

UCH-FC
DOC-B
A634

**ESTUDIOS DE LOS MECANISMOS DE REGULACION DE LA PROTEINA
TRANSDUCTORA G_s DE OOCITOS 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

por

01-0349238

JUAN MARCELO ANTONELLI ANATIVIA

Diciembre de 1994

Director de tesis: Dr. Jorge E. Allende R.

Co-Director: Dr. Juan A. Olate A.



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

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

JUAN MARCELO ANTONELLI ANATIVIA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para la
obtención del grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología en el Examen de
Defensa de Tesis rendido el 14 de Octubre de 1994.

Director de Tesis Dr. Jorge E. Allende


Comisión Informante de Tesis

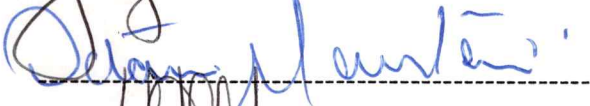
Dr. Octavio Monasterio


Dr. Ariel Orellana

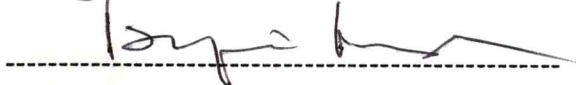
Dr. Francisco Sepúlveda


Dr. David Holmes











Esta tesis fué realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Jorge E. Allende R.

A Suony

A mis hijos

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos al Dr. Jorge E. Allende, al Dr. Juan Olate y a la Dra. Catherine Connelly, por haberme guiado y apoyado en el desarrollo de esta tesis, contribuyendo con ello a otra etapa de mi formación.

Deseo agradecer también muy especialmente a la Dra. Pilar Carvallo y la Dra. Germaine Jacob por el estímulo, el apoyo y la amistad que siempre recibí de ellas.

Hago extensivos mis agradecimientos a José Mondaca, por su diligencia en la confección de los esquemas y figuras.

INDICE DE MATERIAS

	página
LISTA DE TABLAS.	xiv
LISTA DE ESQUEMAS.	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.	xxi
RESUMEN.	xxiv
SUMMARY.	xxvii
INTRODUCCION	1
A. IMPORTANCIA GLOBAL DEL ESTUDIO DE LOS SISTEMAS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES Y PAPEL DE LAS PROTEINAS G	1
B. SISTEMA DEL OOCITO DE <i>Xenopus laevis</i> Y TRANSDUCCION DE SEÑALES HORMONALES	2
B.1. La maduración meiótica del oocito.	2
B.2. Regulación de la actividad adenililciclase de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> por proteínas G y efecto de la hormona progesterona.	4
C. PRIMER OBJETIVO GENERAL DE ESTA TESIS Y SU FUNDAMENTO	6
D. MECANISMO DE ACTIVACION DE LAS PROTEINAS G.	9
D.1. Esquema general de activación de proteínas G	9
D.2. Mecanismo de activación de proteínas G mediada por receptores	13
D.2.1. Efecto del receptor sobre el intercambio de nucleótidos y sobre la actividad GTPásica de la subunidad Ga.	13
D.2.2. Unión de GTP a Ga y disociación de Ga de Gβγ.	14
D.2.3. Papel del Mg ²⁺ en la activación de las proteínas G por nucleótidos de guanina. Regulación del intercambio de GDP por GTP.	16
D.2.3.a. Requerimientos de Mg ²⁺ en el orden de concentración nanomolar.	16

D.2.3.b.	Requerimientos de Mg^{2+} en el orden de concentración milimolar.17
D.2.3.c.	Efecto de Mg^{2+} en la activación hormonal de las proteínas G18
D.3.	Desactivación de las proteínas G18
D.4.	Activación de proteínas G por ión fluoruro y ión aluminio.20
D.5.	Efecto de toxina del cólera y de toxina de <i>Bordetella pertussis</i> sobre la activación de proteínas G21
E.	RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G21
E.1.	Estructura de los receptores acoplados a proteínas G.22
E.2.	Dominios de interacción del receptor con las proteínas G. Caracter básico de estos dominios22
F.	SISTEMA DE LA ADENILILCICLASA.25
F.1.	Estructura de la adenililciclase25
F.2.	Regulación de la actividad de la adenililciclase de membrana.28
F.2.1.	Efecto de forskolina28
E.2.2.	Efecto de G_{sa}29
E.2.3.	Efecto de G_{ia}32
E.2.4.	Efecto de $G_{\beta\gamma}$34
G.	SEGUNDO OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS Y SU FUNDAMENTO.35
H.	RELACION ESTRUCTURA FUNCION DE LAS SUBUNIDADES G_{α}37
H.1.	Estructura terciaria de G_{α}37
H.2.	Dominios de interacción de G_{α} con $G_{\beta\gamma}$43
H.3.	Dominios de interacción de G_{α} con el receptor43
H.4.	Interacción de G_{α} con el efector44
	MATERIALES Y METODOS45
A.	REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION.45
B.	PREPARACION Y PURIFICACION DE NUCLEOTIDOS.48
B.1.	Síntesis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$48
B.2.	Síntesis de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$48

B.3.	Análisis y pureza de los nucleótidos radiactivos.51
B.4.	Purificación de nucleótidos radiactivos.52
B.5.	Síntesis y purificación de [γ - 32 P]-GTP53
B.6.	Iodinación del anticuerpo anti IgG de conejo53
C.	PREPARACION DE MEMBRANAS PLASMATICAS DE OOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i> CON ACTIVIDAD ADENILILCICLASA.54
C.1.	Obtención de ovario de <i>Xenopus laevis</i>54
C.2.	Obtención de oocitos libres de células foliculares.54
C.3.	Fraccionamiento celular.55
D.	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ADENILILCICLASA55
E.	CALCULO DE PARAMETROS CINETICOS EN LA ACTIVACION DE LA ADENILILCICLASA58
F.	CALCULO DE LA CONCENTRACION DE GTP-γ-S NECESARIO PARA OBTENER LA MITAD DEL EFECTO MAXIMO EN LA ACTIVACION DE LA ADENILILCICLASA POR ESTE AGONISTA58
G.	DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE Mg²⁺ LIBRE EN EL MEDIO DE ENSAYO DE LA ADENILILCICLASA.60
H.	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GTPásica DE PROTEINAS G60
I.	CALCULO DE LOS PARAMETROS CINETICOS (Km Y Vmax) DE LA ACTIVIDAD GTPásica DE Gi-3α62
J.	DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE Mg²⁺ LIBRE EN EL MEDIO DE ENSAYO DE LA ACTIVIDAD GTPásica DE Gi-3α63
K.	ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA63
L.	ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS EN GELES DE AGAROSA64
M.	REACCION DE SECUENCIACION DE DNA DE DOBLE HEBRA64

N.	ELECTROFORESIS PARA REACCIONES DE SECUENCIACION EN GELES DE POLIACRILAMIDA66
O.	EXPRESION DE LOS GENES CODIFICANTES PARA LAS PROTEINAS G _α66
0.1.	Subclonamiento de fragmentos de cDNA en vectores de expresión.67
0.1.1.	Cepas y medios de cultivo utilizados67
0.1.2.	Digestión con enzimas de restricción67
0.1.3.	Extracción de proteínas de soluciones de ácidos nucleicos.67
0.1.4.	Purificación de fragmentos de DNA por membrana de DEAE67
0.1.5.	Ligación de fragmentos de cDNA a plasmidios68
0.1.6.	Transformación de <i>Escherichia coli</i> con DNA plasmidial.69
0.1.6.1.	Preparación de bacterias "competentes de transformación".69
0.1.6.2.	Transformación69
0.1.7.	Análisis de las colonias bacterianas transformadas.70
0.1.8.	Preparación de DNA plasmidial en gran escala71
0.2.	Expresion de las proteínas G _α de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> en bacterias.72
0.2.1.	Subclonamiento de los genes que codifican para las proteínas G _α de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> en el vector de expresión pT7-7.72
0.2.2.	Síntesis de las proteínas G _α de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> en <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).74
0.2.3.	Inmunodetección de proteínas G _α expresadas en bacterias.76
0.3.	Expresión de las proteínas G _α en lisado de reticulocitos.77
0.3.1.	Subclonamiento de las secuencias de cDNA codificantes para las proteínas G _α de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> y humano en pAGA77
0.3.2.	Construcción de los genes quiméricos78
0.3.2.1.	Construcción de los genes quiméricos Ch1, Ch2, Ch3 y Ch4.80
0.3.2.2.	Construcción de los genes quiméricos Ch5, Ch6, Ch7 y Ch8.83
0.3.2.3.	Construcción de los genes quiméricos Ch9 y Ch1083

0.3.2.4.	Construcción de los genes quiméricos Ch11 y Ch1288
0.3.2.5.	Construcción de los genes quiméricos Ch13 y Ch1492
0.3.3.	Síntesis de mRNA "in vitro".94
0.3.4.	Traducción "in vitro".95
0.3.5.	Cuantificación de la proteína sintetizada por el lisado de reticulocitos.96
P.	ENSAYO DE PROTECCION POR GTP- γ -S, A LA DIGESTION PROTEOLITICA DE PROTEINAS G_{su} CATALIZADA POR TRIPSINA.97
Q.	ANALISIS DE LA INTERACCION DE LAS PROTEINAS G_{su} Y $G_{\beta\gamma}$ POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE SACAROSA97
R.	DETERMINACION DE PROTEINAS99
S.	TRATAMIENTO DE LOS DATOS99
RESULTADOS		100
A.	EFFECTO DE POLICATIONES	100
A.1.	Estudios del efecto de policationes sobre la actividad adenililciclase de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	100
A.1.1.	Efecto de polilisina sobre la actividad adenililciclase medida en la presencia de diferentes activadores	100
A.1.2.	Efecto de polilisina sobre la concentración de GTP- γ -S necesaria para obtener la mitad del efecto máximo	102
A.1.3.	Efecto de espermina sobre la actividad adenililciclase de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	106
A.1.4.	Efecto de espermina sobre la concentración de GTP- γ -S necesaria para obtener la mitad del efecto máximo.	108
A.1.5.	Efecto de otros policationes sobre la actividad adenililciclase de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	108
A.1.5.1.	Efecto de poliornitina.	108
A.1.5.2.	Efecto de poliarginina.	112

A.1.6.	Efecto de polilisina sobre los requerimientos por ión Mg^{2+} de la adenililciclase de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>112
A.1.7.	Efecto de polilisina sobre la cinética de reacción de formación del cAMP.115
A.2.	Estudios del efecto de policlaciones utilizando subunidades $G\alpha$ de proteínas G118
A.2.1.	Efecto de compuestos policlacionicos sobre la actividad GTPásica de la subunidad $G\alpha$ de la proteína Gi-3.119
A.2.2.	Efecto de polilisina sobre la cinética de reacción de formación de fosfato119
A.2.3.	Efecto de polilisina sobre la curva de concentraciones crecientes de Gi-3 α119
A.2.4.	Efecto de concentraciones crecientes de polilisina sobre la actividad GTPásica de Gi-3 α122
A.2.5.	Efecto de poliornitina, poliarginina y espermina sobre la actividad GTPásica de Gi-3 α122
A.2.6.	Efecto de polilisina sobre la K_m en la reacción de hidrólisis de GTP catalizada por Gi-3 α125
A.2.7.	Efecto de polilisina sobre los requerimientos de ión Mg^{2+} en la reacción de hidrólisis de GTP catalizada por Gi-3 α125
A.2.8.	Efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de otras proteínas que unen GTP.129
A.2.8.1.	Efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de la transducina (Gt).129
A.2.8.2.	Efecto de polilisina sobre los requerimientos de ión Mg^{2+} en la reacción de hidrólisis de GTP catalizada por transducina.129
A.2.8.3.	Efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de H-ras129
B.	ESTUDIOS DE FUNCIONALIDAD DE PROTEINAS G_{sa} DE OOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>.134

B.1.	Expresión de Gsa de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> en bacterias.134
B.1.1.	Análisis de la expresión de las proteínas Gsa de oocitos en <i>E. coli</i>135
B.1.2.	Reconstitución de la actividad adenililciclase de membranas cíclicas con Gsa de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>137
B.2.	Expresión de Gsa de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> en lisado de reticulocitos141
B.2.1.	Subclonamiento de los cDNA codificantes para las proteínas Gsa de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> en lisado de reticulocitos.142
B.2.2.	Análisis de la transcripción "in vitro" de los RNA mensajeros codificantes para las proteínas Gsa de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> y de humano142
B.2.3.	Análisis de la traducción de los RNA mensajeros codificantes para las proteínas Gsa de oocitos y de <i>Xenopus laevis</i>144
B.2.4.	Reconstitución de la actividad adenililciclase de membranas cíclicas con las proteínas Gsa sintetizadas en lisado de reticulocitos.147
B.3.	Localización en la proteína Gsa de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> , de la región responsable de la falta de acoplamiento con la adenililciclase de mamíferos.149
B.3.1.	Proteínas quiméricas construídas.149
B.3.2.	Capacidad de las proteínas quiméricas de reconstituir la respuesta de la adenililciclase a GTP- γ -S, NaF, GTP e isoproterenol150
B.3.3.	Reconstitución de la actividad adenililciclase de membranas cíclicas por las proteínas quiméricas Gi-2 α -Gsa.163
B.4.	Estudio del efecto de protección por GTP- γ -S a la digestión por tripsina de G _{sa} de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>169
B.4.1.	Efecto de protección por GTP- γ -S a la digestión de Gsa de <i>Xenopus laevis</i> , por concentraciones crecientes de tripsina170

B.4.2.	Efecto de protección por GTP- γ -S a la digestión por tripsina de las quimeras Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12.	173
B.4.3.	Efecto de protección por GTP- γ -S a la digestión por tripsina de las quimeras Gi-2 α -Gsa.	176
B.5.	Estudio de la interacción de Gsa de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> con G $\beta\gamma$ de cerebro de bovino	176
DISCUSION.		183
A.	EFFECTO DE POLICATIONES	183
A.1.	Especificidad del efecto estimulador a nivel de proteínas G (Gs)	183
A.2.	Efecto de compuestos policatiónicos sobre la actividad GTPasica de proteínas G purificadas	184
A.3.	Efecto de polilisina sobre el recambio de nucleótidos de guanina de las proteínas G	185
A.4.	Efecto de polilisina sobre la activación de las proteínas G por Mg ²⁺	188
A.5.	Efecto de polilisina sobre los parámetros cinéticos de activación de la adenililciclase por Gs.	191
A.6.	Efecto de polilisina en relación con la inhibición de la adenililciclase por progesterona.	192
A.7.	Aspectos estructurales del efecto de compuestos policatiónicos sobre las proteínas G	193
B.	ESTUDIOS DE FUNCIONALIDAD DE PROTEINAS Gs DE OOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>	197
B.1.	Análisis funcional de las proteínas Gsa de oocitos producidas en bacterias.	197
B.2.	Análisis funcional de las proteínas Gsa de oocitos producidas en lisado de reticulocitos	198
B.3.	Resultados obtenidos con las proteínas quiméricas.	200

B.4.	Posible función de la región de 110 aminoácidos de Gsa	204
B.5.	Interacción con G β γ	213
B.6.	Gsa de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> : especulaciones a cerca de su funcionalidad.	214
C.	PROYECCIONES DEL TRABAJO REALIZADO EN ESTA TESIS	219
C.1.	Efecto de policonaciones.	219
C.2.	Estudios de funcionalidad de proteínas Gs de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	220
	CONCLUSIONES	223
	BIBLIOGRAFIA	225

LISTA DE TABLAS

		página
TABLA 1	Determinación de la $K_{0,5}$ para GTP- γ -S en presencia o ausencia de polilisina 120 μ M.105
TABLA 2	Determinación de la $K_{0,5}$ para GTP- γ -S en presencia o ausencia de espermina 1 mM110
TABLA 3	Efecto de poliornitina sobre la activación de la adenililciclase de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> por GppNHp111
TABLA 4	Efecto de polilisina sobre los parámetros cinéticos de la reacción catalizada por la adenilil ciclase de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> activada por GTP- γ -S.117
TABLA 5	Efecto de polilisina sobre los parámetros cinéticos de la actividad GTPásica de Gi-3 α127
Tabla 6	Reconstitución de la actividad adenililciclase de membranas cyc ⁻ por las proteínas Gsa producidas en <i>Escherichia coli</i>139
Tabla 7	Reconstitución de la actividad adenililciclase de membranas cyc ⁻ por las proteínas Gsa producidas en lisado de reticulocitos.148

LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

	página
ESQUEMA 1: Propiedades de las proteínas G α identificadas	11
ESQUEMA 2: Mecanismo de activación de proteínas G	12
ESQUEMA 3: Topología propuesta para los receptores de siete dominios transmembránicos acoplados a proteínas G.23
ESQUEMA 4a: Descripción de las características de los subtipos de adenililciclasas estudiadas26
ESQUEMA 4b: Topología de la adenililciclasa de membrana27
ESQUEMA 5: Procesamiento alternativo del mRNA de Gsa en mamíferos.30
ESQUEMA 6: Modelo de G α38
ESQUEMA 7: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas G α39
ESQUEMA 8: Estructura tridimensional hipotética de G α42
ESQUEMA 9a: Síntesis enzimática de [γ - ³² P]-ATP.49
ESQUEMA 9b: Síntesis enzimática de [α - ³² P]-ATP.50
ESQUEMA 10: Curva de progreso de una enzima histerética que presenta una fase de retardo o período de latencia.59
ESQUEMA 11: Subclonamiento en pT7-7.	75
ESQUEMA 12: Subclonamiento en pAGA.	79
ESQUEMA 13: Proteínas quiméricas construídas.	81

ESQUEMA 14:	Construcción de quimeras Ch1, Ch2, Ch3 y Ch4.82
ESQUEMA 15:	Construcción de quimeras Ch5, Ch6, Ch7 y Ch8.84
ESQUEMA 16:	Construcción de quimeras Ch9 y Ch10.	86
ESQUEMA 17:	Construcción de quimeras Ch11 y Ch12.89
ESQUEMA 18:	Construcción de quimeras Ch13 y Ch14.93
ESQUEMA 19:	Proteínas quiméricas construídas	151
ESQUEMA 20A:	Comparación de secuencias de aminoácidos de Gsa de humano y de <i>Xenopus laevis</i>	201
ESQUEMA 20B:	Comparación de secuencias de aminoácidos de Gsa de humano y de <i>Xenopus laevis</i>	202
ESQUEMA 21:	Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas Ga	208
ESQUEMA 22:	Estructura tridimensional hipotética de Ga	211
FIGURA 1.	Efecto de polilisina sobre la activación de la adenililciclase de oocitos por GTP- γ -S, fluoruro y forskolina.101
FIGURA 2.	Efecto de polilisina sobre la activación de la adenililciclase a concentraciones sublimitantes de GTP- γ -S.103
FIGURA 3.	Efecto de polilisina sobre la activación de la adenililciclase por GTP- γ -S.	104
FIGURA 4.	Efecto de espermina sobre la activación de la adenililciclase de oocitos por GTP- γ -S, fluoruro y forskolina.107

FIGURA 5.	Efecto de espermina sobre la activación de la adenililciclase por GTP- γ -S.	109
FIGURA 6.	Efecto de poliarginina sobre la activación de la adenililciclase de oocitos por GTP- γ -S.	113
FIGURA 7.	Efecto de polilisina sobre la activación de la adenililciclase por ion Mg^{2+}	114
FIGURA 8.	Efecto de polilisina sobre la cinética de formación de cAMP catalizada por la adenililciclase de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	116
FIGURA 9.	Efecto de polilisina sobre la cinética de formación de ^{32}P - PO_4^{3-} catalizada por Gi-3 α	120
FIGURA 10.	Efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de Gi-3 α	121
FIGURA 11.	Efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de Gi-3 α	123
FIGURA 12.	Efecto de espermina sobre la actividad GTPásica de Gi-3 α	124
FIGURA 13.	Efecto de polilisina sobre la activación por sustrato de la actividad GTPásica de Gi-3 α	126
FIGURA 14.	Efecto de polilisina sobre la activación por Mg^{2+} de la actividad GTPásica de Gi-3 α	128
FIGURA 15.	Efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de la transducina.	130
FIGURA 16.	Efecto de polilisina sobre la activación por Mg^{2+} de la actividad GTPásica de la transducina.	131
FIGURA 17.	Efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de H-ras.	132

FIGURA 18.	Efecto de polilisina sobre la cinética de formación de $^{32}\text{[P]-PO}_4^{3-}$ catalizada por H-ras.	133
FIGURA 19.	Análisis por geles de poliacrilamida desnaturantes de la expresión de proteínas G α en <i>Escherichia coli</i>	136
FIGURA 20.	Inmunodetección de las subunidades G α expresadas en <i>Escherichia coli</i> por western.	138
FIGURA 21.	Análisis de la síntesis de mRNA que codifican para las proteínas G α de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> y de humano, por geles de agarosa.	143
FIGURA 22.	Análisis por electroforesis y autorradiografía en geles de poliacrilamida, de la expresión en lisado de reticulocitos de las proteínas G α de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> y de humano.	145
FIGURA 23.	Cinética de síntesis de las proteínas G α de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> y de humano en lisado de reticulocitos	146
FIGURA 24.	Análisis de la síntesis de los mRNA que codifican para las proteínas quiméricas Ch1, Ch2, Ch3, Ch4, Ch5, Ch6, Ch7 y Ch8, por geles de agarosa.	152
Figura 25.	Análisis de la síntesis de los mRNA que codifican para las proteínas quiméricas Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12, por geles de agarosa.	154
FIGURA 26.	Análisis por electroforesis y autorradiografía de la expresión de las proteínas quiméricas Ch1, Ch2, Ch3, Ch4, Ch5, Ch6, Ch7 y Ch8 en lisado de reticulocitos.	156

FIGURA 27.	Análisis por electroforesis y autorradiografía en geles de poliacrilamida, de la expresión de las proteínas quiméricas Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12 en lisado de reticulocitos.	157
FIGURA 28.	Análisis de la capacidad de las proteínas quiméricas Ch1, Ch2, Ch3, Ch4, Ch5, Ch6, Ch7 y Ch8 de reconstituir la actividad adenililciclasa de membranas cyc-.	158
FIGURA 29.	Análisis de la capacidad de las proteínas quiméricas Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12 de reconstituir la actividad adenililciclasa de membranas cyc-.	161
FIGURA 30.	Análisis de la síntesis de los mRNA que codifican para las proteínas quiméricas Ch13 y Ch14 en geles de agarosa.	164
FIGURA 31.	Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida y autorradiografía, de la expresión de las proteínas quiméricas Ch13 y Ch14.	165
FIGURA 32.	Análisis de la capacidad de las proteínas quiméricas Ch13 y Ch14 de reconstituir la actividad adenililciclasa de membranas cyc-.	167
Figura 33.	Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida y autorradiografía, del efecto de protección del GTP- γ -S a la digestión por tripsina de las proteínas G _{s0} de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> y de humano.	172
FIGURA 34.	Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida y autorradiografía, del efecto de protección del GTP- γ -S a la digestión por tripsina de las proteínas quiméricas Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12.	174

FIGURA 35.	Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida y autorradiografía, del efecto de protección del GTP- γ -S a la digestión por tripsina de las proteínas quiméricas Ch13 y Ch14.177
FIGURA 36.	Análisis por sedimentación en gradiente de sacarosa, de la interacción de las proteínas Gsa de <i>Xenopus laevis</i> y de humano con G $\beta\gamma$ de cerebro de bovino.179
FIGURA 37.	Análisis por sedimentación en gradiente de sacarosa, de la interacción de las quimeras Ch11 y Ch12 con G $\beta\gamma$ de cerebro de bovino181

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina 5'-difosfato
AMP	adenosina 5'-monofosfato
ATP	adenosina 5'-trifosfato
cAMP	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
Ci	Curie
cpm	cuentas por minuto
CTP	citidina 5'-trifosfato
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
dTTP	timidina 5'-trifosfato
ddATP	2',3'-didesoxiadenosina 5'-trifosfato
ddCTP	2',3'-didesoxicitidina 5'-trifosfato
ddGTP	2',3'-didesoxiguanosina 5'-trifosfato
ddTTP	3'-desoxitimidina 5'-trifosfato
DEAE	dietilaminoetil
DEPC	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicol bis-(β -amino etil

	éter)-N,N,N',N'-tetraacético
GDP	guanosina 5'-difosfato
GDP-β-S	guanosina 5'-[β-tio] difosfato
cGMP	guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
GTP	guanosina 5'-trifosfato
GTPasa	GTP hidrolasa
GTP-γ-S	guanosina 5'-[γ-tio] trifosfato
Hepes	ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'- 2-etanosulfónico
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactosido.
Iso	isoprotereno1
kDa	kiloDalton
Km	constante de Michaelis
MPF	factor promotor de la maduración
mA	miliamper
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido
PEP	fosfoenol piruvato
P _i	fosfato inorgánico
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro
POPOP	1,4-bis (5-fenil-2-oxazolil) benceno
PPO	2,5-difeniloxazol
SDS	dodecil sulfato de sodio
TCA	ácido tricloroacético
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
UTP	uridina 5'-trifosfato

Vmax

velocidad máxima

V

volt

RESUMEN

El oocito de *Xenopus laevis* es una célula ampliamente utilizada para el estudio de la transducción de señales hormonales, pues posee receptores para progesterona, insulina y acetilcolina. Además la microinyección de mRNA exógenos en el oocito ha permitido realizar la expresión funcional de otros receptores distintos a los mencionados con anterioridad. Esto ha facilitado el usar al oocito como modelo para estudiar el fenómeno de transducción de señales hormonales. Uno de los sistemas de transducción de señales que existe en la membrana del oocito es el de las proteínas G. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, indican que en el oocito de *Xenopus laevis* existe una actividad adenililciclase regulada por proteínas G. Esta enzima es activada por una proteína de tipo G_{sq} e inhibida por la hormona progesterona. Esta hormona inhibe a la adenililciclase actuando sobre un receptor ubicado en la membrana plasmática. Esta inhibición es aparentemente mediada por una proteína G de naturaleza desconocida. Estos estudios han sido complementados con el clonamiento molecular realizado en nuestro laboratorio, de una genoteca de cDNA de oocitos de *Xenopus laevis* de dos formas de proteínas G_{sq} .

El interés general de esta *Tesis* es profundizar en el conocimiento que se tiene sobre el sistema de transducción de señales mediado por proteínas G en el oocito de *Xenopus laevis*. Estudios realizados en nuestro laboratorio han indicado que compuestos policatiónicos como la polilisina, la poliornitina y otros, son capaces de producir cambios en la actividad de varias enzimas de membrana, entre ellas la adenililciclase. En un intento por profundizar la naturaleza de este efecto hemos realizado como parte de esta *Tesis*, una caracterización del efecto de estos compuestos sobre la actividad de la adenililciclase de la membrana del oocito. Nuestros resultados indican que polilisina, poliornitina, espermina pero no

poliarginina, estimulan la actividad de la adenililciclase, actuando específicamente a nivel de la actividad G_{s0} de membrana. Esta estimulación se debe a que estos compuestos aumentan la afinidad de G_{s0} por el GTP. Polilisina también disminuye los requerimientos de Mg^{2+} necesarios para la activación de la adenililciclase, cuando ésta es activada a través de G_{s0} . Estos resultados son muy similares a aquellos obtenidos con compuestos también de naturaleza catiónica como el mastoparén, que imitan en su forma de acción al complejo hormona receptor. Debido a los complejos efectos que producen polilisina y otros compuestos policatiónicos sobre la membrana plasmática, decidimos además, estudiar el efecto de estos compuestos sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} , transducina y H-ras. Nuestros resultados indican que polilisina, poliornitina y en menor grado poliarginina, pero no espermina, son capaces de estimular significativamente la actividad GTPásica de G_{i-30} . Polilisina también estimula, pero en menor grado que con G_{i-30} , la actividad GTPásica de la transducina y de H-ras. Estos resultados indican que no todas las proteínas que unen GTP se ven afectadas de igual manera por estos compuestos policatiónicos. Polilisina disminuye la K_m de G_{i-30} para GTP en la reacción de hidrólisis, lo que podría reflejar un efecto del polication sobre la afinidad de G_{i-30} por el GTP. Polilisina también afecta los requerimientos de Mg^{2+} de la reacción de hidrólisis del GTP por G_{i-30} . En su conjunto, estos resultados indican que polilisina y otros compuestos policatiónicos estudiados por nosotros afectarían la actividad de las proteínas G de manera similar a como lo hacen los receptores.

En la segunda parte de esta *Tesis*, nos propusimos estudiar las propiedades funcionales de las proteínas cuyas secuencias obtenidas por clonamiento molecular, correspondían a las proteínas G_{s0} de oocitos de *Xenopus laevis*. Nuestros resultados indican que estas proteínas expresadas en lisado de reticulocitos no son capaces de reconstituir la actividad adenililciclase de un sistema de mamíferos deficiente en la proteína G_{s0} .

endógena (membranas cyc-), a diferencia de una proteína G_{sq} clonada de humano. Debido a que la identidad a nivel de aminoácidos entre las proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis* y de humano es de un 90%, decidimos construir proteínas quiméricas entre regiones de las secuencias de aminoácidos de humano y de las de *Xenopus laevis*, con la finalidad de ubicar la región responsable en las proteínas de oocitos, que dieran cuenta de su incapacidad de reconstituir funcionalmente la actividad adenililciclase de mamíferos. Nuestros resultados indican que esta región se encuentra en un dominio de 110 aminoácidos ubicado hacia el extremo amino terminal de las dos proteínas de oocitos. Cabe hacer notar que es en esta región donde se concentran la mayor cantidad de sustituciones a nivel de aminoácidos entre las proteínas de *Xenopus laevis* y de humano. Nosotros postulamos que esta región es importante en la interacción física de la proteína G_{sq} con la adenililciclase o bien regula alguna función relacionada con la activación de las proteínas G_{sq} . Nuestros resultados y los de otros grupos parecen apoyar esta segunda opción. Finalmente, experimentos de sedimentación en gradiente de sacarosa realizados con la finalidad de analizar la interacción de G_{sq} con un preparación purificada de $G_{\beta\gamma}$ de cerebro de bovino, indican que la región de 110 aminoácidos de G_{sq} sería también importante en la formación del trímero $G_{\alpha\beta\gamma}$.

SUMMARY

Oocytes obtained from the amphibian *Xenopus laevis* are widely used for the study of signal transduction. Oocytes have receptors for progesterone, insulin and acetylcholine and in addition, they have the capacity to express receptors and other proteins from microinjected mRNA. For these reasons the oocyte is frequently used as a model for the study of the phenomena of signal transduction. One such signal system present in oocyte membranes is that of the G-proteins. Previous studies from this laboratory indicate that *Xenopus laevis* oocytes have an adenylyl cyclase activity regulated by G-proteins. This enzyme is activated for a G_s type protein. The adenylyl cyclase activity is inhibited in the presence of the hormone progesterone and this inhibition is mediated by an unknown type of G protein. These studies have been complemented by the molecular cloning of two types of G_{sq} from a cDNA library obtained from oocytes.

The general objective of this *Thesis* is to analyze in depth the signal transduction system mediated by G proteins in the oocyte. Studies from this laboratory indicated that polycationic compounds such as polylysine, spermine and polyornithine produce changes in the activity of several membrane enzymes such as adenylyl cyclase. In order to further our understanding of the mechanism of this effect, we have studied in greater detail the effect of polycationic compounds on the adenylyl cyclase activity of the oocyte membrane. Our results indicate that polylysine, polyornithine, spermine, but not polyarginine stimulate the adenylyl cyclase. This effect is specific for the G_s membrane activity. This stimulation is produced because polylysine increases the affinity of G_s for GTP. Polylysine decreases the requirements of Mg^{2+} in the activation of the adenylyl cyclase activity for G_{sq} . Cationic peptides such as mastoparan produce effects very similar to those of the polylysine in the activation of G proteins.

Polylysine and other compounds produce very complex effects on the plasmatic membrane. For this reason, we also studied the effect of polylysine and other polycationic compounds on the GTPase activity of others proteins that bind GTP such as $G_{i-3\alpha}$, transducine and H-ras. Our results indicate that polylysine and polyornithine stimulate significantly the GTPase activity of $G_{i-3\alpha}$. Polyarginine also stimulates the GTPase activity of $G_{i-3\alpha}$, but to a lesser degree than polylysine. Spermine has no effect on the GTPase activity of $G_{i-3\alpha}$. Polylysine also stimulates the GTPase activity of transducine and H-ras, but also less than with $G_{i-3\alpha}$. These results indicate that not all proteins that bind GTP are effected in the same way. Polyarginine decreased the K_m of $G_{i-3\alpha}$ for GTP in the hydrolysis of GTP. Polylysine also affects the requirements for Mg^{2+} in the GTPase activity of $G_{i-3\alpha}$. As a whole, these results suggest that polylysine and other polycationic compounds affect the activity of G proteins in a way similar to receptors.

In the second part of this *Thesis*, we studied the functionality of $G_{s\alpha}$ type proteins of *Xenopus laevis* obtained by molecular cloning. Our results indicate that this recombinant G-protein produced *in vitro* in reticulocyte lysates does not reconstitute the adenylate cyclase activity of a mammalian system defective in endogeneous $G_{s\alpha}$ (cyc- membranes). However, human cloned $G_{s\alpha}$ produced in reticulocyte lysates, does reconstitute the adenylyl cyclase activity of cyc- membranes. Since, both proteins have 90% structural identity, we prepared chimeric recombinant proteins, in order to define the region in the oocyte protein responsible for the lack of reconstitution capacity with cyc- membranes. Our results indicate that the responsible region is a 110 amino acid domain located in the amino terminal region of the *Xenopus laevis* protein. In this region, one find most of the differences in the amino acid sequence upon comparison of the $G_{s\alpha}$ protein of oocyte and human. We propose that this

region is important in the physical interaction of G_{sa} with the adenylyl cyclase or that it participates in the regulation of the functional activation of G_{sa} . Our results and the results of the other groups support this second possibility. Finally, experiments of sedimentation in sucrose gradients indicate that this region of 110 amino acids participates in the interaction of G_{sa} with $G_{\beta\gamma}$ prepared and purified from bovine brain.

INTRODUCCION

A. IMPORTANCIA GLOBAL DEL ESTUDIO DE LOS SISTEMAS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES Y PAPEL DE LAS PROTEINAS G.

Procesos tan importantes como la división y la diferenciación celular, la secreción de proteínas y muchos otros son iniciados por la acción de señales externas sobre la superficie celular. Estas señales deben ser transducidas hacia el interior de la célula para generar una cascada de eventos que finalmente van a desencadenar el efecto biológico. La dilucidación de los mecanismos moleculares que regulan el fenómeno de transducción de señales a nivel de la membrana plasmática, ha adquirido gran relevancia en los últimos años. Uno de los sistemas involucrados en la regulación de la transducción de señales es el de las proteínas G acopladas a receptores hormonales. Estas proteínas, transducen la señal hormonal desde un receptor ubicado en la superficie de la membrana plasmática hacia un sistema efector, también presente en la membrana plasmática. Las proteínas G son heterotrímeros formados por una subunidad α (conocida también como G_α), una subunidad β (G_β) y una tercera subunidad denominada γ (G_γ). La subunidad G_α tiene la capacidad de hidrolizar el GTP a GDP y fosfato (P_i). Las proteínas G se acoplan con una gran cantidad de receptores. Estos, en la mayor parte de los casos pertenecen a la familia de los receptores que poseen una estructura con dominios que atraviesan siete veces la membrana plasmática. Cuando uno de estos receptores, interactúa en forma específica con su ligando en la superficie externa de la membrana plasmática, induce la activación de la proteína G a la cual se acopla. La activación de la proteína G determina a su vez un cambio en la actividad del sistema efector. Se conocen varios sistemas efectores presentes en la membrana plasmática y que son regulados por proteínas G. Entre estos se encuentra la adenililciclase, la

fosfolipasa C- β , la fosfodiesterasa de GMP cíclico (cGMP), la fosfolipasa A₂ y algunos canales iónicos. Todos estos sistemas regulan los niveles intracelulares de metabolitos importantes para la célula, como lo son el AMP cíclico (cAMP), el inositol trifosfato (IP₃), el diacilglicerol, el ión Ca²⁺, el ión K⁺ y otros. Estos metabolitos han sido llamados segundos mensajeros, debido a que variaciones en las concentraciones intracelulares de estas moléculas, pueden producir cambios importantes a nivel del metabolismo celular, inducir la entrada de la célula a estados proliferativos, y regular la expresión de genes específicos.

La subunidad G_q de las proteínas G de membrana pertenece a una familia de proteínas que incluye a miembros de la familia de ras, algunos factores citosólicos involucrados en la síntesis de proteínas y tubulina. Todas ellas comparten con las proteínas G_q de membrana la propiedad de unir GTP y de hidrolizarlo a GDP y P_i. Además, el mecanismo molecular de activación y desactivación de todas estas proteínas es también en líneas generales similar (Allende, 1988). Nuestro laboratorio ha estado por varios años interesado en el estudio de los mecanismos de regulación de la transducción de señales hormonales, y ha utilizado para estos efectos el sistema del oocito de *Xenopus laevis*. La relevancia de estos estudios es realizada por las peculiaridades que el sistema del oocito presenta en relación con el mecanismo de acción de la hormona progesterona.

B. SISTEMA DEL OOCITO DE *Xenopus laevis* Y TRANSDUCCION DE SEÑALES HORMONALES.

1. La maduración meiótica del oocito.

El oocito de *Xenopus laevis* en estado VI es una célula detenida en la primera profase de la división meiótica. La exposición del oocito a la progesterona o a la insulina reinicia la meiosis para detenerse nuevamente en la segunda metafase. Este proceso se conoce como maduración meiótica,

y transforma al oocito en un huevo con la capacidad de ser fecundado e iniciar la embriogénesis (Maller, 1985).

El sistema del oocito de *Xenopus laevis* ha sido utilizado como sistema modelo para el estudio de la regulación del ciclo celular, debido a que ofrece ventajas comparativas con respecto a otros sistemas. Una de estas ventajas es su gran tamaño (1,4 mm de diámetro), el cual es 500.000 veces más grande que el de un célula somática normal y facilita su manipulación. Este gran tamaño también permite utilizar al oocito para realizar la técnica de microinyección, como una manera de estudiar la regulación de la división celular y el mecanismo de acción hormonal. Otra ventaja del oocito es su sincronización fisiológica. Los oocitos plenamente desarrollados (estado VI, según Dumont, 1972) están todos detenidos en la profase de la primera división meiótica, y por acción de la hormona esteroideal progesterona o de la insulina, pasan sincrónicamente en 18 horas a la metafase de la segunda división meiótica. Esta sincronización fisiológica permite analizar la regulación de las diferentes etapas que participan en el proceso de división celular. Esta característica del oocito ha facilitado el estudiar el mecanismo por el cual progesterona e insulina ejercen su acción (Smith, 1989).

A diferencia de lo establecido para la acción de las hormonas esteroideas en otros sistemas, en los cuales existen receptores nucleares y una interacción a nivel del DNA (Wahli y Martínez, 1991), en el oocito de *Xenopus laevis* la progesterona actúa a nivel de la membrana celular, en donde existiría un receptor para ella (Sadler y Maller, 1982). Está bien establecido que la maduración inducida por progesterona involucra la inhibición de la adenilciclase del oocito (Jordana y cols., 1981b; Sadler y Maller, 1981; Finidori-Lepicard y cols., 1981) y la consecuente disminución en la actividad de la proteína quinasa dependiente de cAMP.

2. Regulación de la actividad adenililciclase de oocitos de *Xenopus laevis* por proteínas G y efecto de la hormona progesterona.

Los estudios anteriormente referidos sobre el efecto de progesterona a nivel de la membrana plasmática y su relación con los nucleótidos cíclicos, motivaron al laboratorio a iniciar a principios de la década de 1980 el estudio de la caracterización de la adenililciclase presente en el oocito de *Xenopus laevis* en estadio VI. Como producto de estas investigaciones hoy se sabe que esta actividad se encuentra presente en fracciones de membrana plasmática del oocito de *Xenopus laevis* (Jordana y cols., 1981a). Esta actividad es estimulada por análogos no hidrolizables de GTP, toxina del cólera y por ión fluoruro, e inhibida por la hormona progesterona (Jordana y cols., 1981b; Jordana, 1984). Estos hallazgos sugirieron la existencia de una actividad tipo G_s en estas células (la proteína G involucrada en la activación de la adenililciclase). La caracterización de la adenililciclase de membrana plasmática de oocitos de *Xenopus laevis* y su regulación por la hormona progesterona, dió origen a dos Tesis de Doctorado (Jordana, 1982; Olate, 1985).

Con respecto a la acción de la hormona progesterona, la información acumulada hasta este momento indica que ella es capaz de inhibir tanto en oocitos de *Xenopus laevis* intactos (Bravo y cols., 1978; Maller y cols., 1979), como en membranas aisladas, la actividad de la adenililciclase presente en este sistema (Jordana y cols., 1981b; Sadler y Maller, 1981; Finidori-Lepicard y cols., 1981). Esta inhibición es dependiente de nucleótidos de guanina. Sin embargo, hasta el presente momento no existe todavía claridad con respecto al mecanismo por el cual la progesterona ejerce su acción inhibidora sobre la adenililciclase. Se ha postulado, por analogía a lo encontrado en la regulación de la adenililciclase de mamíferos, que la acción de la hormona esteroideal podría ser mediada por una proteína G del tipo inhibidor de la actividad de la adenililciclase (conocida como G_i).

Sin embargo, el efecto de progesterona no responde al patrón clásico observado en la inhibición hormonal de la adenililciclase mediada por G_i en otros sistemas. En prácticamente todos los sistemas estudiados, la inhibición hormonal de la adenililciclase a través de G_i puede ser revertida por la acción de una toxina bacteriana, la toxina de *Bordetella pertussis* (Birnbaumer y cols., 1990). A pesar de que en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*, la toxina de *Bordetella pertussis* ADP-ribosila a una proteína con una migración electroforética típica a las de la familia de G_i , la inhibición hormonal de la adenililciclase no es revertida por la acción de esta toxina. (Olate y cols., 1984; Sadler y cols., 1984). Estos experimentos cuestionan la hipótesis de que la inhibición de la adenililciclase por progesterona en oocitos, ocurra a través de una proteína del tipo G_i similar a las descritas en mamíferos. Además, sugieren la posibilidad de que esta inhibición pueda ser mediada por otra proteína G distinta a G_i . Por otro lado, algunos experimentos realizados con membranas de oocitos de *Xenopus laevis*, indican que la progesterona podría interferir con la activación de G_s por análogos no hidrolizables de GTP (Jordana y cols., 1984; Olate y cols., 1985). Sin embargo, toda la evidencia experimental que apoya esta hipótesis es de tipo indirecto.

Con respecto a la existencia de un receptor para progesterona en la membrana del oocito de *Xenopus laevis*, la información existente en la literatura a este respecto no es clara. Aunque dos grupos han reportado la identificación de un posible receptor de naturaleza proteica (Sadler y Maller, 1982; Blondeau y Baulieu, 1984), la información reportada por ellos es contradictoria y no es indicativa de que el receptor de progesterona haya sido realmente caracterizado.

Cuando se expone el oocito a progesterona se produce un aumento de la síntesis de proteínas de alrededor de dos veces y esto ocurre aproximadamente 2 horas después del tratamiento con la hormona (Bravo y

col., 1978). Los inhibidores de la síntesis proteica bloquean la maduración del oocito, al ser agregados antes de las 2 horas del tratamiento del oocito con progesterona. Posterior a la inducción de la síntesis proteica y coincidente con la ruptura de la membrana nuclear, proceso que define la maduración meiótica del oocito, se detecta en el citoplasma la aparición del factor promotor de la maduración (MPF). Al microinyectar el oocito con un extracto citoplasmático obtenido a partir de oocitos maduros, se observa un aumento significativo en la fosforilación de proteínas (Lohka y col., 1987; Cicirelli y col., 1988), junto con lo cual hay ruptura de la membrana nuclear. Esto ocurre en ausencia de progesterona y sin síntesis de proteínas. El MPF está constituido por dos proteínas, la cdc-2 quinasa y la ciclina. Esta última es sintetizada *de novo* luego de la inducción hormonal de la maduración del oocito y se sabe que su unión a la cdc-2 quinasa es fundamental para obtener un MPF activo (Lewin, 1990).

C. PRIMER OBJETIVO GENERAL DE ESTA TESIS Y SU FUNDAMENTO.

Los datos presentados anteriormente tienen el interés de constituir las pruebas de un mecanismo de acción de una hormona esteroidea que implica una modificación de la actividad adenilciclase regulada por proteínas G. Las peculiaridades que presenta el mecanismo de la inhibición de la adenilciclase por progesterona anteriormente discutidas y su relación con las proteínas G, justifican el profundizar en el conocimiento general que se tiene sobre el sistema de transducción de señales mediado por proteínas G en el oocito.

En lo referente a la regulación de la actividad de la adenilciclase de oocitos de *Xenopus laevis*, su mecanismo de activación mediada por G_s parece ser similar al descrito en mamíferos en lo referente a la activación por análogos no hidrolizables de GTP. Sin embargo no se ha descrito hasta ahora la existencia de alguna hormona o receptor que active a la

adenililciclase a través de G_s . Esta aparente falta de sistemas hormonales estimuladores de la adenililciclase en el oocito llama la atención, y nos plantea la pregunta del porqué de la existencia de G_s en la membrana del oocito. La falta de receptores acoplados a G_s en el oocito, ha dificultado el estudio de la activación hormonal de la adenililciclase en este sistema. Esta dificultad ha sido en parte superada por los estudios de expresión en la membrana del oocito del receptor β -adrenérgico de mamíferos, mediante la microinyección de su RNA mensajero codificante en el citoplasma del oocito de *Xenopus laevis* (Kobilka y cols., 1987). Este receptor es capaz de acoplarse funcionalmente a G_s de oocitos y activar la adenililciclase de *Xenopus laevis*. Otro tipo de aproximación empleada para estudiar la activación hormonal de G_s en oocitos, es la desarrollada por nuestro grupo de trabajo. Esta aproximación emplea péptidos de carácter básico y moléculas más pequeñas como las poliaminas, que imitan a los receptores en su mecanismo de activación de las proteínas G. Resultados preliminares de nuestro laboratorio (Gatica y cols., 1987), indicaron que polilisina y poliornitina, junto con algunos compuestos tales como la espermina y la espermidina, eran capaces de modular la actividad de una serie de enzimas de membrana en oocitos de *Xenopus laevis*, entre ellas a la adenililciclase (Gatica y cols., 1987). Estos resultados, en conjunto con los datos de la literatura que indicaban que algunos péptidos de carácter básico como el mastoparín (un tetradecapéptido extraído del veneno de la avispa), imitaban en su acción sobre las proteínas G a los receptores (Higashijima y cols., 1990), nos motivaron a iniciar una serie de estudios con la finalidad de aclarar si el efecto estimulador de polilisina y otros policationes sobre la adenililciclase en oocitos, era o no mediado por proteínas G. Por esta razón nos pareció de importancia como primer objetivo general de esta Tesis, el profundizar en la naturaleza del efecto de compuestos policationicos sobre la funcionalidad de las proteínas G. Para cumplir con este objetivo general

se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de compuestos policatiónicos (polilisina, poliornitina, espermina y otros) sobre la función de G_s acoplada a la adenililciclase en membranas de oocitos. Dentro de este punto nos propusimos analizar también el efecto que tienen estos compuestos sobre la inhibición de la adenililciclase por progesterona.

2. Estudiar el efecto de los compuestos policatiónicos sobre la activación de algunas proteínas G_q purificadas (G_{1-30} y transducina) y sobre la proteína ras que sin pertenecer al grupo de G_q , pertenece a la familia de las proteínas que unen GTP. Este segundo objetivo específico se fundamenta por dos razones. La primera es poder caracterizar el efecto de los compuestos policatiónicos sobre las proteínas G_q en un sistema menos complejo que el de membrana. La segunda razón es estudiar la especificidad del efecto de compuestos policatiónicos sobre otras proteínas G y sobre proteínas que unen GTP como ras. Se ha elegido como criterio de ensayo de activación de proteínas G la actividad GTPásica, por ser ampliamente utilizado en la literatura (Gilman, 1987; Birnbaumer y cols., 1990). Cabe comentar que hubiera sido de interés el haber estudiado el comportamiento de la proteína G_{sq} de oocito frente a los policationes. Sin embargo, la falta de un protocolo adecuado de purificación para esta proteína de su fuente natural, o producida mediante técnicas de DNA recombinante impidió este propósito.

Como uno de los propósitos fundamentales de esta *Tesis* es profundizar en el estudio del mecanismo por el cual estos péptidos ejercen su acción sobre las proteínas G, es conveniente discutir lo que se conoce actualmente acerca de los aspectos generales del mecanismo de activación de las proteínas G y su regulación hormonal, para posteriormente revisar algunos aspectos de la regulación de la adenililciclase por proteínas G.

D. MECANISMO DE ACTIVACION DE LAS PROTEINAS G.

1. Esquema general de activación de proteínas G.

Las proteínas G son oligómeros formados por tres tipos de polipéptidos: una subunidad denominada α (G_α), cuya masa molecular relativa oscila entre los 39.000 kD y los 52.000 kD, un polipéptido de cerca de 36 kDa denominado β , y una subunidad γ de 5-10 kDa, que se asocia permanentemente a β ($G_{\beta\gamma}$) (Gilman, 1987; Birnbaumer y cols., 1990).

La subunidad G_α tiene la propiedad de unir nucleótidos de guanina y posee además una actividad hidrolítica sobre el GTP (Birnbaumer y cols., 1990). Por bastante tiempo se pensó que esta subunidad era la única que determinaba la especificidad de interacción de la proteína G con el receptor y con el sistema efector. En este esquema, $G_{\beta\gamma}$ cumplía un papel mas bien pasivo, en el sentido de que no participaba directamente en la regulación de la actividad del sistema efector. Hoy, se sabe que tanto G_α como $G_{\beta\gamma}$ cumplen roles protagónicos en la regulación de la actividad del sistema efector, lo que ha contribuido a complicar bastante el tradicional esquema planteado para la regulación hormonal de los sistemas acoplados a proteínas G (Birnbaumer, 1992; Clapham y Neer, 1993).

Con respecto a las subunidades G_α conocidas, sólo algunas de ellas han sido purificadas de tejidos. Este es el caso de $G_{s\alpha}$ (Northup y cols. 1980; Codina y cols., 1984a), $G_{i\alpha}$ (Neer y cols., 1984; Stenweis y Robishaw, 1984; Bokoch y cols., 1984; Katada y cols., 1984), $G_{o\alpha}$ (Sternweis y Robishaw, 1984), $G_{t\alpha}$ (transducina) (Kühn, 1980; Fung, 1983) y $G_{q\alpha}$ (Pang y Sternweis, 1990). El resto de las subunidades G_α , ha sido identificada por secuenciación de sus cDNA respectivos (Simon y cols., 1991; Birnbaumer 1992; Clapham y Neer, 1993). En base a sus características funcionales y al análisis de la estructura primaria de las subunidades G_α clonadas, estas se han clasificado en cuatro grandes grupos: el de $G_{s\alpha}$, el de $G_{i\alpha}$, el de $G_{q\alpha}$ y el de $G_{12\alpha}$ (Simon y cols., 1991; Hepler y Gilman 1992). Una descripción de

cada uno de los tipos de G_q conocidas, su clasificación y el sistema efector que regulan se muestra en el esquema 1.

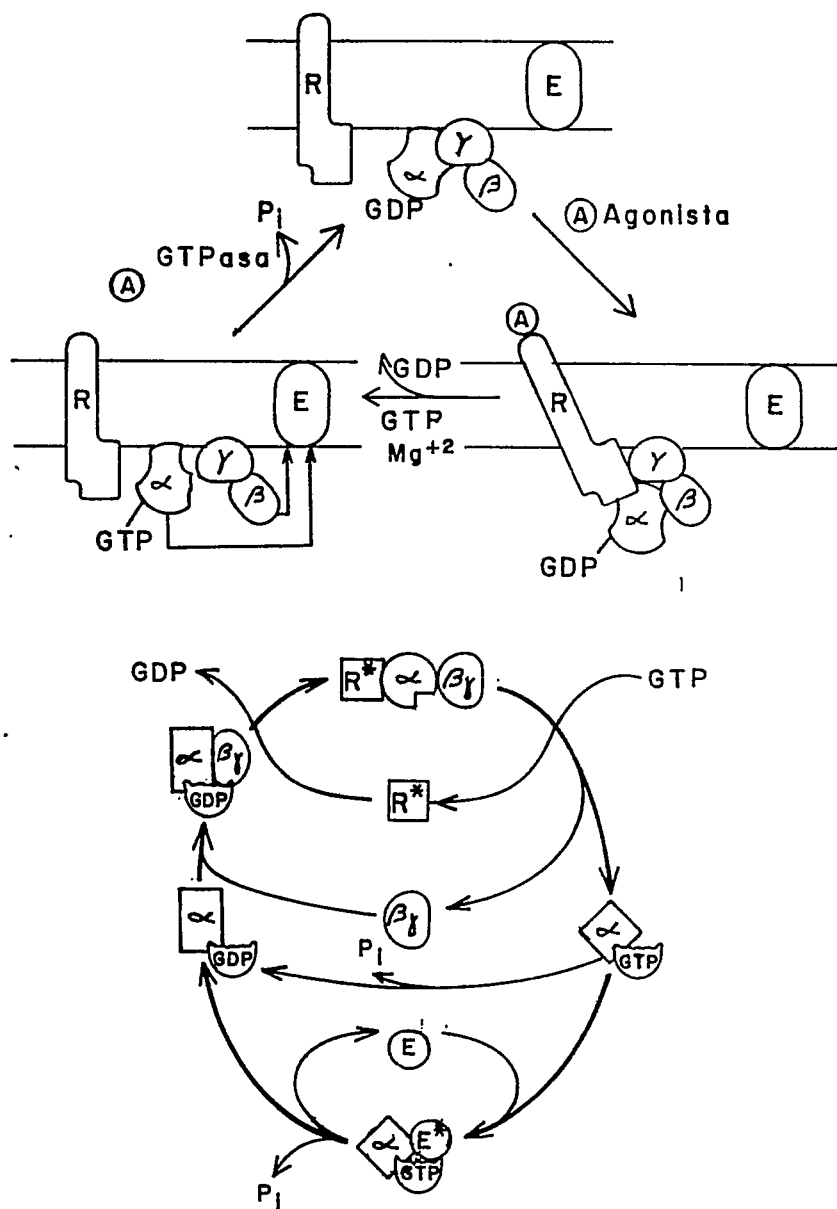
Las proteínas G triméricas, en su estado basal (no activado), poseen una molécula de GDP unida a la subunidad G_q . Cuando un receptor de la superficie celular se activa por acción de su agonista (ligando o luz), es capaz de asociarse en forma específica a una proteína G (esquema 2). La interacción del complejo hormona-receptor (receptor activado) con la proteína G promueve la disociación del GDP unido a G_q y su recambio por GTP. La unión de GTP o sus análogos no hidrolizables, como el GTP- γ -S o el GppNHp, conducen a la activación de las proteínas G. Una gran cantidad de información acumulada hasta el momento indica que la unión de este nucleótido induce un cambio conformacional en la subunidad G_q . Este cambio conformacional lleva a la subunidad G_q a un estado activo, con baja afinidad por el receptor y por $G_{\beta\gamma}$. Como consecuencia de la unión de GTP, el trimero $G_{\alpha\beta\gamma}$ se disocia del complejo hormona receptor. Posteriormente o simultáneamente G_q se disocia de $G_{\beta\gamma}\cdot G_q$ con GTP unido (G_q -GTP), e interactúa entonces con su efector modificando su actividad. Por otro lado $G_{\beta\gamma}$ también es capaz de interactuar específicamente con algunos sistemas efectores modificando sus actividades. Este efector puede ser el mismo sobre el cual G_q -GTP actúa, u otro. La hidrólisis del GTP por G_q , determina su disociación del sistema efector y la formación del trimero G_q -GDP $\cdot G_{\beta\gamma}$ ya que el complejo G_q -GDP tiene gran afinidad por $G_{\beta\gamma}$. A continuación se detalla cada una de las etapas mencionadas con anterioridad en el mecanismo de activación de las proteínas G. Los estudios que han llevado a proponer este mecanismo se han realizado fundamentalmente con sólo algunos tipos de proteínas G: G_s , G_o , G_t (transducina) y G_q (Gilman, 1987; Taylor, 1990; Birnbaumer y cols., 1990; Bourne y cols., 1990; Cerione, 1991; Clapham y Neer, 1993).

Familia	subunidad G_α	% identidad ^a a nivel de aminoácidos	sensibilidad ^b a toxina bacteriana	efector regulado
G_s	G_{sa-s} (especie corta)	100	TC	} †adenililciclase
	G_{sa-l} (especie larga)	-	TC	
	G_{olfa}	88	TC	†adenililciclase
G_i	G_{i-1a}	100	TBP	} †canales de K^+
	G_{i-2a}	88	TBP	
	G_{i-3a}	94	TBP	
	G_{oAa}	73	TBP	†adenililciclase
	G_{oBa}	73	TBP	†fosfolipasa C?
	G_{t-1a} (transducina)	68	TC, TBP	†fosfolipasa A2?
	G_{t-2a} (transducina)	68	TC, TBP	†fosfolipasa C?
	G_{ga} (gusducina)	67	TBP, TC?	†fosfolipasa C? cGMP
	G_{za}	60		†fosfolipasa C? cGMP
G_q	G_{qa}	100		†fosfolipasa C?
	G_{11a}	88		†fosfolipasa CB1, CB2 y CB3.
	G_{14a}	79		†fosfolipasa CB ?
	G_{15a}	57		?
	G_{16a}	58		fosfolipasa CB1, CB2 y CB3.
G_{12}	G_{12a}	100		?
	G_{13a}	67		†intercambiador Na^+-H^+

Esquema 1: Propiedades de las proteínas G_α identificadas.

^a: % de identidad aminoacídica: comparación con el primer miembro de cada familia.

^b: TC: toxina del cólera. TBP: toxina de *Bordetella pertussis*.



Esquema 2: Mecanismo de activación de proteínas G.

Parte superior: esquema simplificado.

A: agonista; R: receptor; E: efector.

Parte inferior: diagrama que muestra tres posibles conformaciones de G_0 en el ciclo de activación.

R: receptor y E: efector.

2. Mecanismo de activación de proteínas G mediada por receptores.

2.1. Efecto del receptor sobre el intercambio de nucleótidos y sobre la actividad GTPásica de la subunidad G_q .

Varios autores han observado que la activación del receptor induce sobre las proteínas G un aumento de la velocidad de intercambio del GDP unido por GTP, y una estimulación de la actividad GTPásica asociada a la subunidad G_q (Fung y Stryer, 1980; Cassel y Selinger, 1978; Brandt y Ross, 1986; Florio y Sternweis, 1989). El efecto estimulador de los receptores sobre la actividad GTPásica de G_q parece ser mas bien una consecuencia del recambio de GDP por GTP en la subunidad G_q y no un efecto directo sobre la actividad catalítica de la enzima propiamente tal (Lester y cols., 1982; Brandt y cols., 1983; Kanaho y cols., 1984, Brandt y Ross, 1986; Gilman, 1987; Birnbaumer y cols., 1990). Al utilizar subunidades G_{i0} y G_{o0} purificadas, se encuentra que la velocidad de entrada de GTP- γ -S es limitada por la velocidad de disociación del GDP unido (Ferguson y cols., 1986). Mediciones de las constantes de disociación de GDP y de la constante catalítica de hidrólisis de GTP (k_{cat} ; Higashijima y cols, 1987b; Markby y cols., 1993) realizadas con diferentes subunidades G_q purificadas (G_{o0} ; G_{s0} ; G_{i0}), indican que la velocidad de disociación de GDP es limitante con respecto a la hidrólisis de GTP (Higashijima y cols, 1987b; Graziano y cols., 1989; Linder y cols., 1990). Esta observación sumada al hecho de que no se ha encontrado efecto directo del complejo hormona receptor sobre la hidrólisis del GTP indican que la reacción de hidrolisis de GTP es principalmente regulada por el recambio de GDP por GTP (Brandt y Ross, 1986).

El receptor afecta tanto la disociación del GDP, como la asociación del GTP a la subunidad G_q (Cassel y Selinger, 1978; Brandt y Ross, 1986; Florio y Sternweis, 1989). Experimentos realizados con receptores y proteínas G

reconstituídos en vesículas de fosfolípidos, indican que la activación del receptor induce sobre las proteínas G un aumento en la velocidad de disociación del GDP y un aumento en la velocidad de unión de GTP o de sus análogos no hidrolizables (Asano y cols., 1984; Brandt y Ross, 1986; Tota y cols., 1987; May y Ross, 1988; Florio y Sternweis, 1989; Birnbaumer y cols., 1990; Blank y cols., 1991). Este efecto sobre la velocidad de unión de GTP es independiente de la etapa de disociación de GDP (Brandt y Ross 1986; Florio y Sternweis, 1989). Es interesante hacer notar que cuando el complejo hormona receptor está presente, la velocidad de disociación de GDP no parece ser la etapa limitante, pues la unión de GTP- γ -S es aún mas lenta (Brandt y Ross, 1986). Esto contrasta con lo observado con las proteínas G_q purificadas en ausencia de estímulo hormonal donde la unión de GTP- γ -S, es limitada por la velocidad de disociación de GDP (Ferguson y cols., 1986; Higashijima y cols, 1987b). En resumen, el complejo hormona receptor modifica las afinidades relativas de G_{sq} por el GDP y por el GTP, promoviendo de esta manera el recambio de nucleótidos, con la consecuente activación de las proteínas G (Florio y Sternweis, 1989; Birnbaumer y cols., 1990).

