución que contenía: Hepes 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; DTT 1 mM y sacarosa 0,88 M (solución A). La homogeneización se llevaba a cabo en un homogeneizador Dounce, con 10

pasadas del vástago A y 10 pasadas del vástago B. El homogeneizado se centrifugaba por 15 minutos a 1.000 x g. El sobrenadante se filtraba a través de lana de vidrio y el filtrado se centrifugaba por 20 minutos a 20.000 x g. El sobrenadante se filtraba nuevamente a través de lana de vidrio y el filtrado se centrifugaba por dos horas a 100.000 x g. En esta última centrifugación se obtenían 3 fracciones: un sedimento bien adherido al fondo del tubo, una fracción de aspecto "algodonoso" por encima del sedimento y un sobrenadante transparente. La fracción "algodonosa" se diluía a 0,22 M sacarosa con una solución que contenía: Hepes 50 mM pH 8,0; EDTA 1 mM; DTT 1 mM (solución B) y se centrifugaba nuevamente por dos horas a 100.000 x g. Bajo estas nuevas condiciones se obtenía un sedimento adherido al fondo del tubo y un sobrenadante. Finalmente el sedimento se resuspendía en la solución C que contenía: Hepes 50 mM, pH 8,0; DTT 1 mM; EDTA 1 mM y sacarosa 0,22 M a una concentración de proteína entre 15 a 20 mg/ml y se guardaba en volúmenes de 300 a 400  $\mu$ l a  $-80^{\circ}$  hasta su uso.

Las células foliculares obtenidas por centrifugación a 1.000 x g se homogeneizaban en 10 volúmenes de solución A. La homogeneización se llevaba a cabo de manera idéntica a la descrita anteriormente para los oocitos. El homogeneizado se centrifugaba por 15 minutos a 1.000 x g. El sobrenadante se diluía a una concentración de 0,44 M sacarosa con solución B y se centrifugaba por 20 minutos a 20.000 x g. El sobrenadante se centrifugaba por 2 horas a 100.000 x g obteniéndose un sedimento y un sobrenadante. Los sedimentos se resuspendían en la solución C y se almacenaban en condiciones idénticas a las descritas anteriormente.

#### D. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ADENILILCICLASA.

La actividad adenililciclase se ensayaba generalmente en triplicado por el procedimiento descrito por Rodbell (1967). La actividad de diferentes fracciones se medía en una mezcla de reacción con un volumen final de 0,1 ml, que contenía: Hepes 50 mM, pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> o MnCl<sub>2</sub> 5 mM; cAMP 1 mM; DTT 1 mM; fosfocreatina 4 mM; creatinafosfoquinasa 0,4 mg/ml (6,6 unidades); EDTA 0,45 mM; glicerol al 5% (v/v); [ $\alpha$ -<sup>32</sup>p] ATP 0,10-0,12 mM (300-1.200 cpm/pmol). NaF, EGTA, GMP.P(NH)P, CAPP, forskolina y progesterona se agregaban a las concentraciones indicadas en RESULTADOS. Cuando se usaba progesterona, forskolina y CAPP, estas se preparaban en una solución de etanol y todas las incubaciones controles contenían la misma cantidad de etanol.

Generalmente se iniciaba la reacción con la adición de la fracción enzimática (50 a 300  $\mu$ g de proteínas). Las incubaciones se realizaban por 20 a 30 minutos a 32°, excepto en los casos indicados en el capítulo RESULTADOS. La reacción se detenía con la adición de 0,1 ml de una solución que contenía ATP 20 mM y <sup>3</sup>H cAMP 6,25 mM (20.000 cpm/umol), pH 7,0; seguida de un calentamiento a 100° durante 3 minutos. El [<sup>32</sup>p] cAMP formado se purificaba siguiendo el procedimiento de cromatografía secuencial en columnas de Dowex 50 y alúmina neutra descrito por Salomon y col., (1974).

Las muestras, después de agregarles 1 ml de agua bidestilada, se colocaban en columnas de Dowex 50-X4 (4 cm de altura por 0,5 cm de diámetro) previamente lavadas con HCl 2N y agua bidestilada. Las columnas se lavaban luego en dos etapas, primero con 1 ml y luego con



4 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada, descartándose los eluidos. Posteriormente se pasaban 6 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada, recogiendo los eluidos directamente sobre columnas de alúmina neutra (3 cm de altura por 0,5 cm de diámetro) previamente equilibradas con una solución de imidazol-HCl 0,1 M, pH 7,5. Una vez pasados los 6 ml por la alúmina, las columnas se lavaban con 1,5 ml de la solución anterior y luego el cAMP se eluía con 4 ml de la misma solución. Los eluidos de 4 ml se recogían en frascos de centelleo líquido y la radiactividad de <sup>32</sup>P y <sup>3</sup>H se determinaba en 12 ml de líquido de centelleo Atomlight.

El [<sup>3</sup>H] cAMP incluido como patrón interno permitía calcular la recuperación de cAMP después del procedimiento a través de las columnas. Estas recuperaciones oscilaban entre un 70 y un 80%. En cada experimento se determinaba también que porcentaje del producto aislado por esta cromatografía secuencial era [<sup>32</sup>P] cAMP. Para ello se trataba el producto con fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos y sólo las cpm de <sup>32</sup>P que desaparecían eran consideradas cpm originadas por [<sup>32</sup>P] cAMP. Las cpm resistentes a este tratamiento no sobrepasaban el 2% de las cpm totales recuperadas y estos valores eran utilizados como blanco. El procedimiento era el siguiente: una vez detenida la reacción de la adenililciclase se agregaban 5 µl de HEPES 1 M, pH 8,0; 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 0,1 M y 5 µl de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (10 mg/ml; 0,01 unidades) y se incubaba a 30° por dos horas. La reacción se detenía de igual forma que para la reacción de la adenililciclase. A los tubos se agregaban 0,9 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada y las muestras eran procesadas a través de columnas Dowex 50 y alúmina neutra como ya se describió anteriormente.

El cálculo de los pmoles de cAMP formados se hacía a base de los datos de actividad específica del  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP utilizado como sustrato, a las cpm de  $[\text{}^{32}\text{P}]$  cAMP y a la recuperación de  $[\text{}^3\text{H}]$  cAMP en cada una de las muestras.

Los resultados de las determinaciones de la actividad de adenililciclase generalmente incluye el período de retardo y se realizan en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (5-10 mM). La actividad enzimática varía de una preparación de membrana a otra. El tiempo de almacenamiento a  $-80^\circ$  y el proceso de congelamiento y descongelamiento a que ellas son sometidas también afectan la actividad enzimática de una misma preparación de membrana.

El rango de actividad adenililciclase generalmente varía entre 3 pmoles (actividad basal) a 160 pmoles (en presencia de efectores) de cAMP formados por mg de proteína en 20 a 30 minutos a  $32^\circ$ .

Los resultados de las determinaciones de la actividad de la adenililciclase se expresan en general como promedio de triplicados.

#### E. PREPARACION DE FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS DE OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS ACTIVADA POR $\text{CaM-Ca}^{2+}$ .

Se preparaba la enzima utilizando el método descrito por Echeverría y col., (1981).

Los oocitos (estado VI) se homogeneizan suavemente usando un homogeneizador Dounce con 5 volúmenes de buffer de extracción que contenía: Hepes 50 mM, pH 7,5;  $\text{MgCl}_2$  5 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol, 3 mM; EDTA 0,1 mM y EGTA 0,1 mM. El homogeneizado se centrifugaba a 20.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante era diluido 5 veces y aplicado a una columna de celulosa DE-52 (7 cm de largo por 0,8 cm de diámetro)

equilibrada con el buffer de extracción pero conteniendo Hepes 10 mM, pH 7,5 y eluida con un gradiente salino lineal (0 a 1 M acetato de sodio). Se colectaban fracciones de 0,5 ml y se les determinaba actividad fosfodiesterasa en ausencia y en presencia de CaM-Ca<sup>2+</sup>. Aquellas fracciones que presentaban la máxima diferencia de actividad bajo las dos condiciones anteriores eran juntadas y guardadas a -80°.

#### F. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS DE MEMBRANAS DE OOCITOS.

Se utilizó el método descrito por Thompson y col., (1974). En este procedimiento se utilizaba como sustrato el [8-<sup>3</sup>H] cAMP en una concentración final de 5 µM (38 Ci/mmol).

La medición de la actividad enzimática se realizaba en 200 µl de una mezcla de reacción que contenía: Hepes, 10 mM pH 7,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; β-mercaptoetanol 3 mM; [<sup>3</sup>H] cAMP 5 µM (38 Ci/mmol) y membranas en una concentración de 110 µgr.

La medición de la actividad basal de la enzima se realiza en presencia de EGTA 1 mM, en cambio la determinación de la actividad en presencia de CaM-Ca<sup>2+</sup> se realizaba en presencia de calmodulina purificada a homogeneidad de cerebro de bovino en una concentración final de 5,0 x 10<sup>-5</sup> M y de CaCl<sub>2</sub> 50 µM.

La reacción se comenzaba generalmente por la adición del sustrato, siendo el tiempo de incubación de 20 minutos a 30°. La reacción se detenía colocando la mezcla a 100° durante 90 segundos y luego de enfriar los tubos a 4°, se agregaban 24 µl de 5'-nucleotidasa (2,0 mg/ml) y se incubaba por 10 minutos a 30°. Esta segunda reacción se detenía agregando 1 ml de etanol. Alícuotas de 0,5 ml o 1 ml eran

aplicadas a columnas de Dowex 1-X4 (2 cm de altura por 0,5 cm de diámetro) previamente equilibradas con HCl 0,1 N y lavadas con H<sub>2</sub>O bidestilada. La adenosina formada por acción de la 5'-nucleotidasa era eluida de la columna agregando 1,5 ml de metanol. El eluido se recogía en 12 ml de líquido de centelleo Atomlight y se contaba en un contador de centelleo líquido. Para los blancos se utilizaba la fracción de membranas hervidas.

#### G. TRATAMIENTO DE LAS MEMBRANAS DE OOCITOS CON TOXINA DEL COLERA Y TOXINA DE BORDETELLA PERTUSSIS.

Este tratamiento consta de dos etapas: activación de las toxinas y posterior ADP-ribosilación de las membranas con la toxina activada en presencia de NAD<sup>+</sup> o [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] NAD<sup>+</sup>.

##### 1. Activación de la toxina del cólera.

5 mg de toxina se resuspendieron en 1 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada. Esta solución se distribuyó en volúmenes de 20  $\mu$ l y se guardó a -80°. Para la activación de la toxina se mezclaba 20  $\mu$ l de la toxina con 20  $\mu$ l de DTT 80 mM, se incubaba 20 minutos a 32° y finalmente se agregaba a la mezcla de incubación 360  $\mu$ l de una solución que contenía 150  $\mu$ g/ml de BSA.

##### 2. ADP-ribosilación de las membranas por toxina del cólera.

60-150  $\mu$ g de proteínas se incubaban durante 30 minutos a 32° en un volumen final de 60  $\mu$ l que contenía: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] NAD<sup>+</sup> 10  $\mu$ M (300 Ci/mol); ATP 1 mM; GTP 0,5 mM timidina 15 mM; DTT 5 mM; EDTA 1 mM y 20  $\mu$ l (82  $\mu$ g/ml) de toxina del cólera activada. La reacción era detenida por adición de 1 ml de TCA frío al 20%, seguido de una centrifugación a 3.000 cpm por 30 minutos. Los sedimentos se lavaban con 1,5

ml de dietileter anhidro a 4° para remover el TCA remanente.

### 3. Activación de la toxina de Bordetella pertussis.

6 µg de la toxina liofilizada se resuspendían en 1 ml de una solución que contenía: 20 mM DTT y 150 ug/ml de BSA. La mezcla se incubaba 30 minutos a 32° y finalmente se distribuía en volúmenes de 100 µl y se guardaba a -80°.

### 4. ADP-ribosilación de las membranas por toxina de B. pertussis.

El procedimiento utilizado era similar al descrito anteriormente para la toxina del cólera pero con las siguientes variaciones: se utilizaba  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{NAD}^+$  1 µM (300 Ci/mmol), amortiguador fosfato 100 mM pH 7,5 necesario para la acción de esta toxina y 1,7 µg/ml de toxina activada (20 µl). En algunos experimentos se realizaba una preincubación de 90 min de las membranas en presencia de  $\text{NAD}^+$  1 mM no radioactivo con el objeto de saturar los sitios susceptibles a ADP-ribosilación en una segunda incubación con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{NAD}^+$ .

### H. TRATAMIENTO DE LAS MEMBRANAS DE OOCITOS CON GTPox Y $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{GTPox}$ .

Las membranas (15-25 mg/ml), previamente lavadas 3 veces con amortiguador fosfato 50 mM pH 8,0; DTT 1 mM, y EDTA 1 mM, eran incubadas a 30°C en un medio de reacción idéntico al utilizado para la determinación de actividad de la adenililciclase excepto que el amortiguador usado era fosfato 50 mM, pH 8,0. Las diferentes condiciones de la incubación (tiempo, preincubaciones, etc.) así como las concentraciones de GTPox,  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{GTPox}$  y  $\text{GTPox}$  utilizadas son indicadas en las respectivas figuras en la sección RESULTADOS. La reacción se detenía por la adición de borohidruro de sodio y por dilución con

amortiguador Hepes 50 mM pH 8,0. Las muestras eran centrifugadas, el sedimento lavado 3 veces con el mismo amortiguador y finalmente era resuspendido a la misma concentración de proteínas inicial. Finalmente se determinaba la actividad adenililciclase a estas membranas en presencia de diferentes efectores de esta enzima o las membranas eran sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida.

#### I. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS.

El análisis electroforético de las proteínas de membrana ADP-ribosiladas en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}] \text{NAD}^+$  o tratadas con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}] \text{GTPOx}$  era realizado en geles de poliacrilamida al 10-12% (razón acrilamida: bis-acrilamida = 100:2,6) de acuerdo al método de Laemmli (1970). Previamente a la electroforesis, las muestras eran llevadas a una concentración de 30% de etilenglicol,  $\beta$ -mercaptoetanol 20  $\mu\text{M}$  y NaCl 100 mM y precipitadas por la adición de 9 volúmenes de acetona fría. Las proteínas precipitadas eran resuspendidas en el amortiguador para muestras descrito por Laemmli (1970) que contenía: SDS al 1% y pironina Y al 0,02% como colorante e incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora. La electroforesis se realizaba a temperatura ambiente a un voltaje constante de 100-150 V (aproximadamente 30 mA de corriente inicial). Para el cálculo de los pesos moleculares de las proteínas se usaban como patrones las siguientes proteínas (Bio Rad): fosforilasa (P.M.=94.000), BSA (P.M.=67.000), ovoalbúmina (P.M.=43.000), anhidrasa carbónica (P.M.=30.000) y el inhibidor de tripsina (P.M.=20.000). Las proteínas patrones se preparaban para la electroforesis disolviéndolas en el amortiguador de muestras de Laemmli y calentándolas a 100° por 3 minutos.

Una vez terminada la electroforesis los geles eran teñidos en una solución que contenía ácido acético: metanol: agua bidestilada (1:5:5) y azul brillante de coomasie al 0,1% durante 6 horas. Los geles eran desteñidos en una solución de ácido acético al 10%, secados y finalmente sometidos a autoradiografía a  $-80^{\circ}$  durante 1-5 días, utilizando para ello papel fotográfico Kodak XR-5.

#### J. CALCULO DE PARAMETROS CINETICOS EN LA ACTIVACION DE LA ADENILILCICLASA.

La evaluación de los parámetros cinéticos se realizó de acuerdo al método descrito por Neet y Ainslie (1980), utilizando el método gráfico. La figura 1 muestra como se obtienen estos valores a partir de una curva de progreso para una enzima histerética que presenta una fase retardada.

La velocidad en régimen estacionario  $V_{ss}$  se calcula de la pendiente de la curva en su parte recta. La constante de velocidad aparente de primer orden ( $\tau_{ap}$ ), con la cual se alcanza el estado estacionario desde una velocidad inicial ( $V_i$ ) a una velocidad en estado estacionario ( $V_{ss}$ ), se calcula mediante la ecuación:

$$\tau_{ap} = \frac{V_{ss}}{\text{intersección en el eje producto}}$$

y el valor del tiempo medio de activación ( $t_{1/2}$ ) de la enzima a partir de la ecuación:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\tau_{ap}}$$

#### K. DETERMINACION DE PROTEINAS.

La concentración de proteínas presentes en las membranas de oocitos era determinada por el método descrito por Lowry y col.(1951), usando BSA como patrón.



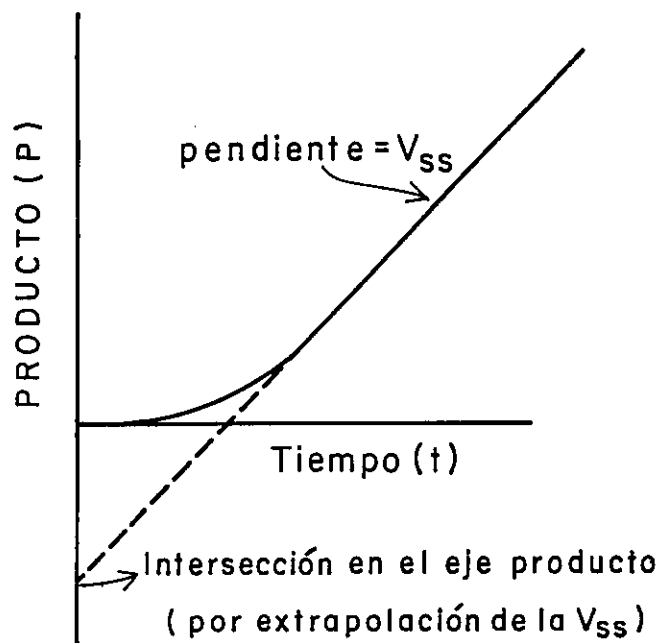


Figura 1. Curva de progreso de una enzima histerética que presenta una fase retardada, o período de latencia.  $V_{ss}$ =velocidad en régimen estacionario.

## RESULTADOS

### A. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS DE LA ADENILILCICLASA DE OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS.

La información contenida en la primera parte de esta tesis es una continuación de los estudios realizados por Xavier Jordana en su tesis de doctorado (Jordana, 1982) y tiene por objeto profundizar la caracterización de la adenililciclase de oocitos unida a membrana y su inhibición por la progesterona.

#### 1. Efecto de forskolina en la adenililciclase de oocitos y en la inhibición por progesterona.

Como se vió en la INTRODUCCION y fue demostrado por Jordana (1982), la adenililciclase de oocitos de anfibio se asemeja bastante a la adenililciclase presente en membranas de células de mamífero. La enzima de oocito puede ser estimulada por una serie de efectores que actúan a través de la proteína reguladora que media la activación de la adenililcilasa (Ns), pero poco se conoce acerca de la subunidad catalítica C de la enzima.

Con estos antecedentes, ha sido interesante estudiar el efecto de forskolina en el sistema de oocito. Este diterpeno caracterizado recientemente, activa a la adenililciclase de mamíferos en ausencia de nucleótidos de guanosina y lo hace fundamentalmente a través de la subunidad catalítica de la enzima (Seamon y Daly, 1983).

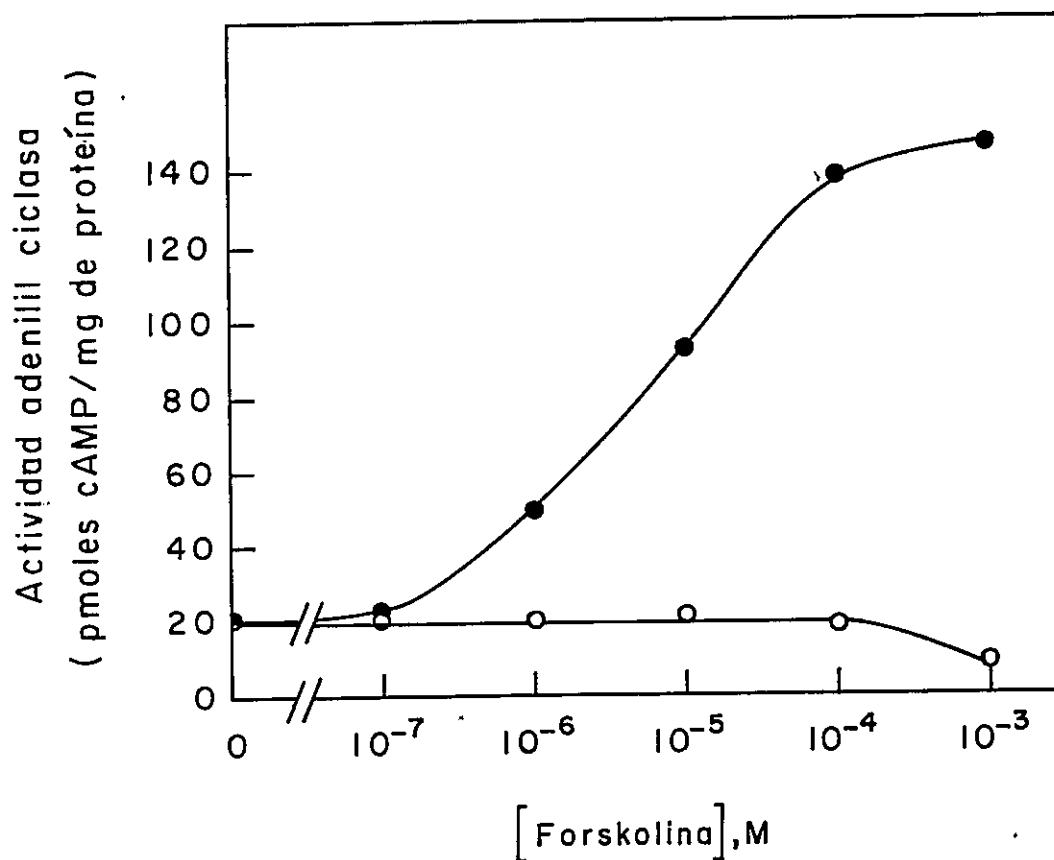


Figura 2. Efecto de forskolina en la actividad de la adenililciclasa de oocitos.

La formación de cAMP se midió en triplicado como está descrito en Materiales y Métodos, en presencia de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP 0,1 mM (325 cpm/pmol) y de las concentraciones de forskolina indicadas en la figura (●). La curva control (○) contiene los mismos componentes excepto que en vez de forskolina contienen la misma concentración de etanol. La reacción se inició con la adición de la enzima (1,5 mg de proteína/ml de medio de incubación) y se continuó por 20 minutos a 32°.

TABLA 1

Efecto de forskolina en la adenililciclase de oocitos.

Adición al ensayo	Actividad adenililciclase (pmoles cAMP/mg de proteína)
ninguna	14
forskolina 1 $\mu$ M	42
forskolina 10 $\mu$ M	79
forskolina 100 $\mu$ M	102
GMP.P(NH)P 25 $\mu$ M	173
GMP.P(NH)P 25 $\mu$ M + forskolina 100 $\mu$ M	263

La formación de cAMP se midió en triplicado como está descrito en Materiales y Métodos, en presencia de [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP 0,1 mM (349 cpm/pmol) y de los efectores indicados en la tabla. La reacción se inició con la adición de la enzima (1 mg de proteína/ml de medio de incubación) y se continuó por 25 minutos a 32°. Las actividades se expresan en pmoles de cAMP formado por mg de proteína, en 25 minutos.

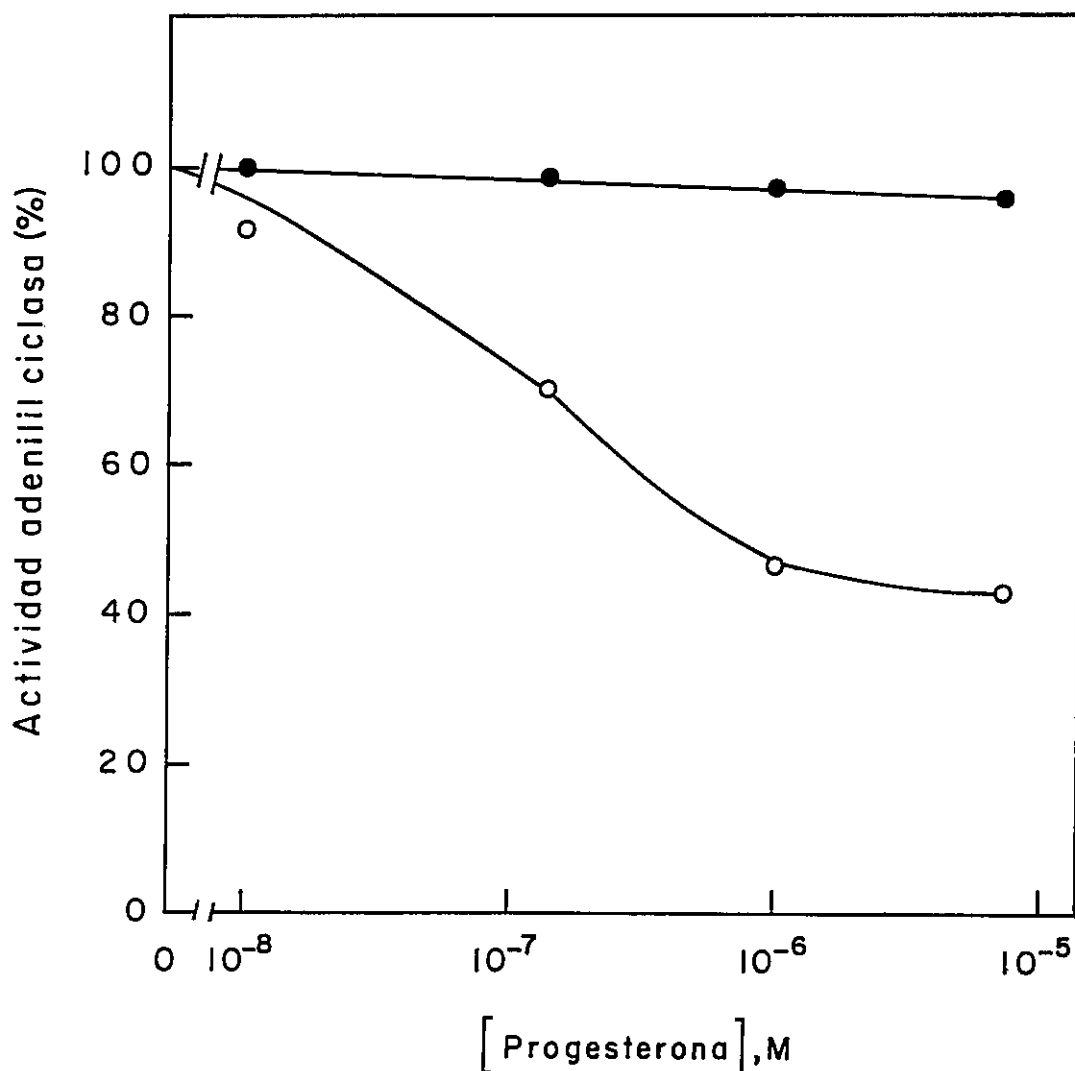


Figura 3. Efecto de progesterona en la activación de la adenililciclasa por forskolina y GMP.P(NH)P.

La formación de cAMP se midió en triplicado como está descrito en Materiales y Métodos en presencia de [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP 0,1 mM (607 cpm/pmol), forskolina 150  $\mu$ M (●) o GMP.P(NH)P 25  $\mu$ M (○). La reacción se inició con la adición de la enzima (1 mg de proteína/ml de medio de incubación). Las actividades están expresadas como porcentajes de la actividad medida en ausencia de progesterona (70,3 pmoles de cAMP/mg de proteína para forskolina y 60,8 pmoles de cAMP/mg de proteína para GMP.P(NH)P).

Se analizó inicialmente el efecto de concentraciones crecientes de forskolina en la actividad de la adenililciclase. Los resultados se muestran en la figura 2. Se observa que la actividad basal de la enzima es aumentada gradualmente con concentraciones crecientes de forskolina, alcanzándose un máximo de estimulación de 5 veces con una concentración de forskolina de 100  $\mu\text{M}$ . Concentraciones mayores de forskolina (sobre 100  $\mu\text{M}$ ) no aumentan mayormente la actividad de la enzima. Esta activación de la adenililciclase por forskolina es muy similar a la observada en otros sistemas (Seamon y col., 1981; Daly, 1984) y sugiere que la subunidad catalítica C, presente en membranas de oocitos, puede interactuar con el diterpeno.

