

UCH-FC
DOC-B
066
c 1

ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVACION POR CALMODULINA Y POR PROTEOLISIS
DE UNA FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS DE OVARIO DE
Xenopus laevis

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
Básicas y Farmacéuticas

por

Omar Orellana Orellana

Junio, 1983

Profesor patrocinante: Dr. Jorge E. Allende



FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

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

Omar Orellana Orellana

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 30 de Mayo de 1983.

Patrocinante de Tesis

Jorge Allende

Jorge E. Allende

Comisión Informante de Tesis

Herman Niebauer

Herman Niebauer

Enilio Caudemil

Enilio Caudemil

Mano Penetta

Mano Penetta

Mano Sepag

Mano Sepag



Esta tesis fue realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, División de Ciencias Médicas Norte, de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Jorge E. Allende. Contó con el patrocinio de este Departamento, que dirige el Dr. Lionel Gil, del cual el autor de esta tesis es miembro académico.



A mi esposa

A mis hijos



AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a las personas que contribuyeron al desarrollo y presentación de este trabajo.

Al Dr. Jorge E. Allende por la oportunidad que me brindó de desarrollar esta tesis bajo su experta dirección. A la Dra. Catherine Connelly por el aporte profesional entregado durante el desarrollo de este trabajo.

A Eugenia Jedlicki por la discusión constante del trabajo y de los aspectos humanos de nuestro quehacer en general. A Nora Riveros por la revisión de los manuscritos de esta tesis y por la crítica y el apoyo personal brindados.

A María Plaza por su valiosa ayuda en la realización de muchos experimentos. A todos los miembros del laboratorio del Dr. Allende, por la ayuda brindada durante el desarrollo de este trabajo.

A la Señorita Patricia Donoso por la dedicación brindada a la transcripción del texto y al Sr. José Mondaca por el esmero en la confección de las figuras de esta tesis.





INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUCCION	1
A. LA MADURACION MEIOTICA DE OOCITOS DE ANFIBIO	1
1. Generalidades sobre la maduración meiótica	1
2. Los nucleótidos cíclicos y la maduración meiótica	3
3. Las proteína-quinasas dependientes de cAMP y su papel en la maduración.....	4
4. El ión calcio y su papel en la maduración meiótica.....	5
5. La calmodulina y el proceso de maduración meiótica	6
6. Mecanismo de inducción de la maduración por progesterona	11
B. LAS FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS Y SU POSIBLE PAPEL EN LA MADURACION MEIOTICA.....	12
1. Generalidades sobre las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos	12
2. La fosfodiesterasa dependiente de calmodulina y calcio	14
C. OBJETIVOS DE LA TESIS.....	18
MATERIALES Y METODOS.....	21
1. ANIMALES Y REACTIVOS	21
2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASICA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS	22
3. PURIFICACION DE LOS SUSTRATOS RADIATIVOS	24
4. PREPARACION DE FRACCION CRUDA DE CALMODULINA DE CEREBRO ...	25
5. PREPARACION DE EXTRACTOS DE OVARIO DE XENOPUS LAEVIS CON ACTIVIDAD FOSFODIESTERASICA	26
a) Obtención de los ovarios	26
b) Procesamiento de los ovarios	27

<i>i. Obtención de extractos con fines preparativos.....</i>	26
<i>ii. Obtención de extractos con fines analíticos</i>	26
6. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN COLUMNAS DE DEAE-CELULOSA.....	27
7. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN COLUMNAS DE CALMODULINA-SEFAROSA	27
<i>a. Preparación de calmodulina inmovilizada en Sefarosa</i>	27
<i>b. Cromatografía de afinidad preparativa</i>	28
<i>c. Cromatografía de afinidad analítica</i>	29
8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	30
<i>a. Electroforesis preparativa</i>	30
<i>b. Electroforesis analítica</i>	31
9. TRATAMIENTO DE LAS PREPARACIONES ENZIMATICAS CON TRIPSINA	31
10. FILTRACION EN GELES DE SEFADEX	31
11. ELECTROFORESIS EN GELES EN CONDICIONES DESNATURANTES	32
12. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS	33
RESULTADOS.....	34
A. ACTIVIDAD FOSFODIESTERASICA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS EN OVARIO DE XENOPUS LAEVIS	34
1. <i>Actividad fosfodiesterásica en extracto de ovario</i>	34
2. <i>Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos de extracto de ovario.....</i>	37
B. PURIFICACION DE LA FOSFODIESTERASA I DE OVARIO DE XENOPUS LAEVIS.....	40
1. Método de purificación.	40
<i>a. Preparación del extracto de ovario</i>	40
<i>b. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa</i>	40
<i>c. Cromatografía de afinidad en columna de calmodulina-Sefarosa</i>	40
<i>d. Electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida</i>	41
2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	45

C. CARACTERISTICAS DE LA FOSFODIESTERASA I.	45
1. Estudios de inhibición de la hidrólisis de cGMP por otros nucleótidos.....	45
2. Actividad de la fosfodiesterasa I en función de la concentración de calmodulina	48
3. Efecto de 2-cloro 10(3 aminopropil) fenotiazina en la activación de la fosfodiesterasa I por calmodulina y calcio	51
4. Actividad de la fosfodiesterasa I en función de la concentración de sustrato	51
D. ACTIVACION DE LA FOSFODIESTERASA I POR PROTEASAS.....	56
1. Efecto de algunas enzimas hidrolíticas sobre la actividad de la fosfodiesterasa I.....	56
2. Cinética de activación de la fosfodiesterasa I por tripsina	56
3. Efecto de la concentración de tripsina sobre la actividad de la fosfodiesterasa I.....	58
4. Efecto de la tripsina sobre la estimulación de la fosfodiesterasa I	58
5. Efecto de la tripsina sobre la actividad de la fosfodiesterasa I. Estudios de Saturación por sustrato	63
E. EFECTO DE LA TRIPSINA SOBRE ALGUNAS PROPIEDADES MOLECULARES DE LA FOSFODIESTERASA I	63
1. Efecto de la tripsina sobre la migración electroforética de la fosfodiesterasa I	63
2. Efecto de la tripsina sobre la retención de la fosfodiesterasa I en columna de calmodulina-Sefarosa	67
3. Protección de la fosfodiesterasa I del efecto de tripsina por calmodulina y calcio.....	72
4. Efecto de la tripsina sobre la filtración de la fosfodiesterasa I en gel de Sefadex	73
DISCUSION	79
PURIFICACION DE LA FOSFODIESTERASA I DE OVARIO DE XENOPUS LAEVIS	79
CARACTERISTICAS DE LA FOSFODIESTERASA I	80
ACTIVACION DE LA FOSFODIESTERASA I POR PROTEASAS	83

REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFODIESTERASA I. EN OOCITOS DE <i>XENOPUS LAEVIS</i>	88
PROYECCIONES DEL TRABAJO REALIZADO	89
BIBLIOGRAFIA	90

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla I. Propiedades fisicoquímicas de la calmodulina	9
Tabla II. Tabla de purificación	44
Tabla III. Estudios de inhibición de la hidrólisis de cGMP por otros nucleótidos	47
Tabla IV. Constantes cinéticas de la fosfodiesterasa I.	55
Tabla V. Efecto de enzimas hidrolíticas sobre la actividad de la fosfodiesterasa I	57
Tabla VI. Efecto de tripsina sobre la estimulación de la fosfodiesterasa I por calmodulina y calcio	62
Tabla VII. Efecto de tripsina sobre las constantes cinéticas de la fosfodiesterasa I.....	66
Tabla VIII. Protección de la fosfodiesterasa I del efecto de tripsina por calmodulina y calcio	74

LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

	Pág.
Esquema I. Mecanismo de activación de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos por calmodulina y por proteasas.....	19
Esquema II. Mecanismo de activación de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos dependiente de calmodulina de ovario de <i>Xenopus laevis</i>	86
Figura 1. Estructura de la calmodulina	8
Figura 2. Actividad fosfodiesterásica en extracto de ovario.....	35
Figura 3. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de extracto de ovario	38
Figura 4. Cromatografía de afinidad de la fosfodiesterasa I en columna de calmodulina-Sefarosa.....	42
Figura 5. Electroforesis en geles de poliacrilamida	43
Figura 6. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....	46
Figura 7. Actividad de la fosfodiesterasa I en función de la concentración de calmodulina	49
Figura 8. Efecto de 2-cloro,10(3 aminopropil)fenotiazina en la activación de la fosfodiesterasa I por calmodulina	52
Figura 9. Actividad de la fosfodiesterasa I en función de la concentración de sustrato.....	53
Figura 10. Cinética de activación de la fosfodiesterasa I por tripsina.....	59

	Pág.
Figura 11. Efecto de la concentración de tripsina sobre actividad de la fosfodiesterasa I.....	61
Figura 12. Efecto de la tripsina sobre la actividad de la fosfodiesterasa I.	64
Figura 13. Efecto de la tripsina sobre la migración electroforética de la fosfodiesterasa I...	68
Figura 14. Efecto de la tripsina sobre la retención de la fosfodiesterasa I en columna de calmodulina-Sefarosa.....	70
Figura 15. Efecto de la tripsina sobre la filtración de la fosfodiesterasa I en gel de Sefadex	75
Figura 16. Determinación del peso molecular relativo de la fosfodiesterasa I. Efecto de tripsina	77

ABREVIATURAS

BSA	:	seroalbúmina de bovino
CaM	:	calmodulina
CaM-Ca	:	calmodulina-calcio
CAPP	:	2-cloro,10(3 aminopropil)fenotiazina
DEAE	:	dietilaminoetil
DTT	:	ditiotreitól
EDTA	:	etilendiamino-tetraacetato
EGTA	:	etilenglicol-bis(β -aminoetil) N,N'-tetra-acetato
FDE	:	fosfodiesterasa
Hepes	:	ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2etanol-sulfónico
MPF	:	factor promotor de la maduración
PPO	:	2,5-difeniloxazol
POPOP	:	1,4-bis 2-(5 feniloxazoil)benceno
SDS	:	dodecilsulfato de sodio
Tris	:	Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMEN

La inducción de la maduración meiótica de oocitos de anfibio involucra un aumento temporal en el nivel de calcio intracelular y una disminución en los niveles de nucleótidos cíclicos. Esta disminución podría explicarse por la activación de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos dependiente de calmodulina (fosfodiesterasa I) presente en los oocitos, como un mecanismo alternativo al de inhibición de la adenilato-ciclasa inducida por progesterona.

En esta tesis se estudian algunas propiedades de la estimulación de la fosfodiesterasa I por calmodulina y calcio y también por proteólisis, con el objeto de obtener información sobre el mecanismo de regulación de la actividad enzimática por estos efectores.

Se ha purificado la fosfodiesterasa I mediante un procedimiento que incluye cromatografía en DEAE-celulosa, cromatografía de afinidad en calmodulina-Sefarosa (calmodulina -Sephrose) y electroforesis en geles de poliacrilamida, obteniéndose una enzima que presenta una sola banda de peso molecular de 66.000 en geles de poliacrilamida desnaturantes.

La determinación del pesomolecular mediante electroforesis en geles desnaturantes y filtración en geles de Sefadex (Sephadex) indican que la fosfodiesterasa I sería un dímero de 140.000 formado por subunidades de igual tamaño.

La actividad de la fosfodiesterasa I es estimulada por calmodulina y calcio. Esta estimulación se debería fundamentalmente a un

incremento en la $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima. Se ha observado un aumento de doce veces respecto del valor de este parámetro en la actividad basal de la preparación enzimática proveniente de calmodulina-Sefarosa. Se observa también una disminución de la K_m aparente de la enzima.

La fosfodiesterasa I también es activada por un tratamiento controlado con proteasas. La acción proteolítica reduce el peso molecular a 90.000, produciéndose una alteración en la movilidad electroforética de la enzima. La activación proteolítica causa un aumento en la $V_{m\acute{a}x}$ y una disminución en la K_m aparente de la enzima, de magnitud similar al producido por calmodulina y calcio.

La menor retención de la fosfodiesterasa I en calmodulina-Sefarosa indican que la proteólisis produce una alteración en el sitio de unión de la enzima a la calmodulina. Esta idea se apoya en el hecho que el complejo calmodulina-calcio protege a la enzima del efecto de la tripsina.

Estos resultados sugieren que la tripsina remueve uno o más péptidos de la cadena polipeptídica de la fosfodiesterasa I que formarían parte de una estructura inhibitoria de la actividad enzimática. Esta estructura incluiría parte o todo el sitio de unión de la calmodulina.

La eliminación o modificación de la estructura inhibitoria propuesta, por el tratamiento proteolítico o por la unión del complejo calmodulina-calcio, provocaría la activación de la enzima.

La activación de la fosfodiesterasa I por calmodulina y por proteólisis podrían ser mecanismos fisiológicos a través de los que se producirían la disminución de los niveles de cAMP de los oocitos de *Xenopus laevis* inducida por progesterona.

ABSTRACT

Induction of meiotic maturation of amphibian oocytes by progesterone involves a transient increase in the intracellular calcium level and a decrease in cyclic nucleotides levels. The decrease in cyclic nucleotides levels could be the result of an activation of the oocyte calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase by a progesterone mediated mechanism, as an alternative to the adenylate-cyclase inhibition already described.

In this work, some properties of the stimulation of the phosphodiesterase I by the calmodulin-calcium complex and proteolysis, have been studied in order to obtain information about the mechanism of the regulation of the enzyme activity at the molecular level.

Phosphodiesterase I is purified by a procedure that includes DEAE-cellulose chromatography, calmodulin-Sepharose affinity chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. The purified enzyme shows a single band of 66,000 daltons in SDS gel electrophoresis.

SDS gel electrophoresis and Sephadex G-200 filtration experiments show that the enzyme is a dimer of 140,000 daltons formed by subunits of identical size.

The calmodulin-calcium complex stimulation of phosphodiesterase I is due to the increase in the V_{max} of the enzyme. The enzyme, purified by calmodulin-Sepharose, shows a twelve fold increase of its V_{max} when it is stimulated by the calmodulin-calcium complex, as

compared with its basal activity. In contrast, the apparent K_m is only slightly decreased.

Phosphodiesterase I can also be stimulated by a controlled proteolytic treatment. Proteolysis decreases the molecular weight of enzyme to 90,000, and produces an increase in the V_{max} and a decrease in the apparent K_m , similar to the calmodulin-calcium complex effect on the kinetics parameters.

Proteolysis of the phosphodiesterase I involves an alteration of the calmodulin binding site in the enzyme. This idea is supported by the results of calmodulin-Sepharose experiments of the normal and trypsin treated enzyme and from the observation of a protection of the enzyme activity from proteolytic activation by the presence of the calmodulin-calcium complex.

These results suggests that there is an inhibitory domain in the enzyme structure. This domain includes the calmodulin binding site. The modification of the inhibitory domain by the calmodulin-calcium complex binding or by the proteolytic treatment results in an activation of the enzyme.

The activation of the phosphodiesterase I by calmodulin or by proteolysis could be of physiological significance and related to the decrease in the cAMP levels of *Xenopus laevis* oocytes induced by progesterone.

INTRODUCCION

A) LA MADURACION MEIOTICA DE OOCITOS DE ANFIBIO.

1) Generalidades sobre la maduración meiótica.

La maduración meiótica de oocitos de anfibio se ha usado como modelo en el estudio de los procesos morfológicos y bioquímicos involucrados en la respuesta de las células a estímulos hormonales.

Los oocitos de anfibio en su máximo estado de desarrollo se encuentran en la profase de la primera división meiótica. En la hembra adulta, el proceso de maduración meiótica continúa inducido por hormonas gonadotrópicas hipofisarias, y el oocito alcanza la metafase de la segunda división meiótica, estado en que es ovulado y puede ser fertilizado. Se ha postulado que estas hormonas actuarían sobre las células foliculares, donde se producirían esteroides tales como progesterona o derivados de ella, los que actuarían directamente sobre el oocito dando lugar al proceso de maduración.

Este proceso puede ser inducido *in vitro* en folículos aislados, es decir, el oocito y su capa de células foliculares, por las hormonas gonadotrópicas hipofisarias, extractos hipofisarios, gonadotropina coriónica y hormona luteinizante de origen humano o animal y también por progesterona, testosterona y algunos análogos de estas hormonas. Las hormonas esteroidales no requieren de las células foliculares para inducir la maduración meiótica (ref. en Masui y Clarke, 1979).

El mecanismo de acción de la progesterona en los oocitos de

anfibio no está totalmente esclarecido. Sin embargo, la información obtenida señala que la hormona actuaría en forma diferente al esquema clásico descrito para la acción de hormonas esteroidales. Este último modelo plantea que la hormona, una vez que atraviesa la membrana plasmática de las células blanco, se uniría a un receptor citoplasmático específico. El complejo hormona-receptor entraría al núcleo donde actuaría sobre la cromatina provocando una alteración específica de la transcripción, que sería la respuesta principal del sistema al estímulo hormonal (ref. en Yamamoto y Alberts, 1976).

Los oocitos de anfibio, en cambio, responden a progesterona unida covalentemente a polietileno, un polímero que se mantiene en el medio externo de incubación de las células. Por el contrario, no hay respuesta a la progesterona si ésta es microinyectada en los oocitos (ref. en Masui y Clarke, 1979).

Recientemente se ha descrito la presencia de una proteína con propiedades de receptor para hormonas esteroidales en la membrana de oocitos de *Xenopus laevis* (Sadler y Maller, 1982).

Esta información sugiere que la acción de la progesterona ocurriría por unión de ésta a la superficie externa del oocito y no se requeriría que entrara a las células.

La maduración de los oocitos inducida por progesterona no requiere síntesis de RNA, puesto que ocurre en presencia de inhibidores de la transcripción, tampoco requiere de la presencia de cromatina ya que los oocitos anucleados responden a progesterona, al menos en las primeras manifestaciones del proceso de maduración.

Otras características importantes del proceso de maduración

meiótica inducida por progesterona son la dependencia de la síntesis proteica y la aparición del llamado "factor promotor de la maduración" (MPF). El MPF es una proteína presente en el citoplasma de oocitos maduros, la que al ser microinyectada en oocitos que no han sido expuestos a hormonas, promueve la maduración (ref. en Masui y Clarke, 1979).

El hecho que la progesterona actúe en la superficie externa del oocito hace necesario el estudio del mecanismo de transmisión del estímulo desde la membrana hacia el interior de la célula.

2) Los nucleótidos cíclicos y la maduración meiótica.

Se ha postulado que los nucleótidos cíclicos y el ión calcio, conocidos segundos mensajeros en el mecanismo de acción de muchas hormonas (ref. en Robinson y col., 1968; Rasmussen y Goodman, 1977), cumplen un papel importante en el proceso de maduración meiótica. A continuación se describen algunos datos experimentales que apoyan esta idea.

Se ha observado que los niveles de nucleótidos cíclicos disminuyen al incubar oocitos de anfibio con progesterona. En oocitos de *Rana pipiens* el cAMP y el cGMP disminuyen durante la primera hora de incubación con progesterona (Speaker y Butcher, 1977; Morril y col., 1977) y en oocitos de *Xenopus laevis* el cAMP disminuye en los primeros minutos (Maller y col., 1979) y alrededor de tres horas después de iniciada la incubación con la hormona (Bravo y col., 1978).

Los inhibidores de la actividad fosfodiesterásica de nucleótidos cíclicos, teofilina, papaverina y SQ20.006, inhiben la maduración inducida por progesterona en oocitos de *Xenopus laevis* (Morril y col., 1977, Bravo y col., 1978). La teofilina impide la disminución de los niveles de cAMP provocada por progesterona (Bravo y col., 1978).

El tratamiento de oocitos de *Xenopus laevis* con toxina del cólera, activador de la adenilato-ciclasa, enzima que sintetiza cAMP, aumenta el nivel de cAMP e inhibe la maduración inducida por progesterona. La microinyección de la subunidad activa de la toxina también inhibe la maduración en oocitos estimulados por progesterona (Schorderet-Slatkine y col. 1978; Maller y col., 1979).

3) *Las proteína-quinasa dependientes de cAMP y su papel en la maduración.*

En papel biológico del cAMP en las células se ha relacionado con las proteína-quinasa dependientes de este nucleótido.

Estas enzimas son oligómeros formados por dos subunidades regulatorias y dos subunidades catalíticas. Las subunidades regulatorias al unir cAMP se disocian de las subunidades catalíticas permitiendo a estas últimas fosforilar las proteínas que son sustrato (ref. en Flockhart y Corbin, 1982).

En oocitos de *Xenopus laevis* la microinyección de la subunidad regulatoria de las proteína-quinasa de corazón bovino o de un inhibidor termoestable de la subunidad catalítica de la enzima provoca la maduración en ausencia de progesterona (Maller y Krebs, 1977; Huchon y col., 1981). La microinyección de la subunidad catalítica de la enzima inhibe, la maduración inducida por progesterona (Maller y Krebs, 1977).

Estos resultados sugieren que uno de los eventos importantes en el proceso de maduración sería la disminución de la velocidad de fosforilación de los sustratos de estas proteína-quinasa y probablemente se produciría un aumento de la desfosforilación de esas proteínas. Esta idea es reforzada por el hecho que si se microinyecta en oocitos de *Xenopus laevis* un inhibidor de la proteína-fosfatasa I, enzima que

hidroliza el fosfato de las proteínas fosforiladas, se retarda la maduración inducida por progesterona (Huchon y col. 1981).

4) *El ión calcio y su papel en la maduración meiótica.*

El ión calcio se ha descrito como otro segundo mensajero en la respuesta de una célula a un estímulo externo. Existe un gran número de procesos biológicos en los cuales se han observado cambios en los niveles intracelulares de este ión, de ahí la importancia que se ha conferido al estudio de la regulación del nivel de calcio intracelular (ref. en Rasmunssen y Goodman, 1977).

El ión calcio parece ser otro de los factores importantes en la maduración meiótica de oocitos de anfibio. Se ha observado que debe estar presente en el medio en que se mantienen los oocitos para inducir la maduración. Además, la incubación de oocitos con progesterona produce un aumento de las velocidades de flujo de ión calcio a través de la membrana plasmática (ref. en Masui y Clarke, 1979).

La incubación con ión calcio y el ionóforo A23187, que facilita la entrada de calcio a los oocitos, induce la maduración en ausencia de progesterona, en cambio al microinyectar la célula con EGTA, quelante del ión calcio, se suprime la maduración inducida por progesterona (ref. en Masui y Clarke, 1979).