2.2. Unión de GTP a G_q y disociación de G_q de $G_{\beta\gamma}$

Como consecuencia de la unión de GTP o de sus análogos no hidrolizables, la subunidad G_q experimenta un cambio conformacional. La evidencia experimental que apoya la existencia de este cambio conformacional puede ser resumida en los siguientes puntos:

a) Experimentos en gradiente de densidad de sacarosa realizados con las proteínas G_s y G_i purificadas, indican que como consecuencia de la adición de GTP y Mg^{2+} al medio, la proteína G conserva su estructura trimérica, pero presenta un coeficiente de sedimentación menor al de la proteína G no activada (Codina y cols., 1984b).

b) Experimentos de fluorescencia realizados con varias subunidades

G_q aisladas indican que como consecuencia de la unión de GTP- γ -S en presencia de Mg^{2+} , éstas experimentan un aumento en la fluorescencia de uno o varios triptofanos. Este cambio en la fluorescencia ha sido atribuído a la formación de un complejo $G_q \cdot GTP-\gamma-S \cdot Mg^{2+}$ el que induciría un cambio en la conformación de la proteína (Higashijima y cols., 1987a; Phillips y Cerione, 1988; Guy y cols., 1990; Lee y cols., 1992a).

c) El cambio conformacional ha sido detectado también por alteraciones en el patrón de digestión de varias subunidades G_q por enzimas proteolíticas, como consecuencia de la unión de los análogos no hidrolizables de GTP o de fluoruro complejoado con Al^{3+} (AlF_4^-) (Hudson y cols., 1981; Fung y Nash, 1983; Winslow y cols., 1986; Denker y cols., 1992). Cuando G_{sq} es preincubada con GTP- γ -S y posteriormente tratada con tripsina, la unión del nucleótido protege un fragmento de 40.000-41.000 kD de G_{sq} de la proteólisis (Hudson y cols., 1981). Este fragmento contiene el sitio de unión del nucleótido (Markby y cols., 1993; Noel y cols., 1993).

Como consecuencia del cambio conformacional que sufre la subunidad G_q de las proteínas G por efecto del recambio de GDP por GTP, se produce su disociación de $G_{\beta\gamma}$. La disociación del trimero $G_{\alpha\beta\gamma}$ ha sido ampliamente documentada en estudios *in vitro* (Codina y cols., 1983; Codina y cols., 1984b; Northup y cols., 1983a; Northup y cols., 1983b; Iyengar y cols., 1988; Ransnäs y cols., 1989). Preparaciones purificadas de G_s y G_i (Codina y cols., 1984b) experimentan un cambio en el coeficiente de sedimentación de una forma de 4S a 2S, medido por centrifugación en gradientes de sacarosa, como consecuencia de la incubación previa del trimero con análogos no hidrolizables de GTP y Mg^{2+} . La forma con coeficiente de sedimentación de 2S representa la subunidad G_{sq} libre. Iyengar y cols., (1988) han descrito que en preparaciones de membranas de hígado de rata, el glucagón induce la disociación de G_s en G_{sq} y $G_{\beta\gamma}$. El mismo fenómeno ha sido observado en membranas de células S49 donde la activación del receptor β -adrenérgico

induce la disociación de G_s en G_{sa} libre y $G_{\beta\gamma}$ (Ransnäs y cols., 1989). Además la forma G_q -GTP se une con menos afinidad que G_q -GDP a una resina que contiene $G_{\beta\gamma}$ unida covalentemente a agarosa (Pang y Sternweis, 1989). En resumen, la activación de las proteínas G sin duda induce disociación del trimero $G_{\alpha\beta\gamma}$ en solución. Sin embargo no hay certeza de que la disociación sea esencial para la activación de los sistemas efectores por G_q o $G_{\beta\gamma}$ o si ocurre o no *in vivo*. Aunque la disociación no fuera un fenómeno con relevancia fisiológica, es importante señalar que cuando las proteínas G unen GTP, tanto G_q como $G_{\beta\gamma}$ adquieren una conformación activa.

2.3. Papel del Mg^{2+} en la activación de las proteínas G por nucleótidos de guanina. Regulación del intercambio de GDP por GTP.

Uno de los aspectos claves en la regulación de la activación de las proteínas G por el complejo hormona receptor es el complejo papel que cumple el ión Mg^{2+} . Los estudios de varios autores han permitido concluir que la acción del ión Mg^{2+} se manifiesta por lo menos en dos ordenes de concentración claramente establecidos: nanomolar y milimolar. Las diversas acciones del Mg^{2+} son resumidas en los siguientes puntos:

2.3.a. Requerimientos de Mg^{2+} en el orden de concentración nanomolar.

Los estudios de la dependencia de Mg^{2+} en la actividad GTPásica de varias proteínas G indican que se requieren concentraciones de Mg^{2+} en el orden nanomolar para inducir su activación (Sunyer y cols., 1984; Brandt y Ross, 1986; Higashijima, 1987c; Antonelli y cols., 1991; Lee y cols., 1992a).

Del mismo modo, se requieren concentraciones de Mg^{2+} en el orden nanomolar para producir una estimulación significativa del aumento de la fluorescencia de algunas proteínas G_q como consecuencia de la unión de GTP- γ -S (Higashijima y cols., 1987a; Lee y cols., 1992a).

Por otro lado, la velocidad de disociación de GTP- γ -S de varias proteínas G es dependiente en una relación inversa de la concentración de Mg^{2+} . La constante de afinidad aparente para Mg^{2+} , determinada en base al

efecto del metal sobre la velocidad de disociación del GTP- γ -S para varias proteínas G, es también del orden nanomolar (Higashijima y cols., 1987c; Graf y cols., 1992; Lee y cols., 1992a).

Se ha postulado, que los requerimientos de Mg^{2+} anteriormente mencionados y que se relacionan con la interacción de GTP y G_0 , reflejarían la formación de un complejo GTP· Mg^{2+} . Este complejo es probablemente el sustrato real de G_0 .

2.3.b. Requerimientos de Mg^{2+} en el orden de concentración milimolar.

Los estudios de la dependencia de Mg^{2+} sobre la activación de las proteínas G triméricas, en ausencia de estímulo hormonal, indican que se requieren concentraciones de Mg^{2+} en el orden milimolar para obtener una óptima activación (Katada y cols., 1986; Higashijima y cols., 1987c; Higashijima y cols., 1990; Lee y cols., 1992b). Los criterios de activación usados en estos estudios involucran la estimulación por Mg^{2+} , de la actividad GTPásica (Katada y cols., 1986; Higashijima y cols., 1987c), y de la velocidad de disociación de GDP (Higashijima y cols., 1987c). A diferencia de lo observado con las proteínas triméricas, la activación de G_0 aislada por Mg^{2+} ocurre en un orden de concentración de Mg^{2+} muy por debajo del milimolar, siendo desplazado al orden nanomolar de Mg^{2+} ((Higashijima y cols., 1987c, Higashijima y cols., 1990; Lee y cols., 1992a). Estos resultados indican que la presencia de $G_{\beta\gamma}$ modifica los requerimientos de Mg^{2+} por G_0 desplazándolos del orden nanomolar al milimolar (Gilman, 1987; Birnbaumer y cols., 1990). Se ha postulado que el efecto activador de Mg^{2+} sobre las proteínas G triméricas en el orden milimolar, reflejaría la existencia de un segundo sitio para el metal en G_0 , diferente de aquel en el cual el Mg^{2+} se encuentra coordinado con el GTP (Gilman, 1987).

2.3.c. Efecto de Mg^{2+} en la activación hormonal de las proteínas G.

La información de la literatura indica que el receptor activado disminuye la concentración de Mg^{2+} requerida para la activación de las proteínas G desde el orden milimolar al micromolar (Iyengar y Birnbaumer, 1982; Asano y cols., 1984; Haga y cols., 1985; Brandt y Ross, 1986; Senogles y cols., 1990). Esto ha sido observado en experimentos de reconstitución de G_s con el receptor β -adrenérgico (Asano y cols., 1984; Brandt y Ross, 1986), de G_i con el receptor de dopamina D_2 (Senogles y cols., 1990) y de G_i con el receptor colinérgico muscarínico (Haga y cols., 1985). Efectos similares de Mg^{2+} han sido observados en la activación de la adenililciclase dependiente de hormona, en membranas aisladas (Iyengar y Birnbaumer, 1982).

En base a los resultados anteriormente descritos, se ha propuesto que la acción activadora del complejo hormona receptor sobre las proteínas G es explicada en parte por una disminución en los requerimientos de Mg^{2+} para la reacción de intercambio de GDP por GTP. Analizando estos resultados en el contexto de la existencia un sitio de baja afinidad para Mg^{2+} , se ha postulado que el complejo hormona receptor aumenta la afinidad de este sitio por ión Mg^{2+} , induciendo la activación de las proteínas G en un nivel de concentración de Mg^{2+} (micromolar), donde en ausencia de estímulo hormonal no hay activación (Gilman, 1987; Birnbaumer y cols., 1990).

3. Desactivación de las proteínas G.

Una vez que G_α -GTP y $G_{\beta\gamma}$ se disocian, pueden interaccionar con su sistema efector respectivo y modificar su actividad. Se han descrito varios sistemas enzimáticos y algunos canales iónicos que son regulados por proteínas G, tanto por G_α o por $G_{\beta\gamma}$. Probablemente, el sistema efector mejor estudiado es el de la adenililciclase (Tang y Gilman, 1992; Iyengar, 1993). Otros sistemas regulados por proteínas G se muestran en el esquema 1.

La hidrólisis del GTP, unido a la proteína G_q induce su desactivación. Luego, debido a la alta afinidad que la forma G_q -GDP tiene por $G_{\beta\gamma}$ se produce una reasociación del trimero (Pang y Stenweis, 1989). De esta manera la desactivación de G_q determina a su vez la desactivación de $G_{\beta\gamma}$ (Clapham y Neer, 1993). Una vez que G_q -GTP interactúa con su efector, se produce una estimulación de la actividad GTPásica de G_q . Las proteínas G_q hidrolizan el GTP con una constante de velocidad intrínseca que es relativamente similar para las distintas subunidades G_q conocidas (de 1 y 5 min^{-1}) (Gilman, 1987; Markby y cols., 1993). Esta velocidad es relativamente mayor que la constante de hidrólisis de GTP de otras familias de proteínas con actividad GTPásica, como ras. Sin embargo este hecho no da cuenta de la velocidad con la cual las proteínas G son desactivadas en membranas, en sistemas reconstituídos o *in vivo*. La velocidad de desactivación de la adenilciclase regulada por G_s , es coincidente con la velocidad de hidrólisis de GTP para G_s purificada (Cassel y cols., 1977; Brandt y Ross, 1986). Sin embargo, la velocidad de desactivación de otras proteínas G que interactúan con sus efectores es considerablemente mayor que la velocidad de hidrólisis del GTP en la misma proteína G purificada. Por ejemplo, la transducina aislada hidroliza el GTP unido con una vida media de 15 segundos (Navon y Fung, 1984). Sin embargo, la desactivación de la fosfodiesterasa de cGMP activada por transducina en membranas toma menos de 1 segundo (Arshavsky y cols., 1991). En forma análoga, G_i hidroliza GTP casi a una velocidad similar a la de la transducina (Higashijima y cols., 1987b), pero la desactivación del canal de K^+ regulado por G_i en miocitos cardiacos es 100 veces más rápida (Breitwieser y Szabo, 1988). Estos resultados son una evidencia indirecta que indica que los sistemas efectores podrían actuar como factores que estimulan la actividad GTPásica de las proteínas G. Evidencias directas sobre esto último lo entregan estudios realizados con transducina, que indican que su actividad

GTPásica es estimulada significativamente por la fosfodiesterasa de cGMP (4 a 5 veces) (Arshavsky y Bownds, 1992). También se ha observado que la fosfolipasa C- β 1 aumenta 50 veces la velocidad de hidrólisis de GTP de una mezcla de G_q y G_{11} ($G_{q/11}$). Este efecto de fosfolipasa C- β 1 es específico sobre $G_{q/11}$ (Berstein y cols. 1992).

4. Activación de proteínas G por ión fluoruro y ión aluminio.

La activación de proteínas G por concentraciones milimolar de fluoruro en presencia del ión Mg^{2+} , requiere de la adición en trazas de ión Al^{3+} o de ión Be^{3+} , los que forman complejos fluorados de la forma AlF_x o BeF_x (Sternweis y Gilman, 1982). En vista de que la activación por fluoruro de las proteínas G requiere de la presencia de GDP unido a G_q , se postuló que estos complejos se unirían al fosfato β de G_q -GDP formando la especie $GDP \cdot AlF_x$ o $GDP \cdot BeF_x$. Estos complejos imitarían la molécula de GTP, produciendo la activación irreversible de las proteínas G (Bigay y cols., 1985). Los resultados obtenidos por estudios de resonancia magnética nuclear de ^{19}F y ^{31}P han confirmado el modelo planteado. Estos experimentos indican la formación de un complejo $GDP \cdot AlF_x$ (probablemente con $x = 3$), con un átomo de Mg^{2+} en el sitio de unión de GDP (Higashijima y cols., 1991; Antonny y Chabre, 1992). El ión fluoruro en ausencia de Al^{3+} , pero en presencia de Mg^{2+} es también capaz de activar a las proteínas G (Higashijima y cols., 1987a). Este efecto de fluoruro requiere que G_q tenga GDP unido (Antonny y cols., 1990). Estudios de resonancia magnética nuclear y de fluorescencia, indican que se forma un complejo con dos átomos de Mg^{2+} y tres de fluoruro para producir la especie $G_q(GDP \cdot MgF_3)Mg$, que sería estructuralmente análoga a $G_q(GDP \cdot AlF_x)Mg$ y a $G_q(GTP)Mg$ (Antonny y cols., 1993).

5. Efecto de toxina del cólera y de toxina de *Bordetella pertussis* sobre la activación de proteínas G.

Dos toxinas bacterianas han sido de gran utilidad para estudiar el mecanismo de activación de las proteínas G: la toxina del cólera (C.T.) y la toxina de la *Bordetella pertussis* (P.T.X).

La toxina de *Bordetella pertussis* cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde una molécula de NAD hasta un residuo de cisteína ubicado en el extremo carboxilo terminal de las proteínas $G_{i-1\alpha}$, $G_{i-2\alpha}$, $G_{i-3\alpha}$, $G_{0\alpha}$, $G_{t-1\alpha}$ y $G_{t-2\alpha}$ (West y cols., 1985; Hepler y Gilman, 1992). Esta modificación produce el desacoplamiento de la proteína G con el receptor (Van Dop y cols., 1984b), bloqueando la transmisión de la señal hormonal (Birnbaumer y cols., 1990).

La toxina del cólera también cataliza la transferencia de una molécula de ADP-ribosa desde el NAD, pero en este caso a un residuo de arginina que poseen $G_{s\alpha}$, $G_{olf\alpha}$ y $G_{t\alpha}$ (Van Dop y cols., 1984a). Esta modificación produce la inhibición de la actividad GTPásica de G_o , generando una proteína permanentemente activada (Freissmuth y Gilman, 1989).

E. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G.

La familia de los receptores proteicos acoplados a proteínas G ha llegado en este momento a superar los 100 miembros identificados (Birnbaumer y cols., 1990; Lancet y Ben-Arie, 1993; Abe y cols., 1993). Los distintos miembros de esta familia de receptores poseen la capacidad de interactuar con una gran variedad de ligandos, que van desde moléculas pequeñas como las catecolaminas hasta péptidos y proteínas (Birnbaumer y cols., 1990; Lancet y Ben-Arie, 1993; Abe y cols., 1993). Los más conocidos son los receptores α y β adrenérgicos, los receptores para dopamina, los receptores muscarínicos, los receptores de histamina, los receptores para somatostatina, vasopresina y oxitocina, los receptores para glucagón, para

colecistoquinina, para angiotensina y trombina. En el fenómeno de la percepción sensorial, también están involucrados este tipo de receptores. Es así como en la retina, la rodopsina es estimulada por la luz activando a una proteína G llamada transducina (Wittinghofer, 1994). Los quimiorreceptores para agentes odorantes y del gusto están también aparentemente acoplados a proteínas G (Lancet y Ben-Arie, 1993; Abe y cols., 1993).

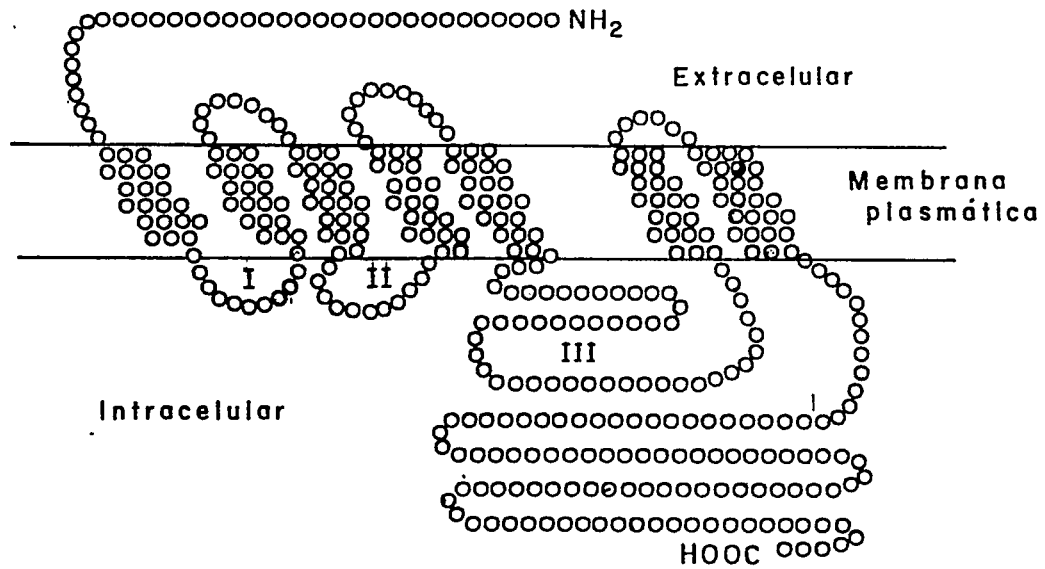
1. Estructura de los receptores acoplados a proteínas G.

En forma general estos receptores poseen siete secuencias hidrofóbicas transmembránicas de 20 a 25 aminoácidos, cada una de las cuales está limitada por una región hidrofílica de longitud variable. La topología propuesta para este tipo de receptores se muestra en el esquema 3. De acuerdo a este modelo, cada uno de los siete dominios hidrofóbicos forman una estructura de α hélice, con las regiones hidrofílicas expuestas hacia el lado intracelular y hacia el extracelular (Strader y cols., 1989).

Los estudios realizados con varios receptores indican que el sitio de unión del ligando está ubicado en un bolsillo rodeado por α hélices hidrofóbicas de los dominios de transmembrana y bajo el plano de la membrana citoplasmática (Findlay y Pappin., 1986; Strader y cols., 1989; Siciliano y cols., 1994). Sin embargo, otros estudios han involucrado en forma adicional el extremo amino terminal extracelular como un segundo sitio de interacción con el ligando (La Rosa y cols., 1992; Siciliano y cols., 1994).

2. Dominios de interacción del receptor con las proteínas G. Caracter básico de estos dominios.

Estudios de mutagénesis por delección de secuencias específicas (Dixon y cols., 1987; Strader y cols., 1987) y de mutagénesis sitio dirigida en el gen del receptor β -adrenérgico han permitido definir a las secuencias amino y carboxilo del tercer dominio citoplasmático y a la región amino del extremo carboxilo terminal citoplasmático de la proteína, como importantes



Esquema 3: Topología propuesta para los receptores de siete dominios transmembránicos acoplados a proteínas G.

Los números I, II y III denotan los dominios citoplasmáticos del receptor.

para la interacción con la proteína G_s (O'Dowd y cols., 1988). Construcciones de receptores quiméricos, han permitido también corroborar que en el tercer dominio citoplasmático existen regiones que son importantes para la interacción receptor-proteína G (Cotecchia y cols., 1990; Wong y cols., 1990; Lechleiter y cols., 1990).

La importancia de varios de los dominios citoplasmáticos, entre ellos el tercero, en la interacción del receptor con la proteína G ha quedado también de manifiesto con estudios de competencia realizados con péptidos deducidos a partir de las secuencias de aminoácidos de varios receptores en esta región. Varios péptidos derivados del segundo y tercer dominio citoplasmáticos y también del segmento amino del extremo carboxilo terminal citoplasmático del receptor β -adrenérgico (Münch y cols., 1991) y de la rodopsina (Konig y cols., 1989), inhiben el acoplamiento del receptor con la proteína G. Así mismo, estudios realizados *in vitro* con varios péptidos derivados de los extremos amino y carboxilo del tercer dominio citoplasmático de algunos receptores, indican que éstos son capaces de estimular la actividad GTPásica y la unión de GTP- γ -S de las proteínas G (Okamoto y cols., 1991; Cheung y cols., 1991; Voss y cols., 1993). Estos péptidos tienen como característica fundamental la de poseer aminoácidos básicos como lisina, arginina e histidina.

Es de interés el señalar que el mastoparán, un tetradecapéptido rico en aminoácidos básicos, presente en el veneno de la avispa, imita a los receptores en su efecto estimulador del recambio de GDP por GTP, y de la actividad GTPásica de G_0 y G_i (Higashijima y cols., 1988; Higashijima y cols., 1990; Mousli y cols., 1989). Un péptido básico de once aminoácidos, la sustancia P, y una poliamina aromática, el compuesto 48/80 son también capaces de imitar al receptor en su capacidad de activar una mezcla de G_i y G_0 (Mousli y cols., 1990a; Mousli y cols., 1990b).

F. SISTEMA DE LA ADENILILCICLASA.

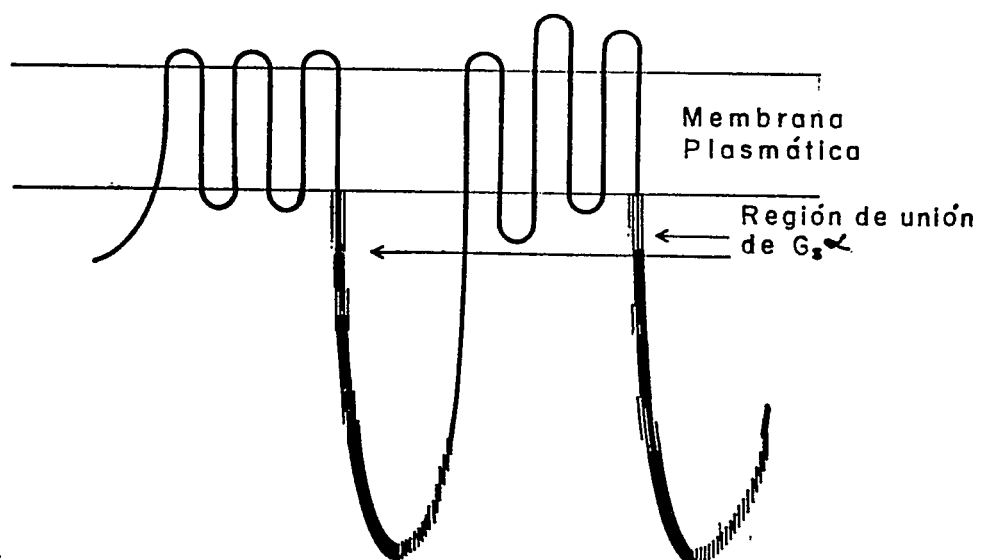
La acción de la adenililciclase está involucrada en la regulación de procesos tan diversos como el metabolismo, la transcripción de genes y la memoria. Por estudios bioquímicos se han caracterizado tres formas de adenililciclasas: una forma sensible (Smigel, 1986) y otra forma insensible a calmodulina y Ca^{2+} (Mollner y Pfeuffer, 1988). Estas dos formas están asociadas a la membrana plasmática (Gross y cols., 1987) y son reguladas por proteínas G. Existe también una tercera forma soluble, que es estimulada por calmodulina pero que no es regulada por proteína G (Gross y cols., 1987). Recientemente se han identificado, por clonamiento molecular ocho genes distintos de adenililciclase (Tang y Gilman, 1992; Iyengar, 1993). Algunos de estos genes han sido expresados en líneas celulares en cultivo. Esto ha permitido analizar las características funcionales de las proteínas producidas (Iyengar, 1993). Un cuadro resumen de algunas de las propiedades funcionales de las adenililciclasas conocidas se muestra en el esquema 4a.

1. Estructura de la adenililciclase.

La adenililciclase es una glicoproteína integral de membrana. Las proteínas nativas tienen una masa molecular relativa de 110-180 kDa (Pfeuffer y cols., 1991). A partir del análisis de las secuencias de aminoácidos de las diferentes formas de adenililciclasas clonadas, se ha postulado que estas proteínas presentarían una topología similar al de un canal iónico, con dos grandes dominios cada uno de los cuales atravesaría seis veces la membrana plasmática (esquema 4b) (Krupinski y cols., 1989; Iyengar, 1993). Estos dos dominios están separados por una región de 350 aminoácidos que se ubica hacia el lado citoplasmático de la membrana. La proteína en su extremo carboxilo terminal, presenta una región de 250 a 300 aminoácidos, que se extiende hacia la cara citoplasmática de la membrana. En las dos regiones citoplasmáticas de la proteína existen secuencias de

Entidad reguladora	efecto	tipo de adenililciclase	comentario
G_{sa}	estimulación	I-VI	
G_{ia}	inhibición	I y V	posiblemente todos los tipos pueden ser inhibidos directamente
$G_{\beta\gamma}$	estimulación en presencia de G_{sa}	II y IV	Forskolina se une a todas las ciclasas conocidas
	inhibición	I	
	ningún efecto	III, V y VI	
forskolina	estimulación	I-VI	
Ca^{2+} /Calmodulina	estimulación	I y III	

Esquema 4a: Descripción de las características de los subtipos de adenililciclasas estudiadas.



Esquema 4b: Topología de la adeniliclasa de membrana.

aminoácidos que están ampliamente conservadas en las adenililciclasas. Por el contrario, los aminoácidos involucrados en la asociación de la proteína a la membrana son diferentes entre las adenililciclasas conocidas (Tang y Gilman, 1992; Iyengar, 1993).

2. Regulación de la actividad de la adenililciclase de membrana.

La expresión de los subtipos de adenililciclasas I a VI en sistemas de expresión eucarióticos, ha permitido estudiar la regulación de la actividad de la enzima (esquema 4a). Todas las adenililciclasas caracterizadas de esta manera son estimuladas por forskolina y por G_{50} preactivada (Bakalyar y Reed, 1990; Tang y cols., 1991; Tang y Gilman, 1991; Feinstein y cols., 1991; Gao y Gilman, 1991; Katsushika y cols., 1992; Premont y cols., 1992; Yoshimura y Cooper, 1992).

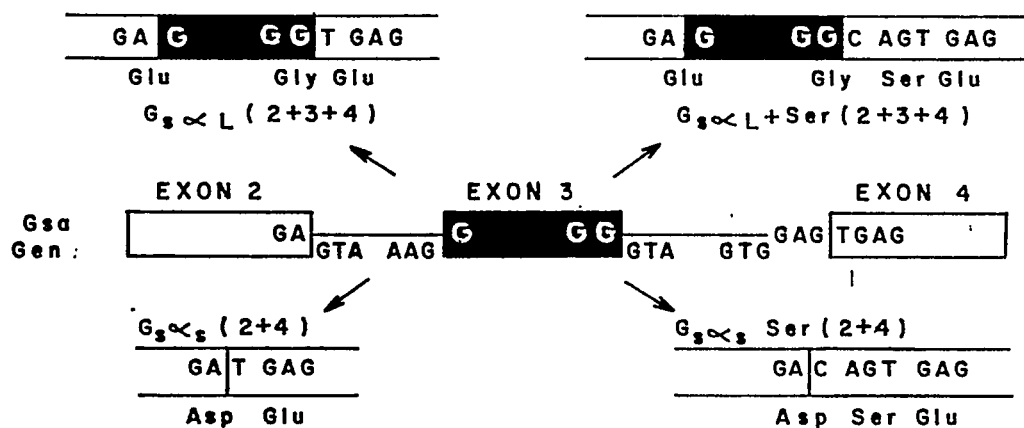
2.1. Efecto de forskolina.

La forskolina es un diterpeno extraído de la planta *Coleus forskohlii*, que se une específicamente a la adenililciclase y estimula su actividad (Seamon y Daly, 1983). El uso de este compuesto ha sido de gran utilidad para la caracterización bioquímica de la enzima (Pfeuffer y Metzger, 1982). La estimulación de la actividad de la adenililciclase por forskolina es independiente de la activación por G_{50} (Seamon y Daly, 1981). Sin embargo, la estimulación de la actividad de la enzima por el diterpeno puede ser potenciada por G_{50} , lo que sugiere que forskolina y G_{50} podrían estimular la actividad de la adenililciclase por la misma vía de acción (Bender y Neer, 1983; Iyengar 1993). No hay indicaciones directas que indiquen la región o las regiones de la adenililciclase donde la forskolina se une y produce su acción, pero se ha postulado que el diterpeno podría afectar la fluidez del microambiente de la membrana que rodea algunas de las regiones de transmembrana de la adenililciclase. Esto podría tal vez alterar la interacción de las dos regiones citoplasmáticas de la proteína modificando las propiedades catalíticas de la enzima (Iyengar, 1993).

2.2. Efecto de $G_{s\alpha}$.

Esta proteína, fue junto con $G_{i\alpha}$ y $G_{t\alpha}$ (transducina), una de las primeras subunidades G_α de proteínas G en ser caracterizada (Northup y cols. 1980; Hanski y cols. 1981; Sternweis y cols. 1981; Manning y Gilman, 1983; Northup y cols. 1983a; Codina y cols, 1984a). Los estudios de clonamiento y secuenciación han permitido aislar varios cDNA que codifican para proteínas $G_{s\alpha}$ procedentes de varias especies (Olate y Allende, 1991; Kaziro y cols., 1991). Las subunidades $G_{s\alpha}$ de mamíferos presentan entre sí una altísima identidad a nivel de secuencia de aminoácidos (correspondiente al 90%). Estos estudios han permitido definir en mamíferos la existencia de dos formas cortas ($G_{s\alpha-s}$) y dos largas ($G_{s\alpha-l}$) producidas por procesamiento alternativo de un único transcrito primario (esquema 5). Las dos formas cortas tienen 379 y 380 aminoácidos y las dos formas largas tienen 394 y 395 aminoácidos. Las formas largas y las formas cortas difieren entre sí en una serina (Kozasa y cols., 1988). Las migraciones electroforéticas en geles desnaturalantes de poliacrilamida, corresponden a proteínas de peso molecular de 45.000 para las dos forma cortas y de 52.000 para las dos formas largas. Todas las proteínas anteriormente descritas poseen el sitio de ADP ribosilación por toxina del cólera. Las evidencias que vinculan a $G_{s\alpha}$ con la regulación de la actividad adenililciclase pueden ser resumidas en los siguientes puntos:

- Preparaciones purificadas de las formas corta y larga de $G_{s\alpha}$ son capaces de estimular a la adenililciclase de un sistema de membranas deficiente en actividad G_s : las membranas cyc-. Estas membranas provienen de una línea de células en cultivo derivadas de un linfoma de ratón: las células S49. Cabe hacer notar que las membranas de células cyc- han sido de vital importancia en la purificación de las proteínas de la familia G_s , pues permiten seguir su actividad biológica a través de las distinta etapas de la purificación. Además han tenido importancia en los estudios de la



Esquema 5: Procesamiento alternativo del mRNA de G_{sq} en mamíferos.

El gen de G_{sq} es mostrado en el centro. Los exones 2 y 4 aparecen en color blanco. El exón 3 es mostrado en color negro. Las especies corta y larga de G_{sq} son indicadas como G_{sq-s} y G_{sq-l} respectivamente.

regulación funcional de esta proteína (Northup y cols., 1980; Hanski y cols., 1981; Sternweis y cols., 1981; Codina y cols., 1984a).

- Preparaciones purificadas de las formas corta y larga de $G_{s\alpha}$ son capaces de acoplarse al receptor β -adrenérgico, y reconstituir la estimulación hormonal de la actividad adenililciclase purificada en vesículas de fosfolípidos (Cerione y cols., 1984).

- El uso de las técnicas de biología molecular, junto con la disponibilidad de diversos tipos de sistemas de expresión de proteínas ha permitido estudiar la funcionalidad de las proteínas G_q cuyas secuencias de cDNA se conocen (Birnbaumer y cols., 1990). Las distintas formas de $G_{s\alpha}$ de mamíferos, expresadas tanto en bacterias (Graziano y cols., 1987; Graziano y cols., 1989; Mattera y cols., 1989) como en lisado de reticulocitos (Olate, y cols., 1988), estimulan la actividad de la adenililciclase de las membranas cíclicas sin mostrar aparentes diferencias cinéticas en esta capacidad. Es interesante señalar que las proteínas $G_{s\alpha}$ producidas en lisado de reticulocitos activan la adenililciclase en el mismo orden de concentración que las obtenidas por purificación a partir de tejidos. Esto es en el orden picomolar de concentración.

- Las adenililciclasas que han sido clonadas y expresadas en líneas celulares, muestran toda la capacidad de ser estimuladas por $G_{s\alpha}$ preactivada con análogos no hidrolizables de GTP, o por fluoruro complejado con Al^{3+} (Tang y Gilman, 1992; Iyengar, 1993). También pueden ser activadas por hormonas que actúan a través de receptores que se acoplan a G_s (Premont y cols., 1992).

La adenililciclase no es el único sistema regulado por $G_{s\alpha}$. Se ha descrito que esta proteína estimula la apertura de un canal de Ca^{2+} de músculo cardíaco y de túbulo transverso de músculo esquelético (Yatani y cols., 1988; Mattera y cols., 1989), y promueve además el cierre de un tipo de canal de Na^+ (Schubert y cols., 1989).

2.3. Efecto de G_{i0} .

Mediante la técnica de marcación de proteínas con NAD radiactivo y la toxina de *Bordetella pertussis*, se logró caracterizar a partir de varios tejidos de mamíferos, un grupo de proteínas con un peso molecular de 40.000-41.000 (Bokoch y cols., 1983; Codina y cols., 1983; Bokoch y cols., 1984, Katada y cols., 1984; Neer y cols., 1984; Sternweis y Robishaw, 1984, Uhing y cols., 1987). La observación de que la inhibición hormonal de la adenililciclase era también revertida por la acción de la toxina de *Bordetella pertussis*, hizo pensar que estas proteínas podían estar involucradas en esta inhibición (Katada y Ui, 1981; Kurose y cols., 1983; Murayama y Ui, 1983). De modo análogo al caso de G_{s0} , estas proteínas copurificaban con otras dos, que eran estructuralmente similares a G_{β} y G_{γ} aisladas de G_s y de la transducina (Sunyer y cols., 1984; Sternweis y Robishaw, 1984). Estas proteínas recibieron entonces el nombre de G_i por su aparente función inhibidora de la actividad adenililciclase.

Mediante clonamiento molecular, se han identificado en varias especies, distintas formas de G_{i0} (Sullivan y cols., 1986; Didsbury y cols., 1987; Didsbury y Snyderman, 1987; Suki y cols., 1987; Beals y cols., 1987; Codina y cols., 1988; Itoh y cols., 1988; Olate y cols., 1990). Estas han sido clasificadas en tres subtipos de G_{i0} : G_{i0-1} , G_{i0-2} y G_{i0-3} . Las secuencias obtenidas predicen proteínas con un peso molecular de 40.000-41.000 que corresponden a las proteínas previamente purificadas (Birnbaumer y cols., 1990). Todas estas especies poseen además la cisteína en el extremo carboxilo terminal que se ADP-ribosila por la toxina de *Bordetella pertussis* (Birnbaumer y cols., 1990). Sus secuencias de aminoácidos presentan más de un 85 % de identidad entre sí. Los tres tipos de proteínas G_{i0} son codificadas por genes distintos (Itoh y cols., 1988).

Estudios realizados con proteínas de la familia de G_{i0} purificadas de tejidos (Katada y cols., 1984) o recombinantes (Linder y cols., 1990),

indicaron que eran requeridas altas concentraciones de estas proteínas (10 nM a 2,5 μ M) para obtener una modesta inhibición, y además no saturable, de la actividad de la adenililciclase. Además, se había observado que $G_{\beta\gamma}$ purificado inhibía la actividad adenililciclase de membranas de plaquetas y de células S49, de manera más potente que G_{i0} y además saturable. Este hallazgo hizo pensar que la inhibición de la adenililciclase mediada por hormona se debía, a que la proteína $G_{\beta\gamma}$ liberada por la disociación del trímero G_i , titulaba al complejo G_{s0} -GDP, causando el desplazamiento del equilibrio hacia la formación del trímero G_s inactivo (Katada y cols., 1984). Es posible que la desactivación de G_{s0} por $G_{\beta\gamma}$ sea uno de los mecanismos de inhibición de la adenililciclase. Sin embargo, la expresión en células de varios subtipos de G_{i0} , que presentan mutaciones que inhiben su actividad GTPásica, producen una caída en los niveles intracelulares de cAMP (Wong y cols., 1991; Wong y cols., 1992). Estos resultados indican que G_{i0} puede inhibir directamente la actividad de la adenililciclase. Finalmente, esta inhibición directa ha podido ser demostrada con el uso de preparaciones purificadas de las tres formas de G_{i0} producidas en bacterias, en su forma miristoilada (Taussig y col., 1993a). Esta modificación química, que afecta a algunas proteínas G_q , entre ellas G_{i0} (pero no a G_{s0}), es esencial para la asociación de ellas con la membrana plasmática (Mumby y cols., 1990; Jones y cols., 1990). Este hecho, sumado a la disponibilidad de mayores cantidades de proteínas G_{i0} recombinantes, que las obtenidas con las técnicas clásicas de purificación a partir de tejidos, ha permitido demostrar que las tres formas de G_{i0} inhiben la actividad de varias formas de adenililciclasas. Esta inhibición es saturable y se observa en el orden de concentración nanomolar de G_{i0} (Taussig y col., 1993a).

2.4. Efecto de $G_{\beta\gamma}$

El dímero $G_{\beta\gamma}$ ha sido purificado de varios sistemas (Fung, 1983; Northup, 1983b; Sternweis y Robishaw, 1984; Boyer y cols., 1989), a partir de las proteínas G conocidas en su forma trimérica. En membranas de tejidos procedentes de diversas fuentes se han caracterizado por lo menos dos formas de G_{β} : una de 36.000 kDa y otra de 35.000 kDa (Mumby y cols., 1986; Amatruda y cols., 1988). Por clonamiento molecular se han identificado cuatro tipos de G_{β} en mamíferos (Fong y cols., 1987; Gao y cols., 1987; Levine y cols., 1990; von Weizsäcker y cols., 1992). Entre estas cuatro proteínas existe más de un 80 % de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Todas las secuencias de cDNA clonadas codifican para proteínas de 340 aminoácidos (Simon y cols., 1991). Con respecto a G_{γ} se han identificado por clonamiento molecular hasta el momento siete tipos distintos (Yatsunami y cols., 1985; Cali y cols., 1992; Clapham y Neer., 1993). En todos los casos las secuencias de cDNA codifican para proteínas de 75 aminoácidos con una masa molecular de 7.3-8.4 kDa (Hepler y Gilman, 1992). No todos los tipos de G_{β} se asocian con todos los tipos de G_{γ} conocidos. En este sentido parece existir un grado de especificidad (Schmidt y cols., 1992; Pronin y Gautam, 1992).

El efecto de $G_{\beta\gamma}$ sobre la actividad de los distintos tipos de adenililciclasas conocidas es complejo. La adenililciclase tipo I expresada en células Sf9 de insecto, es inhibida por $G_{\beta\gamma}$ purificada de cerebro de bovino. Esta inhibición es el resultante de la acción directa de $G_{\beta\gamma}$ sobre la enzima y se manifiesta cuando la adenililciclase ha sido previamente activada por calmodulina y Ca^{2+} , G_{sq} -GTP- γ -S o forskolina (Tang y cols., 1991; Tang y Gilman, 1991; Taussig y cols., 1993b). Por otra parte $G_{\beta\gamma}$ potencia significativamente el efecto estimulador del complejo G_{sq} -GTP- γ -S sobre la actividad de las adenililciclasas tipo II y IV expresadas también en células Sf9 de insecto. El efecto estimulador de $G_{\beta\gamma}$ observado sobre estas formas

de adenilicilasa es absolutamente dependiente de la presencia, del complejo $G_{s\alpha}$ -GTP- γ -S y no se observa en ausencia de él (Tang y Gilman, 1991; Gao y Gilman, 1991; Taussig y cols., 1993b). $G_{\beta\gamma}$ no parece afectar la actividad de las adenilicilasas tipos III, V y VI (Tang y Gilman, 1992; Iyengar, 1993). No todas las formas de $G_{\beta\gamma}$ activan a la adenilicilasa con la misma efectividad. Por ejemplo, la combinación de $G_{\beta1\gamma1}$ o $G_{\beta\gamma}$ de la transducina activan la adenilicilasa tipo II con un decimo de la potencia de la mostrada por $G_{\beta1\gamma2}$, $G_{\beta2\gamma2}$ ó $G_{\beta2\gamma3}$ (Iñiguez-Lluhi y cols., 1992).

G. SEGUNDO OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS Y SU FUNDAMENTO.

Debido al interés general de nuestro laboratorio de estudiar los mecanismos de transducción de señales acoplados a proteínas G en el oocito de *Xenopus laevis*, se planteó como uno de los proyectos de nuestro laboratorio el de caracterizar mediante el clonamiento molecular las especies de proteínas G_q presentes en el oocito de *Xenopus laevis*. La finalidad de realizar este tipo de aproximación era la de disponer mediante el uso de sistemas de expresión, de las respectivas proteínas para poder realizar su caracterización funcional. También se planteó dentro de esta misma línea general de trabajo el desarrollar sistemas que nos permitiesen mediante el uso de las proteínas recombinantes el poder dilucidar algunos de los aspectos pendientes relacionados con el efecto de la progesterona en el oocito. Dentro de esta línea de trabajo y usando sondas específicas para subunidades G_q de proteínas G y una genoteca de cDNA de oocitos de *Xenopus laevis*, se identificaron cinco tipos distintos de proteínas G_q : un tipo de $G_{q\alpha}$ (Olate y cols., 1989), dos tipos de $G_{q\beta}$ y dos correspondientes a dos variedades cortas de $G_{s\alpha}$ (Olate y cols., 1990). Las dos especies de cDNA para $G_{s\alpha}$ contienen secuencias de 379 aminoácidos que presentan un 96 % de identidad entre sí (Olate y cols., 1990). Estas dos formas presentan una identidad de un 90% en la secuencia de aminoácidos,

con las formas cortas de G_{sq} de humano, bovino y rata.

Dentro de este proyecto de nuestro laboratorio se planteó como segundo objetivo general de esta *Tesis* el caracterizar funcionalmente a las subunidades G_{sq} de *Xenopus laevis* en relación con sus contrapartidas de mamíferos. Para cumplir con este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Expresar las dos proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis* en bacterias y en lisado de reticulocitos.

2. Caracterizar funcionalmente a las proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis* en su capacidad de activar a la adenililciclase de membranas de un sistema de mamíferos deficiente en la proteína G_{sq} endógena, las células cyc-. En este punto se pretende comparar la capacidad de reconstitución de la adenililciclase de las proteínas de oocitos, con la de una proteína G_{sq} de humano. Esta proteína, previamente clonada de humano (Mattera y cols., 1986), reconstituye la actividad de la adenililciclase de las membranas cyc- al ser producida por técnicas de DNA recombinante en bacterias (Mattera y cols., 1989) y en lisado de reticulocitos (Olate y cols., 1988). El uso del sistema de las células cyc- en nuestro trabajo experimental se justifica (como se mencionó anteriormente en esta *Introducción*) por la gran importancia que ha tenido en la caracterización funcional de G_{sq} de mamíferos. Como parte de estos estudios, se propone también comparar como las diferencias a nivel de aminoácidos entre las proteínas de *Xenopus laevis* y de humano, afectan su funcionalidad.

Con respecto a los antecedentes bibliográficos necesarios para una cabal comprensión de este segundo objetivo general, señalamos que han sido prácticamente todos mencionados en relación con el primer objetivo general de esta *Tesis*, quedando sólo por discutir lo referente a algunos aspectos relacionados con la estructura tridimensional de las proteínas G_q en relación con su funcionalidad.

H. RELACION ESTRUCTURA FUNCION DE LAS SUBUNIDADES G_q .

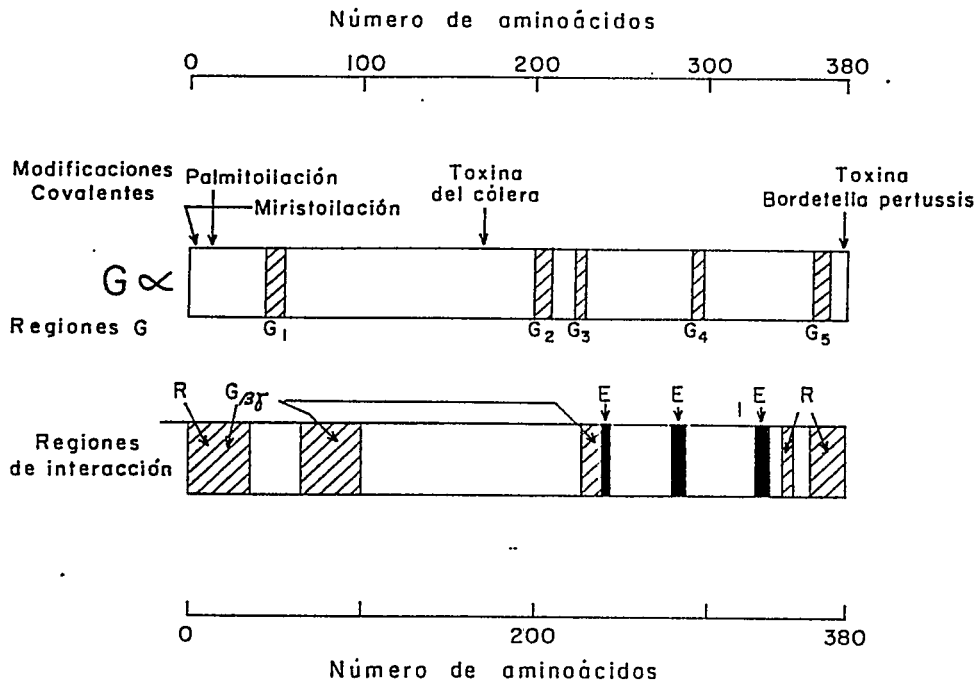
1. Estructura terciaria de G_q .

Dada la homología en la secuencia aminoacídica entre las subunidades G_q de las proteínas G, varios autores han propuesto un modelo tridimensional para una estructura " G_q tipo", que considera las características estructurales y funcionales de cada una de las subunidades G_q conocidas (Masters y cols., 1986; Holbrook y Kim, 1989; Berlot y Bourne, 1992; Conklin y Bourne, 1993). El modelo propuesto ha sido construido en base a:

-El alineamiento de secuencias de aminoácidos de las distintas subunidades G_q conocidas, en relación con la secuencia de aminoácidos de la proteína ras. Las proteínas G_q y ras poseen varias secuencias cortas de aminoácidos distribuidas a lo largo de la molécula (denominadas regiones G) que son muy conservadas y que están involucradas en la unión del nucleótido de guanina (esquema 6) (Holbrook y Kim, 1989). Estas secuencias de homología han sido usadas como referencia para los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas G_q con ras (esquemas 7) (Berlot y Bourne, 1992; Conklin y Bourne, 1993).

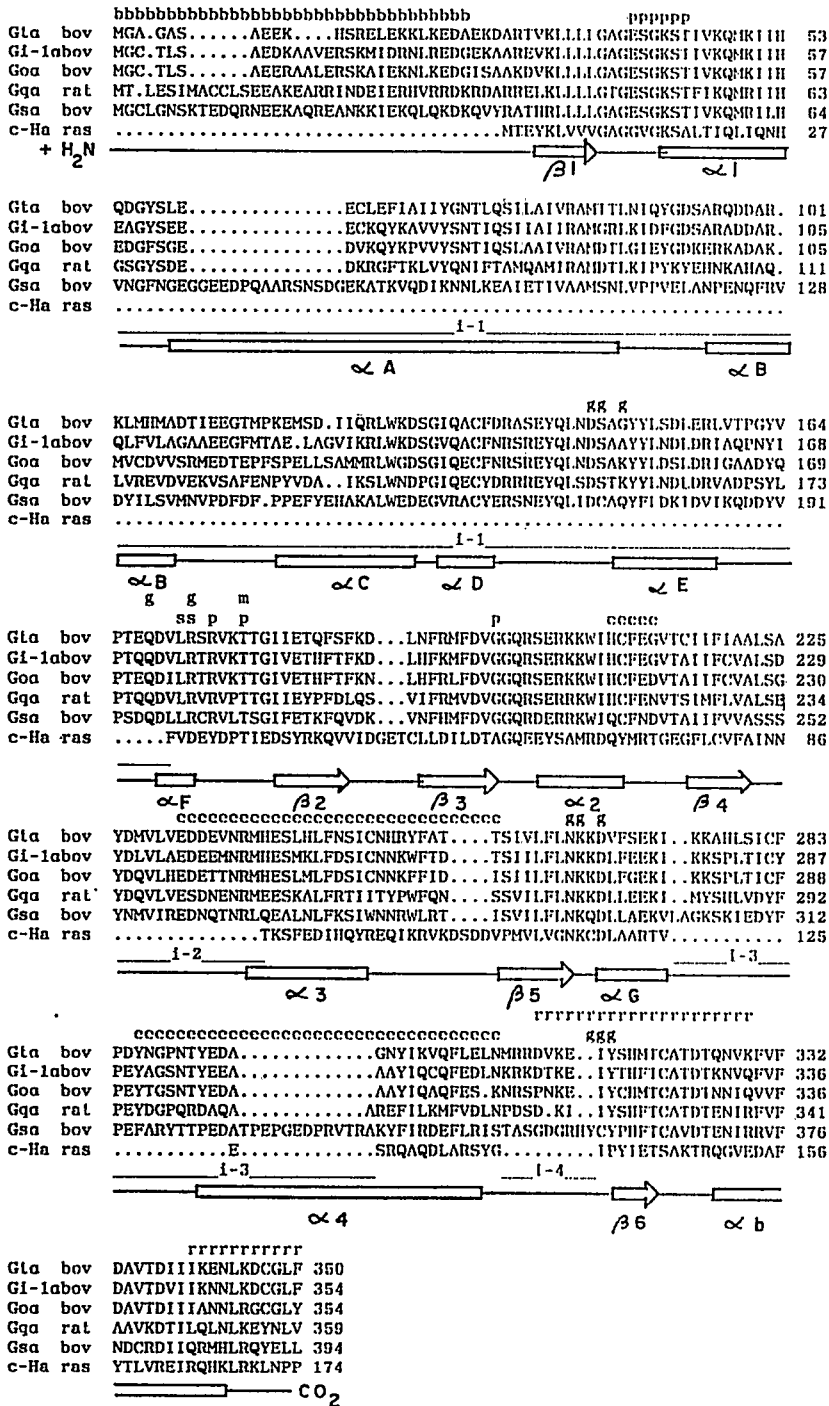
-El análisis de la estructura tridimensional de ras (Pay y cols., 1990; Milburn y cols., 1990), del factor de elongación de la traducción EF-Tu (Berchtold y cols., 1993), y de la transducina (Noel y cols., 1993), muestran que estas tres proteínas se pliegan, por lo menos en la región que une GTP, de manera muy similar (Wittinghofer, 1994).

Una representación de la proteína " G_q tipo" se muestra en el esquema 8. Al comparar los 165 aminoácidos de la estructura primaria de ras con los 350-394 aminoácidos de las subunidades G_q conocidas, queda en evidencia que existen cuatro regiones que están presentes en todas las subunidades G_q , pero que no están presentes en ras. Estas fueron denominadas regiones de inserción (Berlot y Bourne, 1992). La región de inserción más notable



Esquema 6: Modelo de G α .

La barra superior muestra la localización de las secuencias conservadas de las proteínas G α (regiones G o de unión al GTP). La barra inferior muestra la localización de las regiones de interacción con el receptor (R), el efector (E) y con G $\beta\gamma$. En el esquema también se señalan la localización de aquellos aminoácidos susceptibles de ser modificados por las toxinas del cólera y de *Bordetella pertussis*, y por lípidos: palmitoilación y miristoilación.



Esquema 7: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas G₀ (ver leyenda en la página siguiente).

Esquema 7: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas G_q .

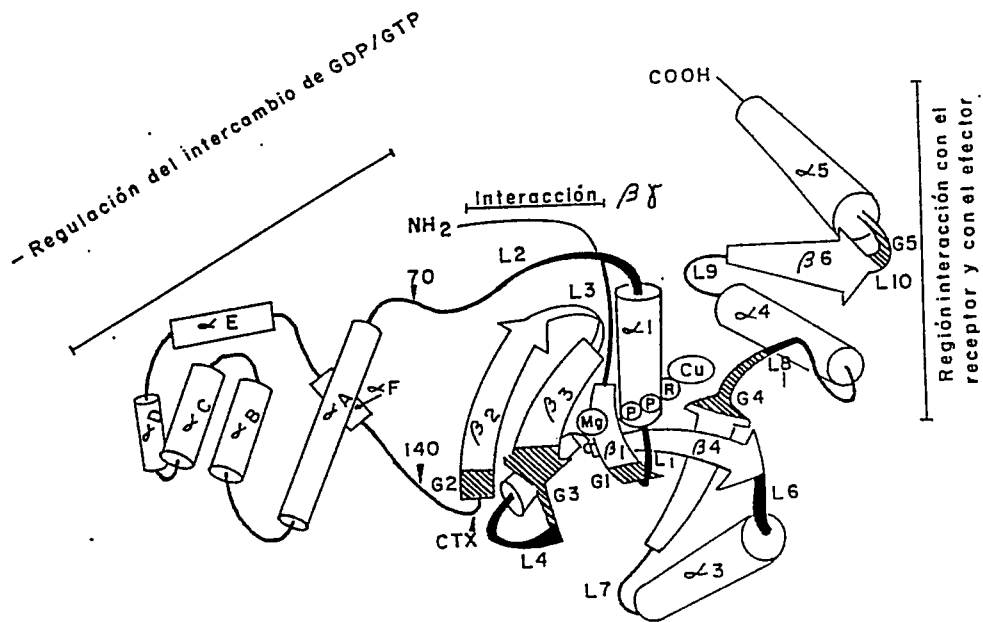
Los elementos de estructura secundaria indicados bajo las secuencias están tomados de la estructura tridimensional de $G_{i\alpha}$ (Noel y cols., 1993). i-1, i-2, i-3 e i-4 indican las secuencias de inserción en relación a la proteína ras. Las secuencias comparadas son: $G_{s\alpha}$ de bovino (bov) (Robishaw y cols., 1986), $G_{i\alpha}$ de bovino (Nukada y cols., 1986b), $G_{o\alpha}$ de bovino (Van meurs y cols., 1987), $G_{r\alpha}$ de ratón (rat) (Strathmann y Simon, 1990) y Ha-ras (Capon y cols., 1983).

b: región de unión a $G_{p\gamma}$

r: región de unión al receptor.

e: región de unión al efector.

es la llamada i-I (esquema 7) que involucra a un dominio de aproximadamente 120 aminoácidos ubicado hacia el amino terminal de G_q . Las otras tres secuencias de inserción son bastante más pequeñas y están distribuidas en el resto de la molécula. Antes de conocerse la estructura cristalográfica de la transducina, Conklin y Bourne (1993) propusieron que la región conocida como i-1 formaba un dominio estructural independiente del resto de la molécula, que contiene el sitio de unión de GTP. Los datos obtenidos a partir de la estructura cristalina de la transducina confirmaron este modelo (Noel y cols., 1993; Bourne, 1993; Wittinghofer, 1994). Estos datos indican que la región i-I se pliega en un dominio independiente (esquema 8), y a nivel de estructura secundaria está formado por seis α -hélices (Noel y cols., 1993). Este dominio se extiende desde el límite del bolsillo de unión del nucleótido de guanina, hacia el extremo amino terminal de G_q . El resto de los dominios de inserción (i-2, i-3 e i-4) se encuentran dentro del dominio de unión de GTP (denominado dominio de GTPasa) conectando regiones de estructura α -hélice con regiones que presentan estructura β (Noel y cols., 1993; Wittinghofer, 1994). El dominio denominado de la GTPasa se pliega de manera muy similar a la proteína ras y al factor de elongación EF-Tu (Noel y cols., 1993). Este dominio consiste en seis regiones de estructura β intercaladas por cinco regiones α -hélice. El dominio i-I está conectado al dominio de la GTPasa por dos pequeños segmentos polipeptídicos. Estos dos dominios interaccionan de manera tal el uno con el otro que entierran completamente dentro de la proteína al GTP coordinado con ión Mg^{2+} . Aquellas proteínas como ras que no poseen el dominio i-I, exponen parcialmente el sitio de unión de GTP hacia la superficie de la proteína (Milburn y cols., 1990; Pay y cols., 1990; Noel y cols., 1993). La inaccesibilidad del sitio de unión del nucleótido en G_q , sugiere que para poder recambiar el GDP unido por GTP, la proteína debe



Esquema 8: Estructura tridimensional hipotética de G_{α} .

Esta estructura ha sido adaptada de Masters y cols. (1986), Berlot y Bourne (1992), Olate y Allende (1991) y Noel y cols. (1993). Las α hélices son indicadas por cilindros, las hojas β por flechas y las regiones no estructuradas por líneas negras. G1 a G5 son las regiones involucradas en la unión de GTP (áreas achuradas). La arg modificada por la toxina del colera es indicada por la flecha (CT). Gu: base de guanina, R: ribosa, P: fosfato.

sufrir un cambio conformacional que expone hacia la superficie el sitio de unión del nucleótido.

2. Dominios de interacción de G_q con $G_{\beta\gamma}$

Evidencias bioquímicas y estructurales indican que la zona de interacción de G_q con $G_{\beta\gamma}$ se encuentra en el extremo amino terminal de G_q . Deleciones o mutaciones de la región amino terminal de varias subunidades G_q inhiben o atenúan la interacción con $G_{\beta\gamma}$ (Fung y Nash, 1983; Journot y cols., 1991; Graf y cols., 1992; Denker y cols., 1992). Existe evidencia experimental que indica que la miristoilación de una glicina ubicada en el extremo amino terminal puede ser importante para la interacción de G_q con $G_{\beta\gamma}$ (esquema 6) (Linder y cols., 1991). Conklin y Bourne (1993), han propuesto que $G_{\beta\gamma}$ podría interactuar también con G_q en algún punto de la región i-1 y también a través de algunos aminoácidos ubicados en la segunda α -hélice del dominio GTPasa de G_q .

3. Dominios de interacción de G_q con el receptor.

El extremo carboxilo terminal de G_q tiene un papel fundamental en la interacción con el receptor. A este respecto, se ha visto que mutaciones en el extremo carboxilo terminal de G_q (Sullivan y cols., 1987; Hirsch y cols., 1991), la ADP-ribosilación de la cisteína carboxilo terminal de G_q por toxina de *Bordetella pertussis* (West y cols., 1985) y anticuerpos dirigidos contra péptidos de la región carboxilo terminal de G_q (Simonds y cols., 1989; Gutowski y cols., 1991; Shenker y cols., 1991), bloquean la interacción del receptor con la proteína G_q . De la misma forma la construcción de proteínas quiméricas donde los últimos cinco aminoácidos del extremo carboxilo terminal de G_{q0} han sido cambiados por los correspondientes de G_{i0} , permiten que la proteína quimérica G_{q0} - G_{i0} sea activada por receptores que normalmente se acoplan a G_{i0} (Conklin y cols., 1993). Sin embargo la región amino terminal de G_q también tiene importancia en la interacción con el receptor. Un péptido amino terminal deducido a partir de la secuencia

de aminoácidos de $G_{t\alpha}$, inhibe la interacción de G_t con la rodopsina activada por luz (Hamm y cols., 1988). Por otra parte, experimentos de entrecruzamiento de $G_{0\alpha}$ con mastoparín, que interacciona con el extremo carboxilo terminal de $G_{0\alpha}$, indican que éste puede unirse covalentemente a una cisteína del extremo amino terminal de $G_{0\alpha}$ (Weingarten y cols., 1990; Higashijima y Ross, 1991). Estos experimentos, junto a otros realizados con anticuerpos (Deretic y Hamm, 1987; Mazzoni y cols., 1991) indican que el extremo amino y carboxilo terminal de las proteínas G_q están espacialmente muy próximos entre sí. Finalmente, una región muy conservada entre las distintas subunidades G_q , ubicado en el dominio GTPasa y que está sobre β -6 y α -5 de la estructura cristalina de $G_{t\alpha}$ (esquema 8), también tiene importancia en la interacción de G_q con el receptor (Hamm y cols., 1988; Hamm y cols., 1991).