Los resultados que se presentan en la tabla 1 muestran que la activación de la enzima es independiente de la presencia de nucleótidos de guanosina, confirmando el resultado anterior. Además se puede ver que cuando la enzima es activada simultáneamente por GMP.P(NH)P y forskolina, utilizando concentraciones que separadamente causan la máxima estimulación de la actividad de la adenililciclase, la activación obtenida es aditiva. Estos resultados sugieren que estos dos componentes actuarían en sitios diferentes, GMP.P(NH)P a nivel de la proteína reguladora  $N_s$  y forskolina a nivel de la subunidad catalítica C.

Como una manera de visualizar si la hormona esteroidal podría estar afectando a la subunidad catalítica C, se estudió el efecto de la progesterona en la activación de la adenililciclase por forskolina y por GMP.P(NH)P. La figura 3 muestra estos resultados y se ve claramente que concentraciones de progesterona de alrededor de  $10^{-6}$  M, que

causan un 50% de inhibición de la enzima activada por GMP.P(NH)P, no tienen efecto en la activación de la adenililciclase por forskolina 150  $\mu$ M. Esto demuestra que la progesterona no estaría interfiriendo con la activación de la subunidad catalítica por forskolina.

2. Efecto de la progesterona en la activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P y  $Mg^{2+}$ .

Como fue descrito en la INTRODUCCION, la adenililciclase de varias fuentes es una enzima regulada por nucleótidos de guanosina (Rodbell y col., 1971) y por iones  $Mg^{2+}$  (Iyengar y Birnbaumer, 1981; Iyengar, 1981). Se estudió en primer lugar la regulación de la actividad de la adenililciclase por estos dos compuestos y en segundo lugar como la progesterona podría afectar esta regulación.

2.1. Cinética de activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P y  $Mg^{2+}$ .

Como se ha observado para otras adenililciclasas y como fue demostrado por Xavier Jordana (1982), la cinética de la reacción catalizada por la adenililciclase de oocitos en presencia de GMP.P(NH)P y  $Mg^{2+}$  presenta un período inicial de retardo.

La figura 4 muestra la producción de cAMP en el tiempo, catalizada por la enzima de oocitos en presencia de  $MgCl_2$  2 mM y de diferentes concentraciones de GMP.P(NH)P. Se puede observar que concentraciones crecientes de este nucleótido aumentan significativamente la velocidad en estado estacionario de la reacción. En la tabla 2 se muestran los valores de estas velocidades, de la constante de velocidad de primer orden aparente ( $\mathcal{V}_{ap}$ ) y del tiempo medio de activación de la enzima ( $t_{1/2}$ ) obtenidos de los datos de la figura 3 y cuyo

cálculo se ha descrito en la sección MATERIALES y METODOS. En el se puede ver que los valores de  $\tau_{ap}$  y  $t_{1/2}$  no son alterados por las distintas concentraciones de GMP.P(NH)P utilizadas, indicando que las concentraciones de este nucleótido no tienen mayor efecto sobre la histeresis de activación de la enzima. Sin embargo, cuando se estudió el efecto de concentraciones crecientes de  $Mg^{2+}$  en presencia de GMP.P(NH)P 10  $\mu M$ , se obtuvieron los resultados que se muestran en las figuras 5 y 6. Se aprecia que este catión en concentraciones crecientes también aumenta las velocidades en estado estacionario (tabla 3), al igual que GMP.P(NH)P y que en ausencia de  $Mg^{2+}$  la enzima no presenta actividad. La tabla 3 también muestra los valores de  $\tau_{ap}$  y  $t_{1/2}$  para estas curvas de progreso. Se puede ver que  $Mg^{2+}$  a concentraciones de 0,1 y 0,5 mM tiene un efecto sobre la duración del período de latencia, como lo indican el aumento de los valores de  $\tau_{ap}$  y la disminución de los valores de  $t_{1/2}$ . Puede decirse por lo tanto, que el fenómeno de histéresis puede ser disminuido aunque no eliminado al aumentar las concentraciones de  $Mg^{2+}$ , mientras que concentraciones crecientes de GMP.P(NH)P no la afectan significativamente. De acuerdo a estos resultados podemos concluir que el ión  $Mg^{2+}$  también juega un rol regulador importante en el comportamiento de la adenililciclase de oocitos frente a la adición de nucleótidos de guanósina y la concentración de  $Mg^{2+}$  en el medio de reacción es crítica para este efecto.

2.2. Efecto de la concentración de  $Mg^{2+}$  en la actividad de la adenililciclase y en la inhibición por la progesterona.



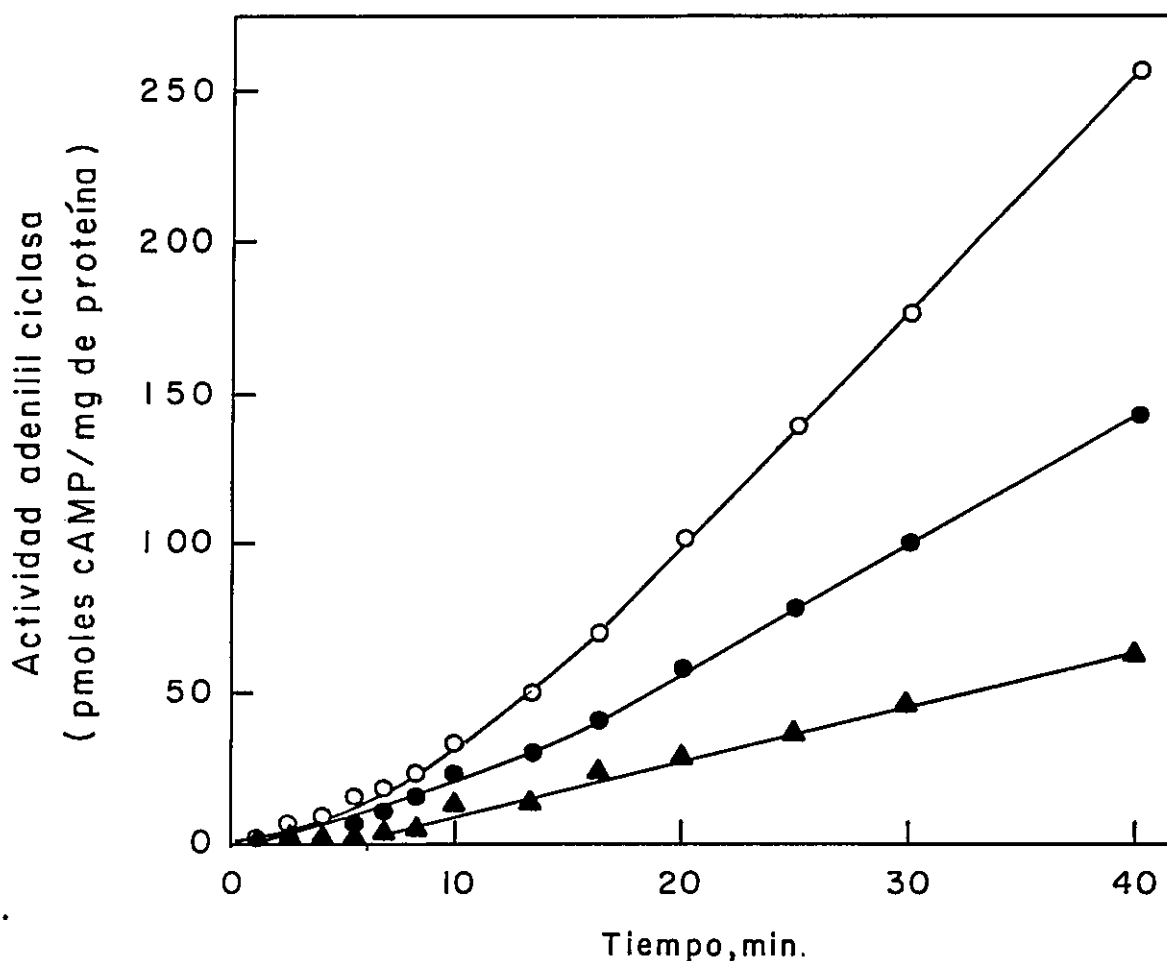


Figura 4. Cinética de la reacción de formación de cAMP en presencia de diferentes concentraciones de GMP.P(NH)P.

La formación de cAMP en el tiempo se midió en condiciones estándares a 32° en presencia de  $MgCl_2$  2 mM,  $[\alpha\text{-}^{32}P]$  ATP 0,1 mM (400 cpm/pmol). Las concentraciones de GMP.P(NH)P utilizadas fueron 0,05  $\mu M$  (▲), 1  $\mu M$  (●) y 10  $\mu M$  (○). La reacción se inició con la adición de la enzima (0,3 mg de proteína/ml de medio de incubación) y a cada tiempo indicado se retiraron 0,1 ml de la mezcla de incubación y la reacción se detuvo tal como se describe en Materiales y Métodos.

TABLA 2

Efecto de diferentes concentraciones de GMP.P(NH)P en las propiedades histeréticas de la adenililciclase.

Adición al ensayo	Velocidad en estado estacionario (pmoles de cAMP/mg de proteína/min)	Valores de $\tau$ aparente (min <sup>-1</sup> )	t <sup>1/2</sup> de activación (min.)
CMP.P(NH)P 0,05 $\mu$ M	2,0	0,190	3,6
GMP.P(NH)P 1 $\mu$ M	3,9	0,208	3,3
GMP.P(NH)P 10 $\mu$ M	8,8	0,205	3,3

Los valores de velocidad en estado estacionario fueron calculadas a partir de las pendientes de las respectivas curvas de progreso que aparecen en la figura 4. Los valores de  $\tau$  aparente y el t<sup>1/2</sup> de activación se calcularon por el método de Neet y Anslie (1980), descrito en Materiales y Métodos.

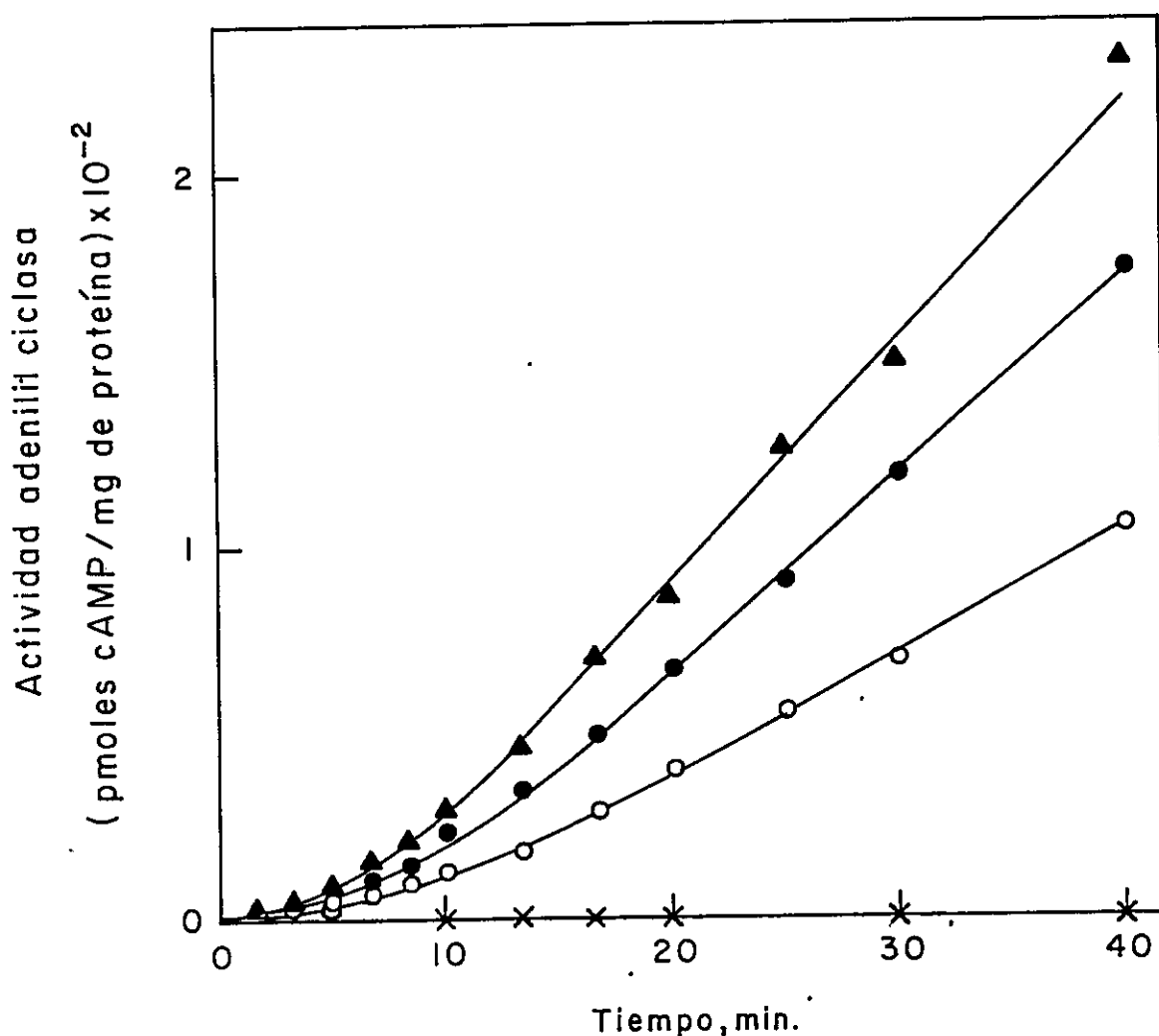


Figura 5. Cinética de la reacción de formación de cAMP en presencia de diferentes concentraciones de  $MgCl_2$ .

La formación de cAMP en el tiempo se midió en condiciones estándares a  $32^\circ$  en presencia de GMP.P(NH)P  $10 \mu M$ ,  $[\alpha\text{-}^{32}P]$  ATP  $0,1 \text{ mM}$  ( $320 \text{ cpm/pmol}$ ) y en ausencia (X) o en presencia de  $MgCl_2$   $0,5 \text{ mM}$  (○);  $2 \text{ mM}$  (●) y  $5 \text{ mM}$  (▲). La reacción se inició con la adición de la enzima ( $0,3 \text{ mg}$  de proteínas de membrana por ml de reacción) y a cada tiempo indicado se retiraron  $0,1 \text{ ml}$  de la mezcla de incubación y la reacción se detuvo tal como se describe en Materiales y Métodos.

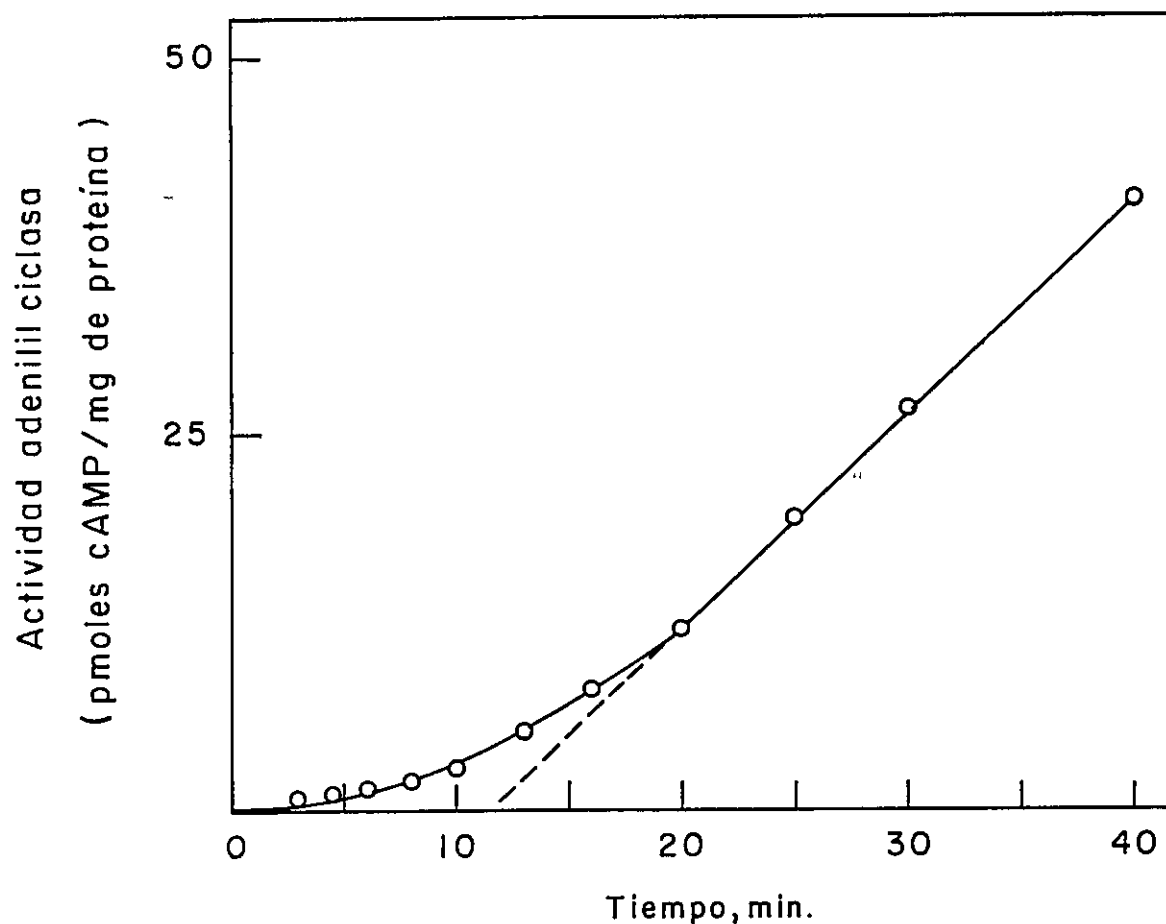


Figura 6. Cinética de la reacción de formación de cAMP en presencia de  $MgCl_2$  0,1 mM.

La formación de cAMP en el tiempo se midió en condiciones idénticas a las descritas en la figura 5 con la misma preparación de membranas.

TABLA 3

Efecto de diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  en las propiedades histeréticas de la adenililciclasa.

Adición al ensayo	Velocidad estado estacionario (pmoles cAMP/mg proteína/ minuto.	Valores de $\tau$ aparente (min. <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ de activación (min.)
ninguna	-	-	-
$MgCl_2$ 0,1 mM	1,4	0,088	7,7
$MgCl_2$ 0,5 mM	3,2	0,136	5,3
$MgCl_2$ 2 mM	5,2	0,158	4,6
$MgCl_2$ 5 mM	6,1	0,160	4,7

Los valores de velocidad en estado estacionario fueron calculadas a partir de las pendientes de las respectivas curvas de progreso que aparecen en las figuras 5 y 6. Los valores de  $\tau$  aparente y el  $t_{1/2}$  de activación se calcularon por el método de Neet y Anslie (1980) descrito en Materiales y Métodos.

Se ha descrito que la concentración de  $Mg^{2+}$  requerida para activar la adenililciclase es menor cuando la enzima se encuentra en presencia de la hormona estimuladora que en ausencia de ella, permitiendo que la enzima se active por nucleótidos de guanosina a concentraciones fisiológicas de  $Mg^{2+}$ , fenómeno que no es posible en ausencia de la hormona (Iyengar y Birnbaumer, 1982). Se estudió, por lo tanto, el efecto de varias concentraciones de este catión sobre la activación de la enzima por GMP.P(NH)P en presencia y ausencia de progesterona. La figura 7 muestra que en ausencia de la hormona esteroidea, concentraciones crecientes de  $Mg^{2+}$  aumentan progresivamente la actividad de la enzima medida durante 20 minutos, obteniéndose un máximo de activación con  $Mg^{2+}$  5 mM. En presencia de la hormona se puede ver que nuevamente el máximo de activación de la enzima se alcanza con  $Mg^{2+}$  5 mM y que la hormona es capaz de inhibir entre un 30 a un 40%, tanto a concentraciones bajas como altas de  $Mg^{2+}$ . Estos resultados además de confirmar el hecho que la actividad de la enzima de oocitos es estimulada por concentraciones crecientes de  $Mg^{2+}$  (Fig. 5 y 6, tabla 3), indican que la progesterona, una hormona inhibidora de la adenililciclase, no tiene efecto en la modulación de la actividad de la enzima por  $Mg^{2+}$ .

### 3. Efecto del derivado de fenotiazina CAPP, en la actividad de la adenililciclase de oocitos.

Varias observaciones han demostrado que los derivados de fenotiazinas, conocidas como drogas antisicóticas, pueden afectar la maduración meiótica del oocito (Baulieu y col., 1978; Hollinger y Alvarez, 1982; Hollinger y Alvarez, 1984). Debido a que estas

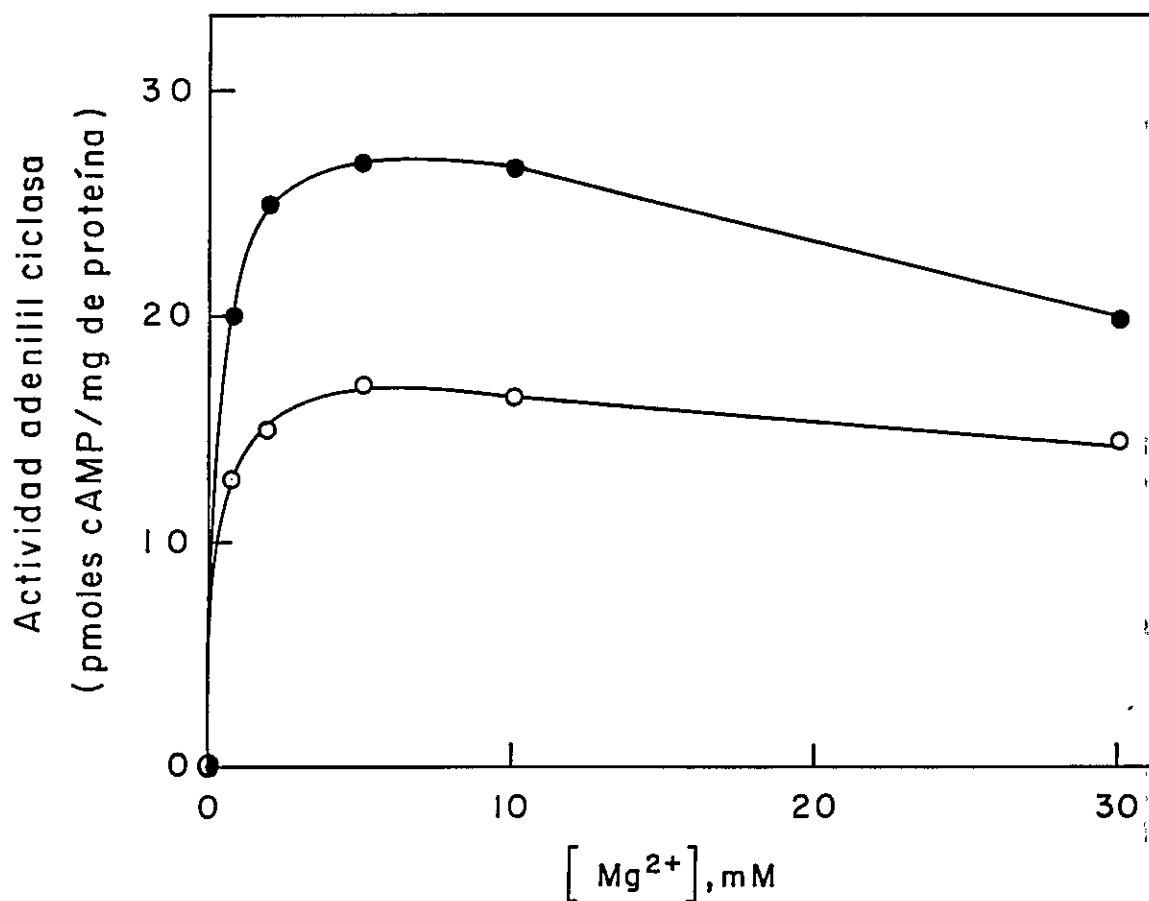


Figura 7. Efecto de  $Mg^{2+}$  en la activación de la adenililciclase en presencia y ausencia de progesterona.

La actividad de la adenililciclase se midió en condiciones estándares en presencia de GMP.P(NH)P 10  $\mu$ M,  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]$  ATP 0,1 mM (420 cpm/pmol), de las distintas concentraciones de  $Mg^{2+}$  indicadas en la figura y en ausencia (●) y en presencia de progesterona 5  $\mu$ M (○). La reacción se inició con la adición de la enzima (1 mg de proteína por ml de medio de incubación) y se continuó por 20 minutos a 32°.

drogas pueden unirse a la proteína calmodulina (CaM) en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  e inhibir a una serie de enzimas que son activadas por esta proteína moduladora dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Levin y Weiss, 1977; Kuhn y Lovenberg, 1982), se ha propuesto que la proteína CaM estaría comprometida en la inducción hormonal de la maduración del oocito. Con respecto a la hipótesis de la participación de CaM en la maduración meiótica se ha descrito la existencia de una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos en oocitos de Xenopus laevis, la cual puede ser estimulada por CaM y  $\text{Ca}^{2+}$  e inhibida por 2-cloro-10(3-aminopropil)fenotiazina (CAPP), pero hasta el momento no hay pruebas que esté relacionada en el proceso de maduración (Echeverría y col., 1981; Allende y Allende, 1982).

Estudios previos realizados por Jordana (1982), relacionados con el efecto de algunas drogas antisicóticas en la actividad de la adenililciclase, mostraron que la inhibición de la enzima por drogas parece ser independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y que las drogas afectarían de alguna manera la función de la proteína reguladora Ns. Con el objeto de caracterizar mejor el efecto de una de estas drogas en la actividad de la adenililciclase de oocitos y de investigar la posible participación de CaM y  $\text{Ca}^{2+}$  en la regulación de la enzima, se estudio el efecto de la droga CAPP en la actividad de la adenililciclase bajo diferentes condiciones.

### 3.1. Efecto de CAPP, $\text{Ca}^{2+}$ , y CaM en la actividad de la adenililciclase.

Los resultados del experimento 1 en la tabla 4, muestran que la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM inhiben a la enzima en un 23%. Esta inhibición



también se observa cuando se adiciona solamente  $\text{Ca}^{2+}$ , indicando posiblemente que la disminución de la actividad de la enzima no se debería al complejo  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM, hallazgo que ha sido descrito previamente por otros autores (Finidori-Lepicard y col., 1981). La adición de EGTA al sistema no afecta la actividad de la adenililciclasa. En el experimento 2 de la tabla 4, utilizando condiciones similares a la anterior, se puede ver que la inhibición por CAPP no es revertida o afectada por la adición exógena de  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM.

### 3.2. Efecto de distintas concentraciones de CAPP en la actividad de la adenililciclasa y de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos.

En la figura 8 parte A, se muestra el efecto de la droga en la activación de la adenililciclasa por dos efectores que actúan a nivel de la proteína Ns, como son el GMP.P(NH)P y el ión fluoruro ( $\text{F}^-$ ). En presencia de  $\text{F}^-$  se ve que la actividad de la enzima se encuentra estimulada por concentraciones de CAPP entre 10 y 100  $\mu\text{M}$ , por sobre la activación producida por el  $\text{F}^-$  solamente, mientras que concentraciones de CAPP sobre 100  $\mu\text{M}$  causan una fuerte inhibición de la enzima. Las mismas concentraciones de CAPP (10  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ) que causan la activación de la enzima en presencia de  $\text{F}^-$ , inhiben notoriamente la adenililciclasa activada por GMP.P(NH)P.

En la parte B de la figura 8 se muestra un experimento similar, pero en este caso en presencia de forskolina, la cual activa principalmente la subunidad catalítica C. Se puede ver que este diterpeno estimula la actividad de la adenililciclasa alrededor de seis veces, pero esta estimulación no es afectada por concentraciones de

TABLA 4

Efecto de  $\text{Ca}^{2+}$ , Calmodulina y CAPP en la adenililciclase de oocitos.

Experimento	Adición al ensayo	Actividad de	Inhibición
		Adenililciclase (pmoles cAMP/mg de proteína)	
1	ninguna	100,1	
	$\text{Ca}^{2+}$ 50 $\mu\text{M}$ + CaM 50 $\mu\text{M}$	77,2	23
	EGTA 500 $\mu\text{M}$	106,7	—
2	ninguna	78,3	
	CAPP 100 $\mu\text{M}$	28,2	66
	CAPP 100 $\mu\text{M}$ + CaM 50 $\mu\text{M}$ + $\text{Ca}^{2+}$ 50 $\mu\text{M}$	30,8	61

Las membranas de oocitos fueron lavadas por sedimentación en ausencia de EGTA y  $\text{Ca}^{2+}$ . La actividad de la adenililciclase se midió en condiciones estándares como está descrito en Materiales y Métodos en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP 0,1 mM (964 cpm/pmol), 5 mg de proteína por ml de medio de incubación y de los componentes indicados en la tabla durante 20 minutos a 32°. Las actividades se expresan en pmoles de cAMP formados por mg de proteína en 20 minutos. Los experimentos 1 y 2, se realizaron con preparaciones diferentes de membrana.