La incubación de los oocitos con ión lantano (La^{+3}), que bloquea el flujo de calcio a través de la membrana plasmática y libera al ión calcio secuestrado en diferentes compartimientos celulares, provoca la maduración en ausencia de progesterona, al igual que la aplicación iontoforética del ión calcio en las cercanías de la membrana plasmática (ref. en Masui y Clarke, 1979).

La medición del ión calcio libre intracelular mediante la microinyección de acuerina, proteína que unida a este ión emite luz, demuestra que la incubación con progesterona provoca un aumento rápido y temporal del ión calcio libre intracelular, tanto en oocitos de estrella de mar (Moreau y col., 1978) como de la mutante albina de *Xenopus laevis* (Wasserman y col., 1980).

Aún no se ha establecido si este aumento de ión calcio libre producido por progesterona modifica algún proceso particular en la célula.

5) La calmodulina y el proceso de maduración meiótica.

Un gran número de procesos biológicos en los cuales está comprometido el ión calcio se efectúan mediante proteínas que lo unen, una de ellas es la calmodulina (Cheung, 1982 a, b).

La calmodulina está presente en la mayoría de las células eucariotas estudiadas. En protozoos se ha encontrado una proteína cuya secuencia aminoacídica coincide en más de un 70% con la de calmodulina de mamíferos (Vanaman, 1980).

Originalmente esta proteína fue descrita como un activador termoestable de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (Kakiuchi, 1970; Cheung, 1971). Posteriormente se determinó que unía calcio, formando un complejo calcio-calmodulina, esencial para la activación de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (Teo y col., 1973; Teo y Wang, 1973).

La calmodulina interviene en una serie de procesos biológicos, tales como regulación de los niveles de nucleótidos cíclicos, movilidad celular, regulación de vías metabólicas, regulación de flujos de calcio (Klee, 1980), neurotransmisión (De Lorenzo, 1982), acción farmacológica de varias drogas (Weiss y Wallace, 1980) y división celular (Means y Dedman,

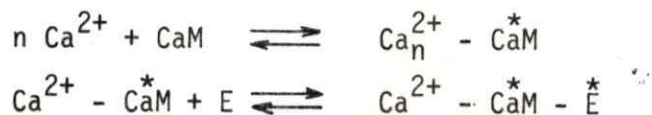
1980; Chafouleas y col., 1982).

La estructura de la calmodulina (Figura 1) comprende cuatro sitios de unión de calcio, con constantes de disociación del orden de 10^{-6} M. Los pares de sitios I-III y II-IV son equivalentes estructuralmente (Klee y col., 1980; Klee, 1980; Vanaman, 1980). En la tabla I se señalan algunas propiedades fisicoquímicas de la calmodulina de dos especies animales.

La unión de calcio a la calmodulina provoca cambios conformacionales que exponen regiones hidrofóbicas de ella (Klee, 1979; Johnson y col. 1982), las que probablemente le permiten interactuar con zonas hidrofóbicas de las proteínas blanco (Gopalakrishna y Anderson, 1983). La activación de estas proteínas blanco sería el resultado de una modificación de su estructura provocada por la calmodulina (Tanaka e Hidaka, 1980; Gietzen y col., 1982; Hansen y Beavo, 1982).

La acción de la calmodulina puede ser inhibida por una serie de drogas, entre las que se encuentran derivados de la fenotiazina, de efecto antisicótico. Esta inhibición depende de la unión de calcio y aparentemente está relacionada con la exposición de regiones hidrofóbicas en la calmodulina por efecto del metal (Weiss y Wallace, 1980).

El mecanismo general de activación de enzimas por calmodulina puede representarse mediante la siguiente secuencia de reacciones:



En una primera etapa el ión calcio se une a calmodulina provocando un estado activado de la proteína. Posteriormente el complejo calmodulina-calcio se une a la enzima en su estado basal (poco activo

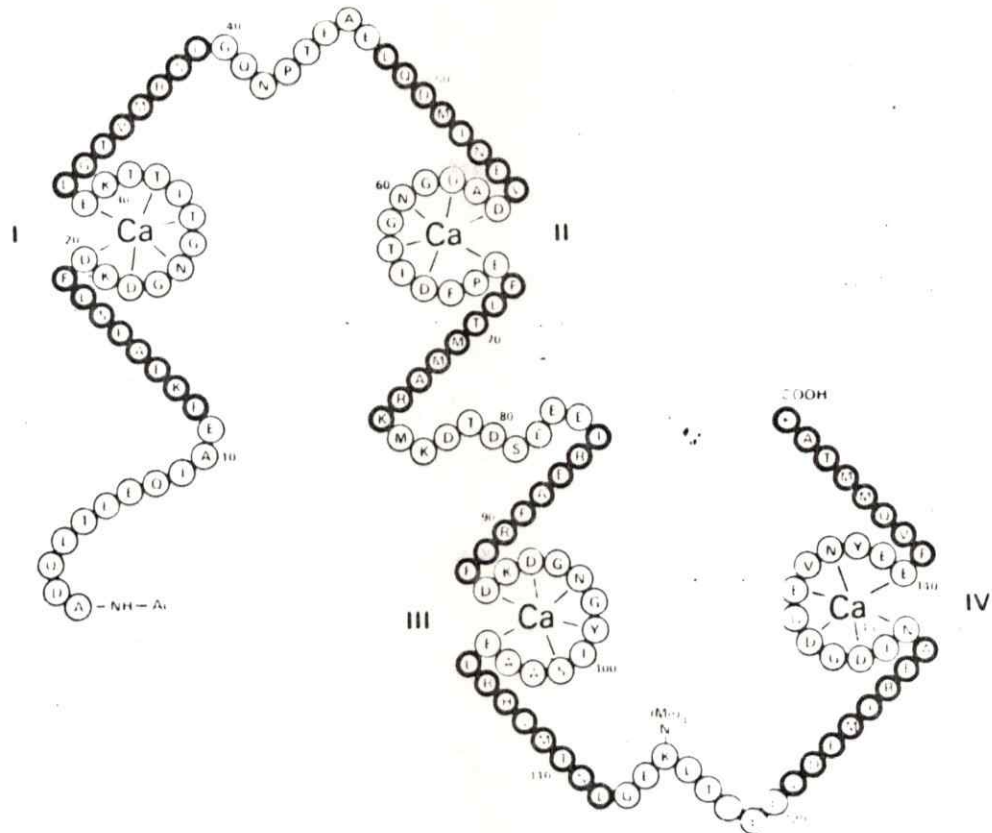


Figura 1. Estructura de la calmodulina. La secuencia de aminoácidos de calmodulina está representada mediante el código siguiente: A, ala; D, asp; E, glu; F, fe; G, gli; H, Lis; I, ile; K, lis; L, leu; M, met; N, asn; P, pro; Q, glu; R, arg; S, ser; T, treo; V, val; Y, ter. Los números romanos indican los cuatro sitios de unión de calcio. (tomado de Klee, C.B. 1980).

TABLA I

Propiedades fisicoquímicas de la calmodulina.

Propiedad	Tejido	
	Cerebro bovino ^a	ovario de anfibio ^b
Peso Molecular	16723 ^c 16500 ^d	- 18500 ^d
pI	4,2	4,3
Coefficiente de Extinción ($E_{276}^{1\%}$)	1,8	2,2
Sitios de unión de calcio (alta afinidad)	2 - 4	2
K_D calcio	$\approx 10^{-6}$ M	$\approx 10^{-6}$ M

- a) Obtenido de Klee, 1980 y Vanaman, 1980.
b) Obtenido de Wasserman y Smith, 1981.
c) Determinado de la secuencia de aminoácidos.
d) Determinado por electroforesis desnaturante.

o inactivo) activándola a través de cambios conformacionales.

Los asteriscos indican los estados activados de las proteínas.

La calmodulina puede ejercer su acción biológica por activación de las enzimas que intervienen directamente en el proceso a ser modificado o activando una enzima que a su vez regule la actividad de enzimas o proteínas relacionadas directamente con el proceso alterado.

Prácticamente todas las proteínas que unen calmodulina lo hacen en forma dependiente de calcio. Una excepción está dada por la fosforilasa-quinasa, una de cuyas subunidades es la calmodulina, que no requiere de calcio para su unión al resto de la enzima (Klee, 1980; Cohen, 1980).

Diversos autores han presentado datos que relacionan a la calmodulina con el proceso de maduración meiótica de oocitos de anfibio.

La microinyección de calmodulina de cerebro en oocitos de *Xenopus laevis* provoca la maduración de ellos, pero la eficiencia es baja (Maller y Krebs, 1978; Cartaud y col., 1980), en cambio la microinyección del complejo calmodulina-calcio es más eficiente que la calmodulina sola en la inducción de la maduración (Wasserman y Smith, 1981).

En oocitos de *Xenopus laevis* se ha detectado la presencia de una proteína con características fisicoquímicas similares a la calmodulina (Cartaud y col., 1980; Wasserman y Smith, 1981; Echeverría y col., 1981). La tabla I muestra algunas de sus propiedades.

Esta proteína de oocitos es capaz de estimular las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos dependientes del complejo calmodulina-calcio de cerebro bovino (Wasserman y Smith, 1981) y de ovario de *Xenopus laevis* (Echeverría y col., 1981).

Estos antecedentes sugieren que la acción del calcio en la maduración podría llevarse a cabo a través de la calmodulina.

6) *Mecanismo de inducción de la maduración por progesterona.*

Los antecedentes presentados anteriormente han permitido postular el siguiente mecanismo para explicar el efecto de la progesterona en la inducción de la maduración de oocitos de anfibio:

i) Unión de la progesterona a un receptor de la membrana plasmática.

ii) Aumento temporal del ión calcio intracelular y disminución de los niveles de nucleótidos cíclicos.

iii) Disminución de la actividad de proteína-quinasa dependientes de cAMP.

iv) Desfosforilación de algunas proteínas que inducirían la síntesis y activación del factor promotor de la maduración.

v) El MPF provocaría cambios que culminan con la ruptura de la vesícula germinal, la expulsión del corpúsculo polar y la activación de la membrana plasmática.

La disminución de los niveles de cAMP provocada por la progesterona, puede deberse a una disminución de la actividad de la adenilato-ciclasa, a un aumento de la actividad de la fosfodiesterasa o a una combinación de ambos efectos.

Resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio (Jordana y col. 1981a; Jordana y col., 1981 b; Jordana y col., 1982) y en otros laboratorios (Mulner y col., 1979; Sadler y Maller, 1981; Sadler y Maller, 1982) han demostrado una inhibición de la actividad de la adenilato-ciclasa en respuesta a la progesterona, apoyando la idea que la disminución

"enzima de alta K_m " por el alto valor de ese parámetro cinético para cAMP comparado con el de otras fosfodiesterasas. Es activada por calmodulina y calcio y ha sido usada por diversos autores como modelo en el estudio del mecanismo de acción de la calmodulina (Klee, 1980; Lin y Cheung, 1980; Gietzen y col., 1982).

Además de la regulación de los niveles de nucleótidos cíclicos (Klee y col., 1980), se ha relacionado su actividad con la regulación de la polimerización de microtúbulos (Watanabe y Weiss, 1982). Una descripción más detallada de esta enzima se hará más adelante (sección B2).

Otra fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, denominada "enzima de baja K_m ", se encuentra unida a la fracción particulada de hígado, tejido adiposo, corazón y otros tejidos de diferentes vertebrados. Su actividad es específica para cAMP y presenta cooperatividad negativa con una $K_{0,5}$ entre 0,1 y 1,0 μM . La actividad de esta enzima se ha relacionado con la respuesta hormonal del hígado y del tejido adiposo en la insulina (Wells y Hardman, 1977).

Una tercera forma enzimática descrita en diferentes tejidos, hidroliza tanto cAMP como cGMP. Esta enzima presenta cooperatividad positiva para cAMP en determinadas condiciones de ensayo. El cGMP, a concentraciones micromolares, estimula la hidrólisis de cAMP catalizada por esta enzima, sin embargo el cAMP no produce el mismo efecto en la hidrólisis de cGMP. Se ha descrito que esta enzima posee un sitio de unión de cGMP diferente al sitio catalítico (Francis y col., 1980; Martins y col., 1982). Se han encontrado varias otras fosfodiesterasas en diferentes tejidos y organismos. Una de ellas está presente en la

fracción particulada de células de retina de mamíferos y anfibios. Hidroliza cGMP y puede ser activada por la luz en preparaciones crudas. La respuesta de esta enzima a estímulos luminosos está relacionada con la hidrólisis de GTP (Stryer y col. 1981) a través de un mecanismo similar al que opera en algunos factores de la síntesis proteica y de activación de la adenilato-ciclasa sensible a hormonas (Allende, 1982).

2) *La fosfodiesterasa dependiente de calmodulina y calcio.*

Esta enzima ha sido purificada hasta homogeneidad a partir de cerebro (Klee y col., 1979; Morrill y col., 1979; Sharma y col., 1980) y corazón bovino (Laporte y col., 1979). Recientemente se han usado en la purificación de ambas fosfodiesterasas anticuerpos monoclonales inmovilizados que discriminan entre diferentes conformaciones de la enzima (Hansen y Beavo, 1982). Su peso molecular relativo es cercano a 120.000 cuando se determina por filtración en geles o por sedimentación (Morrill y col., 1979; Sharma y col., 1980) y es de 58.000 a 59.000 al medirlo por electroforesis en condiciones desnaturantes (Klee, 1979; Laporte y col. 1979; Sharma y col., 1980), lo que indica que la enzima está constituida por dos subunidades de igual peso molecular.

La enzima hidroliza cAMP con una Km aparente cercana a 100 μ M (Klee, 1980). Su actividad es dependiente de Mg^{2+} y es activada por calmodulina y calcio.

Estudios de saturación por cAMP demuestran que la actividad basal de la enzima, en ausencia del complejo calmodulina-calcio, posee una cinética compleja debido probablemente a la presencia de más de una forma enzimática o a una cooperatividad negativa de los sustratos. En cambio, en presencia de los efectores, la enzima presenta una

cinética de tipo michaeliana con ambos sustratos (Klee, 1980).

Este efecto estimulador de calmodulina y calcio ha sido estudiado con detalle desde el punto de vista cinético y de unión de los efectores.

Desde el punto de vista cinético, en algunos casos se ha observado un aumento de la $V_{m\acute{a}x}$ sin un cambio en la K_m aparente de la enzima (Morrilly col., 1979; Pichard y Cheung, 1977) y en otros casos se ha demostrado tanto un aumento de $V_{m\acute{a}x}$ como una disminución de la K_m (Cheung, 1971; Teo y col., 1973; Klee y col., 1979). Estudios del efecto de la concentración de la proteína moduladora en la actividad enzimática demuestran que los parámetros cinéticos dependen de la concentración de calmodulina usada (Teo y col., 1973; Brostrom y Wolff, 1976). Estos resultados podrían explicar las diferencias señaladas anteriormente.

Estudios de unión de la calmodulina radiactiva a la fosfodiesterasa demuestran la formación de un complejo entre la enzima y el activador en presencia de calcio (Richman y Klee, 1978; Laporte y col., 1979). Algunos autores han observado la unión de la calmodulina a la fosfodiesterasa en ausencia de ión calcio o en presencia de EGTA (Laporte y col., 1979; Wang y col., 1980 a). La activación de la enzima requiere de la presencia de ambos efectores (Teo y Wang, 1973), llegando a ser máxima con la unión de tres a cuatro moles de iones calcio por mol de calmodulina (Wang y col., 1980 b; Cox y col., 1981).

La constante de activación de la enzima por calcio, en presencia de calmodulina, es del orden de $10^{-6}M$ (Teo y Wang, 1973; Cox y col., 1981).

Este valor es similar al de la constante de disociación del complejo calmodulina-calcio (Teo y Wang, 1973; Klee, 1977; Cox y col., 1981).

Se ha observado que la afinidad de la calmodulina por la enzima aumenta en presencia de cAMP (Teo y col. 1973; Klee y col. 1979).

La activación de la fosfodiesterasa por calmodulina y calcio es un proceso reversible y puede ser anulada tanto por la remoción de calcio por EGTA como de calmodulina por otras proteínas que se unen a este activador.

Wang y Desai (1977) describieron la presencia de un inhibidor de la activación de fosfodiesterasa por calmodulina en cerebro bovino.

Esta proteína, denominada calcineurina por su alta concentración en cerebro (Wallace y col., 1980), es un dímero constituido por dos subunidades, una de 60.000 y otra de 15.000 de peso molecular (Klee y Krinks, 1978; Sharma y col., 1979). En presencia de calcio, esta proteína forma un complejo con calmodulina (Wang y Desai, 1977; Klee y col., 1978).

Klee y colaboradores han encontrado calcineurina asociada a la fosfodiesterasa (Klee y col., 1979a), por lo que plantean que sería una subunidad regulatoria de ésta, sin embargo otros autores no han detectado esta asociación (Laporte y col. 1979; Morrill y col., 1979; Sharma y col., 1979).

La presencia de cAMP, que aumenta la afinidad de la enzima por calmodulina, disminuye la inhibición causada por calcineurina (Cheung y col., 1981).

Se ha postulado que la calcineurina podría ser otra enzima

dependiente de calmodulina. Esta hipótesis ha sido confirmada al detectar actividad de proteína-fosfatasa dependiente de calmodulina en preparaciones altamente purificadas de calcineurina (Stewart y col., 1982; Yang y col., 1982).

Se ha descrito la presencia de proteínas similares que inhiben la estimulación de la fosfodiesterasa por calmodulina en macrófagos en cultivo (Speaker y col., 1983) y en oocitos de anfibio (Jedlicki y col., 1983). Su función fisiológica no se conoce.

Otro método que permite activar a la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina es un tratamiento controlado con proteasas (Cheung, 1971). Se ha observado que la incubación de la enzima con tripsina provoca un aumento gradual de la actividad basal de la fosfodiesterasa (Sakai y col., 1977; Tucker y col., 1981) y una disminución concomitante de la sensibilidad de la enzima a calmodulina y calcio. La activación de la enzima por proteasas llega a niveles iguales o superiores a los que se pueden obtener con calmodulina y calcio (Cheung, 1971; Sakai y col., 1977; Tucker y col., 1981).

Estudios del efecto de la tripsina sobre la estructura de la fosfodiesterasa de cerebro han demostrado que hay una reducción del tamaño molecular de ésta (Krinks y Klee, 1980; Tucker y col., 1981) y a la vez una pérdida de su capacidad de unirse a la calmodulina (Sakai y col., 1977; Tucker y col., 1981).

Los parámetros cinéticos de la enzima son modificados por tripsina de una manera similar a como lo hacen calmodulina y calcio (Cheung, 1971; Sakai y col., 1977).

Estos resultados sugieren la presencia de regiones regulatorias

de la actividad en la estructura de la enzima. Estas regiones estarían inhibiendo la acción del sitio activo de la enzima y podrían ser desplazadas tanto por calmodulina y calcio en forma reversible como por tripsina en forma irreversible.

En el esquema I se representa gráficamente una interpretación simplificada de estos antecedentes, descrita por varios autores (Klee, 1980; Lin y Cheung, 1980; Gietzen y col., 1982).

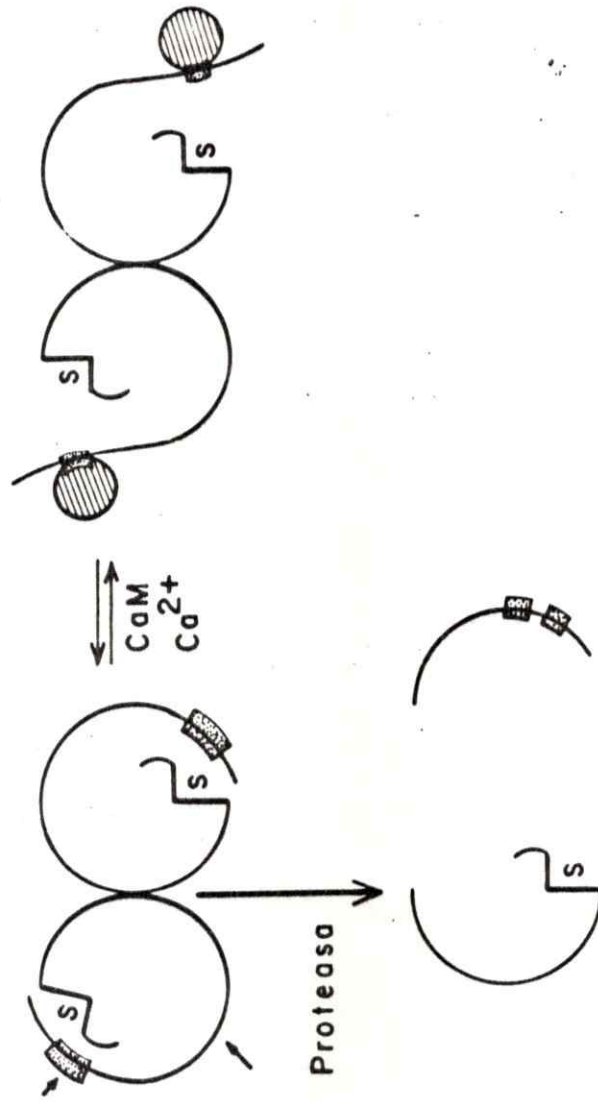
Varias otras enzimas dependientes de calmodulina son activadas por tripsina, entre las que se cuentan la NAD^+ quinasa de erizo de mar (Meijer y Guerrier, 1982) y la ATPasa dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} de eritrocitos (Gietzen y col., 1982). Estos hechos sugieren que todas estas enzimas poseen regiones regulatorias equivalentes que podrían ser modificadas por calmodulina de manera similar, siendo éste un mecanismo de regulación enzimática de gran versatilidad.

C) OBJETIVOS DE LA TESIS.

Los antecedentes expuestos demuestran la importancia de la disminución del cAMP en la maduración meiótica de oocitos de anfibio, lo que hace necesario el estudio del mecanismo molecular a través del cual ocurre esta disminución inducida por progesterona.

Los estudios desarrollados en nuestro laboratorio relativos a este fenómeno se han orientado al análisis de las enzimas involucradas en el metabolismo del cAMP, la adenilato-ciclasa y las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, y a las proteína-quinasa dependientes de cAMP.

Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos han sido estudiadas tanto *in vivo* (Allende y col., 1977; Allende y Allende, 1982) como *in vitro* (Allende y col., 1977; Echeverría y col., 1981) en oocitos de



Esquema I. Mecanismo de activación de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos por calmodulina y por proteasas.