4.4 Interacción de G_q con el efector.

Estudios de mutagénesis de $G_{s\alpha}$ combinado con la construcción de quimeras entre $G_{s\alpha}$ y $G_{t\alpha}$ (Itoh y Gilman, 1991; Berlot y Bourne, 1992; Conklin y Bourne, 1993), indican que existirían por lo menos tres regiones de interacción de $G_{s\alpha}$ con la adenililciclasa en el dominio GTPasa de G_q . La primera región estaría ubicada hacia el extremo carboxilo terminal de la α -hélice 2 (esquemas 7 y 8). La segunda región involucraría parte de la región de inserción 2 (i-2) y la α -hélice 3. El tercer dominio se extendería a través de la α -hélice 4 y la región de inserción 4 (i-4). Este último dominio de interacción de $G_{s\alpha}$ con la adenililciclasa, es equivalente a una región de la transducina que está involucrada en la interacción con la fosfodiesterasa de cGMP (Rarick y cols., 1992).

MATERIALES Y METODOS

A. REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Las enzimas de restricción BamH I, Bgl II, EcoR I, Hind III, Kpn I, Nco I, Pst I, Pvu II, Sma I, Sal I, Ssp I, Sty I y Xba I fueron obtenidas de Promega Co. BsaB I y Tth111 I fueron obtenidas de New England Biolabs Inc. Dexoxiribonucleasa Q, lisado de reticulocitos, mezcla de aminoácidos sin metionina y RNA polimerasa de fago T7 fueron obtenidas de Promega Co. DNA de fago λ , DNA ligasa de fago T4, DNA polimerasa de fago T7 (sequenase: versiones I y II), ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, fragmento "klenow" de la DNA polimerasa, IPTG y polinucleótido quinasa de fago T7 fueron obtenidas de United States Biochemicals Co. Acetato de magnesio, ácido bórico, ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2 etanosulfónico (hepes), ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (mes), ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico (mops), ácido tricloroacético (TCA), AMP, cAMP, ADP, ATP, azida de sodio, azul de bromofenol, benzamidina, bromuro de etidio, BSA (seroalbumina de bovino: fracción V), citocromo c, $\text{Co}(\text{NH})_6\text{Cl}_3$, cloramina T, cloruro de aluminio, cloruro de litio, cloruro de potasio, cloruro de rubidio, colagenasa (tipo IA), creatinina fosfoquinasa (de musculo de conejo), SDS, DEPC, DTT, EDTA, EGTA, espermidina, espermina, fluoruro de sodio, formamida, fosfocreatina, fosfoenolpiruvato, D-(+)-glucosa, GDP, GDP- β -S, GMP.P(NH)P, GTP, GTP- γ -S, inhibidor de tripsina (de soya, tipo I-S), imidazol (grado I), (-)-isoproterenol, lisosima, L-metionina, lubrol, β -mercaptoetanol, metabisulfito de sodio, NP-40, ovoalbumina, pironina Y, penicilina sódica, PMSF, polietilenglicol 8000 (formalmente 6000) poli-l-arginina (P.M. 15.000-70.000, sal de HCl), poli-l-lisina (P.M. 11.000, sal de HBr), poli-l-ornitina (P.M. 15.000-30.000, sal de HBr), POPOP [1,4-bis-(5-fenil-2-oxazolil)-benceno y 2,2'-p-fenilen-bis-(5-feniloxazol)], PPO (2,5 difeniloxazol), ribonucleasa pancreática (RNasa A), sacarosa, seroalbumina

de bovino, sulfato de estreptomicina, tripsina, tris-(hidroximetil)-aminometano (tris), urea, y xileno-cianol fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ATP, CTP, GTP, UTP, ditioeritritol, fosfatasa alcalina de intestino de ternera, 3-fosfogliceraldehido deshidrogenasa (de levadura), l- α -fosfoglicerol-deshidrogenasa (de musculo de conejo), fósforiosa-isomerasa (de musculo de conejo), hexoquinasa (de levadura), lactato-deshidrogenasa (de corazon de porcino), mioquinasa (de musculo de conejo), NAD⁺, nucleasa P₁ (de *Penicillium citrum*), 5'-nucleotidasa (de serpiente), piruvato-quinasa (de musculo de conejo), polinucleotido-quinasa (de *E. coli* infectada con fago T₄), piruvato de sodio, 3-fosfoglicerato-quinasa (de levadura) y l- α -fosfoglicerol fueron obtenidos de Boheringer Mannheim. Acrilamida, azul de Coomassie R-250, Dowex AG 50-W-X4 (200-400 mallas, forma cloruro), Dowex 1-X4 (200-400 mallas, forma cloruro), glicina, N,N-metilen-bis-acrilamida y persulfato de amonio, fueron obtenidas de Bio Rad. Agar, bacto extracto de levadura, bacto tripona y casa aminoácidos fueron obtenidos de Difco. Estándares de RNA para electroforesis fueron obtenidos de Gibco BRL Life Technologies, Inc. Forskolina y progesterona fueron adquiridas en Calbiochem Behring Corp. Acetato de potasio, acetato de sodio, ácido acético, alcohol isoamílico, cloruro de amonio, fenol y n-butanol fueron obtenidos de Fluka. Ampicilina, DMSO y Glicerol fueron obtenidos de J.T. Baker Chemical Corp. Agua oxigenada, ácido clorhídrico, ácido fórmico, ácido ortofosfórico, ácido sulfúrico, acetona, alumina neutra, amoníaco, benceno, bicarbonato de sodio, cloroformo, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de sodio, etanol, isobutanol, metanol, molibdato de sodio, nitrato de calcio, papel de nitrocelulosa, placas cromatograficas de polietilén-iminocelulosa, silicato de sodio, sulfato de magnesio, tolueno, tungstato de sodio y trietilamina fueron obtenidos de E. Merck A.G. Darmstadt. Agarosa y agarosa Nusieve fueron obtenidas de Seakem, FMC Bio Products. DEAE-Sephadex A-25 se obtuvo de Pharmacia

Fine Chem. Filtros de millipore (0,45 μm) fueron obtenidos de Millipore Corporation. Filtros de fibra de vidrio GF/A y papel Whatman N° 1, 2 y 3 se obtuvieron de Whatman International Ltd. Las placas para autoradiografía "X-Omat- XAR" de 35 X 43 cm y "XAR" de 5,8 X 10 pulgadas fueron obtenidas de Eastman Kodak Co. Membrana de DEAE fue obtenida de Schleicher & Schuell, Inc. Mezcla de proteínas estándares para geles de poliacrilamida fue obtenida de Amersham International plc. Progesterona fue adquirida en Calbiochem Behring Corp.

[2,8- ^3H]-cAMP, [α - ^{35}S]-dATP y [^{35}S]-metionina fueron obtenidos de New England Nuclear. ^{32}Pi , [γ - ^{32}P]-ATP y ^{125}I fueron obtenidos de Amersham International plc. y de New England Nuclear.

Los plasmidios de expresión pAGA I, pAGA II, pT7-7, la proteína $G_{i-3\alpha}$ purificada, $G_{\beta\gamma}$ purificada de cerebro de bovino y las membranas cíclicas fueron donadas al laboratorio por el Dr. Lutz Birnbaumer. La transducina pura (G_t) fue donada al laboratorio por el Dr. Yee-kin Ho. Los cDNA codificantes para las proteínas $G_{s6A1\alpha}$, $G_{s12B2\alpha}$, $G_{o\alpha}$ y $G_{i-1\alpha}$ habían sido previamente clonados a partir de una genoteca de cDNA de oocitos de *Xenopus laevis* (Olate y cols, 1989; Olate y cols., 1990) y $G_{o\alpha}$ y $G_{i-1\alpha}$ habían sido previamente subclonados en el laboratorio en el plasmidio de expresión pT7-7. Las secuencias de cDNA codificantes para las proteínas $G_{s\alpha}$ de humano en sus dos formas corta y larga, y subclonadas también en el vector de expresión pT7-7 fueron donadas al laboratorio por el Dr. Lutz Birnbaumer. El fragmento de cDNA codificante para los 195 aminoácidos correspondientes a la porción amino terminal de la proteína $G_{i-2\alpha}$ de ratón fue donada al laboratorio por el Dr. Lutz Birnbaumer. El anticuerpo anti- G_q común y el anti-IgG de conejo fue obtenido del laboratorio del Dr. Lutz Birnbaumer. La proteína H-ras fue producida en el laboratorio a partir de *Escherichia coli* y purificada como lo describe Santos y cols. 1988.

Las hembras adultas de *Xenopus laevis* fueron adquiridas en South

African Snake Farm., Cape Province, R.S.A.

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* AG-1, TG-1 y BI21(DE3) fueron obtenidas del laboratorio del Dr. Lutz Birnbaumer.

B. PREPARACION Y PURIFICACION DE NUCLEOTIDOS.

1. Síntesis de [γ - 32 P]-ATP.

Para la síntesis de [γ - 32 P]-ATP se utilizó el método descrito por Walseth y Johnson (1979), que consiste en una serie de reacciones enzimáticas descritas en el esquema 9a.

El procedimiento experimental es el siguiente: la solución ácida de 32 Pi en HCl 0,2N (50 mCi), se lleva a pH 8 con NaOH 2N. Luego se incuba a 30 °C por una hora en un medio que contiene: Tris-HCl 80 mM, pH 9,0; DTT 10mM; α -L-glicerol 0,24 mM; NAD⁺ 1mM; MgCl₂ 20 mM; ADP 0,1 mM; piruvato de sodio 2mM; 0,8 unidades de fosfoglicerol-deshidrogenasa; 0,7 unidades de fosfotriosa-isomerasa; 1,1 unidades de 3-fosfogliceraldehído deshidrogenasa; 0,6 unidades de 3-fosfoglicerato quinasa; y 3,5 unidades de lactato deshidrogenasa. El volumen final de la reacción es de 1 ml. Las enzimas utilizadas están suspendidas en sulfato de amonio, por lo cual se mezclan previamente en la proporción adecuada y se centrifugan a 7.000 x g por 10 min. El residuo se resuspende en Tris-HCl 50 mM, pH 9,0; DTT 1 mM y se adiciona a la mezcla de reacción. La reacción de fosforilación de ADP se detiene por calentamiento a 100 °C por 2 min.

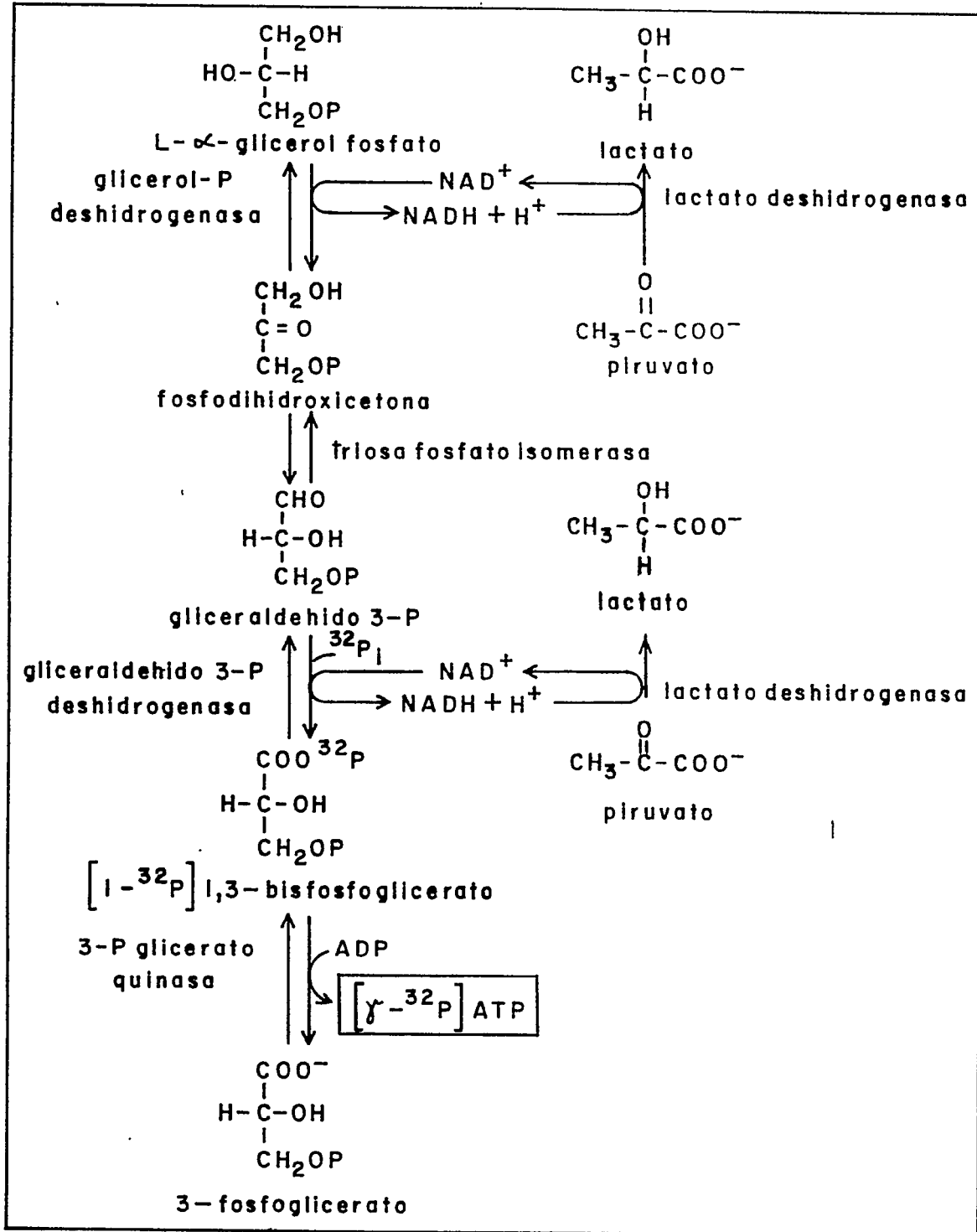
2. Síntesis de [α - 32 P]-ATP.

El [γ - 32 P]-ATP sintetizado se utiliza para la síntesis del [α - 32 P]-ATP de acuerdo a las siguientes etapas y reacciones (esquema 9b):

a) Fosforilación de 3' AMP en posición 5'.

b) Eliminación del grupo fosfato del 3'5' AMP, en la posición 3'.

c) Eliminación del [γ - 32 P]-ATP remanente que no reaccionó en la etapa anterior.

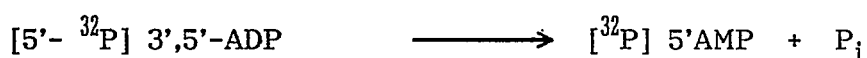


Esquema 9a: Síntesis enzimática de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$.

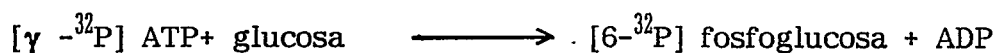
Etapa a) Fosforilación del 3'-AMP en posición 5'.



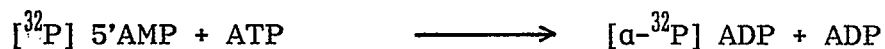
Etapa b) Eliminación del grupo fosfato de la posición 3'.



Etapa c) Eliminación del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ remanente que no reaccionó en la etapa B.



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



Esquema 9b: Síntesis enzimática de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$.

d) Síntesis del $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, por fosforilación del 5' AMP.

El procedimiento experimental es el siguiente: una vez obtenido el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (en algunas ocasiones se realizaba la síntesis del $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ a partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ adquirido comercialmente), se agrega a la mezcla de reacción 40 μl de espermina 0,1 M, 60 μl de 3'-AMP 50 mM, 30 unidades de polinucleótido quinasa, y se incuba la mezcla por 6 horas y media a 30 °C (etapa a). A continuación se agregan 50 μl de una solución amortiguadora de acetato de sodio 1M pH 5.5 (pH final 7) y 50 unidades de nucleasa P1, y se incuba por una hora a 33 °C (etapa b). La reacción se detiene por calentamiento a 100 °C durante dos minutos. Se agregan luego 20 μl de glucosa 60 mM y 2 unidades de hexoquinasa y se incuban a 35 °C por una hora (etapa c). Para la última etapa se agregan 120 unidades de mioquinasa y 15 unidades de piruvato quinasa. Ambas enzimas suspendidas en sulfato de amonio se centrifugan a 1.000 x g durante diez minutos y el residuo se resuspende en una mezcla que contenía 40 μl de KCl 2M, 75 μl de PEP 0,1 M, 2 μl de ATP 40 mM, 75 μl de Tris-HCl 1 M, pH 7,4 y 100 μl de agua destilada, y se incuba a 35 °C por una hora y media (etapa d). La reacción se detiene por calentamiento a 100 °C durante dos minutos. El rendimiento de esta síntesis es de un 70% aproximadamente.

3. Análisis y pureza de los nucleótidos radiactivos.

La determinación de la pureza de los nucleótidos sintetizados, así como la incorporación de la marca radiactiva en los productos de las diferentes etapas de la síntesis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ y $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, se realiza por cromatografía ascendente en placas de polietilen-imino celulosa. El procedimiento experimental es el siguiente: se hace una primera corrida hasta 6 cm. del origen usando como solvente formiato de sodio 2 M, pH 3,5 y luego una segunda corrida hasta 20 cm. del origen usando como solvente formiato de sodio 4 M, pH 3,5. Este método permite obtener una buena separación de los nucleótidos en aproximadamente 2,5 horas. Las distancias

relativas de migración de los patrones (R_f) son de aproximadamente 0,30 a 0,35 para el ATP, 0,5 a 0,6 para el ADP y el 3'5'-ADP, 0,70 para el 3'AMP y 0,75 a 0,80 para el 5'AMP.

La posición de los nucleótidos utilizados como patrones se determina por exposición de la placa cromatográfica a luz ultravioleta de onda corta. La posición y la cuantía de los nucleótidos radiactivos se determina cortando la placa cromatográfica en trozos de 0,5 cm y cuantificando la radiactividad en un contador de centelleo líquido.

4. Purificación de nucleótidos radiactivos.

Los nucleótidos radiactivos sintetizados por el método ya descrito se purifican por cromatografía en una columna de DEAE-sephadex A-25 (16 x 1,7cm) previamente equilibrada con NH_4HCO_3 1M y lavada con agua. Una vez colocada la muestra en la columna, se eluye con un gradiente continuo de bicarbonato de trietilamina, pH 7,5 entre 0 y 1M (volumen total 200 ml). A las fracciones colectadas (aproximadamente 6 ml), se les determina la radiactividad presente, colectándose aquellas fracciones correspondientes al último pico de radiactividad. Este último pico contiene el $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (este eluye a una concentración de bicarbonato de trietilamina entre 0,60 y 0,75 M). La muestra recogida se lleva a sequedad en evaporador rotatorio. El residuo se resuspende en 5 ml de metanol y se lleva nuevamente a sequedad. Este proceso se repite dos veces y finalmente el $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ se resuspende en un volumen apropiado de agua destilada. El producto final contiene alrededor de un 96% de la radiactividad incorporada en el ATP, 2 a 3% en el ADP y un 1% en el AMP.

Un segundo método de purificación de los nucleótidos radiactivos sintetizados consiste en una doble cromatografía de la mezcla de síntesis sobre Dowex 50X-4 y Dowex 1-X4. La mezcla de reacción se carga sobre la columna de Dowex 50X-4 (1,5 x 0,7cm) previamente equilibrada con HCl 2N y lavada con agua. La salida de esta primera columna se coloca sobre

la segunda columna de Dowex X-1 (1,5 x 0,7cm) también previamente equilibrada en HCl 2N y lavada con agua. Una vez cargada la muestra sobre la primera columna se eluye con 3 ml de H₂O. Este eluido se deja pasar sobre la segunda columna, quedando retenido el nucleótido de interés en el Dowex.1-X4. Realizada esta etapa se desconecta la primera columna y se lava la segunda columna con 30 ml de HCl 30 mM. Luego se eluye la muestra con alicuotas de 1 ml de HCl 250 mM sobre tubos de 1,5 ml que contiene 150 µl de Trizma base 2M. Se recogen aproximadamente 6 fracciones, encontrándose la mayor parte del [α-³²P]-ATP en el segundo y tercer tubo. Se juntan las fracciones que contienen la mayor parte de la marca radiactiva y se guardan a -20°C. El producto final contiene más del 95% de la marca incorporada en el ATP.

5. Síntesis y purificación de [γ-³²P]-GTP.

El [γ-³²P]-GTP se sintetiza por el mismo procedimiento descrito anteriormente para la síntesis del [γ-³²P]-ATP (etapa A) pero en este caso se utiliza GDP en vez de ADP como sustrato de la reacción. La purificación del nucleótido se realiza por el método de las dos columnas de Dowex, descrito para el [α-³²P]-ATP.

6. Iodinación del anticuerpo anti IgG de conejo.

Para la reacción de iodinación se utilizó el método descrito por McConahey y Dixon (1980). La reacción de iodinación del anticuerpo anti IgG de conejo se hace en un medio de reacción que contiene: amortiguador fosfato de potasio 0,57 M pH 7,0; 6 mg de anti IgG de conejo; 2 mCi de ¹²⁵I y cloramina T 1 mg/ml. La incubación se realiza durante 1 minuto a temperatura ambiente. La reacción se inicia con la adición de la cloramina T. Finalmente la reacción es detenida con la adición de una solución de metasulfito de sodio 16,7 mg/ml para llegar a una concentración final de 5 mg/ml. Con la finalidad de purificar el anticuerpo iodinado del ¹²⁵I libre no reaccionante, se carga la mezcla de reacción sobre una columna de

Sephadex G-25 (5 cm x 1,52 cm) previamente equilibrada en una solución que contiene Tris-HCl 50 mM pH 8,5; NaCl 150 mM y ovoalbumina al 0,1%. La columna es eluída en etapas con la misma solución de lavado, colectándose de 15 a 16 fracciones de 400 µl. Finalmente se cuentan alícuotas de 10 µl de cada tubo en un contador gamma y se colectan los tubos con mayor radioactividad. Generalmente el pico de radioactividad correspondiente al anticuerpo anti IgG de conejo se encuentra entre los tubos 6 y 9. El anticurpo iodinado es guardado a -20 °C hasta su uso.

C. PREPARACION DE MEMBRANAS PLASMATICAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis* CON ACTIVIDAD ADENILILCICLASA.

1. Obtención de ovario de *Xenopus laevis*.

Las hembras adultas son anestesiadas por hipotermia a 4°C, el ovario se extrae quirúrgicamente y se corta en pequeños trozos. Estos se lavan con una solución salina de Barth para anfibios y se mantienen en esta solución a 4°C. La composición de esta solución es: Tris-HCl 10mM pH 7,6; MgSO₄ 0,82 mM; CaCl₂ 0,74 mM; KCl 1,0 mM; Ca(NO₃)₂ 0,33 mM; NaCl 88mM; NaHCO₃ 2,4 mM; penicilina 0,1 mM y sulfato de estreptomina 0,1 mM.

2. Obtención de oocitos libres de células foliculares.

Este tratamiento disocia al tejido del ovario, dejando oocitos libres y una suspensión de células foliculares. Estas últimas se eliminan aprovechando el hecho de que sedimentan más lento que los oocitos. Los oocitos disociados se lavan exhaustivamente con solución de Barth para eliminar la colagenasa y se tratan nuevamente con la misma solución para desprender el resto de las células foliculares.

Los oocitos de mayor tamaño, correspondientes a los estados V y VI descritos por Dumont, 1972, se separan de los más pequeños filtrando a través de una malla de nylon de 700 µm (Burzio y Koide, 1977), en la cual los primeros son retenidos y los últimos no.

3. Fraccionamiento celular.

Todas las manipulaciones se realizan a 4°C. Los oocitos se homogenizan en un volumen de una solución que contiene: Hepes 50 mM pH 8,0; EDTA 1 mM; DTT 1 mM y sacarosa 0,88 M (solución A). La homogeneización se lleva a cabo en un homogeneizador Dounce, con 10 pasadas del vastago A y 10 pasadas del vastago B. El homogeneizado se centrifuga por 15 minutos a 1.000 x g. El sobrenadante se filtra a través de lana de vidrio y el filtrado se centrifuga por 20 minutos a 20.000 x g. El sobrenadante se filtra nuevamente a través de lana de vidrio y el filtrado se centrifuga por 2 horas a 100.000 x g. En esta última centrifugación se obtienen tres fracciones: un sedimento bien adherido al fondo del tubo, una fracción de aspecto algodonoso por encima del sedimento y un sobrenadante transparente. La fracción algodonosa se diluye a 0,22 M sacarosa con una solución que contiene: Hepes 50 mM pH 8,0; EDTA 1 mM y DTT 1 mM (solución B) y se centrifuga nuevamente por dos horas a 100.000 x g. Bajo estas nuevas condiciones se obtiene un sedimento adherido al fondo del tubo y un sobrenadante. Finalmente el sedimento se resuspende en la solución C que contiene: Hepes 50 mM pH 8,0; DTT 1 mM; EDTA 1 mM y sacarosa 0,22 M a una concentración de proteína entre 15 y 20 mg/ml y se guarda en volúmenes de 300 a 400 µl a -80 °C hasta su uso.

D. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ADENILILCICLASA.

La actividad adenililciclase se ensaya generalmente en triplicado por el procedimiento descrito por Rodbell (1967). La actividad se mide en una mezcla de reacción con un volumen final de 100 ó 50 µl que contiene: Hepes 50 mM pH 8,0; cAMP 1 mM; DTT 1 mM; fosfocreatina 4 mM; 6,6 unidades de creatina fosfoquinasa, EDTA 0,45 mM; MgCl₂ 5 mM; glicerol al 5% (v/v) y

[α - 32 P]-ATP 0,10-0,12 mM (300-1.200 cpm/pmol). GTP, GDP, GTP- γ -S, GMP.P(NH)P, forskolina, isoproterenol, NaF, poli-l-arginina, poli-l-ornitina, poli-l-lisina, espermina y progesterona se agregan a las concentraciones indicadas en *Resultados*. Cuando se usa progesterona y forskolina se preparan en una solución de etanol y todas las incubaciones controles contienen la misma cantidad de etanol. La actividad medida en presencia de Mg^{2+} y en ausencia de efectores que activen a la adenililciclase directamente o a través de G_s es denominada actividad basal.

La reacción se inicia generalmente con la adición de la fracción que contiene la actividad adenililciclase. En el caso de las membranas de oocitos de *Xenopus laevis* se utilizan de 50 a 300 μ g de proteína contenida en esta fracción. En el caso de los experimentos de reconstitución de la actividad adenililciclase de las membranas cyc- se utilizan 10 μ g de proteína contenida en esta fracción y de 5 a 10 μ l de extracto de lisado de reticulocitos o de bacterias que expresan las proteínas G_q . Las incubaciones se realizan a 32 °C. La reacción se detiene con la adición de 0,1 ml de una solución que contiene ATP 20 mM y [3 H]-cAMP 6,25 mM (20.000 cpm/ μ mol) pH 7,0 y SDS al 1%.

El [32 P]-cAMP formado, se purifica siguiendo el procedimiento de cromatografía secuencial en columnas de Dowex 50 y alumina neutra descrito por Salomon y cols., (1974). Las muestras, después de agregarles 1 ml de agua destilada, se colocan en columnas de Dowex 50-X4 (4 x 0,5 cm) previamente lavadas con HCl 2N y agua destilada. Las columnas se lavan en dos etapas, primero con 1 ml y luego con 4 ml de agua destilada, descartándose los eluidos. Posteriormente se pasan 6 ml de agua destilada, recogiendo los eluidos directamente sobre columnas de alúmina neutra (3 x 0,5cm) previamente equilibradas con una solución de imidazol-HCl 0,1 M pH 7,5. Una vez pasados los 6 ml por la alúmina, las columnas se lavan con 1,5 ml de la solución anterior y luego el cAMP se eluye con 4 ml de la

misma solución. Los eluidos de 4 ml se recogen en frascos de centelleo líquido y la radiactividad de ^{32}P y ^3H se determina en 12 ml de líquido de centelleo cuya composición es la siguiente: 4 g de PPO; 80 mg de POPOP; 1 litro de tolueno; 0,5 litros de Tritón X-100 y cantidades variables de metanol para que según la temperatura ambiente la mezcla resulte homogénea. El [^3H]-cAMP incluido como patrón interno permite calcular la recuperación de cAMP después del procedimiento a través de las columnas. Estas recuperaciones oscilan entre un 70 y 80%.

El cálculo de los pmoles de cAMP formados se hace en base a los datos de actividad específica del [α - ^{32}P]-ATP utilizado como sustrato, a las cpm de [^{32}P]-cAMP y a la recuperación de [^3H]-cAMP en cada una de las muestras. Los resultados de actividad adenililciclase obtenidos en membranas de oocitos de *Xenopus laevis* se expresan como el cociente entre los picomoles de cAMP producidos en el tiempo de duración del ensayo y la cantidad de proteína presente en la fracción de membrana expresada en miligramos de proteína. En la leyenda de cada figura se señala el tiempo de duración del ensayo. Las incubaciones se realizan entre 20 y 40 minutos. En este intervalo de tiempo la reacción es lineal. Los resultados de los experimentos de reconstitución de la actividad adenililciclase en membranas cyc- se expresan como cantidad de picomoles de cAMP producidos en 40 minutos por cada 10 μg de proteína de membrana cyc-.

Los resultados de las determinaciones de la actividad de adenililciclase se expresan en general como promedio de triplicados con su desviación estándar. En general existe bastante variabilidad entre los valores de actividad de adenililciclase de una preparación de membranas de oocitos a otra. Por este motivo nosotros usamos como criterio comparativo entre una preparación de membranas y otra, la relación entre la actividad de la adenililciclase estimulada por análogos no hidrolizables de GTP y la

actividad basal. Este valor oscila de una preparación a otra, entre cinco y diez veces.

E. CALCULO DE PARAMETROS CINETICOS EN LA ACTIVACION DE LA ADENILILCICLASA.

La evaluación de los parámetros cinéticos, se realiza de acuerdo al método descrito por Neet y Ainslie (1980), utilizando el método gráfico. El esquema 10 muestra como se obtienen estos valores a partir de una curva de progreso para una enzima que presenta un periodo de latencia (fenómeno de histeresis).

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

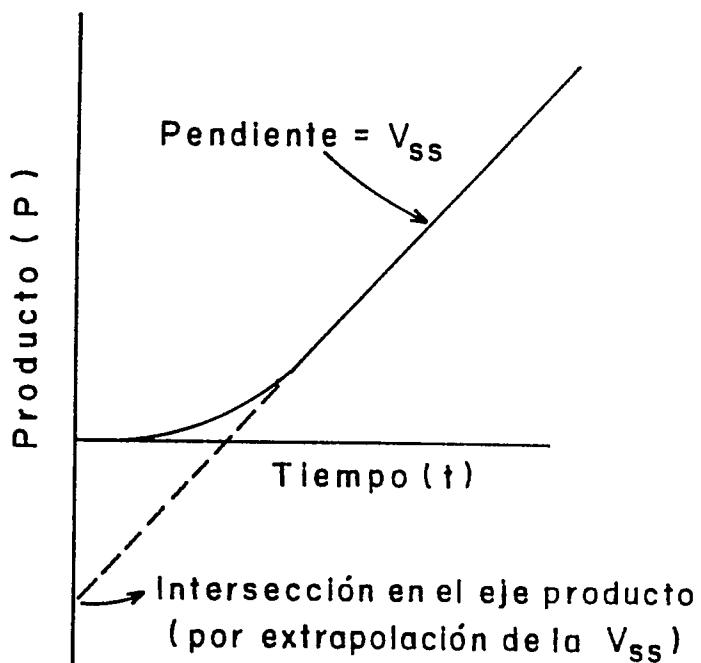
$$\tau_{ap} = \frac{V_{ss}}{\text{intercepto en el eje producto}}$$

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

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

F. CALCULO DE LA CONCENTRACION DE GTP- γ -S NECESARIO PARA OBTENER LA MITAD DEL EFECTO MAXIMO EN LA ACTIVACION DE LA ADENILILCICLASA POR ESTE AGONISTA.

El cálculo de la concentración de GTP- γ -S necesario para obtener la mitad del efecto máximo en la activación de la adenililciclase ($K_{0,5}$) se realiza a partir de los datos obtenidos de los experimentos de activación por el nucleótido de la actividad de la adenililciclase de oocitos de *Xenopus laevis* (ver sección *Resultados*). Los valores de actividad de la enzima obtenidos



Esquema 10: Curva de progreso de una enzima histerética que presenta una fase de retardo o período de latencia.

V_{ss} : velocidad en régimen estacionario.

a diferentes concentraciones de GTP- γ -S se ajustan a la ecuación de los dobles recíprocos como se describe en Segal (1975). La ecuación es la siguiente:

$$1/A = K_{0,5}/A_{(max)}[GTP-\gamma-S] + 1/A_{(max)}$$

donde $1/A$ representa el recíproco de la cantidad de producto producido en el tiempo de ensayo de la adenililciclase, $1/[GTP-\gamma-S]$ representa el valor del recíproco de la concentración de GTP- γ -S y $A_{(max)}$ representa la cantidad de producto producido a concentraciones saturantes de GTP- γ -S. Los valores de $K_{0,5}$ y A_{max} se obtienen a partir del ajuste de los datos experimentales a esta ecuación mediante el uso del programa de computación Enzfit.

G. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE Mg^{2+} LIBRE EN EL MEDIO DE ENSAYO DE LA ADENILILCICLASA.

La concentración de Mg^{2+} libre y de $MgATP^{2-}$ en el medio de ensayo de la actividad adenililciclase se calcula a partir de la concentración de Mg^{2+} total en el medio de incubación mediante el programa de computación Complex, basado en un método iterativo diseñado por Storer y Cornish-Bowden (1976). Para ajustar la concentración de metal libre en cada punto del experimento, se utiliza EDTA en la cantidad requerida por el cálculo teórico. Los valores de las constantes de equilibrio consideradas en el cálculo, fueron obtenidas de Martell y Smith (1974).

H. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GTPásica DE PROTEINAS G.

El ensayo utilizado en esta *Tesis* se basa en la cuantificación del fosfato inorgánico producido mediante la formación de un complejo de ácido fosfomolibdico, el que es fácilmente extraído del medio acuoso por una mezcla de solventes orgánicos. Este método fue originalmente descrito por Martin y Doty (1949) y usado también con algunas modificaciones por

Conway y Lipmann (1964) para medir la actividad GTPásica de algunos factores de la síntesis de proteínas. La actividad se mide a 32°C, en una mezcla de reacción con un volumen final de 0,1 ml y que contiene: Tris-HCl 15 mM, pH 8,0; MgCl₂ 5 mM; β-mercaptoetanol 20 mM; EDTA 1,1 mM; BSA 50 µg/ml y [γ -³²P]-GTP 1 µM. Poli-l-lisina, poli-l-arginina, poli-l-ornitina, G_{i-3a}, G_t y H-ras fueron agregados a las concentraciones indicadas en *Resultados*. La reacción es detenida por la adición de 200 µl de una solución de ácido silicotúngstico que había sido previamente preparada como sigue: se disuelven 5,7 gr. de silicato de sodio no hidratado y 79,4 gr. de tungstato de sodio dihidratado en alrededor de 500 ml de agua. Se agregan entonces 15 ml de ácido sulfúrico concentrado y se calienta a reflujo por 5 horas, luego de lo cual el sólido remanente es eliminado por filtración. Finalmente la solución es llevada a un volumen final de 1 litro con agua destilada.

Una vez detenida la reacción se procede a cuantificar el fosfato liberado al medio, para lo cual se agregan 100 µl de una solución de KH₂PO₄ como "transportador", seguido por 200 µl de una solución de molibdato de amonio al 5% en ácido sulfúrico 4 N. El fosfomolibdato de amonio formado es extraído con 600 µl de una mezcla de benceno y alcohol isobutílico 1:1, para lo cual el tubo contenedor es agitado por 15 segundos en un vortex y posteriormente centrifugado por 1 minuto a 12.000 x g para separar la fase orgánica superior de la acuosa inferior. Finalmente se analiza una alícuota de 300 µl de la fase orgánica en contador de centelleo líquido para estimar la cantidad de fosfato inorgánico radiactivo liberado al medio por la actividad GTPásica de las proteínas en estudio. En todos los ensayos realizados se determina también la cantidad de fosfato inorgánico presente en el medio de incubación que no proviene de la hidrólisis enzimática de GTP. Para ello, se hace para cada uno de los puntos de un experimento, un blanco sin enzima. Las cpm de fosfato inorgánico determinadas de esta manera se restan a las cpm totales de fosfato inorgánico obtenidas de los

tubos a los cuales sí se les ha agregado la enzima. A partir de las cpm de fosfato inorgánico netas y de la actividad específica del GTP agregado a cada ensayo se determina la cantidad de fosfato inorgánico producido atribuible a la actividad GTPásica. Los resultados de las determinaciones de la actividad GTPásica se expresan como picomoles de fosfato inorgánico (P_i) producidos en el tiempo de duración del ensayo por μg de proteína G_0 utilizada. En la leyenda de cada figura se señala el tiempo de duración del ensayo. En el caso de G_{i-30} y transducina, la actividad GTPásica es lineal dentro de los primeros 6 minutos. En el caso de H-ras la actividad GTPásica es todavía lineal en el tiempo a los 40 minutos. Algunos ensayos de actividad GTPásica de G_{i-30} y transducina, mostrados en *Resultados*, se realizan a un intervalo de tiempo donde la reacción no es lineal. En estos casos, se escoge como tiempo de incubación los 20 minutos.

I. CALCULO DE LOS PARAMETROS CINETICOS (K_m Y V_{max}) DE LA ACTIVIDAD GTPásica DE G_{i-30} .

Los cálculos de los parámetros cinéticos constante de Michaelis-Menten (K_m) y de la velocidad máxima (V_{max}) de la actividad GTPásica de G_{i-30} para el sustrato GTP, se realizan mediante el análisis cinético de Eadie-Hofstee como se describe en Segal (1975). Para esto se utilizan los resultados obtenidos en el experimento de activación por el nucleótido de la actividad GTPásica de G_{i-30} (ver sección *Resultados*). Los valores de actividad de la enzima obtenidos a diferentes concentraciones de GTP son ajustados a la siguiente ecuación lineal:

$$V = - K_m V/[GTP] + V_{max}$$

donde V representa la actividad GTPásica de G_{i-30} (expresada en pmoles de $^{32}P_i$ producido/ μg de proteína/minuto) y $V/[GTP]$ representa el valor del cociente entre la actividad GTPásica de G_{i-30} y la concentración de GTP. Los valores de K_m y V_{max} son obtenidos a partir del ajuste de

los datos experimentales a esta ecuación mediante el uso del programa de computación Enzfit.

J. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE Mg^{2+} LIBRE EN EL MEDIO DE ENSAYO DE LA ACTIVIDAD GTPásica DE G_{i-3a}

La concentración de Mg^{2+} libre en el medio de ensayo de la actividad GTPasa se calcula a partir de la concentración de Mg^{2+} total en el medio de incubación, mediante el programa de computación Complex, basado en un método iterativo diseñado por Storer y Cornish-Bowden (1976). Para ajustar la concentración del metal libre en cada punto del experimento, se utiliza EDTA en la cantidad requerida por el cálculo teórico. Los valores de las constantes de equilibrio consideradas en el cálculo, fueron obtenidas de Martell y Smith (1974).

K. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

El análisis electroforético de las proteínas G_{sq} sintetizadas en bacterias o en lisado de reticulocitos se realiza en geles de poliacrilamida al 10-12% de acuerdo al método de Laemmli (1970). Para ello las muestras son tratadas con el amortiguador que contiene: Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; SDS al 1%, glicerol al 10%; β -mercapto-etanol al 5% y pironina Y al 0,02% como colorante. La electroforesis se realiza a temperatura ambiente a un voltaje constante de 100-150 V (aproximadamente 30 mA de corriente inicial). Para el cálculo de los pesos moleculares de las proteínas se usan como patrones las siguientes proteínas: fosforilasa (P.M.= 94.000), BSA (P.M.= 67.000), ovoalbumina (P.M.=43.000), anhidrasa carbónica (P.M.= 30.000) y el inhibidor de tripsina (P.M.= 20.000).

Una vez terminada la electroforesis los geles son teñidos en una solución que contiene ácido acético, metanol y agua destilada en una proporción de 1:5:5 y azul de Coomasie al 0,1% durante 1 a 2 horas. Los

geles son desteñidos en una solución de ácido acético al 10%, secados y en algunos casos sometidos a autorradiografía durante 1-7 días, utilizando para ello película autorradiográfica Kodak X-OMAT.

L. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS EN GELES DE AGAROSA.

Los fragmentos de DNA y de RNA sintetizados *in vitro* son analizados en geles de agarosa al 1%, mediante la técnica descrita por Sambrook y cols. (1989). La agarosa se disuelve en amortiguador TBE que contiene Tris-base 89 mM; ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM pH 8,0, por calentamiento a 100°C. Luego se agrega bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml y se deja gelificar a temperatura ambiente. Previo a la corrida, las muestras de ácidos nucleicos son tratadas con una solución de carga que contiene: azul de bromofenol al 0,25%; xileno cianol al 0,25% y sacarosa al 40%. La electroforesis se realiza a un voltaje constante de 100 V. Como patrón de tamaño para DNA se usa DNA de fago λ digerido con la enzima de restricción Hind III ó con Bsa b1. Para el análisis electroforético en geles de agarosa del RNA transcrito *in vitro*, se procede de la misma manera que la señalada para el DNA, pero todas las soluciones, el material de plástico y de vidrio utilizado son previamente tratados para inactivar las ribonucleasas presentes del modo que describe Sambrook y cols. (1989). Tanto el DNA como el RNA son visualizados, colocando el gel contra una fuente de luz ultravioleta de onda corta.

M. REACCION DE SECUENCIACION DE DNA DE DOBLE HEBRA.

Para la reacción de secuenciación de DNA se utiliza el método descrito por Sanger y Coulson (1975). Este método permite secuenciar DNA de simple o doble hebra. El DNA plasmidial debe ser preparado por el método del polietilenglicol (descrito en esta sección) o por el método de centrifugación

en gradiente de cloruro de cesio (Sambrook y cols., 1989). En la reacción de secuenciación se usa el kit comercial Sequenase 2.0 (United States Biochemicals Co.). Este kit utiliza la DNA polimerasa del fago T7 modificada genéticamente para eliminar su actividad exonucleasa 3'-5' (Tabor y Richardson, 1989). El método es el siguiente: se desnaturalizan de 2 a 5 µg de DNA plasmidial en 30 µl de un medio que contiene NaOH 0,2 N, durante 5 minutos a temperatura ambiente. El DNA se neutraliza por la adición de 3 µl de acetato de amonio 2 M y se precipita durante 2 horas a -20°C o 30 minutos a -80°C con la adición de 70 µl de etanol al 100%. El DNA se sedimenta por centrifugación a 10.000 x g por 15 minutos a 40°C y se lava con etanol al 70%. El sedimento de DNA se seca a temperatura ambiente y se resuspende en 10 µl de un medio que contiene Tris-HCl 40 mM pH 7,5; MgCl₂ 20 mM; NaCl 25 mM y 3 pmoles del oligonucleótido usado como partidador en la reacción de secuencia. Se incuba esta mezcla por 30 minutos a 37°C, para que el oligonucleótido hibride con el DNA a ser secuenciado. La reacción de secuenciación propiamente tal se inicia con la etapa de extensión de la hebras de DNA. Para ello, se incuban los 10 µl de la etapa anterior durante 5 minutos a temperatura ambiente, en un volumen final de 15,5 µl y en un medio que contiene dGTP, dCTP y dTTP a una concentración final de 0,2 µM; DTT 10 mM; [α -³⁵S]-dATP 0,3 µM (1000 Ci/mmol) y 3 unidades de Sequenase 2.0. La siguiente etapa de la reacción es la de terminación de la reacción de extensión de las cadenas de DNA marcadas con [α -³⁵S]-dATP. Para ello se toma del medio de reacción alícuotas de 3,5 µl y se agrega sobre 4 tubos con 2,5 µl de una solución que contiene NaCl 50 mM; dGTP 80µM; dTTP 80 µM; dCTP 80µM y dATP 80µM. Además cada uno de los tubos contiene uno de los cuatro nucleótidos terminadores de la reacción: ddATP; ddGTP; ddCTP y ddTTP a una concentración de final de 8 µM. La incubación de cada uno de los tubos se realiza durante 5 minutos a 37°C. La reacción se detiene agregando a cada

tubo 4 μ l de una solución que contiene formamida al 95%; EDTA 20 mM; azul de bromofenol al 0,05% y xileno cianol al 0,05%. Las muestras son almacenadas a -20°C , para someterlas luego a electroforesis en geles de poliacrilamida.

N. ELECTROFORESIS PARA REACCIONES DE SECUENCIACION EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Las muestras que contienen las reacciones de secuenciación son sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida de 40 X 20 X 0.04 cm. En la electroforesis se utiliza un gel separador preparado de la siguiente manera: se filtran 60 ml de una solución que contiene Tris-borato 89 mM; EDTA 2 mM; acrilamida 6% (razón acrilamida: bis acrilamida 19:1) y urea al 48% (p/v). La reacción de gelificación de la acrilamida se inicia por la adición de 30 μ l de TEMED al 100% y 60 μ l de persulfato de amonio al 25%. El gel se deja polimerizar a temperatura ambiente durante 1 hora. Las muestras se aplican en el gel, previo calentamiento por 3 minutos a $70-80^{\circ}\text{C}$. La electroforesis se realiza a temperatura ambiente a un voltaje constante de 1600-1800 V.

Una vez terminada la electroforesis los geles son secados y sometidos a autorradiografía durante 1-3 días a temperatura ambiente, utilizando película autorradiográfica Kodak X-OMAT.

O. EXPRESION DE LOS GENES CODIFICANTES PARA LAS PROTEINAS G_q .

Durante el desarrollo de esta *Tesis* los genes codificantes para las proteínas G_q fueron expresados en bacterias y en lisado de reticulocitos. Para poder realizar ésto fue necesario subclonar previamente estas secuencias de cDNA en vectores de expresión adecuados. Este trabajo involucró el uso de técnicas estándares para la manipulación de DNA.

1. Subclonamiento de fragmentos de cDNA en vectores de expresión.

1.1. Cepas y medios de cultivo utilizados.

Los vectores de expresión son amplificados mediante el uso de las cepas de *Escherichia Coli* AG-1, TG-1 y BI21(DE3). Para el crecimiento de las bacterias se utiliza medio Luria-Bertani (LB) que contiene bacto-triptona 10 g/lt; bacto extracto de levadura 5 g/lt y NaCl 10 g/lt. Los vectores de expresión utilizados en esta *Tesis* contienen marcadores de resistencia a ampicilina por lo que la selección de las bacterias transformadas con los respectivos plasmidios se hacen sobre placas de medio sólido LB que contiene además agar al 1% y ampicilina 50-100 µg/ml.

1.2. Digestión con enzimas de restricción.

Las digestiones por enzimas de restricción, de fragmentos de DNA se realizan de acuerdo a la metodología descrita por Sambrook y cols. (1989). Los fragmentos de DNA son digeridos en las condiciones descritas para cada enzima de restricción en particular. El análisis de la reacción se realiza mediante electroforesis en geles de agarosa.

1.3. Extracción de proteínas de soluciones de ácidos nucleícos.

Para extraer las proteínas de soluciones con DNA o RNA se utiliza la extracción secuencial con fenol y fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1) como se describe en Sambrook y cols. (1989).

1.4. Purificación de fragmentos de DNA por membrana de DEAE.

Este método se utiliza para la purificación de fragmentos de DNA de un tamaño de hasta 7 kb (Sambrook y cols., 1989). La muestra de DNA se aplica sobre un gel preparativo de agarosa al 1% y se somete a electroforesis a un voltaje constante de 100 V. El DNA se electroeluye del gel de agarosa colocando un trozo de membrana de DEAE (2 X 0,5 cm) en una incisión realizada frente a la banda de DNA a purificar. Se continúa la electroforesis por 15 minutos al mismo voltaje. La membrana de DEAE se lava en agua destilada y posteriormente se corta en trocitos pequeños y

se coloca sobre 0,3 ml de una solución que contiene Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 1M y EDTA 0,1 mM. Se incuba la membraba durante 60 minutos a 65°C. Luego de esta incubación se traspasa la solución a otro tubo y se realiza una extracción con un volumen n-butanol previamente saturado en agua, con el fin de eliminar el bromuro de etidio. Luego el DNA se precipita en presencia de etanol al 70% durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente se colecta el DNA por centrifugación y se lava con etanol al 70%. Finalmente el DNA se resuspende en un volumen adecuado de agua (generalmente de 10 a 20 µl).

1.5. Ligación de fragmentos de cDNA a plasmidios.

Los fragmentos de cDNA previamente cortados con las enzimas de restricción adecuadas y purificados por el método de la membrana de DEAE son ligados al plasmidio de interés (también previamente digerido y purificado), como lo describe Sambrook y cols. (1989). El DNA plasmidial previo a la ligación, es desfosforilado en su extremo 5'. Para ello se incuban 5 µg de DNA plasmidial en un volumen de 20 µl que contiene ZnCl₂ 1mM; MgCl₂; amortiguador Tris-HCl pH 8,0 y 1 unidad de fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIP), durante 30-60 minutos a 37°C. La reacción es detenida por la adición de 2 µl de EGTA 0,5 M pH 8,0 y posterior incubación de la mezcla de reacción a 60°C durante 30 minutos. Se agregan 80 µl de agua destilada y las proteínas son extraídas con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1) y un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). El DNA se colecta por precipitación etanólica y se resuspende en un volumen adecuado de agua.

En la reacción de ligación se incuban de 50 a 100 ng del fragmento de cDNA con 10 a 20 ng de DNA plasmidial durante 16 horas a 16°C, en un volumen final de 20 µl y en un medio que contiene Tris-HCl pH 7,6 50 mM; MgCl₂ 5 mM; ATP 1 mM; DTT 1 mM; polietilenglicol 8000 al 5% (p/v)

y 1 unidad de DNA ligasa de fago T4. Luego de esta incubación las mezclas de ligación son utilizadas para transformar bacterias.

1.6. Transformación de *Escherichia coli* con DNA plasmidial.

1.6.1. Preparación de bacterias "competentes de transformación".

Las cepas de *Escherichia coli* AG-1, TG-1 y BL21(DE3) son transformadas con DNA plasmidial por el método de alta eficiencia de transformación de Hanahan y Meselson (1983). Para ello se inoculan 3 ml de medio de cultivo LB con la cepa bacteriana a transformar y se incuba durante toda la noche con fuerte agitación a 37°C. Al día siguiente se transfieren 0,5 ml de este cultivo a 100 ml de medio LB y se crecen durante aproximadamente dos horas con vigorosa agitación hasta alcanzar una D.O. de 0,45 - 0,55 a 550 nm.. Se toma entonces una alícuota de 12,5 ml y se incuba por 10 minutos en hielo a 4°C. Las células son sedimentadas por centrifugación a 750 x g por 15 minutos a 4°C y el sobrenadante descartado. Las bacterias son resuspendidas en 1/3 del volumen original, con la solución de transformación (TFB) que contiene K-MES 10 mM pH 6,3; RbCl₂ 100 mM; MnCl₂·4H₂O 45 mM; CaCl₂·2H₂O 10 mM y CoCl₃(NH)₆ 3 mM, e incubadas durante 15 minutos en hielo a 4°C. Las células son sedimentadas por centrifugación a 750 x g por 12 minutos a 4°C y el sobrenadante descartado. Las bacterias son resuspendidas en 1/12,5 del volumen original, con solución de transformación TFB. Luego se agrega una solución de DMSO y DTT a una concentración final de 3,5% (v/v), que contiene DTT 1M y DMSO al 90% (v/v), y se incuba 10 minutos en hielo. Se agrega nuevamente el mismo volumen de la solución de DMSO y DTT y se incuba por 20 minutos mas en hielo.

1.6.2. Transformación.

En la transformación se agregan 10 µl de una mezcla de ligación o 10 ng de DNA plasmidial a 200 µl de bacterias competentes. La mezcla se incuba durante 1 hora a 4°C en hielo y posteriormente 90 segundos a 42°C,

devolviendo las bacterias inmediatamente al hielo, dejandolas reposar por 5 minutos. A cada tubo se le agregan 800 μ l de medio LB, y se incuba con agitación fuerte por 1 hora a 37°C. Las bacterias se sedimentan por centrifugación a 1000 x g por tres minutos y se resuspenden en 100 μ l de medio LB. Finalmente se usan de 50 a 100 μ l de esta suspensión de bacterias para sembrar placas de cultivo que contienen medio sólido LB con agar al 1% y ampicilina 50 μ g/ml. Las placas son incubadas toda la noche en estufa a 37°C.

1.7. Análisis de las colonias bacterianas transformadas.

Este método es descrito en Sambrook y cols., (1979). Se pican las colonias bacterianas transformantes y se crecen en 3 ml de medio de cultivo LB con ampicilina 100 μ g/ml, durante toda la noche a 37°C con agitación vigorosa. Entonces se traspasan 1,5 ml de este cultivo a tubos de microfuga y el resto se guarda a 4°C. Se colectan las bacterias por centrifugación a 12.000 x g por 2 minutos, se resuspenden en 100 μ l de solución de lisis que contiene glucosa 50 mM; tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM, y se incuban 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregan 200 μ l de una solución que contiene NaOH 0,2 N y SDS 1% y se incuban 5 minutos en hielo. Se agregan 150 μ l de una solución de acetato de potasio 5 M y ácido acético 3 M y se incuban 5 minutos en hielo. Se centrifuga centrifugado a 12.000 x g por 5 minutos y se colecta el sobrenadante. Las proteínas son extraídas con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1) y el DNA se recupera por precipitación etanólica. Se resuspende el DNA plasmidial en 50 μ l de una solución que contiene Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM (TE) y ribonucleasa pancreática 20 μ g/ml. Finalmente se analiza la presencia del inserto de DNA en el vector de expresión, por digestión con enzimas de restricción y posterior electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las bacterias que contienen los plasmidios recombinantes son guardadas a -20°C

en medio de cultivo LB con glicerol al 50% y ampicilina 50-100 µg/ml. Las bacterias guardadas de esta manera son viables durante meses.

1.8. Preparación de DNA plasmidial en gran escala.

Para preparar DNA plasmidial en gran escala, se utiliza el método del polietilenglicol descrito por Sambrook y cols. (1989). Este método permite obtener de 0,5 a 1 mg de DNA plasmidial puro a partir de 1 litro de cultivo. Se inocula 1 lt de medio LB con ampicilina 100 µg/ml, con 1 ml de un cultivo fresco de bacterias que portan el plasmidio. Se crecen las bacterias con agitación vigorosa a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se colectan las bacterias por centrifugación a 2500 x g por 20 minutos y se resuspenden en 10 ml de una solución que contiene glucosa 50 mM; tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM. La suspensión se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregan 20 ml de una solución que contiene NaOH 0,2 N y SDS 1% y se incuba 5 minutos en hielo. Luego se adicionan 15 ml de una solución que contiene acetato de potasio 5 M y ácido acético 3 M y se incuba 5 minutos en hielo. El precipitado se centrifuga a 20.000 x g por 30 minutos y se colecta el sobrenadante. Se agrega al sobrenadante 0,6 volúmenes de alcohol isopropílico y se deja precipitar por 15 minutos a temperatura ambiente. El precipitado formado se sedimenta por centrifugación a 20.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y el precipitado se lava con etanol al 70% y posteriormente se seca al vacío. Se resuspende el precipitado en 3 ml de amortiguador TE. Se agregan 3 ml de LiCl 5M y se deja precipitar por 10 minutos a temperatura ambiente. Esta etapa tiene como función eliminar el RNA de alto peso molecular. Se centrifuga a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C y se recupera el sobrenadante. Se agrega un volumen de alcohol isopropílico y se deja precipitar por 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado formado se colecta por centrifugación a 12.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente y se lava con etanol al 70%. El

DNA se seca y se resuspende en 500 μ l de amortiguador T.E. conteniendo ribonucleasa A a una concentración de 20 μ g/ml. Se incuba por 30 minutos a 37°C y se agregan 500 μ l de una solución que contiene NaCl 1,6 M y polietilenglicol 8.000 al 13% (p/v), con lo cual el DNA plasmidial es selectivamente precipitado. Se deja precipitar por una hora. Se colecta el DNA por centrifugación a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C y se resuspende en 400 μ l de amortiguador TE. Las proteínas son secuencialmente extraídas con un volumen de fenol, un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1) y finalmente cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). El DNA plasmidial se reprecipita con 100 μ l de acetato de amonio y 1 ml de etanol al 100% por dos horas a -20°C. El DNA se lava con etanol al 70%, y finalmente se resuspende en amortiguador TE. La concentración de DNA se mide por densidad óptica a 260 nm.

2. Expresión de las proteínas G₅₀ de oocitos de *Xenopus laevis* en bacterias.

2.1. Subclonamiento de los genes que codifican para las proteínas G₅₀ de oocitos de *Xenopus laevis* en el vector de expresión pT7-7.

La cepa bacteriana de *Escherichia coli* BL21(DE3) posee integrado en su cromosoma un fago lisogénico derivado de fago λ , el DE3. Este fago contiene en su genóma la secuencia codificante para la RNA polimerasa del fago T7, bajo el control del promotor lac. Las bacterias que poseen este fago pueden sintetizar la RNA polimerasa del fago T7, al ser inducidas por IPTG (Studier y Moffatt, 1986). Si además la bacteria ha sido transformada con el vector de expresión pT7-7, que posee delante de su caja de clonaje una secuencia promotora para la RNA polimerasa del fago T7 (ϕ 10), se podrá generar un RNA mensajero que contenga las secuencias codificantes para cualquier cDNA que haya sido subclonado en este vector. Este vector posee además entre la secuencia promotora del fago T7 y su caja de clonaje una secuencia de unión al ribosoma

bacteriano. Esto permite la traducción eficiente en bacterias del RNA mensajero generado por la inducción con IPTG.

Las secuencias de cDNA que codifican para las dos formas de proteínas G_{50} de oocitos de *Xenopus laevis* ($G_{50}12B2$ y $G_{50}6A1$), habían sido subclonadas en forma previa a este trabajo, en el plasmidio pGEM-3Zf^r. Para liberar estos fragmentos de cDNA, los plasmidios que contienen dichas secuencias son cortados con las enzimas de restricción Nco I y Sal I como se muestra en el esquema 11. El protocolo experimental es el siguiente: se incuban 50 µg de DNA plasmidial conteniendo las secuencias de interés en un medio que contiene amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,5; $MgCl_2$ 10 mM; NaCl 100 mM; ditioeritritol 1 mM y 50 unidades de cada una de las enzimas de restricción en un volumen final de 500 µl, a 37 °C por dos horas. Al cabo de este tiempo se analiza una alícuota de 5 µl mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% para chequear la digestión. Como resultado de esta incubación se libera un fragmento de DNA de 1270 pares de bases. Los fragmentos de cDNA codificantes para $G_{50}12B2$ y $G_{50}6A1$ son purificados por el método de la membrana de DEAE y posteriormente tratados con el fragmento klenow de la DNA polimerasa de *Escherichia coli*, transformando sus extremos cohesivos en romos. Para ello, se incuban de 10 µg de ambos cDNA, por 30 minutos a temperatura ambiente en un medio que contiene amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.6; $MgCl_2$ 10 mM; dATP 50 µM; dGTP 50 µM; dCTP 50 µM; dTTP 50 µM y 50 unidades/ml de fragmento klenow de la DNA polimerasa de *Escherichia Coli*. El medio de incubación es entonces sometido a extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1). El DNA es precipitado con etanol al 100%, sedimentado por centrifugación y resuspendido en 10 µl de H_2O .