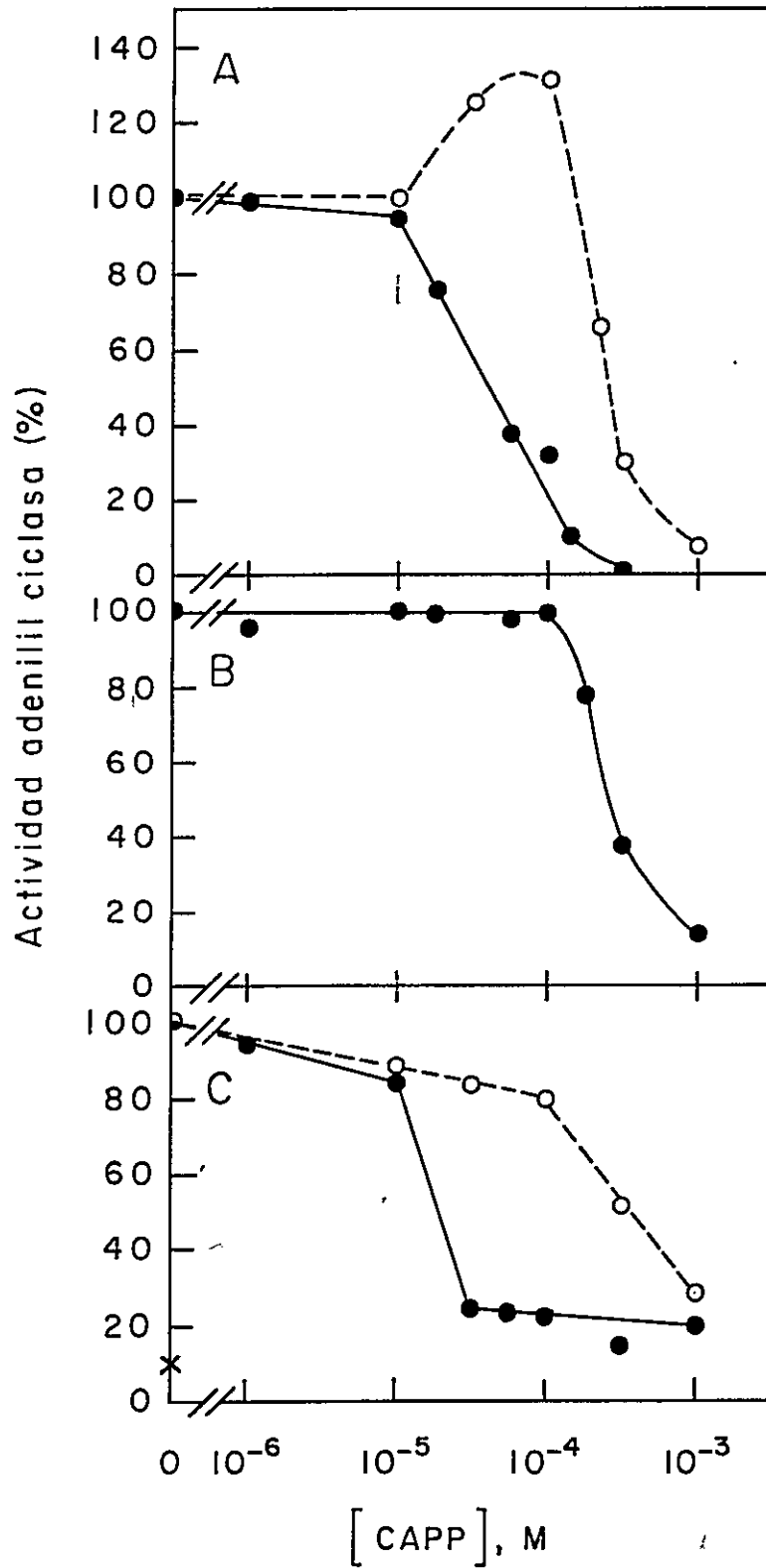


Figura 8. Efecto de CAPP en la actividad de la adenililciclasa y fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de oocitos.

Figura 8. Efecto de CAPP en la actividad de la adenililciclase y fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de oocitos.

En A y B, la adenililciclase unida a membrana fue obtenida como se describe en Materiales y Métodos. En A, la actividad de la adenililciclase se midió en condiciones estándares en presencia de NaF 5 mM, 0,5 mg de proteína/ml de reacción, EGTA 0,2 mM y  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  0,1 mM (832 cpm/pmol) correspondiendo un 100% de actividad a 15/pmoles de cAMP formado por mg de proteína, en 20 minutos (○), o en presencia de GMP.P(NH)P 25  $\mu\text{M}$ , 0,6 mg de proteína/ml de reacción, EGTA 0,5 mM y  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  0,1 mM (444 cpm/pmol), correspondiendo un 100% de actividad a 15/pmoles de cAMP formado/mg de proteína, en 20 minutos (●). En B, el ensayo contiene forskolina 100  $\mu\text{M}$ , 1 mg de proteína/ml de medio de reacción, EGTA 0,2 mM y  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  0,1 mM (220 cpm/pmol), correspondiendo un 100% de actividad a 80 pmoles de cAMP formado por mg de proteína, en 20 minutos (●). En C, la actividad de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  - CaM y la actividad de la adenililciclase se midió como se describe en Materiales y Métodos. La enzima dependiente de CaM (●) se purificó parcialmente de acuerdo a Echeverría y col., 1981 y su actividad se midió en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  0,5 mM, CaM de cerebro de bovino 5  $\mu\text{M}$  y 0,2 de proteína/ml de medio de incubación. En este caso el 100% de la actividad corresponde a 301 pmoles de  $[\text{}^3\text{H}]\text{cAMP}$  hidrolizados por mg de proteína por minuto (1 pmol de  $[\text{}^3\text{H}]\text{cAMP} = 370$  cpm). El símbolo X muestra la actividad de la enzima en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , CaM y CAPP. La actividad de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM presente en las membranas de oocitos (○), se midió en presencia de EGTA 0,25 mM y 1,1 mg de proteína/ml de medio de reacción. El 100% de actividad corresponde a 30 pmoles de cAMP hidrolizados/mg de proteína, en un minuto.

CAPP menores de 100  $\mu\text{M}$ . Concentraciones mayores de la droga inhiben casi completamente a la enzima.

La parte C de la figura 8 presenta el efecto de CAPP en la actividad de dos fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos con diferentes características presentes en oocitos de Xenopus laevis. Una es soluble y es activada por  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM y la otra es una enzima unida a membrana e insensible al efecto regulador de  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM. Con la enzima citosólica, la activación causada por  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM fué inhibida fuertemente por concentraciones de CAPP entre 10 y 50  $\mu\text{M}$ , como ha sido descrito anteriormente (Echeverría y col., 1981). Sin embargo, la inhibición de la actividad de la fosfodiesterasa unida a membranas, que es insensible a  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM, necesita concentraciones de CAPP superiores.

3.3. Efecto de CAPP en la actividad de la adenililciclase presente en membranas de oocitos y en células foliculares.

La tabla 5 muestra que CAPP 100  $\mu\text{M}$  inhibe en un 51% la actividad de la adenililciclase de oocitos estimulada por toxina del colera y GTP, pero no inhibe la actividad basal o la activación de la enzima por el ión  $\text{Mn}^{2+}$ . Cabe recordar que la toxina del cólera actúa sobre la proteína Ns, mientras que el ión  $\text{Mn}^{2+}$  activa la subunidad catalítica C de la adenililciclase. En presencia de GMP.P(NH)P, el derivado de fenotiazina a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  también inhibe la adenililciclase de células foliculares en un 53%.

3.4. Efecto de la progesterona en la inhibición de la adenililciclase por CAPP.

La figura 9 muestra el efecto de diferentes concentraciones de CAPP en la actividad de la adenililciclase en presencia y ausencia de

TABLA 5

Efecto de CAPP en la actividad de la adenililciclase de oocitos y células foliculares.

Fuente de la enzima	Adiciones al ensayo	Actividad de Adenililciclase (pmoles cAMP/mg de proteína).		Inhibición (%)
		- CAPP	+ CAPP	
Oocitos	ninguna	35,0	36,0	-
	GMP.P(NH)P 25 $\mu$ M	151,0	58,1	61
	toxina del cólera + GTP 25 $\mu$ M	94,4	46,1	51
	MnCl <sub>2</sub> 5 mM	17,4	17,4	-
Células foliculares	GMP.P(NH)P 25 $\mu$ M	418,6	195,2	53

La preparación de las membranas provenientes de ambos tipos de células se describe en Materiales y Métodos. La actividad de la enzima de oocitos se midió en condiciones estándares en presencia de EGTA 0,5 mM, 0,6 mg de proteína/ml de medio de reacción y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP 0,1 mM (641 cpm/pmol). La actividad de la enzima de células foliculares se midió como está descrito en Materiales y Métodos en presencia de EGTA 0,2 mM, 0,1 mg de proteína/ml de medio de reacción y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP 0,1 mM (1790 cpm/pmol).

El pretratamiento de las membranas de oocito con toxina del cólera se describe en Materiales y Métodos. Las actividades se expresan en pmoles de cAMP formados por mg de proteína, en 20 minutos.

progesterona 10  $\mu\text{M}$ . Los resultados muestran claramente que la inhibición causada por la progesterona en ausencia de la droga (alrededor de un 40%), es aditiva a la inhibición causada por la droga en todas las concentraciones de CAPP utilizadas. Además el porcentaje de inhibición por la hormona se mantiene más o menos constante a todas las concentraciones de CAPP utilizadas.

### 3.5. Efecto de CAPP en la activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P.

Se midió la capacidad inhibidora de CAPP 100  $\mu\text{M}$  en presencia de diferentes concentraciones de GMP.P(NH)P. De los resultados mostrados en la figura 9, es evidente que la droga no afecta significativamente la concentración de GMP.P(NH)P necesaria para alcanzar la mitad de la activación máxima de la enzima, siendo esta concentración de 5  $\mu\text{M}$  tanto en ausencia como en presencia de CAPP. Es interesante también destacar que en presencia de GMP.P(NH)P 1  $\mu\text{M}$ , la droga inhibe completamente la activación de la adenililciclase por el nucleótido de guanosina. Sin embargo, concentraciones saturantes de GMP.P(NH)P no revierten la inhibición de la enzima por CAPP, que se mantiene en alrededor de un 50%.

### B. ESTUDIOS DE LAS PROTEINAS REGULADORAS DE LA ACTIVIDAD ADENILILCICLASE EN MEMBRANAS DE OOCITOS.

Actualmente se sabe que la actividad de la adenililciclase es regulada positiva o negativamente, a través de dos proteínas que unen nucleótidos de guanosina. Una de ellas participa en la estimulación de la enzima ( $N_s$ ) y la otra participa en la inhibición de la enzima ( $N_i$ ).

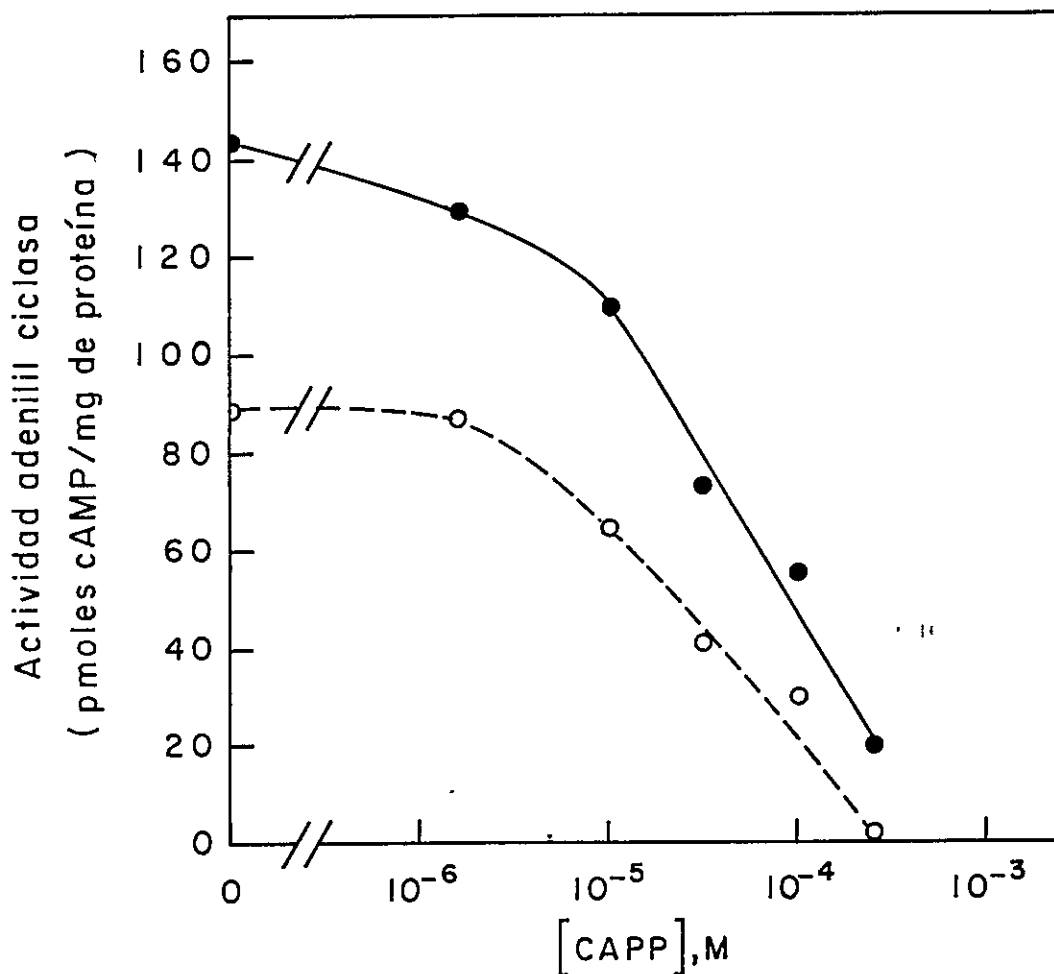


Figura 9. Efecto de CAPP en la inhibición de la adenililciclase por progesterona.

La actividad de la adenililciclase se midió en las condiciones estándares descritas en Materiales y Métodos en presencia de EGTA 0,2 mM; [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] ATP 0,1 mM (944 cpm/pmol), 0,5 mg de proteína/ml de medio de reacción y en presencia (○) o ausencia de progesterona 10  $\mu\text{M}$  (●).



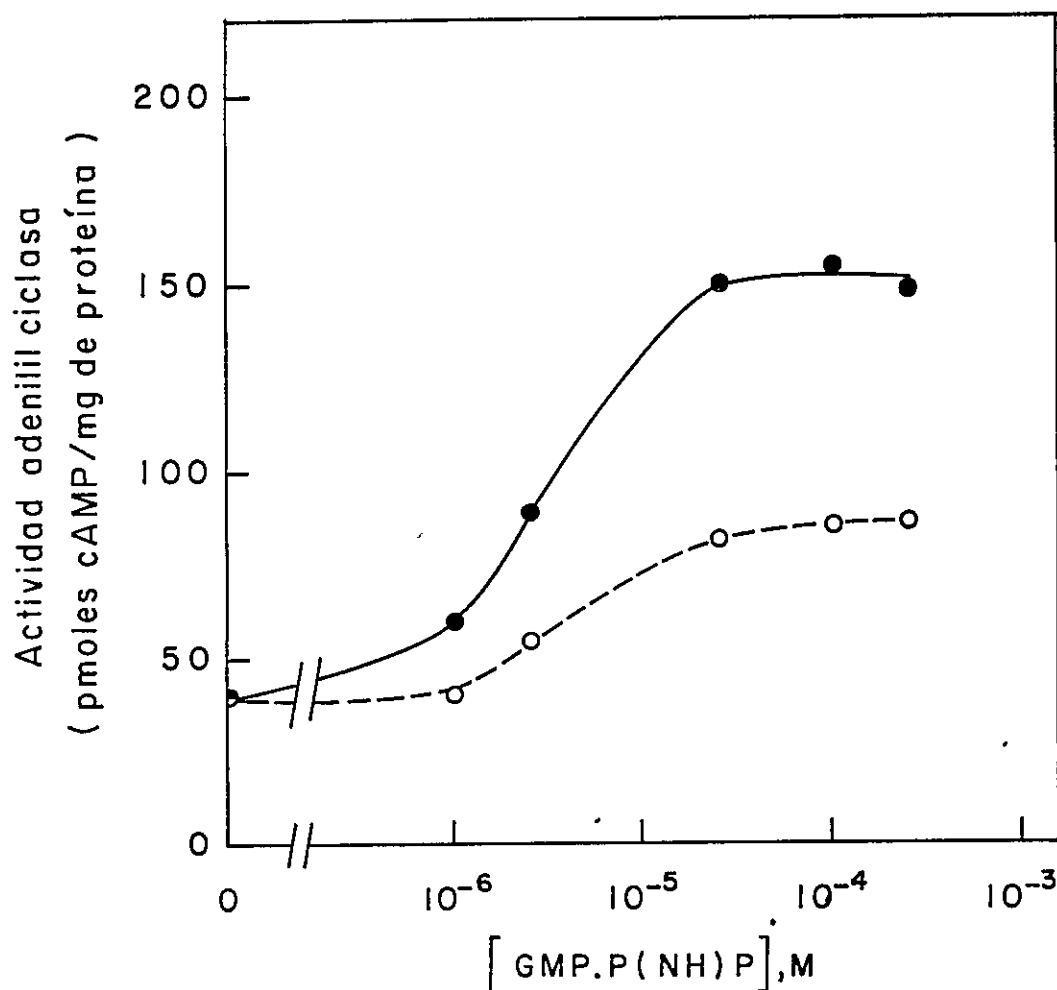


Figura 10 Efecto de CAPP en la activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P.

La actividad de la adenililciclase se midió en las condiciones estándares descritas en Materiales y Métodos en presencia de EGTA 0,2 mM,  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP 0,1 mM (101 cpm/pmol), 1 mg de proteína/ml de medio de incubación, las cantidades de GMP.P(NH)P indicadas en la figura y en presencia (○) o ausencia de CAPP 100  $\mu\text{M}$  (●).

Los estudios realizados por Jordana(1982) y aquellos contenidos en la primera parte de esta tesis muestran que la adenililciclase de oocitos es activada por  $F^{2-}$ , GMP.P(NH)P y toxina del cólera. Estos compuestos son conocidos activadores de la adenililciclase de otros sistemas por ejercer su acción a través de la proteína Ns. Estos antecedentes, por lo tanto, indican que en membranas de oocitos debería estar presente la proteína Ns. Por otro lado, el hecho que la adenililciclase sea inhibida por una hormona (progesterona) indica la posible participación de una proteína reguladora similar a la proteína Ni descrita en mamíferos.

Lo anteriormente expuesto llevó a analizar de manera directa la presencia de las proteínas reguladoras Ns y Ni en membranas de oocitos, mediante el uso de toxinas bacterianas y de electroforesis. Una vez detectadas estas proteínas, se estudió su posible participación en el efecto inhibitor de la progesterona.

1. Posible participación de Ni en la inhibición de la adenililcilasa por la progesterona.

1.1. ADP-ribosilación de las membranas de oocitos por la toxina de Bordetella pertussis.

Como se mencionó en la INTRODUCCION, hasta el momento se ha observado que todas las hormonas que inhiben la actividad de la adenililcilasa, lo hacen a través de un mecanismo en el cual participan los nucleótidos de guanosina y a la proteína reguladora Ni (Londos y col., 1981; Jakobs y col., 1981; Bokoch y col., 1983; Codina y col., 1983). Como la progesterona inhibe la adenililciclase de oocitos y

esta inhibición es dependiente de nucleótidos de guanosina, puede suponerse que la progesterona también estaría actuando a través de un mecanismo similar, es decir a través de Ni. Lógicamente que para contestar a esta interrogante, primero hay que analizar si las membranas de oocitos contiene Ni. Para ello se recurrió al uso de la toxina de Bordetella pertussis, la cual ADP-ribosila específicamente a una proteína de membrana de peso molecular entre 40.000 y 41.000d. (Katada y Ui, 1982a; Katada y Ui, 1982b) y que corresponde a la subunidad de la proteína reguladora Ni (Bokoch y col., 1983; Codina y col., 1983).

Como se muestra en la figura 11, el tratamiento de las membranas de oocitos con la toxina de B. pertussis en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}] \text{NAD}^+$  resulta en la incorporación de  $^{32}\text{p}$  ADP-ribosa en una sola proteína con un peso molecular de 41.000 (canales 5 y 6). Esta proteína tiene la misma migración que la subunidad  $\alpha_i$  de Ni purificada a homogeneidad a partir de eritrocitos humanos y que también es ADP-ribosilada por B. pertussis (canales 1 y 2). En ausencia de la toxina, tanto la proteína Ni (canales 3 y 4) como las membranas de oocitos (canales 7 y 8), no son ADP-ribosiladas. Se concluye de estos resultados que en las membranas de oocitos está presente una proteína homóloga, en tamaño molecular y en su capacidad de ser ADP-ribosilada específicamente por la toxina de B. pertussis, a la proteína reguladora presente en membranas de células de mamífero.

1.2. Efecto de la toxina de B. pertussis en la activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P y en la inhibición por la progesterona.

Hazeki(1980) y Katada (1981, 1982a y 1982b) demostraron que la inhibición hormonal de la adenililciclase puede ser bloqueada

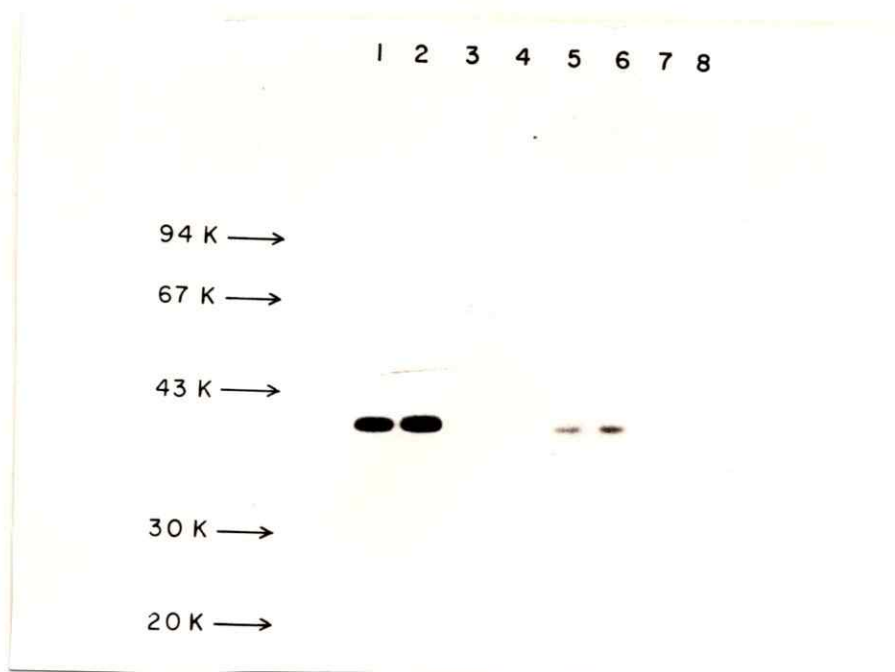


Figura 11. Análisis por autoradiografía de la incorporación de  $[^{32}\text{P}]$  ADP-ribosa en proteínas de membrana de oocito y en la proteína Ni.

30 y 60  $\mu\text{g}$  de proteínas de membrana de oocito y 11 ng y 20 ng de proteína Ni se incubaron con 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de toxina de Bordetella pertussis en condiciones estándares descritas en Materiales y Métodos en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  NAD<sup>+</sup> 10  $\mu\text{M}$  (actividad específica de 300 mCi/mmol). Posteriormente las proteínas se separaron por electroforesis en gels de poliacrilamida en condiciones desnaturantes, teñidas con azul de coomasie y sometidas a autoradiografía por 9 horas a  $-70^\circ$ . Los canales 1 y 3 contienen 11 ng de proteína Ni y los canales 2 y 4 contienen 20 ng de Ni. Los canales 5 y 7 contienen 30  $\mu\text{g}$  de proteína de membrana de oocito y los canales 6 y 8, 60  $\mu\text{g}$ . Los canales 1, 2, 5 y 6 contienen además la toxina de Bordetella pertussis. Los pesos moleculares de las proteínas estándares utilizadas se describen en Materiales y Métodos.

si las membranas son tratadas previamente con toxina de B. pertussis. Posteriormente se vió que este efecto era debido a la ADP-ribosilación de la proteína Ni por esta toxina, con la consecuente pérdida de su funcionalidad no se disocia.

La presencia de una proteína con características de Ni en membranas de oocitos y la posibilidad que esta proteína esté participando en los efectos inhibidores de la progesterona llevó a realizar estudios para analizar si la modificación de la proteína Ni por la toxina de B. pertussis interfiere con el efecto de progesterona.

La tabla 6 muestra la actividad de la adenililciclase en membranas tratadas y no tratadas con toxina de B. pertussis y la inhibición de esta actividad por la progesterona. Se puede ver que el tratamiento de las membranas con la toxina no tiene efecto sobre la actividad basal de la enzima, ni tampoco sobre la actividad de la enzima estimulada por GMP.P(NH)P. El tratamiento de las membranas con la toxina tampoco interfiere con la posterior inhibición de la adenililciclase por la progesterona.

La alta concentración de  $\text{NAD}^+$  (1 mM) y el prolongado tiempo de incubación (90 minutos) utilizado en los experimentos anteriores (tabla 6), fue con el objeto de modificar todos los sitios en la membrana susceptibles a la acción de la toxina. Bajo estas condiciones saturantes de  $\text{NAD}^+$ , se espera ADP-ribosilar todas las moléculas de Ni presentes en la membrana del oocito y expuestas a la acción de la toxina. Para confirmar esta presunción, se sometió inicialmente a las membranas a un tratamiento extensivo con la toxina y  $\text{NAD}^+$  1 mM y posteriormente, después de haber eliminado el exceso de

TABLA 6

Efecto de la ADP-ribosilación de las membranas de oocitos por la toxina de B. pertussis en la actividad de la adenililciclase por GMP.P(NH)P y en la inhibición por la progesterona.

Pretratamiento de las membranas	Adiciones al ensayo	Actividad de Adenililciclase (pmoles cAMP/mg de proteína)
NAD <sup>+</sup> 1 mM	-	4,2
	GMP.P(NH)P 25 μM	89,2
	GMP.P(NH)P 25 μM + progesterona 2,5 μM	46,8
NAD <sup>+</sup> 1 mM + toxina 10 μg/ml	-	4,6
	GMP.P(NH)P 25 μM	95,1
	GMP.P(NH)P 25 μM + progesterona 2,5 μM	49,2

Las membranas de oocitos fueron pretratadas en condiciones estándares por 90 minutos a 32°, en presencia de NAD<sup>+</sup> 1 mM y en presencia o ausencia de toxina de Bordetella pertussis (10 ug/ml de medio de reacción). Posteriormente las membranas fueron lavadas por sedimentación y la actividad adenililciclase se midió como está descrito en Materiales y Métodos durante 25 minutos a 32° en presencia de 0,60 mg de proteína de membrana por ml de medio de incubación y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP 0,1 mM (1000 cpm/pmol).