S representa al sustrato, cAMP o cGMP; el área punteada al sitio de unión de la calmodulina; el círculo achurado a la calmodulina. Las flechas indican los sitios de proteólisis (de Klee, 1980).

Xenopus laevis con el objeto de conocer los mecanismos de regulación de estas enzimas, por su posible relación con la disminución de los niveles de cAMP en los oocitos por efecto de progesterona.

El estudio de la forma enzimática dependiente de calmodulina y calcio, presente en estas células, ha sido de especial interés por su posible rol como factor mediador entre el aumento de calcio y la disminución de los niveles de cAMP intracelulares provocados por progesterona.

A base de estos antecedentes, los objetivos de esta tesis son:

- a) Estudiar algunas propiedades de la regulación de la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina y calcio de ovario de *Xenopus laevis*.
- b) Estudiar la relación existente entre la estimulación de la enzima por calmodulina y por proteasas.
- c) Analizar la posible existencia de regiones regulatorias de la actividad en la estructura de la enzima.

MATERIALES Y METODOS

1. ANIMALES Y REACTIVOS.

Las ranas hembras adultas *Xenopus laevis* se obtienen de South African Snake Farm., Cape Province, R.S.A. y fueron mantenidas en viveros artificiales a 22°C, con períodos de luz de 12 horas alternados con períodos de obscuridad de 12 horas.

Los siguientes reactivos se obtienen de Sigma Chemical Co.: ATP, GTP, nucleótidos cíclicos, EDTA, EGTA, DTT, acrilamida, bisacrilamida, Dowex 1 x 4 (Malla 100-200), Tris, Hepes, 2-mercaptoetanol, aminoetanol, TEMED, azul dextrano, azul de Coomassie, PPO y POPOP, 5'-nucleotidasa de veneno de serpiente (Naja-Naja), tripsina tipo III, quimotripsina tipo 1-S, subtilisina tipo VIII, inhibidor de tripsina de poroto de soya tipo 1-S, ovalbúmina grado V, citocromo c tipo III, seroalbúmina y Sefarosa (Sephacrose) activada con bromuro de cianógeno.

Lisozima grado A se obtiene de Calbiochem Inc.; fosfatasa alcalina y fosforilasa b fueron donadas por el Dr. Aldo Solari (U. de Chile), la calmodulina pura de cerebro de bovino fue donada por la Dra. Claude Klee (N.I.H.), CAPP fue recibida del Psychopharmacology Research Branch, National Institute of Mental Health, N.I.H., Bethesda, Md. U.S.A. Glicerol y sacarosa se obtienen de J.T. Baker Chemical, Co.; las placas de PEI-celulosa y glicina se obtienen de Merck A.G., Darmstadt; la resina DEAE-celulosa (DE-52) se obtiene de Whatman Biochemicals y el gel de Sefadex G-200 (Sephadex G-200) se obtiene de Pharmacia Fine Chemicals.

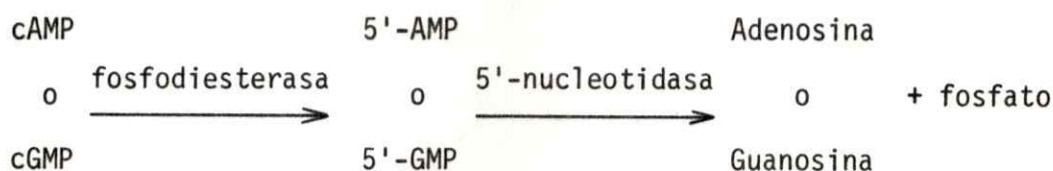
[2- ^3H] cAMP (32 Ci/nmol), [8-5' ^3H] cGMP (34 Ci/nmol) y [^3H] H_2O (0,46 mCi/nmol) se obtienen de New England Nuclear.

Todos los reactivos inorgánicos son de grado analítico y se obtienen de Mallinckrodt, Merck, Baker, May y Baker o Sigma.

2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASICA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS.

Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos catalizan la reacción de hidrólisis de los sustratos, generándose nucleósidos 5'-fosfato como productos.

El ensayo de actividad fosfodiesterásica se realiza básicamente por el método en dos etapas descrito por Thompson y col., (1974) que mide la formación de nucleósidos radiactivos. Un esquema general de las reacciones de este ensayo es el siguiente:



La actividad enzimática dependiente del complejo CaM-Ca, o actividad estimulada por calmodulina, se mide incubando 200 μl de una mezcla de reacción que contiene la preparación enzimática, Hepes 10 mM pH 7,5, 2-mercaptoetanol 3 mM, MgCl_2 5 mM, CaCl_2 0,5 mM, 4 μg de una fracción cruda de calmodulina de cerebro y [^3H] cGMP 1 μM (a.e.: 5×10^5 cpm/nmol) o [^3H] cAMP 5 μM (a.e.: $2,5 \times 10^4$ cpm/nmol) o las concentraciones que se indican en el capítulo III, a 30°C por tiempos variables entre 10 y 30 minutos. La actividad independiente de calcio y calmodulina, o actividad basal, se mide adicionando EGTA a la mezcla de incubación en una concentración final 2 mM. Las incubaciones se inician por la

adición del sustrato radiactivo, a excepción de los casos señalados en el capítulo III en que la reacción se inicia por la adición de la enzima. La reacción enzimática se detiene por calentamiento a 100°C durante 45 segundos, en el ensayo de hidrólisis de cGMP, y durante 90 segundos en el ensayo de hidrólisis de cAMP. Luego de enfriar la mezcla de reacción a 0-2°C, se adicionan 50 µg de 5'-nucleotidasa y se incuba por 10 minutos a 30°C. La reacción se detiene agregando 1 ml de metanol y enfriando a 0-2°C. 0,5 ml de la mezcla de ensayo de hidrólisis de cAMP o 1,2 ml de la mezcla de ensayo de hidrólisis de cGMP se someten a cromatografía de intercambio iónico en columnas de Dowex 1x4 (0,3 ml de resina) equilibrada previamente con HCl, cuyo pH es 4 a 5. Una vez agregada la muestra, las columnas se lavan con 1,5 ml y 3 ml de metanol, en el ensayo de hidrólisis de cAMP y cGMP respectivamente; el lavado de las columnas, que contienen el nucleósido, se recibe en frascos para medir radiactividad, se agrega 12 ml de una mezcla de Tritón y líquido de centelleo (1:2, v:v) y la radiactividad se mide en un contador de centelleos. El blanco de la reacción consiste en una mezcla que contiene los componentes del ensayo de actividad basal o estimulada por calmodulina y calcio, salvo la enzima. La recuperación del nucleósido es mayor que un 90%. Cada determinación se hace en duplicado y la expresión de los resultados corresponde al promedio de las dos determinaciones.

En estas condiciones de ensayo, la hidrólisis del sustrato no sobrepasa el 20% de la cantidad total en el medio de incubación. La reacción está en velocidad inicial.

Se define una unidad de enzima como la cantidad necesaria de

ésta para hidrólizar 1 pmol de cGMP por minuto a 30°C, de acuerdo al ensayo general de actividad.

3. PURIFICACION DE LOS SUSTRATOS RADIATIVOS.

Los sustratos radiactivos usados poseen tritio en la posición ocho de la base nitrogenada y en otras posiciones de la molécula. Estos compuestos se descomponen fácilmente generándose agua y otros compuestos radiactivos. Este fenómeno es progresivo, incluso a -20°C, produciéndose un incremento en el valor del ensayo blanco por lo que es necesario purificar el sustrato radiactivo cada dos o tres meses.

El procedimiento consiste en efectuar una cromatografía de 0,5 mCi de nucleótido radiactivo en una columna de Dowex 1x4 que contiene 1 ml de resina previamente equilibrada con HCl, cuyo pH es 4 a 5. Una vez colocada la muestra, la columna se lava con agua para eliminar el agua radiactiva. Posteriormente, el nucleótido se eluye con HCl 0,05 M en el caso de cAMP o HCl 0,5 M en el caso de cGMP. El eluido se distribuye en tubos de ensayo de modo que contengan $1,1 \times 10^7$ cpm cada uno (medidos en las condiciones descritas para la medición de radiactividad, en la sección anterior), se secan por liofilización y se guardan a -80°C. Al momento de usarlo, el contenido de cada tubo se resuspende en agua.

La pureza del cGMP se determina mediante cromatografía en placas de capa fina de polietileniminocelulosa, de acuerdo al método descrito por Böhme y Schultz (1974).

4. PREPARACION DE FRACCION CRUDA DE CALMODULINA DE CEREBRO.

La fracción cruda de calmodulina se obtiene por homogeneización de 700 g de cerebro bovino fresco en 1,5 l de una solución amortiguadora que contiene Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl₂ 1mM y EDTA 0,1 mM. El homogeneizado se centrifuga a 12.000 x g durante 30 minutos. La suspensión sobrenadante se calienta a 95°C durante 5 minutos, se enfría y se centrifuga a 12.000 x g durante 20 minutos (Lin y col., 1974).

La suspensión sobrenadante de la segunda centrifugación se precipita con sulfato de amonio al 100% de saturación y se deja reposar a 4°C durante la noche. El precipitado obtenido se separa por centrifugación a 27.000 x g durante 20 minutos y se resuspende de un volumen mínimo del tampón de homogeneización. Esta suspensión se divide en alícuotas que se guardan a -20°C.

Previo a su uso, una alícuota se centrifuga a 20.000 x g durante 20 minutos. La fracción sobrenadante se dializa contra un amortiguador que contiene Hepes 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 5 mM, 2-mercaptoetanol 3 mM, EDTA 0.1 mM y EGTA 0,1 mM (Amortiguador A) por dos veces durante 3 horas cada vez. Esta suspensión dializada representa la fracción cruda de calmodulina de cerebro.

5. PREPARACION DE EXTRACTOS DE OVARIO DE *XENOPUS LAEVIS* CON ACTIVIDAD FOSFODIESTERASICA.

a) Obtención de los ovarios.

Los ovarios se obtienen por extracción quirúrgica de ranas *Xenopus laevis* anestesiadas en una mezcla de hielo y agua. Una vez extraídos, los ovarios son mantenidos en la solución salina descrita por Barth y modificada por Kofoid y col., (1979), que contiene NaCl 88 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, KCl 1 mM, CaCl₂ 0,4 mM, MgSO₄ 0,8 mM.

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,33 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, penicilina y estreptomicina 10 mg/ml.cada una.

El peso húmedo de un ovario de rana adulta es entre 15 y 20 g. Está constituido por oocitos crecidos en cantidad equivalente a más del 90% del peso total y por oocitos más pequeños, células foliculares y tejido conectivo que, juntos, constituyen el resto del peso del ovario.

b) *Procesamiento de los ovarios.*

i) Obtención de extractos con fines preparativos.

Se pesan 150 a 200 g de ovario y se lavan con un amortiguador que contiene Hepes 50 mM pH 8,0, MgCl_2 5mM, 2-mercaptoetanol 3 mM, EDTA 0,1 mM y EGTA 0,1 mM (Amortiguador B). Los ovarios se cortan en trozos y pequeñas porciones de éstos se homogeneizan en presencia del amortiguador B (1 volumen de tejido por 1 volumen de amortiguador) en un homogeneizador Potter, ejecutando tres a cuatro golpes del émbolo por cada porción a homogeneizar. Los homogeneizados de tejido así obtenidos se juntan y se centrifugan a 27.000 x g durante 20 minutos a 0-4°C. La suspensión sobrenadante se filtra a través de lana de vidrio y se centrifuga nuevamente a 27.000 x g durante 20 minutos. La fracción sobrenadante de esta última centrifugación corresponde al extracto de ovario (extracto A).

ii) Obtención de extractos con fines analíticos.

En algunos casos se utilizan extractos preparados por homogeneización de 1,5 a 4,0 g de ovario en el amortiguador B (1 g de ovario por 5 ml de amortiguador) en un homogeneizador de vidrio tipo Dounce. El homogeneizado se centrifuga a 27.000 x g durante 20 minutos y la fracción sobrenadante se filtra a través de lana de vidrio. El filtrado corresponde

al extracto de ovario (extracto B) (Echeverría, 1980; Echeverría y col. 1981). La utilización de este tipo de extractos se indica en el capítulo III.

6. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN COLUMNAS DE DEAE-CELULOSA.

Los extractos de ovario de *Xenopus laevis* se someten a fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-celulosa (DE-52, 1,5 x 30 cm) equilibrada previamente con el amortiguador A. Una vez adsorbida la muestra, la columna se lava con 700 ml del mismo amortiguador. La elución de las actividades fosfodiesterásicas se lleva a cabo mediante un gradiente lineal de concentración de acetato de sodio entre 0 y 0,8 M en el amortiguador A en un volumen final de 1.500 ml. El gradiente de concentración de sal se verifica por medición de la conductividad de las fracciones. El flujo de líquido de la columna se mantiene constante en 120 ml por hora y se recogen fracciones de 7 ml.

La actividad enzimática de las fracciones se mide en alícuotas de 10 μ l de éstas, según la metodología descrita previamente. Aquellas fracciones que contienen actividad fosfodiesterásica dependiente del complejo CaM-Ca (ver Resultados) se juntan y se guardan en alícuotas de 3 ml a -80°C hasta su utilización o se someten a fraccionamientos posteriores para su purificación.

7. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN COLUMNAS DE CALMODULINA - SEFAROSA.

a) Preparación de calmodulina inmovilizada en Sefarosa.

El procedimiento utilizado es el descrito por Klee y Krinks (1978). 5 mg de calmodulina pura de cerebro se incuban con 10 ml de un gel de Sefarosa (Sephacrose) activada con bromuro de cianógeno,

equilibrada en un amortiguador que contiene borato de sodio 0,1 M pH 8,2, $MgCl_2$ 1 mM y $CaCl_2$ 0,02 mM a 4°C durante 18 horas. El líquido sobrenadante no presenta actividad de calmodulina después de la incubación con el gel (medido por activación de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos dependiente de calmodulina). El gel se lava por decantación con varios volúmenes del mismo amortiguador, se resuspende en aminoetanol 0,5 M ajustado a pH 8,0 con HCl y se incuba por 16 horas a 4°C. Este proceso inactiva el bromuro de cianógeno remanente en el gel. Finalmente el gel se lava con un amortiguador que contiene Tris-HCl 20 mM pH 8,0; $MgCl_2$ 3mM, $CaCl_2$ 0,02 mM y azida de sodio 0,02% p/v. El gel se mantiene en este amortiguador hasta su utilización.

b) *Cromatografía de afinidad preparativa.*

La mitad de la preparación enzimática proveniente de la etapa de cromatografía de intercambio iónico del proceso de purificación se concentra por ultrafiltración en un sistema Amicon o por precipitación con sulfato de amonio a 80% de saturación y posterior diálisis contra el amortiguador A.

Las preparaciones enzimáticas concentradas se ajustan a una concentración de $CaCl_2$ de 0,5 mM y se someten a cromatografía de afinidad en una columna de calmodulina-Sefarosa (calmodulina-Sepharose) de 2 ml de volumen, equilibrada previamente con una solución que contiene Tris-HCl 40 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 0,2 mM, $MgCl_2$ 3 mM y DTT 0,1 mM (amortiguador C). Una vez colocada la muestra, la columna se lava con 20 ml de la misma solución y luego con 10 ml de amortiguador C que contiene NaCl 0,2 M. La elución de la actividad fosfodiesterásica retenida en la columna se lleva a cabo con una solución que contiene Tris-HCl 40 mM pH 7,5, EGTA 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, DTT 0,1 mM y

8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

a) *Electroforesis preparativa.*

La electroforesis preparativa se lleva a cabo en geles de poliacrilamida al 6% por un método similar al descrito por Usunov y Wess, (1972).

Los geles se preparan en un tampón que contiene Tris 10 mM pH 8,0; $MgCl_2$ 5 mM, 2-mercaptoetanol 3 mM, EGTA 0,1 mM, acrilamida 6% y bisacrilamida 0,05% p/v. La polimerización se inicia por la adición de 15 μ l de TEMED y 0,375 ml de persulfato de amonio 10% p/v. 16 ml de esta solución se colocan en tubos de vidrio (1,4 x 11 cms) y se mantienen a temperatura ambiente por 3 horas hasta la formación del gel.

Los geles se someten a una preelectroforesis en un amortiguador de electrodos que contienen Tris 50 mM, glicina 0,38 M pH 8,8; $MgCl_2$ 5mM, 2-mercaptoetanol 3 mM y EGTA 0,1 mM, a una corriente constante de 4 mA por 16 horas en una cámara de electroforesis refrigerada a 4°C.

La electroforesis de 1 ml de muestra que contiene sacarosa al 10% p/v y azul de bromofenol 0,1% p/v en amortiguador D se realiza a una corriente constante de 8 mA en condiciones similares a las descritas para la preelectroforesis. Este proceso se detiene cuando el colorante avanza entre un 90 y 95% del largo total del gel, lo que ocurre en 3 y media horas de electroforesis.

Los geles se cortan transversalmente en trozos de 4 mm de espesor y se dejan en presencia de 1,5 ml de amortiguador D por 16 horas 4°C para permitir la elución de la enzima. Las fracciones que poseen actividad fosfodiesterásica se juntan y se concentran por ultrafiltración en un sistema Amicon.

b) *Electroforesis analítica.*

Los geles de poliacrilamida se preparan en tubos de 2 ml de volumen por un método similar al descrito anteriormente.

Los geles se someten a una preelectroforesis a 0,5 mA/gel y la electroforesis de la muestra (0,1 ml) se desarrolla a 1 mA por gel.

La elución de la actividad enzimática se lleva a cabo en trozos de gel de 4 mm de espesor, cortados transversalmente, que se incuban a 4°C durante 16 horas en presencia de amortiguador D que contiene seroálbumina bovina 0,5 mg/ml.

9. TRATAMIENTO DE LAS PREPARACIONES ENZIMATICAS CON TRIPSINA.

La preparación enzimática proveniente de DEAE-celulosa se incuba con tripsina 2 µg/ml por 10 minutos a 30°C en el amortiguador A o en las condiciones que se indican en el capítulo III. La preparación enzimática proveniente de calmodulina-Sefarosa se incuba con tripsina 10 µg/ml.

La reacción se inicia por adición de la tripsina y se detiene por adición del inhibidor de tripsina de poroto de soya en una concentración final cinco veces superior a la de la proteasa. Los blancos se realizan agregando el inhibidor y la tripsina al comienzo de la reacción.

10. FILTRACION EN GELES DE SEFADEX.

Los experimentos de filtración en geles se desarrollan en una columna de Sefadex (Sephadex) G-200 (Superfino, 1,5x66 cm) previamente equilibrada con el amortiguador A que contiene NaCl 100 mM. La muestra, en un volumen máximo de 1 ml, se filtra a un flujo constante de 12 ml por hora a 4°C y se recogen fracciones de 2 ml.

La determinación del peso molecular relativo se realiza midiendo el volumen de elución (V_e) de las muestras y comparándolo con el volumen de elución de proteínas de peso molecular conocido. Se usan las siguientes proteínas marcadoras cuyo peso molecular se indica entre paréntesis: citocromo c (12.000), ovalbúmina (43.000), seroalbúmina (67.000), fosforilasa b (94.000) fosfatasa alcalina (160.000). El volumen de exclusión (V_o) se determina filtrando azul dextrano y el volumen total (V_t) se determina con agua tritiada.

La expresión de los resultados se realiza graficando K_{av} en función del logaritmo del peso molecular, siendo $K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$

11. ELECTROFORESIS EN GELES EN CONDICIONES DESNATURANTES.

La electroforesis en condiciones desnaturalantes se realiza en geles de poliacrilamida en placa que contienen dodecilsulfato de sodio (SDS) de acuerdo al método descrito por Laemmli (1979).

El gel de concentración contiene acrilamida al 3% p/v y el gel separador contiene acrilamida al 10% p/v. La electroforesis se realiza a una corriente constante de 30 mA a temperatura ambiente. Las proteínas marcadoras, cuyo peso molecular se indica entre paréntesis son: fosforilasa b (94.000), seroalbúmina (67.000), ovalbúmina (43.000) y anhidrasa carbónica (30.000). La determinación del peso molecular de la fosfodiesterasa se realiza por interpolación de su movilidad relativa (R_f) en un gráfico del logaritmo del peso molecular de los marcadores versus la movilidad respectiva.

La tinción de proteínas se realiza con azul de Coomassie.

12. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS.

La determinación de la concentración de proteínas se realiza por el método de unión de azul de Coomassie descrito por Bradford (1976) con algunas modificaciones. 0,5 ml de muestra, que contienen entre 1 y 10 μg de proteína se mezclan con 0,5 ml de solución de colorante. La absorbancia se mide a 595 nm. La curva de calibración se realiza con seroalbúmina como proteína patrón.

RESULTADOS

A) ACTIVIDAD FOSFODIESTERASICA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS EN OVARIO DE *XENOPUS LAEVIS*.

1. Actividad fosfodiesterásica en extracto de ovario.

La presencia de la actividad fosfodiesterásica de nucleótidos cíclicos en ovario de *Xenopus laevis* ha sido descrita por diferentes autores (Allende y col., 1977; Echeverría y col., 1980; Wasserman y Smith, 1981; Miot y Erneux, 1982; Mulner y col., 1979; Baltus y col., 1981). La figura 2 muestra los resultados obtenidos al analizar la actividad fosfodiesterásica usando cGMP como sustrato en extracto de ovario de *Xenopus laevis* (extracto B).

Se observa que a bajas concentraciones de cGMP ($1 \mu\text{M}$) la actividad basal es estimulada alrededor de seis veces por calmodulina y calcio entre los límites en que ambas actividades son lineales respecto de la cantidad de proteínas (figura 2A). Si se mide la actividad enzimática con cGMP $50 \mu\text{M}$, la estimulación de la actividad basal por calmodulina y calcio es sólo dos veces (figura 2B).

La estimulación de sólo dos veces en la actividad fosfodiesterásica por efecto de calmodulina y calcio medida en presencia de cGMP $50 \mu\text{M}$ puede deberse a la presencia en el extracto de otras enzimas que hidrolizan dicho nucleótido, las que no serían estimulables por los efectos señalados.