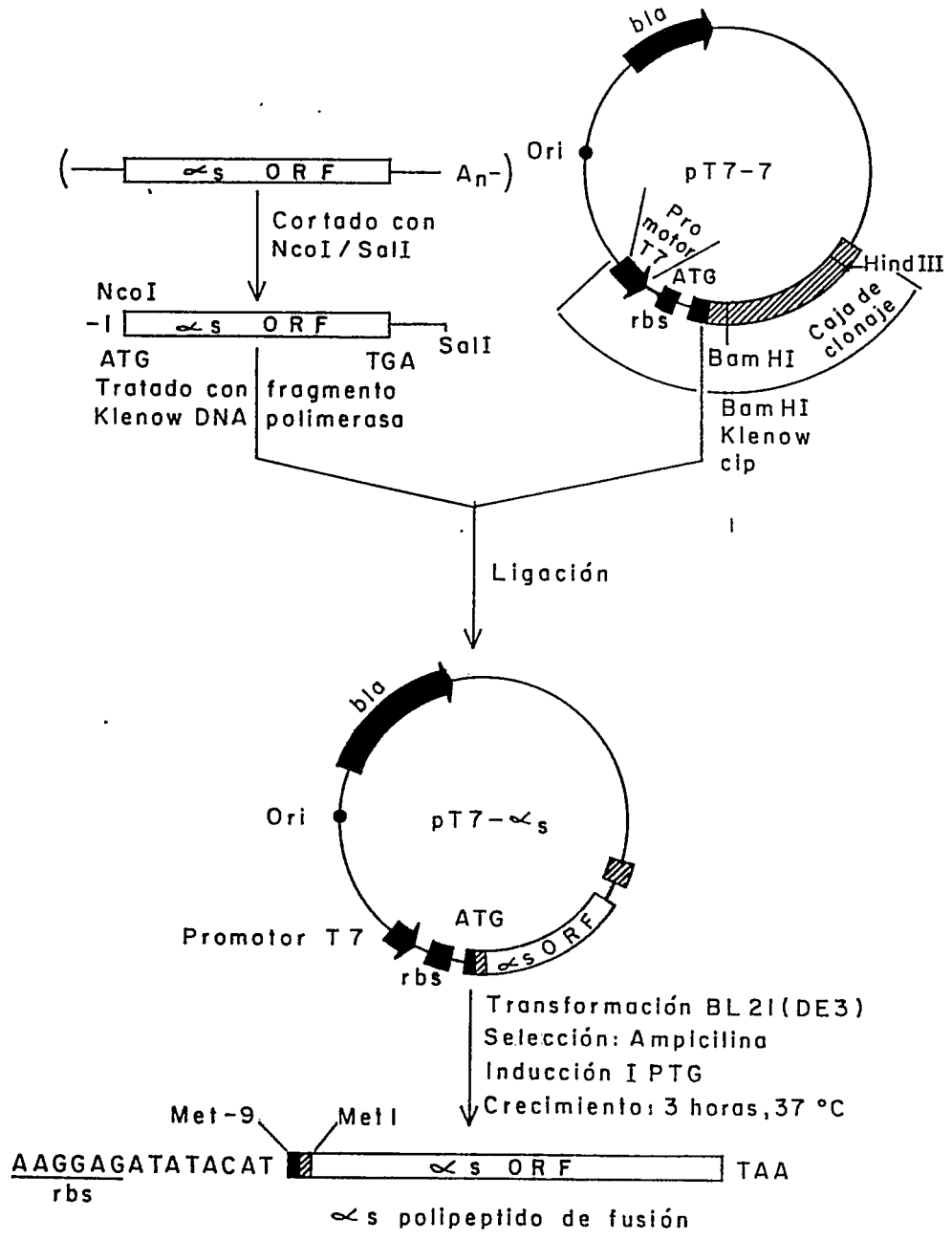
Por otro lado, se digieren 50 µg de DNA plasmidial pT7-7 con 50 unidades de la enzima de restricción Bam HI a 37°C por dos horas, en un medio que contiene Tris-HCl 10 mM pH 8.0; $MgCl_2$ 5 mM; NaCl 100 mM

y β -mercaptoetanol 1 mM y en un volumen de 500 μ l. Sus extremos cohesivos son también rellenados con el fragmento klenow de la DNA polimerasa. Para ello se trata el equivalente a 10 μ g de DNA plasmidial en las condiciones señaladas con anterioridad.

Los fragmentos de cDNA codificantes para las dos formas de las proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* son ligados al plasmidio pT7-7 (previo tratamiento del pT7-7 con fosfatasa alcalina de intestino de ternera como se describió anteriormente) con ligasa de fago T7. El vector resultante es usado para transformar la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) y las bacterias transformantes son seleccionadas por crecimiento en medio con ampicilina. Los insertos de cDNA pueden ligarse al pT7-7 en dos orientaciones posibles: una orientación directa con respecto al promotor de la RNA polimerasa del fago T7 que genera un RNA mensajero con un marco de lectura abierto y otra orientación inversa con respecto al promotor de la RNA polimerasa, que produce un RNA mensajero con una secuencia anti sentido que no genera proteína. Para seleccionar aquellos clones que tienen orientados los cDNA de manera correcta se hacen minipreparaciones de DNA plasmidial de varias colonias y mediante un análisis por cortes con enzimas de restricción se seleccionan aquellos clones que pueden producir las proteínas G_{sq} 6A1 y 12B2 de oocitos de *Xenopus laevis*. Las proteínas recombinantes G_{sq} generadas tienen ambas 9 aminoácidos adicionales en su extremo amino terminal.

2.2. Síntesis de las proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* en *Escherichia coli* BL21(DE3).

Las bacterias *Escherichia coli* BL21(DE3) transformadas con los plasmidios que portan las secuencias de cDNA codificantes para la proteínas G_{sq} 6A1 y G_{sq} 12B2 de oocitos de *Xenopus laevis*, son crecidas durante toda la noche en 3 ml de medio LB con ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml. Al día siguiente se inoculan con 100 μ l de este cultivo, 10 ml de



Esquema 11: Subclonamiento en pT7-7.

medio LB con ampicilina 100 µg/ml e IPTG 0,4 mM, para inducir la síntesis de la proteína exógena. Los cultivos se crecen durante tres horas a 37°C y se colectan las bacterias por centrifugación a 1500 x g por 15 minutos a 4°C. Se resuspende el sedimento de bacterias en un quinto del volumen inicial, en un medio que contiene Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 1mM; DTT 1 mM y lisosima 0,1 mg/ml. Se incuba 30 minutos a 30°C, tomando la solución un aspecto viscoso debido a la lisis bacteriana. Se agrega entonces PMSF, AlCl₃, NaF, y MgCl₂ a una concentración final en el medio de 0,1 mM, 10 µM, 10 mM y 10 mM respectivamente (fracción extracto total). Se centrifuga a 100.000 x g durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante se colecta. Como control se prepara fracción de extracto total y fracción sobrenadante procedentes de bacterias BL21(DE3) que no han sido transformadas con plasmidio alguno. La expresión de las proteínas G_q se analiza por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalantes e inmunodetección.

2.3. Inmunodetección de proteínas G_{sq} expresadas en bacterias.

El protocolo utilizado a continuación se encuentra descrito en Harlow y Lane, 1988. Luego de la electroforesis se transfieren las proteínas a filtros de nitrocelulosa durante 12 horas a una corriente constante de 120 mA y en un solución que contiene Tris-base 25 mM; glicina 192 mM y metanol al 20%. Posteriormente, se bloquea el filtro incubándolo con una solución de ovoalbumina al 3% en amortiguador TBS (Tris-HCl 50 mM pH 8,5; NaCl 150 mM y azida de sodio al 0.5%) durante 3 horas a temperatura ambiente, con agitación suave. Se incuba el filtro con el anticuerpo anti-G_q común en una dilución de 1/1000, en TBS con ovoalbumina al 3%, durante 8 horas con agitación suave. El filtro se lava con la misma solución de bloqueo pero sin ovoalbumina con agitación durante 10 minutos. Posteriormente el filtro es nuevamente lavado tres veces durante 10 minutos con la misma solución, pero conteniendo ahora NP40 al 0,1%.

El filtro de nitrocelulosa es incubado con la solución de bloqueo pero esta vez por un período de tiempo de 1 hora. El filtro es entonces incubado con un segundo anticuerpo anti IgG de conejo, marcado con ^{125}I (50.000.000 cpm totales), en la solución de ovoalbumina al 3% en TBS. El filtro se lava del mismo modo indicado con anterioridad y se seca a 37°C durante 30 minutos. Finalmente se expone 1 a 2 días con película autorradiográfica Kodak X-OMAT.

3. Expresión de las proteínas G_{50} en lisado de reticulocitos.

3.1. Subclonamiento de las secuencias de cDNA codificantes para las proteínas G_{50} de oocitos de *Xenopus laevis* y humano en pAGA.

Para expresar las dos proteínas G_{50} de oocitos de *Xenopus laevis* y la forma corta de la proteína G_{50} de humano en el lisado de reticulocitos, las secuencias de cDNA correspondientes son subclonadas en la caja de clonaje múltiple del vector de expresión pGEM3Zf⁺ modificado (pAGA). Este vector posee hacia la región 5' de su caja de clonaje una región de unión para la RNA polimerasa del fago T7 y una secuencia de unión al ribosoma que proviene del virus del mosaico de la alfalfa. Hacia la región 3' de su caja de clonaje este vector posee un fragmento de 90 adeninas. Las secuencias de cDNA subclonadas en este vector pueden ser transcritas por la RNA polimerasa del fago T7, produciendo un RNA mensajero con una región de unión al ribosoma de eucariontes en su región 5' y una cola de poliadenina en su extremo 3'. La región de unión al ribosoma del virus del mosaico de la alfalfa le confiere al RNA mensajero la propiedad de ser eficientemente traducido por el sistema de lisado de reticulocitos. Además la cola de 90 adeninas del RNA mensajero contribuye al aumento de su estabilidad, permitiendo una mayor eficiencia en la traducción de éste (Sandford y cols., 1991).

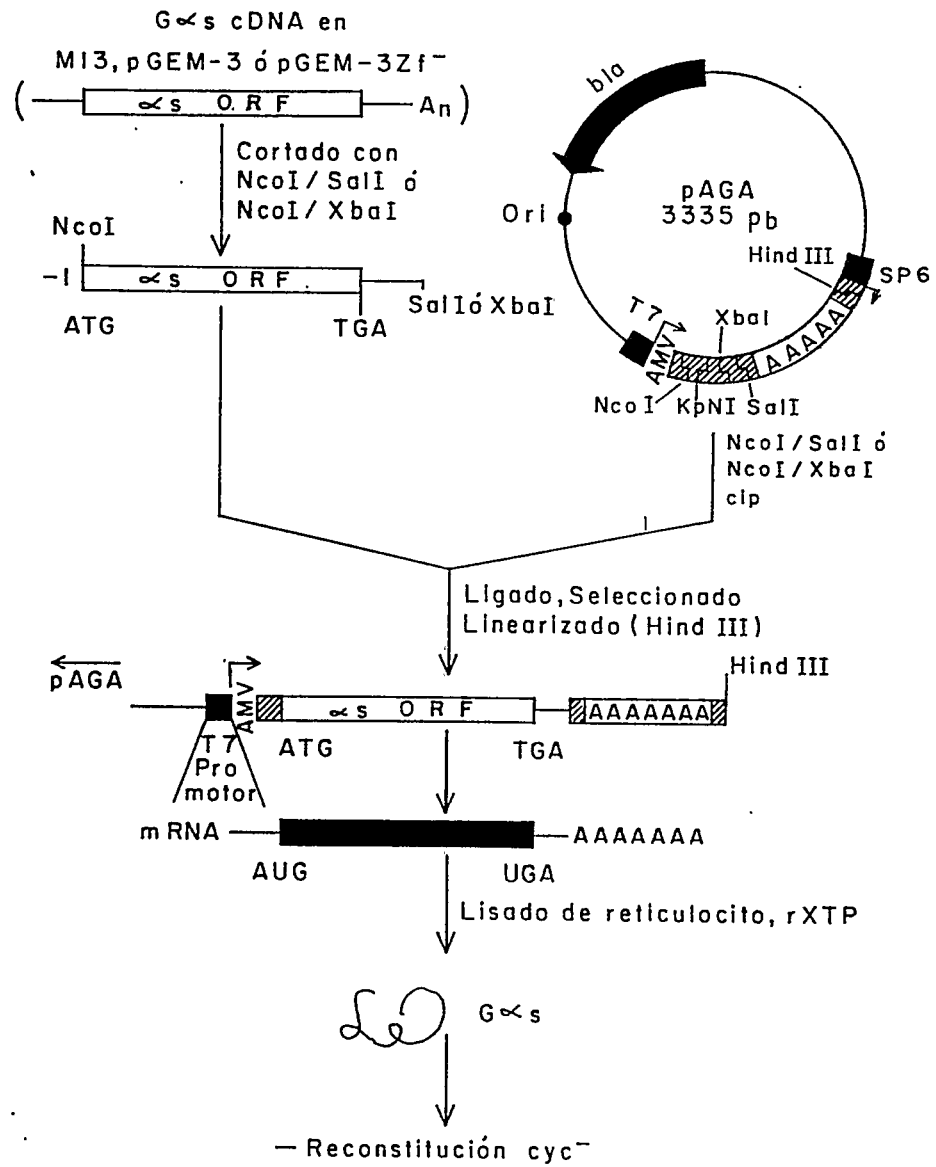
El protocolo de subclonamiento es el siguiente: se digieren 50 μg de los plasmidios (pGEM-3Zf⁺) que contienen las secuencias de cDNA

que codifican para las dos formas de proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* (G_{sq} 12B2 y G_{sq} 6A1) con las enzimas de restricción Nco I y Sal I (esquema 12). Los fragmentos obtenidos se purifican por el método de la membrana de DEAE. La secuencia de cDNA codificante para la forma corta de la proteína G_{sq} de hígado humano y subclonada en pGEM-3, se obtiene por digestión del plasmidio con las enzimas de restricción Nco I y Xba I. El fragmento de cDNA obtenido se purifica por membrana de DEAE. Paralelamente, se digieren 50 μ g del vector de expresión pAGA con Nco I y Sal I ó con Nco I y Xba I. El plasmidio se purifica por membrana de DEAE y se desfosforila bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Las digestiones realizadas con las enzimas de restricción NcoI, Sal I y Xba I se realizan bajo las condiciones descritas en la sección 2.1. Los fragmentos de cDNA codificantes para las proteínas G_{sq} son ligados al vector de expresión pAGA. Las mezclas de ligación resultantes son usadas para transformar bacterias AG-1 o TG-1. Las bacterias transformantes se seleccionan por crecimiento en medio con ampicilina. La presencia de cada uno de los cDNA codificantes para las proteínas G_{sq} , se analiza por mapeamiento con enzimas de restricción a partir de DNA plasmidial preparado de las bacterias transformantes por el método ya descrito de la mini preparación. Finalmente de los clones bacterianos seleccionados se prepara DNA plasmidial por el método del polietilenglicol como se describió anteriormente.

3.2. Construcción de los genes quiméricos.

Para la construcción de las proteínas quiméricas entre segmentos de las proteínas G_{sq} oocitos de *Xenopus laevis* y de humano, fue necesario recurrir a las secuencias de cDNA codificantes para dichas proteínas.

Las enzimas de restricción fueron elegidas de manera tal que los fragmentos producidos, al ser posteriormente religados en forma cruzada, (es decir humano con *Xenopus laevis* y *Xenopus laevis* con humano),

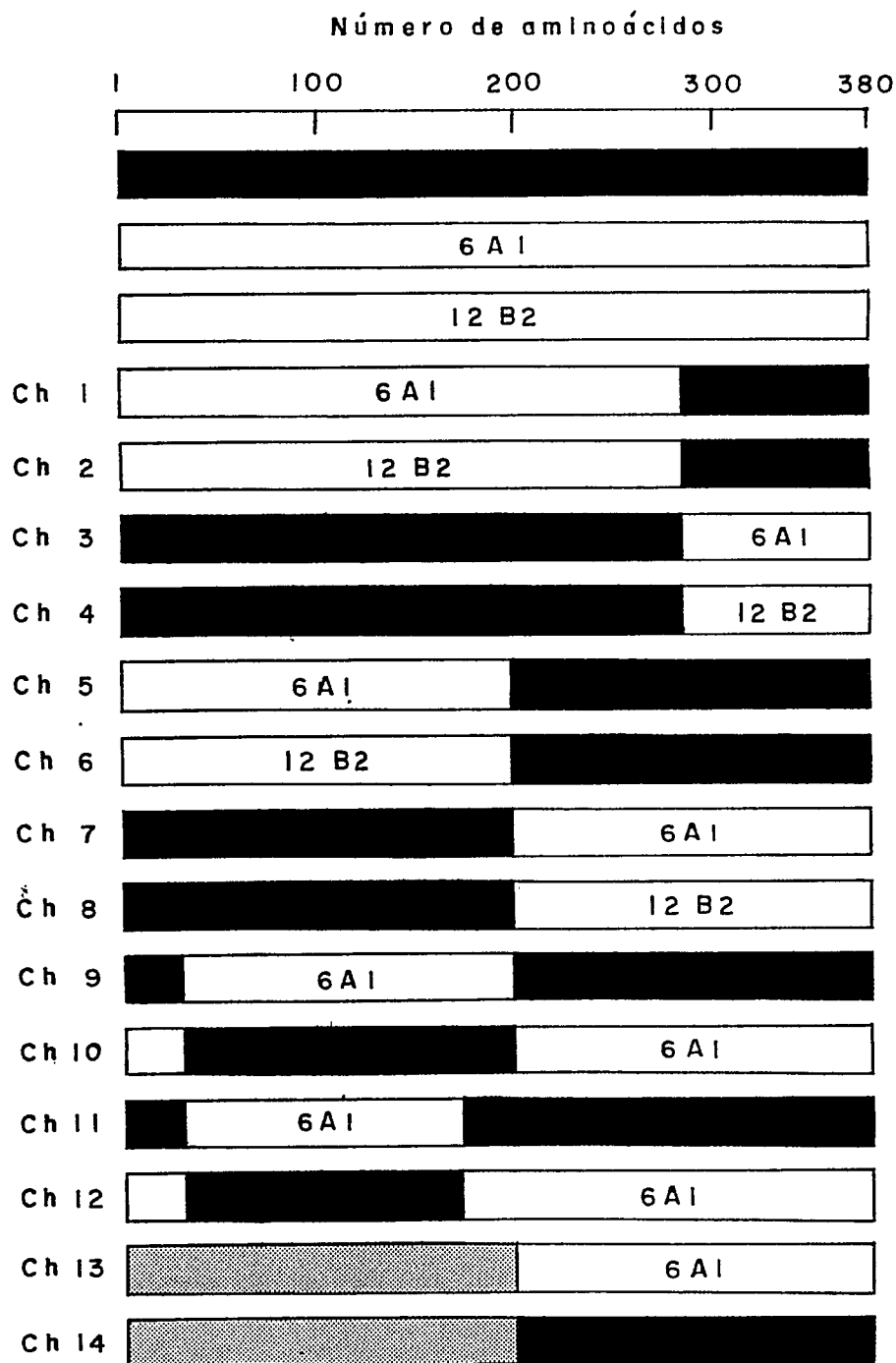


Esquema 12: Subclonamiento en pAGA.

generen una secuencia de cDNA con el marco de lectura completo, que codifique para una proteína quimérica con el mismo número de aminoácidos que las proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis* y humano (379 aminoácidos). Las quimeras construídas se muestran en el esquema 13.

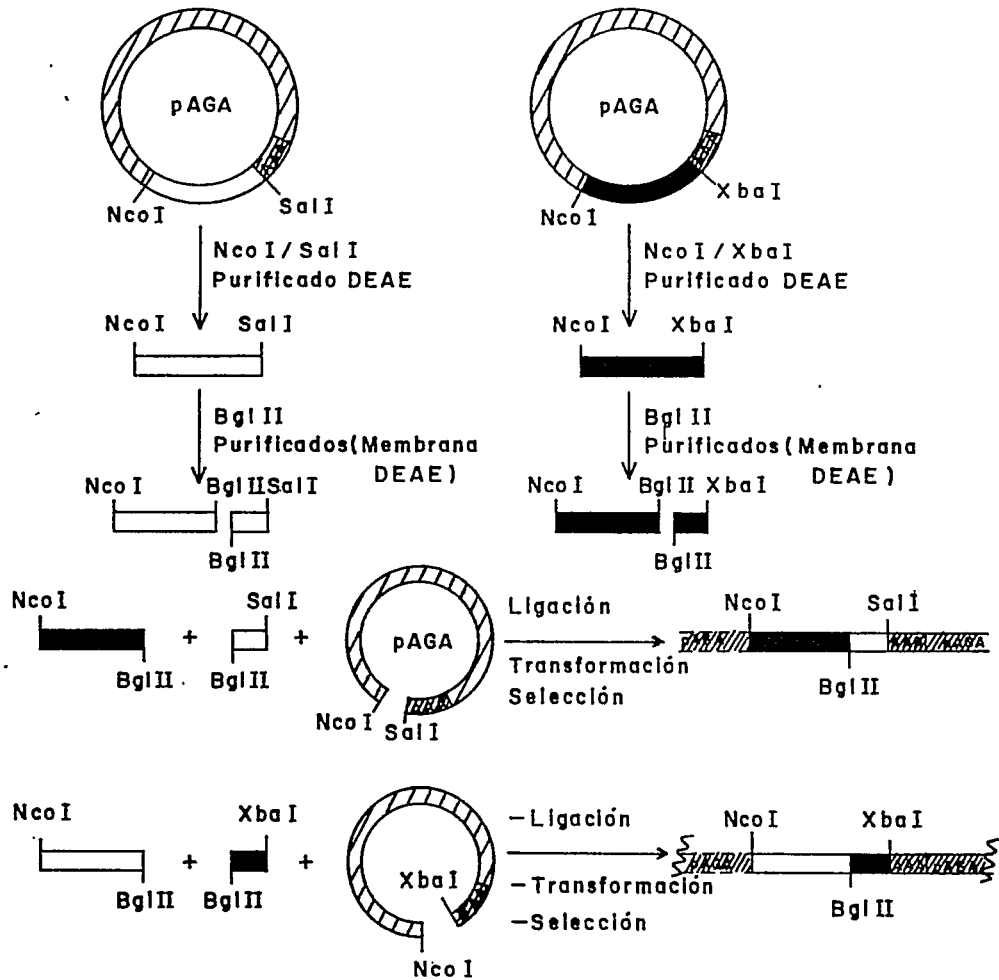
3.2.1. Construcción de los genes quiméricos Ch1, Ch2, Ch3 y Ch4.

La construcción de estos genes quiméricos se detalla en el esquema 14. Las secuencias de los cDNA de G_{sq} 6A1 y G_{sq} 12B2 de *Xenopus laevis* y G_{sq} humano, se digieren con la enzima de restricción Bgl II. Esta enzima posee un unico sitio de corte dentro de cada una de las secuencias de cDNA. El protocolo experimental es el siguiente: se digieren 10 μ g de cada uno de los cDNA con la enzima de restricción Bgl II en 50 μ l de un medio que contiene Tris-HCl 10 mM pH 8,0; $MgCl_2$ 5 mM; NaCl 100 mM; β -mercaptoetanol 1 mM y 10 unidades de enzima, durante dos horas a 37°C. De esta digestión enzimática se originan seis fragmentos, dos de ellos provenientes del gen 12B2, dos del 6A1 y dos provenientes del gen humano. Todos los fragmentos generados son purificados por membrana de DEAE y son resuspendidos en 20 μ l de H_2O . Paralelamente, se digieren 50 μ g del vector de expresión pAGA con Nco I y Sal I ó con Nco I y Xba I, se purifican por membrana de DEAE y se desfosforilan en su extremo 3'. El DNA plasmidial se resuspende en 20 μ l de H_2O . Los fragmentos se ligan de la manera mostrada en el esquema 14, para generar los genes quiméricos. En la reacción de ligación se incuban de 50 a 100 ng de cada uno de los fragmentos de cDNA con 10 a 20 ng de DNA plasmidial durante 16 horas a 16°C, en un volumen final de 20 μ l y en las condiciones descritas en la sección 1.5. El DNA resultante de la ligación se usa para transformar bacterias AG-1 o TG-1. Las transformantes se seleccionan por crecimiento en medio con ampicilina. La presencia de cada uno de los cDNA codificantes para las proteínas quiméricas, se analiza por mapeamiento con enzimas de restricción del DNA plasmidial preparado de las bacterias transformantes



Esquema 13: Proteínas quiméricas construídas.

Las proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis* y de humano aparecen representadas en blanco y negro respectivamente. Las dos proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis* se indican como 6A1 y 12B2. La región amino terminal de la proteína G_{i-20} de ratón es señalada en gris (quimeras Ch13 y Ch14).



Esquema 14: Construcción de quimeras Ch1, Ch2, Ch3 y Ch4.

Las secuencias de cDNA de G_{50} de *Xenopus laevis* y de humano se representan en blanco y negro respectivamente.

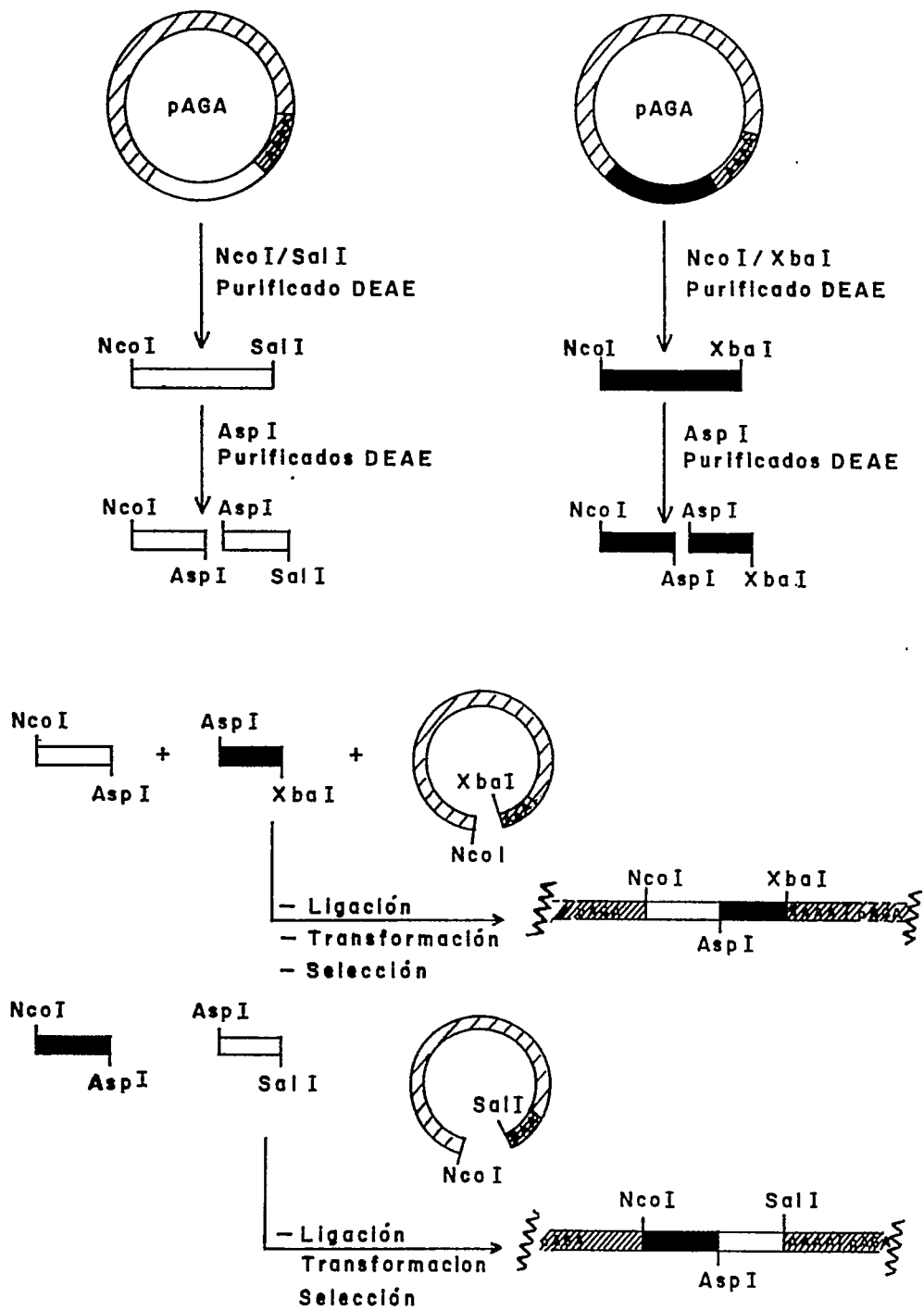
por el método ya descrito de la mini preparación. Finalmente de los clones bacterianos seleccionados se prepara DNA plasmidial por el método del polietilén glicol como se describió anteriormente. Las secuencias de los genes quiméricos se verifican por secuenciación del DNA obtenido.

3.2.2. Construcción de los genes quiméricos Ch5, Ch6, Ch7 y Ch8.

La construcción de estos genes quiméricos se detalla en el esquema 15. Las secuencias de los cDNA de G_{sq} 6A1 y G_{sq} 12B2 de *Xenopus laevis* y G_{sq} humano, se digieren con la enzima de restricción Asp I. Esta enzima posee un único sitio de corte dentro de las secuencias de cDNA de las tres proteínas. El procedimiento experimental es el siguiente: se digieren 10 μ g de cada uno de los cDNA con la enzima de restricción Asp I en 50 μ l de un medio que contiene Tris-HCl 10 mM pH 8,0; $MgCl_2$ 5 mM; NaCl 100 mM; β -mercaptoetanol 1 mM y 10 unidades de enzima, durante dos horas a 37 °C. De esta digestión se originan seis fragmentos, dos de ellos provenientes del gen 12B2 de *Xenopus laevis*, dos del 6A1 también de *Xenopus laevis* y dos provenientes del gen humano. Todos los fragmentos generados se purifican por membrana de DEAE y se resuspenden en 20 μ l de H_2O . Paralelamente, se digieren 50 μ g del vector de expresión pAGA con las enzimas de restricción Nco I y Sal I ó con Nco I y Xba I. Ambos plasmidios linearizados se purifican por membrana de DEAE, se desfosforilan y se resuspenden en 20 μ l de H_2O . Los fragmentos se ligan de la manera mostrada en el esquema 15, para generar los genes quiméricos. Finalmente se procede de la manera descrita en la sección 3.2.1. Las secuencias de los genes quiméricos se verifican por secuenciación del DNA obtenido.

3.2.3. Construcción de los genes quiméricos Ch9 y Ch10.

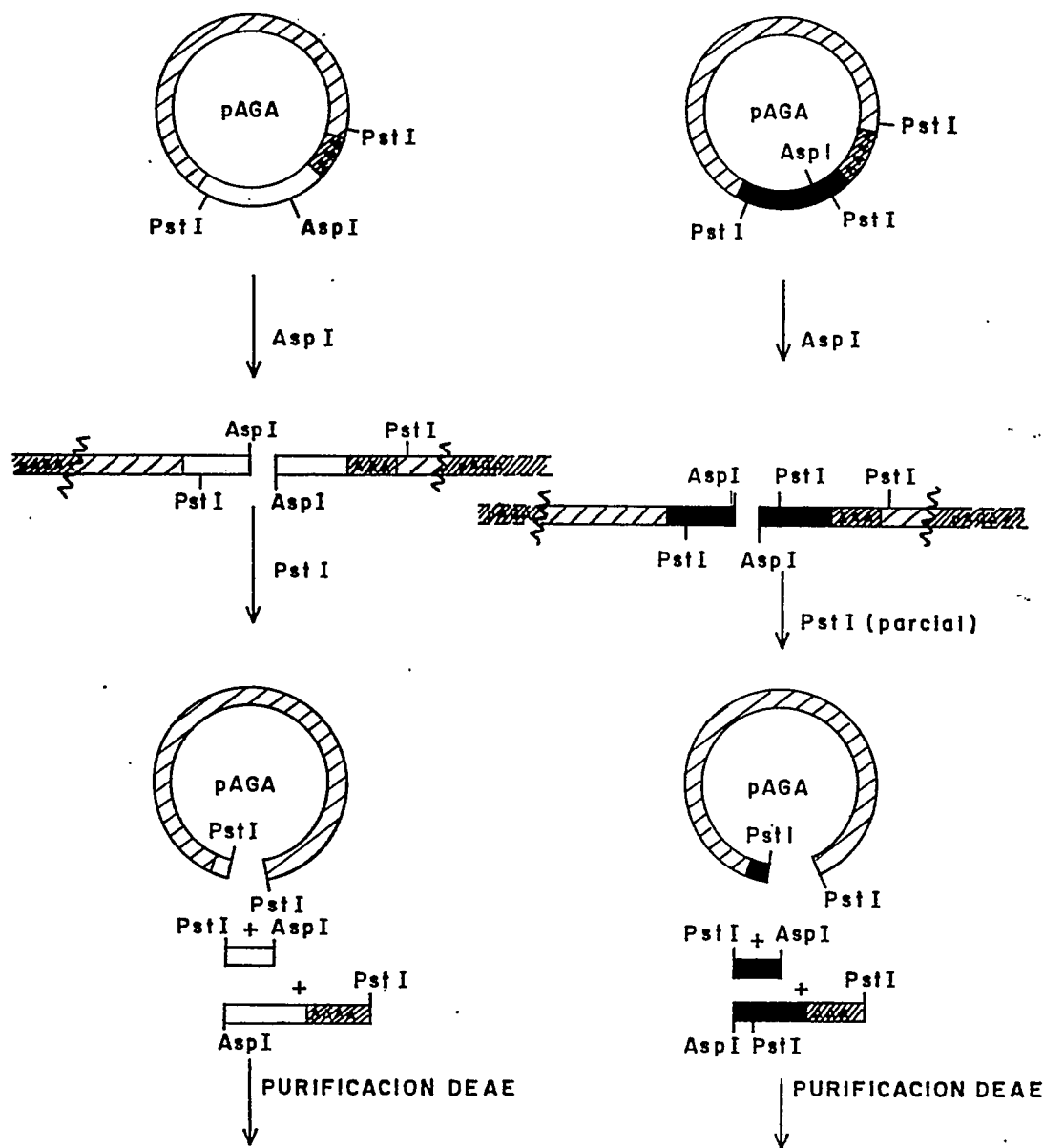
La construcción de estos genes quiméricos se detalla en el esquema 16. El protocolo experimental es el siguiente: se digieren 30 μ g del plasmidio pAGA que contiene la secuencia de cDNA G_{sq} 6A1 de *Xenopus laevis* o del G_{sq} humano, con la enzima de restricción Asp I. Esta enzima posee una



Esquema 15: Construcción de quimeras Ch5, Ch6, Ch7 y Ch8.

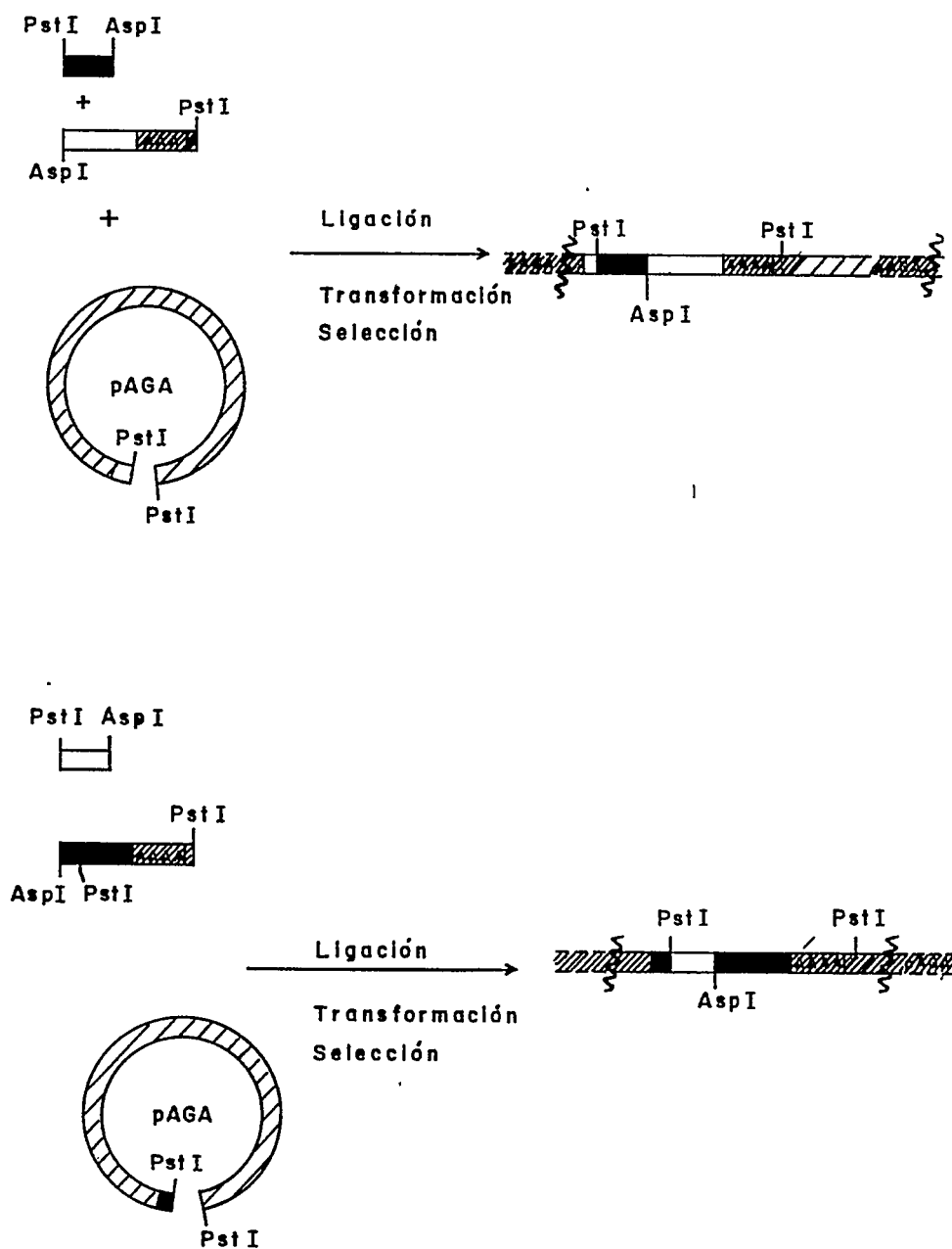
Las secuencias de cDNA de G_{50} de *Xenopus laevis* y de humano se representan en blanco y negro respectivamente.

única secuencia de corte dentro de la región de cDNA codificante para las proteínas de *Xenopus laevis* y de humano y no corta al plasmidio pAGA. La reacción se realiza en 200 μ l de un medio que contiene Tris-HCl 10 mM pH 8,0; $MgCl_2$ 5 mM; NaCl 100 mM; β -mercaptoetanol 1 mM y 30 unidades de Asp I, durante dos horas a 37°C. En cada caso se origina un fragmento de DNA lineal de 4.600 pb. Luego, el vector pAGA con la secuencia $G_{sq}6A1$ de *Xenopus laevis* es digerido con la enzima de restricción Pst I. Esta enzima posee una única secuencia de corte dentro del cDNA codificantes para la proteína de *Xenopus laevis*. Además posee otro sitio de corte en el pAGA, hacia el extremo 3' contiguo a la región del poli A. La digestión se realiza en 20 μ l de una solución que contiene Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; $MgCl_2$ 10 mM; NaCl 100 mM; ditiotreititol 1 mM y 30 unidades de Pst I durante 2 horas a 37°C. Como resultado final de las dos reacciones se obtienen 3 fragmentos de DNA, el mayor de 3300 pb, que contiene al plasmidio y parte de la secuencia de cDNA codificante para la región amino terminal de la proteína de *Xenopus laevis*, un fragmento de 607 pb y otro mas pequeño de 593 pb. Todos los fragmentos generados se purifican por membrana de DEAE, y se resuspenden en 20 μ l de H_2O . El fragmento de 3.300 pb que contiene al plasmidio pAGA y parte de la secuencia de cDNA codificante para la región amino terminal de la proteína G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* se desfosforila como se describió anteriormente. Paralelamente, el vector pAGA con la secuencia G_{sq} de humano se digere con la enzima de restricción Pst I. Esta enzima posee dos sitios de corte dentro de la región de cDNA codificante para la proteína de humano. Además posee otro sitio de corte en el pAGA, hacia el extremo 3' contiguo a la región del poli A. En este caso es necesario realizar una digestión parcial con la enzima Pst I, para poder obtener el fragmento de 707 pb (Asp I-Pst I) como producto mayoritario de la digestión enzimática (esquema 16). Para esto se agrega a la mezcla de reacción de la etapa anterior, 20 μ l de una solución que



Esquema 16: Construcción de quimeras Ch9 y Ch10.

Las secuencias de cDNA de G_{50} de *Xenopus laevis* y de humano se representan en blanco y negro respectivamente.

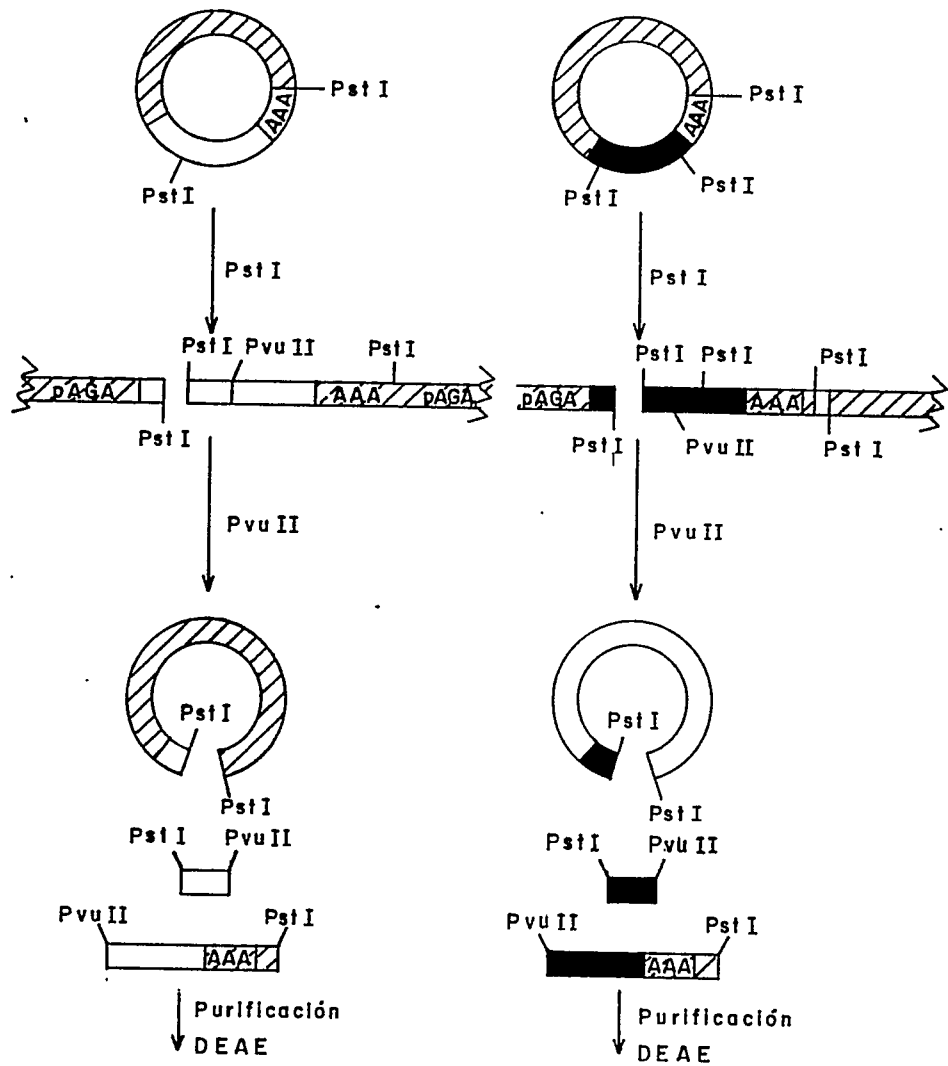


Esquema 16: Construcción de quimeras Ch9 y Ch10 (continuación).

contiene Tris-HCl 10 mM pH 8,0; $MgCl_2$ 5 mM; NaCl 100 mM; β -mercaptoetanol 1 mM y 8 unidades de Pst I. La reacción se realiza por 30 minutos a 37 °C. La digestión se analiza sometiendo una alícuota de la reacción a geles de agarosa al 1%. Como resultado de esta incubación, se obtiene el fragmento mayor de 3300 pb, que contiene al plasmidio y parte de la secuencia de cDNA codificante para la región amino terminal de la proteína G_{su} de humano, el fragmento de 707 pb (AspI-Pst I) en forma mayoritaria, el de 593 p. b. (Pst I-Asp I) y otros dos fragmentos que se descartan. Los tres fragmentos de interés se purifican por membrana de DEAE. El plasmidio pAGA que porta un segmento de la secuencia de cDNA codificante para la región amino terminal de la proteína G_{su} de humano, es defosforilado. Posteriormente se realiza la ligación de los fragmentos como se muestra en el esquema 16, para generar los genes quiméricos. Finalmente se procede de la manera descrita en la sección 3.2.1.

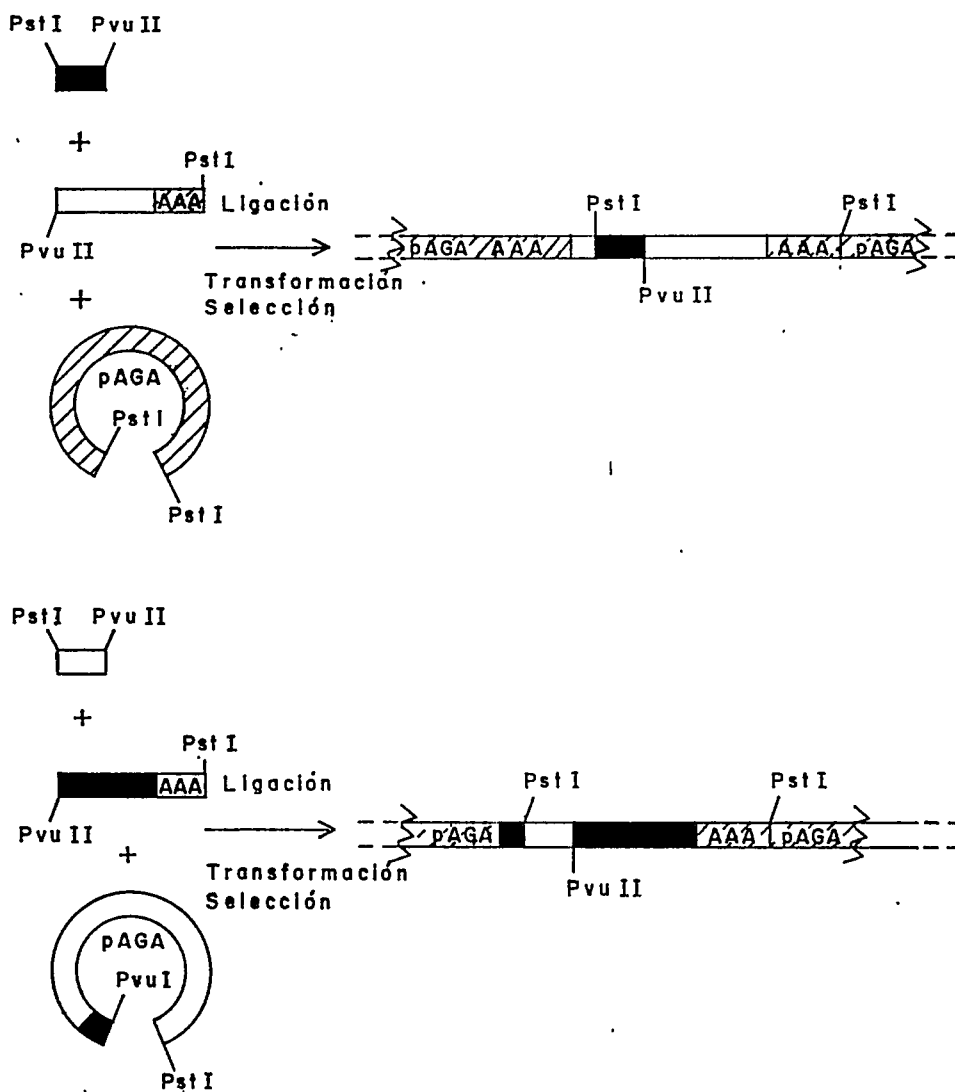
3.2.4. Construcción de los genes quiméricos Ch11 y Ch12.

La construcción de estos genes quiméricos se detalla en el esquema 17. Se digieren 10 μ g del plasmidio pAGA que contiene la secuencia de cDNA codificante para la proteína $G_{su}6A1$ de *Xenopus laevis* con la enzima de restricción Pst I. Esta enzima posee una única secuencia de corte dentro del cDNA codificantes para la proteína de *Xenopus laevis*. Además posee otro sitio de corte en el pAGA, hacia el extremo 3' contiguo a la región del poli A. La reacción se realiza en un volumen de 200 μ l y en un medio que contiene Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; $MgCl_2$ 10 mM; NaCl 100 mM; ditiotreitól 1 mM y 20 unidades de Pst I, durante 2 horas a 37°C. De esta digestión se obtiene un fragmento de 1.200 pb y otro mayor de 3300 pb, que contiene al plasmidio y parte de la secuencia de cDNA codificante para la región amino terminal de la proteína de *Xenopus laevis*. Todos los fragmentos generados se purifican por el método de la membrana de DEAE y se resuspenden en 20 μ l de H_2O . El fragmento de 3.300 pb que contiene al



Esquema 17: Construcción de quimeras Ch11 y Ch12.

Las secuencias de cDNA de G_{50} de *Xenopus laevis* y de humano se representan en blanco y negro respectivamente.



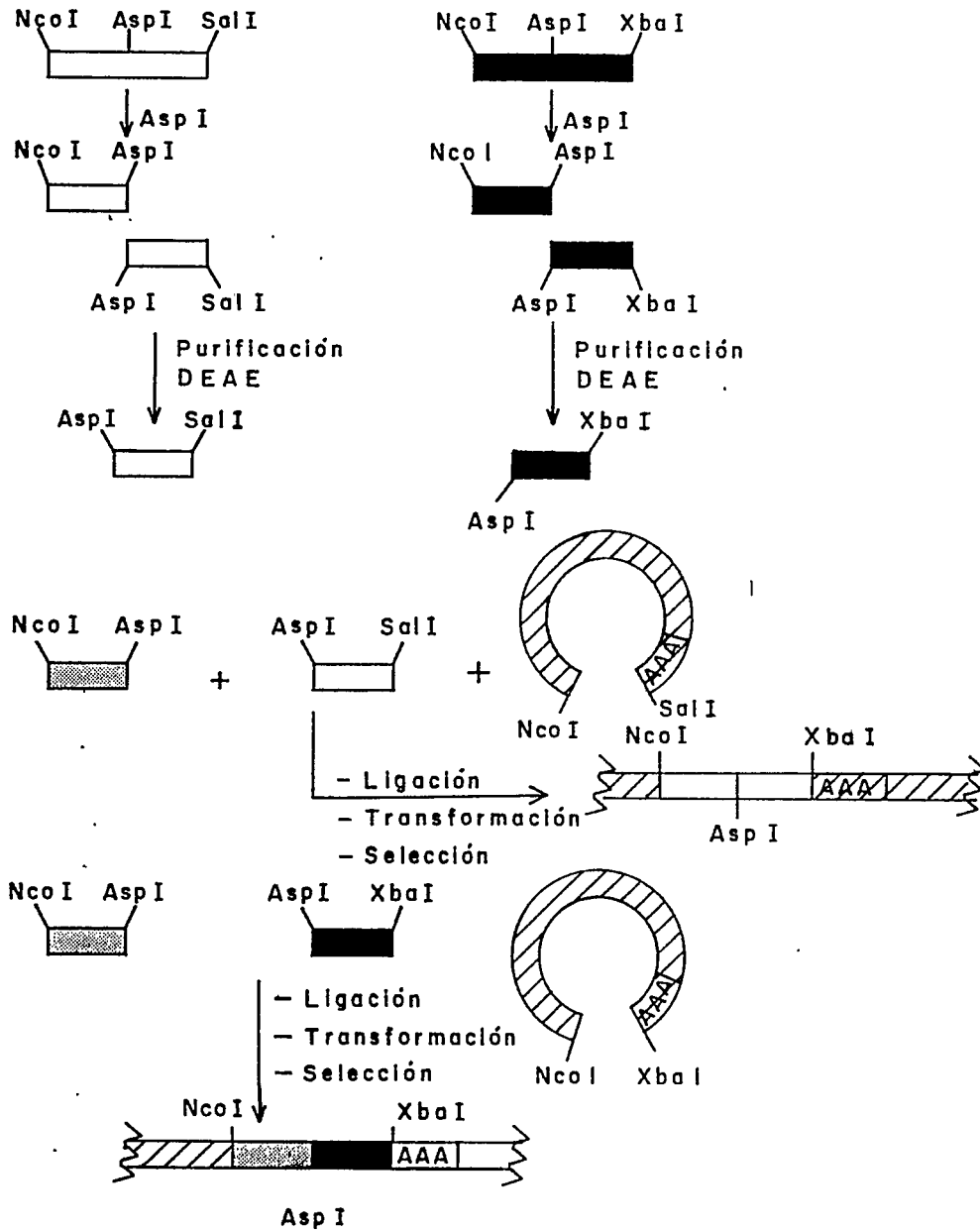
Esquema 17: Construcción de quimeras Ch11 y Ch12 (continuación).

plasmidio pAGA y parte de la secuencia de cDNA codificante para la región amino terminal de la proteína G_{sa} de oocitos de *Xenopus laevis*, se desfosforila como se describió con anterioridad. El fragmento de 1.200 pb se corta con la enzima de restricción Pvu II. Para ello, el fragmento de DNA se incuba en 50 µl de un medio que contenía Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; NaCl 50 mM; ditiotreitól 1 mM y 50 unidades de la enzima de restricción, a 37 °C por dos horas, obteniéndose dos fragmentos: uno de 373 pb y otro de 827 pb. Los fragmentos se purifican por membrana de DEAE y se resuspenden en 20 µl de H₂O. Paralelamente, el vector pAGA con la secuencia G_{sa} de humano se digiere con la enzima de restricción Pst I. Esta enzima posee dos sitios de corte dentro de la región de cDNA codificante para la proteína de humano. Además posee otro sitio de corte en el pAGA, hacia el extremo 3' contiguo a la región del poli A. Para obtener el fragmento de 1.300 pb (Pst I-Pst I) que nos interesa en este caso, es necesario realizar una digestión parcial con la enzima Pst I. La reacción se realiza en un volumen de 200 µl y en un medio que contiene Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; NaCl 100 mM; ditiotreitól 1 mM y 10 unidades de Pst I, durante 50 minutos a 37°C. Como resultado de esta incubación, se obtiene el fragmento mayor de 3300 pb, que contiene al plasmidio y parte de la secuencia de cDNA codificante para la región amino terminal de la proteína G_{sa} de humano, y el fragmento de interés de 1.300 pb en forma mayoritaria, junto a otros fragmentos que fueron descartados. Los dos fragmentos de interés son purificados por membrana de DEAE y se resuspenden en 20 µl de H₂O. El fragmento de 3.300 pb que contiene al plasmidio pAGA y parte de la secuencia de cDNA codificante para la región amino terminal de la proteína G_{sa} de humano, es desfosforilado. El fragmento de 1.300 pb se corta con la enzima de restricción Pvu II. Para ello, el fragmento de DNA se incuba por 2 horas en 50 µl de un medio que contiene Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; NaCl 50 mM; ditiotreitól 1

mM y 50 unidades de la enzima de restricción, a 37°C. Como resultado de la digestión enzimática se obtienen dos fragmentos: uno de 373 pb y otro de 927 pb. Los fragmentos se purifican por membrana de DEAE y se resuspenden en 20 µl de H₂O. Posteriormente se realiza la ligación de los fragmentos para generar los genes quiméricos. Finalmente se procede de la manera descrita en la sección 3.2.1.

3.2.5. Construcción de los genes quiméricos Ch13 y Ch14.

La construcción de estos genes quiméricos se detalla en el esquema 18. Se digieren durante 2 horas 10 µg de las secuencias de cDNA codificantes para las proteínas G₅₀ de *Xenopus laevis* y para la proteína de humano con la enzima de restricción Asp I en 50 µl de un medio que contiene Tris-HCl 10 mM pH 8,0; MgCl₂ 5 mM; NaCl 100 mM; β-mercaptoetanol 1 mM y 10 unidades de enzima, a 37°C. De la digestión enzimática se originan cuatro fragmentos, dos de ellos provenientes del gen 6A1 de *Xenopus laevis* y dos provenientes del gen humano. En este caso se utilizan los fragmentos que contienen las secuencias codificantes para la porción carboxilo terminal de ambas proteínas. Estos fragmentos se purifican por membrana de DEAE y se resuspenden en 20 µl de H₂O. El fragmento de cDNA codificante para los 195 aminoácidos correspondientes a la porción amino terminal de la proteína G₁₋₂₀ de ratón había sido previamente subclonado en el plasmidio pAGA. Para liberar este fragmento del plasmidio se usaron las enzimas de restricción Nco I y Asp I. Para ello, se digieren 10 µg de DNA plasmidial en las condiciones descritas con anterioridad para estas dos enzimas. El fragmento obtenido se purifica por el método de la membrana de DEAE, de la manera descrita con anterioridad y se resuspende en 20 µl de H₂O. De modo paralelo, se digieren 50 µg del vector de expresión pAGA con Nco I y Sal I y con Nco I y Xba I. Ambos plasmidios linearizados se purifican por membrana de DEAE, y se desfosforilan. Finalmente ambos plasmidios son resuspendidos en 20 µl de H₂O. Se realiza



Esquema 18: Construcción de quimeras Ch13 y Ch14.

Las secuencias de cDNA de G_{30} de *Xenopus laevis* y de humano se representan en blanco y negro respectivamente. El fragmento amino terminal del cDNA de G_{i-20} de ratón se muestra en gris.

la ligación de los fragmentos de DNA obtenidos para producir los genes quiméricos como se muestra en el esquema 18. Finalmente se procede de la manera descrita en la sección 3.2.1.

3.3. Síntesis de mRNA *"in vitro"*.

Para la manipulación del mRNA todas las soluciones son tratadas con DEPC y el material de vidrio es calentado a 250°C para inactivar la ribonucleasa (Sambrook y cols., 1989). La transcripción *"in vitro"* se realiza como lo describen Olate y cols. (1988) y Sandford y cols. (1991). El procedimiento experimental es el siguiente: previo a la transcripción, el vector de expresión pAGA que porta la secuencia de cDNA a ser transcrita, se lineariza por digestión con la enzima de restricción Hind III. Para ello se digieren 50 µg de DNA plasmidial en un medio que contiene Tris-HCl 10 mM pH 8,0; MgCl₂ 5 mM; NaCl 100 mM; β-mercaptoetanol 1 mM y 50 unidades de la enzima de restricción, durante dos horas a 37°C. Se realizan extracciones sucesivas con un volumen de fenol, fenol:cloroformo y cloroformo. Se purifica el DNA por precipitación etanólica y se resuspende en 50 µl de H₂O. La concentración de DNA se ajusta por densidad óptica a 260 nm. La síntesis del RNA mensajero se realiza en un volumen de 200 µl, en un medio que contiene Tris-HCl 40 mM pH 7.5; MgCl₂ 6 mM; Espermidina 2mM; NaCl 10 mM; ATP, CTP, GTP y UTP 1 mM; DTT 30 mM; 1 unidad/µl de inhibidor de ribonucleasa (RNasin); 10 µg de DNA templado previamente linearizado con Hind III y 100 unidades de RNA polimerasa de fago T7. Esta mezcla de reacción se incuba durante 2 horas a 37°C. A continuación se adicionan 10 unidades de dexoxiribonucleasa Q y se incuba por 30 minutos a 37°C. Esta etapa tiene por finalidad eliminar el templado de DNA. Luego se realizan extracciones con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1) y el RNA se colecta por precipitación etanólica. El RNA se resuspende en 50 µl de H₂O y se cuantifica por densidad óptica a 260 nm. La integridad del mRNA sintetizado se analiza por electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

3.4. Traducción "*in vitro*".

La reacción de traducción "*in vitro*" se realiza como lo describe Sandford y cols. (1991). El procedimiento experimental es el siguiente: se incuban 0,2 µg/µl de mRNA en un medio que contiene KCl 20 mM, una mezcla de aminoácidos sin metionina 20 µM, lisado de reticulocitos al 60 % (v/v) y ³⁵[S]-metionina 20 µM (15.000-40.000 cpm/pmol). La incubación se realiza durante 60 minutos a 30°C. Para los experimentos de reconstitución de la actividad adenililciclase de las membranas cyc-, la síntesis se realiza en un volumen de 200 µl y en ausencia de metionina radiactiva. En estos casos para poder monitoriar la cantidad de proteína sintetizada, se hace una síntesis en paralelo con metionina radiactiva de la forma siguiente: se prepara una mezcla de reacción que lleva todos los componentes necesarios para la reacción de síntesis a las concentraciones señaladas anteriormente, menos la metionina. Se saca una alícuota de 9 µl de este medio y se le agrega 1 µl metionina radiactiva con la suficiente cantidad de metionina no radiactiva para llegar a una concentración de 20 µM. Paralelamente, al tubo donde se realiza la síntesis no radiactiva, se le agrega la metionina no radiactiva, a una concentración final de 20 µM. Ambos tubos se incuban en paralelo y en las condiciones indicadas con anterioridad. Luego de esta incubación, los extractos no radiactivos conteniendo las proteínas sintetizadas se congelan a -80 °C hasta su uso, y los extractos radiactivos se utilizan en la cuantificación de las proteínas sintetizadas. En algunos experimentos se utiliza proteína radiactiva con mayor actividad específica. Para esto la síntesis se realiza en las mismas condiciones que las señaladas anteriormente, pero en presencia de ³⁵S-metionina 0,6 µM (2×10^6 cpm/pmol).

3.5. Cuantificación de la proteína sintetizada por el lisado de reticulocitos.

Para esto se mide la cantidad de metionina radiactiva incorporada en proteínas por precipitación con TCA. Para ello se toman 2 μ l del medio de síntesis y se le agregan 248 μ l de una solución que contiene NaOH 1M y H_2O_2 al 2% (v/v). La solución se agita con vortex y se deja reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se agrega 1 ml de una solución que contiene TCA al 25% y casa aminoácidos al 2%. La mezcla resultante se incuba durante 30 minutos a 4°C. El precipitado se filtra sobre filtros millipore de 0,45 μ M ó alternativamente con filtros fibra de vidrio. Los filtros se lavan con TCA al 5%, se secan y finalmente se determina la radioactividad del ^{35}S incorporada en proteínas, en un contador de centelleo líquido.

Alternativamente, se aplica la mezcla de reacción conteniendo las proteínas sintetizadas en un gel de poliacrilamida desnaturante, al 10%. Se realiza la electroforesis como se describe en *Materiales y Métodos*. Luego se corta del gel la zona que contiene la proteína. El segmento de gel es colocado sobre frascos de centelleo líquido conteniendo 2 ml de H_2O_2 al 30 % (v/v), e incubado durante 5-6 horas a 65 °C, para disolverlo. Luego se determina la radioactividad del ^{35}S incorporada en proteínas, en un contador de centelleo líquido.