NAD<sup>+</sup>, a una segunda incubación con la toxina y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] NAD<sup>+</sup>. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 12. Se puede apreciar que las membranas controles, que han sido sometidas a la primera incubación con NAD<sup>+</sup> 1 mM en ausencia de la toxina, ya sea por 30 minutos (canales 5 y 6) o por cuatro horas (canales 9 y 10) son marcadas en la segunda incubación usando [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] NAD<sup>+</sup>, apareciendo la radiactividad en la proteína de 41.000d. correspondiente a Ni. Sin embargo cuando la primera incubación se realizó tanto en presencia de NAD<sup>+</sup> 1 mM como de la toxina de B. pertussis (canales 3,4 y 7,8), en la segunda incubación se puede apreciar una disminución considerable de marcación de la proteína Ni a los 30 minutos (canales 3 y 4) y una eliminación de la marca en la preincubación de 4 horas (canales 7 y 8). Estos resultados indican que la ADP-ribosilación de las membranas de oocitos por la toxina de B. pertussis es considerable (alrededor de un 75%) a los 30 minutos y completa (100%) a las 4 horas. Por lo tanto, el tiempo de 90 minutos utilizado en el experimento anterior (tabla 6), es lo suficientemente largo como para alcanzar una ADP-ribosilación prácticamente total de las membranas. Otro aspecto interesante que muestran estos resultados, además de confirmar la presencia de una proteína similar a Ni en membranas de oocitos, es que bajo las condiciones utilizadas en estos experimentos (períodos largos de incubación) no se encuentran otras proteínas ADP-ribosiladas, aparte de la de 41.000d. Esto hace muy específico el uso de esta toxina en estas membranas, a diferencia de la toxina del cólera, la cual ADP-ribosila a más de una proteína (figura 14). Estos resultados también indican que los grupos ADP-ribosilos no se intercambian

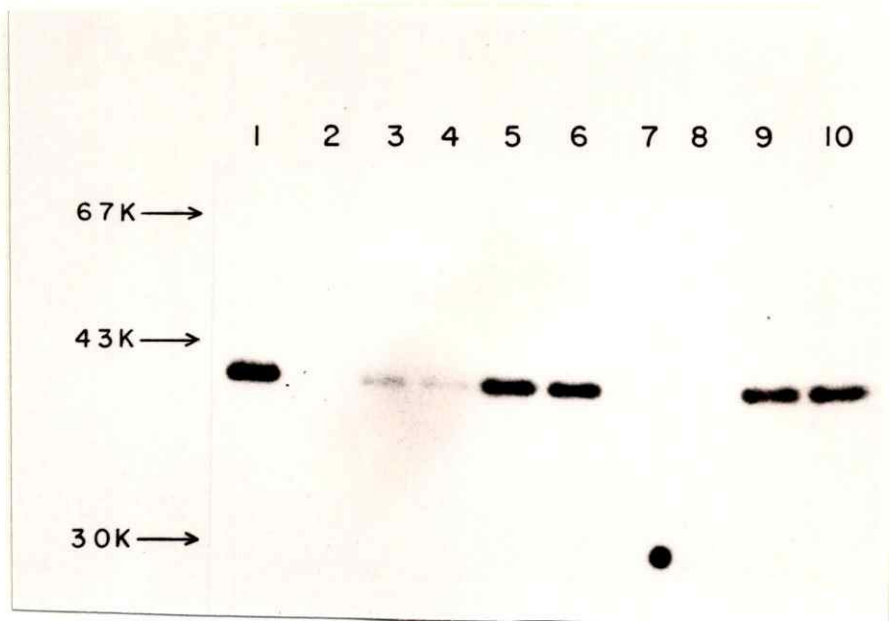


Figura 12. Análisis por autoradiografía de la incorporación de  $[^{32}\text{P}]$  ADP-ribosa en proteínas de membrana de oocito y del efecto del pretratamiento de las membranas con la toxina de B. pertussis en esta incorporación.

30  $\mu\text{g}$  de proteínas de membrana de oocito se sometieron a dos incubaciones consecutivas. La primera se realizó utilizando  $\text{NAD}^+$  1 mM en ausencia (canales 5,6 y 9,10) o en presencia (canales 3,4 y 7,8) de 10  $\mu\text{g}$  de toxina de B. pertussis, durante 30 minutos (canales 3 a 6) o 4 horas a 32° (canales 7 a 10). Después de lavar las membranas por sedimentación, la segunda incubación se realizó utilizando  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$   $\text{NAD}^+$  10  $\mu\text{M}$  (actividad específica de 300 mCi/mmol) en presencia de la misma concentración de toxina durante 30 minutos a 30°. Los canales 1 y 2 contienen 11 ng de proteína Ni pura de eritrocito humano incubada en ausencia (canal 2) y presencia (canal 1) de la toxina de B. pertussis. Posteriormente las proteínas se separaron por electroforesis en gels de poliacrilamida en condiciones desnaturantes, teñidas con azul de coomasie y sometidas a autoradiografía por 10 horas a -70°. Los pesos moleculares de las proteína estándares utilizadas se describen en Materiales y Métodos.



apreciablemente en presencia de la toxina de B. pertussis (Olate y col., 1984).

De los resultados presentados anteriormente puede concluirse que aunque la acción inhibitoria de la progesterona es dependiente de nucleótidos de guanosina, esta inhibición no es sensible a la acción de la toxina de B. pertussis, contrariamente a lo que se ha descrito para otros ligandos u hormonas que actúan a través de Ni (por ejemplo: somatostatina, adrenalina, opiáceos, etc.). Estos hallazgos han sido confirmados recientemente por otros dos grupos de investigadores (Goodhardt y col., 1984; Sadler y col., 1984).

1.3. Efecto de diferentes concentraciones de GMP.P(NH)P en la actividad de la adenililciclase estimulada por forskolina.

Uno de los criterios más utilizados para determinar la participación de Ni en la regulación negativa de la adenililciclase, es la inhibición de la actividad enzimática por bajas concentraciones de GMP.P(NH)P en presencia de forskolina (Seamon y Daly, 1982; Hudson y Fain, 1983). Es interesante entonces estudiar el efecto de diferentes concentraciones de GMP.P(NH)P en la adenililciclase de oocitos activada por forskolina 150  $\mu$ M, como una manera indirecta de analizar la participación de Ni en la inhibición de la enzima.

Los resultados presentados en la figura 13 muestran que en ausencia de la hormona, concentraciones bajas de GMP.P(NH)P no tienen ningún efecto sobre la enzima activada por forskolina, mientras que a concentraciones altas del nucleótido el efecto activador de GMP.P(NH)P es aditivo al efecto de forskolina. En presencia de la hormona esteroidea se observa que no hay inhibición de la adenililciclase a

bajas concentraciones de GMP.P(NH)P, observándose dicha inhibición solo a concentraciones del nucleótido que son estimuladoras de la actividad de la enzima. Estos resultados apoyan los encontrados anteriormente e indican que a pesar de estar Ni presente en las membranas de oocitos, esta entidad proteica no estaría participando en la inhibición de la adenililciclase.

1.4. Efecto de la adición de las proteínas Ni y Ns en la actividad de la adenililciclase de oocitos y en la inhibición por la progesterona.

Actualmente el uso de algunos componentes purificados de la adenililciclase que logran reintegrarse en membranas naturales o sintéticas y reconstituir el sistema adenililciclase (Howlett y col., 1979; Bitensky y col., 1982; Flawiá y col., 1983; Cerione y col., 1984), han permitido estudiar con gran detalle el mecanismo de acción de estos componentes. Usando este tipo de técnicas se realizaron estudios utilizando las proteínas reguladoras Ns y Ni puras provenientes de eritrocitos humanos y membranas de oocitos como sistema aceptor de ellas.

La tabla 7 muestra el efecto de la adición de Ns y Ni exógeno en la actividad de la adenililciclase de oocitos y en la respuesta a nucleótidos de guanosina y a progesterona. Se puede apreciar que la adición de Ns y Ni no afectan mayormente la actividad basal de la enzima, aunque en presencia de Ns la actividad basal muestra una pequeña estimulación que puede deberse a la presencia de nucleótidos de guanosina contaminantes. La adición de Ns en presencia de GMP.P(NH)P 10  $\mu$ M estimula en forma significativa, en alrededor de un 50%, la actividad de adenililciclase. Bajo las mismas condiciones,

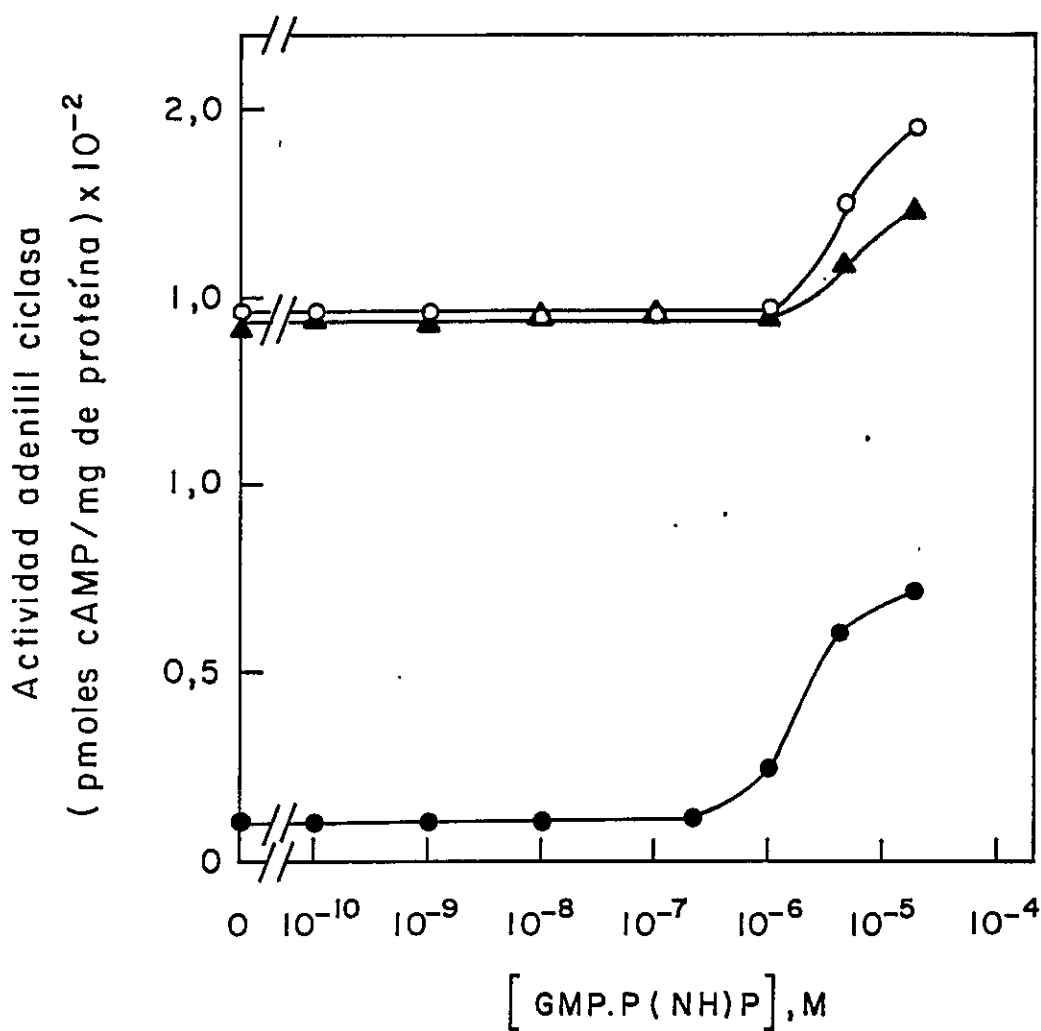


Figura 13. Efecto de GMP.P(NH)P en la adenililciclasa activada por forskolina.

La formación de cAMP se midió como está descrito en Materiales y Métodos en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]$  ATP 0,1 mM (102 cpm/pmol), forskolina 150  $\mu\text{M}$  (O, ▲), en ausencia (○) y en presencia de progesterona 5  $\mu\text{M}$  (▲) y en presencia de las distintas concentraciones de GMP.P(NH)P indicadas. La curva control (●) no contiene otras adiciones al sistema de ensayo. La reacción se inició con la adición de la enzima (2 mg de proteína/ml de medio de incubación) y se continuó por 20 minutos a 32°.

la adición de Ni no tiene ningún efecto en la actividad de la enzima. Las proteínas Ns y Ni tampoco modifican la actividad medida solamente en presencia de progesterona  $4 \mu\text{M}$ , la cual presenta un valor similar a la actividad basal. Cuando se analizó el efecto de la adición de Ns o Ni en la inhibición de la adenililciclase por la progesterona en presencia de GMP.P(NH)P, se vió que la inhibición porcentual es menor en presencia de Ns exógeno (alrededor de un 30%) que cuando no se agrega este componente (alrededor de un 45%). Sin embargo, la disminución de la actividad de la enzima en términos absolutos es la misma en ambos casos, siendo de 50 pmoles de cAMP formados por mg de proteína en ausencia de Ns y de 53 pmoles de cAMP formados por mg de proteína en presencia de Ns exógeno. La adición de Ni no tiene ningún efecto en la inhibición de la adenililciclase por la progesterona en presencia de GMP.P(NH)P.

Una interpretación simple de estos resultados indican que aunque la proteína Ns proveniente de eritrocitos humanos puede activar la subunidad catalítica C de la adenililciclase de oocito, la progesterona no es capaz de inhibir la activación de la adenililciclase causada por el Ns exógeno. Con relación a la proteína Ni, que es lo que interesa en este caso, bajo las condiciones utilizadas no se observó una potenciación del efecto inhibitor de la progesterona al utilizar Ni exógeno en presencia de GMP.P(NH)P. Esto último está plenamente de acuerdo con los resultados mostrados anteriormente en la tabla 6, en el sentido que la proteína Ni no estaría participando en la inhibición de la adenililciclase de oocitos ni por nucleótidos de guanosina ni por la progesterona.

TABLA 7

Efecto de las proteínas reguladoras Ni y Ns en la actividad de la adenililciclase y en la inhibición por la progesterona.

Adición al ensayo.	Proteína N	Actividad de Adenililciclase (pmoles cAMP/mg de proteína)
ninguna	-	9,1
	Ni	9,3
	Ns	11,0
Progesterona 4 $\mu$ M	-	8,6
	Ni	8,5
	Ns	9,9
GMP.P(NH)P 10 $\mu$ M	-	109,3
	Ni	119,6
	Ns	164,0
GMP.P(NH)P 10 $\mu$ M + progesterona 4 $\mu$ M	-	59,2
	Ni	62,7
	Ns	111,5

Las membranas de oocitos (3 mg de proteína/ml de medio de reacción) fueron incubadas con 14 ng de Ni/mg de proteína y con 105 ng de Ns/mg de proteína a 4° por 30 minutos en un medio que contenía Lubrol PX 0,2%, etilenglicol 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,5 mM, albúmina de suero de bovino 0,5 % y Hepes 25 mM pH 8,0. La actividad de la adenililciclase se midió en condiciones estándares como está descrito en Materiales y Métodos en presencia de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP 0,1 mM (1.000 cpm/mol) a 32° durante 20 minutos.

2. Estudios sobre la participación de Ns en la inhibición de la adenililciclase por la progesterona.

2.1. ADP-ribosilación de las membranas de oocitos por la toxina del cólera.

La toxina del cólera activa a la mayoría de las adenililciclasas de eucariontes, incluyendo a la de oocito (Jordana, 1982; Schordered-Slatkine, 1982). Esta activación se debe a la ADP-ribosilación de la subunidad de la proteína reguladora Ns. Resultados previos realizados en las membranas de oocitos (Jordana y col., 1981) han demostrado que el tratamiento de la adenililciclase con la toxina del cólera aumenta en gran medida la capacidad del GTP de estimular a la enzima, indicando la existencia de una proteína similar a Ns en membranas de oocitos y que sería funcionalmente activa.

Utilizando como sustrato  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$ , se estudió la unión covalente de ADP-ribosa radioactiva a proteínas de membranas de oocitos catalizada por la toxina del cólera.

La figura 14 muestra una autoradiografía de las proteínas de membranas de oocitos marcadas con  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{ADP-ribosa}$  bajo diferentes condiciones. En el canal 2 se puede apreciar que en presencia de fosfato 0,5 M la toxina del cólera ADP-ribosila una serie de proteínas, existiendo una con un peso molecular de 43.000d. El canal 1 muestra la ADP-ribosilación de las membranas en ausencia de fosfato (baja fuerza iónica), condiciones en las cuales la toxina no es capaz de ADP-ribosilar a otras proteínas sustratos, pero si auto ADP-ribosilarse. Se puede apreciar que bajo estas condiciones no aparece la proteína de peso molecular 43.000 d, y muchas más de peso

molecular alrededor de 30.000 d, pero subsisten 2 proteínas marcadas, una con un peso molecular aproximado de 24.000 d que correspondería a la auto ADP-ribosilación de la subunidad  $A_1$  de la toxina del cólera y la otra proteína que migra en el frente de corrida del gel, con un peso molecular menor de 10.000 d. En ausencia de la toxina del cólera (canal 3), no hay ADP-ribosilación de las proteínas de membrana. A modo de comparación, se realizó también una ADP-ribosilación de membranas de eritrocito humano en las cuales se ha demostrado la presencia de la subunidad  $\alpha_s$  y que tiene un peso molecular de 42.000 d (Codina y col., 1984a). El canal 4 muestra este análisis y se aprecia una proteína de peso molecular de 42.000 d correspondiente a subunidad  $\alpha_s$  de la proteína  $N_s$ . También aparecen las otras dos proteínas mencionadas anteriormente correspondientes a la auto ADP-ribosilación de la toxina del cólera. En el canal 5 se puede apreciar que en ausencia de toxina del cólera, aparece una proteína de peso molecular de 40.000 d que correspondería a una proteína ADP-ribosilada por una actividad ADP-ribosilante endógena, descrita en algunos sistemas (Gill y col., 1978; Cassel y Pjeuffer, 1978).

Estos resultados indican que en membranas de oocitos la toxina del cólera ADP-ribosila una proteína con un peso molecular de 43.000 d, lo que concuerda plenamente con el peso molecular descrito para la subunidad  $\alpha_s$  de la proteína  $N_s$  presente en mamíferos determinada por ADP-ribosilación (Johnson y col., 1978; Northup y col., 1980; Schleifer y col., 1982).

La existencia de otras proteínas que pueden ser ADP-ribosiladas en la membrana del oocito es interesante, ya que como veremos en la

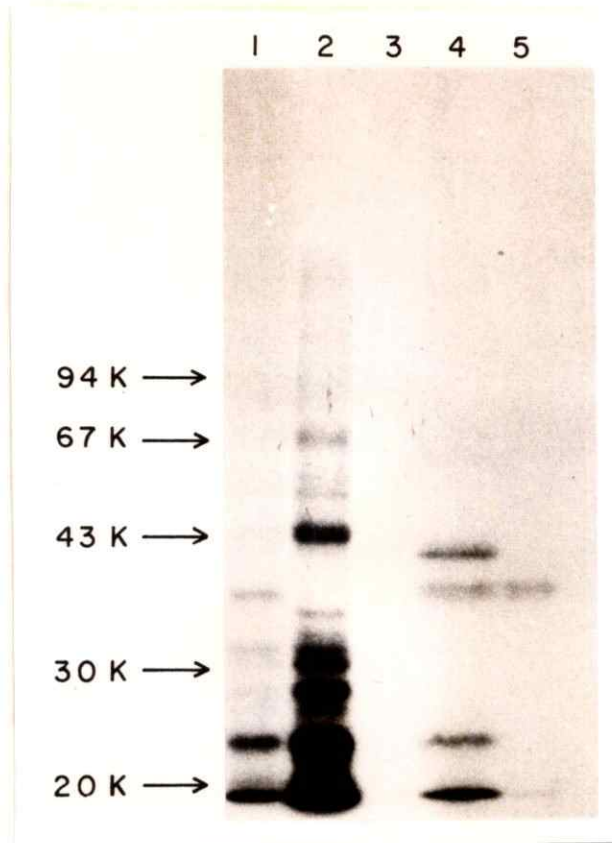


Figura 14. Análisis por autoradiografía de la incorporación de  $[^{32}\text{P}]$ ADP-ribosa en proteínas de membrana de oocito y de eritrocito humano catalizada por la toxina del cólera.

30  $\mu\text{g}$  de proteínas de oocito y 40  $\mu\text{g}$  de proteínas de eritrocito humano se incubaron con 1 mg/ml de la toxina del cólera en condiciones estándares descritas en Materiales y Métodos en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  NAD<sup>+</sup> (300 mCi/mmol). Posteriormente las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes, teñidas con azul de Coomasie y sometidas a autoradiografía por 1 día a  $-70^\circ$ . El canal 1 contiene toxina del cólera, membranas de oocitos en ausencia de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 M; pH 7,5. El canal 2 contiene toxina del cólera, membranas de oocitos y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 M; pH 7,5. El canal 3 contiene membranas de oocitos,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 M; pH 7,5 en ausencia de toxina del cólera. El canal 4 contiene toxina del cólera, membranas de eritrocito humano y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 M; pH 7,5. El canal 5 contiene membranas de eritrocito humano,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 M; pH 7,5 en ausencia de toxina del cólera. Los pesos moleculares de las proteínas estándares usadas se describen en Materiales y Métodos.



DISCUSION, existe una estrecha relación entre estas proteínas que son ADP-ribosiladas y su capacidad de unir GTP o GDP.

2.2. Efecto de la progesterona en la cinética de activación e histerésis de Ns por GMP.P(NH)P.

La figura 15 presenta los efectos de la progesterona en la cinética de activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P 1  $\mu$ M. Se ve claramente que la hormona afecta la histeresis de la enzima, aumentando el período de latencia. La tabla 8 muestra los valores para las velocidades en estado estacionario,  $\bar{v}_{ap}$  y  $t_{1/2}$  en presencia y ausencia de la hormona esteroidea, obtenidos con dos preparaciones enzimáticas diferentes. Se puede apreciar que la progesterona es capaz de aumentar alrededor de 4 veces el valor de  $t_{1/2}$  cuando se utiliza GMP.P(NH)P 1  $\mu$ M y alrededor de 2,5 veces cuando se usa GMP.P(NH)P 25  $\mu$ M. También se puede apreciar que la hormona disminuye la velocidad en estado estacionario de la reacción. Este efecto sin embargo, es menor con altas concentraciones de GMP.P(NH)P. Estos resultados apoyan fuertemente los encontrados por Jordana (1982) en relación a que la progesterona, a través de un mecanismo no conocido aún, afecta la activación de la enzima por el nucleótido de guanosina.

2.3. Efecto de la progesterona en la activación de la proteína Ns por GMP.P.(NH)P.

La presencia en oocitos de una proteína sustrato para la toxina del cólera, análoga a la proteína Ns descrita en mamíferos y la posibilidad que ella pueda ser el blanco de acción de la progesterona, llevó a estudiar directamente el efecto de la progesterona en la activación por nucleótidos de guanosina de una proteína Ns pura obtenida a

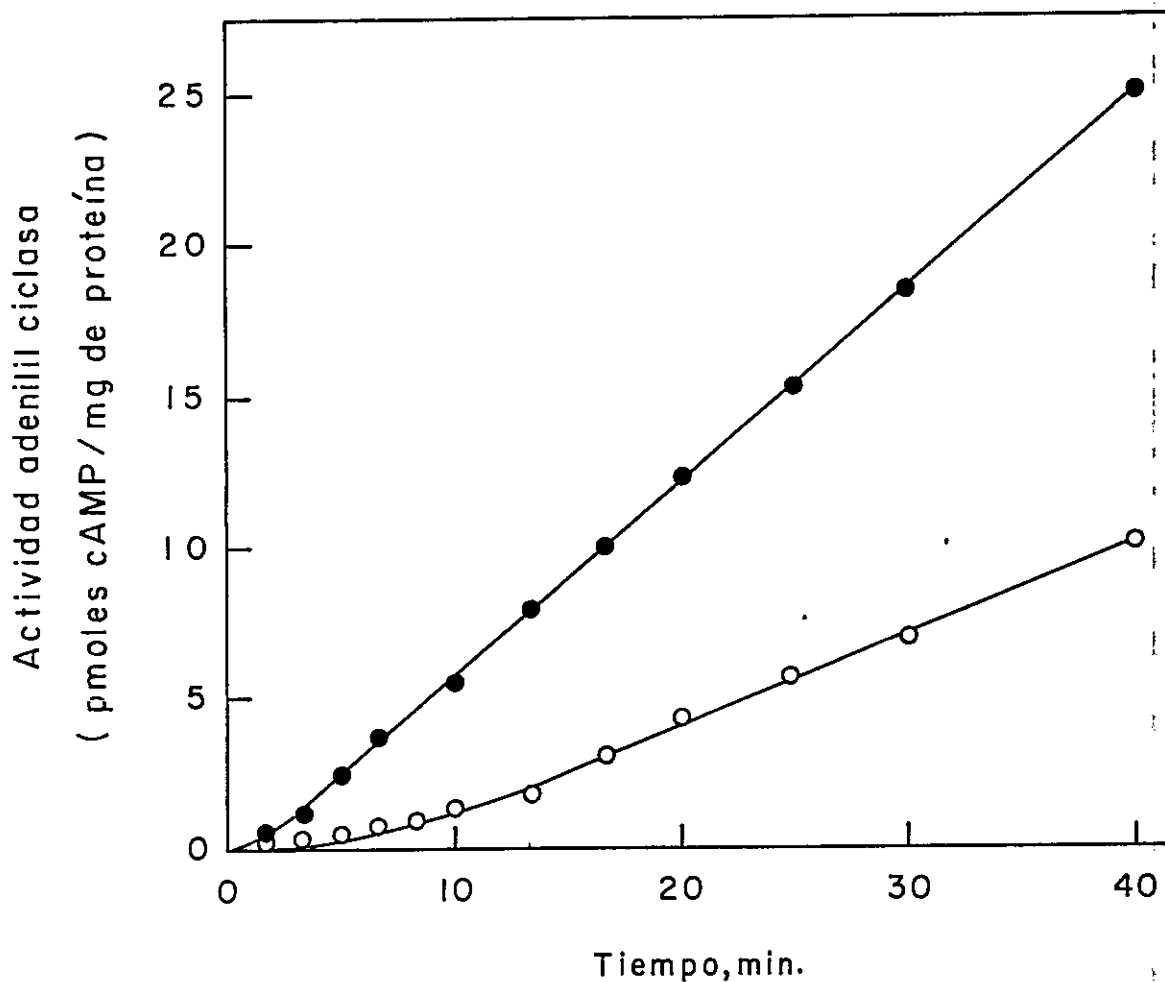


Figura 15. Efecto de la progesterona en la cinética de activación de la adenililciclasa por GMP.P(NH)P.

La formación de cAMP en el tiempo se midió en condiciones estándares en presencia de GMP.P(NH)P  $1 \mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $5 \text{ mM}$ ,  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$   $0,1 \text{ mM}$  ( $600 \text{ cpm/pmol}$ ) y en ausencia (●) o presencia de progesterona  $1 \mu\text{M}$  (○). La reacción se inició con la adición de la enzima ( $1,8 \text{ mg}$  de proteínas por  $\text{ml}$  de reacción) y a cada tiempo indicado se retiraron  $0,1 \text{ ml}$  de la mezcla de incubación y la reacción se detuvo tal como se describe en Materiales y Métodos.

TABLA 8

Efecto de la progesterona en las histerésis de la adenililciclase.

Adición al ensayo	Velocidad en estado estacionario		Valores de $\tau$ aparente		$t_{1/2}$ de activación	
	(pmoles cAMP/mg proteína/minuto)		(min. <sup>-1</sup> )		(min.)	
Adición de progesterona 1 $\mu$ M						
	-	+	-	+	-	+
GMP.P(NH)P 1 $\mu$ M	0,6	0,2	0,881	0,180	0,8	3,8
GMP.P(NH)P 25 $\mu$ M	8,3	6,2	0,420	0,163	1,7	4,2

Los valores de velocidades en estado estacionario fueron calculadas a partir de las pendientes de las curvas de progreso que aparecen en la figura 14, para GMP.P(NH)P 1  $\mu$ M y a partir de resultados obtenidos por Xavier Jordana (1982) para GMP.P(NH)P 25  $\mu$ M. Los valores de  $\tau$  aparente y el  $t_{1/2}$  de activación se calcularon por el método de Neet y Anslie (1980) descrito en Materiales y Métodos. Los valores que se comparan en esta tabla provienen de dos experimentos en los que se utilizó diferentes preparaciones de membrana.

partir de membranas de eritrocitos humanos. Para estos estudios se utilizaron las membranas de las células de linfoma mutantes cyc<sup>-</sup>S40, cuyas propiedades se describieron en la INTRODUCCION.

La tabla 9 muestra estos resultados y en ella se ve que GMP.P(NH)P 40  $\mu$ M en presencia de Mg<sup>2+</sup> activa a la proteína Ns de eritrocito humano, produciéndose un aumento de alrededor de 7 veces en la actividad de la adenililciclase presente en las membranas de células cyc<sup>-</sup>40. Se puede apreciar que la progesterona no tiene ningún efecto en la activación de Ns por GMP.P(NH)P, alcanzándose una actividad reconstituida en las membranas cyc<sup>-</sup>40 idéntica a la alcanzada cuando el Ns activado se adicionó en ausencia de la hormona. Cabe destacar que la progesterona tampoco tiene un efecto en la actividad basal de estas membranas cyc<sup>-</sup>40.

Los experimentos anteriores fueron realizados utilizando un sistema en el cual la interacción entre la proteína Ns y la progesterona se llevó a cabo fuera de la membrana. Estos hallazgos por lo tanto no descartan la posibilidad de la necesidad de un microambiente adecuado en la membrana para que esta interacción sea posible. Para analizar esta posibilidad se realizaron experimentos en los cuales se estudió el efecto de la progesterona en la actividad de membranas cyc<sup>-</sup>40 complementadas con diferentes cantidades de Ns. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10 y al igual que en el caso anterior, la progesterona no tiene ningún efecto en la activación de Ns por nucleótidos de guanósina, aún cuando esta proteína Ns fue incorporada previamente a las membranas.