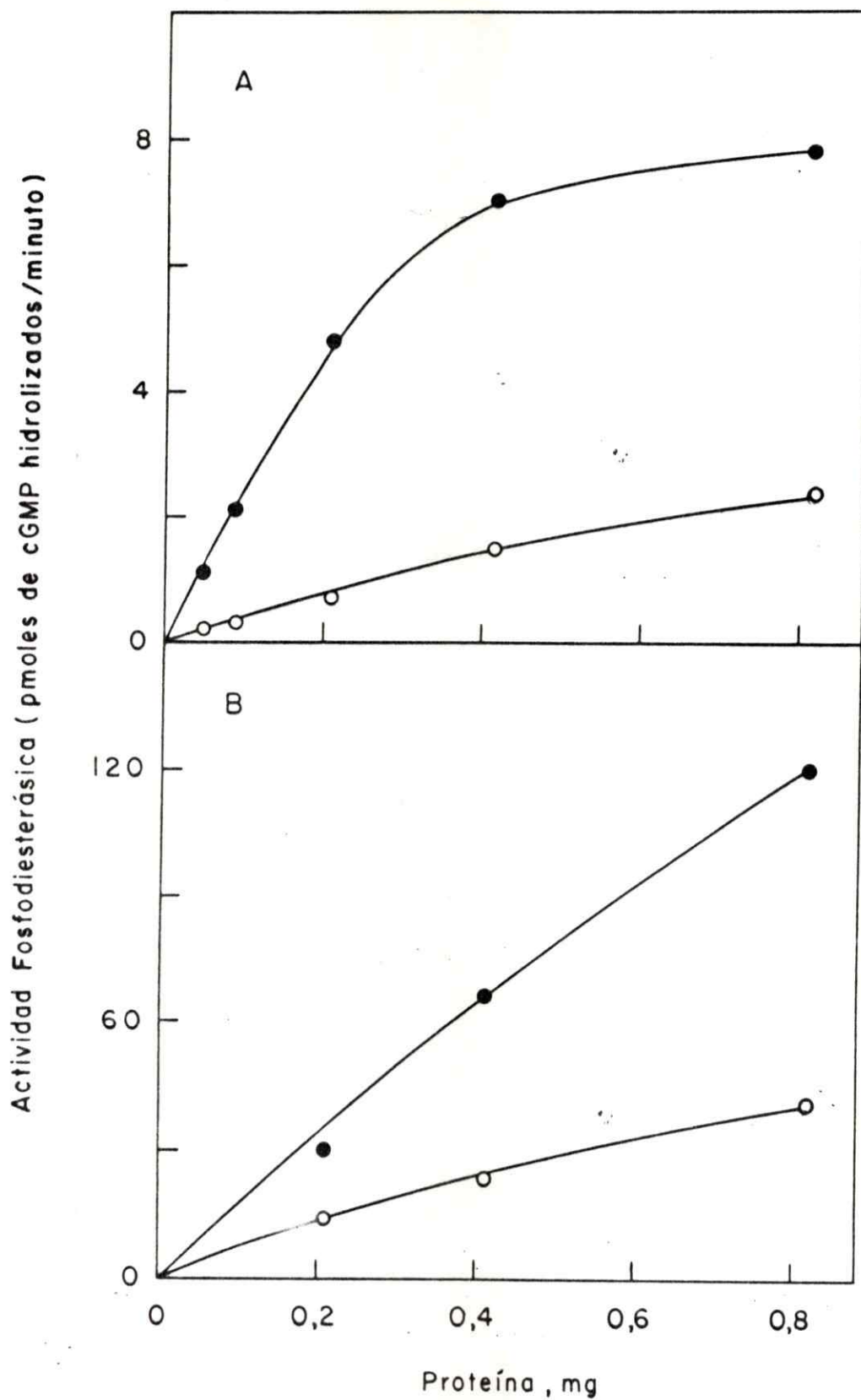


Figura 2. Actividad fosfodiesterásica en extracto de ovario.

Figura 2. Actividad fosfodiesterásica en extracto de ovario. Se mide la actividad basal (o) y estimulada por calmodulina y calcio (●) de un extracto de ovario (extracto B). A, [³H] cGMP 1 μM (a.e.: 5x10⁵ cpm/nmol). B, [³H] cGMP 50 μM (a.e.: 2,5x10⁴ cpm/nmol).

2. *Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos de extracto de ovario.*

Con el objeto de identificar la(s) actividad(es) fosfodiesterásica(s) de nucleótidos cíclicos presentes en los extractos de ovario, éstos se someten a una cromatografía en columna de DEAE-celulosa (0,5 x 7 cm) de acuerdo al procedimiento descrito en Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.

Se observa que la actividad enzimática eluye en dos picos que difieren en el comportamiento cromatográfico, la sensibilidad a calmodulina y calcio y la especificidad de sustrato. El primer pico, denominado fosfodiesterasa I, eluye a una concentración de acetato de sodio de 200 mM, es estimulable por calmodulina y calcio e hidroliza tanto cAMP como cGMP (figuras 3A y B). El segundo pico de actividad, denominado fosfodiesterasa II, eluye con 350 mM de acetato de sodio, es específico para cAMP y no es estimulado por calmodulina (figura 3A). No se observan actividades enzimáticas específicas para cGMP.

Otra actividad enzimática ha sido detectada recientemente en nuestro laboratorio. Esta enzima hidroliza cAMP y cGMP, eluye de una columna de DEAE-celulosa entre 250 y 300 mM de acetato de sodio, su actividad no es estimulable por calmodulina (C. Connelly, comunicación personal y podría dar cuenta, en parte, de la actividad basal observada.

Los estudios de la fosfodiesterasa I desarrollados en esta tesis se realizan con cGMP como sustrato a fin de eliminar la posible contaminación por la fosfodiesterasa II, enzima que no hidroliza este nucleótido.

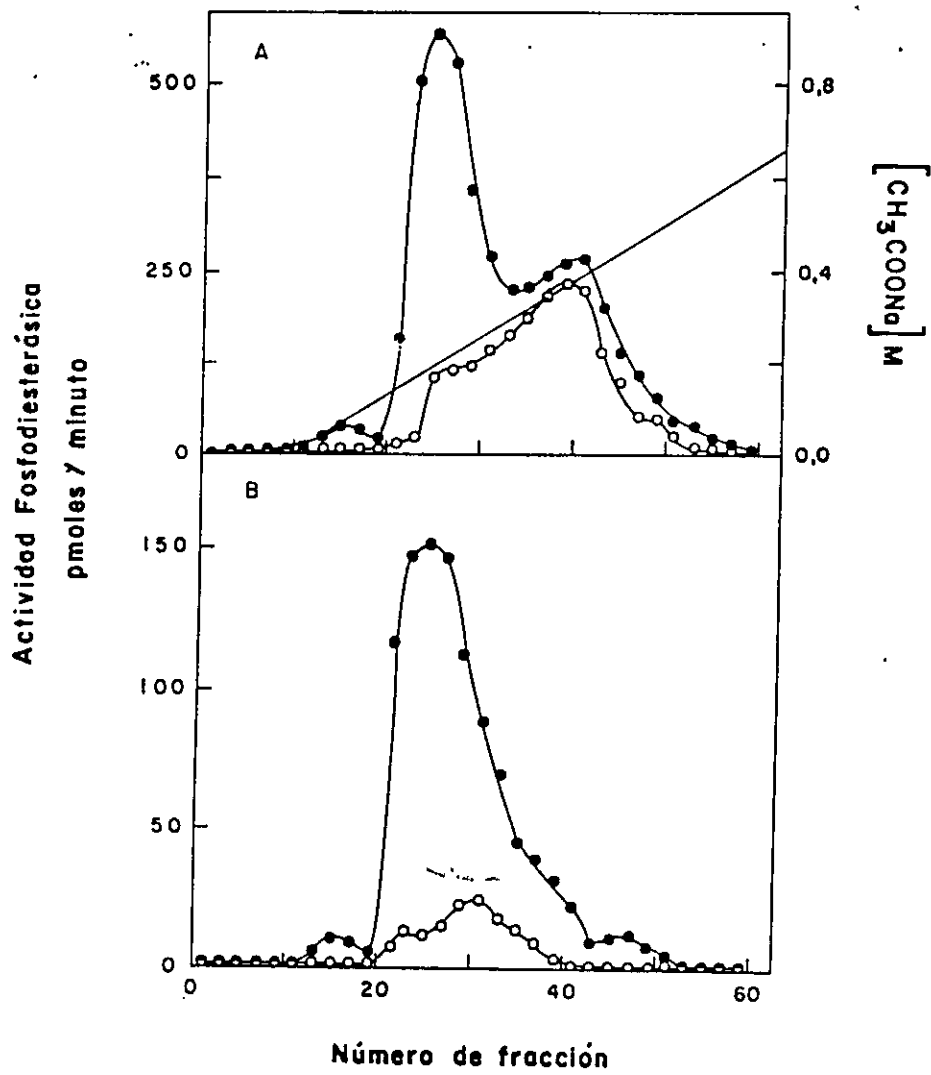


Figura 3. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos de extracto de ovario.

B) PURIFICACION DE LA FOSFODIESTERASA I DE OVARIO DE *XENOPUS LAEVIS*.

1. Método de Purificación.

El método empleado en la purificación de la fosfodiesterasa I consta de las siguientes etapas:

a) *Preparación del extracto de ovario.*

La fosfodiesterasa I se encuentra en la fracción soluble de un homogeneizado de ovario.

El extracto se prepara de acuerdo a la técnica descrita en Métodos (extracto A). La actividad fosfodiesterásica presente en el extracto se muestra en la tabla de purificación (tabla II).

b) *Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.*

El extracto de ovario se somete a cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-celulosa (1,5 x 30 cm) según se describe en Métodos. Las características de esta cromatografía equivalen a las señaladas en el experimento de cromatografía analítica (Sección A2 de este capítulo). El perfil de elución de las actividades fosfodiesterásicas es similar al que se observa en la figura 3.

La fosfodiesterasa I se purifica en esta etapa alrededor de siete veces en relación al extracto con un rendimiento aproximado a un 50% (Tabla II). La estimulación de la enzima por calmodulina y calcio es aproximadamente seis veces, lo que no difiere mayormente de la estimulación de la actividad presente en el extracto.

c) *Cromatografía de afinidad en columna de calmodulina-Sefarosa.*

En presencia de calcio las enzimas dependientes de calmodulina son retenidas en columnas de calmodulina inmovilizada en Sefarosa. Estas enzimas pueden ser eluidas lavando la resina con un tampón que contiene EGTA.

Al someter la fosfodiesterasa I a cromatografía en una columna de calmodulina-Sefarosa se obtienen los resultados que se muestran en la figura 4. Se observa que alrededor de un 40% de la actividad enzimática no es retenida en la columna en presencia de calcio. Esta actividad no es estimulable por calmodulina. La fosfodiesterasa I, que se une a la resina es eluida por un amortiguador que contiene EGTA. La estimulación de esta enzima por calmodulina y calcio es entre 10 y 15 veces la actividad basal. La enzima se purifica entre 250 y 300 veces con respecto a la etapa anterior, con un rendimiento de un 18% respecto a la actividad original (tabla II).

La fosfodiesterasa I obtenida en la etapa de calmodulina-Sefarosa es inestable y pierde rápidamente su capacidad de ser estimulada por calmodulina y calcio. La adición de glicerol alcalinizado a la preparación en una concentración final de 50% v/v, estabiliza a la enzima y mantiene su capacidad de ser estimulada por los efectores.

d) Electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida.

La fosfodiesterasa I proveniente de la cromatografía en calmodulina-Sefarosa se somete a electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida al 6% con el objeto de asegurar que la preparación enzimática sea homogénea. La figura 5 muestra el perfil de actividad de la enzima en estos geles. El rendimiento obtenido en esta etapa de purificación es un 1% de la actividad original. La pérdida de la actividad enzimática que se observa mediante este procedimiento podría deberse a una inactivación por la baja concentración de proteínas en el sistema y a una baja eficiencia en la elución de la enzima del gel. No es posible cuantificar la purificación de la enzima obtenida en esta etapa debido a la baja sensibilidad de los métodos disponibles para determinar proteínas.

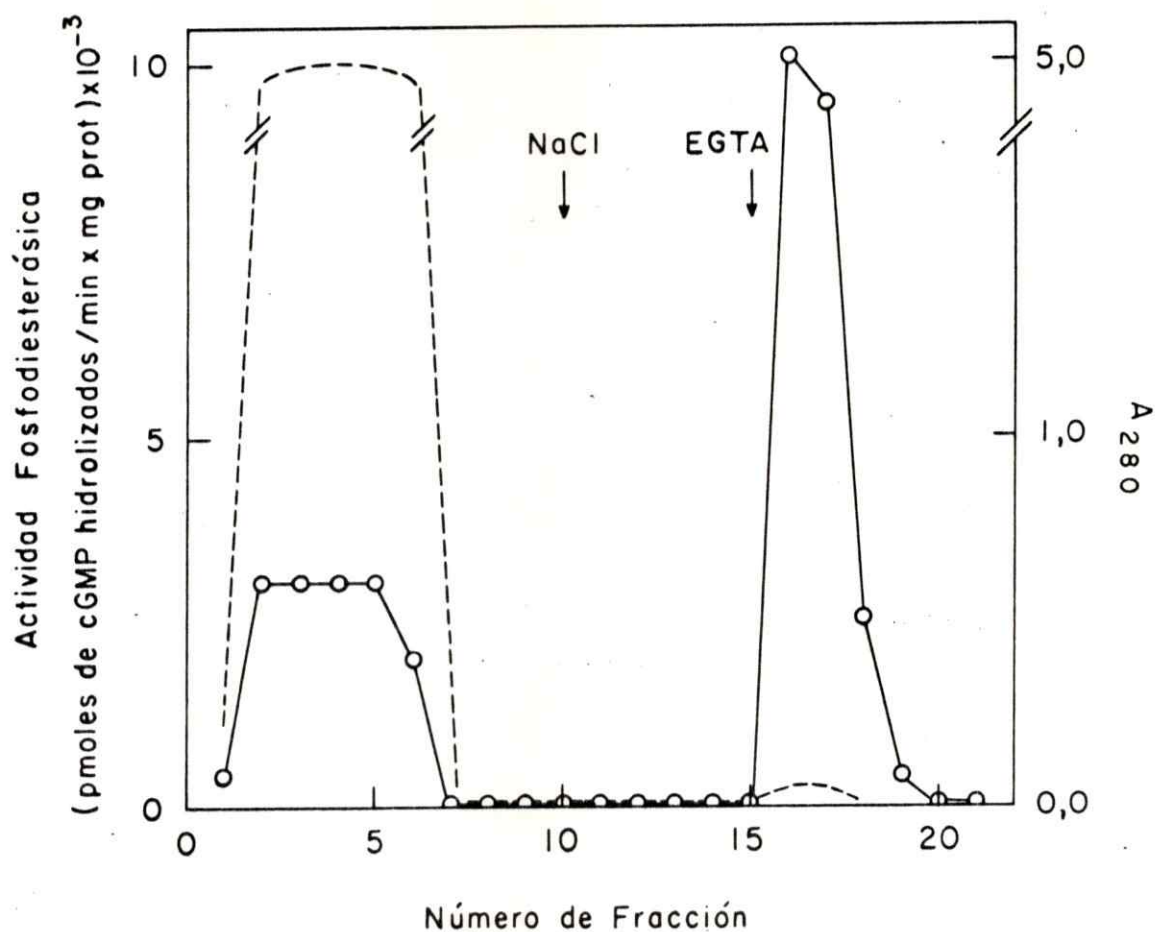


Figura 4. Cromatografía de afinidad de la fosfodiesterasa I en columna de calmodulina-Sepharosa. La enzima proveniente de DEAE-celulosa se somete a cromatografía en una columna de calmodulina-Sepharosa (2 ml) según se describe en Métodos. La actividad estimulada por calmodulina y calcio (o) se mide ajustando la concentración efectiva del ión calcio a 0,5 mM, según el procedimiento general señalado previamente. La absorbancia se mide a 280 nm (---).

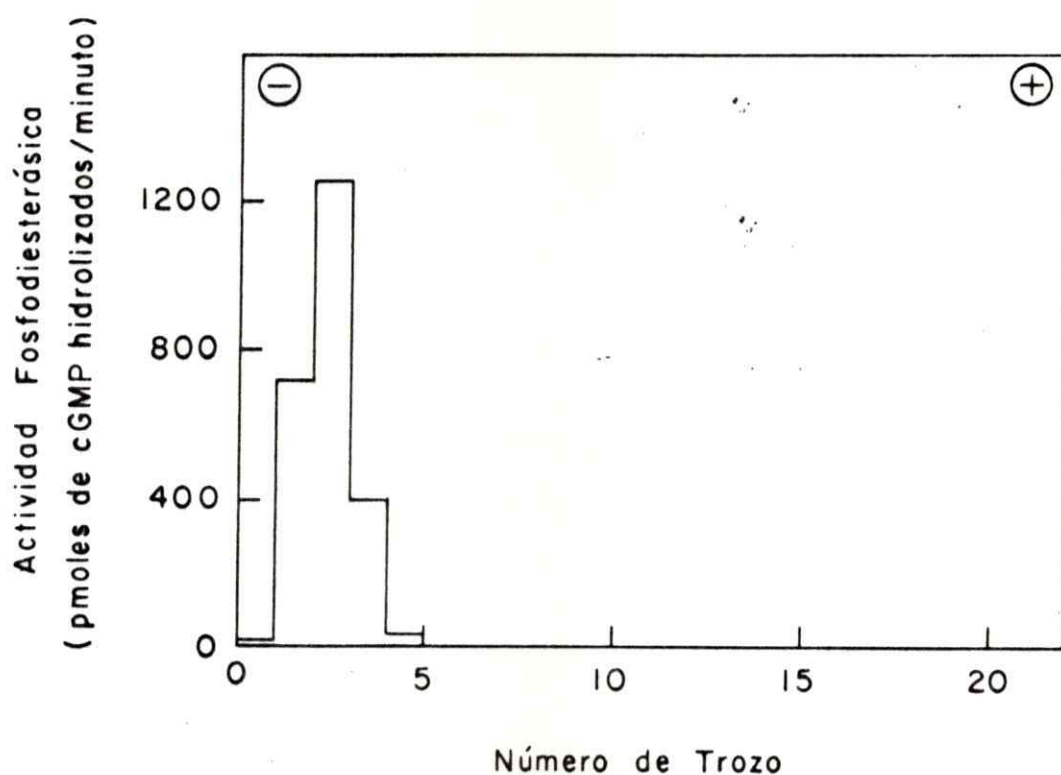


Figura 5. *Electroforesis en geles de poliacrilamida.* La fosfodiesterasa I proveniente de la etapa de calmodulina-Sefarosa se concentra y se somete a una electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida al 6%. La electroforesis se realiza a 8 mA por gel en una cámara refrigerada según el procedimiento descrito en Métodos. Los geles se fraccionan en trozos de 4 mm de espesor, los que eluyen en el tampón A por 16 horas a 4°C. La actividad enzimática se mide en alícuotas del eluido según la metodología general descrita previamente.

TABLA II

Tabla de Purificación

Etapa	unidades totales	volumen ml	a. e. (*) u/mg proteína	purifi- cación. n° veces	rendi- miento. %
Extracto	225.400	245	36,8	1,0	100
DEAE-celulosa	104.400	150	262	7,1	46,3
CaM-Sefarosa	40.840	2,2	74.254	2.017	18,1

(*) Actividad estimulada por calmodulina y calcio.

2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

Con el objeto de tener un criterio cualitativo del grado de pureza de las preparaciones enzimáticas obtenidas mediante el proceso de purificación, éstas se analizan mediante electroforesis en geles en condiciones desnaturalantes. Una alícuota de cada una de las preparaciones obtenidas en las diferentes etapas del proceso se somete a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (Figura 6). Se observa que la etapa de calmodulina-Sefarosa (canal 2) elimina una cantidad considerable de proteínas comparada con la etapa de DEAE-celulosa (canal 1). Las proteínas migran en su mayor parte, en una banda ancha de peso molecular entre 63.000 y 66.000. La enzima obtenida en la etapa de electroforesis preparativa (canal 3 y 6) muestra una sola banda de peso molecular 66.000. Esta etapa de purificación permite obtener una preparación aparentemente homogénea de la fosfodiesterasa I.

C) CARACTERISTICAS GENERALES DE LA FOSFODIESTERASA I.

1) Estudios de inhibición de la hidrólisis cGMP por otros nucleótidos.

Para obtener información sobre la especificidad de la fosfodiesterasa I se analiza la inhibición de la hidrólisis de cGMP por otros nucleótidos. La concentración de nucleótidos no radiactivos usada es 100 μ M mientras que la de [3 H] cGMP es 1 μ M. Los resultados se muestran en la tabla III. Se observa que el cAMP y el cIMP inhiben tanto la actividad basal de hidrólisis de cGMP como la estimulada por calmodulina y calcio en más de un 80%, en cambio el cCMP y el cUMP inhiben sólo la actividad basal en un 28% y un 40% respectivamente. ATP y GTP inhiben la actividad basal en un 60% y un 44% respectivamente. Ambos nucleótidos inhiben la actividad estimulada

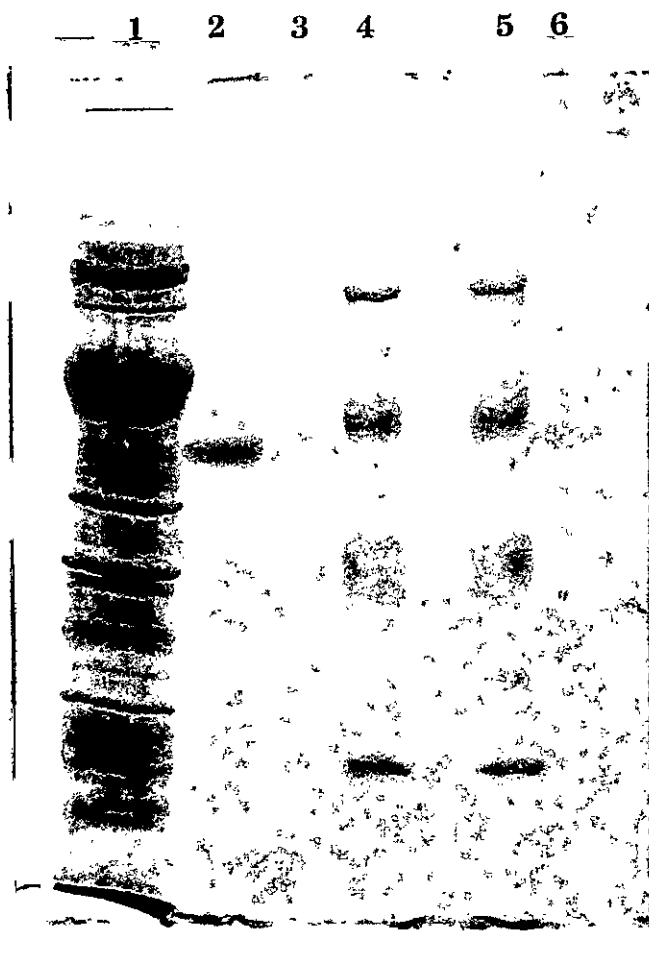


Figura 6. *Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.* Alícuotas de las preparaciones de fosfodiesterasa I obtenidas de las etapas de purificación de DEAE-celulosa (150 μ g, canal 1), calmodulina-Sepharosa (7 μ g, canal 2) y electroforesis en geles de poliacrilamida (aproximadamente 0,5 μ g, canal 3 y 6) se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Las proteínas de referencia usadas (canal 4 y 5), cuyo peso molecular se indica entre paréntesis son: fosforilasa b (94000), seroalbúmina (67000), ovalbúmina (43000), anhidrasa carbónica (30.000). Los geles se tiñen con azul de Coomassie.