Para calcular la cantidad de proteína sintetizada, en cada caso se hace un blanco, que contiene todos los reactivos necesarios para la traducción, menos el mRNA. Las cpm de ^{35}S obtenidas con este control, son restadas a la radioactividad del ^{35}S incorporada en proteínas. El cálculo de la cantidad de moles de proteína sintetizada en cada caso se hace en base a la radioactividad del ^{35}S incorporada en la proteína, la actividad específica de la metionina usada en la reacción de síntesis y el número de metioninas de la proteína. Cuando se utiliza metionina radiactiva de alta

actividad específica (2×10^6 cpm/pmol), sólo se considera en el cálculo de la proteína sintetizada la concentración de metionina aportada por la metionina radioactiva. La concentración de proteína sintetizada por este método oscila entre los 10 y 100 nM.

P. ENSAYO DE PROTECCION POR GTP- γ -S, A LA DIGESTION PROTEOLITICA DE PROTEINAS $G_{s\alpha}$ CATALIZADA POR TRIPSINA.

En este ensayo se utiliza la técnica descrita en Denker y cols. (1992). Las proteínas $G_{s\alpha}$ se sintetizan y se cuantifican como se describe en *Materiales y Métodos*. La metodología experimental es la siguiente: se preincuban las proteínas marcadas con 35 [S]-metionina (60-300 cpm/pmol) en 10 μ l, por 30 minutos a 30°C en presencia o ausencia de GTP- γ -S 150 μ M y en un medio que contiene Hepes pH 8,0 50 mM; $MgCl_2$ 6mM y EDTA 1.5 mM. La digestión con la proteasa se inicia por la adición a cada tubo de una solución de tripsina en amortiguador TE a la concentración indicada en los resultados. La incubación se realiza por 30 minutos a 30°C. La reacción se detiene con la adición de 1,5 μ l de una solución de benzamidina 0,1 mM. A cada tubo de reacción se le agrega un volumen de amortiguador de Laemmli y las muestras se aplican en geles de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturantes. El gel se tiñe con azul de coomassie, luego de lo cual se seca y se somete a autorradiografía por 1-4 días.

Q. ANALISIS DE LA INTERACCION DE LAS PROTEINAS $G_{s\alpha}$ Y $G_{\beta\gamma}$ POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE SACAROSA.

Las proteínas $G_{s\alpha}$ utilizadas en el ensayo de asociación con $G_{\beta\gamma}$ se sintetizan y se cuantifican como se describe en *Materiales y Métodos*, sólo que en este caso se usa 35 [S]-metionina de mayor actividad específica (0,6 μ M, 2×10^6 cpm/pmol).

El ensayo de asociación de G_{α} con $G_{\beta\gamma}$ se realiza como está descrito

en Denker y cols. (1992). El protocolo experimental es el siguiente: se toman 7,5 μ l del lisado de reticulocitos que contiene la proteína G_{sa} radioactiva y se incuban con 5 pmoles (228 ng) de $G_{\beta\gamma}$ purificada de cerebro de bovino, por 24 horas a 4°C. Los 7,5 μ l restantes se incuban sin $G_{\beta\gamma}$ en las mismas condiciones. Ambas incubaciones se realizan en 40 μ l de un medio que contiene: Tris-HCl pH 8,0 50 mM; EDTA 10 mM; DTT 1 mM y GDP- β -S 1 mM. Luego de la incubación se agregan 60 μ l de una solución que contiene Tris-HCl 20 mM pH 8,0; EDTA 1 mM; 10 mM β -mercaptoetanol; lubrol 0,1% y GDP- β -S 1 μ M (solución A), y citocromo C 1,6 mg/ml y BSA 0,5 mg/ml. Se aplica esta mezcla sobre un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 20 % (p/p) en solución A. Las muestras son centrifugadas a 41.000 rpm durante 17 horas en un rotor Sorvall SW50L. Terminada la centrifugación, se colectan fracciones de 150 μ l. La radioactividad incorporada en proteínas se analiza por precipitación con TCA al 10% de una alícuota de 50 μ l de cada fracción y posterior filtración en filtros de fibra de vidrio. Para analizar la distribución de la proteína estandar BSA en el gradiente, se precipitan alícuotas de 50 μ l de cada fracción con 0,5 ml de acetona a 4°C. El precipitado se resuspende en 30 μ l de amortiguador de Laemmli y se somete a electroforesis en geles desnaturantes de poliacrilamida al 12,5 %. El gel es teñido con azul de Coomassie y la banda de BSA es analizada por densitometría. La distribución del citocromo C en el gradiente se analiza por densidad óptica a 430 nm. La concentración de sacarosa en cada fracción del gradiente se calcula a partir de la lectura del índice de refracción de alícuotas de 10 μ l de cada fracción del gradiente.

R. DETERMINACION DE PROTEINAS.

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

S. TRATAMIENTO DE LOS DATOS.

Cada experimento de esta *Tesis* fué repetido entre 1 y 5 veces, en idénticas condiciones. En cada caso se muestran los resultados de uno sólo de los experimentos, representativo del conjunto, y los valores con que se construyeron los gráficos corresponden al promedio entre los duplicados o triplicados de un mismo experimento. En ningún caso la desviación standard entre los valores es superior al 10% del promedio. En el caso de las tablas, los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar de los duplicados o triplicados de un mismo experimento, representativo de 2 o más experimentos iguales.

RESULTADOS

A. EFECTO DE POLICATIONES.

1. Estudios del efecto de policationes sobre la actividad adenililciclase de oocitos de *Xenopus laevis*.

Resultados preliminares del laboratorio indicaron que polilisina y algunos compuestos policatiónicos tales como poliornitina y espermina eran capaces de afectar la actividad de varias enzimas presentes en la membrana de los oocitos, incluyendo la adenililciclase (Gatica y cols., 1987). En un intento por determinar la naturaleza de dicho efecto sobre la adenililciclase de oocitos de *Xenopus laevis* se realizaron los experimentos que a continuación se detallan:

1.1. Efecto de polilisina sobre la actividad adenililciclase medida en la presencia de diferentes activadores.

El ión fluoruro y los análogos no hidrolizables de GTP tales como el GTP- γ -S y el GppNHp activan la adenililciclase específicamente a través de la proteína G_s (Birnbaumer y cols., 1990). Por otro lado, el diterpeno forskolina activa a la adenililciclase directamente y en ausencia de nucleótidos de guanina (Seamon y Daly, 1983). En la figura 1 se muestra el efecto de concentraciones crecientes de polilisina sobre la actividad adenilil ciclase medida en presencia de GTP- γ -S y progesterona (A), fluoruro (B) y forskolina (C). En A y B de la figura 1, se mide la actividad de la adenililciclase en la presencia de GTP- γ -S y fluoruro de sodio respectivamente. Se observa que concentraciones de polilisina entre 10 y 100 μ M son estimuladoras de la actividad, mientras que concentraciones mas altas de polilisina son inhibitoras de la actividad de la enzima. En la parte A de la figura se observa también que en presencia de progesterona, el efecto estimulador de la polilisina es inhibido. En la parte C de la figura 1 la actividad de la adenililciclase es medida en presencia de forskolina. En

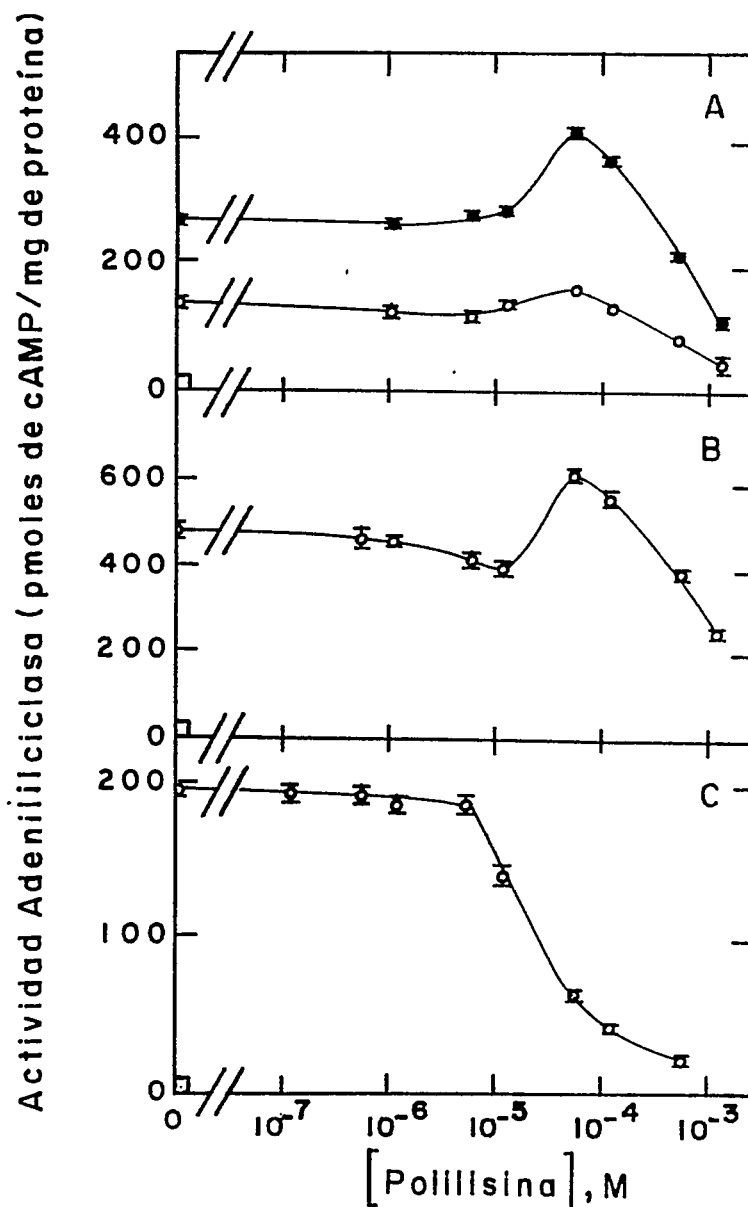


Figura 1. Efecto de polilisina sobre la activación de la adeniliclasa de oocitos por GTP- γ -S, fluoruro y forskolina.

La actividad de la adeniliclasa se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de [α -³²P]-ATP 0,13 mM (677 cpm/pmol en A y 848 cpm/pmol en B y C) y 2,0 mg/ml de proteína en el medio de incubación. Las incubaciones se realizan por 30 minutos a 32°C. En A se agregó al medio de incubación GTP- γ -S 14 μ M (○,●) y progesterona 5 μ M (○). En B la actividad se mide en presencia de fluoruro 10 mM y en C se agrega al medio forskolina 150 μ M. (□) indica el valor de la actividad basal para cada uno de los tres experimentos. Cada punto es determinado por triplicado.

este caso el efecto de polilisina es claramente distinto al anterior debido a que sólo se observa un efecto inhibitor sobre los 10 μM del péptido. Del análisis de este experimento se desprende que el efecto estimulador de polilisina sobre la adenililciclase se observa únicamente cuando la enzima es estimulada a través de G_s .

1.2. Efecto de polilisina sobre la concentración de GTP- γ -S necesaria para obtener la mitad del efecto máximo.

Los resultados de la figura 1A fueron obtenidos usando las condiciones óptimas para la estimulación de la adenililciclase por GTP- γ -S (14 μM del nucleótido y a 5 mM de MgCl_2). Sin embargo si el mismo experimento de la figura 1A es realizado a concentraciones limitantes de GTP- γ -S, por ejemplo 0,11 μM , el efecto estimulador de polilisina es mayor que el previamente observado. Este resultado se muestra en la figura 2. En este experimento el efecto estimulador de 50 μM de polilisina sobre la actividad adenililciclase es de tres veces. Además, al igual que en la figura 1A, también se observa el efecto inhibitor de la progesterona, sobre la capacidad de la polilisina de estimular la actividad adenililciclase. Estos experimentos indican que progesterona parece interferir con la activación de G_s .

El análisis de los experimentos de la figura 1 y 2 nos sugirió que polilisina podía afectar la afinidad de G_s por GTP- γ -S. Esta interpretación fue confirmada por el experimento mostrado en la figura 3. En esta figura se muestra el efecto de polilisina 120 μM sobre la actividad de la adenililciclase de oocitos de *Xenopus laevis*, medida a diferentes concentraciones de GTP- γ -S. Se observa un significativo desplazamiento hacia la izquierda causado por la polilisina en la curva de activación por el análogo no hidrolizable de GTP. Un posterior análisis de dobles recíprocos de la formación de cAMP versus la concentración de GTP- γ -S, muestra que mientras la cantidad de producto producido a concentraciones

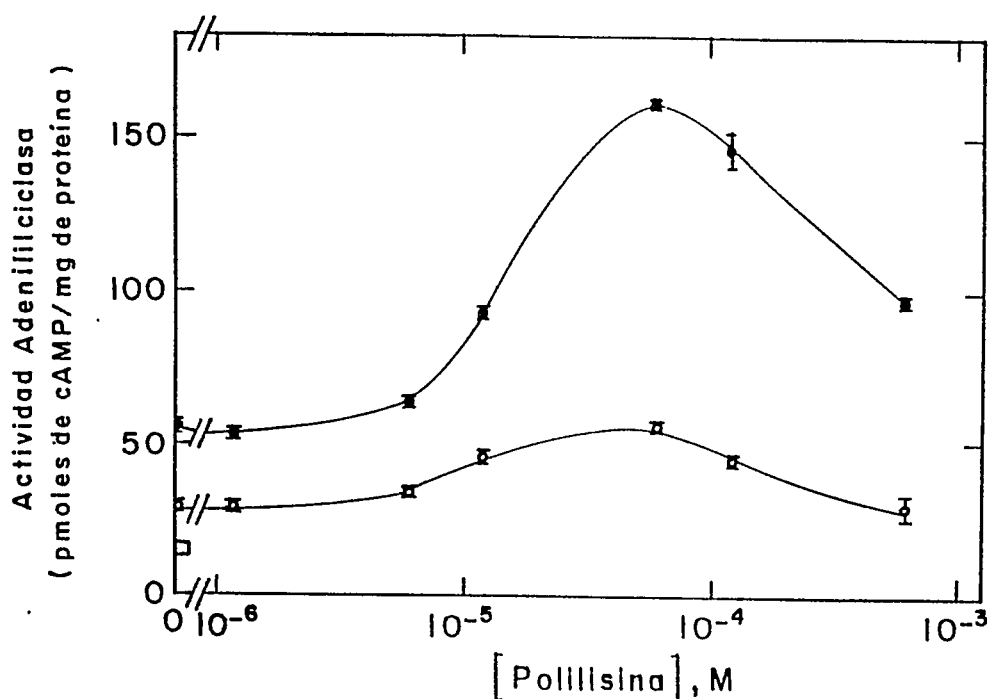


Figura 2. Efecto de polilisina sobre la activación de la adenililciclase a concentraciones sublimitantes de GTP- γ -S.

La actividad de la adenililciclase se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de [α -³²P]-ATP 0,1 mM (594 cpm/pmol); 2,0 mg/ml de proteína en el medio de incubación, GTP- γ -S 0,108 μ M y en ausencia (●) o presencia (○) de progesterona 5 μ M. Las incubaciones se realizan por 30 minutos a 32°C. (□) indica el valor de la actividad basal. Cada punto fue determinado por triplicado.

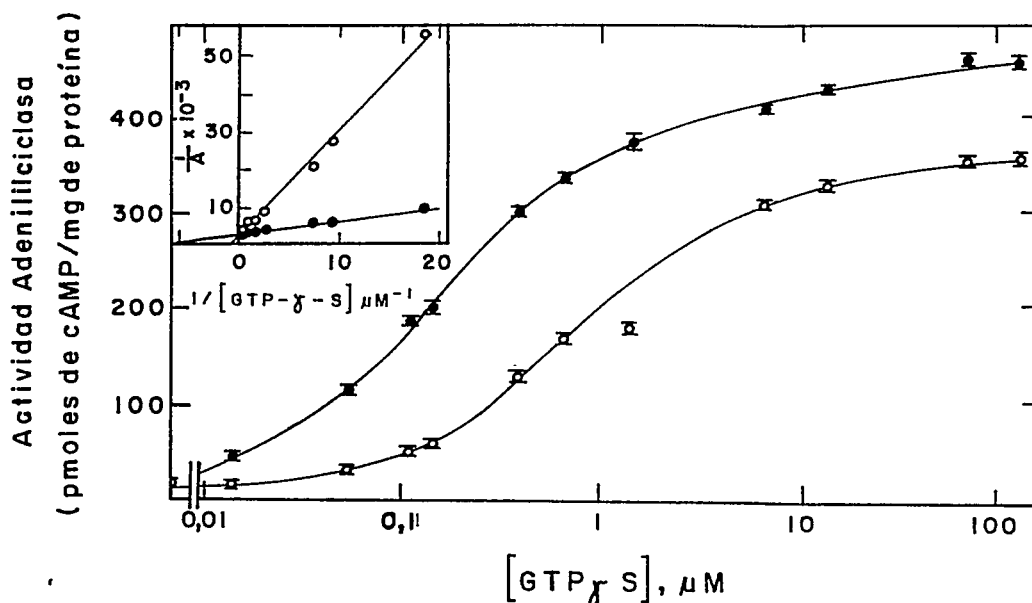


Figura 3. Efecto de polilisina sobre la activación de la adeniliciclasa por GTP- γ -S.

La actividad de la adeniliciclasa se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de [α - 32 P]-ATP 0,1 mM (837 cpm/pmol) 2,0 mg/ml de proteína en el medio de incubación y en ausencia (○) o presencia (●) de polilisina 120 μ M. Las incubaciones se realizan por 35 minutos a 32°C. En el recuadro de la figura se muestra la representación gráfica de los datos obtenidos según el análisis de dobles recíprocos. Cada punto es determinado por triplicado.

TABLA 1

Determinación de la $K_{0,5}$ para GTP- γ -S en presencia o ausencia de polilisina 120 μ M.

	$K_{0,5}$ (μ M)	A_{max} (pmoles cAMP/mg de proteína)
Control	1,14	404
Polilisina	0,15	403

Los valores de $K_{0,5}$ se obtienen a partir de los datos de la figura 3, como se describe en *Materiales y Métodos*. $K_{0,5}$ es la concentración de GTP- γ -S necesaria para obtener la mitad del efecto máximo y A_{max} es la cantidad de producto obtenida a concentraciones saturantes de GTP- γ -S.

saturantes de GTP- γ -S (A_{max}) no varía en forma significativa, la concentración de GTP- γ -S necesaria para obtener la mitad del efecto máximo ($K_{0,5}$), es reducida de 1,14 μ M a 0,15 μ M (recuadro de la figura 3 y tabla 1).

1.3. Efecto de espermina sobre la actividad adenililciclase de oocitos de *Xenopus laevis*.

De manera análoga a la mostrada con anterioridad para polilisina, se estudió el efecto de concentraciones crecientes de espermina sobre la actividad de la adenililciclase de oocitos de *Xenopus laevis*. En la figura 4 se muestra el efecto de la poliamina sobre la actividad de la enzima medida en presencia de varios activadores. En la parte A de la figura 4, en la que la actividad de la adenililciclase es medida en la presencia de concentraciones limitantes de GTP- γ -S (0,108 μ M), se observa que concentraciones de espermina entre 0,1 y 5 mM son estimuladoras de la actividad, mientras que concentraciones mas altas de la poliamina son inhibitoras. En la parte B la actividad de la adenililciclase es medida en presencia de fluoruro, y también se observa un efecto estimulador de espermina pero esta vez a concentraciones por sobre 1 mM de la poliamina. En la parte C la actividad de la adenililciclase es medida en presencia de forskolina. En este caso el efecto de espermina es semejante al de polilisina, debido a que no se observa ningún efecto estimulador de la poliamina, mientras que se hace evidente una inhibición a concentraciones de espermina por sobre 1mM. Estos experimentos indican que al igual que en el caso de la polilisina, la espermina estimula a la adenililciclase actuando específicamente a través de G_s .

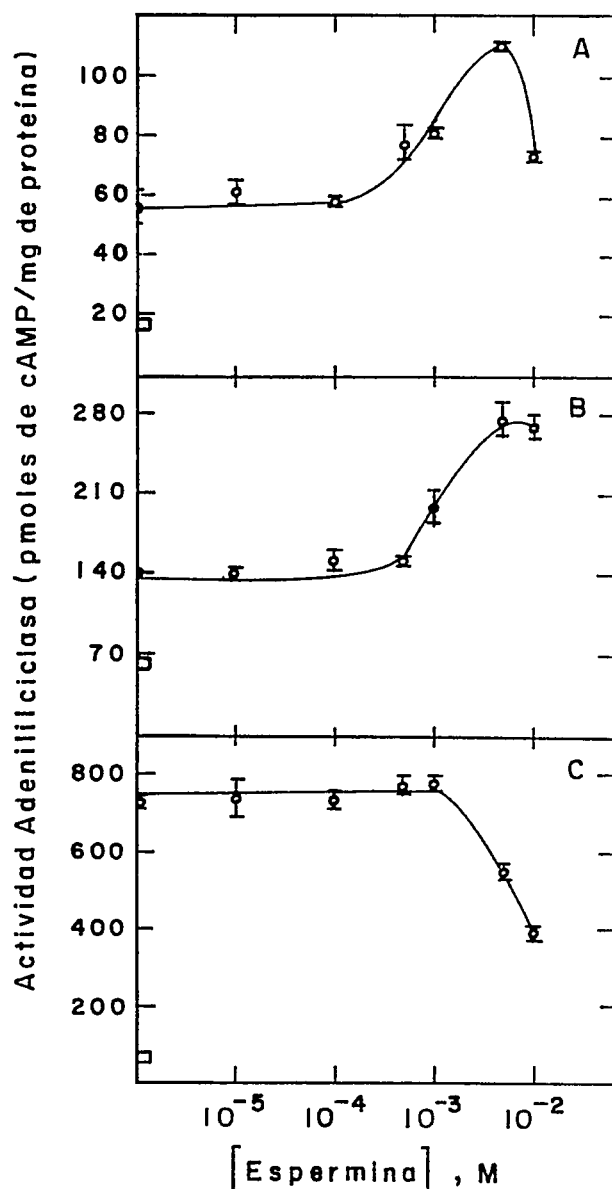


Figura 4. Efecto de espermina sobre la activación de la adeniliciclasa de oocitos por GTP- γ -S, fluoruro y forskolina.

La actividad de la adeniliciclasa se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de [α -³²P]-ATP 0,13 mM (395 cpm/pmol en A, 600 cpm/pmol en B y 748 cpm/pmol en C) y 2,0 mg /ml de proteína en el medio de incubación en A, 1,3 en B y 1,2 en C. Las incubaciones se realizan a 32°C por 30 minutos en A y B, y por 25 minutos en C. En A se agrega al medio de incubación GTP- γ -S 0,108 μ M. En B la actividad se mide en presencia de fluoruro 10 mM y en C se agrega al medio foskolina 150 μ M. (□) indica el valor de la actividad basal para cada uno de los tres experimentos. Cada punto es determinado por triplicado.

1.4. Efecto de espermina sobre la concentración de GTP- γ -S necesaria para obtener la mitad del efecto máximo.

De manera análoga a los estudios realizados con polilisina, se analizó el efecto de espermina sobre la afinidad de GTP- γ -S por G_s . En la figura 5 se muestra el efecto de espermina 1 mM sobre la actividad de la adenilciclase de oocitos de *Xenopus laevis*, medida a diferentes concentraciones de GTP- γ -S. Se observa que espermina produce un significativo desplazamiento hacia la izquierda de la curva de activación por el análogo no hidrolizable de GTP. Un posterior análisis de dobles recíprocos de la formación de cAMP en función de la concentración de GTP- γ -S, muestra que mientras la cantidad de producto producido a concentraciones saturantes de GTP- γ -S (A_{max}) no es afectada, la $K_{0,5}$ (concentración de GTP- γ -S necesaria para obtener la mitad del efecto máximo), es reducida de 0,83 μ M a 0,16 μ M (recuadro de la figura 5 y tabla 2).

1.5. Efecto de otros policationes sobre la actividad adenilciclase de oocitos de *Xenopus laevis*.

Pareció necesario investigar si otros homopolímeros constituídos por aminoácidos básicos tenían efectos similares a los de la polilisina. Se estudió por este motivo, el efecto de poliornitina y poliarginina sobre la actividad de la adenilciclase de oocitos de *Xenopus laevis*.

1.5.1. Efecto de poliornitina.

En la tabla 3 se puede observar que altas concentraciones de poliornitina (22 y 44 μ M) son inhibidoras de la actividad adenilciclase tanto basal, como estimulada por GppNHp. Sin embargo, a bajas concentraciones (4,4 μ M), la poliornitina estimula notoriamente la actividad de la adenilciclase medida en presencia de GppNHp. No se observó efecto de poliornitina a bajas concentraciones sobre la actividad basal de la enzima.

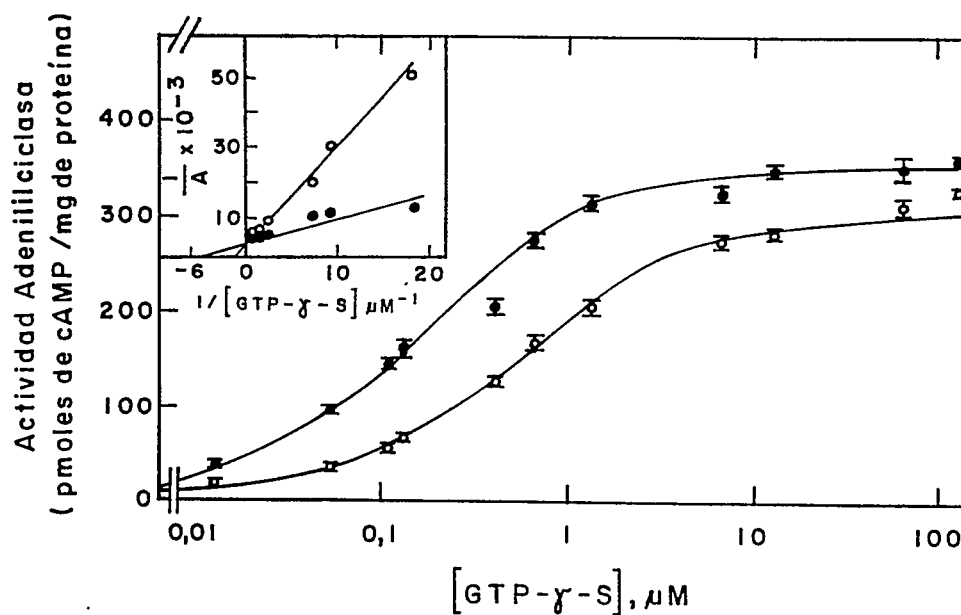


Figura 5. Efecto de espermina sobre la activación de la adeniliciclasa por GTP- γ -S.

La actividad de la adeniliciclasa se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de [α - 32 P]-ATP 0,13 mM (872 cpm/pmol), 2,0 mg/ml de proteína en el medio de incubación y con (●) o sin (○) espermina 1mM. Las incubaciones se realizan por 30 minutos a 32°C. En el recuadro de la figura se muestra la representación gráfica de los datos obtenidos según el análisis de dobles recíprocos. Cada punto es determinado por triplicado.

TABLA 2

Determinación de la $K_{0,5}$ para GTP- γ -S en presencia o ausencia de espermina 1 mM.

	$K_{0,5}$ (μ M)	A_{max} (pmoles cAMP/mg de proteína)
Control	0,83	323
espermina	0,16	328

Los valores de $K_{0,5}$ se obtienen a partir de los datos de la figura 5 como se describe en *Materiales y Métodos*. $K_{0,5}$ es la concentración de GTP- γ -S necesaria para obtener la mitad del efecto máximo y A_{max} es la cantidad de producto obtenida a concentraciones saturantes de GTP- γ -S.

TABLA 3

Efecto de poliornitina sobre la activación de la adenilciclase de oocitos de *Xenopus laevis* por GppNHp.

Experimento	Poliornitina (μM)	GppNHp 25 μM	Actividad adenilciclase (pmoles cAMP/mg de proteína)
1	-	-	25,8 \pm 0,5
	-	+	44,5 \pm 1,1
	22	-	20,4 \pm 0,5
	22	+	32,9 \pm 0,8
2	-	-	45,5 \pm 2,6
	-	+	97,2 \pm 2,6
	4,4	-	41,3 \pm 2,2
	44,0	-	25,5 \pm 2,7
	4,4	+	143,7 \pm 13,3
	44,0	+	57,5 \pm 3,2

La actividad de la adenilciclase se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de [α - ^{32}P]-ATP 0,1 mM (655 cpm/pmol en el experimento 1 y 746 cpm/pmol en el 2, y 1,3 mg /ml de proteína en el experimento 1 y 1,7 mg/ml en el 2. Las incubaciones son realizadas por 30 minutos a 32°C. Cada punto es determinado por triplicado.

1.5.2. Efecto de poliarginina.

Se estudió el efecto de poliarginina sobre la actividad de la adenililciclase de oocitos de *Xenopus laevis*. A diferencia de lo encontrado con los policationes mostrados con anterioridad, se encontró que poliarginina causa sólo inhibición de la actividad de la adenililciclase cuando es activada a través de G_s , con GTP- γ -S. En la figura 6 se muestra que poliarginina produce el efecto inhibitor a concentraciones superiores a 3 μ M del péptido.

1.6. Efecto de polilisina sobre los requerimientos por ión Mg^{2+} de la adenililciclase de oocitos de *Xenopus laevis*.

Como se discutió en la *Introducción*, el complejo hormona receptor (Brandt y Ross, 1986) y algunos compuestos que imitan en su acción a los receptores, como el mastoparín (Higashijima y cols., 1990), afectan los requerimientos de Mg^{2+} necesarios para la activación de las proteínas G. Los experimentos realizados en la figura 7 indican que polilisina afecta los requerimientos por ión Mg^{2+} de la reacción catalizada por la adenililciclase del oocito. Los experimentos fueron realizados a concentraciones limitantes de GTP- γ -S (0,108 μ M). En el experimento control, sin polilisina, hay un pequeño pero significativo incremento de la actividad a un valor de concentración de Mg^{2+} libre de aproximadamente 5 nM. En la presencia de polilisina, el incremento de la actividad a bajas concentraciones de ión Mg^{2+} libre es mayor. A una concentraciones de Mg^{2+} libre de 5 mM, se observa un segundo incremento en la actividad de la adenililciclase. A esta de concentración Mg^{2+} , la actividad de la adenililciclase es estimulada de una manera similar en presencia o ausencia de polilisina. La figura también presenta los resultados obtenidos agregando al medio de ensayo la progesterona. Es notorio que la hormona es inhibitora a todas las concentraciones de Mg^{2+} ensayadas y no afecta significativamente la afinidad aparente por el metal. Sin embargo a altas concentraciones de Mg^{2+} , la

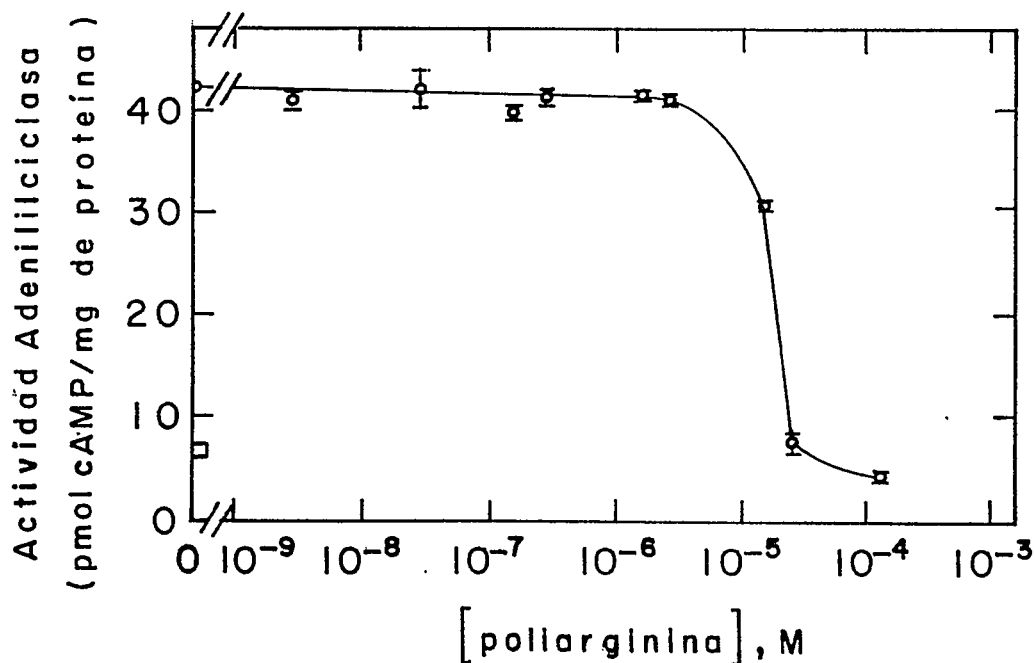


Figura 6. Efecto de poliarginina sobre la activación de la adenililciclase de oocitos por GTP- γ -S.

La actividad de la adenililciclase se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de [α -³²P]-ATP 0,13 mM (916 cpm/pmol), GTP- γ -S 13,5 μ M y 2,0 mg/ml de proteína en el medio de incubación. Las incubaciones son realizadas por 25 minutos a 32°C. (\square) indica el valor de la actividad basal. Cada punto es determinado por triplicado.

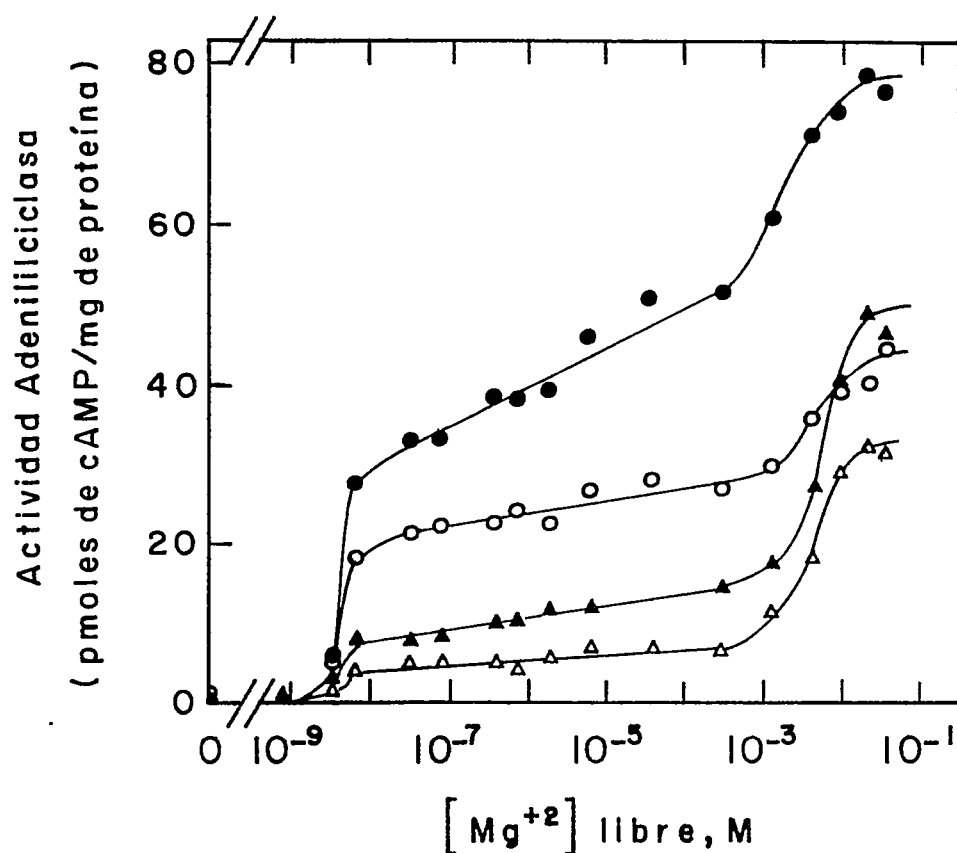


Figura 7. Efecto de polilisina sobre la activación de la adenililciclase por ion Mg²⁺.

La actividad de la adenililciclase se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de [α -³²P]-ATP 0,13 mM (885 cpm /pmol); 2,0 mg /ml de proteína y GTP- γ -S 0,108 μ M en el medio de incubación y con (●,○) o sin (▲,△) polilisina 60 μ M. En las curvas (○,△) se agrega progesterona a una concentración de 5 μ M. Las incubaciones son realizadas por 39 minutos a 32 °C. La concentración de Mg²⁺ libre se calcula como se describe en *Materiales y Métodos*. Cada punto es el resultado de un ensayo. Este experimento fue repetido tres veces, obteniéndose siempre el mismo resultado.

presencia de la hormona disminuye la estimulación de la actividad de la adenililciclase causada por polilisina. Es probable que el efecto observado refleje la acción del Mg^{2+} libre en la activación de G_s de la membrana del oocito. Sin embargo, es necesario ser cuidadoso con la interpretación de estos resultados, pues debe también considerarse los requerimientos de la adenililciclase por Mg^{2+} libre y el complejo con el sustrato ATP en forma de $MgATP^{2-}$ (Somkuti y cols., 1982). Sin embargo, del análisis de la figura 7, se desprende que en el intervalo comprendido entre 5 y 10 nM de Mg^{2+} libre, es todavía observable el efecto inhibitor de la progesterona. Esto apoya nuestra presunción de que el efecto de polilisina y Mg^{2+} sobre la adenililciclase refleja mayoritariamente la acción de éstos sobre G_s . Con respecto a la variación de la concentración del complejo $MgATP^{2-}$ en el experimento, esta osciló entre 0,15 nM (a 40 pM de Mg^{2+} libre) y 60 μ M (a 30 mM de Mg^{2+} libre). A valores de concentraciones de $MgATP^{2-}$ inferiores a 10 nM (3 nM de Mg^{2+} libre), no se observa actividad apreciable de adenililciclase en ninguna de las condiciones ensayadas.

1.7. Efecto de polilisina sobre la cinética de reacción de formación del cAMP.

Como se ha observado para otras adenililciclasas (Iyengar y Birnbaumer, 1981; Iyengar, 1981) y como fue demostrado con anterioridad para la de oocitos de *Xenopus laevis* (Jordana y cols., 1984), la cinética de la reacción catalizada por la adenililciclase de oocitos en presencia de análogos no hidrolizables de GTP y Mg^{2+} presenta un período inicial de retardo (histeresis).

La figura 8 muestra el efecto de la polilisina sobre la producción de cAMP en el tiempo. Se puede observar que una concentración de polilisina de 60 μ M, en presencia de GTP- γ -S 0,108 μ M y ión Mg^{2+} 5 mM, aumenta significativamente la velocidad en estado estacionario de la reacción con respecto al control sin el policación. En la tabla 4 se muestran los valores

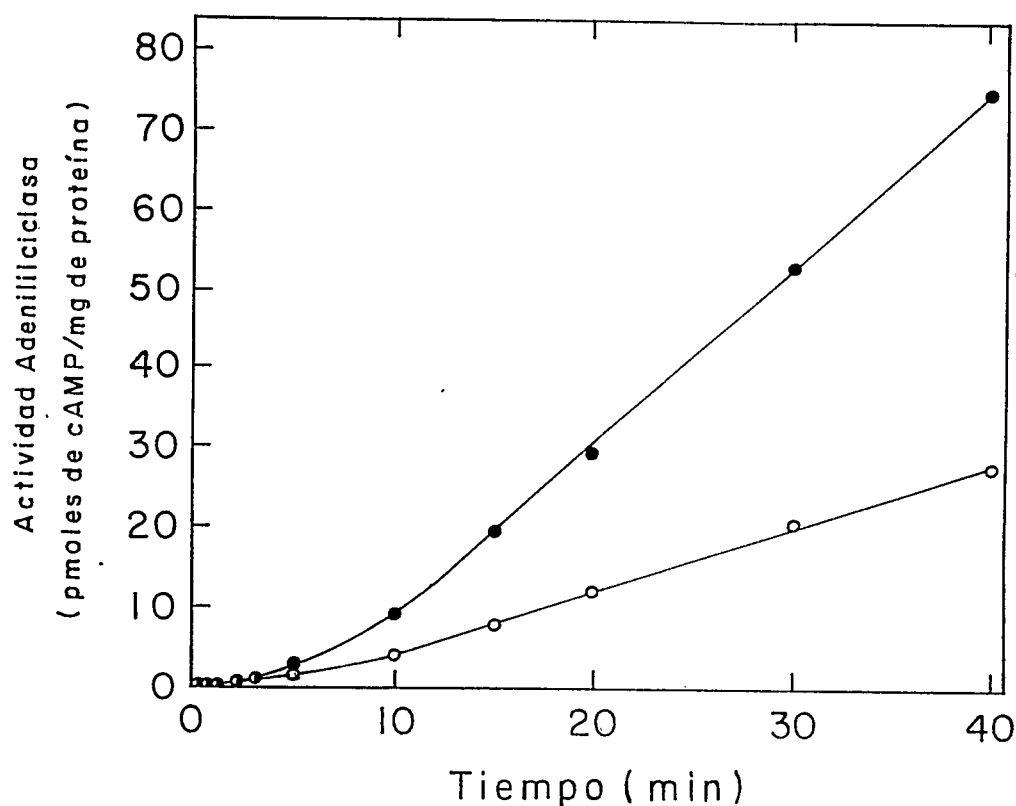


Figura 8. Efecto de polilisina sobre la cinética de formación de cAMP catalizada por la adenililciclase de oocitos de *Xenopus laevis*.

La formación de cAMP en el tiempo se mide en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*, en presencia de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 0,13 mM (771 cpm/pmol); GTP- $\gamma\text{-S}$ 0,108 μM ; 2,0 mg/ml de proteína y con (●) o sin (○) polilisina 60 μM . La reacción se inicia con la adición de la enzima y a cada tiempo indicado se retira 0,1 ml de la mezcla de incubación. La reacción se detiene tal como se describe en *Materiales y Métodos*. Las incubaciones se realizan a 32°C.

TABLA 4

Efecto de polilisina sobre los parámetros cinéticos de la reacción catalizada por la adenililciclasa de oocitos de *Xenopus laevis* activada por GTP- γ -S.

polilisina 60 μ M	$t_{\frac{1}{2}}$ de activación (min)	τ aparente (min ⁻¹)	Vss (pmoles cAMP/ mg proteína/min)
-	3,0	0,23	0,78
+	4,3	0,16	2,22

Los datos usados para calcular el τ aparente (constante de velocidad aparente para alcanzar el estado estacionario) y el $t_{\frac{1}{2}}$ de activación de acuerdo a la ecuación de Neet y Ainslie (1980), son extraídos de la figura 8. Los valores de velocidad en el estado estacionario (Vss) son calculados a partir de las pendientes de las curvas de progreso de la misma figura.

de estas velocidades. Como se ha descrito en el tratamiento teórico del fenómeno de histeresis de reacciones catalizadas por enzimas, la longitud del período de retardo puede ser estimada determinando el $t_{\frac{1}{2}}$ de activación de la reacción (Neet y Ainslie, 1980). A partir del valor del $t_{\frac{1}{2}}$ se puede calcular la constante de velocidad aparente de la reacción τ . En la tabla 4 se muestran los valores de la constante de velocidad de primer orden aparente (τ_{ap}) y el tiempo medio de activación de la enzima ($t_{\frac{1}{2}}$) obtenido de los datos de la figura 8, cuyo cálculo se ha descrito en la sección *Materiales y Métodos*. En ella se puede ver que polilisina produce un aumento del retardo en la cinética de formación del cAMP catalizada por la adenililciclase con respecto al experimento control sin el polication.

2. Estudios del efecto de policationes utilizando subunidades G_q de proteínas G.

Los compuestos policationicos estudiados parecen producir un efecto generalizado sobre varias enzimas de membrana. Esto podría deberse a un efecto directo del polication sobre estas enzimas o bien a un efecto indirecto sobre las propiedades de la membrana plasmática (Gatica y cols., 1987). Para poder resolver entre estas posibilidades se realizó un estudio complementario a los de membrana intacta, utilizando algunas subunidades G_q purificadas de proteínas G.

Para ello se estudió el efecto de polilisina y otros policationes sobre la actividad GTPásica de la subunidad G_q de la proteína G_{i-3} , la subunidad G_q de la transducina y sobre un tipo de proteína ras recombinante disponible en el laboratorio. Es necesario destacar el interés de haber hecho estos experimentos con G_{sq} purificada de oocitos de *Xenopus laevis*. Pero la falta de un adecuado protocolo de expresión y purificación para esta proteína al momento de realizar dichos experimentos, nos imposibilitó del disponer de ella.

2.1. Efecto de compuestos policatiónicos sobre la actividad GTPásica de la subunidad G_q de la proteína G_{i-3} .

La subunidad G_q humana de la proteína G_{i-3} (G_{i-3q}) fue producida en células Sf9 de insectos por infección con baculo virus recombinante y posteriormente purificada a homogeneidad en el laboratorio del Dr. Lutz Birnbaumer (Graf y cols., 1992).

En una primera etapa intentamos medir el efecto de polilisina sobre la cinética de unión de [35 S]-GTP- γ -S a la proteína G_{i-3q} . Para ello se analizó la radioactividad unida a la proteína sobre filtros de nitrocelulosa. Sin embargo y debido a los altos valores obtenidos con los controles no enzimáticos, en presencia de polilisina (causados probablemente por unión inespecífica del [35 S]-GTP- γ -S al policatión), se decidió estudiar el efecto de los compuestos policatiónicos sobre la actividad GTPásica de G_{i-3q} .

2.2. Efecto de polilisina sobre la cinética de reacción de formación de fosfato.

La figura 9 muestra el efecto de polilisina 50 μ M sobre la cinética de formación de fosfato catalizada por 260 μ g de G_{i-3q} . Polilisina estimula significativamente la actividad GTPásica de G_{i-3q} con respecto al control sin el policatión. La reacción en presencia o ausencia de polilisina es lineal hasta aproximadamente los 6 minutos.

2.3. Efecto de polilisina sobre la curva de concentraciones crecientes de G_{i-3q} .

La figura 10 muestra el efecto estimulador de 50 μ M polilisina sobre la actividad GTPásica de diferentes concentraciones de G_{i-3q} . La reacción de formación de fosfato es lineal en todo el intervalo de concentraciones de G_{i-3q} estudiada.

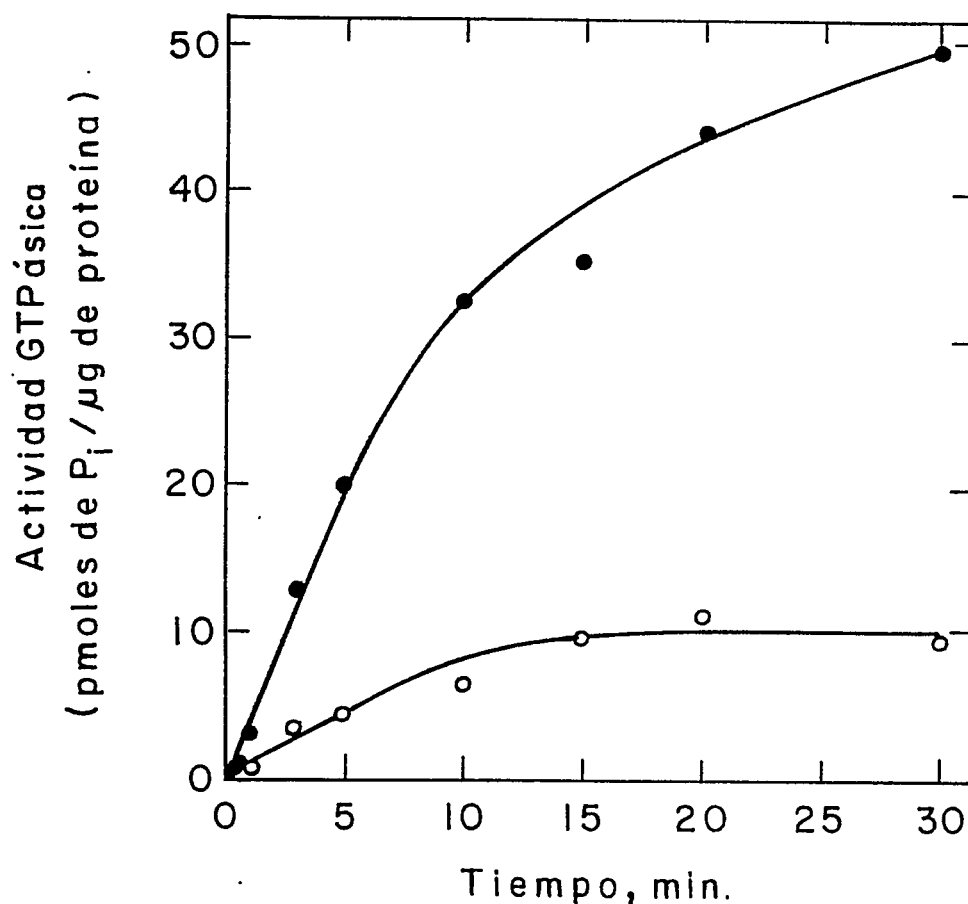


Figura 9. Efecto de polilisina sobre la cinética de formación de $^{32}\text{[P]-PO}_4^{3-}$ catalizada por $G_{i-3\beta}$.

La actividad GTPásica de 0,255 µg de $G_{i-3\beta}$ se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de MgCl_2 5mM; EDTA 1,1 mM y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ 1 µM (5600 cpm/pmol) a 32°C. A los tiempos indicados la reacción se detiene como se describe en *Materiales y Métodos* y se cuantifica el $^{32}\text{[P]-PO}_4^{3-}$ liberado. Las incubaciones se realizan en la presencia (●) o ausencia (○) de polilisina 50 µM.

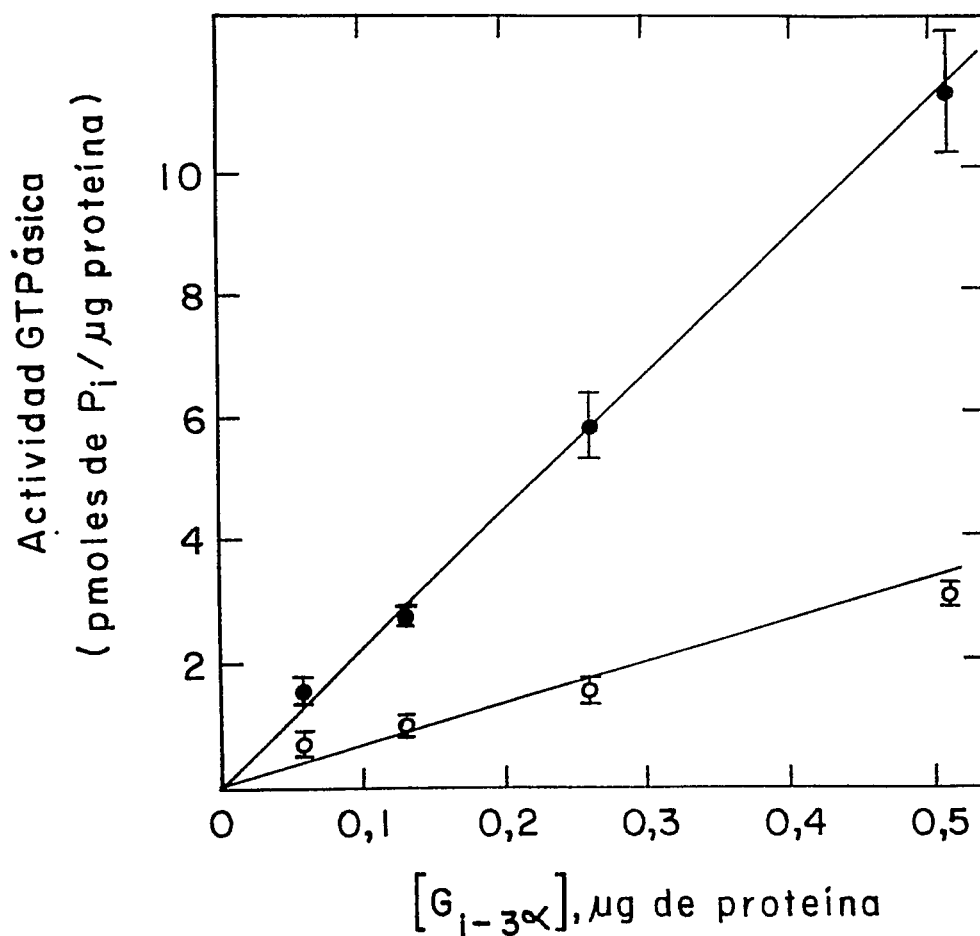


Figura 10. Efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de $G_{i-3\alpha}$.

La actividad GTPásica de concentraciones crecientes de $G_{i-3\alpha}$ se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de $MgCl_2$ 5mM; EDTA 1,1 mM y $[\gamma-^{32}P]$ -GTP 1 μ M (4190 cpm/pmol) durante 6 minutos a 32°C. Las incubaciones se realizan en la presencia (●) o ausencia (○) de polilisina 50 μ M. Cada punto es determinado por duplicado.

2.4. Efecto de concentraciones crecientes de polilisina sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} .

La figura 11A muestra que polilisina estimula la actividad GTPásica de G_{i-30} en un intervalo que se extiende entre 1 μM y 50 μM del péptido. Polilisina 50 μM produce una estimulación máxima de cuatro veces sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} . Este efecto, al igual que el observado sobre la adenililciclase de membrana, es de naturaleza bifásica.

2.5. Efecto de poliornitina, poliarginina y espermina sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} .

Se estudió el efecto de otros policationes sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} . En la figura 11B se muestra el efecto de poliornitina sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} . Este polication produce un efecto similar al de la polilisina sobre la actividad hidrolítica del GTP. Poliornitina estimula esta actividad en el espectro de concentraciones comprendida entre 0,1 y 500 μM , con un máximo de estimulación a los 5 μM . A esta concentración el polication produce una estimulación de cinco veces con respecto al control. En la figura 11C se muestra el efecto de poliarginina sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} . Esta produce un efecto similar al de polilisina y poliornitina sobre esta actividad. Sin embargo el efecto estimulador de poliarginina sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} es menor que el producido por polilisina y poliornitina. Además poliarginina inhibe totalmente la actividad GTPásica de G_{i-30} a una concentración de 25 μM . Sin embargo y a diferencia de lo encontrado en membranas, en relación a la actividad adenililciclase, no se observó efecto de espermina sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} en todo el espectro de concentraciones estudiado (figura 12).

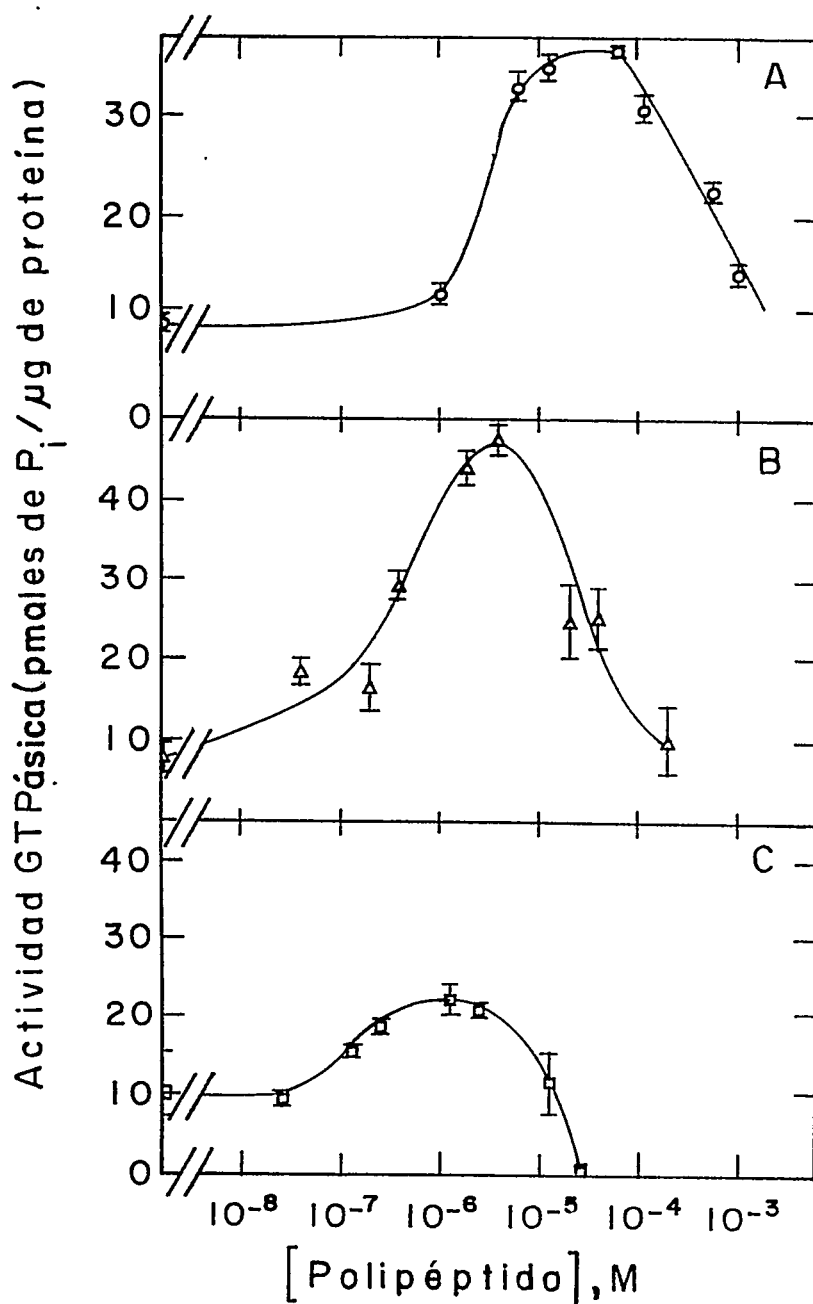


Figura 11. Efecto de policationes sobre la actividad GTPásica de G_{1-30} .

La actividad GTPásica de 0,255 μ g de G_{1-30} se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de polilisina (A), poliornitina (B) y poliarginina (C). El medio de incubación contiene en todos los casos $MgCl_2$ 5mM; EDTA 1,1 mM y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ 1 μ M (6558 cpm/pmol en el experimento A, 2096 cpm/pmol en el experimento B y 1771 cpm/pmol en el C). Las incubaciones se realizan durante 20 minutos a 32°C. Cada punto es determinado por duplicado.

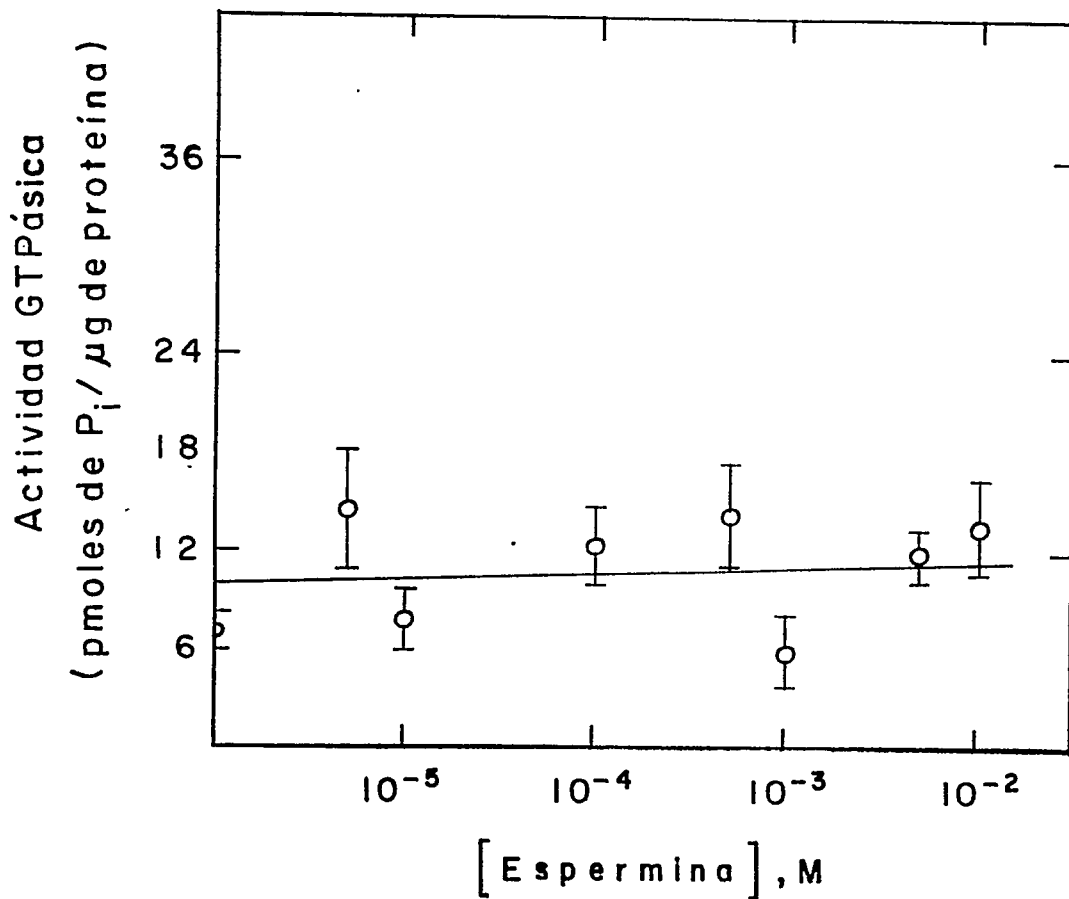


Figura 12. Efecto de espermina sobre la actividad GTPásica de $G_{i-3\alpha}$.