2.4. Inactivación de la proteína Ns por un reactivo de afinidad, el 2'-3'-dialdehído GTP.

En la INTRODUCCION se vió que los nucleótidos de guanosina juegan un rol muy importante en la regulación hormonal de la adenililciclase unida a membranas. En membranas de oocitos la inhibición requiere de la presencia de nucleótidos de guanosina (Jordana y col., 1981) y como se ha demostrado anteriormente la hormona afecta la activación de la enzima por GMP.P(NH)P. Estos antecedentes junto a los experimentos con toxina de Bordetella Pertussis y la proteína reguladora Ni sugieren la participación de la proteína Ns en la inhibición por progesterona y condujeron al uso de un derivado de nucleótido de guanosina, como otra manera de estudiar el posible mecanismo de inhibición por la hormona. En esta parte de la tesis se presentan los resultados obtenidos al tratar las membranas de oocitos con un derivado de GTP, en este caso el 2'-3' dialdehído-GTP (GTPox).

El AMPox, el ADPox y el ATPox han sido utilizados para modificar la actividad de enzimas purificadas, que utilizan como sustrato estos nucleótidos (Easterbrook-Smith y col., 1976; Maccioni y col., 1979; Hinrichs y Eyzaguirre, 1982). También el ATPox y el GTPox han sido utilizados para modificar sistemas más complejos, en los cuales están participando proteínas que tienen afinidad por estos nucleótidos (Westcott y col., 1980; Brandwein y col., 1982; Clertant y Cuzin, 1982). La modificación de la función de la enzima o proteína está dada por la formación de una base de Schiff como intermediario (Spoor y col., 1970; Easterbrook-Smith y col., 1976), entre el grupo amino

TABLA 9

Efecto de la progesterona en la activación de la proteína Ns por GMP.P(NH)P.

Adición en la Activación de Ns	Adición al ensayo	Actividad de Adenililciclase (pmoles cAMP/mg de proteína)
ninguna	ninguna	25,3
ninguna	progesterona 2,5 $\mu$ M	26,3
GMP.P(NH)P 40 $\mu$ M	ninguna	177,5
GMP.P(NH)P 40 $\mu$ M + progesterona 2,5 $\mu$ M	ninguna	176,5

350 ng de proteína Ns pura fue preactivada con GMP.P(NH)P 40  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 80 mM durante 15 minutos a 32° en presencia o ausencia de progesterona 2,5  $\mu$ M, en un volumen final de 20  $\mu$ l. Posteriormente estas soluciones se diluyeron a 4°, agregando 1,48 ml de una solución que contenía albúmina de suero bovino 1%, Tris-HCl 10 mM; pH 8,0 y EDTA 1 mM. Se tomaron volúmenes de 10  $\mu$ l de estas soluciones y se incubaron durante 20 minutos a 4° (1 mg de proteínas/ml de medio de reacción). Finalmente la actividad de la adenililciclase de membranas de células de linfoma se midió en condiciones estándares en ausencia de GMP.P(NH)P, en presencia de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP 0,1 mM (360 cpm/pmol) y en presencia o en ausencia de progesterona 2,5 mM. Las actividades se expresan en pmoles de cAMP formados por mg de proteína, en 25 minutos.

TABLA 10

Efecto de la progesterona en membranas  $\text{cyc}^-$  S40 complementadas con distintas concentraciones de Ns.

Adición al ensayo	Proteínas Ns adicionada (ng)	Actividad de Adenililciclase (pmoles cAMP/mg de proteína)
ninguna	-	1,9
	275	8,5
	55	3,2
	27	3,4
Progesterona 5 $\mu\text{M}$	-	1,9
	275	8,0
	55	3,9
	27	5,1
GMP.P(NH)P 25 $\mu\text{M}$	-	1,9
	275	126,6
	55	55,5
	27	32,3
GMP.P(NH)P 25 $\mu\text{M}$ + progesterona 5 $\mu\text{M}$	-	2,2
	-	120,8
	275	60,5
	27	33,9

Las membranas  $\text{cyc}^-$  S40 (1 mg de proteína/ml de medio de reacción) fueron incubadas con las distintas concentraciones de Ns indicadas a 4° por 30 minutos en un medio que contenía Tris-HCl 10 mM; pH 8,0; albúmina de suero de bovino 1% y EDTA 1 mM. La actividad de la adenililciclase se midió en condiciones estándares como está descrito en Materiales y Métodos en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP 0,1 mM (480 cpm/pmol) a 32° durante 20 minutos. Las actividades se expresan en pmoles de cAMP formados por mg de proteína en 20 minutos.

reactivo del aminoácido cercano al o en el sitio de unión del nucleótido y uno de los carbonilos del dialdehído 2'-3' del nucleótido trifosfato. Este enlace de tipo covalente, puede ser estabilizado posteriormente por reducción del enlace con borohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio.

#### 2.4.1. Efecto de GDPox y GTPox en la actividad de la adenililciclase de oocitos.

La tabla 11 muestra los efectos de GDPox y GTPox 1 mM en la activación de la enzima de oocito por GMP.P(NH)P 25  $\mu$ M y forskolina 100  $\mu$ M. Se puede observar que en las membranas pretratadas con los dos derivados de GTP, la activación de la enzima por GMP.P(NH)P está disminuída en un 65% para GDPox y en un 74% para GTPox. La activación por forskolina también esta disminuída en un 47% para GDPox y en un 57% para GTPox. En las membranas controles preincubadas con GTP, la activación de la enzima por ambos efectores no es afectada y la actividad mostrada por estas membranas es similar a la de las membranas sin pretratamiento. La actividad basal tampoco es afectada por el tratamiento de las membranas con GDPox y GTPox. El efecto de GDPox y GTPox observado en la acción de GMP.P(NH)P y forskolina indican que la enzima esta siendo modificada, ya que la adenililciclase no puede responder en su totalidad a estos efectores. Esto podría ser consecuencia de la modificación de la proteína reguladora Ns por los derivados de GTP, pero no puede descartarse la posibilidad de que la subunidad catalítica también sea afectada por GDPox y GTPox.

Otra observación interesante que deriva de estos resultados, es que ambos compuestos afectan la actividad de la enzima, siendo el



GTPOx más efectivo que el GDPOx. En vista de esto, se utilizó solamente el GTPOx como derivado de GTP para realizar la modificación de la membrana.

2.4.2. Efecto de AMP.P(NH)P en la inactivación de la adenililciclase por GTPOx.

Debido a que el ATPox inactiva irreversiblemente a la subunidad catalítica de la adenililciclase (Westcott y col., 1980), existe la posibilidad que el GTPOx pueda también reaccionar con el sitio para ATP ubicado en la subunidad catalítica C de la adenililciclase. Esta idea esta apoyada por los resultados encontrados anteriormente (tabla 11), en los cuales el GTPOx también afectó la activación de la enzima por forskolina. Para analizar este posible efecto lateral del GTPOx, se estudió el rol protector que puede tener un derivado no hidrolizable del ATP, el AMP.P(NH)P, en la inactivación de la adenililciclase por GTPOx. El uso de este derivado tiene la ventaja de ser resistente a las ATPasas y a las proteína-quinases normalmente presentes en las membranas.

La figura 16 muestra el efecto de la presencia de diferentes concentraciones de AMP.P(NH)P, durante la incubación de las membranas con GTPOx, sobre la actividad de la adenililciclase medida en presencia de GMP.P(NH)P y forskolina. Se puede apreciar que en presencia de altas concentraciones de AMP.P(NH)P (5 mM), la actividad de la enzima medida en presencia de forskolina aumenta considerablemente, indicando que el análogo de ATP protege a la subunidad catalítica C de la inactivación causada por el GTPOx. El efecto protector de AMP.P(NH)P

en el sitio que interacciona con GMP.P(NH)P es mucho menor como era de esperar, dada la conocida especificidad de la subunidad Ns por el nucleosido de guanosina.

Los resultados presentados en la figura 16, sin embargo, también indican que altas concentraciones de AMP.P(NH)P no protegen totalmente la actividad enzimática medida en presencia de forskolina. El porcentaje de inactivación de la actividad enzimática causada por GTPox, en presencia de 5 mM AMP.P(NH)P, es de un 64% cuando se usa GMP.P(NH)P como agente estimulador, mientras que solamente de un 20% al medir la actividad de la enzima en presencia de forskolina. En todo caso, como estos resultados demuestran que la adición de AMP.P(NH)P protege parcialmente a la subunidad catalítica C, se decidió agregar AMP.P(NH)P 5 mM rutinariamente a todos los posteriores tratamientos de las membranas con GTPox.

#### 2.4.3. Efecto de distintas concentraciones de GTPox y de tiempo de incubación en la inactivación de la adenililciclase.

Anteriormente se había utilizado una concentración de GTPox 1 mM y un tiempo de incubación de 1 hora, obedeciendo solamente a lo descrito en diferentes trabajos, en los cuales se utiliza este tipo de modificación química. Para definir mejor las condiciones de experimentación, se estudió la inactivación de la adenililciclase por distintas concentraciones de GTPox y el curso de esta inactivación en el tiempo.

La figura 17 muestra el efecto del pretratamiento de las membranas de oocitos con concentraciones crecientes de GTPox en la actividad de la adenililciclase medida en presencia y en ausencia de

TABLA 11

Efecto de GDPOx y GTPox en la activación de la adenililciclase de oocitos por GMP.P(NH)P y Forskolina.

Pretratamiento de las membranas	Adiciones al ensayo	Actividad de Adenililciclase (pmoles cAMP/mg de proteína)
ninguna	ninguna	4,0
	GMP.P(NH)P 25 $\mu$ M	98,0
	Forskolina 100 $\mu$ M	83,2
GTP 1 mM	ninguna	5,6
	GMP.P(NH)P 25 $\mu$ M	85,1
	Forskolina 100 $\mu$ M	113,0
GDPOx 1 mM	ninguna	4,2
	GMP.P(NH)P 25 $\mu$ M	32,5
	Forskolina 100 $\mu$ M	51,2
GTPox 1 mM	ninguna	3,8
	GMP.P(NH)P 25 $\mu$ M	22,0
	Forskolina 100 $\mu$ M	42,0

El tratamiento de las membranas con GTP, GDPOx y GTPox 1 mM se describe en Materiales y Métodos. Posteriormente las membranas fueron lavadas y sedimentadas y la actividad de la adenililciclase se realizó en condiciones estándares en presencia de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP 0,1 mM (420 cpm/pmol) y 1 mg de proteína/ml de medio de incubación, durante 25 minutos a 32°.

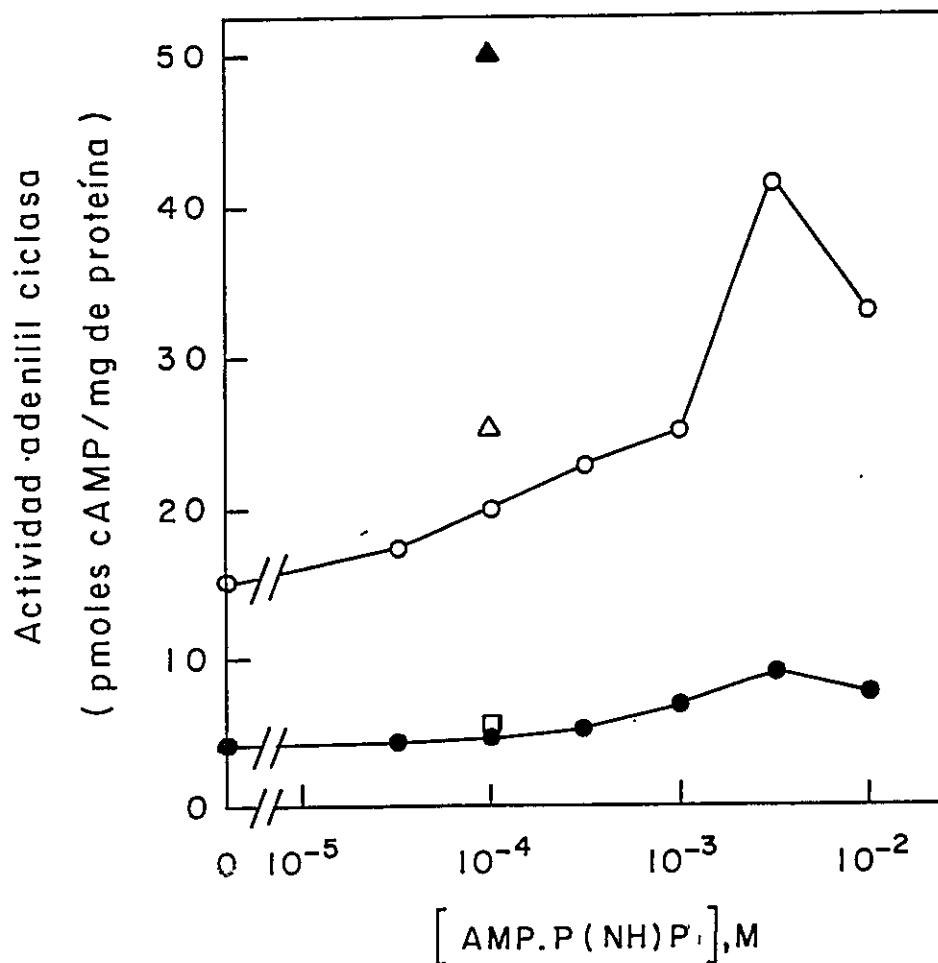


Figura 16. Efecto protector de AMP.P(NH)P en la inactivación de la adenililciclasa por GTPox.

Las membranas de oocitos (7,5 mg de proteína/ml de medio de incubación) fueron incubadas en presencia de GTPox 1 mM y de diferentes concentraciones de AMP.P(NH)P durante 1 hora a 30°. Después de lavar y sedimentar las membranas, se determinó la actividad adenililciclasa en presencia de GMP.P(NH)P 25  $\mu$ M (●), forskolina 150  $\mu$ M (○),  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  0,1 mM (300 cpm/pmol) y 0,6 mg de proteína/ml de medio de reacción durante 32 minutos a 32°. La actividad de las membranas controles (sin pretratamiento) en presencia de Forskolina 150  $\mu$ M, GMP.P(NH)P 25  $\mu$ M y en ausencia de efectores son indicadas en la figura por símbolos ▲, △ y □ respectivamente.

GMP.P(NH)P. Se puede apreciar que concentraciones de GTPox mayores de 0,1 mM inhiben fuertemente la activación de la enzima por GMP.P(NH)P, sin afectar la actividad basal de la enzima medida en ausencia de GMP.P(NH)P. Con concentraciones de GTPox 0,5 mM se alcanza un 60% de inhibición y concentraciones de GTPox sobre 1 mM no producen una mayor inhibición.

En la figura 18 se muestra que la inactivación de la enzima por el tratamiento de las membranas con GTPox 1 mM, es un proceso dependiente de tiempo, alcanzándose un 50% de inhibición a los 30 minutos y un máximo de inhibición a los 45 minutos.

De estos resultados se puede decir entonces que las condiciones utilizadas anteriormente en el pretratamiento de las membranas (GTPox 1 mM y 60 minutos de incubación) aseguran un máximo de modificación de la adenililciclase.

#### 2.4.4. Efecto de GTPox en la activación de la adenililciclase por diferentes efectores.

La especificidad de la inhibición causada por GTPox se estudió con más detalle, midiendo la actividad de la adenililciclase presente en membranas pretratadas con GTPox, en presencia de varios efectores de la enzima.

En la tabla 12 se puede ver que la activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P 15  $\mu$ M y  $F^-$  10 mM, conocidos efectores que actúan a través de  $N_s$ , está disminuída en un 79% y 62% respectivamente en las membranas pretratadas con GTPox con respecto a la activación de la enzima por los mismos efectores en membranas controles pretratadas con GTP. La activación por forskolina 150  $\mu$ M, conocido activador de

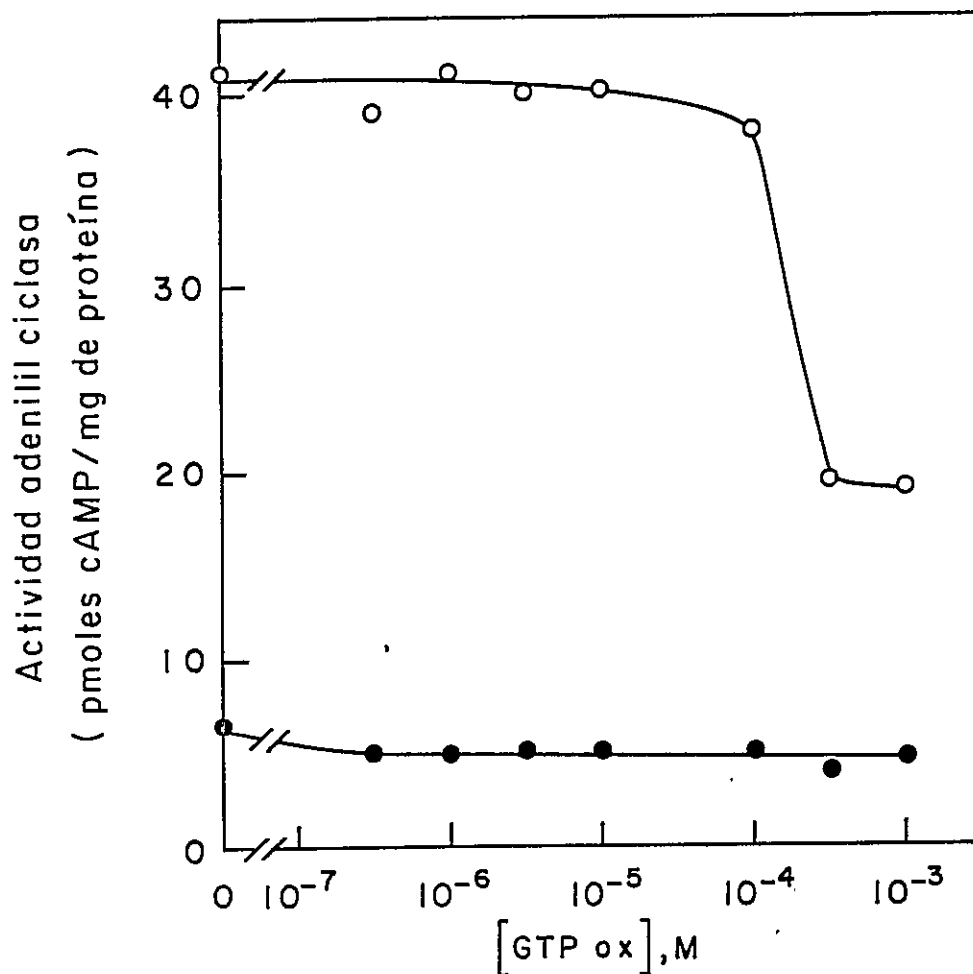


Figura 17. Efecto de GTPox en la actividad de la adenililciclase de oocitos.

Las membranas (6 mg de proteína/ml de medio de incubación) fueron incubadas en presencia de distintas concentraciones de GTPox y AMP.P(NH)P 5 mM durante 1 hora a 30°. Después de lavar y sedimentar las membranas, se determinó la actividad adenililciclase en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  0,1 mM (380 cpm/pmol); y 1,2 mg de proteína/ml de medio de incubación y en presencia (O) o en ausencia de GMP.P(NH)P 25  $\mu\text{M}$  (●).

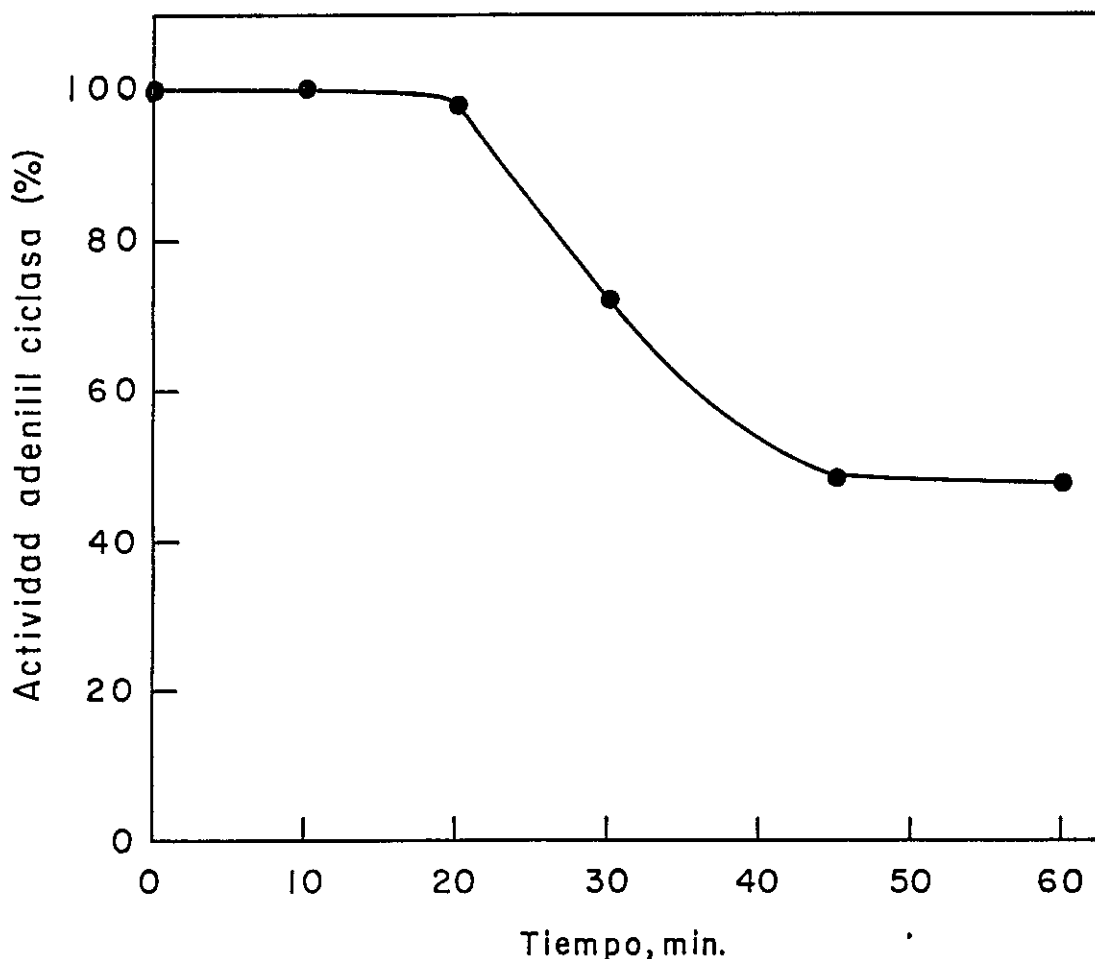


Figura 18. Inactivación en el tiempo de la adenililciclasa por GTPOx.

Las membranas (7 mg de proteína/ml de reacción) fueron incubadas en presencia de GTPOx 1 mM en condiciones estándares. A los tiempos indicados se retiraron alícuotas de 50  $\mu$ l se lavaron y se sedimentaron. Posteriormente a estas fracciones se les determinó actividad adenililciclasa como está descrito en Materiales y Métodos en presencia de GMP.P(NH)P 25  $\mu$ M, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP 0,1 mM (300 cpm/pmol) y 1 mg de proteína/ml de medio de incubación. El porcentaje de inhibición debido al pretratamiento con GTPOx se calculó utilizando como 100% el valor obtenido con el efector GMP.P(NH)P a tiempo cero y que fue de 27,2 pmoles de cAMP formado por mg de proteína, en 30 minutos.

la subunidad catalítica C, también está disminuída, pero solamente en un 39%. La respuesta al ión  $Mn^{2+}$ , no se ve afectada significativamente, mostrando sólo una disminución del 10%. Es importante destacar que la presencia de una cantidad equivalente de GTP no modificado en la preincubación, reduce apreciablemente la inactivación de la adenililciclase por GTPox.

De los resultados presentados en las tablas 11 y 12 se puede concluir que el tratamiento de las membranas con GTPox bloquea principalmente la capacidad de  $GMP.P(NH)P$  y  $F^-$  de activar a la adenililciclase, probablemente por interacción del derivado de GTP con la proteína reguladora Ns. Este tratamiento afecta en mucho menor grado la acción de forskolina, mientras que la acción de  $Mn^{2+}$  es casi insensible a este tratamiento.

#### 2.4.5. Efecto de GTPox en la inhibición de la adenililciclase por la progesterona.

Como sabemos, la adenililciclase de oocitos es activada por  $GMP.P(NH)P$  e inhibida fuertemente por concentraciones micromolares de progesterona, a través de un mecanismo que aparentemente afecta la activación de la proteína Ns por el nucleótido de guanosina. Se estudió entonces, el efecto de la progesterona en la adenililciclase cuya proteína reguladora Ns ha reaccionado previamente con GTPox.

Los resultados obtenidos en la tabla 13 muestran que mientras la progesterona causa una inhibición de un 53% en las membranas controles que han sido pretratadas con GTP, la hormona tiene un efecto mínimo (9%) en las membranas que han reaccionado con GTPox. En este caso, el



TABLA 12

Efecto de GTPox en la activación de la adenililciclase por GMP.P(NH)P, forskolina, fluoruro y  $Mn^{2+}$ .

Adición durante la preincubación	Adición al ensayo	Actividad de adenililciclase (pmoles cAMP/mg de proteína)	Inhibición (%)
ninguna	ninguna	4,3	-
GTP 1 mM	ninguna	4,8	-
GTPox 1 mM	ninguna	4,6	-
GTP 1 mM	GMP.P(NH)P 15 $\mu$ M	85,1	-
GTPox 1 mM	GMP.P(NH)P 15 $\mu$ M	18,0	79
GTPox 1 mM+GTP 1 mM	GMP.P(NH)P 15 $\mu$ M	40,0	53
GTP 1 mM	Fluoruro 10 mM	78,7	-
GTPox 1 mM	Fluoruro 10 mM	30,3	62
GTP 1 mM	Forkolina 150 $\mu$ M	110,0	-
GTPox 1 mM	Forkolina 150 $\mu$ M	67,4	39
GTP 1 mM	$Mn^{2+}$ 10 mM	22,0	-
GTPox 1 mM	$Mn^{2+}$ 10 mM	20,0	10

El pretratamiento de las membranas con GTP y GTPox 1 mM se describe en Materiales y Métodos. Posteriormente las membranas se lavaron y se sedimentaron y la actividad adenililciclase se realizó en condiciones estándares en presencia de [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP 0,1 mM (400 cpm/pmol), de todos los efectores indicados en la tabla (cuando se usó  $Mn^{2+}$ , el  $MgCl_2$  presente normalmente en el medio de incubación fue reemplazado por  $MnCl_2$ ) y de 1 mg de proteína/ml de medio de reacción. La actividad se midió durante 30 minutos a 32°. El porcentaje de inhibición debido al tratamiento de las membranas con GTPox se calculó utilizando como 100% el valor obtenido con el efector correspondiente en las membranas tratadas con GTP (controles).

tratamiento de las membranas con GTPox produce una inhibición de un 75% de la actividad de la enzima medida en presencia de GMP.P(NH)P.

2. .6. Efecto de la adición de la proteína Ns en la actividad de la adenililciclase en membranas tratadas con GTPox y en la inhibición por la progesterona.

Hasta ahora los resultados obtenidos anteriormente indican que el GTPox inactiva preferencialmente la proteína reguladora Ns presente en la membrana del oocito (tabla 12).

Con estos antecedentes se realizaron estudios destinados a ver si las membranas tratadas con GTPox pueden ser complementadas con la proteína Ns purificada proveniente de eritrocito humano y determinar si la progesterona puede interferir posteriormente con esta proteína Ns adicionada exógenamente. Para ello se agregaron concentraciones crecientes de Ns a las membranas de oocitos tratadas con GTPox.

La figura 19 muestra estos resultados. En el caso de las membranas que han reaccionado previamente con GTPox se puede observar que la adición de Ns exógeno en concentraciones superiores a 27 ng de proteína, en presencia de GMP.P(NH)P, causan una estimulación de aproximadamente 3 veces de la actividad adenililciclase, recuperándose el 60% de actividad perdida por el tratamiento con el GTPox. Se puede apreciar también que concentraciones mayores de Ns exógeno adicionado, no lograron saturar el sistema pues no se llega a un 100% de actividad. El resultado más importante, sin embargo, es el que indica que la actividad de la adenililciclase recuperada por la adición del Ns exógeno a las membranas tratadas con GTPox, no puede ser inhibida por la progesterona.