TABLA III
Estudios de inhibición de la hidrólisis de cGMP por
otros nucleótidos.

Nucleótido	Actividad enzimática (pmoles/min x mg prot.)	
	Basal	Estimulada por CaM-Ca
Ninguno	18,5	103
cAMP	4,0	9,6
cIMP	0,0	6,7
cUMP	13,3	102
cCMP	6,7	96,3
GTP	7,4	77,0
ATP	10,4	80,0

La actividad de hidrólisis de [^3H] cGMP 1 μM por la fosfodiesterasa I de DEAE-celulosa se mide en presencia de cada uno de los nucleótidos no radiactivos indicados en una concentración de 100 μM , como se describe en Métodos.

por calmodulina y calcio en un 20% aproximadamente.

La inhibición de la actividad enzimática por cAMP se debe a una competencia entre este nucleótido y el cGMP por el sitio activo ya que cAMP también es sustrato de la enzima. El efecto del cIMP puede deberse a una inhibición de la actividad enzimática sin una hidrólisis de este nucleótido. Sin embargo no es posible destacar una hidrólisis del cIMP por la fosfodiesterasa I.

La inhibición de la actividad basal de la enzima por los nucleótidos cUMP, cCMP, ATP y GTP es mayor que el efecto de éstos en la actividad estimulada por calmodulina y calcio. Este hecho se puede explicar por un posible efecto sobre las fosfodiesterasas independientes de calmodulina y calcio presentes en la preparación de fosfodiesterasa I usada en estos ensayos.

2) Actividad de la fosfodiesterasa I en función de la concentración de calmodulina.

El efecto de la concentración de calmodulina en la actividad de la fosfodiesterasa I se analiza usando calmodulina pura de cerebro. Los resultados se muestran en la figura 7. Se observa que el 50% de la estimulación máxima se obtiene con una concentración de calmodulina aproximadamente 6×10^{-9} M, en presencia de ión calcio 0,5 mM. Este valor es similar al que se obtiene para la fosfodiesterasa de cerebro bovino (Klee y col., 1980).

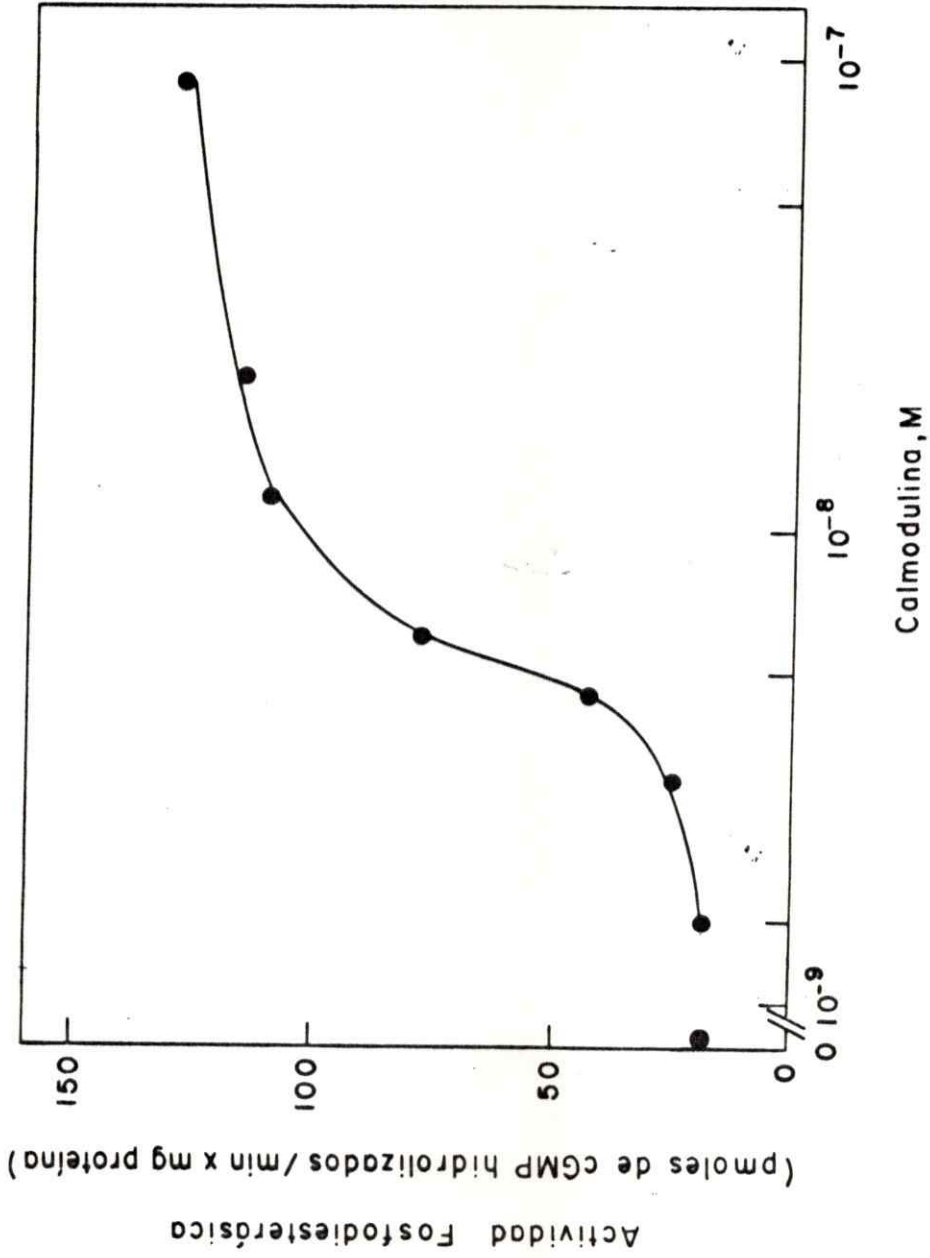


Figura 7. Actividad de la fosfodiesterasa I en función de la concentración de calmodulina.

Figura 7. *Actividad de la fosfodiesterasa I en función de la concentración de calmodulina.* La actividad de la enzima proveniente de DEAE-celulosa (20 μ g) se mide en presencia de concentraciones variables de calmodulina ($1,5 \times 10^{-9}$ a $9,0 \times 10^{-8}$ M) según el método general para medir actividad estimulada por calmodulina y calcio.

3) *Efecto de 2-cloro,10(3 aminopropil)fenotiazina en la activación de la fosfodiesterasa I por calmodulina y calcio.*

Se ha observado que las fenotiazinas inhiben la estimulación por calmodulina de varias enzimas dependientes de dicho activador. Este efecto se debe a una unión de la droga a la calmodulina en presencia de ión calcio (Weiss y Wallace, 1980).

En este experimento se analiza el efecto de 2-cloro,10(3 aminopropil)fenotiazina (CAPP) en la activación de la fosfodiesterasa I por calmodulina. La figura 8 muestra los resultados obtenidos en este estudio. Se observa que la droga en una concentración del orden de 10^{-4} M inhibe totalmente la actividad de la fosfodiesterasa I estimulada por calmodulina y calcio, sin embargo la actividad basal de la enzima es inhibida solamente en un 25% con una concentración de 5×10^{-4} M. La concentración de CAPP necesaria para inhibir un 50% la estimulación máxima de la enzima por calmodulina y calcio es $2,5 \times 10^{-5}$ M.

4) *Actividad de la fosfodiesterasa I en función de la concentración de sustrato.*

Con el objeto de analizar el efecto de calmodulina en la fosfodiesterasa I se mide la actividad basal y estimulada por calmodulina y calcio en presencia de concentraciones variables de cGMP entre 0,4 y 200 μ M. La figura 9 muestra los resultados obtenidos. En la tabla IV se muestran los valores de las constantes cinéticas de la enzima obtenidos por extrapolación de las rectas del gráfico. Se observa que la $V_{m\acute{a}x}$ de la actividad estimulada por calmodulina y calcio es aproximadamente cuatro veces mayor que la $V_{m\acute{a}x}$ de la actividad basal. La K_m aparente de la enzima disminuye cerca de dos veces por efecto de la

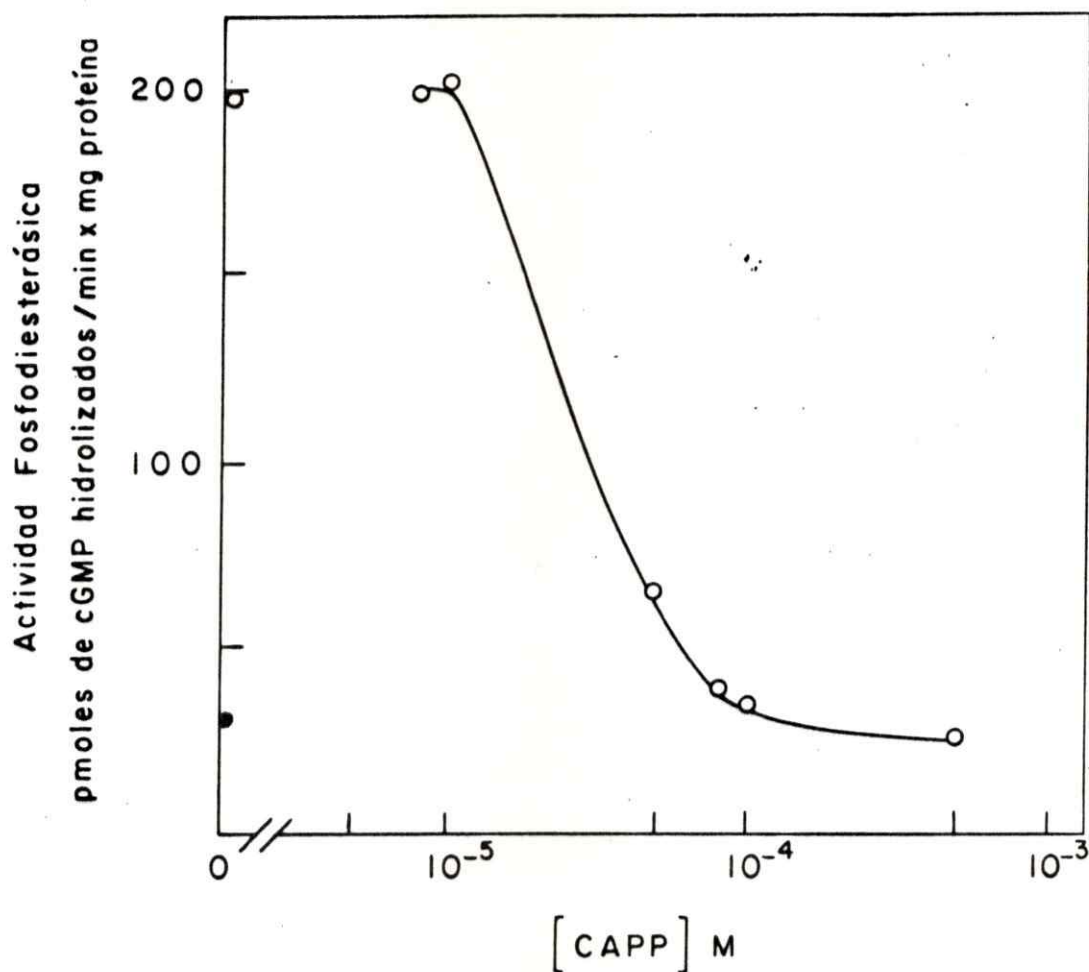


Figura 8. Efecto de 2-cloro,10(3-aminopropil)fenotiazina en la activación de la fosfodiesterasa I por calmodulina. La actividad en la enzima obtenida de DEAE-celulosa (20 μ g) se mide en presencia de calmodulina y calcio y de concentraciones variables de 2-cloro,10(3-aminopropil)fenotiazina (CAPP) entre 8×10^{-5} y 5×10^{-4} M (o), según el ensayo general descrito en Métodos. La actividad basal es 33,8 pmoles/minuto x mg proteína, medida en ausencia de CAPP (●).

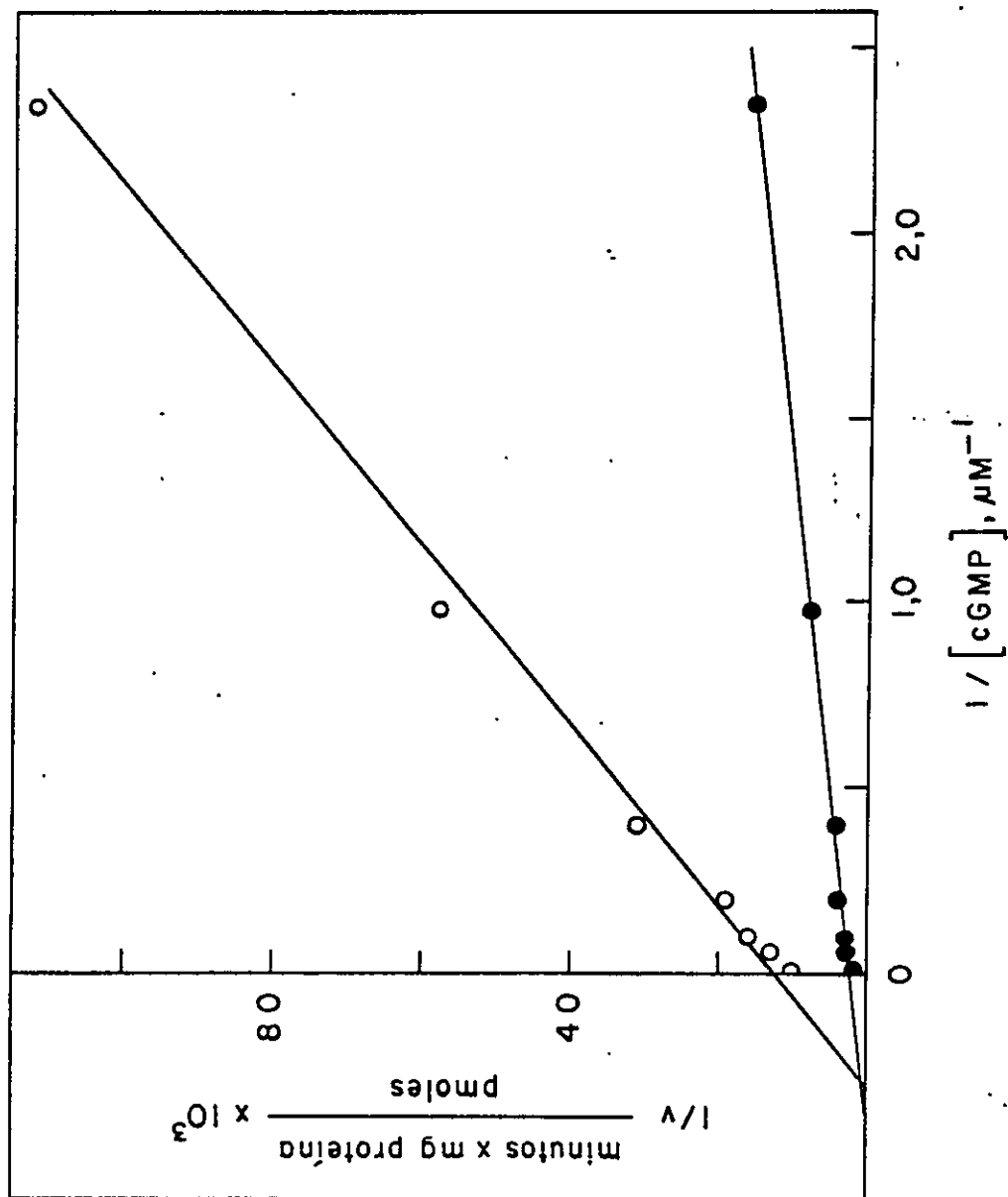


Figura 9. Actividad de la fosfodiesterasa I en función de la concentración de sustrato.

Figura 9. Actividad de la fosfodiesterasa I en función de la concentración de sustrato. La enzima obtenida de DEAE-celulosa (20 μ g) se incubaba con [3 H] cGMP entre 0,4 y 200 μ M (a.e. $1,2 \times 10^7$ a $6,0 \times 10^3$ cpm/nmol respectivamente) y se mide la actividad basal (\circ) y estimulada por calmodulina y calcio (\bullet). La figura corresponde a un gráfico de Lineweaver-Burk en el cual las rectas son líneas de regresión obtenidas por el método de los mínimos cuadrados. La reacción se inicia mediante la adición de la enzima.

TABLA IV

Constantes cinéticas de la fosfodiesterasa I.

Actividad	Km(μ M)	Vmax(pmoles/minuto x mg proteína)
Basal	4,0	93,4
Estimulada por CaM-Ca	2,4	411

Los valores de las constantes cinéticas de la fosfodiesterasa I se obtuvieron por cálculo con los datos del gráfico de la figura 7.

calmodulina y el ión calcio. La concentración de calmodulina usada es alrededor de diez veces mayor que la concentración necesaria para obtener la estimulación máxima de la enzima. Se han obtenido resultados similares con la fosfodiesterasa de cerebro de bovino (Cheung, 1971; Klee y col., 1979; Morrill y col., 1979).

D) ACTIVACION DE LA FOSFODIESTERASA I POR PROTEASAS.

1) *Efecto de algunas enzimas hidrolíticas en la actividad de la fosfodiesterasa I.*

Diversos autores han descrito que el tratamiento controlado con proteasas de la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina y calcio provoca una estimulación de la enzima (Cheung, 1971; Sakai y col., 1977. Tucker y col., 1981. En este experimento se analiza el efecto de la preincubación de la fosfodiesterasa I con diferentes enzimas hidrolíticas sobre la actividad fosfodiesterásica. Los resultados obtenidos en el experimento se muestran en la tabla V. Se observa que la tripsina y la subtilisina provocan un aumento de cinco veces en la actividad basal, en cambio la quimotripsina no produce ese efecto. La lisozima, que hidroliza oligosacáridos, modifica la actividad basal sólo en un 50%.

Los estudios del efecto de las proteasas en la fosfodiesterasa I que se presentan a continuación se realizan con tripsina ya que existe un inhibidor específico de la actividad proteolítica, obtenido de poroto de soya que no afecta a la actividad fosfodiesterásica.

2) *Cinética de activación de la fosfodiesterasa I por tripsina.*

Al preincubar la fosfodiesterasa I proveniente de DEAE-celulosa con tripsina se observa un aumento de la actividad basal de hidrólisis

TABLA V

Efecto de enzimas hidrolíticas en la actividad de la fosfodiesterasa I.

Preincubación	Actividad fosfodiesterásica (pmoles/minuto x mg proteína)
Control	22,6
Tripsina	99,5
Lisozima	33,2
Quimotripsina	23,0
Subtilisina	110,0

La fosfodiesterasa I proveniente de DEAE-celulosa (200 μ g) se preincuba con cada una de las enzimas indicadas (0,5 μ g) o en ausencia de ellas (control) en un volumen final de 200 μ l por 10 minutos a 30°C. La reacción se detiene por adición de 20 μ l de una mezcla de benzamidina, fenilmetilsulfonil fluoruro e inhibidor de tripsina de poroto de soya en una concentración final de 50 mM, 1 mM y 10 μ g/ml respectivamente y se mide la actividad basal de la enzima.

de cGMP. La figura 10 muestra el efecto de la preincubación de la fosfodiesterasa I con tripsina a diferentes tiempos sobre la hidrólisis de cAMP y cGMP. Se observa que la actividad máxima de hidrólisis de ambos sustratos se alcanza en 5 minutos o menos de preincubación y es similar a la actividad estimulada por calmodulina y calcio. La actividad enzimática se mantiene sin mayores variaciones hasta los 60 minutos de incubación con la proteasa. Se obtienen resultados similares con la fosfodiesterasa I purificada por cromatografía en calmodulina-Sefarosa.

3) *Efecto de la concentración de tripsina sobre la actividad de la fosfodiesterasa I.*

Se analiza el efecto de diferentes concentraciones de tripsina sobre la actividad basal de la fosfodiesterasa I. Los resultados se muestran en la figura 11. Se observa que la tripsina entre 3 y 4 $\mu\text{g/ml}$ activa a la fosfodiesterasa I alcanzándose una actividad cuyo valor es similar al de la enzima control medido en presencia de calmodulina y calcio. Esta actividad se sobrepasa con concentraciones mayores de la proteasa. Entre los límites de concentraciones de tripsina utilizadas no se observa una disminución de la actividad fosfodiesterásica por una proteólisis excesiva.