La actividad GTPásica de 0,255 μg de $G_{i-3\alpha}$ se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de espermina 1 mM. El medio de incubación contiene MgCl_2 5mM; EDTA 1,1 mM y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ 1 μM (2096 cpm/pmol). Las incubaciones se realizan durante 20 minutos a 32°C. Cada punto es determinado por duplicado.

2.6. Efecto de polilisina sobre la K_m en la reacción de hidrólisis de GTP catalizada por G_{i-3a} .

La figura 13 muestra el efecto de la polilisina sobre la actividad GTPásica de G_{i-3a} medida a concentraciones crecientes de GTP. Polilisina produce un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de activación por el nucleótido de la actividad GTPásica de G_{i-3a} . El análisis de estos resultados mediante el gráfico de Eadie-Hofstee mostrado en el recuadro de la figura 15, indica que polilisina produce una disminución de la K_m para GTP de 3,8 μM a 1,3 μM (tabla 5). Sin embargo, la polilisina no parece afectar la V_{max} de la reacción (tabla 5). En este sentido, el efecto de polilisina sobre la activación por sustrato de la reacción de hidrólisis de GTP catalizada por G_{i-3a} , es similar al observado sobre la activación por GTP- γ -S de la actividad adenililciclasa de oocitos de *Xenopus laevis*.

2.7. Efecto de polilisina sobre los requerimientos de ión Mg^{2+} en la reacción de hidrólisis de GTP catalizada por G_{i-3a} .

La figura 14 muestra el efecto de polilisina sobre los requerimientos de ión Mg^{2+} en la reacción de hidrólisis de GTP catalizada por G_{i-3a} . Polilisina estimula esta reacción en el intervalo de concentraciones de Mg^{2+} comprendidas entre 10^{-6} y 10^{-2} M. A bajas concentraciones de Mg^{2+} (menores que $1\mu\text{M}$) prácticamente no se observó efecto del polication. Altas concentraciones de Mg^{2+} revierten notoriamente el efecto estimulador de la polilisina. No se observó efecto del polication sobre la afinidad aparente por el metal.

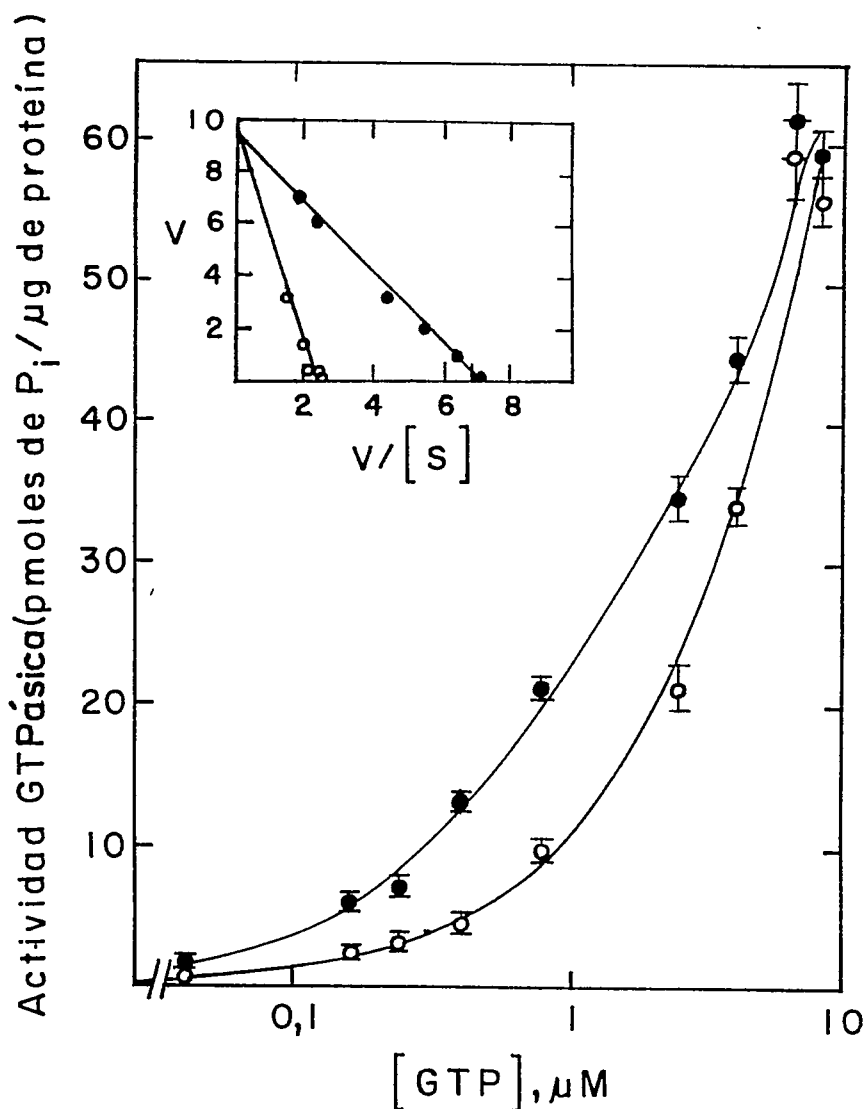


Figura 13. Efecto de polilisina sobre la activación por sustrato de la actividad GTPásica de G_{i-3a} .

La actividad GTPásica de 0,227 μg de G_{i-3a} se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, a diferentes concentraciones de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ (0.041 a 8.2 μM ; 154.709 cpm/pmol a 774 cpm/pmol) y en presencia de MgCl_2 5mM y EDTA 1,1 mM durante 6 minutos a 32°C. Las incubaciones se realizan con (●) o sin (○) polilisina 50 μM . Cada punto es determinado por duplicado. En el recuadro de la figura se muestra la representación gráfica de los datos obtenidos según el análisis de Eadie-Hofstee.

TABLA 5

Efecto de polilisina sobre los parámetros cinéticos de la actividad GTPásica de $G_{i-3\alpha}$.

Polilisina 50 μ M	Km (μ M)	V_{max} (pmoles Pi/ μ g de proteína/minuto)
-	4,28	10,1
+	1,56	10,4

Los valores de Km y Vmax se obtienen a partir del ajuste de los datos de la figura 15 al análisis de Eadie-Hofstee.

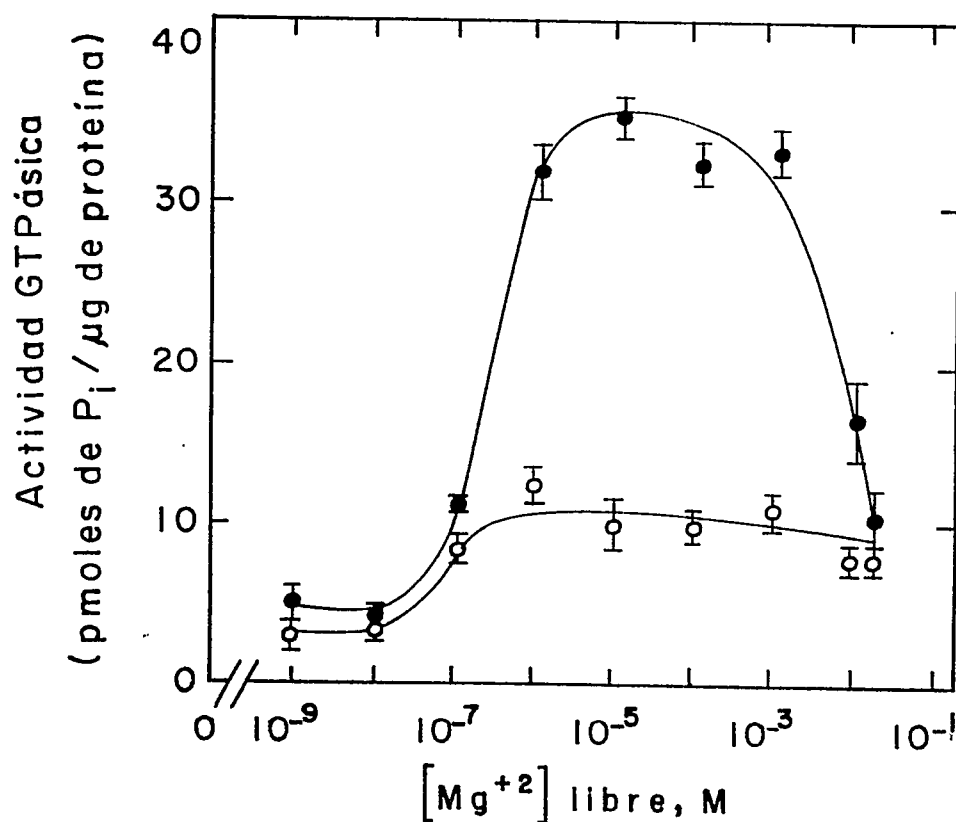


Figura 14. Efecto de polilisina sobre la activación por Mg^{2+} de la actividad GTPásica de $G_{i-3\alpha}$.

La actividad GTPásica de 0,166 μg de $G_{i-3\alpha}$ se mide a distintas concentraciones de Mg^{2+} libre como se describe en *Materiales y Métodos*. Los ensayos se realizan en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ 1 μM (3773 cpm/pmol), durante 20 minutos a 32°C, con (●) o sin (○) polilisina 50 μM . Cada punto se determina por duplicado.

2.8. Efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de otras proteínas que unen GTP.

Se estudió también el efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de otras proteínas que unen e hidrolizan GTP.

2.8.1. Efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de la transducina (G_t).

La figura 15 muestra el efecto de concentraciones crecientes de polilisina sobre la actividad GTPásica de la transducina (G_t). Concentraciones de polilisina de 10 μM estimulan en un 50% la actividad GTPásica de G_t . Sin embargo la actividad específica de la GTPasa de G_t fue un orden de magnitud menor que la observada con G_{i-30} .

2.8.2. Efecto de polilisina sobre los requerimientos de ión Mg^{2+} en la reacción de hidrólisis de GTP catalizada por transducina.

La figura 16 muestra el efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de la transducina medida a concentraciones crecientes de ión Mg^{2+} . Polilisina estimula la actividad GTPásica de la transducina en un intervalo de concentraciones de Mg^{2+} libre de 10 μM a 1 mM. Altas concentraciones de Mg^{2+} revierten el efecto estimulador de polilisina. No se observó efecto de la polilisina sobre los requerimientos de la reacción de hidrólisis de GTP por ión Mg^{2+} .

2.8.3. Efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de H-ras.

La figura 17 muestra el efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica del producto del protooncogén H-ras producido y purificado a partir de *Escherichia coli*. Polilisina 5 μM produce una estimulación máxima de un 25% de la actividad GTPásica de esta proteína. Concentraciones de polilisina 100 μM y mayores son inhibitoras de la actividad GTPásica de la proteína H-ras.

La figura 18 muestra el efecto de polilisina 5 μM sobre la cinética de producción de fosfato a partir de GTP, catalizada por H-ras. La reacción

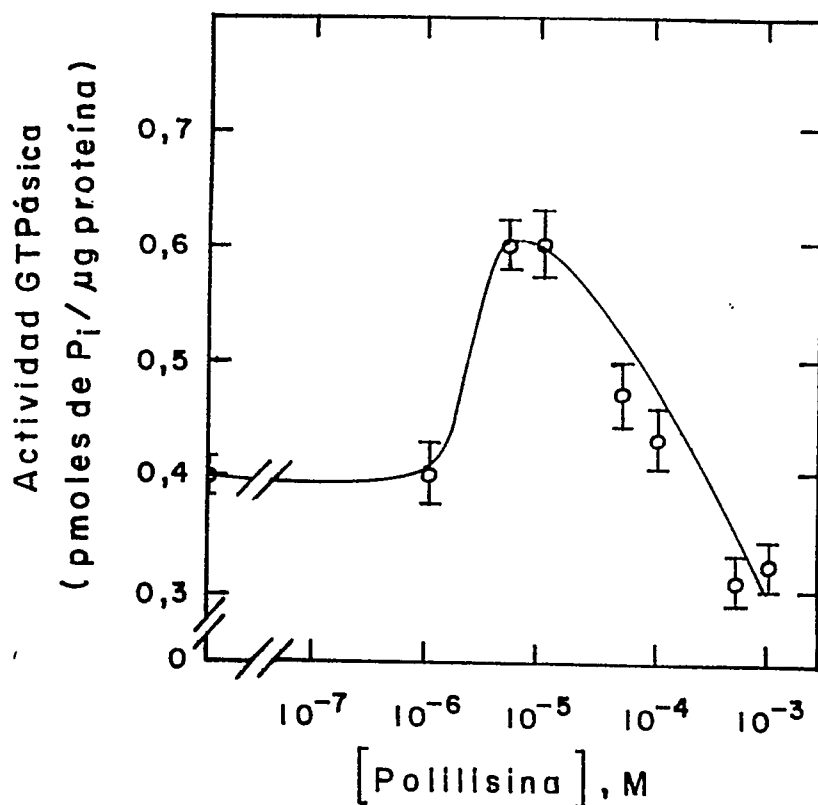


Figura 15. Efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de la transducina.

La actividad GTPásica de 6,8 μg de transducina de bovino pura se mide como se describe en *Materiales y Métodos*, en presencia $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ 1 μM (1330 cpm/pmol) y Mg^{2+} libre 1,1 mM. La actividad se determina durante 20 minutos a 32°C. Cada punto es un promedio de duplicados.

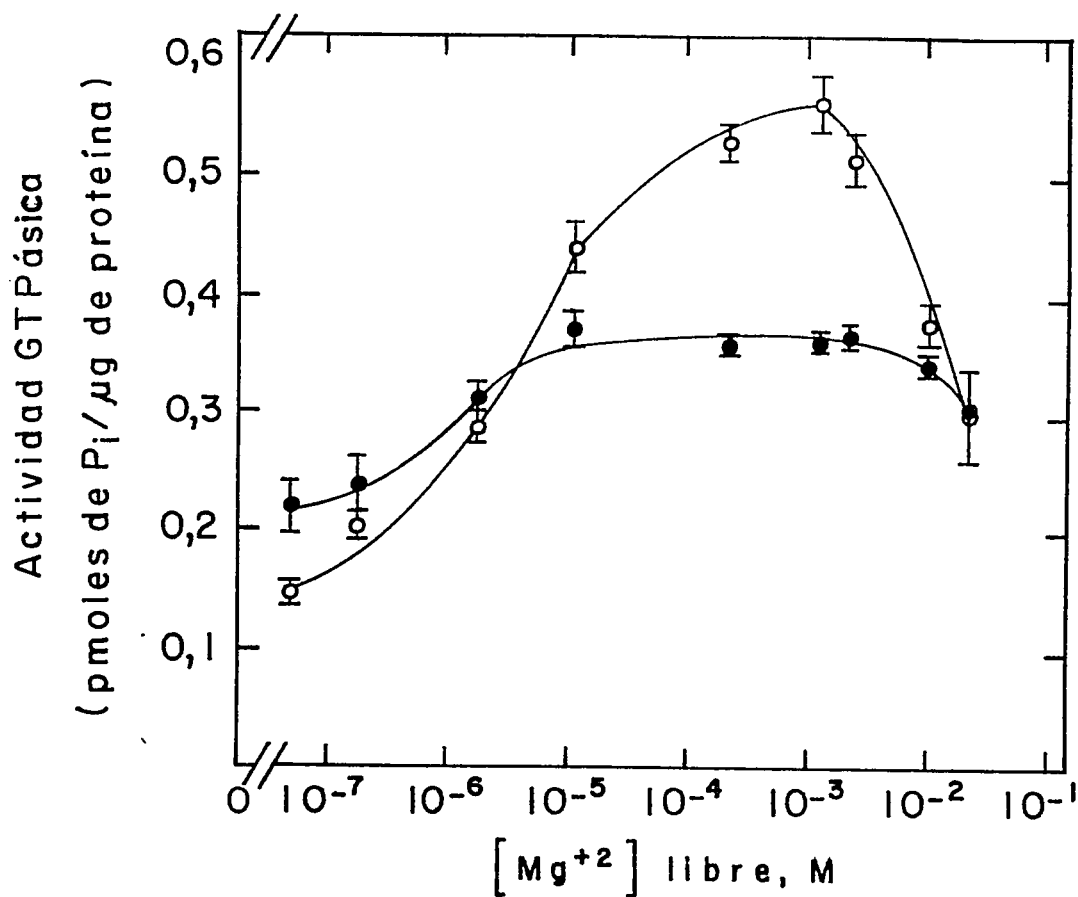


Figura 16. Efecto de polilisina sobre la activación por Mg^{2+} de la actividad GTPásica de la transducina.

La actividad GTPásica de 6,8 μg de transducina se mide a distintas concentraciones de Mg^{2+} libre, como se describe en *Materiales y Métodos*, en un medio que contiene $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ 1 μM (2125 cpm/pmol). Las incubaciones se realizan durante 20 minutos a 32°C, con (○) y sin (●) polilisina 10 μM . Cada punto es determinado por duplicados.

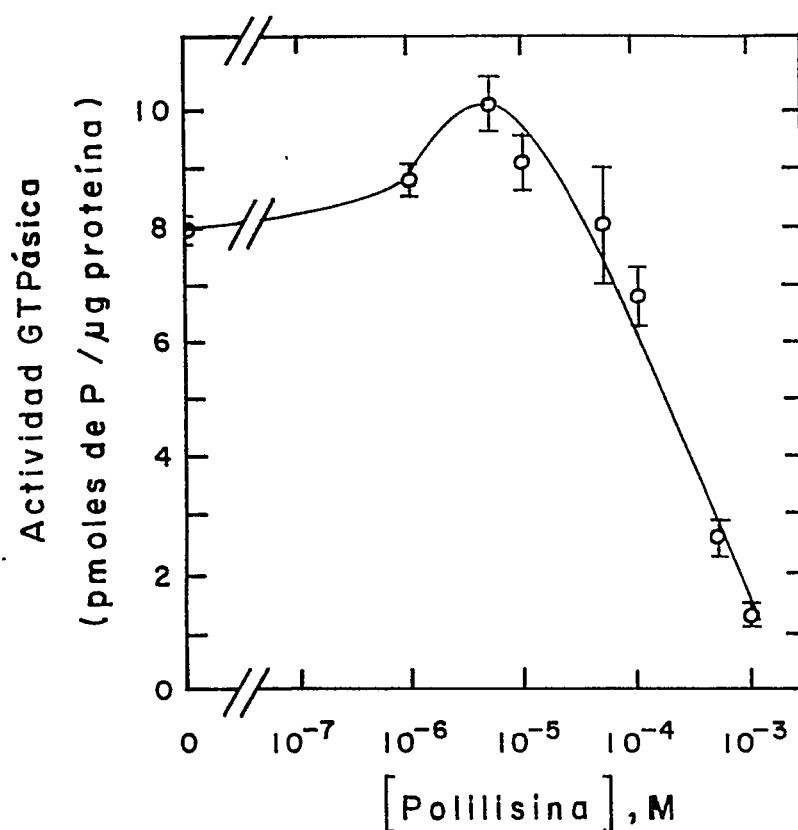


Figura 17. Efecto de polilisina sobre la actividad GTPásica de H-ras.

La actividad GTPásica de 1,6 μg de H-ras, se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ 1 μM (5500 cpm/pmol); MgCl_2 5mM y EDTA 1,1 mM durante 40 minutos a 32°C. Cada punto es determinado por duplicado.

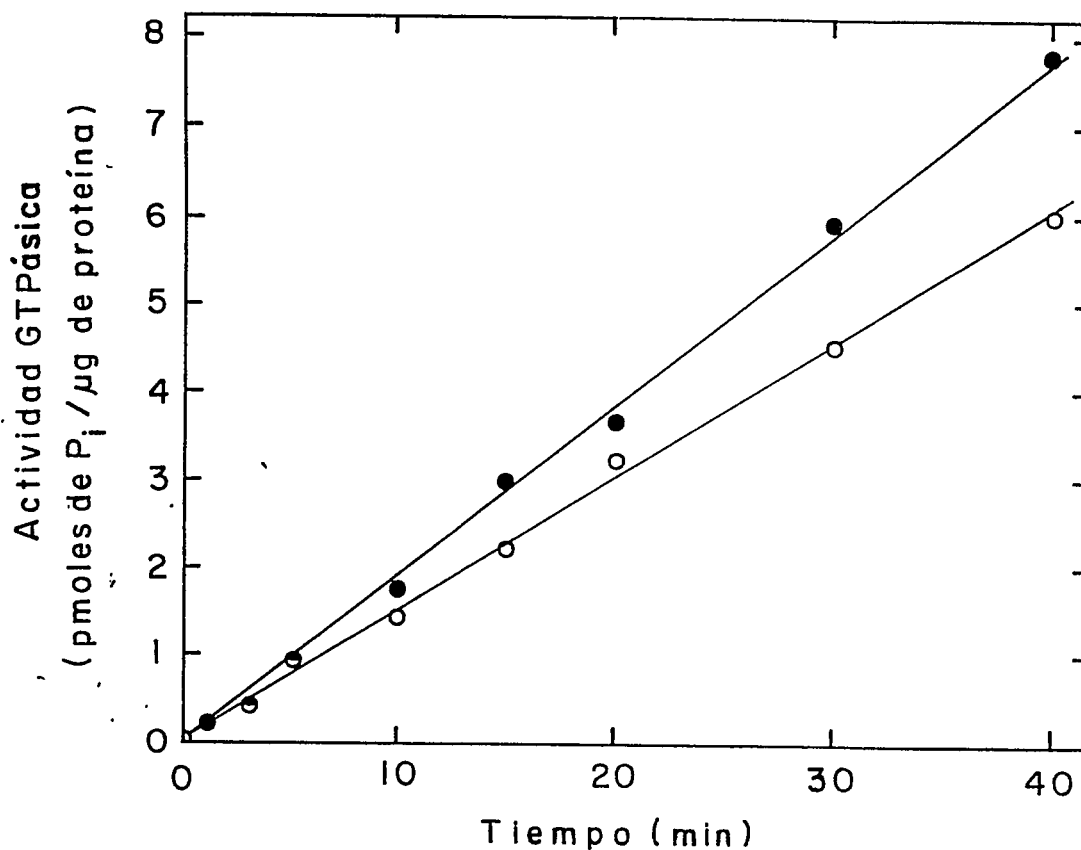


Figura 18. Efecto de polilisina sobre la cinética de formación de $^{32}\text{P}-\text{PO}_4^{3-}$ catalizada por H-ras.

La actividad GTPásica de 1,9 μg de H-ras se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de MgCl_2 5mM; EDTA 1 mM y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ 1 μM (4936 cpm/pmol) a 32°C. A los tiempos indicados la reacción se detiene como se describe en *Materiales y Métodos* y se cuantifica el $^{32}\text{P}-\text{PO}_4^{3-}$ liberado. Las incubaciones se realizan con (●) o sin (○) polilisina 5 μM .

es lineal en todo el intervalo de tiempo ensayado. A los cuarenta minutos la estimulación por polilisina de la actividad GTPásica de H-ras es de un 30%.

B. ESTUDIOS DE FUNCIONALIDAD DE PROTEÍNAS G_{sq} DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

La disponibilidad en nuestro laboratorio de clones de cDNA que codifican para dos formas homólogas de subunidades G_{sq} de *Xenopus laevis*, nos presentaron una excelente oportunidad para definir en profundidad las relaciones de estructura y función de estas proteínas. Un criterio utilizado para estudiar la funcionalidad de una proteína es el de analizar su capacidad para reconstituir sistemas "in vitro". Se decidió por tanto, como parte de esta Tesis el estudiar el acoplamiento funcional de estas proteínas G_{sq} recombinantes sintetizadas en bacterias o en un sistema de lisado de reticulocitos con la adeniliclasa de un sistema de mamífero deficiente en la proteína G_{sq} endógena. Este sistema ha demostrado ser muy útil en estudios de la funcionalidad de proteínas G_{sq} clonadas a partir de otros sistemas (Graziano y cols., 1987; Olate y cols., 1988).

1. Expresión de G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* en bacterias.

En esta etapa del trabajo, se expresaron las dos proteínas G_{sq} en *Escherichia coli*, con la finalidad de analizar la capacidad de estas proteínas de acoplarse funcionalmente a la actividad adeniliclasa. Como fuente de esta última enzima se utilizaron membranas procedentes de una variante de una línea de células en cultivo de ratón (las células S49), denominada cyc-, que tienen la propiedad de ser deficientes en la proteína G_{sq} (Northup y cols., 1980).

Para producir la proteína en bacterias se utiliza una cepa de *Escherichia coli*, la BL21(DE3) como se describió en *Materiales y Métodos* (Studier y Moffatt, 1986).

1.1. Análisis de la expresión de las proteínas G_{50} de oocitos en *E. coli*.

Para verificar que las bacterias estaban produciendo las proteínas G_{50} recombinantes, se realiza un análisis de las proteínas expresadas, en geles desnaturalantes de poliacrilamida al 10 %. En los carriles 8 y 9 de la figura 19 se muestran respectivamente la expresión de los genes G_{50}^{12B2} y G_{50}^{6A1} . En ambos casos se observa que en los extractos totales provenientes de bacterias inducidas con IPTG aparece una nueva proteína, cuya migración electroforética corresponde a la esperada para las proteínas G_{50} (43.000 kDa de masa molecular relativa). Esta banda de proteína no aparece en el carril 14, en el cual se muestra el análisis de extractos totales provenientes de bacterias que no expresan las proteínas G_{50} recombinantes. En los carriles 10 y 11 de la figura 19 se muestran fracciones provenientes de extracto total de bacterias que expresan respectivamente la forma corta y la forma larga de las proteínas G_{50} previamente clonadas de una genoteca de cDNA de proveniente de hígado humano (Mattera y cols., 1986). Las secuencias de cDNA codificantes para estas dos proteínas humanas habían sido también subclonadas en el vector de expresión pT7-7. En el carril 10 se visualiza por tinción con Comassie una proteína de peso molecular 43.000 y en el carril 11 una proteína de 52.000 de peso molecular. Los tamaños observados para las dos proteínas G_{50} de humano son coincidentes con los indicados en la literatura. Los carriles 12 y 13 muestran la inducción de la síntesis en bacterias de las proteínas G_{00} y G_{i-10} de oocitos de *Xenopus laevis*, también clonadas en el laboratorio (Olate y cols., 1989; Olate y cols., 1990). Estas proteínas tienen una masa molecular relativa de 39.000 y 40.000 kDa respectivamente. En la figura 19 se muestra también el análisis de las fracciones provenientes del sobrenadante de la centrifugación a $100.000 \times g$ de extractos totales de bacterias que expresan las mismas proteínas recombinantes (carriles 1-7). En ninguno de los casos mostrados se observa

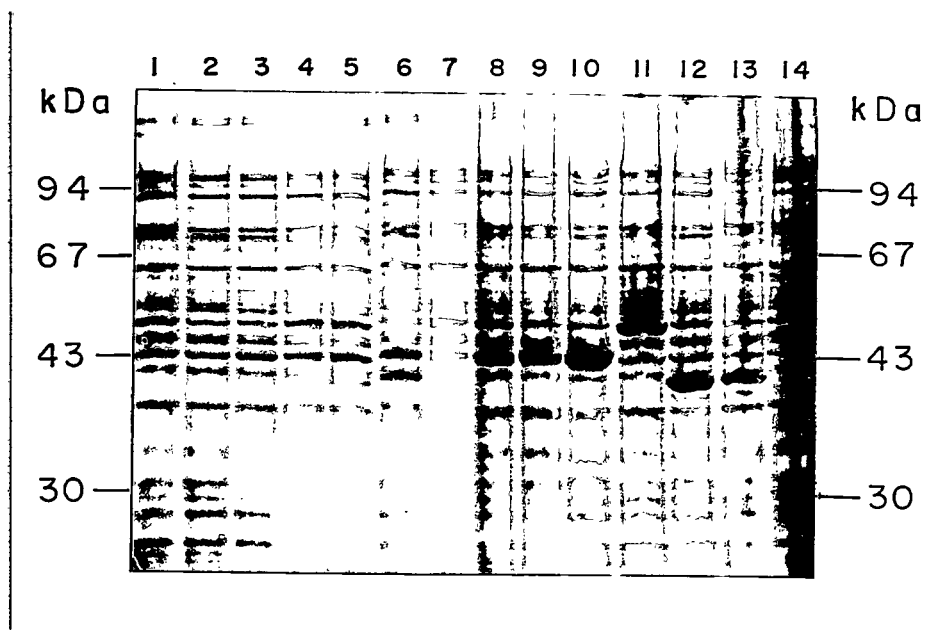


Figura 19. Análisis por geles de poliacrilamida desnaturalantes de la expresión de proteínas G_u en *Escherichia coli*.

Las proteínas G_u son inducidas en *Escherichia coli* como se describe en *Materiales y Métodos*. Luego se realiza una electroforesis aplicando 20 μ l del extracto total y de la fracción sobrenadante en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalantes. Los canales 1 a 7 y 8 al 14, corresponden respectivamente a la fracción sobrenadante y al extracto total provenientes de las bacterias que expresan G_{su}^{12B2} de *Xenopus laevis* (carriles 1 y 8), G_{su}^{6A1} de *Xenopus laevis* (carriles 2 y 9), G_{su} de hígado humano en su variedad corta (carriles 3 y 10), G_{su} de hígado humano en su variedad larga (carriles 4 y 11), G_{ou} de *Xenopus laevis* (carriles 5 y 12), G_{i-10} de *Xenopus laevis* (carriles 6 y 13) y como control extracto total y fracción sobrenadante proveniente de la cepa de *Escherichia coli* B121(DE3) no transformada con el plasmidio de expresión pT7-7 (carriles 7 y 14).

la aparición de cantidades significativas de proteínas recombinantes en esta fracción. Por lo tanto, se deduce que la fracción mayoritaria de proteína G_α expresada queda en el sedimento de la centrifugación a 100.000 x g formando probablemente cuerpos de inclusión.

Con la finalidad de aumentar la sensibilidad de la detección de las proteínas G_{sq} recombinantes expresadas en bacterias se procedió a realizar un análisis mediante la técnica de inmunoblot, utilizando un anticuerpo que reconoce una secuencia peptídica común a todas las subunidades G_α de las proteínas G conocidas. La figura 20 muestra que la proteína G_{sq}6A1 de oocitos de *Xenopus laevis* es detectada por el anticuerpo en las fracciones procedentes del extracto total de bacterias inducidas con IPTG (carril 7). Sin embargo, ésta no es detectada en el sobrenadante de 100.000 x g por el anticuerpo (carril 1). Se expresaron también simultáneamente G_{i-1α} y G_{0α} de *Xenopus laevis* y los dos tipos de proteínas G_{sq} (variedades corta y larga) de humano. Todas estas proteínas son detectadas por el anticuerpo en la fracción sobrenadante de la centrifugación de 100.000 x g. Sin embargo, las formas corta y larga de la proteína G_{sq} de humano están presentes en concentraciones mucho menores que G_{i-1α} y G_{0α}, en esta fracción soluble.

1.2. Reconstitución de la actividad adenililciclase de membranas cyc- con G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis*.

Los intentos de reconstitución de la actividad adenililciclase de las membranas cyc⁻ con las proteínas G_{sq}6A1 y G_{sq}12B2 de oocitos de *Xenopus laevis* fueron todos negativos como lo resume la Tabla 6. Las dos formas de proteínas G_{sq} recombinantes de oocitos provenientes de extractos totales y de sobrenadante de bacterias, no reconstituyeron la actividad de la adenililciclase de membranas cyc⁻. Por otro lado, las dos formas de G_{sq} de hígado humano presentes en la fracción sobrenadante de la centrifugación de 100.000 x g, son capaces de reconstituir la actividad adenililciclase de

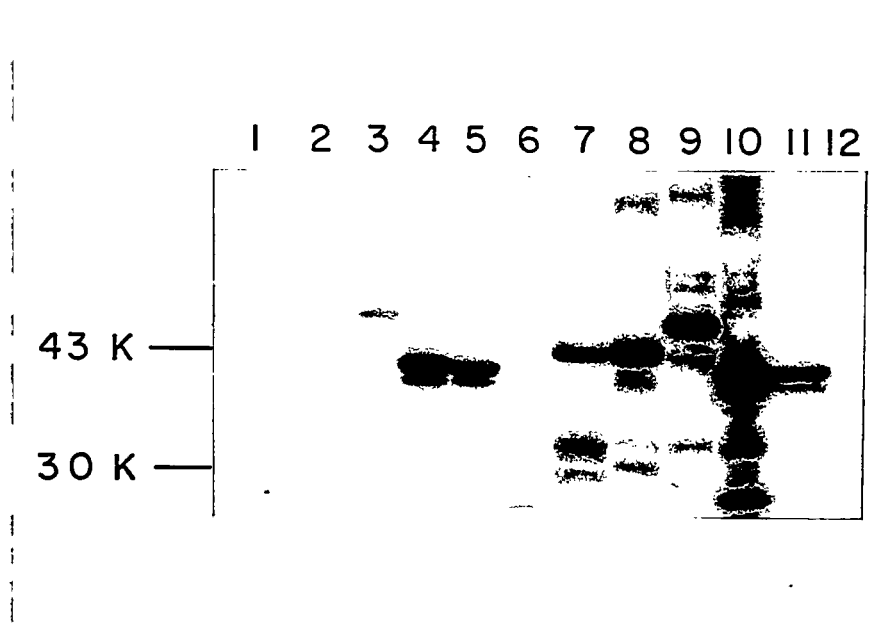


Figura 20. Inmunodetección de las subunidades G_0 expresadas en *Escherichia coli* por western.

Las proteínas G_0 son inducidas en *Escherichia coli* como se describe en *Materiales y Métodos*. Luego se realiza una electroforesis aplicando 20 μ l del extracto total y de la fracción sobrenadante en gels de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturantes. Las proteínas son transferidas a un filtro de nitrocelulosa. Este se incuba con el anticuerpo anti- G_0 y posteriormente con el segundo anticuerpo anti IgG de conejo marcado con 125 I (50.000.000 cpm totales) como se describe en *Materiales y Métodos*. El filtro se seca y se somete a autoradiografía por 12 horas. Los carriles 1 a 6 corresponden a la fracción sobrenadante y los carriles 7 al 12 al extracto total, de bacterias que expresan $G_{0,6A1}$ de *Xenopus laevis* (canales 1 y 7), G_{sa} de hígado humano en su variedad corta (carriles 2 y 8), G_{sa} de hígado humano en su variedad larga (carriles 3 y 9), G_{i-10} de *Xenopus laevis* (carriles 4 y 10), G_{0a} de *Xenopus laevis* (carriles 5 y 11) y como control extracto total y fracción sobrenadante proveniente de la cepa de *Escherichia coli* B121(DE3) no transformada con el plasmidio de expresión pT7-7 (carriles 6 y 12).

Tabla 6

Reconstitución de la actividad adenilciclase de membranas cyc^- por las proteínas G_{sq} producidas en *Escherichia coli*.

tipo de subunidad G_{sq} expresada en bacteria	fracción bacteriana	Actividad adenilciclase (picomoles de cAMP/10 μ g de proteína de membrana cyc^-)
Experimento 1		
control	sobrenadante	1,2 \pm 0,1
G_{sq-s}	sobrenadante	21,0 \pm 1,9
G_{sq-l}	sobrenadante	18,0 \pm 1,5
$G_{sq} 6A1X.l.$	sobrenadante	1,5 \pm 0,1
Experimento 2		
control	extracto total	1,8 \pm 0,1
$G_{sq} 6A1X.l.$	extracto total (-IPTG)	1,7 \pm 0,2
$G_{sq} 6A1X.l.$	extracto total (+IPTG)	1,4 \pm 0,2
control	sobrenadante	1,5 \pm 0,1
$G_{sq} 6A1X.l.$	sobrenadante (-IPTG)	2,4 \pm 0,1
$G_{sq} 6A1X.l.$	sobrenadante (+IPTG)	2,1 \pm 0,3
Experimento 3		
control	extracto total	7,0 \pm 0,2
$G_{sq} 6A1X.l.$	extracto total	5,7 \pm 0,5
$G_{sq} 12B2X. l.$	extracto total	5,5 \pm 0,5

Ver leyenda en la página siguiente.

Tabla 6: Reconstitución de la actividad adenililciclase de membranas *cyc* por las proteínas G_{sq} producidas en *Escherichia coli*.

Las proteínas G_{sq} son inducidas en *Escherichia coli* como se describe en *Materiales y Métodos*. En los experimentos de reconstitución de la actividad adenililciclase de las membranas *cyc* se usan 10 μ l del extracto total de bacteria y 10 μ l de la fracción sobrenadante de la centrifugación de 100.000g. La actividad de la adenililciclase se mide como se describe en *Materiales y Métodos*, en presencia de [α - 32 P]-ATP 0,6 mM (411 cpm/pmol en los experimentos 1 y 2 y 194 cpm/pmol en el experimento 3); GTP- γ -S 100 μ M y 10 μ g de membranas *cyc*. Las incubaciones se realizan por 40 minutos a 32°C. Cada punto se determina por triplicado. Como control se ensaya en los tres experimentos extracto total o sobrenadante proveniente de una cepa bacteriana no transformada y en el caso del experimento 2, extracto total y sobrenadante proveniente de bacteria transformada, pero no inducida con IPTG. (G_{sq-S} : forma corta de G_{sq} de humano. G_{sq-L} : forma larga de G_{sq} de hígado humano).

las membranas *cyc*⁻. Estos resultados pueden indicar que las bacterias no están produciendo las proteínas G_{30} de oocitos en una forma soluble y activa. Sin embargo, una explicación alternativa es que las proteínas G_{30} clonadas de oocitos de *Xenopus laevis* correspondan a una variedad de proteína G_0 que no se acoplan funcionalmente a la adenililciclase presente en membranas de células *cyc*⁻.

Para definir mejor entre estas alternativas se decidió centrar este trabajo experimental en la expresión de las proteínas G_{30} de *Xenopus laevis* en un sistema de lisado de reticulocitos.

2. Expresión de G_{30} de oocitos de *Xenopus laevis* en lisado de reticulocitos.

El lisado de reticulocitos es un sistema de expresión "*in vitro*" de proteínas cuyo uso ha sido ampliamente descrito en la literatura (Perara y cols., 1986; Olate y cols., 1988; Glass y cols., 1989; Journot y cols., 1991; Sandford y cols., 1991; Treacy y cols., 1992). Este sistema tiene la ventaja de que al ser un sistema derivado de eucariontes, es capaz de introducir en las proteínas sintetizadas algunas modificaciones post traduccionales necesarias para su normal funcionamiento en las células (Maltese y Robishaw, 1990; Sandford y cols., 1991). Además no presenta la desventaja que tienen otros sistemas, como el bacteriano, que tienden a formar gránulos de inclusión. El lisado de reticulocitos ha sido usado a modo de ejemplo en la expresión funcional de factores de transcripción (Glass y cols., 1989; Treacy y cols., 1992). En el caso de las proteínas G , ha sido usado como sistema de expresión para estudiar la funcionalidad de proteínas G_{30} (Olate y cols., 1988; Journot y cols., 1991), de G_{00} (Denker y cols., 1992) y de G_γ (Maltese y Robishaw, 1990; Sandford y cols., 1991).

2.1. Subclonamiento de los cDNA codificantes para las proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* en lisado de reticulocitos.

Para expresar las secuencias de cDNA que codifican para las dos proteínas del tipo G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* en lisado de reticulocitos, se subclonaron estas secuencias dentro de la caja de clonaje múltiple del vector de expresión pGEM3Zf⁻ modificado (pAGA), como se describe en *Materiales y Métodos*. Paralelamente y con la finalidad de tener un control positivo, hemos subclonado en pAGA un cDNA que codifica para la especie corta de G_{sq} de hígado humano, con el fin de expresarla también en lisado de reticulocitos. La proteína G_{sq} humana producida de esta manera reconstituye la actividad adenililciclasa de las membranas cyc^{-} (Olate y cols., 1988).

Con la finalidad de sintetizar las proteínas G_{sq} en el lisado de reticulocito es necesario previamente sintetizar un RNA mensajero codificante para estas proteínas.

2.2. Análisis de la transcripción "in vitro" de los RNA mensajeros codificantes para las proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* y de humano.

La transcripción de los RNA mensajeros codificantes para las dos proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* y para la proteína G_{sq} de humano se realiza como está descrito en la sección *Materiales y Métodos*. El análisis de la síntesis de los RNA mensajeros se realiza mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. En la figura 21 se muestra un gel de agarosa con los productos de la transcripción "in vitro" de los tres genes mencionados. En los carriles 2, 3 y 4 aparece una banda mayoritaria de RNA que migra en la misma posición con respecto a un DNA de fago λ digerido con Hind III. Este resultado confirma la integridad del mRNA y la eficiencia de la transcripción que es similar en los tres casos. Posteriormente cada uno de estos transcritos es usado en un ensayo de traducción *in vitro*.

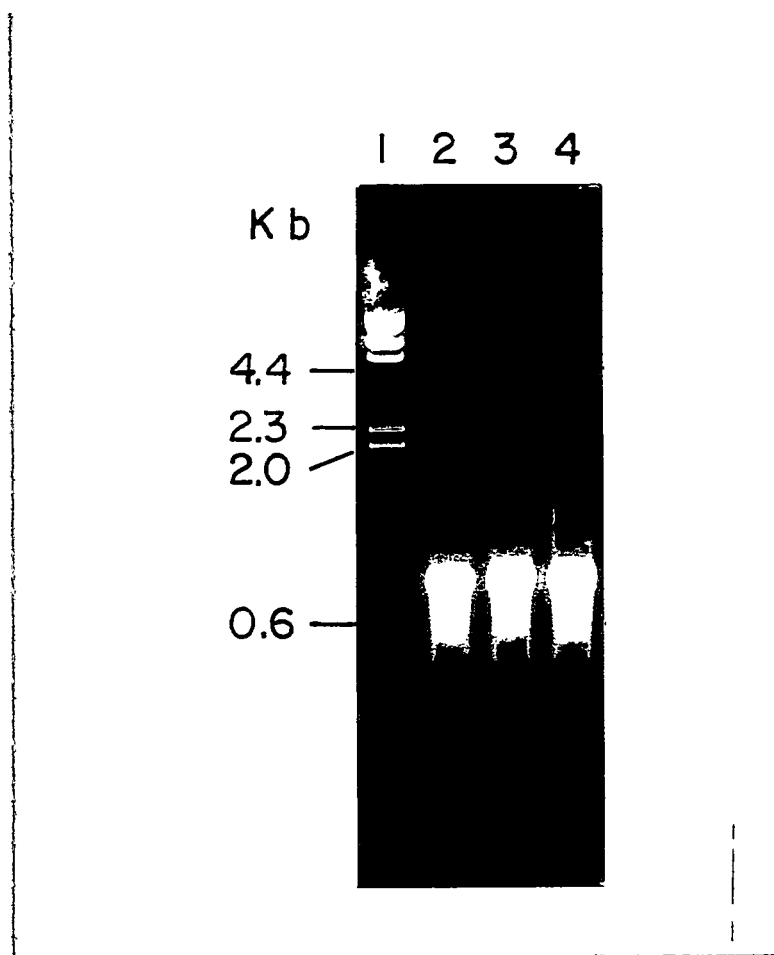


Figura 21. Análisis de la síntesis de mRNA que codifican para las proteínas G_{sd} de oocitos de *Xenopus laevis* y de humano, por geles de agarosa.

La síntesis de los mRNA se realiza como se describe en *Materiales y Métodos*. Para el análisis de los mRNA, se aplican alícuotas de 5 μ l en un gel de agarosa al 1%. La electroforesis se realiza a un voltaje constante de 100 V. El RNA se visualiza por tinción con bromuro de etidio. El carril 1 contiene 1 μ g de DNA de λ gt10 digerido con Hind III como estándar de tamaño. Los carriles 4 y 3 contienen respectivamente los RNA mensajeros codificantes para las proteínas G_{sd} 6A1 y G_{sd} 12B2 de oocitos de *Xenopus laevis* y el carril 2 el RNA mensajero codificante para la proteína G_{sd} de hígado humano.

2.3. Análisis de la traducción de los RNA mensajeros codificantes para las proteínas G_{50} de oocitos y de *Xenopus laevis*.

La síntesis de las proteínas G_{50} de oocitos y de humano se hace en lisado de reticulocitos, en presencia del RNA mensajero correspondiente. Debido a los bajos niveles de proteína sintetizados por este sistema no es posible detectar la proteína producida en geles de poliacrilamida por tinción con azul de Coomassie. Por lo tanto, es necesario realizar la síntesis en presencia de $^{35}\text{[S]}$ -metionina, con la finalidad de poder detectar la proteína marcada por autoradiografía y también para poder medir los niveles de proteína sintetizada. Los productos de traducción se analizan en geles de poliacrilamida sometiéndose luego éstos a autorradiografía. En la figura 22 se muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida donde se analizan las proteínas G_{50} sintetizadas en lisado de reticulocitos. Los carriles 2, 3 y 4 muestran una banda de peso molecular 43.000, que corresponden a las proteínas G_{50} de humano, y de oocitos. El carril 1 muestra un experimento control que contiene extracto de lisado de reticulocitos incubado sin RNA. El peso molecular de las proteínas sintetizadas es la esperada para las del tipo G_{50} . Cabe señalar que en todos los casos mas del 90% de la radioactividad se encuentra incorporada en la banda de 43.000 de peso molecular.

Los resultados de la figura 22 fueron obtenidos con traducciones realizadas en 60 minutos de incubación. La reacción de síntesis de proteína en estas condiciones se encuentra en equilibrio, como lo muestra la figura 23. En esta figura se observa la cinética de la reacción de traducción de dos RNA mensajeros. Uno de ellos es el codificante para la proteína G_{50} de humano y el otro para la proteína $G_{50}6A1$ de oocito de *Xenopus laevis*. Los resultados de este experimento se obtuvieron tomando alícuotas a los tiempos indicados de las mezclas de traducción de dos RNA mensajeros y sometienolas luego a precipitación por TCA al 5%. Paralelamente se analiza

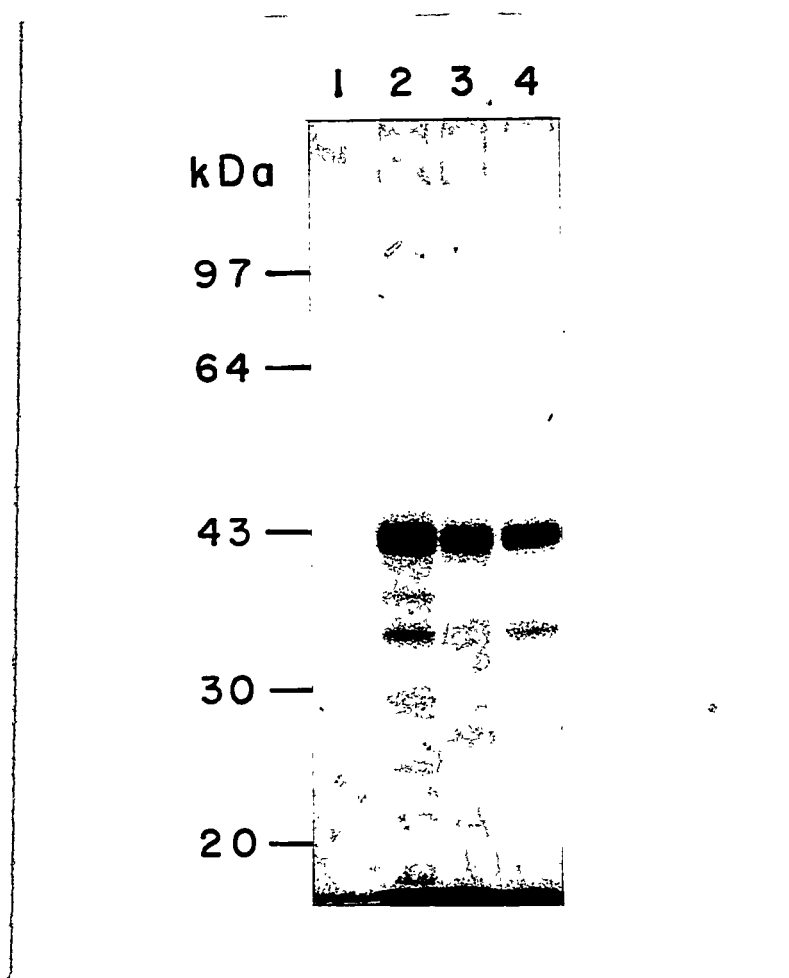


Figura 22. Análisis por electroforesis y autorradiografía en geles de poliacrilamida, de la expresión en lisado de reticulocitos de las proteínas G₅₀ de oocitos de *Xenopus laevis* y de humano.

La síntesis de las proteínas G₅₀ se realiza en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*, en presencia de 2 µg de cada uno de los mRNA y ³⁵[S]-metionina 20 µM (15.750 cpm/pmol), durante 60 minutos a 30°C. La reacción se detiene con 1 volumen de buffer de Laemmli y se aplican 4 µl de esta mezcla en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalantes. El gel se tiñe con azul de coomassie, se seca y se somete a autorradiografía por 12 horas. Los carriles 4 y 3 contienen los productos de la traducción del RNA mensajero que codifica para las proteínas G₅₀6A1 y G₅₀12B2 de oocitos de *Xenopus laevis*. El carril 2 contiene el producto de la traducción del mRNA que codifica para la forma corta de la proteína G₅₀ de hígado humano. El carril 1 contiene lisado de reticulocitos tratado en las mismas condiciones anteriormente indicadas para la síntesis de proteína, pero sin mRNA agregado al medio.

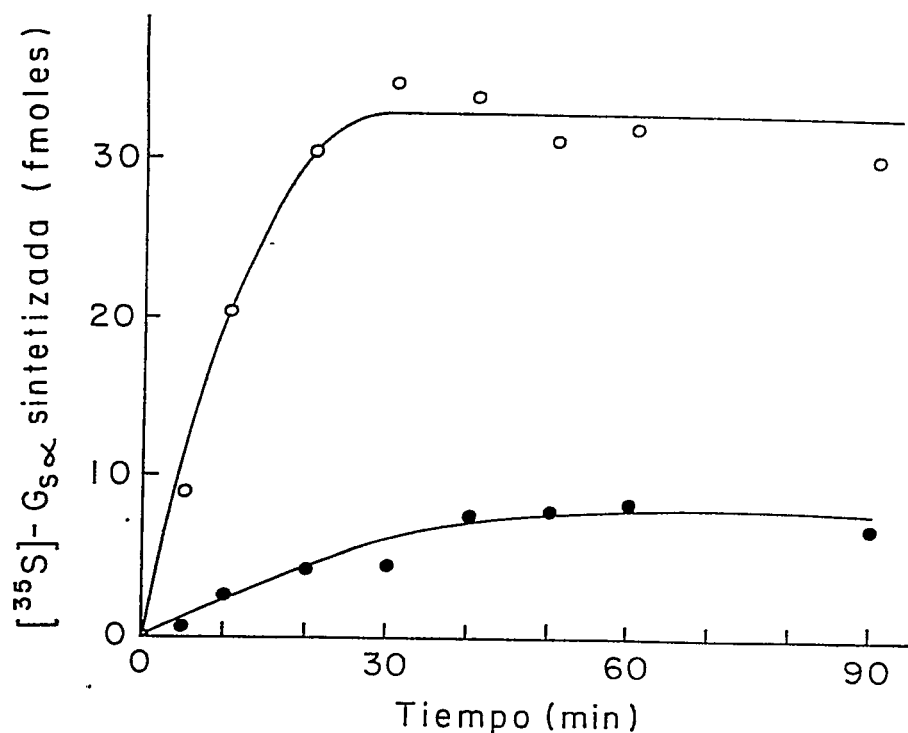


Figura 23. Cinética de síntesis de las proteínas G_{su} de oocitos de *Xenopus laevis* y de humano en lisado de reticulocitos

La síntesis de las proteínas G_{su} en lisado de reticulocitos se realiza en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*, en un volumen final de 50 μ l y en presencia de 10 μ g de mRNA codificante para las proteínas G_{6A1} de oocitos de *Xenopus laevis* (●) y para la proteína G_{su} de hígado humano (○), lisado de reticulocitos al 60% y ³⁵[S]-metionina 20 μ M (21.744 cpm/pmol) a 30°C. La reacción se inicia con la adición de la metionina y a cada tiempo indicado se retiran 5 μ l de la mezcla de incubación y se agregan sobre 5 μ l de amortiguador de Laemmli para detener la reacción. A continuación 4 μ l de esta mezcla se someten a precipitación por TCA al 5% para cuantificar el nivel de proteína sintetizada, como se describe en *Materiales y Métodos*.

por geles de poliacrilamida y autorradiografía la síntesis de ambas proteínas en el tiempo, como lo muestra el recuadro de la misma figura.

2.4. Reconstitución de la actividad adeniliclasa de membranas cyc- con las proteínas G_{sq} sintetizadas en lisado de reticulocitos.

En una etapa posterior de este trabajo experimental se reconstituyó la actividad adeniliclasa de membranas de células cyc-, con extracto de lisado de reticulocitos que contienen las proteínas G_{sq} de oocitos y de humano. En los ensayos de reconstitución se usan cantidades equivalentes de proteínas G_{sq} de oocitos y de humano. La cantidad de proteína G_{sq} usada en cada caso es cuantificada en forma previa al ensayo como se describe en *Materiales y Métodos*.

Como lo indica la tabla 7, mientras que G_{sq} de hígado humano es capaz de reconstituir la actividad adeniliclasa de membranas procedentes de células cyc-, las dos proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* son casi inactivas. Este hecho indica que las proteínas G_{sq} de oocitos expresadas en lisado de reticulocitos no se acoplan funcionalmente a la adeniliclasa de un sistema de mamíferos.

Debido a los resultados obtenidos, hemos considerado oportuno el construir genes quiméricos intercambiando fragmentos entre las proteínas G_{sq} de oocitos y la de hígado humano, con la finalidad de ubicar la región responsable de la falta de interacción funcional con la adeniliclasa de mamíferos en las proteínas de oocito. Esto se fundamenta por el hecho de que las secuencias de aminoácidos de las dos proteínas G_{sq} de oocitos presentan una homología de un 90% con la de la proteína G_{sq} de hígado humano (Olate y cols., 1990).

Tabla 7

Reconstitución de la actividad adenilciclase de membranas cyc⁻ por las proteínas G_{sq} producidas en lisado de reticulocitos.

Fracción	GTP- γ -S (100 μ M)	Actividad Adenilciclase (pmoles cAMP/10 μ g de proteína de membrana cyc ⁻ .)
lisado control	+	0, 64 \pm 0,7
G _{sq} 6A1 X.l.	+	1, 13 \pm 2,1
G _{sq} 12B2 X.l.	+	1, 19 \pm 0,1
G _{sq} humano	+	11 ,38 \pm 0,5
cyc ⁻	+	0, 45 \pm 0,1

La actividad de la adenilciclase se mide como está descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de GTP- γ -S 100 μ M, [α -³²P]-ATP 0,112 mM (1634 cpm/pmol) y 10 μ g de membranas cyc⁻. Las incubaciones se realizan por 40 minutos a 32°C. Cada punto se determina por triplicado. En los experimentos de reconstitución se usan 170 fmoles de cada una de las proteínas G_{sq} expresadas en lisado de reticulocitos. Como control se ensayan extractos de traducción sin RNA mensajero (lisado control) y también se mide la actividad de las membranas cyc⁻ sin extracto de traducción en el medio de ensayo.

3. Localización en la proteína G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis*, de la región responsable de la falta de acoplamiento con la adenililciclase de mamíferos.

Para construir proteínas quiméricas es necesario recurrir a las secuencias de cDNA que codifican para las proteínas en cuestión. El detalle experimental de las construcciones se detalla en *Materiales y Métodos*.

3.1. Proteínas quiméricas construídas.

Las proteínas quiméricas construídas se muestran en el esquema 19.

Estas son:

Ch 1: Constituída por el 70% de la región amino terminal de la proteína G_{sq} 6A1 de oocito y el 30% de la región carboxilo terminal de la proteína G_{sq} de hígado humano.

Ch 2: Constituída por el 70% de la región amino terminal de la proteína G_{sq} 12B2 de oocito y el 30% de la región carboxilo terminal de la proteína G_{sq} de hígado humano.

Ch 3: Constituída por el 70% de la región amino terminal de la proteína G_{sq} de hígado humano y el 30% carboxilo terminal de la proteína G_{sq} 6A1.

Ch 4: Constituída por el 70% de la región amino terminal de la proteína G_{sq} de hígado humano y el 30% carboxilo terminal de la proteína G_{sq} 12B2.

Ch 5: Constituída por el 50% del extremo amino terminal de G_{sq} 6A1 y el 50% del extremo carboxilo terminal de G_{sq} de hígado humano.

Ch 6: Constituída por el 50% del extremo amino terminal de G_{sq} 12B2 y el 50% del extremo carboxilo terminal de G_{sq} de hígado humano.

Ch 7: Constituída por el 50% del extremo amino terminal de la proteína G_{sq} de hígado humano y el 50% del extremo carboxilo terminal de la proteína G_{sq} 6A1 de oocitos.

Ch 8: Constituída por el 50% del extremo amino terminal de la proteína G_{sq} de hígado humano y el 50% del extremo carboxilo terminal de la proteína G_{sq} 12B2 de oocitos.

Ch 9 y Ch 10: En estas dos construcciones se intercambió un fragmento de 170 aminoácidos correspondiente a parte de la región amino terminal de las proteínas $G_{s0}6A1$ de oocito y de humano.

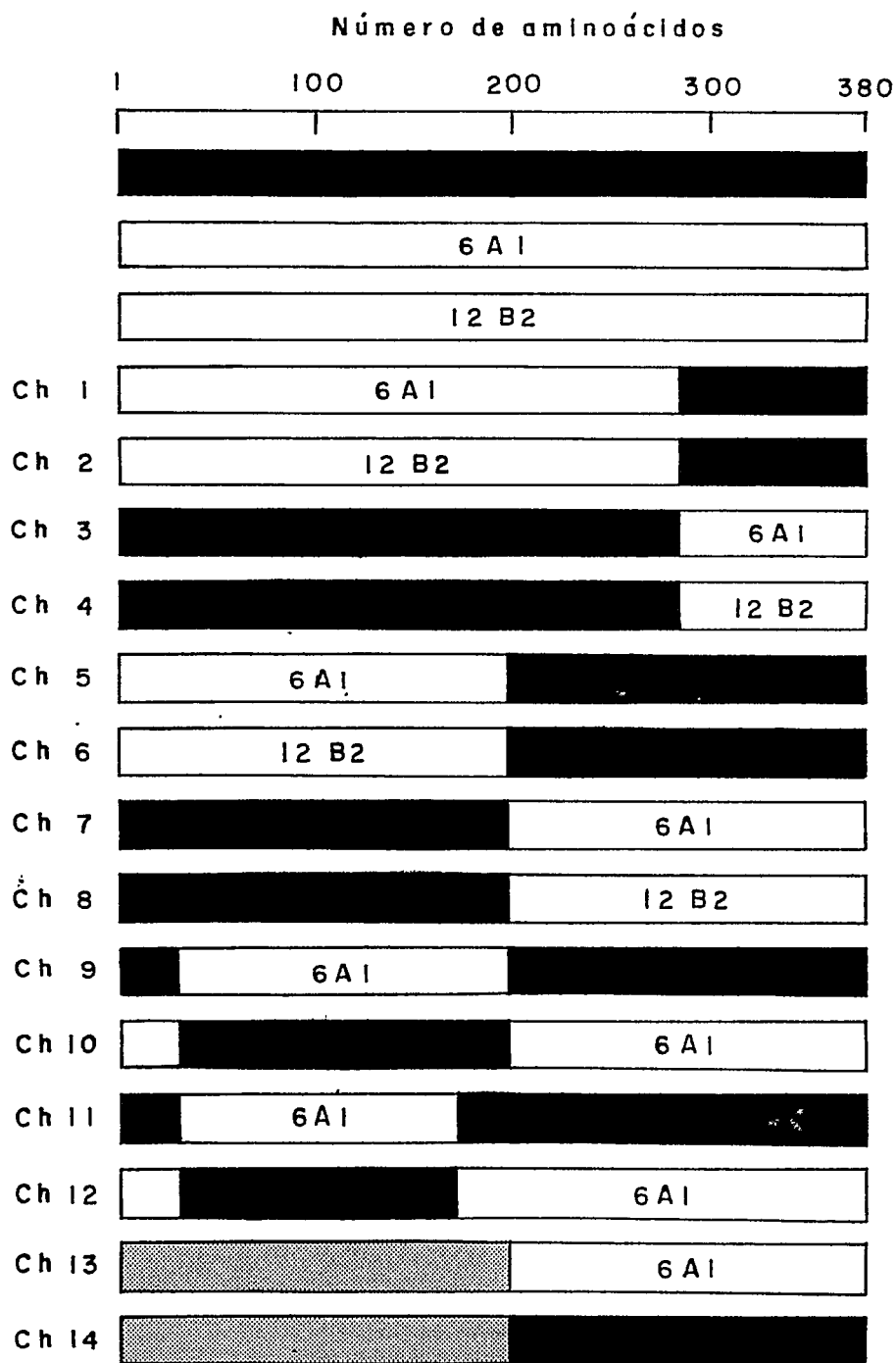
Ch 11 y Ch 12: En estas construcciones se intercambió un fragmento de 126 aminoácidos también en la región amino terminal de las secuencias de oocito y de humano.