Los resultados obtenidos con las membranas controles (tratadas con GTP) nuevamente muestran que concentraciones mayores de 27 ng de Ns exógeno causan una clara estimulación de la actividad medida en presencia de GMP.P(NH)P. En este caso, sin embargo, concentraciones de Ns de 500 ng parecen saturar el sistema, pues no se obtiene mayor actividad al duplicar la concentración de la proteína Ns exógena. Nuevamente en estas membranas, el aumento de actividad causado por la adición de la proteína Ns exógena es igual con y sin progesterona. Aún más a concentración saturante de Ns (500 ng), se observa que incluso la inhibición originada por la progesterona en ausencia o hasta 270 ng de Ns desaparece y no se observa tendencia a la saturación. Las conclusiones de este experimento son que el Ns exógeno es capaz de interaccionar y activar la subunidad catalítica C de las membranas de oocitos, pero no es capaz de traducir el efecto de la hormona sobre la actividad enzimática.

#### 2.4.7. Marcación de las proteínas de membrana de oocitos con GTPox radioactivo.

Si el GTPox esta reaccionando con las proteínas de membrana, en especial con la proteína Ns y formando enlaces covalentes con ellas, debería ser posible visualizar las proteínas de membranas que estan interactuando con este derivado de GTP, mediante el uso de [ $\alpha$ - $^{32}$ P] GTPox.

La figura 20 muestra una autoradiografía de las proteínas de membrana de oocito tratadas con [ $\alpha$ - $^{32}$ P] GTPox y sometidas posteriormente a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes. Se puede apreciar que varias proteínas de membrana unen el GTPox

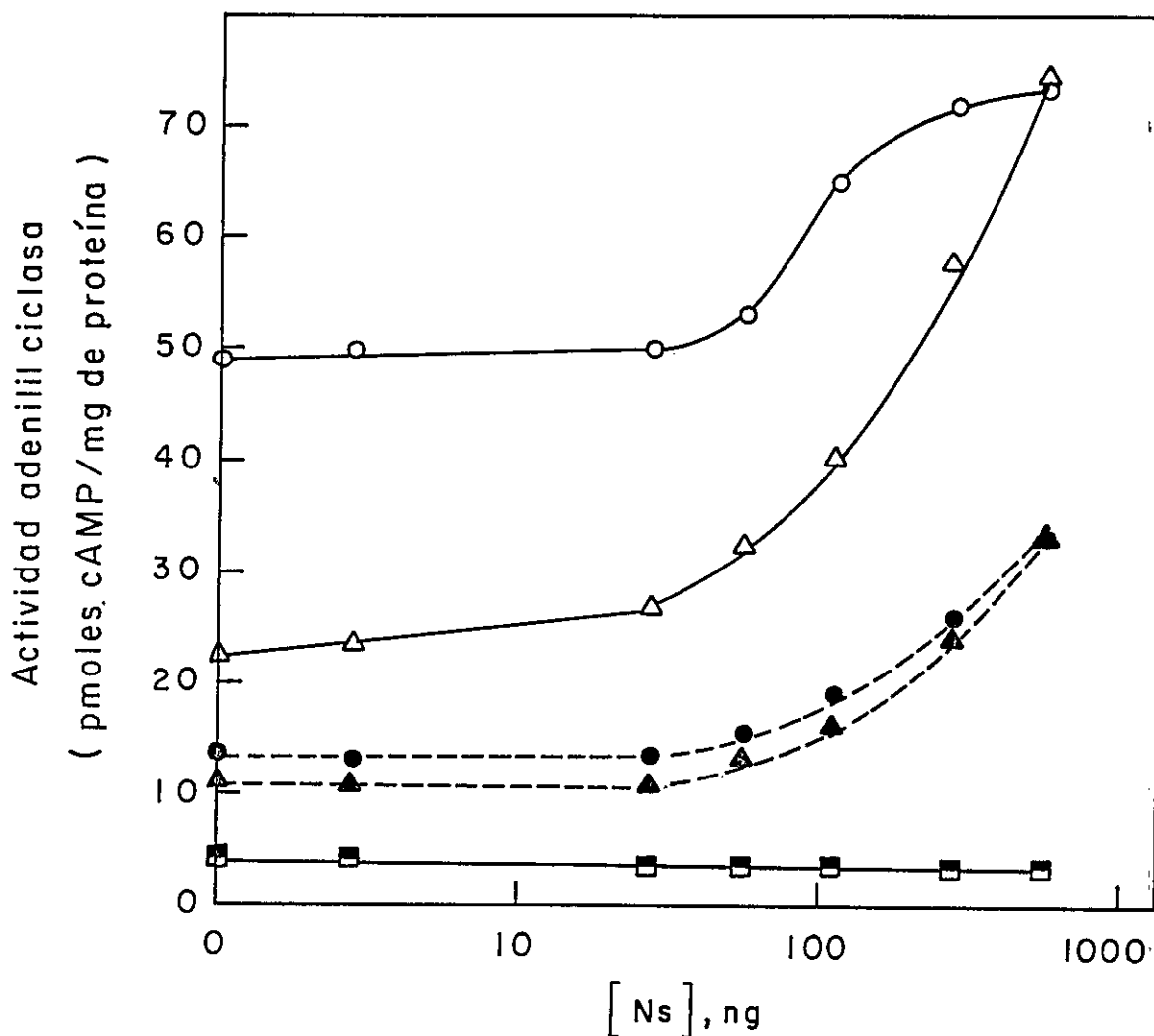


Figura 19. Efecto de la adición de Ns exógeno en la actividad de la adenilil ciclasa presente en membranas controles y tratadas con GTPox y en la inhibición por la progesterona.

Las membranas de oocitos fueron pretratadas con GTP 1 mM (○, △, □) y con GTPox 1 mM (●, ▲, ■) como se describe en Materiales y Métodos. Después de lavar y sedimentar las membranas se midió la actividad adenilil ciclasa en condiciones estándares en presencia de distintas concentraciones de Ns indicadas en la figura, en presencia (▲, ●, △, ○) o en ausencia de GMP.P(NH)P 15 μM (□, ■), en presencia (△, ▲) o en ausencia de progesterona 5 μM (○, ●) y en presencia de [α-<sup>32</sup>P] ATP 0,1 mM (500 cpm/pmol) y 0,75 mg de proteína de membrana por ml de medio de reacción. La actividad se midió durante 35 minutos a 32°.

TABLA 13

Efecto de GTPox en la inhibición por la progesterona.

Adición durante la preincubación	Adición al ensayo	Actividad de adenililciclasa (pmoles cAMP/mg de proteína)	Inhibición (%)
GTP 1 mM	ninguna	3,7	-
	GMP.P(NH)P 15 $\mu$ M	62,8	-
	GMP.P(NH)P 15 $\mu$ M + progesterona 5 $\mu$ M	29,4	53
GTPox 1 mM	ninguna	4,0	-
	GMP.P(NH)P 15 $\mu$ M	16,0	-
	GMP.P(NH)P 15 $\mu$ M + progesterona 5 $\mu$ M	14,6	9

El pretratamiento de las membranas con GTP y GTPox 1 mM se describe en Materiales y Métodos. Posteriormente las membranas fueron lavadas y sedimentadas y la actividad adenililciclase se realizó en condiciones estándares en presencia de [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP 0,1 mM (340 cpm/pmol) y 1 mg de proteína/ml de medio de incubación. La actividad se midió durante 30 minutos a 32°. El porcentaje de inhibición debido al pretratamiento con GTPox se calculó utilizando como 100% el valor obtenido con el efector GMP.P(NH)P en las membranas tratadas con GTP (controles).

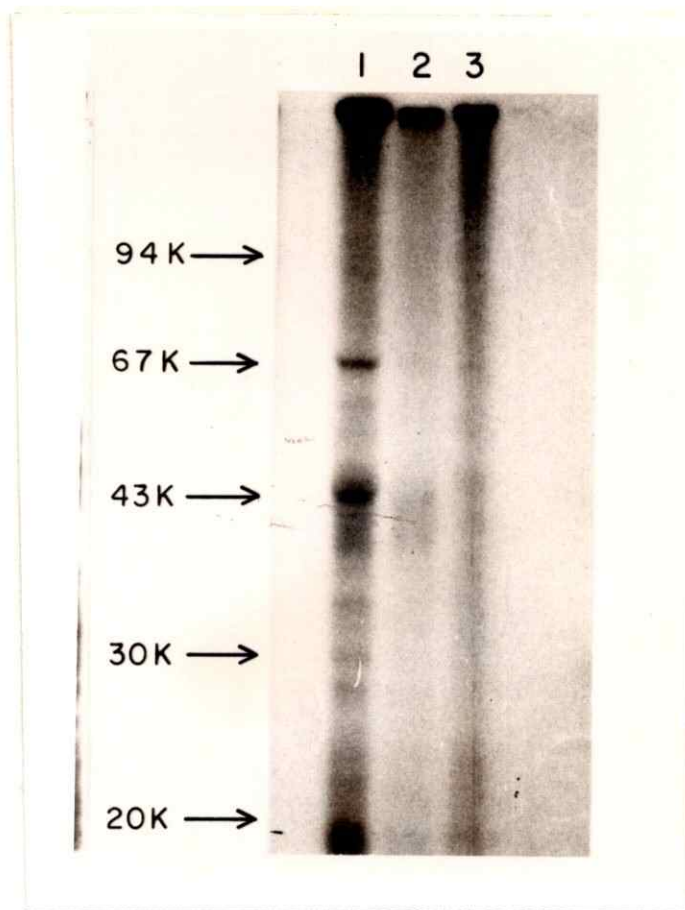


Figura 20. Análisis por autoradiografía de la unión de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]$  GTPox a las proteínas de membrana de oocito.

Las membranas (0,3 mg de proteína de membrana) se incubaron con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]$  GTPox bajo diferentes condiciones y posteriormente las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes, teñidas con azul de Coomassie y sometidas a autoradiografía. El canal 1 contiene membranas tratadas con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]$  GTPox 200  $\mu\text{M}$ . El canal 2 contiene membranas tratadas simultáneamente con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]$  GTPox 200  $\mu\text{M}$  y GTP 10 mM. El canal 3 contiene membranas preincubadas con GTPox 1 mM, lavadas por sedimentación e incubadas finalmente con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]$  GTPox 200  $\mu\text{M}$ . Los pesos moleculares de las proteínas estándares utilizadas se describen en Materiales y Métodos.

(canal 1) y que esta unión puede ser prevenida realizando la incubación de las membranas en presencia de un exceso de GTP no radiactivo (canal 2). La marcación también puede ser prevenida por el tratamiento previo de las membranas con GTPox no radiactivo (canal 3). De estas proteínas que unen GTPox radiactivo, se destacan las con pesos moleculares en el intervalo de 40.000 a 44.000 d. Estas proteínas son importantes, pues sus pesos moleculares coinciden con los pesos moleculares descritos para las subunidades  $\alpha_i$  (peso molecular de 41.000 d) y  $\alpha_s$  (peso molecular de 43.000 d) y que son las subunidades que unen GTP (Gilman, 1984; Hildebrandt y col., 1984). Otra proteína que se destaca y que une GTPox es una proteína con un peso molecular de 67.000 d y que también parece ADP-ribosilarse con toxina del cólera (figura 14).

La visualización de proteínas marcadas con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]$  GTPox después de un tratamiento tan drástico como lo es la electroforesis en condiciones desnaturalantes, indica que la unión de este nucleótido a las proteínas es de tipo covalente.

## DISCUSION

### A. PARTICIPACION DEL $Ca^{2+}$ Y DE LA CALMODULINA EN LA REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENILILCICLASA Y EN LA INHIBICION POR LA PROGESTERONA.

Varios sistemas de adenililciclase son activados por concentraciones micromolares de  $Ca^{2+}$  y se ha demostrado que en esta activación está participando la calmodulina. Esta regulación parece estar presente solamente en tejidos neurosecretorios (Brostrom y col., 1975; Heideman y col., 1982). Sin embargo, recientemente se ha descrito esta misma activación dependiente de  $Ca^{2+}$ -calmodulina, en músculo liso de aorta de bovino (Piascik y col., 1983).

Los criterios más utilizados para determinar si la regulación de la adenililciclase u otro sistema, esta gobernada por  $Ca^{2+}$  y calmodulina son:

- a) La actividad de la adenililciclase debe ser alterada por remoción o por bloqueamiento de la acción de la calmodulina a través de algún medio apropiado.
- b) La adenililciclase desprovista de la calmodulina endógena debe responder a la adición de calmodulina exógena.
- c) La actividad adenililciclase inducida por la adición exógena de calmodulina y  $Ca^{2+}$  o solamente por la adición de  $Ca^{2+}$  debe volver a los niveles basales por la adición de un agente quelante del  $Ca^{2+}$ ,



como EGTA.

d) La adición de una fenotiazina, conocidos inhibidores de la calmodulina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , debe disminuir la activación de la adenililciclase por  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina.

Basándose en los criterios expuestos anteriormente y a los resultados obtenidos en esta tesis, parece improbable que la adenililciclase de oocitos sea regulada por  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina. Se vió por ejemplo que la adenililciclase de oocitos no es activada por la adición de  $\text{Ca}^{2+}$ , si no más bién inhibida (tabla 4). Esta inhibición de la enzima por  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido descrita en una serie de otros sistemas de adenililciclase y es independiente de la presencia de calmodulina (Steer y Levitzki, 1975; Mahaffee y Ontjes, 1980; Lasker y col., 1982). Además la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina a la adenililciclase de oocitos tampoco activa a esta enzima (tabla 4).

Estos hallazgos indican que, bajo las condiciones utilizadas, la adenililciclase no es sensible a la acción de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina exógena.

La inhibición causada por fenotiazinas como criterio para establecer la participación de la calmodulina en procesos regulados por  $\text{Ca}^{2+}$ , ha sido muy criticada. (Landry y col., 1981; Corps y col., 1982).

Se ha estudiado con detalle el efecto de estas drogas en la estructura y organización de la membrana celular y se ha visto que ellas alteran la fluidez de la membrana debido a interacciones hidrofóbicas entre la droga y la membrana (Norman y Drummond, 1979;

Salesesse y col., 1982a; Salesse y col., 1982b). Ha sido demostrado por ejemplo que concentraciones de fenotiazinas que causan una alteración en la fluidez de la membrana de eritrocitos, inhiben la actividad de la adenililciclase (Landry y col., 1981; Salesse y col., 1982a; Salesse y col., 1982b) y el efecto farmacológico de estas drogas no está relacionada con su capacidad de unir calmodulina (Corps y col., 1982).

En la inhibición de la adenililciclase por el derivado de fenotiazina CAPP, no participaría la calmodulina, pues la inhibición no requiere iones  $\text{Ca}^{2+}$  y la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina no modifican el efecto de CAPP (tabla 4).

La proteína reguladora Ns parece ser esencialmente sensible a la acción de CAPP, pues concentraciones de CAPP entre 10 y 100  $\mu\text{M}$  de CAPP, alteran la actividad de la adenililciclase estimulada por efectores que actúan a través de esta proteína, tales como toxina del cólera, nucleótidos de guanosina y iones fluoruro (figura 8). Por otro lado, estas mismas concentraciones de la droga, no afectan la actividad de la subunidad catalítica C de la enzima estimulada por forskolina o  $\text{Mn}^{2+}$  (figura 8, tabla 5).

Concentraciones de CAPP menores que 100  $\mu\text{M}$  estimulan la activación de Ns por fluoruro e inhiben la activación de Ns por GMP.P(NH)P, toxina del cólera y GTP (figura 8, tabla 5) efectos que fueron descritos por Wolff y Jones (1970) hace quince años. Esta respuesta opuesta a CAPP, sugiere que el nucleótido de guanosina y fluoruro tienen efectos diferentes en la subunidad Ns y en su interacción con la subunidad catalítica C.

Concentraciones de CAPP mayores que 100  $\mu\text{M}$  aparentemente afectan la membrana en una forma más general, pues causan la inhibición de la adenililciclasa estimulada ya sea por fluoruro o forskolina y también causan la inhibición de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos independiente de calmodulina, la cual está presente en las mismas membranas. Wolff y Jones (1970) también observaron inhibición de otras enzimas de membrana por estas drogas, como la ATPasa dependiente de sodio y potasio en membranas de tiroide.

La inhibición de la adenililciclasa de oocito por CAPP 100  $\mu\text{M}$  es similar a la inhibición de la enzima por progesterona 1  $\mu\text{M}$ , ya que ambas son dependientes de nucleótidos de guanósina (Jordana y col., 1981). Sin embargo los dos inhibidores no compartían mecanismos similares de acción pues sus efectos son aditivos (figura 8). El CAPP inhibió la adenililciclasa de células foliculares la cual es insensible a progesterona (tabla 5), mientras que la progesterona no estimuló la actividad de la adenililciclasa en presencia de fluoruro (Jordana, 1982).

La aditividad en la inhibición causada por el derivado de fenotiazina y progesterona puede explicar por que concentraciones de flufenazina menores que 200  $\mu\text{M}$  potencian la acción de la hormona esteroïdal, en el oocito, hallazgos encontrados por Cartaud y col., (1981). La inhibición de la maduración observada por ellos, utilizando altas concentraciones de la droga, puede deberse a un efecto inespecífico de estos derivados en la estructura de la membrana del oocito y no a un proceso en el cual participa la calmodulina.

Los resultados presentados en esta tesis por tanto no apoyan la hipótesis que la calmodulina esté participando en la inducción hormonal de la maduración, regulando la actividad de la adenililciclase de membrana a través de un proceso que requiere  $Ca^{2+}$ .

#### B. POSIBLE PARTICIPACION DE LA PROTEINA REGULADORA Ni EN LA INHIBICION DE LA ADENILILCICLASE POR LA PROGESTERONA.

Se mencionó en la INTRODUCCION, que la inhibición de la adenililciclase por hormonas descrita en varios tejidos y esta inhibición presenta dos características fundamentales: es dependiente de la presencia de nucleótidos de guanosina y en ella participa la proteína reguladora Ni.

La inhibición de la adenililciclase de oocitos por la progesterona presenta la primera característica (Jordana y col., 1981) y uno de los objetivos principales de esta tesis fue estudiar si la segunda característica se cumple, es decir, buscar la presencia de Ni en las membranas de oocitos y ver la posibilidad que ella participe en los efectos inhibidores de la progesterona.

Los criterios más utilizados actualmente para determinar la presencia y participación de Ni en el proceso de inhibición hormonal pueden resumirse de la siguiente manera: a) ADP-ribosilación de una proteína de membrana de peso molecular 41.000 d por la toxina de B. pertussis, correspondiente a la subunidad  $\alpha_i$ .

b) Reversión del efecto inhibidor de la hormona por la acción de la toxina de B. pertussis.

c) Inhibición de la actividad de la adenililciclase estimulada por forskolina, por concentraciones de GMP.P(NH)P menores que  $1 \mu M$ .

d) No aditividad en la estimulación de la actividad de la adenililciclase por GMP.P(NH)P y forskolina.

e) Eliminación del efecto inhibitor de la hormona por GDP/ $\beta$ S.

Los estudios realizados en esta tesis utilizando la toxina de B. pertussis han demostrado claramente por primera vez la presencia en membranas de oocitos de una proteína que es sustrato para la actividad ADP-ribosilante de esta toxina (Olate y col., 1984). Esta proteína sustrato tiene un peso molecular de 41.000 d, calculado a partir de su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida (figuras 11 y 12). Basándose en los hallazgos de Katada y col., (1982a y b), los cuales demostraron que la toxina B. pertussis ADP-ribosila la subunidad  $\alpha_i$  de la proteína reguladora Ni de la adenililciclase, es factible pensar entonces que en membranas de oocitos existe una proteína homóloga a la proteína Ni presente en mamíferos.

Aún cuando se demostró la existencia de una proteína homóloga a Ni en membrana de oocitos, ella no estaría participando en el efecto inhibitor de la progesterona. Esta aseveración está apoyada por una serie de observaciones presentadas en esta tesis.

Se sabe que la ADP-ribosilación de Ni catalizada por la toxina de B. pertussis interfiere con la disociación de las subunidades de esta proteína reguladora impidiendo su acción inhibitora (Jakobs y col., 1984). Por lo tanto en el caso de las membranas de oocitos también debería haberse encontrado una atenuación en la inhibición de la adenililciclase cuando las membranas se preincubaron con la toxina y NAD<sup>+</sup>. Este efecto no se encontró para las membranas de oocitos (tabla

6). Cabe la posibilidad que este efecto no se hubiera observado debido a que la proteína Ni no hubiera sido ADP-ribosilada en su totalidad, quedando una fracción importante de ella sin modificar, la cual aún mediaría la inhibición causada por la progesterona. Esta posibilidad queda descartada, pues se logró ADP-ribosilar completamente la población de moléculas de Ni al menos expuestas a la acción de la toxina (figura 12).

Por otro lado, el análisis de otro criterio para identificar la acción de Ni también fue negativo. Es así como la activación de la subunidad catalítica C por forskolina no fue sensible a la acción de la proteína Ni en presencia de bajas concentraciones de GMP.P(NH)P (figura 13), concentraciones a las cuales se ha demostrado que Ni se disocia e inhibe a la enzima en otros sistemas (Katada y col., 1984a,b y c).

La adición de Ni exógeno purificado a homogeneidad proveniente de eritrocito humano en presencia de GMP.P(NH)P no tiene ningún efecto en la actividad de la adenililciclase tanto en presencia como en ausencia de progesterona (tabla, 7). El hecho que la proteína Ns de eritrocito humano active a la adenililciclase de oocitos bajo condiciones similares (tablas 7 y 10), indica que es poco probable que la proteína Ni exógena no pueda interaccionar con la membrana. Además, este tipo de complementación con la proteína Ni purificada se ha logrado en una serie de otros sistemas, permitiendo inclusive realizar estudios acerca del mecanismo de acción de esta proteína. Por ejemplo, se ha demostrado que esta proteína purificada al ser adicionada a membranas de plaquetas humanas, cuya proteína Ni ha sido

modificada e inactivada, restablece el efecto inhibitor de nucleótidos de guanosina y de la hormona epinefrina (Katada y col., 1984a).

En sistemas de adeniliciclasa en los cuales los componentes Ns, Ni y C son funcionalmente activos, no se encuentra aditividad en la activación por GMP.P(NH)P y forskolina, debido a que la activación de la enzima causada por el nucleótido de guanosina y forskolina, a nivel de Ns y C respectivamente, es contrarrestada por la acción inhibitora de Ni. Contrariamente a esto, en el sistema de oocito, se encuentra una aditividad perfecta en la estimulación de la actividad de la enzima por ambos efectores (figura 12 y tabla 1), sugiriendo que en las membranas de oocitos solamente se manifiesta la participación de la proteína Ns y de la subunidad catalítica C y no de la proteína Ni. La no participación de la proteína Ni en el proceso de inhibición también es apoyada por resultados de Jordana (1984), en los cuales el análogo de GDP, el GDP $\beta$ S, no elimina la inhibición causada por la progesterona sino que al contrario la potencia. En sistemas de adeniliciclasa en los cuales participa la proteína Ni, el GDP $\beta$ S se une a esta proteína e impide su disociación promovida por la hormona inhibitora, causando de esta forma una reversión en la inhibición (Jakobs y col., 1983; Hildebrandt y Birnbaumer, 1983). En resumen, basándose en los criterios de análisis descritos anteriormente, los antecedentes acumulados hasta ahora indican que aunque la inhibición de la adeniliciclasa de oocitos es dependiente de nucleótidos de guanosina, la proteína Ni no estaría participando en el proceso de inhibición hormonal. Esto confiere al sistema de oocitos otra diferencia

fundamental con respecto al mecanismo descrito para otras hormonas inhibitoras, aparte del hecho que la adenililciclase es única en su capacidad de ser regulada por una hormona esteroideal.

Estos resultados, sin embargo, no demuestran que la proteína Ni detectada con la toxina de B. pertussis sea idéntica estructuralmente y funcionalmente a la proteína Ni involucrada en la inhibición de la adenililciclase en otros sistemas. Existe la posibilidad que la proteína Ni de oocitos cumpla otro rol en la membrana de estas células.

Al respecto, en estos últimos dos años una serie de trabajos han mostrado que posiblemente la proteína Ni esté involucrada en la regulación de otros procesos. Así por ejemplo, Nakamura y Ui (1983) mostraron que en mastocitos de rata expuestos a la acción de la toxina de B. pertussis, se suprime la liberación de histamina en respuesta a la acción de varias hormonas, sin cambios en los niveles intracelulares de cAMP. Por otro lado Okajima y Ui (1984) encuentran que la exposición de neutrófilos de cobayo a un péptido quimiotáctico, conduce a estas células a liberar ácido araquidónico a partir de fosfolípidos de membrana y a generar también supeóxidos. Todas estas respuestas son suprimidas cuando las células son tratadas con toxina de B. pertussis. Lo más interesante de estos estudios es que hay una relación estrecha entre la pérdida de estas funciones y la ADP-ribosilación de una proteína de membrana con un peso molecular de 41.000 d. Aún más, recientemente Bokoch y Gilman (1984) han encontrado idénticos resultados utilizando el sistema anterior y además demuestran que la inhibición de la secreción de histamina causada por la toxina de B. pertussis es específica, sucede sin



alteración de la actividad adenililciclase y la proteína ADP-ribosilada comigra con la subunidad  $i$  de la proteína  $N_i$ . Se ha encontrado además en membranas de cerebro de bovino y en membranas de células grasas, la presencia de proteínas que unen nucleótidos de guanosina, tienen pesos moleculares entre 39.000 y 40.000 d, y que son ADP-ribosiladas por toxina de B. pertussis, las cuales no estarían acopladas a la adenililciclase (Malbon y col., 1984; Sternweis y Robishaw, 1984).

Todo esto lleva a pensar que existiría probablemente una familia de proteínas homólogas a  $N_i$ , que estarían mediando otros procesos en la membrana plasmática de la célula además de la inhibición de la adenililciclase.

Es interesante hacer una analogía entre las proteínas reguladoras  $N_i$  y  $N_s$  con otras proteínas que también unen GTP y GDP y que cumplen importantes y diferentes funciones en sistemas procariontes y eucariontes. Así por ejemplo, el factor Tu involucrado en la etapa de elongación de la síntesis de proteínas E. coli, la transducina implicada en el proceso de visión en la retina, los factores de iniciación de la síntesis proteica en eucariontes (eIF-2) y la proteína tubulina, pertenecen a una clase de proteínas que unen GDP, GTP, presentan actividad GTPásica y alguna de ellas son ADP-ribosiladas por toxinas bacterianas (Allende, 1982; Hughes, 1983). Aún más, ciertos componentes de estos sistemas son intercambiables entre sí, desempeñando la misma función aún cuando pertenecen a sistemas tan diferentes como los nombrados anteriormente (Bitenski y col., 1982; Manning y Gilman, 1983; Kanaho y col., 1984).

Finalmente, la posibilidad que las proteínas reguladoras Ns y Ni estén relacionadas con el producto del oncogen ras, involucraría a estas proteínas en otra función tan importante como es el control de la proliferación celular (Kataoka y col., 1985; Toda y col., 1985).

Estos hallazgos indican que el rol de estas proteínas reguladoras unidas a membranas y que sirven de traductores de señales externas, no siempre están asociadas al metabolismo del cAMP.

#### C. PARTICIPACION DE LA PROTEINA REGULADORA Ns EN LA INHIBICION DE LA ADENILILCICLASA POR LA PROGESTERONA.

Los trabajos previos realizados por Jordana y col., (1981a y b) han mostrado que las características de la adenililciclase de oocitos pueden ser explicadas bastante bien por el modelo general propuesto por Rodbell (1980), en el cual la actividad de la subunidad catalítica C puede ser estimulada por el componente regulador Ns, el cual a su vez es activado por nucleótidos de guanosina, por  $F^-$  y por toxina del cólera y GTP.

La ADP-ribosilación por toxina del cólera de una proteína con un peso molecular de 43.000 d, homóloga a la proteína Ns presente en mamíferos (figura 14), es una fuerte evidencia que apoya la idea de la existencia de Ns en membranas de oocitos. También se observó la presencia de otras proteínas ADP-ribosiladas por esta toxina, con pesos moleculares superiores a 43.000 d. La heterogeneidad de sustrato mostrada por la toxina del cólera es una característica que se encuentra con frecuencia en el uso de esta toxina, a diferencia de la mostrada por la toxina de Bordetella pertussis, la cual tiene especificidad por una sola proteína de peso molecular 41.000 d (figura 11).

No se sabe si las especies ADP-ribosiladas de mayor peso molecular son precursores de la proteína Ns, pero en todo caso son especies minoritarias comparadas con la proteína de peso molecular de 43.000 d.