4) *Efecto de la tripsina sobre la estimulación de la fosfodiesterasa I por calmodulina-calcio.*

Este experimento tiene por objeto establecer si la actividad de la fosfodiesterasa I estimulada por calmodulina y calcio es alterada por una preincubación de la enzima con tripsina. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla VI. Se observa que la enzima preincubada con tripsina tiene una actividad basal alrededor de siete veces mayor que la actividad de la enzima control. Esta enzima es estimulada sólo

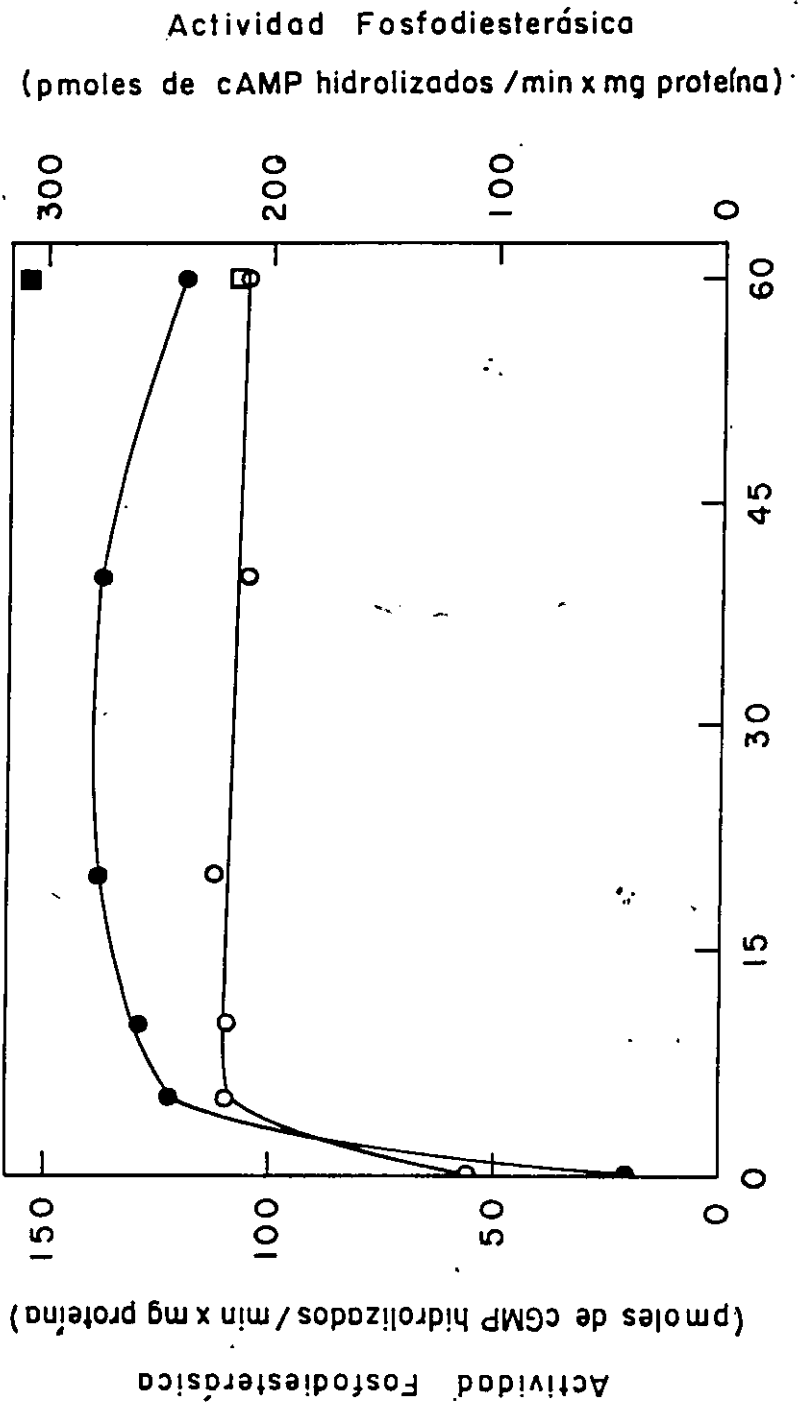


Figura 10. Cinética de activación de la fosfodiesterasa I por tripsina.

Figura 10. *Cinética de activación de la fosfodiesterasa I por tripsina.* La enzima obtenida de DEAE-celulosa (2 mg de proteína) se preincuba con 2 μ g de tripsina a 30°C en un volumen final de 1 ml. En los tiempos indicados, se toman alícuotas de 10 μ l y se agregan a los tubos que contienen los componentes del ensayo de actividad basal y 2 μ g del inhibidor de poroto de soya. La hidrólisis de cAMP (○) y cGMP (●) se mide según la metodología general descrita. La actividad estimulada por calmodulina y calcio se mide a los 60 minutos de preincubación y es 153 pmoles/minuto x mg proteína para cGMP (■) y 210 pmoles/minuto x mg proteína para cAMP (□).

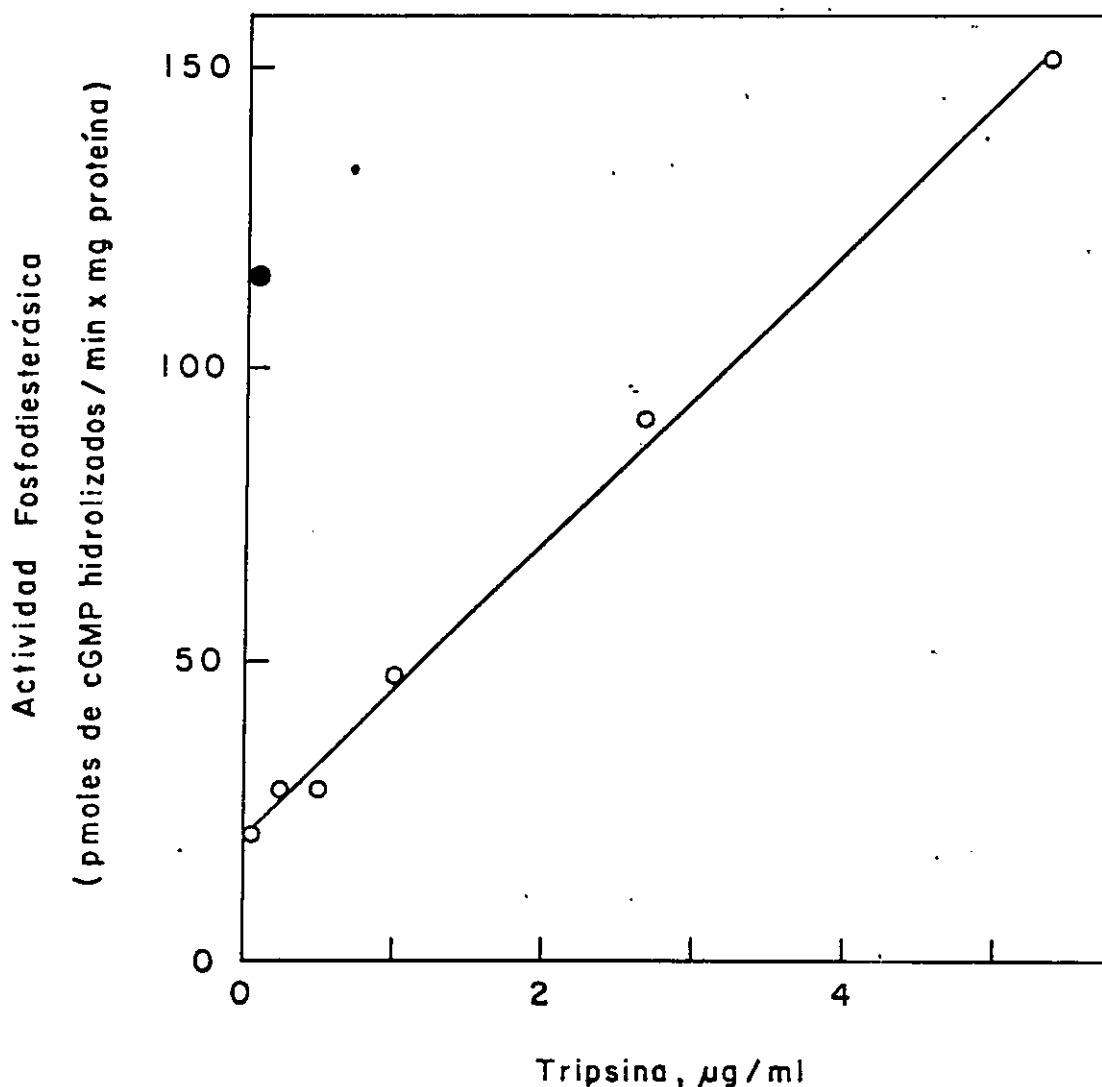


Figura 11. Efecto de la concentración de tripsina sobre la actividad de la fosfodiesterasa I. La enzima proveniente de DEAE-celulosa (20 μg) se preincuba con tripsina (0 a 5,3 $\mu\text{g/ml}$) por 10 minutos a 30°C en un volumen final de 70 μl . La reacción se detiene por adición de inhibidor de tripsina de poroto de soya (20 μg) y se mide la actividad basal (o) en cada caso como se indica en Métodos. La actividad de la enzima estimulada por calmodulina y calcio (●) es 112 pmoles/minuto x mg proteína.

TABLA VI

Efecto de la tripsina sobre la estimulación de la fosfodiesterasa I
el complejo calmodulina-calcio

Preincubación	Actividad fosfodiesterásica (p _m oles/min x mg proteína).		E
	Basal	Estimulada por CaM-Ca	B
Control	20	121	6,05
Tripsina	137	153	1,12

La fosfodiesterasa I obtenida de DEAE-celulosa se preincuba en presencia y ausencia de tripsina y se mide la actividad basal y estimulada por calmodulina y calcio. La razón actividad estimulada por calmodulina y calcio respecto a la actividad basal (E/B) indica el número de veces que la enzima es estimulada por estos efectores.

1,12 veces por calmodulina y calcio a diferencia de la enzima control que es estimulada alrededor de seis veces por los efectores.

La tripsina provoca una pérdida de la sensibilidad de la fosfodiesterasa I a la estimulación por calmodulina.

5) *Efecto de la tripsina sobre la actividad de la fosfodiesterasa I.*

La activación de la fosfodiesterasa I por calmodulina y calcio se debe principalmente a un aumento de la velocidad máxima de la enzima (Figura 9, tabla IV). Se observa también una disminución en la K_m aparente de la enzima a la mitad del valor de la actividad basal.

Se analiza el efecto de la preincubación de la fosfodiesterasa I proveniente de calmodulina-Sefarosa con tripsina en los parámetros cinéticos de la enzima. Los resultados se muestran en la figura 12 y los valores de las constantes cinéticas se resumen en la tabla VIII. Se observa que la activación de la fosfodiesterasa por tripsina se debe principalmente a un aumento de la $V_{m\acute{a}x}$. Se observa también una disminución de la K_m de la enzima. Estos resultados son similares a los obtenidos en la activación de la enzima por calmodulina y calcio.

E) EFECTO DE LA TRIPSINA SOBRE ALGUNAS PROPIEDADES MOLECULARES DE LA FOSFODIESTERASA I.

1) *Efecto de la tripsina sobre la migración electroforética de la fosfodiesterasa I.*

El aumento de la actividad basal y la pérdida de la sensibilidad a calmodulina y calcio de la fosfodiesterasa I indican que la tripsina estaría modificando la estructura de la enzima. La figura 13

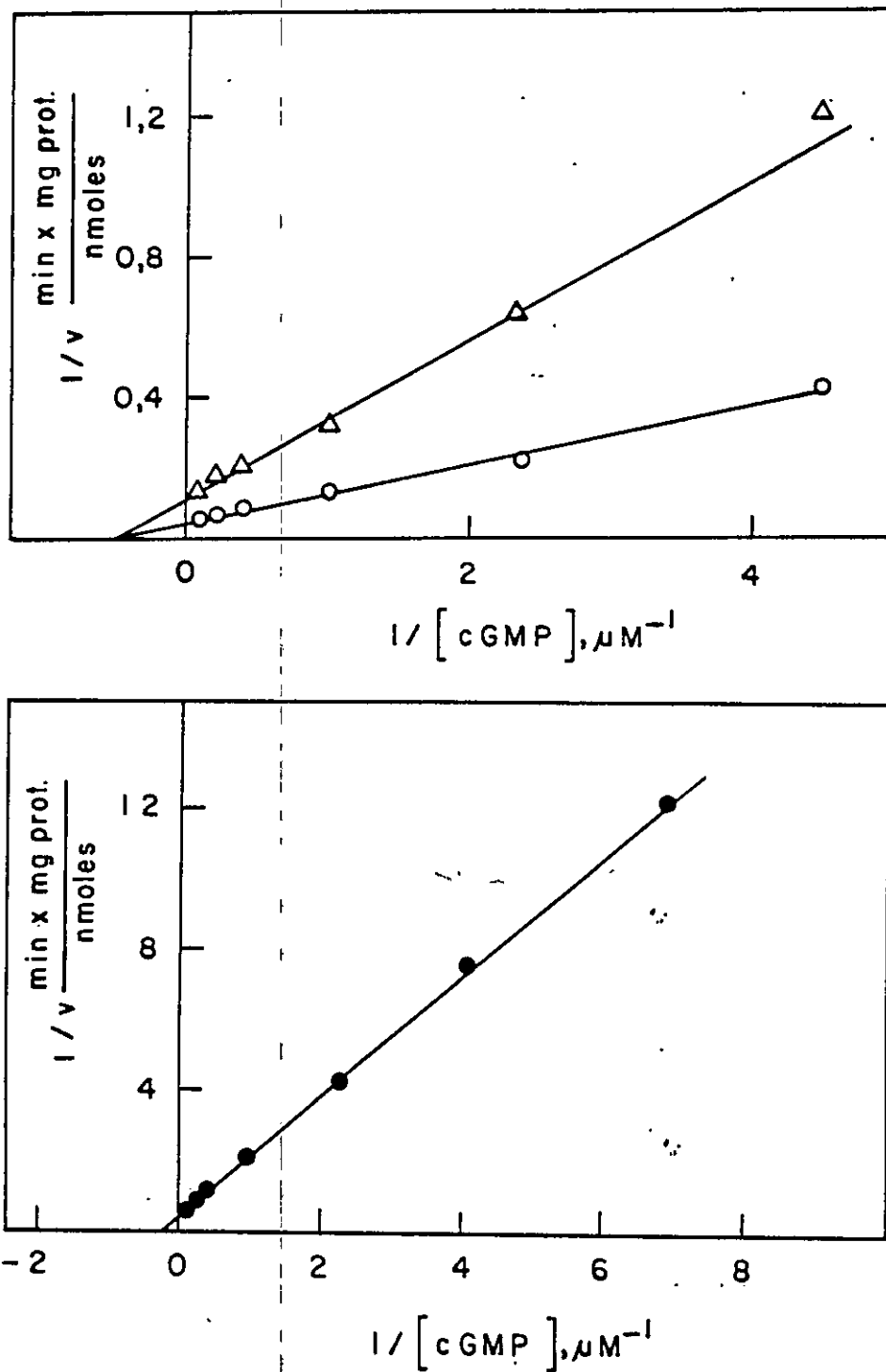


Figura 12. Efecto de la tripsina sobre la actividad de la fosfodiesterasa I.

Figura 12. *Efecto de la tripsina sobre la actividad de la fosfodiesterasa I.* La enzima proveniente de la etapa de calmodulina-Sefarosa (10 μg) se incuba en presencia de tripsina (7 μg) o en ausencia de la proteasa (control) por 20 minutos a 0°C en un volumen final de 500 μl . Al final del tiempo se adiciona 50 μg de inhibidor de tripsina de poroto de soya. Se analiza la actividad basal (\bullet) y estimulada por calmodulina y calcio (\circ) de la enzima control y la actividad basal (\square) de la enzima incubada en presencia de tripsina como se describe en Métodos. La concentración de [^3H] cGMP fue entre 0,4 y 200 μM (a.e. $1,2 \times 10^7$ a $6,0 \times 10^3$ respectivamente).

TABLA VII

Efecto de tripsina sobre las constantes cinéticas de fosfodiesterasa I.

Actividad	Km (μ M)	Vmax (nmoles/minuto x mg prot.)
Basal	5,0	2,0
Estimulada por calmodulina y calcio.	2,9	25,0
Estimulada por tripsina.	2,5	15,0

Los valores de las constantes cinéticas se obtuvieron por cálculo con los datos de los gráficos de los gráficos de la Figura 13.

muestra el efecto de la incubación de la fosfodiesterasa I con tripsina en la migración electroforética de la enzima en geles de poliacrilamida al 6%. Se observa que la fosfodiesterasa que no ha sido tratada con tripsina tiene una migración relativa (R_f) de 0,10. Esta actividad es estimulada por calmodulina y calcio (figura 13A). El tratamiento con tripsina modifica la migración electroforética de la fosfodiesterasa I, observándose un R_f de 0,32. La actividad basal de la enzima es similar a la actividad medida en presencia de calmodulina y calcio (figura 13B).

Las diferencias observadas en la migración electroforética de la fosfodiesterasa I por efecto de la tripsina pueden deberse a la remoción de uno o más péptidos que modifiquen la carga eléctrica y el peso molecular de la enzima.

2) Efecto de la tripsina sobre la retención de la fosfodiesterasa I en columna de calmodulina-Sefarosa.

Con el objeto de analizar si el tratamiento con tripsina altera la capacidad de unión de la fosfodiesterasa I a calmodulina se analiza el efecto de la tripsina en la retención de la enzima en una columna de calmodulina-Sefarosa. La figura 14 muestra los resultados obtenidos en este experimento. Se observa que la enzima control, que no ha sido tratada con tripsina, se retiene en la columna en presencia de ión calcio. Más del 70% de la actividad enzimática es eluida por EGTA y es estimulada alrededor de diez veces por calmodulina y calcio (figura 14A). La fosfodiesterasa I tratada con tripsina pierde la capacidad de unirse a la calmodulina-Sefarosa en presencia de calcio. Más del 90% de la actividad enzimática, que no es estimulable por calmodulina y calcio, se recupera en el lavado de la columna, quedando cerca de un 10% de la

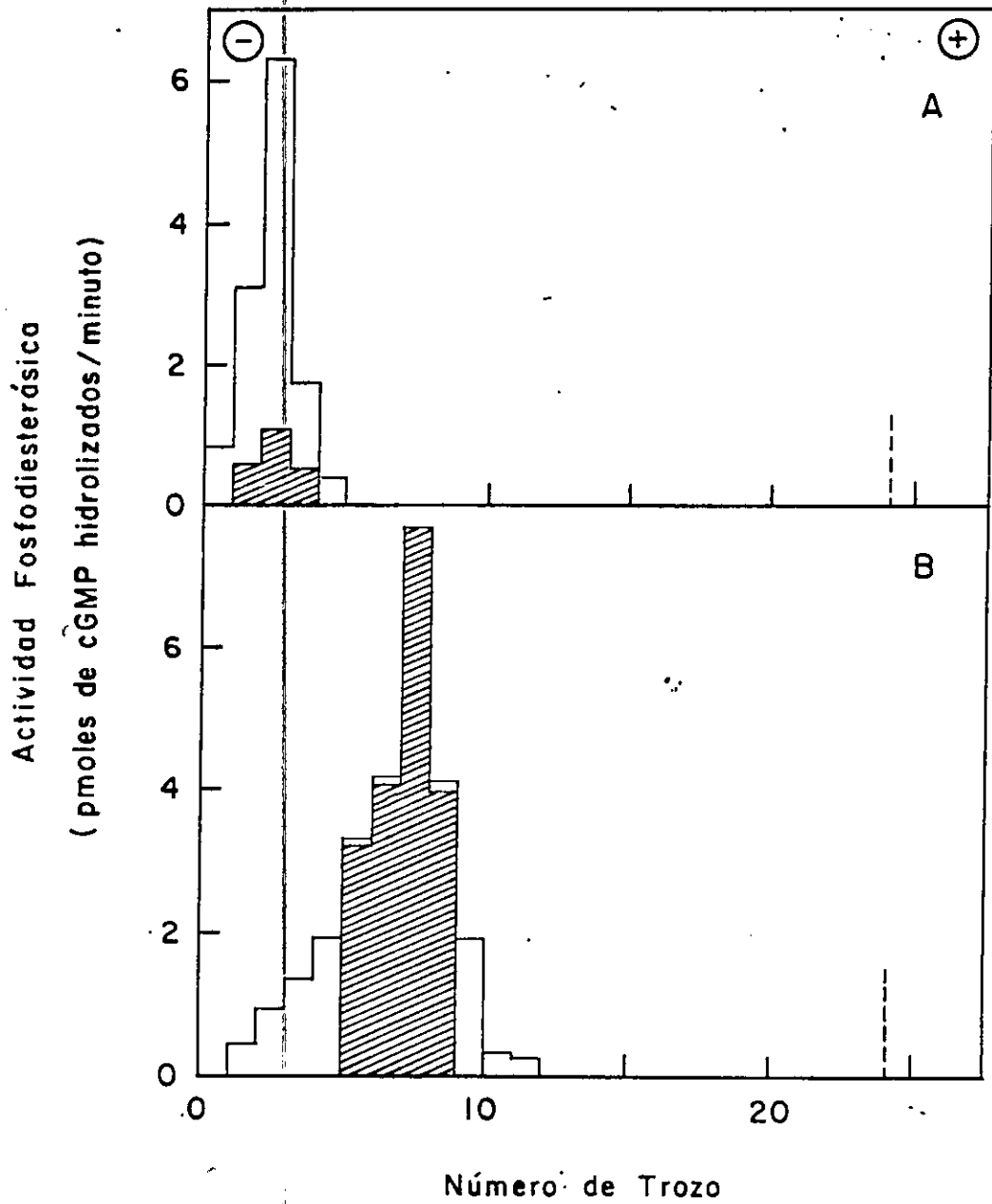


Figura 13. Efecto de la tripsina sobre la migración electroforética de la fosfodiesterasa I.

Figura 13. Efecto de la tripsina sobre la migración electroforética de la fosfodiesterasa I. La enzima obtenida de DEAE-celulosa (200 μg) se somete a electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% según se describe en Métodos (A). Otra muestra igual de enzima (B) se incuba con tripsina (0,2 μg) por 10 minutos a 30°C en un volumen final de 100 μl . La reacción se detiene mediante la adición del inhibidor de tripsina de p_oroto de soya y se sigue el procedimiento descrito en A. Se mide la actividad basal (\otimes) y estimulada por calmodulina y calcio (\square) en cortes de los geles según el procedimiento descrito en Métodos. La polaridad de los electrodos respecto del gel se señala por los símbolos indicados en el gráfico. La migración del colorante se indica por la línea punteada. La actividad basal se mide sólo en los trozos señalados.