Los genes quiméricos fueron subclonados en pAGA, transcritos para producir mRNA (figuras 24 y 25) y posteriormente traducidos en lisado de reticulocitos. Las figuras 26 y 27 muestran los productos de traducción de los genes quiméricos en lisados de reticulocitos sintetizados en presencia de $^{35}[S]$ -metionina y analizados en geles desnaturantes de poliacrilamida al 10%.

3.2. Capacidad de las proteínas quiméricas de reconstituir la respuesta de la adenililciclase a GTP- γ -S, NaF, GTP e isoproterenol.

Los resultados de la figura 28 muestran la capacidad de dos juegos de quimeras recíprocas de reconstituir la respuesta de la actividad adenililciclase de membranas cyc- a GTP- γ -S e isoproterenol. El uso de este último agonista β -adrenérgico se justifica debido a la existencia en la membrana plasmática de las células cyc-, de receptores β -adrenérgicos. Estos receptores son capaces de acoplarse funcionalmente a G_{s0} agregado exogenamente a las membranas y reconstituir la actividad de la adenililciclase (Birnbaumer y cols., 1990). Nos pareció por tanto importante estudiar la capacidad de las quimeras de acoplarse a este tipo de receptores mediante el análisis de su capacidad de reconstituir adenililciclase.

Hay una clara diferencia en la capacidad de estas quimeras para afectar la actividad de la adenililciclase. Es claro que la diferencia en esta capacidad reside en la fracción amino terminal de la proteína humana, ya que las quimeras que poseen el 70% (Ch3 y Ch4) y el 50% (Ch7 y Ch8)



Esquema 19: Proteínas quiméricas construídas.

Las proteínas G_{50} de *Xenopus laevis* y de humano aparecen representadas en blanco y negro respectivamente. Las dos proteínas G_{50} de *Xenopus laevis* se indican como 6A1 y 12B2. La región amino terminal de la proteína G_{1-20} de ratón es señalada en gris (quimeras Ch13 y Ch14).

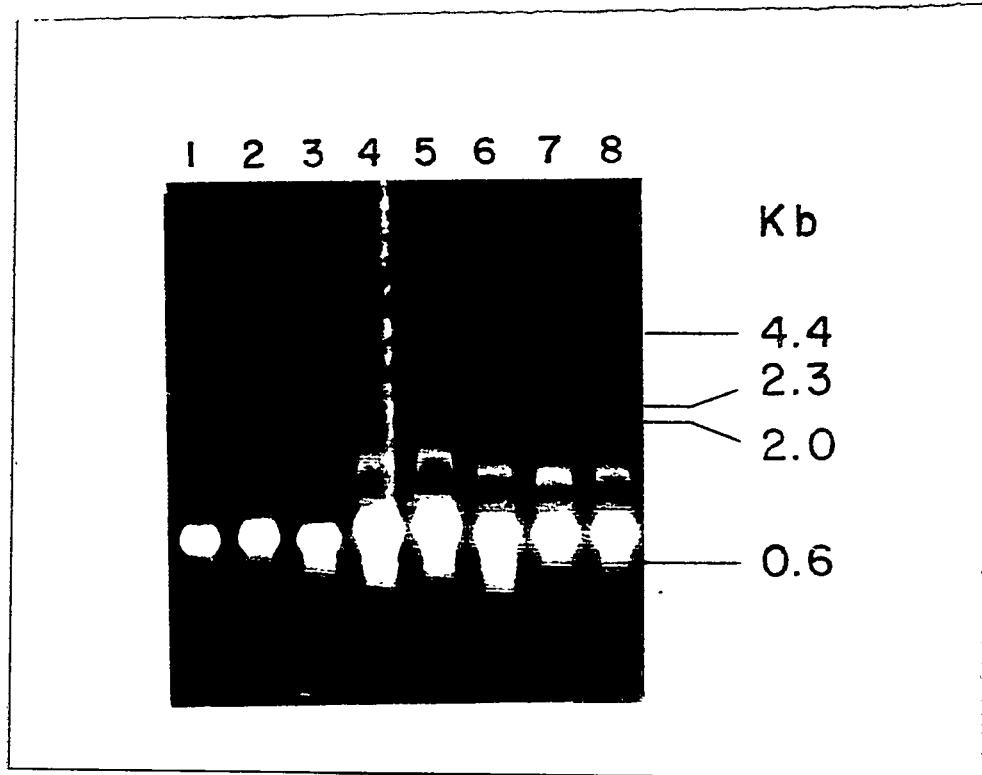
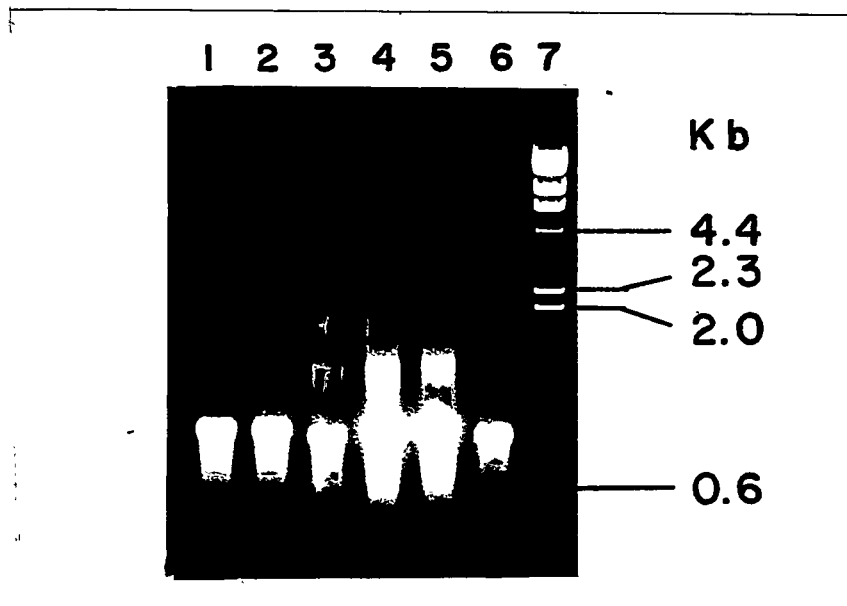
A**B**

Figura 24. Análisis de la síntesis de los mRNA que codifican para las proteínas quiméricas Ch1, Ch2, Ch3, Ch4, Ch5, Ch6, Ch7 y Ch8, por geles de agarosa (ver leyenda en la página siguiente).

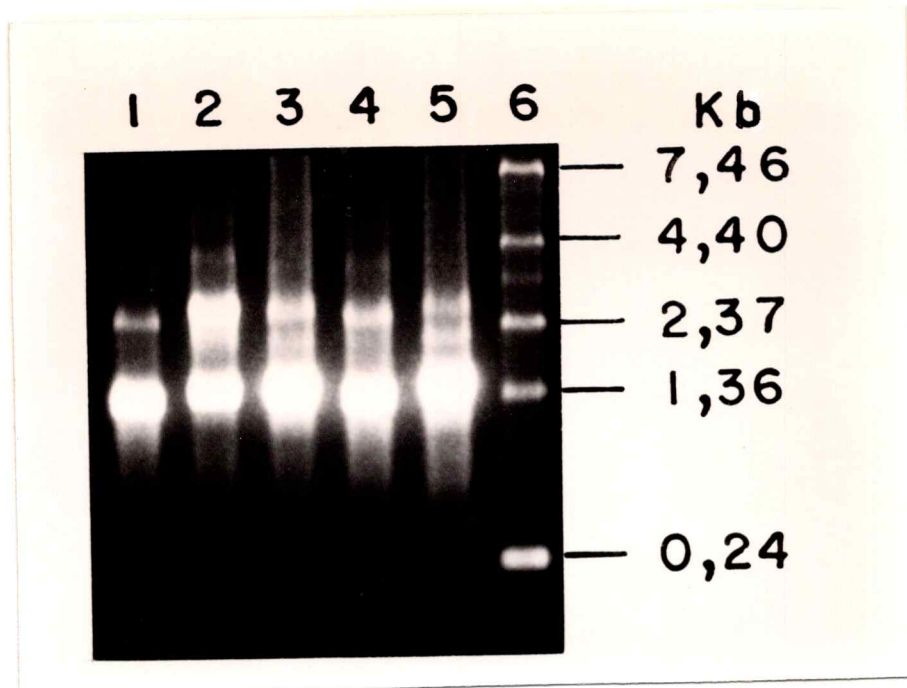
Figura 24. Análisis de la síntesis de los mRNA que codifican para las proteínas quiméricas Ch1, Ch2, Ch3, Ch4, Ch5, Ch6, Ch7 y Ch8, por geles de agarosa.

La síntesis de los mRNA se realiza como está descrito en *Materiales y Métodos*. Para este análisis se aplican alícuotas de 5 μ l de cada medio de transcripción en un gel de agarosa al 1% y se someten a electroforesis en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*.

A) Los carriles 1 y 2 contienen respectivamente los mRNA codificantes para las proteínas G_{6A1} y G_{12B2} de oocitos de *Xenopus laevis* y el carril 3 el mRNA codificante para la proteína G_{su} de hígado humano. Los carriles 4, 5, 7 y 8 contienen respectivamente los mRNA codificantes para las proteínas quiméricas Ch1, Ch2, Ch3 y Ch4. En el carril 6 y como control adicional se incluye el producto de transcripción codificante para la proteína G_{su} de hígado humano cuyo DNA fue cortado por las mismas enzimas de restricción utilizadas en la construcción de las quimeras que aparecen en los carriles 4, 5, 7 y 8 y cuyos fragmentos fueron posteriormente religados y subclonados en pAGA. Los tamaños expresados en kilobases (Kb) corresponden a la migración en el mismo gel de DNA de fago λ digerido con Hind III .

B) Los carriles 1, 2, 3, y 4 contienen respectivamente los productos de transcripción de las quimeras Ch5, Ch6, Ch7 y Ch8. El carril 6 contiene el mRNA codificante para la proteína G_{su} de hígado humano. En el carril 5 y como control se incluye el producto de transcripción codificante para la proteína G_{su} de hígado humano cuyo DNA fue cortado por las mismas enzimas de restricción utilizadas en la construcción de las quimeras que aparecen en los carriles 1, 2, 3 y 4 y cuyos fragmentos fueron posteriormente religados y subclonados en pAGA. El carril 7 contiene 1 μ g de DNA de fago λ digerido con Hind III como estándar de tamaño del DNA.

A



B

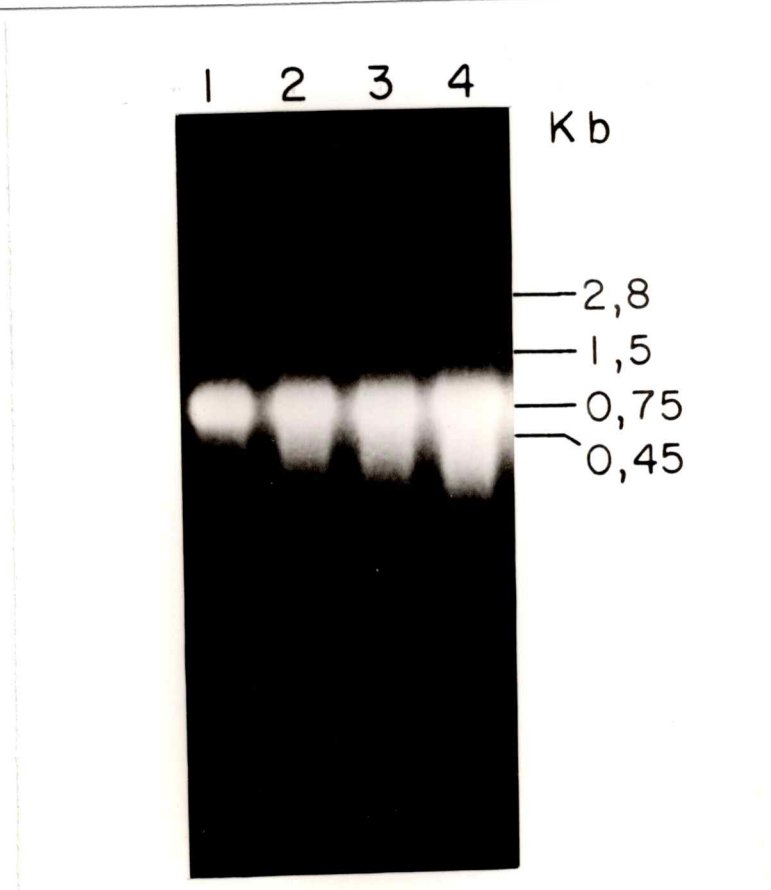


Figura 25. Análisis de la síntesis de los mRNA que codifican para las proteínas quiméricas Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12, por geles de agarosa (ver leyenda en la página siguiente).

Figura 25. Análisis de la síntesis de los mRNA que codifican para las proteínas quiméricas Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12, por geles de agarosa.

La síntesis de los mRNA se realiza como está descrito en *Materiales y Métodos*. Para este análisis se aplican alícuotas de 5 μ l de cada medio de transcripción en un gel de agarosa al 1% y se someten a electroforesis en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*.

A) Los canales 4 y 5 contienen respectivamente los RNA mensajeros codificantes para las proteínas G₅₀6A1 de oocitos de *Xenopus laevis* y G₅₀ de hígado humano. Los carriles 1 y 2 contienen respectivamente los productos de transcripción para las quimeras Ch10 y Ch9. En el carril 3 y como control adicional se incluye el producto de transcripción codificante para la proteína G₅₀ de hígado humano cuyo DNA fue cortado por las mismas enzimas de restricción utilizadas en la construcción de las quimeras que aparecen en los carriles 1 y 2 cuyos fragmentos fueron posteriormente religados y subclonados en pAGA. El carril 6 contiene 1 μ g de estándar de tamaño para RNA.

B) El canal 4 contiene el RNA mensajero codificante para la proteína G₅₀ de hígado humano. Los carriles 1 y 2 contienen respectivamente los productos de transcripción para las quimeras Ch12 y Ch11. En el carril 3 y como control adicional se incluye el producto de transcripción codificante para la proteína G₅₀ de hígado humano cuyo DNA fue cortado por las mismas enzimas de restricción utilizadas en la construcción de las quimeras que aparecen en los carriles 1 y 2 cuyos fragmentos fueron posteriormente religados y subclonados en pAGA. Los tamaños indicados en Kb corresponden a la migración en el mismo gel de DNA de fago λ digerido con la enzima de restricción Bsab1.

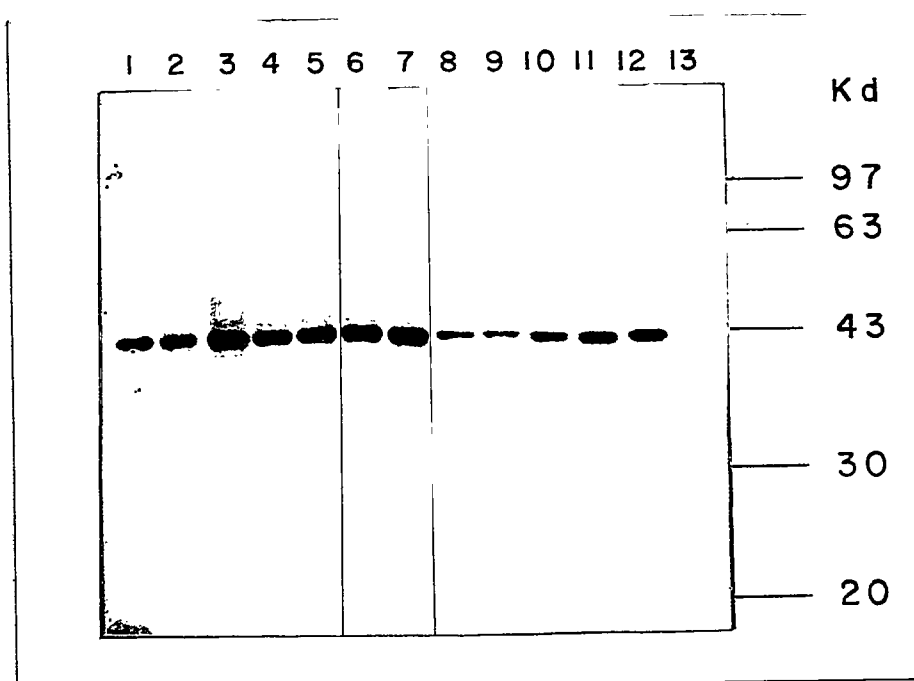


Figura 26. Análisis por electroforesis y autorradiografía de la expresión de las proteínas quiméricas Ch1, Ch2, Ch3, Ch4, Ch5, Ch6, Ch7 y Ch8 en lisado de reticulocitos.

La síntesis de cada una de las proteínas quiméricas se realiza en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*, en presencia de 2 μg de mRNA y ^{35}S -metionina 20 μM (35.900 cpm/pmol). La incubación se realiza durante 60 minutos a 30°C. La reacción se detiene con 1 volumen de buffer de Laemmli. 4 μl de esta mezcla se aplican en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturantes. El gel se tiñe con azul de coomassie, luego de lo cual se seca y se somete a autorradiografía por 12 horas. Los carriles 1 y 2 contienen los productos de la traducción de mRNA codificante para la proteínas $G_{50}6A1$ y $G_{50}12B2$ de *Xenopus laevis*, respectivamente. El carril 3 contiene el producto de la traducción del mRNA que codifica para la forma corta de la proteína G_{50} de hígado humano. El carril 13 contiene lisado de reticulocitos tratado en las mismas condiciones anteriormente indicadas para la síntesis de proteína, pero sin mRNA agregado al medio. Los carriles 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 contienen los productos de traducción de los mRNA que codifican para las quimeras Ch1, Ch2, Ch3, Ch4, Ch5, Ch6, Ch7 y Ch8 respectivamente. En el carril 12 y como control adicional se incluye el producto de traducción de un mRNA codificante para la proteína G_{50} de hígado humano cuyo cDNA es cortado por las mismas enzimas de restricción utilizadas en la construcción de las quimeras que aparecen en los carriles 8, 9, 10 y 11 y cuyos fragmentos de cDNA son posteriormente religados y subclonados en pAGA.

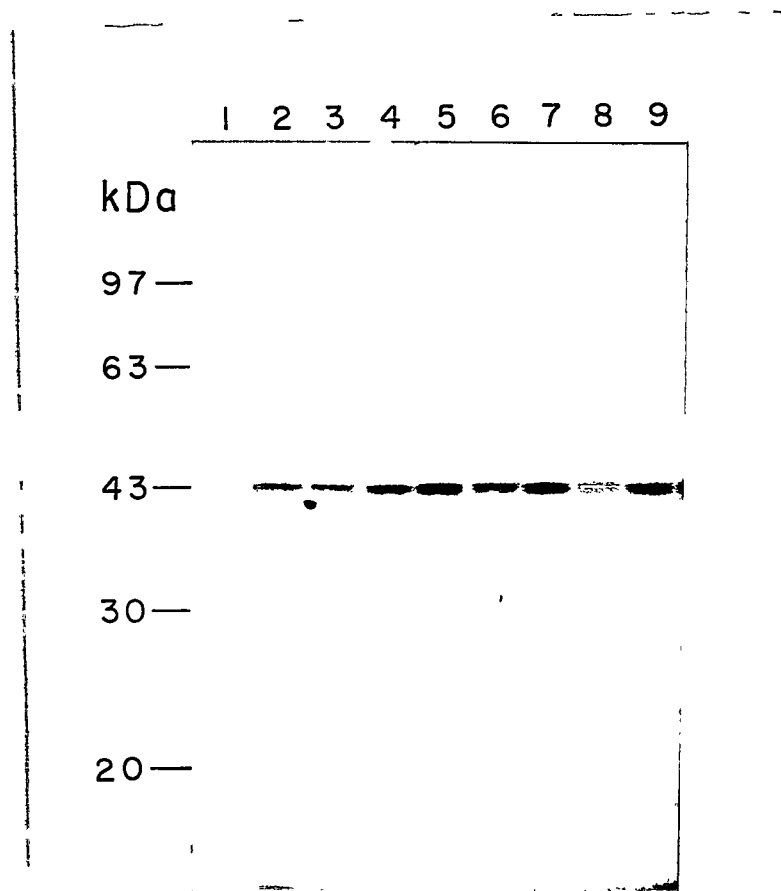


Figura 27. Análisis por electroforesis y autorradiografía en geles de poliacrilamida, de la expresión de las proteínas quiméricas Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12 en lisado de reticulocitos.

La síntesis de cada una de las proteínas quiméricas se realiza en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*, en presencia de 2 μg de mRNA y ^{35}S -metionina 20 μM (20.000 cpm/pmol). La incubación se realiza durante 60 minutos a 30°C. La reacción se detiene con 1 volumen de buffer de Laemmli. 8 μl de esta mezcla de reacción se aplican en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturantes. El gel se tiñe con azul de Coomassie, luego de lo cual se seca y se somete a autorradiografía por 12 horas. Los carriles 2, 3, 5 y 6 contienen los productos de la traducción de mRNA que codifica para las proteínas quiméricas Ch10, Ch9, Ch12 y Ch11. Los carriles 8 y 9 contienen los productos de traducción codificantes para los proteínas $G_{sa}6A1$ de *Xenopus laevis* y para la forma corta de la proteína G_{sa} de hígado humano. El carril 1 contiene lisado de reticulocitos tratado en las mismas condiciones anteriormente indicadas para la síntesis de proteína, pero sin mRNA agregado al medio. En los carriles 4 y 7 se muestran como controles adicionales los productos de traducción de mRNA codificante para la proteína G_{sa} de hígado humano, cuyo cDNA es cortado por las mismas enzimas de restricción utilizadas en la construcción de las quimeras Ch9 y Ch10 (carril 4) y Ch11 y Ch12 (carril 7). Los fragmentos de cDNA obtenidos son posteriormente religados y subclonados en pAGA.

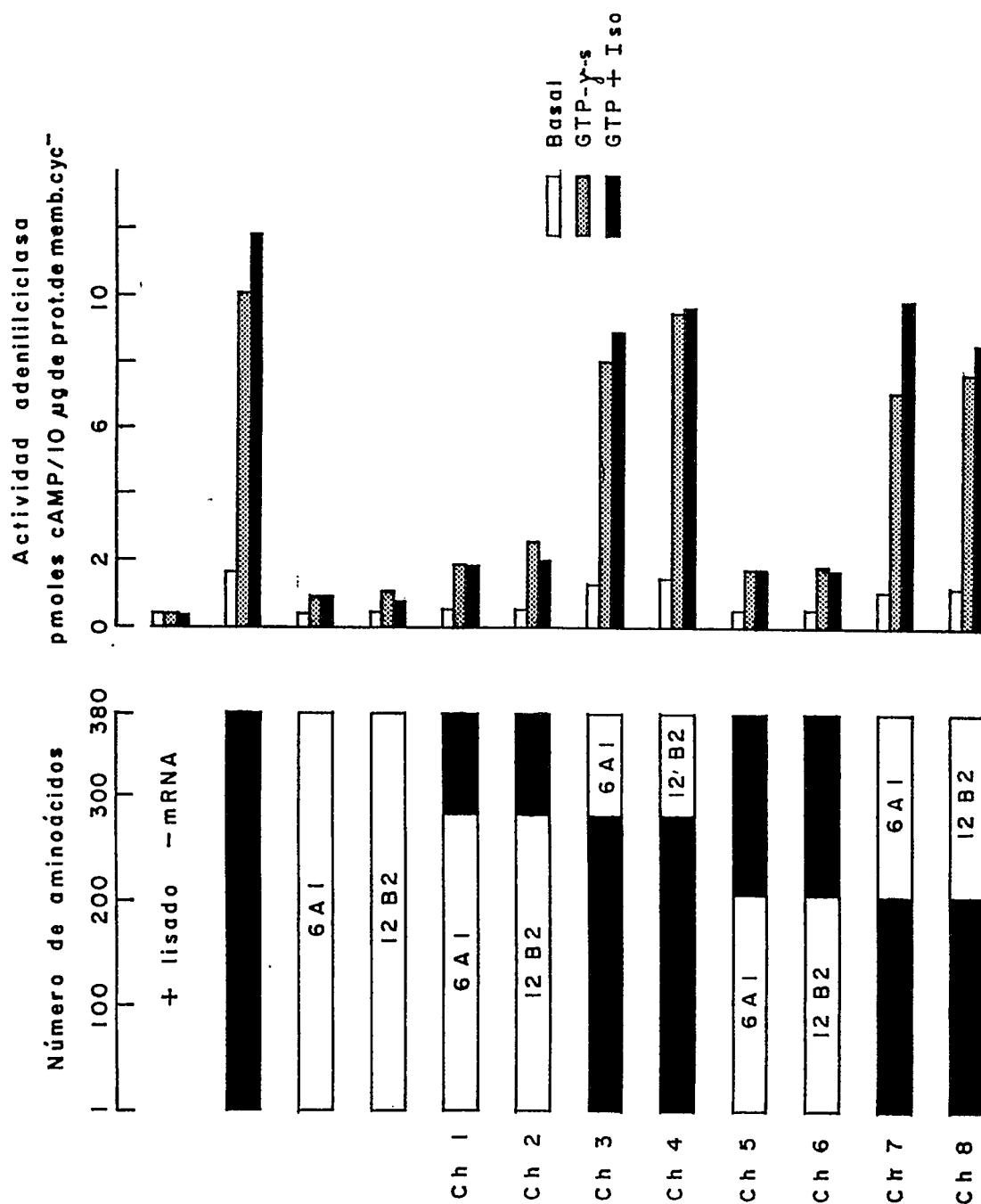


Figura 28. Análisis de la capacidad de las proteínas quiméricas Ch1, Ch2, Ch3, Ch4, Ch5, Ch6, Ch7 y Ch8 de reconstituir la actividad adenilicilasa de membranas cyc⁻ (ver leyenda en la página siguiente).

Figura 28. Análisis de la capacidad de las proteínas quiméricas Ch1, Ch2, Ch3, Ch4, Ch5, Ch6, Ch7 y Ch8 de reconstituir la actividad adeniliciclasa de membranas cyc-.

Las proteínas quiméricas utilizadas en este ensayo se sintetizan y se cuantifican como se describe en *Materiales y Métodos*. En el experimento de reconstitución se usan 160 fmoles de cada una de las proteínas G_{s0} sintetizadas. La actividad de la adeniliciclasa se mide como se describe en *Materiales y Métodos*, en presencia de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 0,110 mM (1520 cpm/pmol) y 10 μg de membranas cyc-. Las proteínas G_{s0} de humano y de *Xenopus laevis* se representan en color negro y blanco respectivamente. Las variantes de *Xenopus laevis* se indican en la figura como 6A1 y 12B2. Las incubaciones se realizan por 40 minutos a 32°C. Donde se indica se adiciona al medio de incubación GTP- γ -S 100 μM (▨), GTP 10 μM e isoproterenol 100 μM (■) o agua bidestilada (actividad basal □). Se ensaya además lisado de reticulocitos tratado en las mismas condiciones indicadas para la síntesis de proteína, pero sin mRNA agregado al medio (+lisado -mRNA). El $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-cAMP}$ se cuantifica como se describe en *Materiales y Métodos*. Cada punto es determinado por triplicado.

amino terminal de la proteína de humano reconstituyen la actividad adenililciclase de células cyc- prácticamente en el mismo nivel que la proteína de hígado humano. Por el contrario las quimeras que poseen el 70% (quimeras Ch1 y Ch2) y el 50% (Ch5 y Ch6) de la región amino terminal de las proteínas G_{sq} 6A1 y G_{sq} 12B2 son casi tan inactivas como las proteínas que provienen en su totalidad de oocitos de *Xenopus laevis*

Estos resultados nos sugieren que la región responsable de la falta de acoplamiento funcional de las dos proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* con la adenililciclase se encuentra en la región amino terminal de estas proteínas. Es precisamente en esta región donde se concentran la mayor cantidad de diferencias a nivel de aminoácidos entre las dos proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis* y la proteína de humano. Por este motivo decidimos construir proteínas quiméricas en las cuales se intercambian regiones del segmento amino terminal de las proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis* y de humano. Debido a que las dos proteínas de *Xenopus laevis* presentan actividades equivalentes, se decidió trabajar sólo con una de las dos formas: la proteína G_{sq} 6A1. En el experimento de la figura 29 se muestra la capacidad de las proteínas quiméricas construídas de reconstituir la respuesta de la adenililciclase a GTP- γ -S, NaF e isoproterenol. Estos resultados indican que la proteína de hígado humano a la cual se le insertaron 170 aminoácidos de la porción amino terminal de la proteína G_{sq} 6A1 de oocitos pierde la capacidad de acoplarse funcionalmente a la adenililciclase de membranas cyc-, mientras que la proteína de oocitos a la cual se le insertaron los 170 aminoácidos de la región amino terminal de la proteína de hígado humano si lo hace. El mismo efecto se observa cuando se intercambia el fragmento mas pequeño de 126 aminoácidos. Este último fragmento contiene 19 de las 29 diferencias a nivel de aminoácidos (de un total de 379) que existen entre las proteína G_{sq} 6A1 de oocitos de *Xenopus laevis* y de humano. Estos resultados fueron obtenidos en presencia

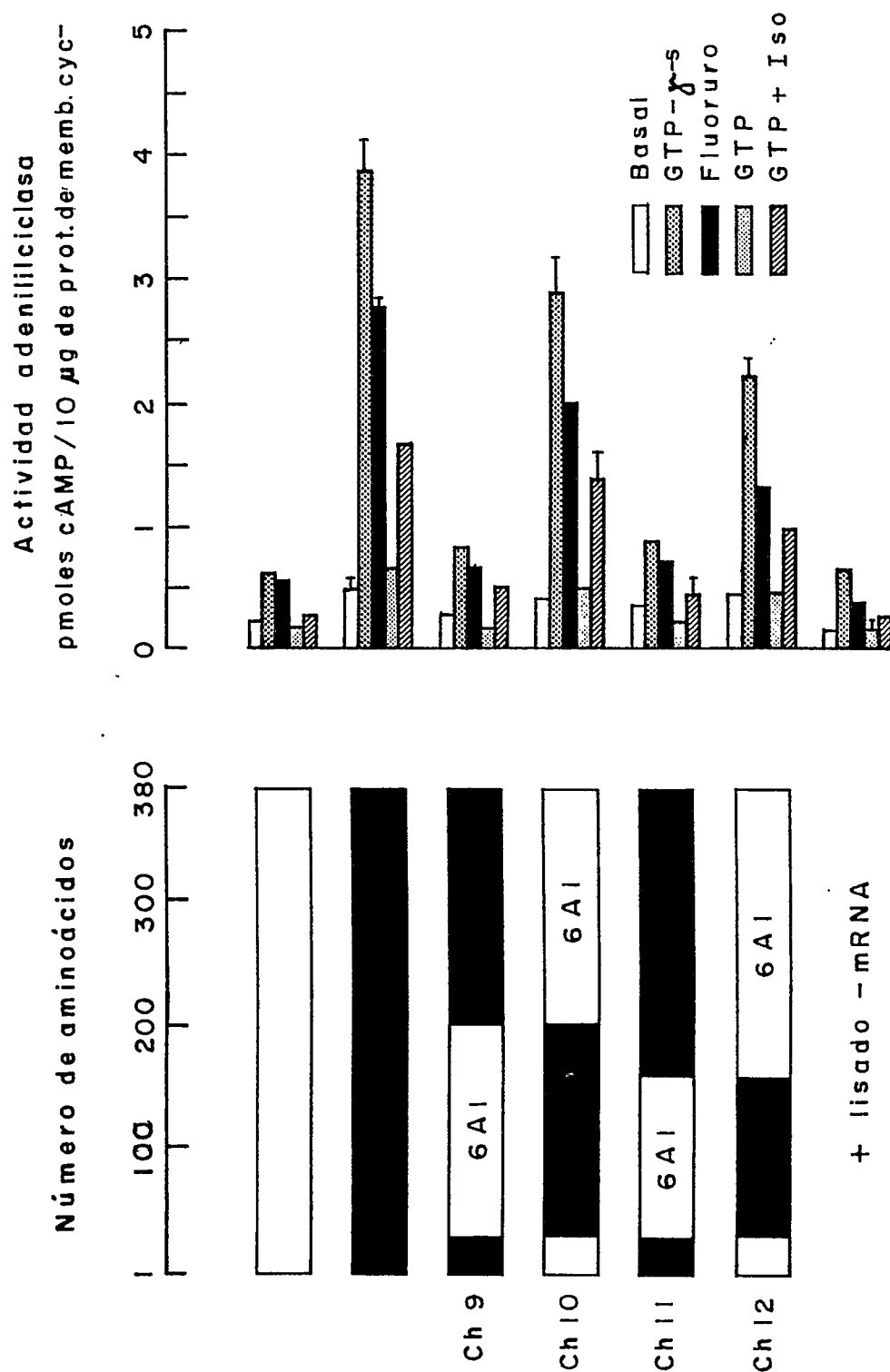


Figura 29. Análisis de la capacidad de las proteínas quiméricas Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12 de reconstituir la actividad adeniliclasa de membranas cyc⁻ (ver leyenda en la página siguiente).

Figura 29. Análisis de la capacidad de las proteínas quiméricas Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12 de reconstituir la actividad adenililciclasa de membranas cyc-.

Las proteínas quiméricas utilizadas en este ensayo se sintetizan y se cuantifican como se describe en *Materiales y Métodos*. En el experimento de reconstitución se usan 63 fmoles de cada una de las proteínas G_{sq} sintetizadas. La actividad de la adenililciclasa se mide como se describe en *Materiales y Métodos*, en presencia de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 0,150 mM (745 cpm/pmol) y 10 μg de membranas cyc-. Las incubaciones se realizan por 40 minutos a 32°C. Las proteínas G_{sq} de humano y de *Xenopus laevis* se representan en color negro y blanco respectivamente. Las variantes de *Xenopus laevis* se indican en la figura como 6A1 y 12B2. Donde se indica se adiciona al medio de incubación GTP- γ -S 100 μM (▨), GTP 10 μM (▩), GTP 10 μM e isoproterenol 100 μM (▧), fluoruro 10 mM (■) o agua bidestilada (actividad basal □); Se ensaya además lisado de reticulocitos tratado en las mismas condiciones indicadas para la síntesis de proteína, pero sin mRNA agregado al medio (+lisado -mRNA). El $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-cAMP}$ se cuantifica como se describe en *Materiales y Métodos*. Cada punto se determina por triplicado.

de varios efectores que activan específicamente a las proteínas G_q .

3.3. Reconstitución de la actividad adenililciclase de membranas cyc- por las proteínas quiméricas G_{i-20} - G_{sq} .

Como se discutió en la *Introducción*, G_{i-20} participa en la inhibición hormonal de la adenililciclase, aunque sobre este tema todavía existe controversia. Algunos autores han comunicado la inhibición directa de la adenililciclase por esta proteína (Taussig y cols., 1993a), otros indican que ella no parece modificar sustancialmente la actividad de la adenililciclase (Osawa y cols., 1990). Sin embargo, experimentos con proteínas quiméricas que contienen segmentos de G_{i-20} y G_{sq} expresadas en células cyc- en cultivo, indican que éstas presentan una capacidad bastante mayor que la proteína G_{sq} de reconstituir la actividad adenililciclase (Osawa y cols., 1990). Debido a estos antecedentes de la literatura y a que nuestros resultados indican que existe en la región amino terminal de G_{sq} otra región que es importante en la regulación de la actividad de la adenililciclase de membranas cyc-, nos pareció interesante estudiar como afectaría el remplazar la región amino terminal de G_{sq} de *Xenopus laevis* y de humano, por regiones de la proteína G_{i-20} . Es así como se construyeron las dos proteínas quiméricas mostradas en el esquema 19 y que llevan la denominación Ch13 y Ch14. La quimera Ch13 está constituida por el 50% amino terminal de la proteína G_{i-20} de ratón y por el 50% carboxilo terminal de la proteína G_{sq} 6A1 de *Xenopus laevis*. Finalmente la quimera Ch14 está constituida por el 50% amino terminal de la proteína G_{i-20} de ratón y por el 50% carboxilo terminal de la proteína G_{sq} de humano. El detalle experimental de la construcción de estas quimeras a nivel de las secuencias de cDNA se encuentra en la sección *Materiales y Métodos*. Estos genes fueron subsecuentemente transcritos (figura 30) y traducidos (figura 31) para producir las proteínas correspondientes.

En la siguiente etapa se procedió a estudiar la capacidad de las

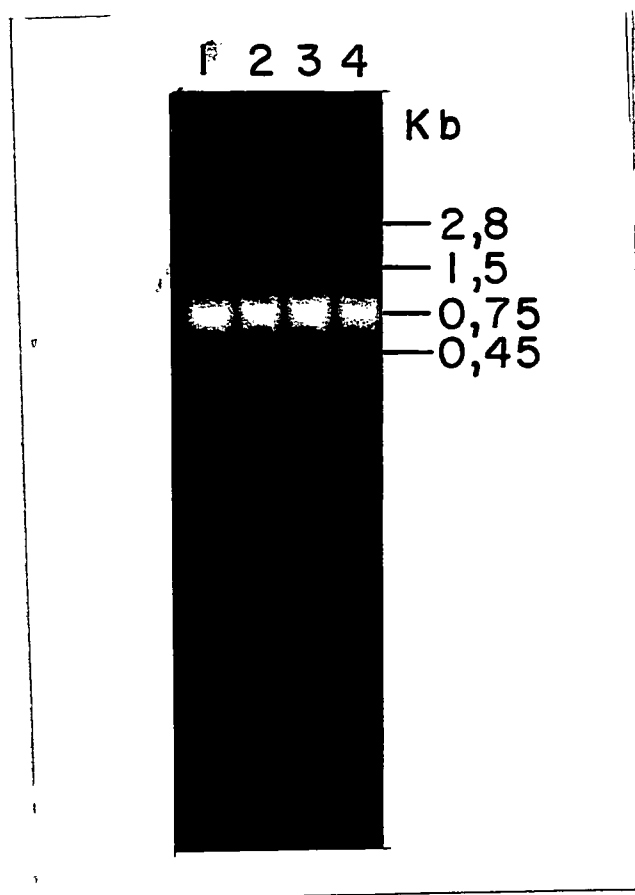


Figura 30. Análisis de la síntesis de los mRNA que codifican para las proteínas quiméricas Ch13 y Ch14 en geles de agarosa.

La síntesis de los mRNA se realiza como está descrito en *Materiales y Métodos*. Para este análisis se aplican alícuotas de 5 μ l de cada medio de transcripción en un gel de agarosa al 1% y se someten a electroforesis en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*. Los carriles 3 y 4 contienen respectivamente los mRNA codificantes para las proteínas G_{50} de hígado humano y $G_{50}A1$ de oocitos de *Xenopus laevis*. Los carriles 1 y 2 contienen respectivamente los productos de transcripción para las quimeras Ch13 y Ch14. Los tamaños indicados en Kb corresponden a la migración en el mismo gel de DNA de fago λ digerido con la enzima de restricción Bsal1.

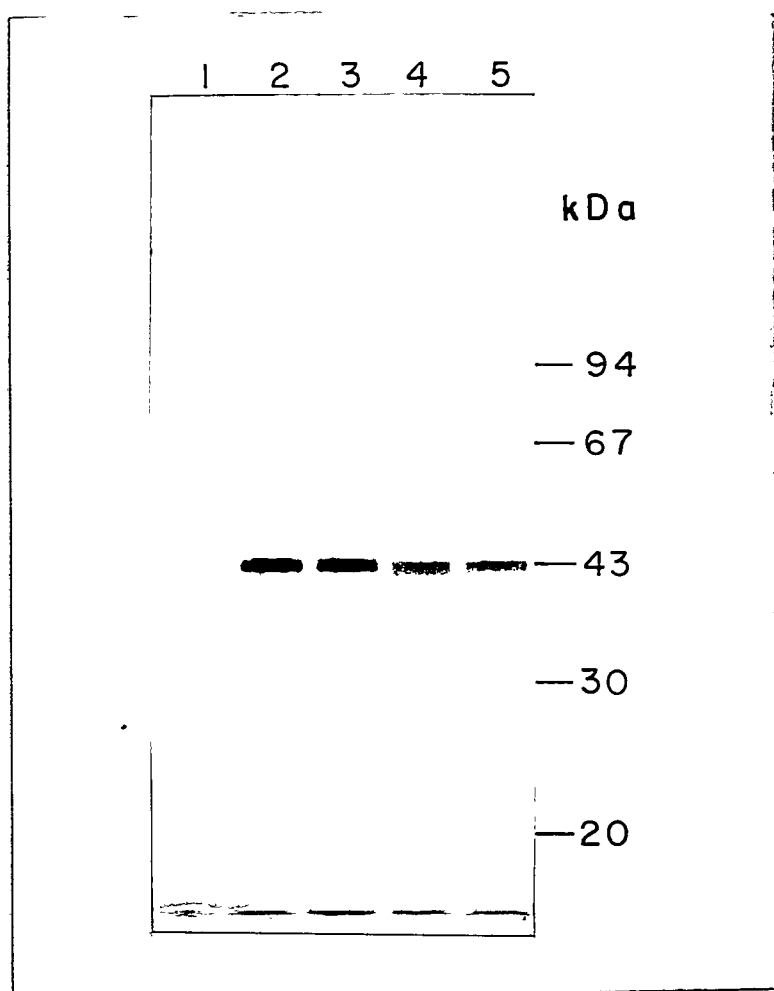


Figura 31. Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida y autorradiografía, de la expresión de las proteínas quiméricas Ch13 y Ch14.

La síntesis de cada una de las proteínas quiméricas se realiza en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*, en presencia de 2 μg de mRNA y ^{35}S -metionina 20 μM (15.500 cpm/pmol). La incubación se realiza durante 60 minutos a 30°C. La reacción se detiene con 1 volumen de buffer de Laemmli. 7 μl de esta mezcla de reacción se aplican en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes. El gel se tiñe con azul de Coomassie, luego de lo cual se seca y se somete a autorradiografía por 48 horas. Los carriles 4 y 5 contienen los productos de la traducción de los mRNA que codifican para las proteínas G_{50} de hígado humano y $G_{50}6A1$ de *Xenopus laevis*. Los carriles 2 y 3 contienen los productos de traducción de los mRNA que codifican para las quimeras Ch14 y Ch13 respectivamente. El carril 1 contiene lisado de reticulocitos tratado en las mismas condiciones anteriormente indicadas para la síntesis de proteína, pero sin mRNA agregado al medio.

quimeras Ch13 y Ch14 de reconstituir la respuesta a GTP, GTP- γ -S, NaF e isoproterenol de la actividad adenililciclase de las membranas cyc-. En la figura 32 se muestra el resultado de este experimento. Se compara la capacidad de las dos quimeras de reconstituir la actividad de la adenililciclase con las proteínas G_{sq} de humano y de oocitos de *Xenopus laevis*. Las dos proteínas que tienen la secuencia amino terminal de la proteína G_{i-2q} de rata presentan una capacidad mucho mayor que la proteína G_{sq} de humano de estimular la adenililciclase de oocitos de *Xenopus laevis*. Esta característica se manifiesta tanto en la actividad medida en condiciones basales, como en aquella medida en presencia de diferentes efectores. Es también notorio que la quimera G_{i-2q} - G_{sq} humano (Ch14) presenta una mayor capacidad que la quimera G_{i-2q} - G_{sq} de *Xenopus laevis* (Ch13) de reconstituir la actividad de la adenililciclase de las membranas cyc- en todas las condiciones ensayadas.

Estos resultados están de acuerdo con lo previamente informado en la literatura con respecto al comportamiento de proteínas quiméricas G_{i-2q} - G_{sq} (Osawa y cols., 1990). A raíz de estos resultados se ha postulado que existiría en la región amino terminal de la proteína G_{sq} un dominio regulador del intercambio de GDP por GTP. Al cambiarle a la proteína G_{sq} los aminoácidos de esta región por los de G_{i-2q} , se alteraría este dominio, con lo cual se produciría una proteína que recambiaría el GDP por el GTP a mayor velocidad que G_{sq} . Esto produciría una proteína con una afinidad por GTP mayor que la de G_{sq} . Nosotros sospechamos que los altos niveles de activación de la adenililciclase obtenidos con las quimeras G_{i-2q} - G_{sq} en ausencia de cualquier efector agregado al medio de ensayo (actividad basal), se deberían al GTP endógeno del lisado de reticulocitos. Los niveles de reconstitución de la actividad adenililciclase realizados con G_{sq} de humano en presencia de isoproterenol y en ausencia de GTP, son similares a los obtenidos con la adición de GTP e Isoproterenol (resultados no

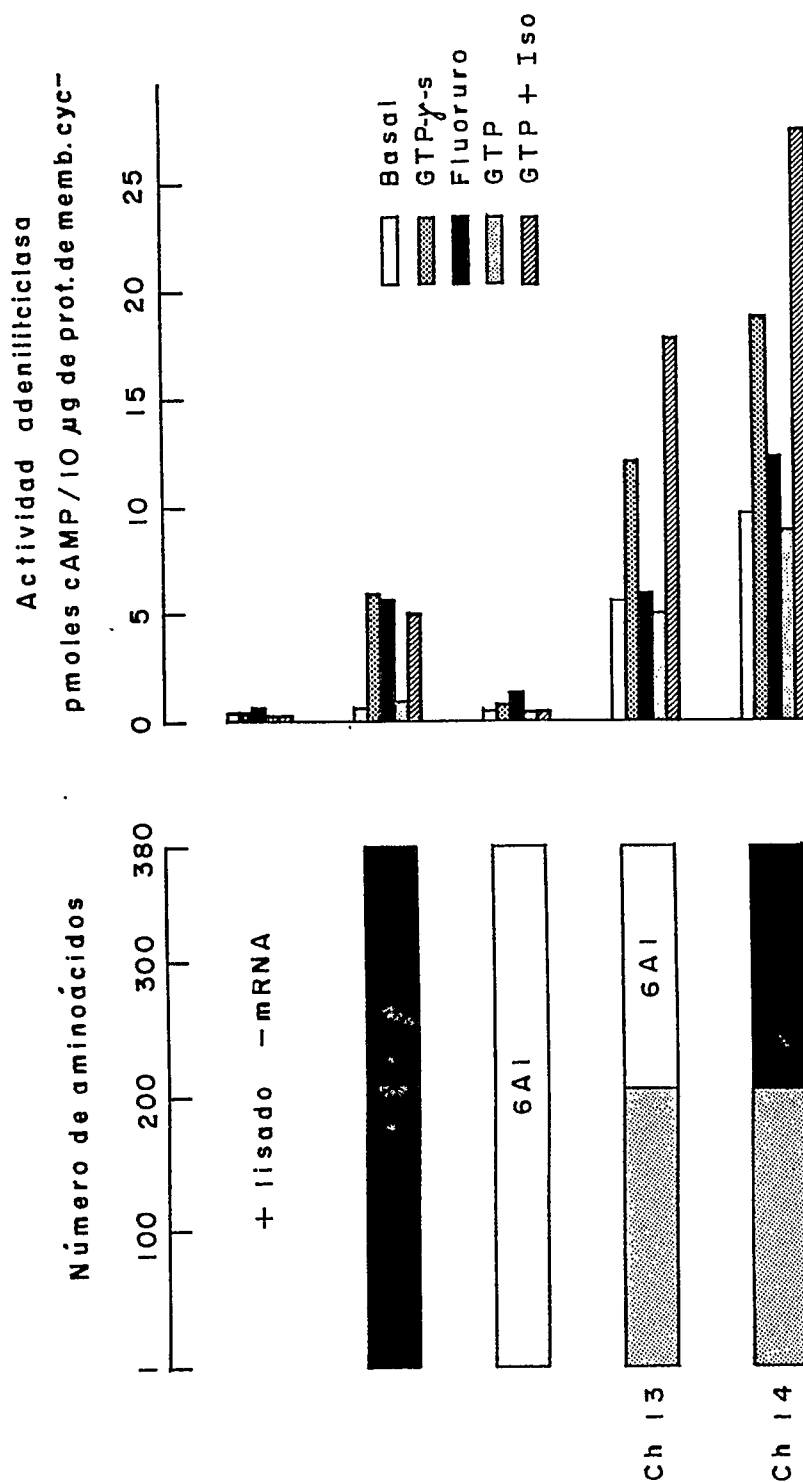


Figura 32. Análisis de la capacidad de las proteínas quiméricas Ch13 y Ch14 de reconstituir la actividad adeniliciclasa de membranas cyc⁻ (ver leyenda en la página siguiente).

Figura 32. Análisis de la capacidad de las proteínas quiméricas Ch13 y Ch14 de reconstituir la actividad adenililciclase de membranas *cyc*⁻.

Las proteínas quiméricas utilizadas en este ensayo se sintetizan y se cuantifican como se describe en *Materiales y Métodos*. En el experimento de reconstitución se usan 63 fmoles de cada una de las proteínas G_{sa} sintetizadas. La actividad de la adenililciclase se mide como se describe en *Materiales y Métodos*, en presencia de 100 fmoles de cada una de las proteínas G_{sa} sintetizadas, [α -³²P]-ATP 0,132 mM (1389 cpm/pmol) y 10 μ g de membranas *cyc*⁻. Las incubaciones se realizan por 40 minutos a 32°C. Donde se indica se adiciona al medio de incubación GTP- γ -S 100 μ M (▨), GTP 10 μ M (▩), GTP 10 μ M e isoproterenol 100 μ M (▧), fluoruro 10 mM (■) o agua bidestilada (actividad basal □). Se ensaya además lisado de reticulocitos tratado en las mismas condiciones anteriormente indicadas para la síntesis de proteína, pero sin mRNA agregado al medio (+lisado -mRNA). El [α -³²P]-cAMP se cuantifica como se describe en *Materiales y Métodos*. Cada punto se determina por triplicado.

mostrados). De estos experimentos es posible concluir que los niveles de GTP aportados por el lisado al ensayo de actividad de la adenililciclase podrían llegar al nivel del micromolar. Este orden de concentración de GTP, sumado al hecho de que G_{sq} de humano tendría una menor afinidad por GTP que las quimeras $G_{i-20}-G_{sq}$, darían cuenta de los resultados obtenidos. De estos últimos resultados mostrados y de los obtenidos con las proteínas quiméricas construídas entre G_{sq} de humano y de *Xenopus laevis*, es factible postular la existencia en la región amino terminal de la proteína G_{sq} , de una región que sería fundamental para la activación funcional de estas proteínas. Esta región controlaría probablemente entre otras funciones el intercambio de nucleótidos de guanina. Los resultados obtenidos con las dos proteínas G_{sq} clonadas de *Xenopus laevis* pueden indicar que al menos en este caso esta región sería hiperatenuadora del intercambio de nucleótidos de guanina.

4. Estudio del efecto de protección por GTP- γ -S a la digestión por tripsina de G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis*.

Cuando las proteínas G_q unen GTP o sus análogos no hidrolizables, sufren un cambio conformacional como consecuencia de su activación. Este cambio conformacional puede ser monitoreado por fluorescencia (Higashijima y cols., 1987a) o por digestión con algunas enzimas proteolíticas tales como la tripsina (Hudson y cols., 1981). Este cambio conformacional trae como consecuencia la protección de algunos sitios susceptibles al corte por tripsina dentro de la proteína. Por tanto, al tratar G_{sq} con tripsina en ausencia de GTP en el medio, la proteína de 43.000 de peso molecular se digiere produciéndose varios fragmentos pequeños. Sin embargo al preincubar la proteína con análogos no hidrolizables de GTP tales como GTP- γ -S o GppNHp y posteriormente tratarla con tripsina, se observa la aparición de una banda de 41.000 de peso molecular, con la liberación de un pequeño fragmento del extremo amino terminal de la proteína.

Estos resultados han sido interpretados en el sentido de que la región central de la proteína G_q contendría el sitio de unión del nucleótido de guanina. La unión del GTP y el posterior cambio conformacional de G_q la protegerían de la digestión por la proteasa. El criterio de digestión con tripsina ha sido usado para medir en forma cualitativa la capacidad de una subunidad G_q de unir GTP y sufrir el cambio conformacional como consecuencia de su activación (Binbaumer y cols., 1990). En nuestro caso usamos este criterio para analizar si la región de 126 aminoácidos de la región amino terminal de la proteína G_{sq} de oocito interfiere con la unión del GTP y el posterior cambio conformacional, afectando la capacidad de ella de acoplarse funcionalmente a la adenililciclasa. Existe además alguna evidencia experimental de que la región amino terminal de G_q jugaría un papel importante en regular el recambio de GTP por GDP (Osawa y cols., 1990).

4.1. Efecto de protección por GTP- γ -S a la digestión de G_{sq} de *Xenopus laevis*, por concentraciones crecientes de tripsina.

Para realizar este estudio se preincubaban las proteínas $G_{sq}6A1$ de oocitos de *Xenopus laevis* y de humano con 200 μ M de GTP- γ -S, luego de lo cual se incuban por 30 minutos con concentraciones crecientes de tripsina. El resultado de este experimento se muestra en la figura 33. Concentraciones sobre 10 μ g/ml de tripsina producen una digestión total de la proteína $G_{sq}6A1$ de *Xenopus laevis*, habiendo o no sido previamente preincubada con GTP- γ -S. Por el contrario la proteína G_{sq} de humano muestra una mayor resistencia a la digestión por la proteasa, observandose la aparición de la banda de 41.000 sobre los 10 μ g/ml de tripsina, habiendo o no sido previamente incubada con GTP- γ -S. Sin embargo a 30 y 50 μ g/ml de tripsina se observa una significativa protección por GTP- γ -S de la digestión por la proteasa de una forma de 41.000 de peso molecular. La proteína $G_{sq}12B2$ de oocitos de *Xenopus laevis* muestra un comportamiento

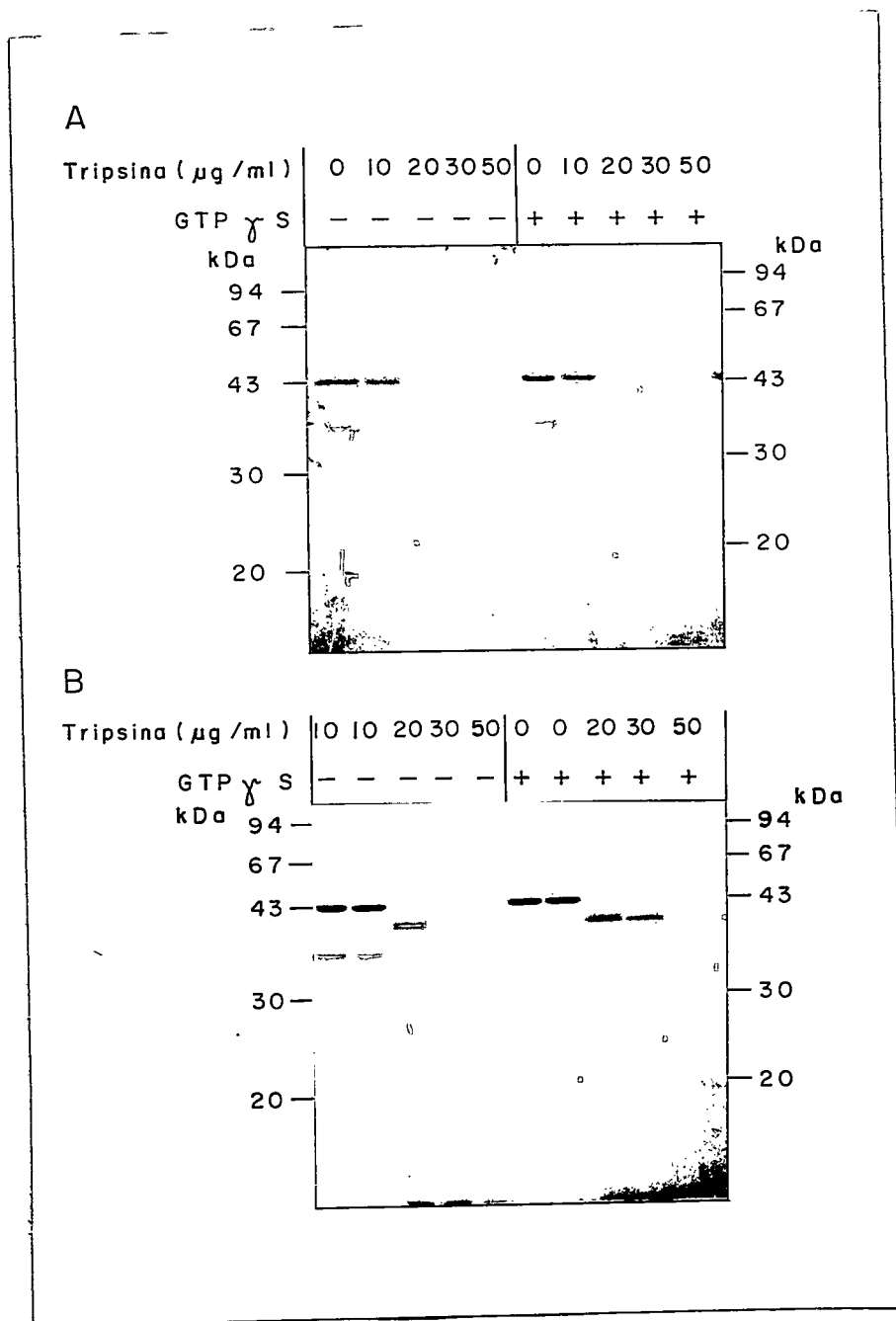


Figura 33. Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida y autorradiografía, del efecto de protección del GTP- γ -S a la digestión por tripsina de las proteínas G_{30} de oocitos de *Xenopus laevis* y de humano (ver leyenda en la página siguiente).

Figura 33. Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida y autorradiografía, del efecto de protección del GTP- γ -S a la digestión por tripsina de las proteínas G₅₀ de oocitos de *Xenopus laevis* y de humano.

Las proteínas utilizadas en este ensayo se sintetizan y cuantifican como se describe en *Materiales y Métodos*. Se preincuban 17 fmoles de las proteínas G₅₀ de *Xenopus laevis* (A) (355 cpm/fmol) y de humano (B) (417 cpm/fmol) en presencia (-) o ausencia de GTP- γ -S 150 μ M (+), por 30 minutos a 30°C. La digestión se inicia por la adición a cada tubo de 5 μ l de una solución de tripsina para llegar a la concentración final indicada en la figura. La incubación se realiza por 30 minutos a 30°C. La reacción se detiene como se indica en *Materiales y Métodos*. A cada tubo de reacción se le agrega un volumen de amortiguador de Laemmli y las muestras se aplican en un gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturantes. El gel se tiñe con azul de Coomassie, se seca y se somete a autorradiografía por 48 horas.

similar a la proteína $G_{sq}6A1$ en su susceptibilidad a la digestión por tripsina en presencia o ausencia de GTP- γ -S (resultados no mostrados).

Estos resultados podrían indicar que las proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* o bien no recambian GDP por GTP con una cinética similar a G_{sq} de humano, o bien no son susceptibles de sufrir el cambio conformacional como consecuencia de su activación por GTP- γ -S. En un intento por averiguar si esta propiedad de las proteínas $G_{sq}6A1$ de *Xenopus laevis* de ser susceptible a la digestión por tripsina en presencia de GTP- γ -S, se encuentra en la región amino terminal, se decidió realizar los experimentos de susceptibilidad a la digestión por tripsina con las quimeras Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12. En estas proteínas quiméricas se ha intercambiado un fragmento amino terminal de 170 (quimeras Ch9 y Ch10) y 126 aminoácidos (Ch11 y Ch12) entre la proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis* y de humano.

4.2. Efecto de protección por GTP- γ -S a la digestión por tripsina de las quimeras Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12 .

Las proteínas quiméricas indicadas y las proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* y de humano son preincubadas con GTP- γ -S o con el amortiguador respectivo como control. Posteriormente se tratan con tripsina a una concentración de 50 μ g/ml en el medio de incubación. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 34. Estos indican que aquellas quimeras que portan la región amino terminal de la proteína G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* no presentan protección a la digestión por tripsina cuando son princubados con GTP- γ -S. Por el contrario, cuando se le coloca a la proteína G_{sq} de oocito la región amino terminal de la proteína de humano, se produce la protección por el GTP- γ -S a la digestión por la proteasa. Esto sucede indistintamente si el fragmento intercambiado entre las proteínas G_{sq} de oocitos y de humano es el de 170 o el de 126 aminoácidos.