La enzima de oocitos, cuando es activada por GMP.P(NH)P y  $Mg^{2+}$ , presenta una cinética de reacción con un período inicial de retardo (figuras 4 y 5). Este fenómeno de histeresis se ha descrito para una serie de otras adenililciclasas (Schramm y Rodbell, 1975; Iyengar y Birnbaumer, 1981), pero existen discrepancias en la interpretación de este retardo y actualmente se han postulado dos hipótesis. Algunos postulan que el retardo se debería a un intercambio lento entre el GDP que sale y el GTP que entra al sitio de unión presente en la proteína Ns. Se ha visto que este intercambio es la etapa limitante en la adenililciclase de eritrocito de pavo (Cassel y Selinger, 1977). Otros postulan que existe una isomerización lenta entre la forma inactiva y la forma activa de la proteína Ns, dando origen a este retardo. Este proceso sería regulado por el ión  $Mg^{2+}$  y no por la unión del nucleótido de guanosina (Iyengar y Birnbaumer, 1981).

Con respecto a la primera hipótesis, la disminución en las velocidades en estado estacionario, causadas por la progesterona (figura 15, tabla 8) y la dependencia de este efecto de la concentración de GMP.P(NH)P, puede ser explicado por un efecto de la progesterona en el intercambio de nucleótidos. La hormona esteroideal podría estar afectando este intercambio de nucleótidos disminuyendo la afinidad de la proteína Ns por los nucleótidos de guanosina que la activan o aumentando la afinidad por los nucleótidos que la inhiben (GDP, GDP/βS).

Resultados obtenidos por Jordana y col., (1983) apoyan bastante esta idea. Ellos observaron que la inhibición causada por la progesterona, en presencia de concentraciones saturantes de GMP.P(NH)P, puede ser aumentada y potenciada cuando se adiciona GDP $\beta$ S al ensayo. Recientemente Sadler y Maller (1983), muestran que la inhibición de la adenililciclase de oocitos por la progesterona se debería principalmente a una disminución en el intercambio de nucleótidos de guanosina, aunque los experimentos de unión e intercambio no demuestran si esto se debe a un aumento de afinidad de la proteína Ns por GDP.

Estudios de unión de [ $^3$ H]GMP.P(NH)P a membranas de oocitos, no mostrados en esta tesis, han permitido calcular una constante de disociación aparente de 1,5  $\mu$ M para este nucleótido. Este valor es muy similar al valor de Km aparente de 3  $\mu$ M, encontrada por Jordana (1982) a partir de datos cinéticos. No se han realizado los mismos experimentos de unión en presencia de progesterona, ya que obviamente la realización de ellos permitirá elucidar si la hormona esteroidea está afectando la unión de GMP.P(NH)P.

Los resultados encontrados en esta tesis apoyan la segunda hipótesis, pues la activación de la enzima por diferentes concentraciones de GMP.P(NH)P no muestra variación en el período de retardo (figura 4, tabla 2). Si la etapa limitante predominante en el sistema de oocito hubiese sido el intercambio de nucleótidos, se debería haber encontrado un aumento en los valores de  $\tau_{ap}$  y una disminución en los valores de  $t_{1/2}$ , al utilizar concentraciones crecientes de GMP.P(NH)P. Además, cuando la concentración de GMP.P(NH)P se mantuvo constante y

las concentraciones de  $Mg^{2+}$  fueron aumentadas, los períodos de retardo disminuyeron (aumento de  $\gamma_{ap}$  y disminución de  $t_{1/2}$ ), indicando que el  $Mg^{2+}$  de alguna manera regularía los niveles de la forma activa de la proteína  $N_s$ , proceso que sería independiente de la concentración de nucleótidos de guanosina.

La activación de la enzima por concentraciones crecientes de ión  $Mg^{2+}$  puede deberse al aumento de formación del complejo  $Mg-ATP$ , el cual es el sustrato óptimo de la subunidad catalítica C en presencia de  $GMP.P(NH)P$ . Esta posibilidad es improbable, pues el efecto activador del  $Mg^{2+}$  se sigue observando a concentraciones del catión muy superiores (10 a 30mM) a las concentraciones de ATP utilizadas en el ensayo y que son de 100  $\mu M$ . A concentraciones de  $Mg^{2+}$  superiores a 100  $\mu M$  todo el ATP está en la forma de  $Mg-ATP$ , no existiendo la posibilidad entonces de un aumento en la formación de este sustrato.

Cuando se analizó el efecto de la progesterona sobre la regulación de la adenililciclase por  $Mg^{2+}$  no se encontró que la hormona esteroïdal afectara los requerimientos de  $Mg^{2+}$  por la enzima (figura 7). Contrariamente a lo que realizan las hormonas estimuladoras, la progesterona no produjo un aumento en las concentraciones de  $Mg^{2+}$  necesarias para obtener el mismo grado de activación de la enzima en ausencia de la hormona esteroïdal. Esto es apoyado por el hecho que la activación máxima de la adenililciclase se alcanza a una misma concentración de  $Mg^{2+}$  tanto en ausencia como en presencia de progesterona (figura 7). La inhibición de la adenililciclase por la progesterona tampoco fue afectada por concentraciones crecientes de

$Mg^{2+}$ , manteniéndose esta inhibición en alrededor de un 40% (figura 7). Podemos decir por lo tanto que la progesterona no afecta la regulación de la adenililciclase por el ión  $Mg^{2+}$ .

La progesterona, eso si, afecta la cinética de activación de la enzima por GMP.P(NH)P en dos formas. Por un lado aumenta el período de latencia de la reacción y por otro lado disminuye las velocidades en estado estacionario de la enzima (figura 15, tabla 8). Basándose en evidencias recientes que indican que la activación de la proteína Ns por el nucleótido de guanosina se debe a una disociación de esta proteína en sus subunidades  $\alpha_s$  y  $\beta_\mu$ , existe la posibilidad que la progesterona interfiera con este proceso de disociación y de esta manera causar la inhibición. Analizando esta posibilidad, se encontró que la hormona esteroidea no afecta por si sola la etapa de disociación de una proteína Ns de eritrocito humano, pues la proteína Ns activada fuera de la membrana, ya sea en presencia o en ausencia de progesterona, estimuló en igual forma la actividad de la adenililciclase de membranas cyc<sup>-</sup> S40 (tabla 9). Idénticos resultados se encontraron cuando la proteína Ns fue activada en la membrana (tabla 10).

Probablemente sea necesario la participación de una proteína receptora específica para progesterona, la cual permita el efecto hormonal. Esta idea es apoyada por el hecho que progesterona tampoco inhibe la activación de Ns cuando esta proteína está incorporada en membranas cyc<sup>-</sup> S40 (tabla 10). La explicación podría ser entonces, que estas membranas no posean la proteína receptora. Con respecto a

esto, estudios no incluidos en esta tesis, mostraron que la progesterona no inhibe la actividad adenililciclase presente en membranas de eritrocito humano, de plaquetas y de células de linfoma S49 silvestres (todas ellas con una proteína Ns funcional), indicando la necesidad de una proteína receptora que medie los efectos de la hormona esteroideal. Lo mismo ha sido encontrado por Jordana (1982) para la adenililciclase de células foliculares de oocitos de Xenopus laevis. Todo esto hace pensar que posiblemente la especificidad de tejido mostrada por la progesterona, este determinada por la presencia de una proteína receptora en la membrana del oocito. Maller y col., (1982), utilizando un derivado de fotoafinidad de la progesterona, han detectado en membranas de oocitos la presencia de una proteína con un peso molecular de 100.000 d que une este derivado. El peso molecular de esta proteína es similar al del receptor de progesterona de oviducto de pollo, pero no comparte características relacionadas con la unión de otros agonistas y antagonistas esteroidales.

Los experimentos de complementación dirigidos a establecer una relación entre la activación de la proteína Ns y su inhibición por la progesterona a través de una proteína receptora, utilizando para ello membranas de oocitos, no ayudaron a esclarecer esta posibilidad. Se vió por ejemplo que la proteína Ns adicionada exógenamente a membranas de oocitos y activada por GMP.P(NH)P y  $Mg^{2+}$  es capaz de estimular la actividad de la subunidad catalítica C de la adenililciclase de oocitos (tabla 7). Esta estimulación adicional sin embargo, no fue sensible a la inhibición por la progesterona (tabla 7). Estos resultados indican que aunque la proteína reguladora Ns exógena puede interactuar

con la subunidad catalítica C, ella no puede actuar como una proteína traductora del efecto hormonal. Posiblemente el complejo progesterona receptor esté acoplado a la proteína Ns endógena en una forma diferente a la que se puede establecer con la proteína Ns exógena bajo las condiciones utilizadas en estos experimentos. Se ha visto que para obtener una adecuada interacción de la proteína N con la subunidad catalítica C de la adenililciclase es indispensable el uso de fosfatidilcolina y lisofosfatidilcolina (Hebdon y col., 1981; Ross 1982). Posiblemente en este caso también sea necesaria la presencia de estos fosfolípidos en el medio de incubación para lograr una buena reconstitución del sistema y permitir que la proteína Ns quede correctamente acoplada al complejo hormona-receptor. Tampoco puede descartarse la posibilidad que la proteína Ns adicionada no se haya incorporado correctamente a la membrana debido a la falta de un proceso normal de glicosilación y transporte a nivel del aparato Golgi. Existe una gran correlación entre el grado de glicosilación de una proteína y su función como proteína intrínseca de membrana. Posiblemente la proteína Ns utilizada en estos experimentos no este glicosilada del todo y esto afecte su integración a la membrana. Los efectos vistos al adicionar la proteína Ns a la membrana del oocito pueden representar una interacción de Ns con la subunidad catalítica C en un ambiente lipídico no adecuado de la membrana y por lo tanto no descartan la posibilidad de una interacción proteína Ns-receptor en condiciones adecuadas.



Los experimentos realizados con el GTPox permitieron estudiar desde otro punto de vista la participación de la progesterona en el proceso de activación de Ns. Mediante el uso de este derivado de GTP se logró inactivar la proteína Ns endógena dejando la mayor parte de la subunidad catalítica C funcionalmente activa. Bajo estas condiciones se facilita el estudio posterior de la acción de la progesterona en la activación de la proteína Ns exógena en ausencia de actividad Ns endógena. Los resultados encontrados en esta tesis demostraron que el tratamiento de las membranas de oocitos con el GTPox afectó la actividad de la adenililciclase presente en las membranas de oocitos debido a que el GTPox reacciona preferencialmente con la proteína reguladora Ns. Las evidencias que indican la susceptibilidad de Ns a la acción del GTPox, son que la presencia de GTP durante la reacción con el dialdehído protege de la inactivación de la enzima (tabla 12) y que la activación de la enzima por efectores que actúan a través de Ns ( $F^-$  y  $GMP.P(NH)P$ ), se encuentra fuertemente disminuida por el tratamiento con GTPox (tabla 12). La reacción con GTPox también disminuyó la activación de la adenililciclase por forskolina, pero en menor grado si se la compara con los efectos anteriores. Esto es interesante, pues forskolina actúa principalmente a través de la subunidad catalítica C. Por lo tanto, no debería haberse encontrado en este caso efecto alguno por GTPox. La activación de la enzima por el ión  $Mn^{2+}$ , otro efector de la subunidad catalítica C, no fue afectada por el GTPox. Esta discrepancia y diferencia en el efecto entre estos dos activadores de la subunidad catalítica C, puede ser explicada si la proteína Ns participara de

alguna manera en la activación de C por forskolina y no en la activación por  $Mn^{2+}$ . Una explicación similar ha sido propuesta por Wong y col., (1983), quienes obtuvieron resultados similares utilizando GTP- $\gamma$ -azidoanilido como derivado de GTP modificador de la actividad de la adenililciclase en hígado de rata. A pesar de esta diferencia, es claro que la modificación afecta a la proteína Ns en mayor grado que a la subunidad catalítica C. Esta selectividad de acción del GTPox se observa aún mucho mejor, cuando al ensayo se adiciona AMP.P(NH)P, con el propósito de proteger a la subunidad catalítica C de la inactivación por el GTPox (figura 16). En este caso también se observó una pequeña protección de la proteína Ns por parte del AMP.P(NH)P. Este hecho sugiere que el AMP.P(NH)P esta entrando también al sitio de unión para GTPox ubicado en la proteína Ns. Cuando se analizaron las concentraciones necesarias de GTPox para lograr la máxima inactivación, se vió que sólo a concentraciones entre 0,5 y 1 mM de GTPox se alcanzó el efecto máximo (figura 17). Estas concentraciones son muy superiores al valor de la  $K_m$  aparente para GMP.P(NH)P calculada por Jordana (1982), y que es de 3  $\mu M$ . Este hecho se puede deber a la diferencia en estructura entre ambos nucleótidos, siendo el GTPox menos afín por el sistema al tener dos grupos aldehído en vez de dos grupos hidroxilos en posición 2' y 3' del anillo de ribosa. Logicamente se necesitan estudios de unión, utilizando ambos nucleótidos radiactivos, para determinar con mayor certeza estas diferencias de afinidad.

El hallazgo más interesante de este trabajo es que el

tratamiento de las membranas con GTPox elimina prácticamente toda la inhibición causada por la progesterona y la actividad residual, que es alrededor de un 25%, es inhibida solamente en un 9% (tabla 13). El hecho que se este afectando principalmente la función de la proteína Ns con el GTPox y que esto se traduzca en una pérdida casi total en la inhibición causada por la progesterona, apoya fuertemente la idea que la hormona esteroideal esté actuando a través de Ns.

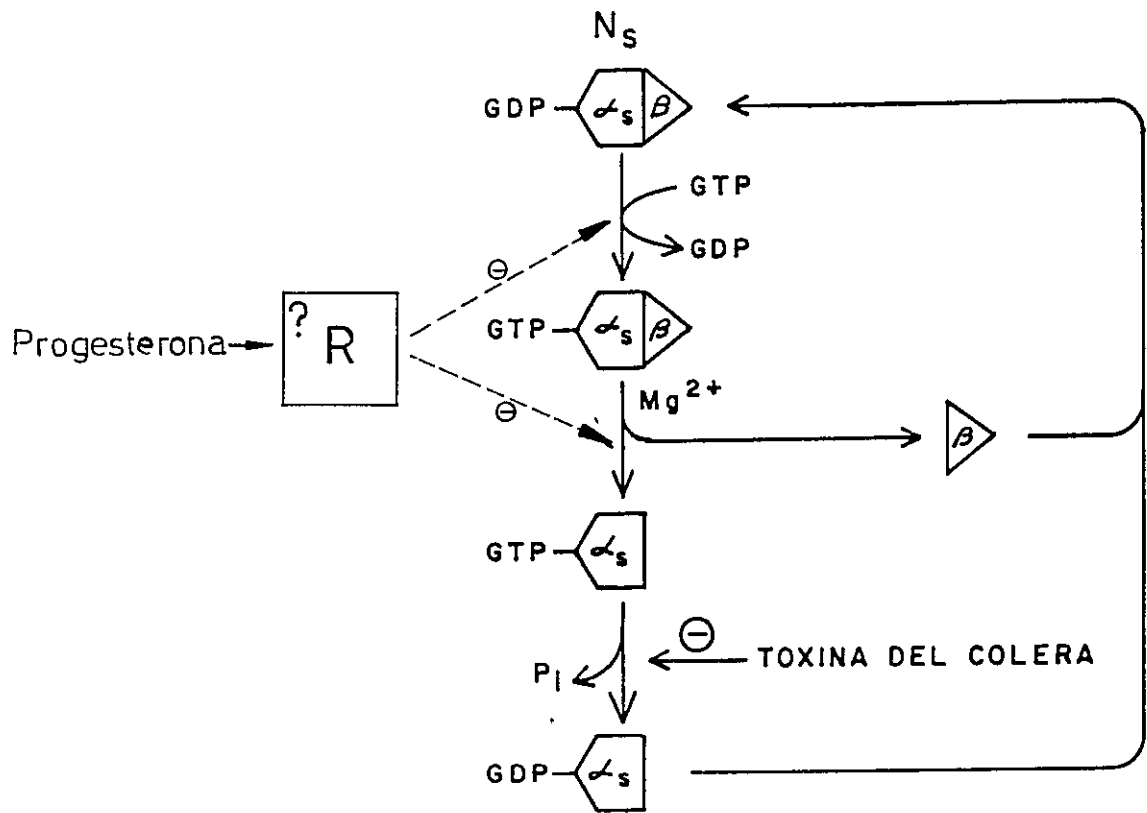
Similarmente a los resultados mostrados en la tabla 7, cuando se adicionó la proteína Ns pura proveniente de eritrocito humano a las membranas de oocitos tratadas con GTPox, se vio que el Ns exógeno activó a la subunidad catalítica C, pero la activación causada por la proteína Ns adicionada no fue sensible a la hormona esteroideal (figura 19). Las causas probables de este fenómeno fueron discutidas anteriormente y se deben posiblemente a condiciones no adecuadas en la reconstitución del sistema enzimático.

Los resultados obtenidos al agregar Ns exógeno a las membranas no tratadas con GTPox, mostraron que cuando se adiciona un exceso de proteína Ns exógena, condición en la cual presumiblemente la subunidad catalítica C es limitante, desaparece el efecto inhibitorio de la progesterona (figura 19). Este resultado podría ser explicado si se postula que la proteína Ns endógena y la proteína Ns exógena compiten por la subunidad catalítica C. Por lo tanto, a altas concentraciones de Ns exógeno la función de la proteína Ns endógena, que es la única sensible a la hormona, sería desplazada y eliminada. Recientemente Arad y col., (1984), muestran evidencias que indican que la proteína Ns y la subunidad catalítica C están fuertemente asociadas en la membrana.

El uso de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]$  GTPox permitió visualizar las proteínas de membrana que unen este derivado de GTP. Se encontró una marcación mayoritaria de proteínas con pesos moleculares entre 43.000 y 41.000 d, rango descrito para las proteínas Ns y Ni. Además se observó una proteína que une GTPox con un peso molecular de 67.000 d (figura 20). Es interesante hacer notar que una de las proteínas ADP-ribosiladas por la toxina del cólera también tiene un peso molecular de 67.000 d (figura 14). Esto sugiere una relación entre la unión de GTP por parte estas proteínas y su capacidad de ser ADP-ribosiladas por toxinas bacterianas. Esto ha sido demostrado para una serie de proteínas que unen GTP las cuales también son ADP-ribosiladas por toxinas bacterianas (Cooper y col., 1981).

Esta unión de GTPox a las proteínas es específica, ya que la marcación en presencia de un exceso de GTP no radiactivo o la preincubación de las membranas previamente con GTPox no radiactivo, eliminan totalmente la marcación por  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]$  GTPox (figura 20).

Basándose en los resultados obtenidos y utilizando el ciclo regulador de la activación de la proteína Ns, en el esquema VIII se muestran los posibles mecanismos de acción de la progesterona en la inhibición de la adenililciclase. La hormona, a través de una proteína específica de membrana, interferiría con la activación de la proteína Ns por nucleótidos de guanosina afectando la etapa de disociación de la proteína Ns o la etapa de intercambio de nucleótidos de guanosina.



Esquema VII. Posibles mecanismos de acción de la progesterona en el ciclo regulador de la activación y desactivación de la proteína  $N_s$  por nucleótidos de guanosina.

R = receptor

## CONCLUSIONES

Las conclusiones más importantes que pueden ser obtenidas de esta tesis son:

1. La progesterona inhibe la actividad de la adenililciclase de oocitos y además parece aumentar la fase retardada en la conducta histerética de la enzima. La hormona esteroidal aumenta el período de latencia en la activación de la enzima por nucleótidos de guanosina y también disminuye las velocidades en régimen estacionario de la enzima.
2. La inhibición no está siendo regulada por iones  $Ca^{2+}$  y calmodulina. El efecto inhibitorio de la fenotiazina CAPP se debería a un efecto inespecífico de la droga sobre la membrana del oocito.
3. En los efectos inhibitorios de la progesterona sobre la adenililciclase no participa la proteína reguladora Ni presente en las membranas de oocitos.
4. La modificación química de las membranas por GTPox afecta preferencialmente la función de la proteína Ns. La inhibición de la adenililciclase por la progesterona se pierde casi completamente en las membranas tratadas con GTPox y en membranas con exceso de Ns exógeno.
5. En la inhibición causada por la progesterona participaría la proteína reguladora Ns, presente también en las membranas de oocitos.

## BIBLIOGRAFIA

- Abramowitz, J. y Birnbaumer, L. (1982) Properties of the hormonally responsive rabbit luteal adenylyl cyclase: effects of guanine nucleotides and magnesium ion on stimulation by gonadotropin and catecholamines. *Endocrinology* 110, 773-781.
- Abramowitz, J. y Campbell, A.R. (1984) Enkephalin-mediated inhibition of forskolin-stimulated rabbit luteal adenylyl cyclase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 116, 574-580.
- Abramowitz, J., Iyengar, R. y Birnbaumer, L. (1980) On the mode of action of catecholamines on the turkey erythrocyte adenylyl cyclase: evaluation of basic activity states after removal of endogenous GDP and interpretation of nucleotide regulation and hormone activation in terms of a two state model. *J. Biol. Chem.* 255, 8259-8265.
- Aktories, K. y Jakobs, K. (1981) Epinephrine inhibits adenylate cyclase and stimulates a GTPase in human platelet membranes via alpha-adrenoceptors. *FEBS Lett.* 130, 235-238.
- Aktories, K., Schultz, G. y Jakobs, K. (1982) Stimulation of a low Km GTPase by inhibitors of adipocyte adenylate cyclase. *Mol. Pharmacol.* 21, 336-342.
- Allende, J. (1982) The binding, hydrolysis and release of GTP and GDP as a mechanism that regulates the reversible association of macromolecules: a comparison of four different systems. *Arch. Biol. Med. Exp.* 15, 347-355.
- Allende, C. y Allende, J. (1982) Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase of amphibian oocytes is inhibited in vivo. *Biochem. Int.* 5, 91-96.
- Allende, C., Bravo, R. y Allende, J. (1977) Comparison of in vivo and in vitro properties of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase of amphibian oocytes. *J. Biol. Chem.* 252, 4662-4666.
- Baulieu, E., Godeau, F., Schorderet, M. y Schorderet-Slatkine, S. (1978) Steroid induced meiotic division in Xenopus laevis oocytes: surface and calcium. *Nature* 275, 593-598.
- Bender, J. y Neer, E. (1983) Properties of the adenylate cyclase catalytic unit from caudate nucleus. *J. Biol. Chem.* 258, 2432-2439.

Berridge, M. e Irvine, R. (1984) Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315-321.

Bird, S. y Maguire, M. (1978) The agonist-specific effect of magnesium ion on binding by beta-adrenergic receptors in S49 lymphoma cells. Interaction of GTP and magnesium in adenylate cyclase activation. *J. Biol. Chem.* 253, 8826-8834.

Birnbaumer, L., Torres, H.N., Flawiã, M.N. y Fricke, R.F. (1979) Improved methods for determination of guanylyl cyclase activity and synthesis of  $\alpha$ -<sup>32</sup>P GTP. *Anal. Biochem.* 93, 124-133.

Birnbaumer, L., Swartz, T., Abramowitz, J., Mintz, P. e Iyengar, R. (1980) Transient and steady state kinetics of the interaction of nucleotides with the adenylyl cyclase system from rat liver plasma membranes: Interpretation in terms of a simple two-state model. *J. Biol. Chem.* 255, 3542-3551.

Birnbaumer, L., Codina, J., Hildebrandt, J., Sunger, T., Iyengar, R., Sekura, R., y Manclarck, C. (1983) Mechanisms in the vectorial receptor - adenylate cyclase signal transduction. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 17, 111-126.

Bitensky, M., Wheeler, M., Rarenick, M., Yamasaki, A., Stein, P., Halliday, K. y Wheeler, G. (1982) Functional exchange of components between light-activated photoreceptor phosphodiesterase and hormone-activated adenylate cyclase systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3408-3412.

Bitonti, A., Moss, J., Tandon, N. y Vaughn, M. (1980) Prostaglandins increase GTP hydrolysis by membranes from human mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* 255, 2026-2029.

Blondeau, J. y Baulieu, E. (1984) Progesterone receptor characterized by photoaffinity labelling in the plasma membrane of Xenopus laevis oocytes. *Biochem. J.* 219, 785-792.

Blume, A., Lichtshtein, D. y Boone, G. (1979) Coupling of opiate receptors to adenylate cyclase: Requirement for Na<sup>+</sup> and GTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5626-5630.

Bokoch, G. y Gilman, A. (1984) Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin. *Cell* 39, 301-308.

Bokoch, G., Katada, T., Northup, J., Hewlett, E. y Gilman, A. (1983) Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J. Biol. Chem.* 258, 2072-2075.

Bokoch, G., Katada, T., Northup, J., Ui, M. y Gilman, A. (1984) Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259, 3560-3567.



- Bourne, H., Coffino, P. y Tomkins, G. (1975) Selection of a variant lymphoma cell deficient in adenylate cyclase. *Science* 187, 750-752.
- Brandt, D. y Ross, E. (1985) GTPase activity of the stimulatory GTP-binding regulatory protein of adenylate cyclase, Gs. Accumulation and turnover of enzyme-nucleotide intermediates. *J. Biol. Chem.* 260, 266-272.
- Brandt, D., Asano, T., Pedersen, S. y Ross, E. (1983) Reconstitution of catecholamine-stimulated guanosine triphosphatase activity. *Biochemistry* 22, 4357-4362.
- Brandwein, H., Lewicki, J., Waldman, S. y Murad, F. (1982) Effect of GTP analogues on purified soluble guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 257, 1309-1311.
- Bravo, R., Otero, C., Allende, C. y Allende, J. (1978) Amphibian oocyte maturation and protein synthesis: related inhibition by cyclic AMP, theophylline, and papaverine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1242-1246.
- Burns, D., Hewlett, E., Moss, J. y Vaughn, M. (1983) Pertussis toxin inhibits enkephalin stimulation of GTPase of NG 108-15 cells. *J. Biol. Chem.* 258, 1435-1438.
- Burzio, L.O. y Koide, S.S. (1977) Stimulation of poly(adenosine diphosphate ribose) synthase activity of *Xenopus* germinal vesicle by progesterone. *Ann. NY Acad. Sci.* 286, 398-407.
- Cartaud, A. y Ozon, R. (1981) Adenosine 3':5'-monophosphate receptor sites in *Xenopus laevis* oocytes. *Differentiation* 18, 179-184.
- Cartaud, A., Huchon, D., Marot, J., Ozon, R. y Demaille, J. (1981) Calmodulin is involved in the 1st step of oocyte maturation - effects of the antipsychotic drug fluphenazine and of anti-calmodulin antibodies on the progesterone-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell Differ.* 10, 357-363.
- Cassel, D. y Pfeuffer, T. (1978) Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2669-2673.
- Cassel, D. y Selinger, Z. (1976) Catecholamine-stimulated GTPase activity in turkey erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 452, 538-551.
- Cassel, D. y Selinger, Z. (1977) Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3307-3311.

Cassel, D. y Selinger, Z. (1978) Mechanism of adenylate cyclase activation through the beta-adrenergic receptor: catecholamine-induced displacement of bound GDP by GTP. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4155-4159.

Cerione, R., Sibley, D., Codina, J., Benovic, J., Winslow, J., Neer, E., Birnbaumer, L., Caron, M. y Lefkowitz, R. (1984) Reconstitution of a hormone-sensitive adenylate cyclase system. J. Biol. Chem. 259, 9979-9982.

Citri, Y. y Schramm, M. (1980) Resolution, reconstitution and kinetics of the primary action of a hormone receptor. Nature 287, 297-300.

Clark, R., Goka, T., Green, D., Barber, R. y Butcher, R. (1982). Differences in the forskolin activation of adenylate cyclase in wild-type and variant lymphoma cells. Mol. Pharmacol. 22, 609-613.

Clertant, P. y Cuzin, F. (1982) Covalent affinity labeling by periodate-oxidized <sup>32</sup>P ATP of the large-T proteins of polyoma and SV40 viruses. J. Biol. Chem. 257, 6300-6305.

Codina, J., Hildebrandt, J., Iyengar, R., Birnbaumer, L., Sekura, R. y Manclark, C. (1983) Pertussis toxin substrate, the putative Ni of adenylyl cyclases, is an alpha/beta heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4276-4280.

Codina, J., Hildebrandt, J., Sekura, R., Birnbaumer, M., Brian, J., Manclark, R., Iyengar, R. y Birnbaumer, L. (1984a) Ns and Ni, the stimulatory and inhibitory regulatory components of adenylyl cyclase. Purification of the human erythrocyte proteins without the use of activating regulatory ligands. J. Biol. Chem. 259, 5871-5883.

Codina, J., Hildebrandt, J., Birnbaumer, L. y Sekura, R. (1984b) Effects of guanine nucleotides and Mg on human erythrocyte Ni and Ns, the regulatory components of adenylyl cyclase. J. Biol. Chem. 259, 11408-11418.

Cooper, D. (1982) Bimodal regulation of adenylate cyclase. FEBS Lett. 138, 157-163.