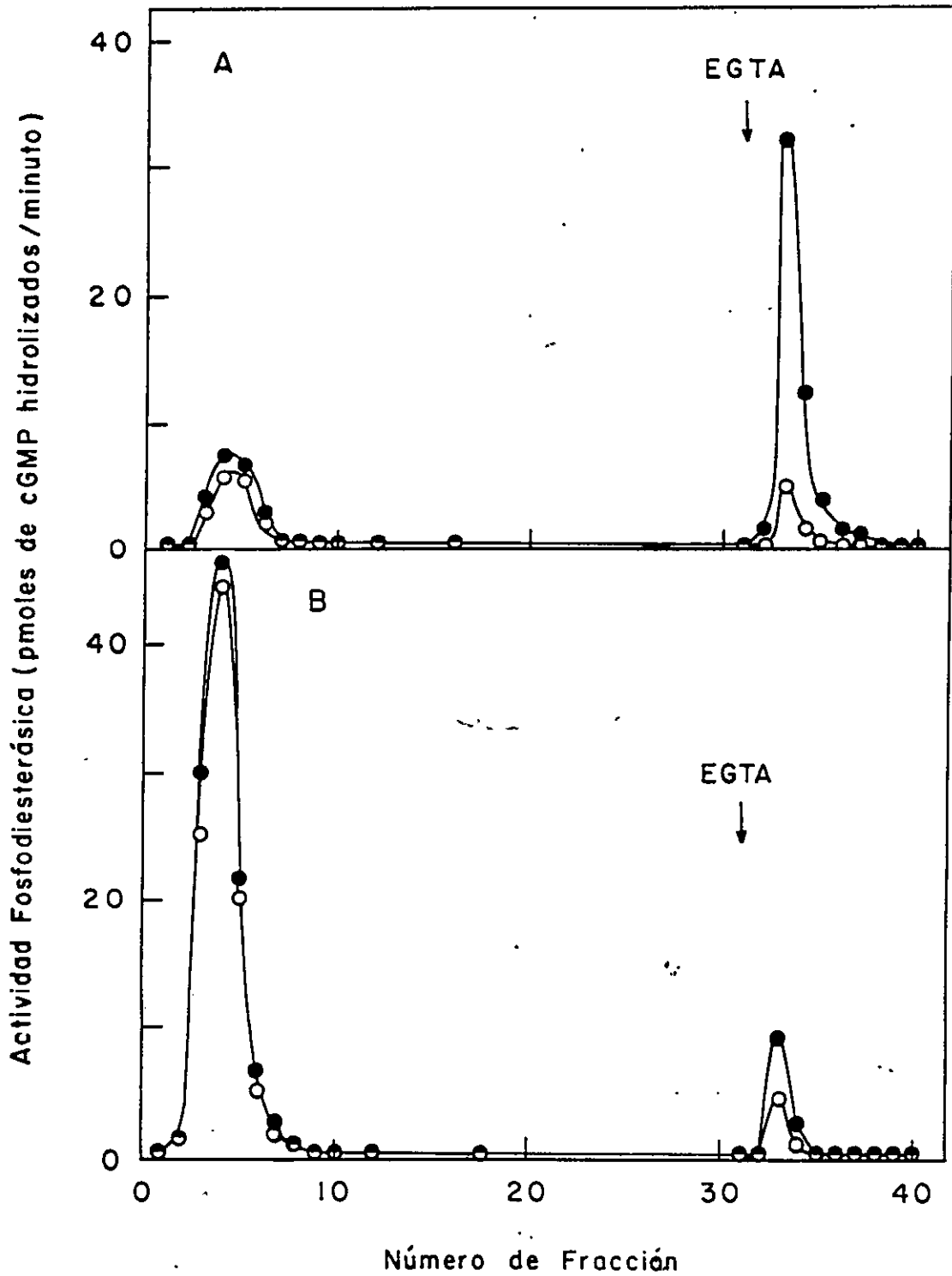


Figura 14. Efecto de la tripsina sobre la retención de la fosfodiesterasa I en columna de calmodulina-Sefarosa.

Figura 14. Efecto de la tripsina sobre retención de la fosfodiesterasa I en columna de calmodulina-Sefarosa. La enzima proveniente de DEAE-celulosa (2 μ g) se ajusta a 0,5 mM de CaCl_2 en un volumen de 1 ml y se somete a cromatografía en una columna de calmodulina-Sefarosa de 1 ml como se describe en Métodos (control, A). Otra muestra igual de la enzima se preincuba con tripsina (2 μ g/ml) por 10 minutos a 30°C. La reacción se detiene mediante la adición del inhibidor de tripsina de poroto de soya y se sigue el procedimiento descrito en A (B). La actividad basal (o) y estimulada por calmodulina y calcio (●) se mide en alícuotas de 50 μ l de cada fracción. El volumen de las fracciones es de 500 μ l.

actividad enzimática retenida en la columna, la que puede ser eluída por EGTA (figura 14B).

Los resultados obtenidos en estos experimentos indican que la tripsina está alterando la unión de la fosfodiesterasa I a la calmodulina inmovilizada en Sefarosa.

3) *Protección de la fosfodiesterasa I del efecto de tripsina por calmodulina y calcio.*

La fosfodiesterasa I tratada con tripsina pierde la capacidad de unirse a la calmodulina-Sefarosa debido a una posible alteración en el sitio de unión del activador.

En este experimento se analiza el efecto de la calmodulina y el calcio en la activación de la fosfodiesterasa I por la tripsina. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla VIII. Se observa que la preincubación de la fosfodiesterasa I con tripsina estimula a la actividad basal alrededor de 4 veces. Si la preincubación de la enzima se lleva a cabo en presencia de calmodulina y calcio, se observa que la estimulación de la actividad basal disminuye considerablemente. La presencia del complejo calmodulina-calcio protege a la fosfodiesterasa I del efecto de la tripsina.

La calmodulina sólo disminuye levemente el efecto de la tripsina, en cambio la presencia de calcio sólo no afecta la estimulación de la fosfodiesterasa I por la proteasa.

Se observa que las preparaciones cuya actividad basal fue menos activada por la tripsina, responden mejor al complejo calmodulina-calcio que las más activadas.

4) Efecto de la tripsina sobre filtración de la fosfodiesterasa I en gel de Sefadex.

Diversos autores han demostrado que el tratamiento de la fosfodiesterasa de otros tejidos con tripsina reduce el tamaño molecular de la enzima (Krinks y Klee, 1980; Tucker y col., 1981). Los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la tripsina en la filtración de la fosfodiesterasa I en Sefadex G-200 se muestran en la figura 15.

El tratamiento de la enzima con tripsina produce un aumento del volumen de elución con respecto de la enzima control. Esta última es estimulada alrededor de ocho veces por calmodulina y calcio (figura 15A). La actividad basal de la enzima tratada con tripsina es similar a la actividad medida en presencia de calmodulina y calcio (figura 15B).

El peso molecular de la enzima control es 140.000 en cambio la enzima tratada con la proteasa tiene un peso molecular de 90.000 (figura 16).

Estos resultados, junto al peso molecular de 66.000 daltons de la enzima determinado por electroforesis en geles desnaturalantes, indican que la fosfodiesterasa I está formado por dos subunidades de igual peso molecular. El efecto de la tripsina sería la remoción en el dímero de uno o más fragmentos con un peso molecular total de 50.000.

TABLA VIII

Protección de la fosfodiesterasa I del efecto de tripsina por calmodulina y calcio

Preincubación	Actividad enzimática (pmoles/minuto x mg proteína)	
	Basal	Estimulada por CaM-Ca
E	42,8	128
E + T	161	191
E + T + Ca	157	149
E + T + CaM	126	139
E + T + CaM + Ca	73	117

La enzima de DEAE-celulosa (E) (200 μ g) se preincuba en ausencia y presencia de los factores indicados por 10 minutos a 30°C en un volumen final de 200 μ l. La concentración de los efectores es: Tripsina 2 μ g/ml (T), calmodulina 3×10^{-6} (CaM) y CaCl_2 1 mM (Ca). La reacción se detiene por la adición del inhibidor de tripsina de poroto de soya y se analiza la actividad basal y estimulada por calmodulina y calcio mediante el ensayo descrito previamente.

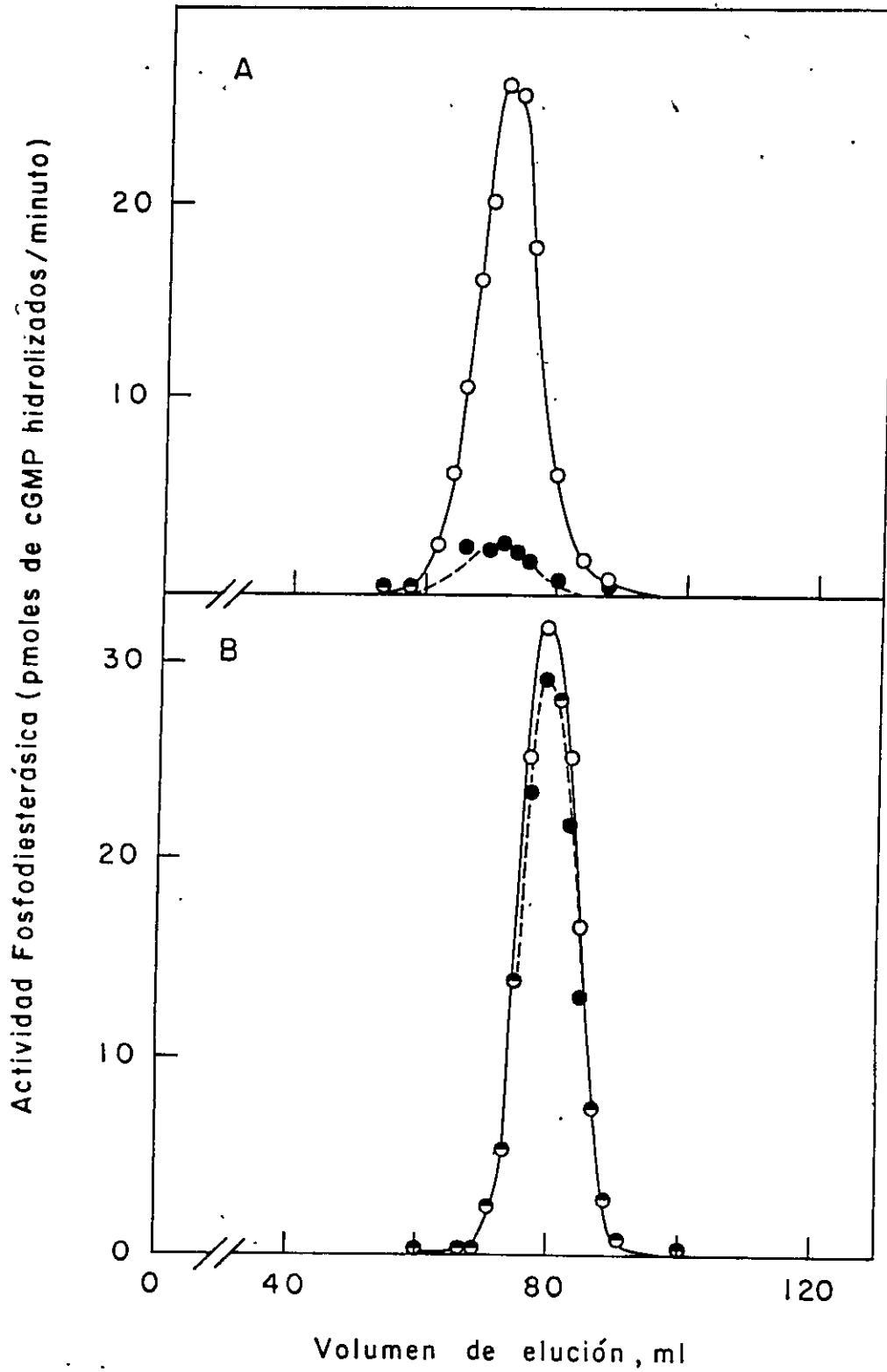


Figura 15. Efecto de la tripsina sobre la filtración de la fosfodiesterasa I en gel de Sefadex.

Figura 15. Efecto de la tripsina sobre la filtración de la fosfodiesterasa I en gel de Sefadex. La enzima proveniente de DEAE-celulosa (2 mg) en un volumen de 1 ml se filtra en una columna de Sefadex G-200 como se describe en Métodos (A)(control). Otra muestra igual de enzima (B) se preincuba con tripsina (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 10 minutos a 30°C de acuerdo al procedimiento general descrito previamente y se sigue el procedimiento descrito en A. Se colectan fracciones de 2 ml y se mide la actividad basal (●) y estimulada por calmodulina y calcio (○) en alícuotas de 50 μl según el ensayo descrito en Métodos.

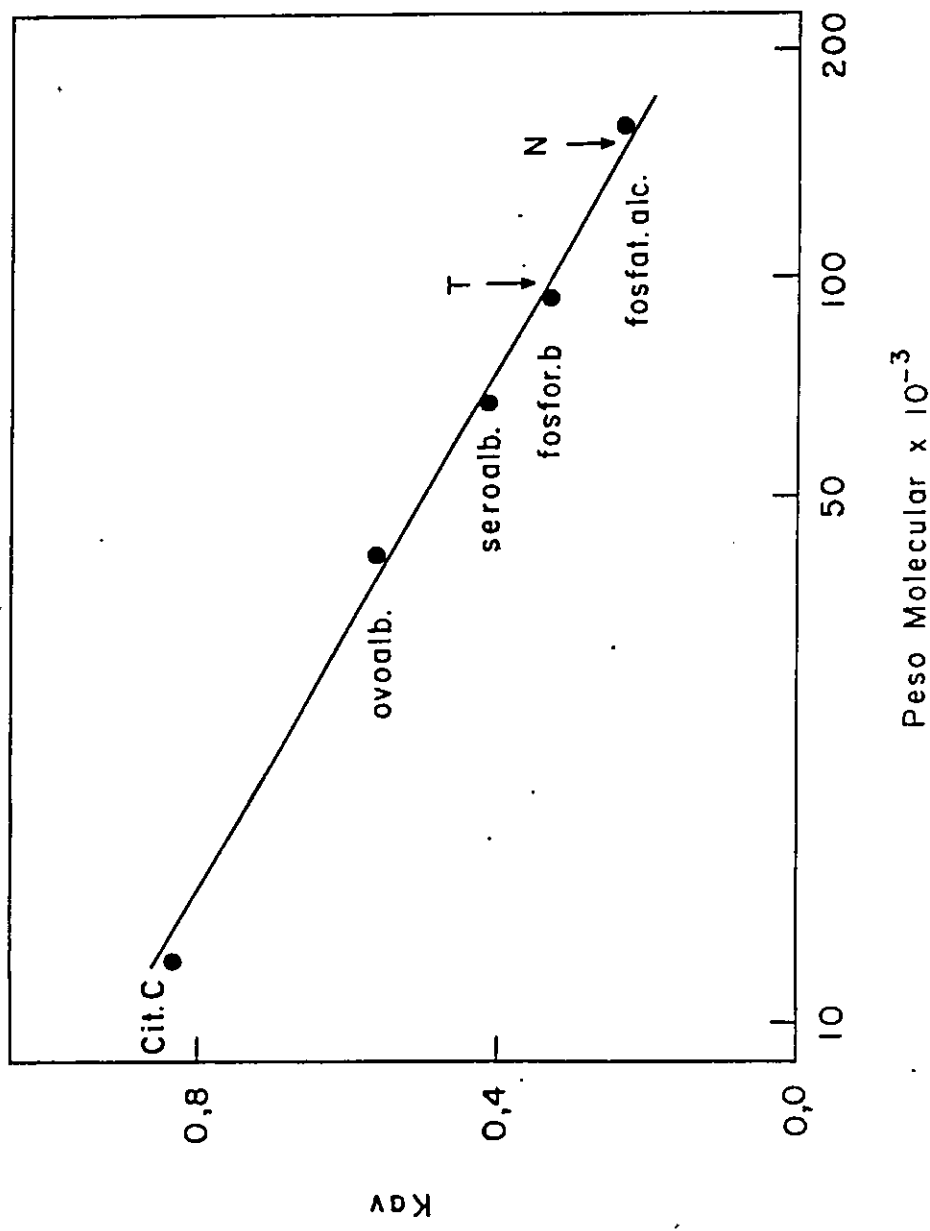


Figura 16. Determinación del peso molecular relativo de la fosfodiesterasa I. Efecto de tripsina.

Figura 16. *Determinación del peso molecular relativo de la fosfodiesterasa I. Efecto de Tripsina.* Los valores de volumen de elución de la enzima normal (N), tratada con tripsina (T) y de las proteínas de referencia se grafican como se describe en Métodos. Las proteínas de referencia, cuyo peso molecular se indica entre paréntesis, son: citocromo c (12000), ovalbúmina (43000), seroalbúmina (67000), fosforilasa b (94000) y fosfatasa alcalina (160000).

DISCUSION

PURIFICACION DE LA FOSFODIESTERASA I DE OVARIO DE *XENOPUS LAEVIS*.

La presencia de actividad fosfodiesterásica de nucleótidos cíclicos en ovario de *Xenopus laevis* ha sido descrita por varios autores (Allende y col., 1977; Mulner y col., 1980; Wasserman y Smith, 1981; Baltus y col., 1981; Miot y Erneux, 1982). En nuestro laboratorio se han identificado tres formas enzimáticas mediante fraccionamiento de un extracto de ovario en DEAE-celulosa (Echeverría y col., 1981). Una de estas enzimas, denominada fosfodiesterasa I, hidroliza tanto cAMP como cGMP y es estimulada por el complejo calmodulina-calcio. Otros autores han confirmado la presencia en ovario de *Xenopus laevis* de una actividad enzimática estimulable por el complejo calmodulina-calcio mediante fraccionamiento de un extracto en gradiente de sacarosa (Miot y Erneux, 1982).

Parte del trabajo de esta tesis lo constituye la purificación de la fosfodiesterasa I hasta aparente homogeneidad. Hasta el momento sólo se han purificado las enzimas de cerebro y corazón bovino (Klee y col., 1979; Morrill y col., 1979; Sharma y col., 1980; Laporte y col., 1979). Este trabajo constituye la primera descripción de la purificación de una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos dependiente del complejo calmodulina-calcio de un tejido de anfibio.

Una de las etapas de purificación de la fosfodiesterasa I más importante es la cromatografía de afinidad en calmodulina-Sefarosa. Mediante esta técnica se obtiene un alto grado de purificación observándose

que esta enzima es una de las proteínas que se unen a la matriz más abundante. Estos resultados sugieren que en ovario de *Xenopus laevis*, la fosfodiesterasa I podría ser una de las proteínas que unen calmodulina que se encuentra en mayor proporción.

En el sistema de corazón bovino la enzima presenta un comportamiento similar en calmodulina-Sefarosa al descrito en ovario. La fosfodiesterasa dependiente del complejo calmodulina-calcio de este sistema se ha purificado hasta aparente homogeneidad mediante esta técnica (Laporte y col., 1979). En cambio en cerebro bovino la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos es una de las proteínas que unen calmodulina que se encuentra en menor proporción. La purificación de esta enzima requiere el uso de otras metódicas además de la cromatografía de afinidad en calmodulina-Sefarosa (Klee y col., 1979).

CARACTERISTICAS DE LA FOSFODIESTERASA I.

La fosfodiesterasa I presenta un peso molecular de 140.000 y está formada por dos subunidades de peso molecular 66.000. Estos resultados son similares a los observados en las enzimas de cerebro y corazón bovino. Ambas enzimas están formadas por dos subunidades de peso molecular 58.000 a 59.000 y los dímeros presentan un peso molecular de 120.000 (Klee y col., 1979; Laporte y col., 1979; Morrill y col., 1980; Sharma y col., 1980).

El análisis de las propiedades cinéticas de la fosfodiesterasa I indica que esta enzima interactúa preferentemente con nucleótidos cíclicos cuya base nitrogenada es una purina. La enzima hidroliza tanto cAMP como cGMP, aunque la hidrólisis de este último nucleótido es más eficiente ya que presenta una K_m aparente diez veces menor que la

hidrólisis de cAMP. La $V_{m\acute{a}x}$ de hidrólisis de ambos nucleótidos es similar (Echeverría y col., 1981). No existen antecedentes sobre una posible hidrólisis de cAMP por la fosfodiesterasa I por lo que no se puede determinar el carácter de la inhibición de la hidrólisis de cGMP por este nucleótido.

Las propiedades cinéticas de la fosfodiesterasa I descritas son similares a las observadas en las enzimas de otros sistemas, lo que sugiere que se trata de enzimas análogas, (Wells y Hardman, 1977; Klee y col., 1980). Estos antecedentes hacen suponer que estas enzimas podrían cumplir funciones similares en los tejidos en que se encuentran.

La estimulación de la fosfodiesterasa I por el complejo calmodulina-calcio se debe principalmente a un aumento en la $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima de la misma manera como se ha descrito para la enzima de cerebro bovino (Cheung, 1971; Klee y col., 1979). El efecto estimulador se obtiene con concentraciones de calmodulina del orden de 10^{-9} M y es inhibido por drogas derivadas de la fenotiazina, produciéndose una leve alteración en la actividad basal que podría deberse a una interacción inespecífica de las drogas con la enzima, similar al descrito para otras enzimas (Gietzen y col., 1982; Olate y col., 1983).

El grado de estimulación de la fosfodiesterasa I por el complejo calmodulina-calcio depende de la preparación enzimática, de la naturaleza y de la concentración de sustrato empleada. La estimulación de la actividad fosfodiesterásica de cAMP sólo se manifiesta después de someter a los extractos a cromatografía en DEAE-celulosa. Sin embargo, con cGMP como sustrato, sólo se observa un aumento en el grado de estimulación de la hidrólisis después de la cromatografía en calmodulina-

Sefarosa.

El incremento en el grado de estimulación de la actividad de la fosfodiesterasa I a medida que se purifica la enzima, puede deberse a la eliminación de otras fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos que no son estimulables por calmodulina. Se ha descrito la presencia en los extractos de una enzima, denominada fosfodiesterasa II, que es específica para cAMP y no es estimulable por calmodulina y calcio. Esta enzima podría dar cuenta de una parte de la actividad basal de hidrólisis de cAMP. También se encuentra presente en los extractos otra actividad enzimática que hidroliza cAMP y cGMP con una K_m aparente para cGMP de $40 \mu M$. Esta enzima tampoco es estimulada por calmodulina y calcio. La presencia de esta enzima podría explicar la disminución en el grado de estimulación de seis a dos veces al determinar la actividad enzimática de los extractos con cGMP $1 \mu M$ y $50 \mu M$ respectivamente.

Otra explicación para el aumento en el grado de estimulación por el complejo calmodulina-calcio que se obtiene al purificar a la fosfodiesterasa I es la remoción de un inhibidor de la actividad estimulada por los efectores. Recientemente se ha descrito la presencia en extracto de ovario de una proteína que inhibe la estimulación de la fosfodiesterasa I por calmodulina. Esta actividad inhibitoria es específica para la actividad dependiente de calmodulina, ya que no afecta la actividad basal de la enzima ni la de la fosfodiesterasa II (Jedlicki y col., 1983).