Cooper, D., Jagur, R., Somers, R. y Rodbell, M. (1981) Cholera toxin modifies diverse GTP-modulated regulatory proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 1179-1185.

Corps, A., Hesketh, R. y Metcalfe, J. (1982) Limitations on the use of phenothiazines and local anaesthetics as indicators of calmodulin function in intact cells. FEBS Lett. 138, 280-284.

Cote, T., Grewe, C., Tsuruta, K., Stoof, J., Eskay, R. y Keibian, J. (1982) D-2 dopamine receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase activity in the intermediate lobe of the rat pituitary gland requires guanosine 5'-triphosphate. Endocrinology 110, 812-819.

- Daly, J. (1984) Forskolin, adenylate cyclase, and cell physiology: an overview. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 17, 81-89.
- Darfler, F., Lawrence, M., Kaachman, A. e Insel, P. (1982) Stimulation by forskolin of intact S49 lymphoma cells involves the nucleotide regulatory protein adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 257, 11901-11907.
- Downs, R., Spiegel, A., Singer, M., Reen, S. y Aurbach, G. (1980) Fluoride stimulation of adenylate cyclase is dependent on the guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 255, 949-954.
- Dufau, M., Bankal, A. y Catt, K. (1980) Hormone-induced guanyl nucleotide binding and activation of adenylate cyclase in the Leydig cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5837-5841.
- Dumont, J. (1972) Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). Stages of oocyte in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136, 153-180.
- Easterbrook-Smith, S.B., Wallace, J.C. y Keech, D. (1976) Pyruvate carboxylase: affinity labelling of the magnesium adenosine triphosphate binding site. *Eur. J. Biochem.* 62, 125-130.
- Echeverría, M., Orellana, O., Jedlicki, E., Plaza, M., Allende, C. y Allende, J. (1981) Regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase from Xenopus laevis ovary by calmodulin and calcium. *Biochem. Int.* 2, 539-545.
- Ernst, V., Levin, D., Foulkes, G. y London, I. (1982) Effects of skeletal muscle protein phosphatase inhibitor-2 on protein synthesis and protein phosphorylation in rabbit reticulocyte lysates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7092-7096.
- Finidori-Lepicard, J., Schorderet-Slatkine, J., Hanoune, J. y Baulieu, E. (1981) Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in Xenopus laevis oocytes. *Nature* 292, 255-257.
- Finidori-Lepicard, J., Hanoune, J. y Baulieu, E. (1982) Adenylate cyclase in Xenopus laevis oocytes: Characterization of the progesterone-sensitive, membrane-bound form. *Mol. Cell. Endocrinol.* 28, 211-227.
- Flawiã, M., Kornblihtt, A., Reig, J., Torruella, M. y Torres, H. (1983) Reconstitution of a hormone-sensitive adenylate cyclase with membrane extracts from *Neurospora* and avian erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 258, 8255-8259.
- Flockhart, D. y Corbin, J. (1982) Regulatory mechanisms in the control of protein kinases. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 12, 133-186.
- Foulkes, J. y Maller, J. (1982) In vivo actions of protein phosphatase inhibitor-2 in Xenopus oocytes. *FEBS Lett.* 150, 155-160.

Gill, D.M. y Meren, R. (1978) ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: Basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3050-3054.

Gilman, A. (1984) G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* 36, 577-579.

Goodhardt, M., Ferry, N., Buscaglia, M., Baulieu, E. y Hanoune, J. (1984) Does the guanine nucleotide regulatory protein Ni mediate progesterone inhibition of Xenopus laevis oocyte adenylate cyclase? *EMBO Journal* 3, 2653-2658.

Gorski, J. y Gannon, F. (1976) Current models of steroid hormone action: a critique. *Ann. Rev. Physiol.* 38, 425-450.

Hanski, E., Sternweis, P., Northup, J., Dromerick, A. y Gilman, A. (1981) The regulatory component of adenylate cyclase. Purification and properties of the turkey erythrocyte protein. *J. Biol. Chem.* 256, 12911-12919.

Hazeki, O. y Ui, M. (1980) Modification by islet-activating protein of receptor-mediated regulation of cyclic AMP accumulation in isolated rat heart cells. *J. Biol. Chem.* 256, 2856-2862.

Hebdon, M., Levine, H., Sahyoun, N., Schmitges, C. y Cuatrecasas, P. (1981) Specific phospholipids are required to reconstitute adenylate cyclase solubilized from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 120-123.

Hildebrandt, J., Hanoune, J. y Birnbaumer, L. (1982) Guanine nucleotide inhibition of cye-S49 mouse lymphoma cell membrane adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 257, 14723-14725.

Hildebrandt, J., Sekura, R., Codina, J., Iyengar, R., Manclarck, C. y Birnbaumer, L. (1983) Stimulation and inhibition of adenylyl-cyclases Mediated by Distinct Proteins. *Nature* 302, 706-709.

Hildebrandt, J. y Birnbaumer, L. (1983) Inhibitory regulation of adenylyl cyclase in the absence of stimulatory regulation. Requirements and kinetics of guanine nucleotide induced inhibition of the cyc<sup>-</sup> S49 adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 258, 13141-13147.

Hildebrandt, J., Codina, J., Risinger, R. y Birnbaumer, L. (1984) Identification of a gamma subunit associated with the adenylyl cyclase regulatory proteins Ns and Ni. *J. Biol. Chem.* 259, 2039-2042.

Hinrichs, M.V. y Eyzaguirre, J. (1982) Affinity labeling of rabbit muscle pyruvate kinase with dialdehyde - ADP. *Biochim. Biophys. Acta* 704, 177-185.

Hollinger, T. y Alvarez, M. (1982) Trifluoperazine-induced meiotic maturation in Xenopus laevis. *J. Exp. Zool.* 224, 461-464.

- Hollinger, T. y Alvarez, M. (1984) The effect of trifluoperazine on maturation of Xenopus laevis oocytes. J. Exp. Zool. 230, 427-441.
- Howlett, A. y Gilman, A. (1980) Hydrodynamic properties of the regulatory component of adenylate cyclase. J. Biol. Chem. 255, 2861-2866.
- Howlett, A.C., Sternweis, P.C., Macik, B., VanArsdale, P. y Gilman, A. (1979) Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylate cyclase. Association of a regulatory component of the enzyme with membranes containing the catalytic protein and beta-adrenergic receptors. J. Biol. Chem. 254, 2287-2295.
- Huchon, D., Ozon, R., Fisher, E. y DeMaille, J. (1981a) The pure inhibitor of cAMP-dependent protein kinase initiates Xenopus laevis oocyte maturation: a 4-step scheme for meiotic maturation. Mol. Cell. Endocrinol. 22, 211-222.
- Huchon, D., Ozon, R., y DeMaille, J. (1981b) Protein phosphatase-1 is involved in Xenopus oocytes maturation. Nature 294, 358-359.
- Hudson, T., Fain, J. (1983) Forskolin-activated adenylate cyclase inhibition by guanyl-5'-yl-imidodiphosphate. J. Biol. Chem. 258, 9755-9761.
- Hughes, S. (1983) Are guanine nucleotide binding proteins a distinct class of regulatory proteins? FEBS Lett. 164, 1-8.
- Iyengar, R. (1981) Hysteretic activation of A.C. II. Mg ion regulation of the activation of the regulatory component as analyzed by reconstitution. J. Biol. Chem. 256, 11042-11050.
- Iyengar, R. y Birnbaumer, L. (1981) Hysteretic activation of adenylyl cyclases. I. Effect of Mg ion on the rate of activation by guanine nucleotides and fluoride. J. Biol. Chem. 256, 11036-11041.
- Iyengar, R. y Birnbaumer, L. (1982) Hormone receptor modulates the regulatory component of adenylyl cyclase by reducing its requirements for Mg<sup>2+</sup> and enhancing its extent of activation by guanine nucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5179-5183.
- Iyengar, R., Abramowitz, J., Bordelon-Riser, M., Blume, A.J. y Birnbaumer, L. (1980) Regulations of hormone-receptor coupling to adenylyl cyclase. Effects of GTP and GDP. J. Biol. Chem. 255, 10312-10321.
- Jakobs, K., Saur, W. y Schultz, G. (1976) Reduction of adenylate cyclase activity of human platelets by the alpha-adrenergic component of epinephrine. J. Cyclic Nucleotide Res. 2, 381-386.
- Jakobs, K., Aktories, K. y Schultz, G. (1981) Inhibition of adenylate cyclase by hormones and neurotransmitters. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 14, 173-187.

Jakobs, K., Aktories, K. y Schultz, G. (1983) Mechanisms and components involved in adenylate cyclase inhibition by hormones. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 17, 135-144.

Jakobs, K., Aktories, K y Schultz, G. (1984) Mechanism of pertussis toxin action on the adenylate cyclase system. Inhibition of the turn-on reaction on the inhibitory regulatory site. *Eur. J. Biochem.* 140, 177-181.

Jard, S., Cantau, B. y Jakobs, K. (1981) Angiotensin II and alpha 2-adrenergic agonists inhibit rat liver adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 256, 2603-2606.

Jedlicki, E. (1984) Activación e inhibición de una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de Xenopus laevis. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Johnson, G.L., Kaslow, H.R. y Bourne, H.R. (1978) Genetic evidence that cholera toxin substrates are regulatory components of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 253, 7120-7123.

Jordana, X. (1982) Estudio de actividades de adenilil ciclasa en ovario de Xenopus laevis. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Físicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Jordana, X., Otero, C., Allende, J., Flawiã, M., Kornblihtt, A. y Torres, H. (1981a) Adenylate cyclase activity in Xenopus laevis ovarian follicles. *Mol. Cell. Biochem.* 40, 87-93.

Jordana, X., Allende, C. y Allende J. (1981b) Guanine nucleotides are required for progesterone inhibition of amphibian oocyte adenylate cyclase. *Biochem. Int.* 3, 527-532.

Jordana, X., Allende, C. y Allende, J. (1982) Differential inhibition by progesterone of the adenylate cyclase of oocytes and follicle cells of Xenopus laevis. *FEBS Lett.* 143, 124-128.

Jordana, X., Olate, J., Allende, C. y Allende, J. (1984) Studies on the mechanism of inhibition of amphibian oocyte adenylate cyclase by progesterone. *Arch. Biochem. Biophys.* 228, 379-387.

Kanaho, Y., Tsai, S., Adamik, R., Hewlett, E., Moss, J. y Vaughan, M. (1984) Rhodoprín-enhanced GTPase activity of the inhibitory GTP-binding protein of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259, 7378-7391.

Katada, T. y Ui, M. (1981) Islet-activating protein; a modifier of receptor-mediated regulation of rat islet adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 256, 8310-8317.

Katada, T. y Ui, M. (1982a) Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3129-3133.

Katada, T. y Ui, M. (1982b) ADP-ribosylation of the specific membrane protein of CG cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. *J. Biol. Chem.* 257, 7210-7216.

Katada, T., Bokoch, G., Northup, J., Ui, M. y Gilman, A., (1984a) The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Properties and function of the purified protein. *J. Biol. Chem.* 259, 3568-3577.

Katada, T., Northup, J., Bokoch, G., Ui, M. y Gilman, A. (1984b) The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Subunit dissociation and guanine nucleotide-dependent hormonal inhibition. *J. Biol. Chem.* 259, 3578-3585.

Katada, T., Bokoch, G., Smigel, M., Ui, M. y Gilman, A. (1984c) The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase in S49 lymphoma  $cyc^-$  and wild type membranes. *J. Biol. Chem.* 259, 3586-3595.

Kataoka, T., Powers, S., Cameron, S., Fasano, O., Goldfarb, M., Broach, J. y Wigler, M. (1985) Functional homology of mammalian and yeast RAS genes. *Cell* 40, 19-26.

Kimura, N. y Nagata, N. (1977) The requirement of guanine nucleotides for glucagon stimulation of adenylate cyclase in rat liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 252, 3829-3835.

Koski, G. y Klee, W. (1981) Opiates inhibit adenylate cyclase by stimulating GTP-hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4185-4189.

Krebs, E. (1972) Protein kinases. *Curr. Top. Cell. Regul.* 5, 99-134.

Kuhn, D. y Lovenberg, W. (1982) Role of calmodulin in the activation of tryptophan hydroxylase. *Fed. Proc.* 41, 2258-2264.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the heads of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lai, E., Rosen, O. y Rubin, C. (1981) Differentiation-dependent expression of catecholamine-stimulated adenylate cyclase. Roles of the beta-receptor and G/F protein in differentiating 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 256, 12866-12874.

Landri, Y., Amellal, M. y Ruckstuhl, M. (1981) Can calmodulin inhibitors be used to probe calmodulin effects? *Biochem. Pharmacol.* 30, 2031-2032.

Lasker, R., Downs, R. y Aurbach, G. (1982) Calcium inhibition of adenylate cyclase: studies in turkey erythrocyte and S49 cytochrome c cell membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 216, 345-355.

Lefkowitz, R., Mullikin, D. y Caron, M. (1976) Regulation of beta-adrenergic receptors by guanyl-5'-yl imidodiphosphate and other purine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 251, 4686-4692.

Levine, R. y Weiss, B. (1977) Binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Mol. Pharmacol.* 13, 690-697.

Linbird, L. (1981) Activation and attenuation of adenylate cyclase: The role of GTP binding proteins as macromolecular messengers in receptor-cyclase coupling. *Biochem. J.* 195, 1-13.

Londos, C., Salomon, Y., Lin, M., Harwood, J., Schramm, M., Wolff, J. y Rodbell, M. (1974) 5'-guanylylimidodiphosphate, a potent activator of adenylate cyclase systems in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3087-3090.

Londos, C., Cooper, D. y Rodbell, M. (1981) Receptor-mediated stimulation and inhibition of adenylate cyclase: The fat cell as a model system. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 14, 163-170.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Maccioni, R., Hubert, E. y Slebe, J.C. (1979). Selective modification of fructose 1,6-biphosphatase by periodate oxidized AMP. *FEBS Letters* 102, 29-32.

Maguire, M., Van Arsdale, P. y Gilman, A. (1976). An agonist-specific effect of guanine nucleotides on binding to the beta adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* 12, 335-339.

Mahaffee, D. y Ontjes, D. (1980). The role of calcium in the control of adrenal adenylate cyclase. Enhancement of enzyme activation by guanyl-5'-yl imidodiphosphate. *J. Biol. Chem.* 255, 1565-1571.

Malbon, C. y Greenberg, M. (1982) 3,3',5'-triiodothyronine administration in vivo modulates the hormone-sensitive adenylate cyclase of rat hepatocytes. *J. Clin. Invest.* 69, 414-426.

Malbon, C., Rapiejko, P. y García-Sainz, A. (1984). Pertussis toxin catalyzes the ADP-ribosylation of two distinct peptides, 40 and 41 kDa, in rat cell membranes. *FEBS Letters* 176, 301-306.

Maller, J. y Krebs, E. (1977). Progesterone-stimulated meiotic cell division in Xenopus oocytes: induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 252, 1712-1718.



Maller, J. y Sadler, S. (1981). Regulation of steroid-induced cell division amphibian oocytes by protein phosphorylation. Cold Spring Harbor Conf. Cell. Prolif. 8, 1127-1141.

Maller, J., Butcher, F. y Krebs, E. (1979). Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in Xenopus oocytes. J. Biol. Chem. 254, 579-582.

Manning, D. y Gilman, A. (1983). The regulatory components of adenylate cyclase and transducin. A family. J. Biol. Chem. 258, 7059-

Masaracchia, R., Maller, J. y Walsh, D. (1979). Histone I phosphodiesterase activities during the maturation of oocytes of Xenopus laevis. Arch. Biochem. Biophys. 194, 1-12.

Masui, Y. y Clarke, H. (1979). Oocyte maturation. Int. Rev. Cytol. 57, 185-223.

Masui, Y., Meyerhof, P., Miller, M. y Wasserman, W. (1977). Roles of divalent cations in maturation and activation of vertebrate oocytes. Differentiation 9, 49-57.

Michel, T. y Lefkowitz, R., (1982). Hormonal inhibition of adenylate cyclase.  $\alpha_2$ -adrenergic receptors promote release of  $^3\text{H}$  guanylylimidodiphosphate from-platelets membranes. J. Biol. Chem. 257, 13557-13563.

Moreau, M., Doree, M. y Guerrier, P. (1976). Electrophoretic introduction of calciums ions into the cortex of Xenopus laevis oocytes triggers meiotic maturation. J. Exp. Zool 197, 443-449.

Moreau, M., Vilain, J. y Guerrin, P. (1980). Free calciums changes associated with hormone action in amphibian oocytes. Devel. Biol. 78, 201-214.

Morril, G., Schatz, F., Kostellow, A. y Poupko, J. (1977). Changes in cyclic AMP levels in the amphibian ovarian follicle following progesterone induction of meiotic maturation. Differentiation 8, 97-104.

Morril, G., Zeigler, D. y Kostellow, A., (1982). The role of  $\text{Ca}^{++}$  and cyclic nucleotides in progesterone initiation of the meiotic divisions in amphibian oocytes. Life Sci. 29, 1821-1835.

Murad, F., Chi, Y., Rall, T. y Gutherland, E., (1962). Adenylylcyclase. III. The effect of catecholamines and choline esters on the formation of adenosine 3',5'-phosphate by preparations from cardiac muscle and liver. J. Biol. Chem. 237, 1233-1238.

Murayama, T. y Ui, M. (1983). Loss of the inhibitory function of the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP-ribosylation by is let-activating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes. J. Biol. Chem. 258, 3319-3326.

Nakamura, T. y Ui, M. (1983). Suppression of passive cutaneous anaphylaxis by pertussis toxin, an islet-activating protein, as a result of inhibition of histamine release from mast cells. *Biochem. Pharmacol.* 32, 3435-3441.

Neet, K.E. y Ainslie, R.G. (1980). Hysteretic enzymes. *Methods in Enzymology* Vol. 64, pág. 192-205, Academic Press, New York.

Neulfed, G., Schramm, M. y Weinberg, N., (1980). Hybridization of adenylate cyclase components by membranes fusion and the effect of relative digestion by trypsin. *J. Biol. Chem.* 255, 9268-9274.

Norman, J. y Drumond, A., (1979). Inhibition of calcium-dependent regulator-stimulated phosphodiesterase activity by neuroleptic drugs is unrelated to their clinical efficacy. *Mol. Pharmacol.* 16, 1089-1094.

Northup, J., Sternweis, P., Smigel, M., Schleifer, L., Ross, E. and Gilman, A. (1980) Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 6516-6520.

Northup, J., Smigel, M. y Gilman, A. (1982). The guanine nucleotide activating site of the regulatory component of Adenylate Cyclase. Identification by ligand binding. *J. Biol. Chem.* 257, 11416-11423.

Northup, J., Sternweis, P. y Gilman, A. (1983). The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Resolution activity, and properties of the 35,000 dalton. (beta) subunit. *J. Biol. Chem.* 258-11361.

O'Connor, C. y Smith, L. (1979). *Xenopus* oocyte cAMP-dependent protein kinases before and during progesterone-induced maturation. *J. Exp. Zool.* 207, 367-374.

Okajima, F. y Ui, M. (1984). ADP-ribosylation of the specific membrane protein by islet-activating protein, pertussis toxin, associated with inhibition of a chemotactic peptide-induced arachidonate release in neutrophils. *J. Biol. Chem.* 259, 13863-13871.

Olate, J., Jordana, X., Allende, C. y Allende, J. (1983). Inhibition by phenothiazine derivatives of the adenylate cyclase of amphibian oocytes. *Bioch. Pharmacol.* 32, 3227-3232.

Olate, J., Allende, C., Allende, J., Sekura, R. y Birnbaumer, L. (1984). Oocyte adenylate cyclase contains Ni, yet the guanine nucleotide-dependent inhibition by progesterone is not sensitive to Pertussis Toxin. *FEBS Lett.* 175, 25-29.

Olate, J., Anker, R. y Allende, J. (1985). Treatment of oocyte membranes with the 2'-3'-dialdehyde of guanosine triphosphate reduces progesterone inhibition of adenylate cyclase. *FEBS Letters*. En prensa.

Orellana, O., (1983). Estudios sobre la activación por calmodulina y por proteólisis de una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de ovario de Xenopus laevis. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Orellana, O., Allende, C. y Allende, J. (1981). Trypsin activates the calmodulin sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterase of amphibian oocytes. Biochem. Int. 3, 663-668.

Orellana, O., Jedlicki, E., Allende, C. y Allende, J. (1984). Properties of a cyclic nucleotide phosphodiesterase of amphibian oocytes that is activated by calmodulin and calcium, by tryptic proteolysis and by phospholipids. Arch. Biochem. Biophys. 231, 345-354.

Pedersen, S. y Ross, E., (1982). Functional reconstitution of beta-adrenergic receptors and the stimulatory GTP-binding protein of adenylylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 7228-7232.

Pfeuffer, T. y Metzger, H., (1982). 7-0 hemisuccinyl-deacetyl forskolin-sepharose: a novel affinity support for purification of adenylylate cyclase. FEBS Letters 146, 369-375.

Piasek, M., Babich, M. y Rush, M. (1983). Calmodulin stimulation and calcium regulation of smooth muscle adenylylate cyclase activity. J. Biol. Chem. 258, 10913-10918.

Rodbell, M. (1967). Metabolism of isolated fat cell. V. Preparation of "ghosts" and their properties; adenylyl cyclase and other enzyme. J. Biol. Chem. 242, 5744-5750.

Rodbell, M. (1980). The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. Nature 284, 17-21.

Rodbell, M., Kraus, H., Pohl, S. y Birnbaumer, L. (1971a). The glucagon-sensitive adenylyl-cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanyl nucleotides on binding of <sup>125</sup>I-glucagon. J. Biol. Chem. 246, 1872-1876.

Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. y Kraus, H. (1971b). The glucagon-sensitive adenylyl-cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. an obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. J. Biol. Chem. 246, 1877-1882.

Rodbell, M., Lin, M. y Salomon, Y. (1974). Evidence for interdependent action of glucagon and nucleotides on the hepatic adenylylate cyclase system. J. Biol. Chem. 249, 59-64.

Ross, E. (1982). Phosphatidylcholine-promoted interaction of the catalytic and regulatory proteins of adenylylate cyclase. J. Biol. Chem. 257, 10751-10758.

- Ross, E. y Gilman, A. (1977). Resolution of same components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 252, 6966-6969.
- Ross, E. y Gilman, A. (1980). Biochemical properties of hormone sensitive adenylate cyclase. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 533-564.
- Ross, E., Maguire, M., Sturgill, T., Biltonen, R. y Gilman, A. (1977). Relationship between the beta, adrenergic receptor and adenylate cyclase. Studies of ligand binding and enzyme activity in purified membranes of S49 lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* 252, 5761-5775.
- Sadler, S. y Maller, J. (1981). Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes: action on the guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 256, 6368-6373.
- Sadler, S. y Maller, J. (1982). Identification of a steroid receptor on the surface of *Xenopus* oocytes by photo affinity labeling. *J. Biol. Chem.* 257, 355-361.
- Sadler, S. y Maller, J. (1983). Inhibition of *Xenopus* oocyte adenylate cyclase by progesterone and 2':5'dideoxy adenosine ys associated with slowing of guanine nucleotide exchange. *J. Biol. Chem.* 258, 7935-7941.
- Sadler, S., Maller, J. y Cooper, D. (1984). Progesterone inhibition of *Xenopus laevis* oocyte adenylate cyclase is not mediated via the Bordetella Pertussis toxin substrate. *Mol. Pharmacology* 26, 526-531.
- Salesse, R., Garmer, J. y Daveloose, D., (1982b). Modulation of adenylate cyclase activity by the physical state of pigeon erythrocyte membrane. 2. Fluidity-controlled coupling between the subunit of the adenylate cyclase system. *Biochemistry* 21, 1587-1590.
- Salesse, R., Garmer, J., Leterner, F., Daveloose, D. y Viret, J. (1982a). Modulation of adenylate cyclase activity by the physical state of pigeon erythrocyte membrane. 1. Parallel drug-induced changes in the bilayer fluidity and adenylate cyclase activity. *Biochemistry* 21, 1581-1586.
- Salomon, Y., Londos, C. y Rodbell, M. (1974). A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58, 541-548.
- Salter, R., Krinks, M., Klee, C. y Neer, E. (1981). Calmodulin activates the isolated catalytic unit of brain adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 256, 9830-9833.
- Schleifer, L., Kahn, R., Hanski, E., Northup, J., Sternweis, P. y Gilman, A. (1982). Requirements for cholera Toxin-dependent ADP-ribosylation of the purified regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 257, 20-23.

Schorderet-Sladkine, S., Schorderet, M., Boquet, P., Godeau, Fy Baulien, E., (1978) Progesterone-induced meiosis in Xenopus laevis oocytes: A role for cAMP at the "maturation-promoting Factor" level Cell 15, 1269-1275.

Schorderet-Slatkine, S., Schorderet, M. y Baulie, E. (1982). Cyclic AMP-mediated control of meiosis: effects of progeterone, cholera toxin and membrane active drugs in Xenopus laevis oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 850-854.

Schramm, M. y Rodbell, M. (1975). A persistent active state of the adenylate cyclase system produced by the combined actions of isoproterenol and guanylylimido diphosphate in frog erythrocyte membranes. J. Biol. Che. 250, 2232-2237.

Seamon, K. y Daly, J. (1981). Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. J. Biol. Chem. 256, 9799-9801.

Seamon, K. y Daly, J. (1982). Guanosine 5'-(beta, gama imido) triphosphate inhibition of forskolin-activated adenylate cyclase is mediated by the putative inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. J. Biol. Chem. 257, 11591-11596.

Seamon, K.B. y Daly, J. (1983). Forskolin cyclic AMP and cellular physiology. Trends in Pharmacology Science (TIBS), pág. 120-123.

Sharma, S., Nirenberg, M. y Klee, W. (1975). Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 590.-594.

Speaker, M. y Butcher, F. (1977). Cyclic nucleotide fluctuation during steroid-induced meiotic maturation of frog. oocytes. Nature 267, 848-849.

Spoor, T., Pensico, F., Evans, J. y Kimball, A., (1970). Recognition sites around the catalitic centre of DNA-dependent RNA polymerase. Nature, 227, 57-59.

Steer, M. y Levitzki, A. (1975). The control of adenylate cyclase by calmodulin in turkey erythrocyte ghosts. J. Biol. Chem. 250, 2080-2084.

Sternweiss, P. y Gilman, A., (1982). Aluminum: a requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 4888-4891.

Sternweis, P. y Robishaw, J. (1984). Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of Bovine brain. J. Biol. Chem. 259, 13806-13813.

Sternweiss, P., Northup, J., Smigel, M. y Gilman, A. (1981). The regulatory components of adenylate cyclase. purification and properties. *J. Biol. Chem.* 256, 11517-11522.

Strittmatter, S. y Neer, E. (1980). Properties of the separated catalytic and regulatory units of brain adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 6344-6348.

Sunyer, T., Codina, J. y Birnbaumer, L. (1984). GTP hydrolysis by pure Ni, the inhibitory regulatory component of adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 259, 15447-15451.

Thompson, W.J., Bisoker, G. y Appleman, M.M. Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterase with radioactive substrates (1974). *Methods in Enzymology*, Vol. 38, 205-212.

Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Katada, T., Brock, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K. y Wigler, M., (1985). In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40, 27-36.

Walseth, T.F. y Johnson, R. A. (1979). The enzymatic preparation of  $\alpha$ -<sup>32</sup>P nucleoside triphosphates, cyclic <sup>32</sup>P AMP, and cyclic <sup>32</sup>P GMP (1979). *Bioch. et Biophys. Acta.* 562, 11-31.

Wasserman, W. y Masui, Y. (1971). Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by the combination of divalent cations and ionophore A23 187. *J. Exp. Zool.* 193, 369-375.

Westcott, K., Olwin, B. y Starm, D. (1980). Inhibition of adenylate cyclase by the 2',3'-dialdehyde of adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 255, 8767-8771.

Williams, L., Mullikin, D. y Lefkowitz, R., (1978). Magnesium dependence of agonist binding to adenylate cyclase-coupled hormone receptors. *J. Biol. Chem.* 253, 2984-2989.

Wolff, J. y Jones, A. (1970). Inhibition of hormone-sensitive adenylyl cyclase by phenothiazines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 65, 454-459.

Wong, S. y Martin, R. (1983). The role of a guanine nucleotide-binding protein in the activation of rat liver plasma-membrane adenylate cyclase by forskolin. *Biochem. J.* 216, 753-759.

Yamazaki, S., Katada, T. y Ui, M. (1982). Alpha 2-adrenergic inhibition of insulin secretion via interference with cyclic AMP generation in rat pancreatic islets. *Mol. Pharmacol.* 21. 648-653.