La estimulación por el complejo calmodulina-calcio y la inhibición por la proteína inhibidora de la estimulación por calmodulina serían dos mecanismos fisiológicos por los que se podría regular la

actividad de la fosfodiesterasa I. Estos mecanismos podrían estar relacionados con la disminución de los nucleótidos cíclicos en los oocitos de *Xenopus laevis* en respuesta a la progesterona.

Las propiedades de la activación de la fosfodiesterasa I por el complejo calmodulina-calcio descritas corresponden a las características generales de la activación de diversas enzimas por la calmodulina, lo que sugiere que esta enzima podría estar relacionada, a través de dicho complejo, con el control de los niveles de nucleótidos cíclicos en los oocitos de *Xenopus laevis*, en la misma forma como se ha planteado para otros tejidos (Klee y col., 1980).

ACTIVACION DE LA FOSFODIESTERASA I POR PROTEASAS.

Los estudios realizados en esta tesis demuestran que un tratamiento controlado de la fosfodiesterasa I con tripsina provoca una proteólisis parcial de la enzima (Orellana y col., 1981; Orellana y Allende, 1982). El tratamiento proteolítico modifica la estructura y provoca un aumento en la actividad basal de la fosfodiesterasa I observándose una pérdida de su sensibilidad a la calmodulina.

Los resultados obtenidos sugieren que la proteólisis de la fosfodiesterasa I altera el sitio de unión de la enzima a la calmodulina. Esta idea surge del análisis de los resultados de los experimentos de retención de la enzima modificada por proteólisis en columnas de calmodulina-Sefarosa y de protección por el complejo calmodulina-calcio del efecto de la tripsina.

Algunos autores han señalado que el complejo calmodulina-calcio no protege a la enzima de cerebro bovino frente a la acción proteolítica (Tucker y col., 1981). Este hecho podría deberse a que las

concentraciones de calmodulina usadas en esos experimentos serían insuficientes para proteger a la enzima. La protección de la fosfodiesterasa I frente a la proteólisis se manifiesta sólo con concentraciones de calmodulina del orden de 10^{-6} M, valor que es cien veces mayor que el necesario para obtener la estimulación máxima de la enzima.

El hecho que la protección de la fosfodiesterasa I requiera una concentración de calmodulina de 10^{-6} M puede tener dos posibles explicaciones. Una de ellas considera un efecto proteolítico de la tripsina sobre la calmodulina. Se ha observado que un tratamiento de esta proteína con tripsina genera péptidos que no tienen actividad estimuladora sobre la fosfodiesterasa de cerebro y que no son capaces de inhibir la estimulación de esta enzima por la calmodulina (Klee, 1982). Es decir, la tripsina disminuiría la concentración efectiva de la calmodulina. Otra posible explicación es que la tripsina se encuentre en una concentración suficiente para desplazar el equilibrio hacia la proteólisis de la fosfodiesterasa-I. Por este hecho se requeriría de concentraciones de calmodulina superiores a las necesarias para estimular a la enzima, para desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo enzima-calmodulina-calcio que no sería digerido por la tripsina.

Los antecedentes señalados sugieren que la tripsina remueve uno o más péptidos que son parte de la molécula misma de la fosfodiesterasa y conforman una estructura inhibitoria de la actividad enzimática. Esta estructura incluiría al sitio de unión de la calmodulina. La activación de la enzima se debería a una alteración de esta estructura, ya sea por la unión del complejo calmodulina-calcio o por la acción

proteolítica.

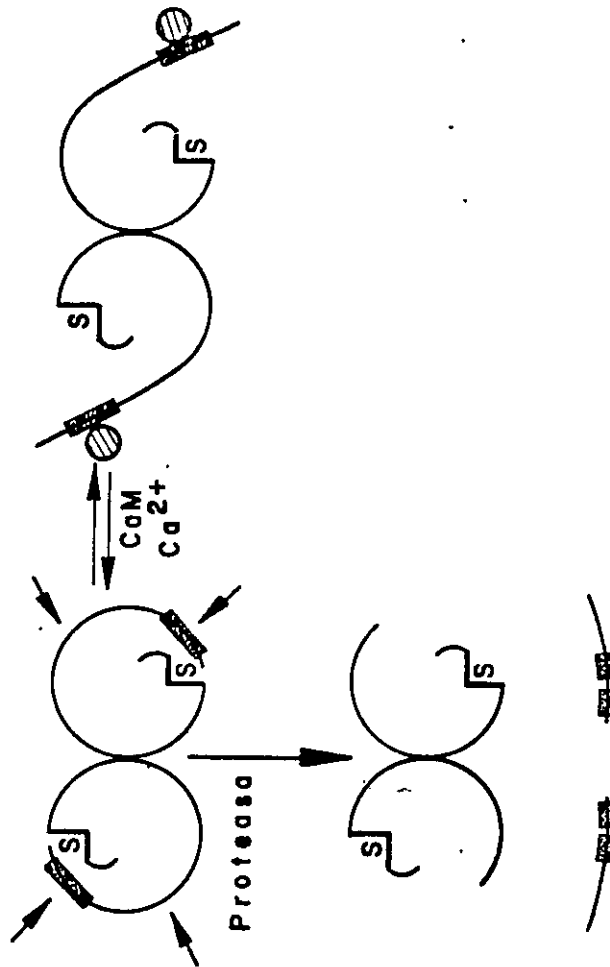
Una representación gráfica del modelo propuesto para la activación de la fosfodiesterasa I se muestra en el esquema II. A diferencia del planteado por otros autores (esquema I, pág. 19), éste propone que la acción de la tripsina no provocaría la disociación de la enzima. Este modelo supone que la tripsina actuaría del mismo modo sobre ambas subunidades de la enzima.

Recientemente hemos observado que en las preparaciones enzimáticas no purificadas y guardadas por varias semanas a 4°C, se produce un aumento en la actividad basal de la fosfodiesterasa I y además una pérdida de la capacidad de ser estimulada por calmodulina y calcio; ambos efectos podrían ser el resultado de la acción hidrolítica de proteasas endógenas.

Esta observación podría explicar el hecho que otros autores no encuentren una actividad fosfodiesterásica de nucleótidos cíclicos dependiente de calmodulina en extracto de ovario de *Xenopus laevis* (Mülner y col., 1980; Wasserman y Smith, 1981).

Existen antecedentes de varias otras enzimas dependientes de calmodulina y calcio que son activadas por proteólisis (Meijer y Guerrier, 1982; Gietzen y col., 1982). Se ha postulado un mecanismo similar al propuesto en esta tesis para la activación de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} de eritrocitos humanos y la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de cerebro de rata (Gietzen y col., 1982).

Otras enzimas que no son estimulables por calmodulina pueden ser activadas por proteólisis. Entre éstas se cuentan la fosfodiesterasa de cGMP de retina (Miki y col., 1975), la fosfodiesterasa de



Esquema II. Mecanismo de activación de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos dependiente de calmodulina de ovario de *Xenopus laevis*.

Esquema II. Mecanismo de activación de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos dependiente de calmodulina de ovario de *Xenopus laevis*.

S representa el sustrato, cAMP o cGMP; el área punteada el sitio de unión de la calmodulina; el círculo achurado la calmodulina. Las flechas indican los sitios de proteólisis.

nucleótidos cíclicos estimulable por cGMP (Francis y col., 1980) y las proteína-quinasa dependientes de cGMP (Lincoln y col., 1978). Todas estas enzimas tienen efectores naturales que pueden activarlas.

La presencia de estructuras regulatorias de la actividad enzimática dentro de la misma molécula de enzima podría constituir un mecanismo general de regulación de la actividad enzimática.

REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFODIESTERASA I EN OOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*.

La fosfodiesterasa I es una enzima que puede ser activada *in vitro* por calmodulina y calcio y por proteólisis parcial. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio señalan que la enzima también puede ser activada por fosfolípidos en una forma independiente de calcio (E. Jedlicki; comunicación personal). Estos efectores podrían ser activadores naturales de la enzima.

La presencia en ovario de *Xenopus laevis* de un inhibidor de la estimulación de la fosfodiesterasa I por calmodulina y calcio también podría estar relacionada con la regulación de esta enzima *in vivo*. La acción de este inhibidor se debería a una disminución en la concentración efectiva de calmodulina necesaria para la estimulación de la fosfodiesterasa I (Jedlicki y col., 1983).

Estudios de la actividad de la fosfodiesterasa I *in vivo* mediante la técnica de microinyección de los oocitos, señalan que la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos por esta enzima se debería principalmente a su actividad basal. Este hecho no sería por una falta de calmodulina en los oocitos ya que al microinyectarla no se activa la enzima. El contenido de calmodulina de los oocitos es cercano a 80 μM , valor

superior al necesario para activar a la fosfodiesterasa I (Allende y Allende, 1982).

La maduración meiótica de los oocitos de anfibio inducida por progesterona causa una disminución de los niveles de nucleótidos cíclicos. Algunos antecedentes indican que las proteasas podrían estar relacionadas con el proceso de maduración y por lo tanto su capacidad de estimular a la fosfodiesterasa I podría tener un significado fisiológico. Se ha observado que el tratamiento de oocitos de diferentes especies con enzimas proteolíticas induce la maduración de ellos, en ausencia de hormonas (Paul, 1975). En cambio, inhibidores de proteasas bloquean la maduración de oocitos de *Xenopus laevis* inducida por progesterona (Guerrier y col., 1976).

Otra observación es que el tratamiento de los oocitos de anfibio con progesterona produce un aumento temporal del nivel de calcio intracelular (Wasserman y col., 1980). Este hecho podría estar relacionado con proteasas activadas por calcio, similares a las descritas en otros sistemas (Murachi, 1982).

La fosfodiesterasa I, por lo tanto, podría ser activada *in vivo* por el complejo calmodulina-calcio o por proteasas endógenas y de esta manera estar involucrada en la inducción de la maduración por progesterona.

PROYECCIONES DEL TRABAJO REALIZADO.

En conclusión, se ha purificado una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos dependiente del complejo calmodulina-calcio, cuyas propiedades moleculares y cinéticas son similares a las descritas para las enzimas de cerebro y corazón bovinos.

La fosfodiesterasa I puede ser activada por el complejo calmodulina-calcio y por una proteólisis parcial con tripsina. La activación de la enzima por ambos agentes estaría relacionada con la modificación de una posible región regulatoria de la actividad enzimática en la estructura de la enzima.

Los resultados obtenidos en esta tesis plantean interrogantes cuyo estudio podría aportar información adicional valiosa acerca de los mecanismos moleculares que regulan la actividad de esta enzima *in vivo* e *in vitro*.

Algunos de estos problemas son:

- a) El análisis detallado de los cambios estructurales de la fosfodiesterasa I por efecto de la proteólisis. Sería de especial interés determinar el peso molecular de las subunidades de la enzima tratada con tripsina y la naturaleza de los péptidos removidos.
- b) Estudios de la posible existencia en los oocitos de proteasas que activen a la fosfodiesterasa I. El análisis de la especificidad de estas proteasas y su posible relación con la maduración podría establecer si la proteólisis es un mecanismo fisiológico de activación de esta y otras enzimas.
- c) Determinación directa de una posible relación de la fosfodiesterasa I con la maduración meiótica de los oocitos de anfibio, lo que podría realizarse microinyectando en los oocitos la enzima normal y modificada por tripsina y analizando una posible inducción de la maduración por estas formas enzimáticas.

BIBLIOGRAFIA

- Allende, J.E. (1982). *Arch. Biol. Med. Exp.* 15, 347-355.
- Allende, C.C., y Allende, J.E. (1982). *Biochem. Int.* 5, 91-96.
- Allende, C.C., Bravo, R. y Allende, J.E. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 4662-4666.
- Baltus, E., Hanocq-Quertier, J. y Fuyaux, M. (1981). *FEBS Lett.* 123, 37-40.
- Böhme, E. y Schultz, G. (1974). *Methods in Enzymology* (Hardman, J.G. y O'malley, B.W., editores) Vol. 38, parte C 27-37.
- Bradford, M.M. (1976). *Ann. Biochem.* 72, 248-254.
- Bravo, R., Otero, C., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1978). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1242-1246.
- Brostrom, C.O. y Wolff, D.J. (1976). *Arch. Biochem. Biophys.* 172, 301-311.
- Cartaud, A., Ozon, R., Walsh, M., Haiech, J. y Demaille, J. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 9404-9408.
- Cohen, P. (1980). *Calcium and Cell Function*. Vol. 1, 59-78 (Ed. W.Y. Cheung) Academic Press N.Y.
- Cox, J.A., Malnoe, A. y Stein, E.E. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 3218-3222.
- Chafouleas, J.G., Bolton, W.E., Hidaka, H., Boyol III, A.E. y Means, A.R. (1982). *Cell* 28, 41-50.
- Cheung, W.Y. (1971). *J. Biol. Chem.* 246, 2859-2869.
- Cheung, W.Y. (1982a) *Sci. Amer.* Vol. 246, 62-
- Cheung, W.Y. (1982b) *Fed. Proc.* 41, 2253-2257.
- Cheung, W.Y., Linch, T.J. Wallace, R.W. y Tallant, E.A. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 4439-4443.
- De Lorenzo, R.J. (1982) *Fed. Proc.* 41, 2265-2271.
- Echeverría, M. (1980) *Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.*

- Echeverría, M., Orellana, O., Jedlicki, E., Plaza, M., Allende, C. y Allende, J. (1981) *Biochem. Int.* 2, 539-545.
- Flockhart, D.A., y Corbin, J.D. (1982) *CRC Critical Rev. Biochem.* Febrero 133-186.
- Francis, S.H., Lincoln, T.M. y Corbin, J.D. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 620-626.
- Gietzen, C., Sadorf, I. y Bader, M. (1982). *Biochem. J.* 207, 541-548.
- Gopalakrishna, R. y Anderson, W. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 2405-2409.
- Guang, W.R., y Cheung, W.Y. (1980). *Arch. Biochem. Biophys.* 204, 191-198.
- Guerrier, P., Moreau, M. y Dorée, M. (1976). *C.R. Acad. Sci., Ser. D.* 284, 317-319.
- Hansen, R.S. y Beavo, J.A. (1982). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 2788-2792.
- Huchon, D., Ozon, R. y Demaille, J. (1981 b) *Nature.* 294, 358-359.
- Huchon, D., Ozon, R., Fisher, E. y Demaille, J. (1981 a) *Mol. Cell. Endocrinol.* 22, 211-222.
- Jedlicki, E., Orellana, O., Plaza, M., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1983). *Reunión Anual Sociedad Brasileira de Bioquímica.* 20-23 Abril Caxambú, Brasil.
- Jordana, X., Allende, C.C., y Allende, J.E. (1981 b). *Biochem. Int.* 3, 527-532.
- Jordana, X., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1982). *FEBS Lett.* 143, 124-128.
- Jordana, X., Otero, C., Allende, C.C., Allende, J.E., Flawiá, M.M., Komblitt, A.R. y Torres, H.N. (1981 a). *Mol. Cell. Biochem.* 40, 87-93.
- Kakiuchi, S., Yamazaki, R. y Nakajimi, H. (1970). *Proc. Jpn. Acad. Sci.* 46, 589-592.
- Klee, C.B. (1977). *Biochemistry* 16, 1017-1024.
- Klee, C.B. (1980). *Calcium and Cell Function.* Vol. 1, 59-78 (Ed. W.Y. Cheung) Academic Press. N.Y.
- Klee, C.B. (1982). *12th International Congress of Biochemistry.* S-030-1 p. 54 (resumen). Australia.

Klee, C.B. y Krinks, M.H. (1978) *Biochemistry* 17, 120-126.

Klee, C.B., Crouch, T.H. y Krinks, M.H. (1979). *Biochemistry* 18, 722-729.

Klee, C.B., Crouch, T.H. y Richman, P.G. (1980). *Annu. Rev. Bioch.* 49, 489-515.

Kofoid, E.C., Knauber, D.C. y Allende, J.E. (1979). *Dev. Biol.* 72, 374-380.

Krinks, M.H. y Klee, C.B. (1980). *Fed. Proc.* 39, 1625 (R 125).

Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)*. 227, 680-685.

Laporte, D.C., Toscano, W.A. y Stom, D.R. (1979). *Biochemistry* 18, 2820-2825.

Lin, Y.M. y Cheung, W.Y. (1980). *Calcium and Cell Function*. Vol. 1, 79-107 (Ed. W.Y. Cheung). Academic Press. N.Y.

Lin, Y.M., Lin, Y.P. y Cheung, W.Y. (1974). *Methods in Enzymology* (ed. Hardman, J.G. y O'Malley, B.W.) Vol. 38, parte C 262-273.

Lincoln, T., Flockhart, D. y Corbin, J. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 6002-6009.

Maller, J.L. y Krebs, E. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 1712-1718.

Maller, J.L., Butcher, F. y Krebs, E. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 579-582.

Martins, T.J., Mumby, M.C. y Beavo, J.A. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 1973-1979.

Masui, Y. y Clarke, H.J. (1979). *Int. Rev. Cytol.* 57, 185-282.

Means, A.R. y Dedman, J.R. (1980). *Nature* 285, 73-77.

Meijer, L. y Guerrier, P. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 702, 143-146.

Miki, N., Baraban, J.M., Keirns, J.J., Boyce, J.J. y Bitensky, M. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 6320-6327.

Miot, F. y Erneux, C (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 701, 253-259.

Moreau, M., Guerrier, P. y Dorée, M. (1978) *Nature* 274, 251-253.

Morrill, M.E., Thompson, S.T. y Stellwagen, E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4371-4374.

- Morril, G.A., Schaltz, F., Kostellow, A.B. y Poupko, J.M. (1977). *Differentiation* 8, 97-104.
- Mulner, O., Cartaud, A. y Ozon, R. (1980) *Differentiation* 16, 31-39.
- Mulner, O. Huchon, D., Thibier, C. y Ozon, R. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 582, 179-184.
- Murachi, T. (1982) *12th Int. Congress of Bioch.* S-012 p. 28 Australia.
- Olate, J., Jordana, X., Allende, C. y Allende, J. (1983). *Biochem. Pharmacol.* (en prensa).
- Orellana, O. y Allende, J.E. (1982). *Arch. Biol. Med. Exp.* 15, R67.
- Orellana, O., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1981). *Biochem. Int.* 3, 663-668.
- Paul, M. (1975). *Dev. Biol.* 43, 299-312.
- Pichard, A.L. y Cheung, W.Y. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 4872-4875.
- Rasmussen, M. y Goodman, D.B.P. (1977). *Physiol. Rev.* 57, 421-507.
- Richman, P.G. y Klee, C.B. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 6323-6326.
- Robinson, G.A., Butcher, R.W. y Sutherland, E.W. (1968). *Annu. Rev. Biochem.* Vol. 37, 149-174.
- Sadler, S.E. y Maller, J.L. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 6368-6373.
- Sadler, S.E. y Maller, J.L. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 355-361.
- Sakai, T., Yamanaka, H., Tanaka, R., Makino, H. y Kasai, H. (1977). *Biochem. Biophys. Acta* 483, 121-134.
- Schorderet-Slatkine, S., Schorderet, M., Boquet, P., Godeau, F. y Baulieu, E. (1978). *Cell* 15, 1269-1275.
- Sharma, R.K., Desai, R., Waisman, D.M. y Wang, J.H. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 4276-4282.
- Sharma, R.K., Wang, T.H., Wirch, W. y Wang, J.H. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 5916-5923.
- Speaker, M. y Butcher, F. (1977). *Nature.* 267, 848-849.
- Speaker, M.G., Olrow, S.J., Sturgill, T.W. y Rosen, O.M. (1983). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 329-333.

- Stewart, A.A., Ingebritsen, T.S., Manalan, A., Klee, C.B. y Cohen, P. (1982). *FEBS Lett.* 137, 80-84.
- Stryer, L., Hurley, J.B. y Fung, B.K.K. (1981) *TIBS*, 6 245-247.
- Teo, T.S., Wang, J.H. (1973). *J. Biol. Chem.* 248, 5950-5955.
- Teo, T.S., Wang, T.H. y Wang, J.H. (1973). *J. Biol. Chem.* 248, 588-595.
- Thompson, W.J., Brooker, G. y Appleman, M.M. (1974). *Methods in Enzimology* (Hardman, J.G. y O'Malley, B.W., editores). Vol. 38, parte C, 205-212.
- Thompson, W.J., Terasaki, W.L., Epstein, P.M. y Strada, S.J. (1979). *Advances in Cyclic Nucleotide Research.* 10, 69-92.
- Tucker, M.M., Robinson, J.B. y Settlwagen, E. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 9051-9058.
- Uzunov, P., y Wess, B. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 284, 220-226.
- Vanaman, T.C. (1980). *Calcium and Cell Function*. Vol. 1, 41-58. (Ed. W.Y. Cheung) Academic Press N.Y.
- Wallace, R.W., Tallant, E.A. y Cheung, W.Y. (1980). *Biochemistry* 19, 1831-1837.
- Wang, J.H. y Desai, R. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 4175-4184.
- Wang, J.H., Sharma, R.K. y Tam, S.W. (1980). *Calcium and Cell Function*. Vol. 1, 305-328 (Ed. W.Y. Cheung) Acad. Press N.Y.
- Wang, J.H., Sharma, R.K., Huang, C.Y., Chau, V. y Boon Chock, P. (1980). Vol. 356, 190 - 203 *Annals N. Y. Acad. Sci.*
- Wasserman, W. y Smith, D. (1981). *Cell. Biol.* 89, 389-394.
- Wasserman, W., Pinto, L., O'Connor, C. y Smith, D. (1980). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 1534-1536.
- Weiss, B. y Wallace, T.L. (1980). *Calcium and Cell Function*. Vol. 1, 330-380 (Ed. W.Y. Cheung) Academic Press N.Y.
- Wells, J.N. y Hardman, G.J. (1977). *Adv. Cyclic Nuc. Res.* 8, 119-143.
- Watanabe, K. y West, W.L. (1982). *Fed. Proc.* 41, 2292-2299.
- Yamamoto, K.R. y Alberts, B.M. (1976). *Annu. Rev. Biochem.* 45, 721-746.
- Yang, S.D., Tallant, E.A. y Cheung, W.Y. (1982). *Biochem. Biophys. Res. Com.* 106, 1419-1425.