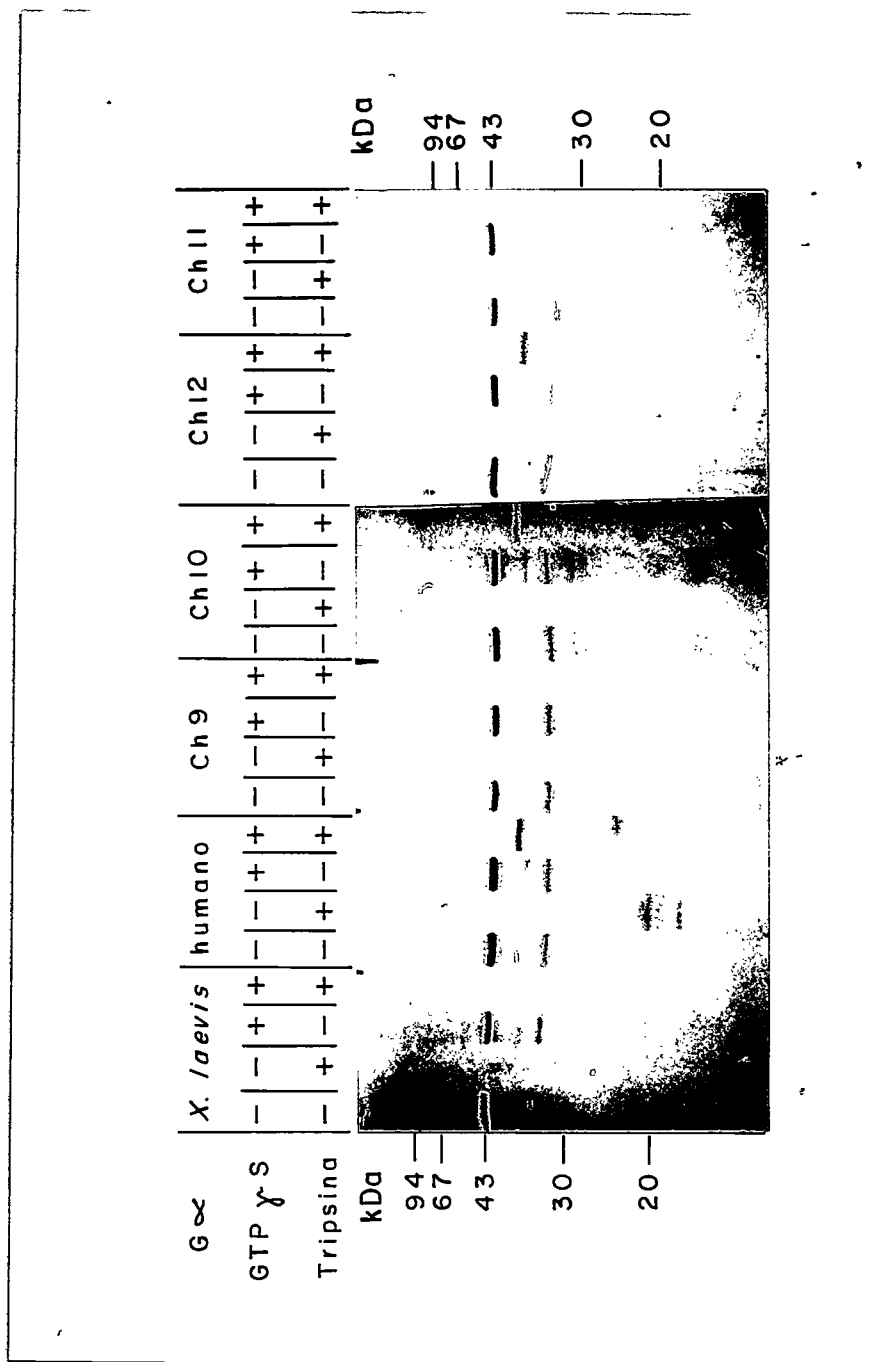


Figura 34. Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida y autorradiografía, del efecto de protección del GTP-γ-S a la digestión por tripsina de las proteínas quiméricas Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12 (ver leyenda en la página siguiente).

Figura 34. Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida y autorradiografía, del efecto de protección del GTP- γ -S a la digestión por tripsina de las proteínas quiméricas Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12.

Las proteínas utilizadas en este ensayo se sintetizan y cuantifican como se describe en *Materiales y Métodos*. Se preincuban 30 fmoles de proteína G₃₀ humana (145 cpm/fmol), de *Xenopus laevis* (221 cpm/fmol) y las proteínas quiméricas Ch9 (136 cpm/fmol), Ch10 (128 cpm/fmol), Ch11 (295 cpm/fmol) y Ch12 (168 cpm/fmol), en presencia (-) o ausencia de GTP- γ -S 150 μ M (+). La digestión con la proteasa se inicia por la adición a cada tubo de 5 μ l de una solución de tripsina 150 μ g/ml. La incubación se realiza por 30 minutos a 30°C. La reacción se detiene como se describe en *Materiales y Métodos*. A cada tubo de reacción se le agrega un volumen de amortiguador de Laemmli y las muestras se aplican en un gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturantes. El gel se tiñe con azul de Coomassie, se seca y se somete a autorradiografía por 48 horas.

4.3. Efecto de protección por GTP- γ -S a la digestión por tripsina de las quimeras $G_{i-2\alpha}$ - $G_{s\alpha}$.

Las proteínas quiméricas $G_{i-2\alpha}$ - $G_{s\alpha}$ de *Xenopus laevis* (Ch 13) y $G_{i-2\alpha}$ - $G_{s\alpha}$ de humano (Ch 14), son preincubadas con GTP- γ -S o con el amortiguador respectivo como control. Posteriormente se tratan con tripsina a una concentración de 50 μ g/ml en el medio de incubación. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 35. Estos indican que ambas proteínas son protegidas por GTP- γ -S a la digestión por tripsina.

Analizando en su conjunto los resultados obtenidos con el patrón de digestión de la tripsina sobre las proteínas $G_{s\alpha}$ de *Xenopus laevis*, de humano y de algunas de las proteínas quiméricas construidas, es posible concluir de que existiría en la región amino terminal de las proteínas G_{α} una región que puede controlar el intercambio de nucleótidos de guanina y/o el cambio conformacional que es fundamental para la activación funcional de las proteínas G_{α} .

5. Estudio de la interacción de $G_{s\alpha}$ de oocitos de *Xenopus laevis* con $G_{\beta\gamma}$ de cerebro de bovino.

Con la finalidad de estudiar si la región de 126 aminoácidos que involucra los 19 aminoácidos diferentes entre $G_{s\alpha}$ de *Xenopus laevis* y de humano juega algún papel en regular la interacción con $G_{\beta\gamma}$ se analizó la capacidad de las proteínas $G_{s\alpha}$ producidas en lisado de reticulocitos de interactuar físicamente con $G_{\beta\gamma}$ purificada de cerebro de bovino. Para ello se sintetizan las proteínas $G_{s\alpha}$ de *Xenopus laevis*, de humano y las proteínas quiméricas Ch11 y Ch12, en lisado de reticulocitos en presencia de 35 [S]-metionina. Las proteínas marcadas fueron sometidas a una sedimentación en gradiente de sacarosa del 5% al 20% en presencia y ausencia de $G_{\beta\gamma}$ purificada de cerebro de bovino. Un desplazamiento en la migración de las proteínas $G_{s\alpha}$ marcadas con respecto a su migración en el gradiente sin $G_{\beta\gamma}$ es indicación de la formación del trímero $G_{\alpha\beta\gamma}$. Los

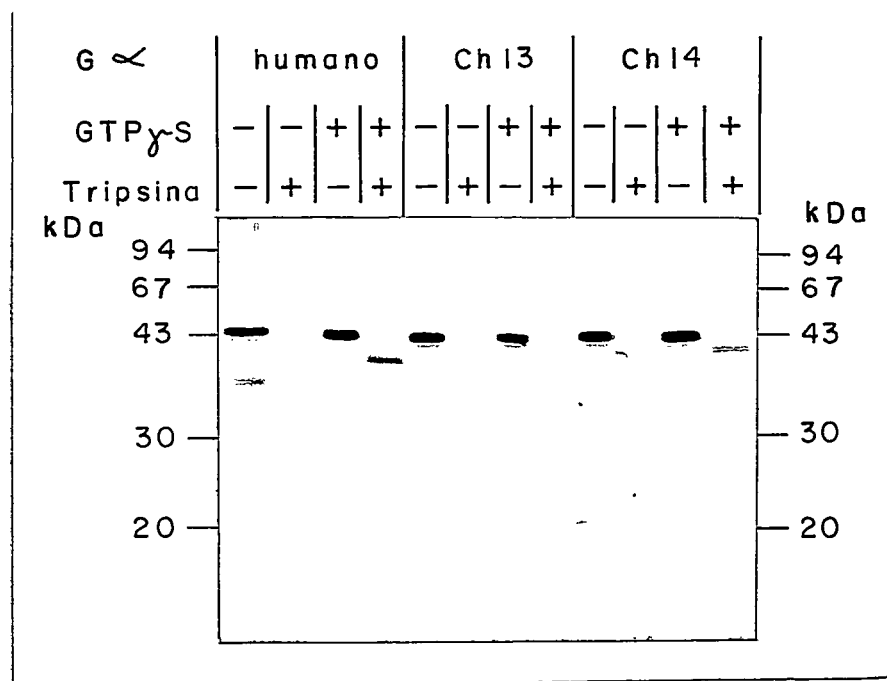
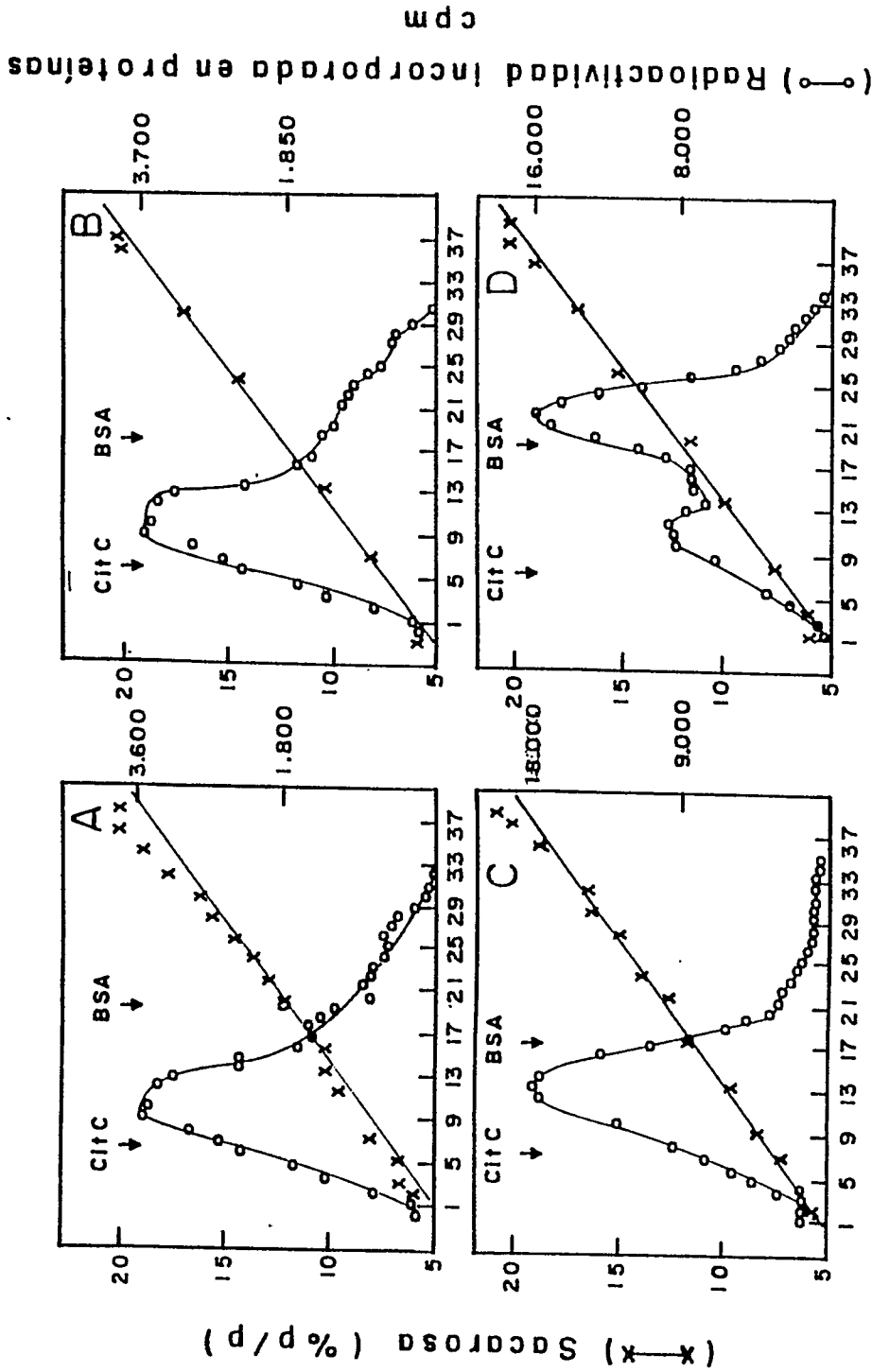


Figura 35. Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida y autorradiografía, del efecto de protección del GTP- γ -S a la digestión por tripsina de las proteínas quiméricas Ch13 y Ch14.

Se preincuban 30 fmoles de la proteína G_{50} humana (145 cpm/fmol) y las quimeras Ch13 (169 cpm/fmol) y Ch14 (169 cpm/fmol), en presencia (+) o ausencia de GTP- γ -S 150 μ M (-), por 30 minutos a 30°C. La digestión con la proteasa se inicia con la adición a cada tubo de 5 μ l de una solución de tripsina 150 μ g/ml. La incubación se realiza por 30 minutos a 30 °C. La reacción se detiene como se describe en *Materiales y Métodos*. A cada tubo de reacción se le agrega un volumen de amortiguador de Laemmli y las muestras se aplican en un gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturantes. El gel se tiñe con azul de Coomassie, luego de lo cual se seca y se somete a autoradiografía por 48 horas.

resultados de este experimento son mostrados en las figura 36 y 37. Estos indican que mientras la proteína $G_{s\alpha}$ de humano es capaz de asociarse con $G_{\beta\gamma}$ la proteína de *Xenopus laevis* no lo hace (figura 36). Por otro lado la proteína quimérica que posee los 126 aminoácidos del amino terminal de $G_{s\alpha}$ de humano (Ch11) es capaz de asociarse, aunque en forma parcial con $G_{\beta\gamma}$ de cerebro de bovino (figura 37). La otra proteína quimérica que posee los 126 aminoácidos del amino terminal de $G_{s\alpha}$ de *Xenopus laevis* (Ch12), no es capaz de asociarse con $G_{\beta\gamma}$ de cerebro de bovino. Este resultado es una indicación de que la región amino terminal de las proteínas G_q , específicamente la región que se ha intercambiado entre las proteínas de humano y de *Xenopus laevis*, podría jugar un papel en el reconocimiento de $G_{\beta\gamma}$.

Gran parte de los resultados mostrados con anterioridad en esta sección han sido publicados (Antonelli y cols., 1991; Antonelli y cols., 1992; Antonelli y cols., 1994).



Número de fracción

Figura 36. Análisis por sedimentación en gradiente de sacarosa, de la interacción de las proteínas G₈₀ de *Xenopus laevis* y de humano con G₉₀ de cerebro de bovino (ver leyenda en la página siguiente).

Figura 36. Análisis por sedimentación en gradiente de sacarosa, de la interacción de las proteínas $G_{\beta\gamma}$ de *Xenopus laevis* y de humano con $G_{\beta\gamma}$ de cerebro de bovino.

Se incuban 11 fmoles de la proteína $G_{\beta\gamma}$ de *Xenopus laevis* (12.680 cpm/fmol de proteína) (A y B) y 42 fmoles de $G_{\beta\gamma}$ de humano (14.286 cpm/fmol de proteína) (C y D) por 24 horas a 4°C en presencia (B y D) o ausencia (A y C) de 5 pmoles de $G_{\beta\gamma}$ de cerebro de bovino. Posteriormente las muestras se centrifugan en un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 20 % (p/p) durante 17 horas como se describe en *Materiales y Métodos*. En la figura se muestra la radioactividad incorporada en proteínas expresada en cpm TCA precipitable de una alícuota de 50 μ l de cada fracción versus el número de fracciones. En la centrifugación se utilizan como patrones de masa molecular relativa BSA (67.000 kDa) y Citocromo C (12.000 kDa).

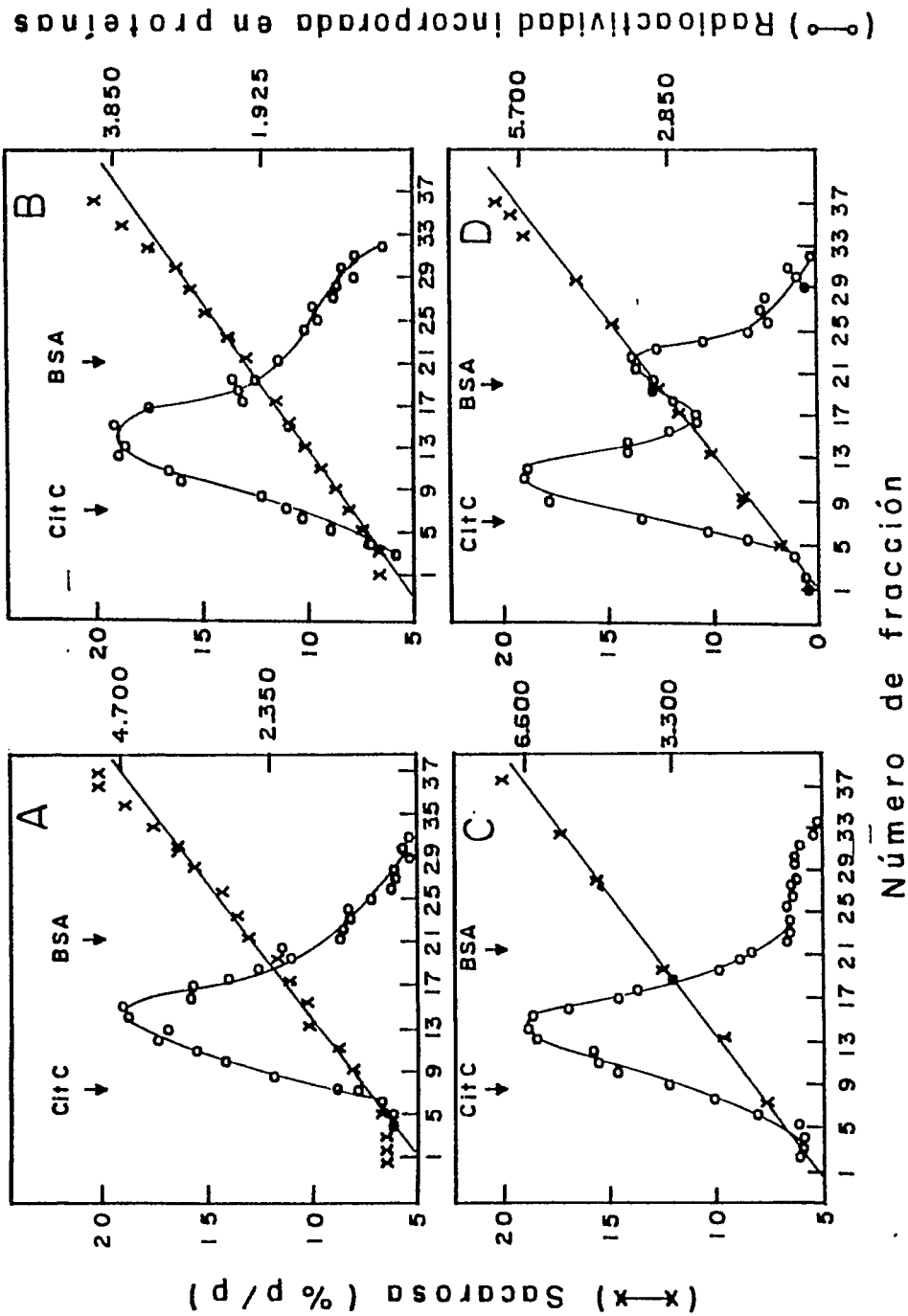


Figura 37. Análisis por sedimentación en gradiente de sacarosa, de la interacción de las quimeras Chi1 y Chi2 con $G_{\beta\gamma}$ de cerebro de bovino (ver leyenda en la página siguiente).

Número de fracción

Figura 37. Análisis por sedimentación en gradiente de sacarosa, de la interacción de las quimeras Ch11 y Ch12 con $G_{\beta\gamma}$ de cerebro de bovino.

Se incuban 8 fmoles de la quimera Ch11 (23.250 cpm/fmol de proteína) (A y B) y 8 fmoles de la quimera Ch12 (28.500 cpm/fmol de proteína) (C y D) por 24 horas a 4°C en presencia (B y D) o ausencia (A y C) de 5 pmoles de $G_{\beta\gamma}$ de cerebro de bovino. Posteriormente las muestras se centrifugan en un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 20 % (p/p) durante 17 horas como se describe en *Materiales y Métodos*. En la figura se muestra la radioactividad incorporada en proteínas, expresada en cpm TCA precipitable de una alícuota de 50 μ l de cada fracción versus el número de fracciones. En la centrifugación se utilizan como patrones de masa molecular relativa BSA (67.000 kDa) y Citocromo C (12.000 kDa).

DISCUSION

A. EFECTO DE POLICATIONES.

1. Especificidad del efecto estimulador a nivel de proteínas G (G_s).

Los resultados obtenidos en esta *Tesis* indican que polilisina y espermina producen una estimulación de la actividad de la adenililciclase de oocitos de *Xenopus laevis*, cuando ésta es medida en presencia de ligandos que la activan a través de G_s . Sin embargo, cuando la adenililciclase es estimulada directamente por forskolina, polilisina y espermina sólo producen una inhibición de esta actividad a altas concentraciones de ambos compuestos. Poliornitina también produce una estimulación de la actividad de la adenililciclase, cuando ésta es medida en presencia del análogo no hidrolizable de GTP, GppNHp. Aunque en este caso no se midió el efecto de poliornitina sobre la actividad adenililciclase estimulada directamente por forskolina, concentraciones por sobre los 5 μ M del péptido son inhibitoras de la actividad basal (actividad de la enzima medida en ausencia de agentes estimuladores de la actividad de la enzima). Ninguno de estos compuestos produce algún efecto significativo sobre la actividad basal de la adenililciclase, en el intervalo de concentración en el que estimulan a la adenililciclase cuando ésta es activada a través de G_s . Estos resultados indican que la estimulación de polilisina, espermina, y muy probablemente la de poliornitina sobre la actividad de la adenililciclase se debe a una acción específica de estos compuestos a nivel de la proteína G_s . La inhibición que producen los péptidos catiónicos y espermina sobre la actividad de la adenililciclase debe contrarrestar al efecto estimulador de estos compuestos observado al activar la adenililciclase a través de G_s . Es por tanto probable que el efecto estimulador de polilisina, poliornitina y espermina sea aún mayor que el neto observado. Poliarginina por el contrario no produce ninguna

estimulación de la adenililciclase a través de G_s . Este compuesto produce sólo un fuerte efecto inhibitor de la enzima por sobre los 5 μ M del péptido. Esta observación indica que el efecto de polilisina, poliornitina y espermina sobre G_s , no es un efecto general de todos los compuestos de naturaleza policatiónica. De hecho la poliamina espermidina es capaz de estimular la actividad de la adenililciclase cuando es medida en presencia de GppNHp, sin embargo la potencia de su efecto es mucho menor que la obtenida con espermina (resultados no mostrados).

2. Efecto de compuestos policatiónicos sobre la actividad GTPásica de proteínas G purificadas.

Los resultados presentados demuestran que varios compuestos de naturaleza policatiónica pueden estimular la actividad GTPásica de algunas proteínas G. Los resultados mas claros fueron obtenidos con la proteína G_{i-30} , la cual había sido expresada y purificada a partir del sistema del Baculo virus (Graf y cols., 1992). Polilisina y poliornitina estimulan significativamente la actividad GTPásica de G_{i-30} . Poliarginina también produce una estimulación, pero menor a la observada con polilisina y poliornitina. Por el contrario, espermina que estimula la actividad de G_s en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*, no produce ningún efecto sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} , en todo el intervalo de concentración ensayada. Las concentraciones de polilisina necesarias para obtener el efecto máximo sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} , son de aproximadamente un orden de magnitud menor que las observadas sobre G_s en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*.

La estimulación por polilisina de la actividad GTPásica de la transducina (G_t), es clara, pero mucho menor que la encontrada con la subunidad G_{i-30} . Con respecto a este punto es necesario notar que la actividad GTPásica basal de la transducina es de un orden de magnitud menor que la de G_{i-30} . Los trabajos previos sobre esta proteína indican que

la transducina posee una actividad GTPásica muy baja en ausencia de rodopsina. Esto es consecuencia de su baja capacidad, en comparación a otras proteínas G_q , de recambiar GDP por GTP en ausencia del receptor al cual se acopla (Fung, 1983; Philips y Cerione, 1988; Fawzi y cols., 1991). La actividad GTPásica de G_{i0} aislada es aún mas baja que la de la proteína trimérica (Fung, 1983). Nosotros no pudimos detectar una actividad GTPásica significativa de esta proteína bajo nuestras condiciones de ensayo. Por este motivo utilizamos la proteína trimérica. Polilisina tampoco estimula significativamente la hidrólisis de GTP de la proteína H-ras. Estos resultados indican que la capacidad de la polilisina de estimular la actividad GTPásica no es uniforme para todas las proteínas que poseen esta función.

3. Efecto de polilisina sobre el recambio de nucleótidos de guanina de las proteínas G.

La estimulación de polilisina y espermina de la actividad adenililciclasa es mas evidente a concentraciones sublimitantes de GTP- γ -S. Esto se debe a que ambos compuestos producen una disminución de la concentración de GTP- γ -S necesaria para obtener la mitad del efecto máximo ($K_{0,5}$). Sin embargo, la magnitud de esta disminución es mayor con polilisina que con espermina. Este resultado, podría ser el reflejo de un aumento de la afinidad de G_s por el GTP- γ -S, como consecuencia del efecto de ambos compuestos policatiónicos. Ni polilisina, ni espermina producen efectos significativos sobre la actividad de la adenililciclasa medida a concentraciones saturantes de GTP- γ -S.

La estimulación por polilisina sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} , es debido a un efecto sobre la K_m para GTP de la reacción de hidrólisis del nucleótido. Polilisina disminuye este valor en aproximadamente tres veces con respecto al experimento control. Este efecto es similar al producido por polilisina en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*, sobre la afinidad

por GTP- γ -S en la activación de la adenililciclase mediada por Gs (comparar figura 3 con 15). El valor de K_{m} para GTP determinado por nosotros para la proteína $G_{i-3\alpha}$ difiere en un orden de magnitud a los valores publicados en la literatura (300 nM) para preparaciones purificadas de varias proteínas G (Gilman, 1987). La diferencia entre nuestros valores y los obtenidos con preparaciones purificadas, puede deberse al hecho de que la proteína utilizada por nosotros fue producida en el sistema de baculo virus, que a pesar de ser un sistema eucariónte, no introduzca todas las modificaciones post traduccionales que la proteína requiere para obtener una funcionalidad semejante a las de las proteínas nativas.

El efecto de polilisina detallado anteriormente es similar al que produce el complejo hormona receptor sobre las proteínas G. Éste modifica las afinidades aparentes de las proteínas G por GDP y GTP. De esta manera, la subunidad G_{α} intercambia el GDP unido por GTP (Gilman, 1987; Birnbaumer y cols., 1990). Los estudios realizados con varios péptidos de naturaleza policatiónica derivados fundamentalmente de secuencias de receptores que interaccionan con las proteínas G_{α} o de otras fuentes indican que éstos inducen una estimulación de la unión de $^{35}\text{[S]-GTP-}\gamma\text{-S}$ y una estimulación de la actividad GTPásica sobre las proteínas G (Okamoto y cols., 1990; Okamoto y cols., 1991; Mousli y cols., 1990a; Mousli y cols., 1990b; Cheung y cols., 1991; Nishimoto y cols., 1993). Esta estimulación de la unión del nucleótido puede ser consecuencia de un aumento en la velocidad de disociación de GDP, de un aumento en la velocidad de asociación de GTP o de ambos a la vez. Uno de estos péptidos, el mastoparín, un tetradecapéptido rico en aminoácidos básicos que imita al receptor en su acción sobre las proteínas G, produce un aumento en la velocidad de disociación de GDP y una estimulación en la velocidad de hidrólisis de GTP. Estos autores también demostraron que mastoparín no parece tener ningún efecto directo sobre la constante catalítica de

hidrólisis de GTP (k_{cat}), por lo que el efecto de mastoparén se debe probablemente a un efecto directo del péptido sobre el recambio de GDP por GTP. Precisamente una de las características observadas en la acción de receptores sobre proteínas G, es que el efecto que ellos producen sobre la actividad GTPásica de dichas proteínas, no se debe a un efecto directo sobre la actividad enzimática propiamente tal, si no que es una consecuencia del recambio de GDP por GTP (Gilman, 1987). El efecto que polilisina produce sobre la afinidad de G_s por GTP- γ -S en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*, puede ser explicado por una acción del polication similar a la que producen mastoparén y otros compuestos básicos sobre las proteínas G. Nosotros postulamos que polilisina produce una estimulación del recambio de GDP por GTP- γ -S. Esto daría cuenta de la estimulación que produce polilisina sobre la actividad adenililciclase cuando es medida en presencia de GTP- γ -S y explicaría también el efecto del polication sobre la afinidad aparente por el análogo no hidrolizable de GTP.

Aunque nosotros no estudiamos el efecto de polilisina sobre la unión de GTP por G_{i-30} o transducina, es probable que la estimulación producida por este compuesto sobre la actividad GTPásica de estas dos proteínas, sea también consecuencia de un efecto sobre el recambio de GDP por GTP. El efecto de polilisina sobre la K_m para GTP en la reacción de hidrólisis del nucleótido catalizada por G_{i-30} , puede también ser el reflejo de un aumento en la afinidad de la proteína G_0 sobre el sustrato. Un resultado experimental que apoya esta hipótesis, es que el efecto activador de polilisina sobre G_s en membranas de oocitos de *Xenopus laevis* se observa en presencia de GTP- γ -S, un análogo no hidrolizable de GTP. Por lo que en este caso, el efecto de polilisina no puede deberse a un efecto sobre la actividad GTPásica de G_s .

Los resultados obtenidos con fluoruro en relación al efecto de polilisina sobre la actividad adenililciclase en membranas de oocitos

de *Xenopus laevis* son interesantes. Fluoruro y también el complejo fluoruro aluminio activan a las proteínas G por un mecanismo similar. Ambos forman un complejo con el fosfato β del GDP que imita al GTP. La formación de este complejo requiere que la proteína G_0 tenga previamente GDP unido (Antonny y cols., 1993). La estimulación que produce polilisina sobre la actividad adenililciclase en presencia de fluoruro puede indicar que este compuesto promueve una conformación de G_0 activa que de alguna manera facilita la estimulación por el GDP complejado con fluoruro y Mg^{2+} en el sitio de unión del nucleótido. Esto coincide con los resultados previos que indican que el complejo hormona receptor induce la formación de un estado en el que G_0 presenta una alta afinidad por GTP (Birnbaumer y cols., 1990).

4. Efecto de polilisina sobre la activación de las proteínas G por Mg^{2+} .

Polilisina también modifica los requerimientos de Mg^{2+} relacionados con la activación de las proteínas G. Los estudios del efecto de polilisina sobre la dependencia de la concentración de Mg^{2+} libre en la activación de la adenililciclase por GTP- γ -S, son complejos. La curva de actividad de la adenililciclase en función de la concentración de Mg^{2+} en ausencia de polilisina, muestra una pequeña estimulación de esta actividad cuando la concentración del metal libre alcanza los 5-10 nM. Concentraciones milimolar de Mg^{2+} producen una estimulación muy significativa de la actividad adenililciclase. Polilisina estimula la actividad de la adenililciclase a concentraciones nanomolar de Mg^{2+} y mantiene esta estimulación por todo el intervalo de Mg^{2+} ensayado. Es muy probable que los resultados de este experimento reflejen el efecto de Mg^{2+} sobre la activación de G_s . Los resultados que apoyan esta conclusión se basan en los experimentos de otros grupos que han estudiado la dependencia de Mg^{2+} sobre la actividad GTPásica de G_0 (Higashijima y cols., 1990) o sobre la unión de $^{35}[S]$ -GTP- γ -S a G_{i-2} (Okamoto y cols., 1990). En todos estos casos las curvas de la

dependencia de Mg^{2+} son muy similares a las obtenidas por nosotros. Ellas muestran dos inflexiones, una a bajas concentraciones de Mg^{2+} (10-100 nM) y la otra a concentraciones del metal sobre el milimolar. Es probable que estas dos inflexiones sean el reflejo de dos sitios para Mg^{2+} en G_q (Gilman, 1987; Higashijima y cols., 1990). Aunque polilisina no parece modificar los requerimientos de Mg^{2+} por el sitio de alta afinidad, produce una significativa estimulación en la activación de la adenilciclase por GTP- γ -S en el espectro nanomolar-milimolar de Mg^{2+} . El policatión tampoco parece producir cambios sustanciales sobre los requerimientos de Mg^{2+} por el sitio de baja afinidad.

El efecto que tiene polilisina a bajas concentraciones de Mg^{2+} sobre la activación de la adenilciclase de oocitos por GTP- γ -S, es similar al efecto causado por el policatión sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} y transducina a bajas concentraciones de Mg^{2+} (comparar figuras 9 y 16). El estudio de la dependencia de Mg^{2+} sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} indica que concentraciones en el orden del micromolar del metal son suficientes para obtener el efecto estimulador de polilisina. En el caso de la transducina, el efecto estimulador de la polilisina se observa a partir de los 10 μ M de Mg^{2+} . En ambos casos, concentraciones de Mg^{2+} sobre el mM son inhibitoras de la actividad GTPásica de ambas proteínas.

Los resultados obtenidos con polilisina son parecidos a los obtenidos por Higashijima y cols. (1990) con mastoparén. Este péptido extraído del veneno de la avispa es capaz de activar G_0 y G_{00} purificado. La curva de activación por Mg^{2+} de G_0 , muestra dos inflexiones: una a bajas concentraciones de Mg^{2+} y otra inflexión sobre el milimolar de Mg^{2+} . Mastoparén produce una estimulación muy significativa de la actividad GTPásica de G_0 también en el orden 100 nM-1 μ M de Mg^{2+} . Esta estimulación se mantiene hasta altas concentraciones de Mg^{2+} (mM). La forma de estas curvas recuerdan a las obtenidas por nosotros en los estudios de la

dependencia de Mg^{2+} sobre la activación de la adenililciclase en relación al efecto de polilisina. Mastoparán, al igual que polilisina no parece modificar sustancialmente los requerimientos de Mg^{2+} por los sitios de alta y de baja afinidad.

Con G_{00} purificado, la curva de la dependencia de Mg^{2+} sobre la actividad GTPásica muestra una inflexión en el orden 10 nM- 1 μ M de Mg^{2+} . En este caso y a diferencia de lo que ocurre con la proteína trimérica, no se observa la segunda inflexión en el intervalo mM de Mg^{2+} . Mastoparán estimula la activación por Mg^{2+} de la actividad GTPásica en el intervalo nanomolar-micromolar de Mg^{2+} . Concentraciones mas altas de mastoparán son inhibitoras de esta actividad. Otros estudios indican que mastoparán estimula la velocidad de disociación de GDP de G_0 del orden de 10 veces. Sin embargo, esta estimulación es independiente de la concentración de Mg^{2+} entre 1nM y 1 mM. La velocidad de disociación de GDP de la proteína trimérica en ausencia de mastoparán sólo se incrementa a concentraciones de Mg^{2+} por arriba del milimolar. El efecto de mastoparán sobre la dependencia de Mg^{2+} de la velocidad de disociación de GDP de G_{00} aislada es similar al de la proteína trimérica. Estos resultados indican que mastoparán (o el receptor) promueve la disociación de GDP de una manera independiente de Mg^{2+} .

Un péptido catiónico derivado de una región intracelular del receptor de manosa-6 fosfato produce un efecto parecido a los anteriormente mencionados sobre la dependencia de Mg^{2+} en la unión de $^{35}[S]$ -GTP- γ -S por G_{i-2} . (Okamoto y cols., 1990). En ausencia del péptido la curva de la dependencia de Mg^{2+} muestra dos inflexiones, una a concentraciones de Mg^{2+} que oscilan entre 10 y 100 nM y una segunda inflexión por sobre el milimolar de Mg^{2+} . El péptido en cuestión produce una estimulación de la unión de GTP- γ -S en el orden de los 10-100 nM del metal. Al igual que en los estudios realizados con polilisina y mastoparán, el péptido no modifica

los requerimientos de Mg^{2+} en el sitio de alta afinidad. Si consideramos en su conjunto los resultados anteriormente mencionados podríamos especular que la estimulación producida por polilisina a bajas concentraciones de Mg^{2+} sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} y transducina o sobre la activación de la adenililciclase por G_s , puede ser consecuencia de un efecto directo del polication sobre la velocidad de recambio de nucleótidos. En este sentido es significativo que mastoparán tenga un efecto similar al de altas concentraciones de Mg^{2+} sobre la estimulación de la velocidad de disociación de GDP de G_q . Es muy posible que mastoparán sustituya al Mg^{2+} como cofactor en esta reacción. Aunque nosotros no ensayamos el efecto de polilisina sobre la unión de GTP, Brandt y Ross (1986), demostraron que el receptor β -adrenergico estimula la velocidad de asociación de GTP de una manera independiente de la disociación de GTP. En este sentido será importante estudiar si polilisina, mastoparán u otros péptidos policationicos, son capaces de reemplazar a Mg^{2+} en la reacción de asociación de GTP. Esto contribuirá a dar mayores luces sobre el complejo efecto que tiene el receptor en la activación de las proteínas G. El efecto inhibitor que produce polilisina sobre la actividad GTPásica de G_{i-30} y transducina a alto Mg^{2+} es difícil de explicar.

5. Efecto de polilisina sobre los parámetros cinéticos de activación de la adenililciclase por G_s .

Se ha descrito en la literatura que el complejo hormona receptor modifica los parámetros cinéticos relacionados con la activación de la adenililciclase (Iyengar y Birnbaumer, 1982). Por un lado disminuye la longitud del período de retardo y además produce un aumento de la actividad de la enzima medida en el estado estacionario. Nosotros quisimos probar si polilisina produce estos efectos sobre la actividad de la adenililciclase, cuando la enzima es estimulada con GTP- γ -S a través de G_s . Los resultados obtenidos por nosotros indican que polilisina produce un

aumento significativo de la actividad de la enzima medida en el estado estacionario. Sin embargo, al contrario de lo esperado, el polilisina produce una disminución del período de retardo en la cinética de activación de la enzima. Este último resultado no significa necesariamente que nuestra hipótesis no sea válida. Dada la complejidad del sistema utilizado, es posible que los resultados obtenidos reflejen algún efecto de la polilisina que no se relaciona con la activación de la adenililciclase por G_s . Nosotros creemos que el efecto de la polilisina sobre el período de latencia puede estar relacionado con la inhibición que este compuesto produce a esa misma concentración sobre la actividad de la adenililciclase.

6. Efecto de polilisina en relación con la inhibición de la adenililciclase por progesterona.

Es importante destacar que no se ha descrito hasta ahora la existencia de alguna hormona activadora de la adenililciclase en oocitos de *Xenopus laevis*. Por este motivo es de mucho interés la caracterización del efecto de polilisina. Progesterona revierte la estimulación de polilisina sobre la adenililciclase cuando esta es activada a través de G_s . Este efecto de la progesterona se observa a altas concentraciones de Mg^{2+} . La inhibición de progesterona sobre la adenililciclase se observa en todo el intervalo de Mg^{2+} ensayado, en la presencia y ausencia de polilisina. Se ha descrito que progesterona reduce la afinidad aparente de G_s por GppNHp y aumenta el período de latencia en la cinética de activación de la adenililciclase por GppNHp (Jordana y cols., 1984). Nuestros resultados indican que progesterona no afecta los requerimientos de Mg^{2+} en los sitios de alta y baja afinidad. Es difícil analizar estos resultados pero son una nueva evidencia que apunta a la relación del efecto inhibitorio de progesterona con la activación de G_s .

7. Aspectos estructurales del efecto de compuestos policatiónicos sobre las proteínas G.

Los resultados obtenidos por nuestro grupo y por otros indican que las proteínas G son activadas por moléculas que concentran cargas positivas dentro de su estructura. El hecho de que no todo los compuestos policatiónicos produzcan una estimulación sobre la actividad de la adenililciclase, puede indicar que la acción de estos compuestos sobre G_s no es sólo un mero efecto de carga. Esta afirmación también es válida para los estudios realizados con proteínas purificadas. Polilisina, poliornitina y en menor extensión poliarginina estimulan la actividad GTPásica de $G_{i-3\alpha}$. Del mismo modo polilisina, poliornitina, espermina pero no poliarginina pueden estimular la actividad adenililciclase por G_s en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*. Es interesante que espermina, que estimula la actividad de G_s de una manera análoga a polilisina en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*, no produce efecto sobre $G_{i-3\alpha}$. Por otro lado, poliarginina que no produce efecto activador sobre G_s en membranas de oocitos, si es capaz de estimular la actividad GTPásica de $G_{i-3\alpha}$. En la literatura también se encuentran casos semejantes. Se ha descrito que un péptido básico derivado del receptor β_2 -adrenérgico produce un fuerte estimulación de la unión de $^{35}\text{[S]-GTP-}\gamma\text{-S}$ a G_s purificada. Este mismo péptido estimula la unión del nucleótido a G_{i-1} purificada, pero en una extensión menor a la de G_s (Okamoto y cols., 1991). Estas observaciones también apuntan a reafirmar que la acción de estos compuestos sobre las proteínas G no involucra sólo al factor carga.

Con respecto a los efectos de compuestos policatiónicos en membranas, se ha descrito que compuestos como la polilisina, protamina, histonas y espermina, pueden producir severas alteraciones en la membrana plasmática de las células que se traducen en cambios en su permeabilidad (Quinton y Philpott, 1973) y en la movilidad lateral de las proteínas

(Schindler y cols., 1980). Es muy probable que polilisina y otros compuestos policatiónicos se unan a la membrana plasmática, causando alteraciones en la microestructura de ésta. Esta unión puede deberse a interacciones de naturaleza electrostática entre las cargas positivas de los compuestos policatiónicos y los sitios aniónicos de la membrana (Weiss, 1970). Es también probable que la inhibición de la actividad adenililciclase, que se observa con todos los compuestos policatiónicos ensayados a altas concentraciones, sea consecuencia de el efecto generalizado que produce polilisina sobre la membrana. En este sentido estaríamos en presencia de un efecto de tipo "inespecífico". Sin embargo es necesario tener cuidado al hablar de especificidad o inespecificidad en lo referente al efecto de los compuestos policatiónicos. Si bien es cierto, estos compuestos modifican la actividad de varias enzimas, entre ellas algunas de membrana, su efecto no es similar en todos los casos observados. Estudios realizados en nuestro laboratorio indican que poli-l-lisina, poli-d-lisina, copolímeros de lisina:serina y lisina:alanina y poli-l-ornitina, producen un gran incremento en la fosforilación de algunas proteínas en la membrana del oocito de *Xenopus laevis*. Sin embargo, poli-l-arginina no produce efecto. Poli-l-lisina, poli-l-ornitina, espermina y espermidina también estimulan la fosforilación in vitro de los fosfatidilinositoles de membranas de oocitos. Poli-l-arginina fracasa en producir el efecto estimulador. Todos estos compuestos son inhibidores de la actividad quinasa a altas concentraciones (Gatica y cols., 1987; Carrasco y cols., 1988). Concentraciones de poli-l-lisina entre 0,2 y 1 μM estimulan la actividad tirosina quinasa del receptor de insulina. Esta estimulación sobre la actividad quinasa de este receptor es específica, pues polilisina no ejerce ningún efecto sobre la actividad tirosina quinasa del receptor de IGF-1 (Morrison y cols., 1989). Wolf y Cook (1975), estudiaron el efecto de varios compuestos policatiónicos sobre la actividad de la adenililciclase en membranas de tiroide de bovino. Ellos encontraron

que poli-l-lisina estimula a bajas concentraciones e inhibe a altas, la actividad de la adenililcilasa cuando ésta es estimulada por ligandos que actúan a través de G_s , como la hormona tirotrófina (TSH) y el GppNHp. Además la longitud del polímero es determinante en cuanto a la concentración de polilisina requerida para obtener el máximo de estimulación, pues a mayor longitud, se requiere menor concentración para alcanzar el máximo de estimulación sobre la actividad de la enzima. Estos resultados indican que se requieren por lo menos cuatro lisinas en la cadena para ver algún efecto estimulador significativo sobre la actividad de la adenililcilasa. Poli-l-ornitina, espermina y espermidina producen un efecto muy similar al de polilisina sobre la actividad de la adenililcilasa. Es interesante el hecho de que algunas proteínas básicas como la ribonucleasa A y el citocromo C, causan un efecto análogo al de la polilisina sobre la actividad de esta enzima. Otra proteína también básica, lisozima produce un efecto inhibitorio a altas concentraciones, pero no el efecto estimulador de la actividad adenililcilasa. Wolff y Cook (1975), propusieron que los efectos detallados anteriormente se debían en una proporción importante, a un efecto de carga, pues un aumento en la fuerza iónica del medio podía revertir el efecto causado por estos compuestos. Sin embargo los resultados encontrados por nosotros con el péptido poliarginina indican que la carga no es el único componente involucrado en estas interacciones. El hecho de que lisina libre no produzca efecto y que se requiera un mínimo de cuatro lisinas en la cadena para ver algún efecto también apunta a esta idea.

Debido al efecto generalizado ya discutido que presenta polilisina sobre las membranas biológicas y sobre la actividad de varias enzimas presentes en ella y debido también al hecho de estar trabajando con un sistema complejo con varios componentes presentes en la membrana, es necesario ser cuidadoso con la interpretación de los resultados. Pero sin

embargo, es posible postular que la estimulación producida por polilisina y otros compuestos de naturaleza catiónica en la actividad de la adenililciclase, puede ser el resultado de una interacción directa entre estos compuestos y G_s de membrana. Los resultados obtenidos con G_{i-30} y transducina purificadas apoyan la idea de este tipo de interacción.

En relación con el problema de la interacción de compuestos básicos con las proteínas G, se ha propuesto que mastoparín y algunos péptidos derivados de secuencias citoplasmáticas de receptores acoplados a proteínas G, forman estructuras de α -hélices anfipáticas (Strader y cols., 1989). Esta característica junto a la de su composición básica, sería fundamental para producir su efecto (Strader y cols., 1989; Higashijima y cols., 1990). Sin embargo, algunos resultados recientes se contraponen con esta idea. El análisis estructural de varios péptidos básicos derivados del tercer dominio citoplasmático de los receptores dopaminérgicos subtipos 1 y 2 y del $\beta 1$ -adrenérgico, indican que uno de estos péptidos que es capaz de estimular la unión de $^{35}\text{[S]-GTP-}\gamma\text{-S}$ sobre una mezcla de G_0 y G_i purificadas no tiene estructura de α -hélice. A la inversa, otro péptido que sí muestra este tipo de estructura, no tiene ningún efecto sobre la mezcla de proteínas G (Voss y cols., 1993). Nosotros no hemos realizado estudios de tipo estructural para determinar la conformación que adoptan polilisina y otros polipeptidos en solución en nuestras condiciones experimentales. El dilucidar la estructura que adoptan polímeros como la polilisina y la poliornitina, puede contribuir significativamente en el futuro a nuestra comprensión sobre el problema de la relación carga estructura que adoptan los dominios de los receptores que interactúan físicamente con las proteínas G.

B. ESTUDIOS DE FUNCIONALIDAD DE PROTEÍNAS G_s DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

1. Análisis funcional de las proteínas G_{sq} de oocitos producidas en bacterias.

Uno de los objetivos fundamentales de nuestro trabajo de investigación fue el expresar las dos proteínas G_{sq} clonadas de una genoteca de oocitos de *Xenopus laevis* (Olate y cols., 1990), con la finalidad de posteriormente estudiar la funcionalidad de estas proteínas. Uno de los criterios de funcionalidad de este tipo de proteínas es su capacidad de reconstituir la adenilciclase de un sistema de mamíferos deficiente en la actividad G_s endógena, las membranas de las células cyc-. Los resultados obtenidos indican que los extractos procedentes de bacterias que expresan las dos proteínas de *Xenopus laevis* no reconstituyen la actividad adenilciclase de membranas cyc-. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes debido a que aunque las proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis* son producidas por las bacterias, estas no parecen encontrarse en una forma soluble. Esta conclusión es apoyada por la falta de detección de la proteína de G_{sq} de *Xenopus laevis* en la fracción sobrenadante de una centrifugación a 100.000g del extracto total de bacterias, por un anticuerpo que reconoce una región común a todas las proteínas G_q . Comparativamente, los extractos de esta fracción sobrenadante, que expresan tanto la forma corta como la larga de la proteína G_{sq} de hígado humano (aunque levemente detectados por el anticuerpo), son capaces de reconstituir la actividad adenilciclase del sistema cyc- de mamíferos. Es muy posible que esta falta de reconstitución por las proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis*, se deba a que las bacterias forman agregados insolubles de estas proteínas que las hacen inactivas. A este respecto existen muchos casos descritos en la literatura a cerca de proteínas exógenas producidas en bacterias, que por no poseer las modificaciones post transcricionales propias de su sistema original son

parcial o totalmente inactivas. En otros casos la bacteria tiende a formar conglomerados insolubles de la proteína extraña en forma de cuerpos conocidos como gránulos de inclusión (Marston, 1986). La formación de estos precipitados depende de factores tales como la composición de aminoácidos de la proteína, las condiciones de inducción usadas para su síntesis y las condiciones de ruptura empleadas sobre la bacteria para recuperar el polipéptido producido (González y cols., 1993). Para obtener una forma activa de la proteína, es necesario recurrir en estos casos a métodos tales como el tratamiento con detergentes con el fin de solubilizar estos agregados. Posteriormente es necesario por algún método, quitar el detergente con el fin de obtener alguna forma activa de la proteína (Marston, 1986).

Los resultados obtenidos por nosotros indican que cualitativamente, las proteínas G_{so} de *Xenopus laevis* y las dos formas de la proteína de humano tienen menor tendencia que otras proteínas G_q , como G_{00} y G_{i-10} a la solubilidad (comparar carriles 4 y 5 con 1,2 y 3 en la figura 22). Es probable que la menor solubilidad de G_{so} sea una propiedad inherente a su composición aminoacídica, que la haga una proteína con mayor tendencia que otras a agregarse.

Los resultados anteriormente mencionados, no nos permiten descartar que las proteínas G_{so} de *Xenopus laevis* no sean capaces de reconstituir la actividad adenililciclasa. Es por este motivo que decidimos reemplazar el sistema de bacteria por el de lisado de reticulocitos.

2. Análisis funcional de las proteínas G_{so} de oocitos producidas en lisado de reticulocitos.

El sistema de lisado de reticulocitos ha sido utilizado con éxito en la expresión de varias proteínas entre ellas varias G_q (Olate y cols., 1988; Journot y cols., 1991). El laboratorio del Dr. Lutz Birnbaumer optimizó la producción de proteínas en lisado de reticulocitos mediante la fabricación

de un vector de expresión (pAGA). Mediante este sistema se puede sintetizar un mRNA con una zona de unión al ribosoma de eucariontes. Esto permite aumentar significativamente la cantidad de proteína sintetizada y la fidelidad del sistema (disminuyendo casi totalmente la iniciación de la traducción en metioninas internas de la secuencia de la proteína), con respecto a los sistemas tradicionales que no poseen esta secuencia específica (Sandford y cols., 1991).

Los resultados obtenidos nos indican que el sistema de reticulocito expresa eficientemente las dos proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis*. Sin embargo, estas proteínas no son capaces de reconstituir la adeniliclasa de un sistema de mamíferos, a diferencia de la proteína G_{sq} humana producida también en este sistema, que si lo hace. La actividad de G_{sq} fue medida en presencia de varios efectores que son activadores de esta proteína: GTP- γ -S, fluoruro y GTP + isoproterenol. GTP- γ -S y fluoruro activan específicamente a la adeniliclasa a través de G_s . Isoproterenol activa a G_s a través del receptor β -adrenérgico que se encuentra presente en las membranas del sistema cyc- (Birnbaumer y cols., 1990). Este resultado negativo obtenido con las proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis*, es sorprendente si consideramos que ellas presentan una identidad de un 90% a nivel de aminoácidos con G_{sq} de humano, de rata y de bovino (esquema 20A) (Olate y cols., 1990), todas las cuales reconstituyen la adeniliclasa de cyc- (Birnbaumer y cols., 1990). Las únicas excepciones conocidas son la proteína G_{sq} clonada de *Drosophila melanogaster* (Quan y cols., 1989; Quan y Forte, 1990) y la proteína G_{olf} clonada de epitelio olfativo de rata y que se acopla a adeniliclasa en este tejido (Jones y Reed, 1989). Estas proteínas reconstituyen muy pobremente la actividad adeniliclasa de células cyc- en presencia de GTP- γ -S, AlF_4^- o isoproterenol, cuando son expresadas mediante transfección en cultivos de estas células (5-10% de la actividad obtenida con G_{sq} de rata) (Jones y cols., 1990; Quan y cols., 1991).

Estas proteínas presentan respectivamente un 73% y un 85% de identidad a nivel de aminoácidos con G_{sq} de humano.

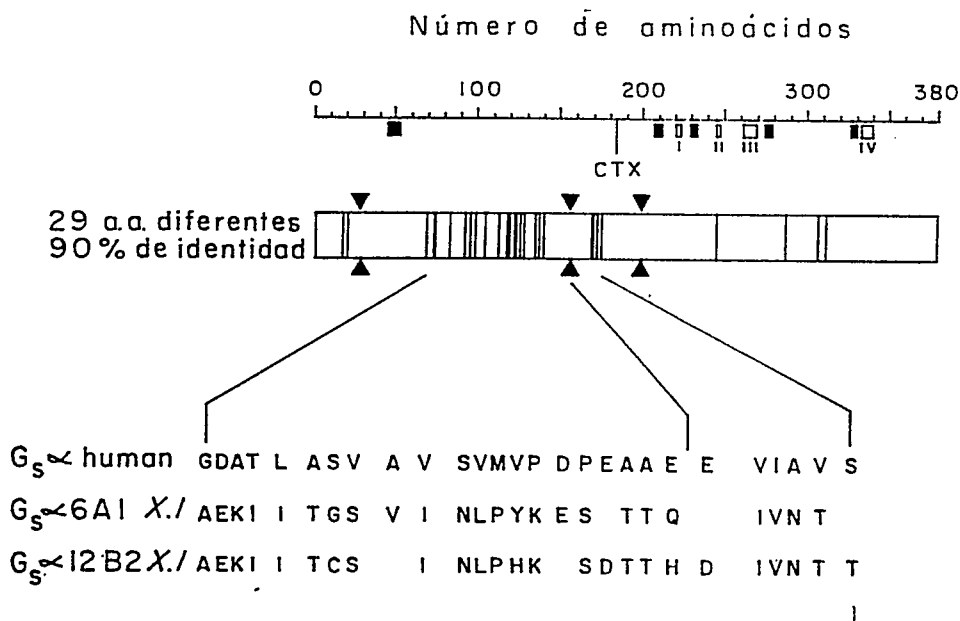
La explicación más obvia de nuestros resultados es que las modificaciones a nivel de secuencia primaria que presentan estas dos proteínas, con respecto a la secuencia de aminoácidos de G_{sq} de humano son la razón de su inactividad. Aunque las tres proteínas poseen 379 aminoácidos en total, la proteína G_{sq} 6A1 de *Xenopus laevis* presenta 29 cambios a nivel de aminoácidos con respecto a la proteína G_{sq} de humano. La otra proteína de *Xenopus laevis*, G_{sq} 12B2 presenta 30 cambios a nivel de aminoácidos con respecto a la proteína de humano. Una cosa notable es que la mayor parte de las diferencias de aminoácidos entre las dos proteínas de *Xenopus laevis* y la de humano, se concentran hacia la región amino terminal de estas proteínas (esquema 20B). Nosotros concluimos que las proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis* podían ser consideradas como mutantes naturales que nos posibilitaría el estudiar regiones de G_{sq} que son importantes en la regulación funcional de la proteína. Por este motivo que decidimos construir quimeras entre fragmentos de las proteínas de *Xenopus laevis* y la de humano, con la finalidad de ubicar la zona responsable en las proteínas de oocitos de su falta de acoplamiento funcional con la adenililciclase de las membranas cyc- y al mismo tiempo identificar regiones en la proteína G_{sq} de humano que cumplen una función en dicho acoplamiento.

3. Resultados obtenidos con las proteínas quiméricas.

Los resultados obtenidos con las proteínas quiméricas, indican que la zona responsable de la falta de acoplamiento entre la proteína G_{sq} 6A1 de oocitos y la adenililciclase, se encuentra dentro de una región de 126 aminoácidos ubicada hacia el amino terminal de esta proteína (aminoácidos 31 al 157, esquema 20A). En esta región se concentran la mayor cantidad de diferencias a nivel de aminoácidos entre la proteína G_{sq} 6A1 de oocitos y

<i>Gsa humano</i>	MGCLGNSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGAGE	50
<i>Gsa12B2X.1</i>	50
<i>Gsa6A1X.1</i>V...T.....	50
<i>Gsa humano</i>	SGKSTIVKQMRILHVNGFNGDEKATKVQDIKNNLKEALETIVAAMSNLVP	100
<i>Gsa12B2X.1</i>AE..KI.....I.....T..C..S.	100
<i>Gsa6A1X.1</i>AE..KI.....I.....T..G..S.	100
<i>Gsa humano</i>	PVELANPENQFRVDYILSVMNVPDFPFPEFYEHAKALWEDEGVRACYER	150
<i>Gsa12B2X.1</i>I...NLP.HK...S...D.T.T..H.D.....	150
<i>Gsa6A1X.1</i>	...V.....I...NLP.YK..E.S.....T.T..Q.....	150
<i>Gsa humano</i>	SNEYQLIDCAQYFLDKIDVIKQADYVPSDQDLLRCRVLTSGIFETKQVD	200
<i>Gsa12B2X.1</i>IV..N..T.T.....	200
<i>Gsa6A1X.1</i>IV..N..T.....	200
<i>Gsa humano</i>	KVNFHMFVCGQRDERRKWIQCFNDVTAIIFVVASSSYNMVIREDNQYTR	250
<i>Gsa12B2X.1</i>H...	250
<i>Gsa6A1X.1</i>H...	250
<i>Gsa humano</i>	LQEALNLFKSIWNNRWLRTISVILFLNKQDLAELVLAGKSKIEDYFPEF	300
<i>Gsa12B2X.1</i>D.....	300
<i>Gsa6A1X.1</i>N.....	300
<i>Gsa humano</i>	ARYTTPEDATPEPGEDPRVTRAKYFIRDEFRLRISTASGDCRHYCYPHFTC	350
<i>Gsa12B2X.1</i>D.....FN.....	349
<i>Gsa6A1X.1</i>D.....VG.....	349
<i>Gsa humano</i>	AVDTENIRRVFNDCRDIQRMLRQYELL	379
<i>Gsa12B2X.1</i>	379
<i>Gsa6A1X.1</i>	379

Esquema 20 A: Comparación de secuencias de aminoácidos de G_{50} de humano y de *Xenopus laevis* (ver leyenda en la página subsiguiente).



Esquema 20 B: Comparación de secuencias de aminoácidos de G_{5d} de humano y de *Xenopus laevis* (ver leyenda en la página siguiente).

Esquema 20: Comparación de secuencias de aminoácidos de G_{s0} de humano y de *Xenopus laevis*.

En A) se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas G_{s0} de humano con G_{s0}^{6A1} y G_{s0}^{12B2} de *Xenopus laevis*. En B) se muestra un diagrama que representa la estructura primaria de G_{s0} . Las barras verticales indican las diferencias de aminoácidos entre las proteínas G_{s0} de humano y G_{s0}^{6A1} de *Xenopus*. Las regiones marcadas con I, II, III y IV (□) representan regiones de interacción con la adenililciclasa (Berlot y Bourne, 1992). ■ indica las regiones de interacción con el GTP. CT indica el sitio de ADP ribosilación por la toxina del colera (arg¹⁸⁴ de la especie corta sin serina). ▼ indica los límites de los fragmentos usados para construir las quimeras Ch9, Ch10, Ch11 y Ch12. En el detalle del esquema se muestran los aminoácidos que se encuentran cambiados entre la proteína de humano y las dos formas de *Xenopus laevis*.

la de hígado humano (20 de los 30 aminoácidos diferentes). Los resultados obtenidos con las quimeras construidas entre la proteína G_{sq} 12B2 de *Xenopus laevis* y la proteína de humano también indican que la zona responsable de la falta de acoplamiento con la adenililciclase se encuentra en la región amino terminal de esta proteína. Debido a la gran homología observada a nivel de aminoácidos entre las dos proteínas de *Xenopus laevis* (96%), y a que la mayor parte de las diferencias entre G_{sq} 12B2 y de humano también se concentran en el extremo amino terminal (20 de 30 aminoácidos), es muy posible que el efecto observado con las dos proteínas de oocitos se deba a aminoácidos que son comunes a ambas secuencias y que se encuentran sustituidos por otros aminoácidos en la proteína G_{sq} de humano. Estos aminoácidos se concentran en una región de 110 aminoácidos ubicada hacia el extremo amino terminal de G_{sq} .

4. Posible función de la región de 110 aminoácidos de G_{sq} .

Los resultados obtenidos con las quimeras indican que existe en la región amino terminal de G_{sq} una región que está involucrada en la regulación de la funcionalidad de esta proteína. Esta región está dentro de la secuencia de 110 aminoácidos donde se encuentran la mayor parte de las diferencias a nivel de aminoácidos entre las proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* y de humano. Esta región puede participar en:

- a) La directa interacción de G_{sq} con la adenililciclase.
- b) La regulación de una función que se relaciona con el mecanismo de activación de G_{sq} .

Como se mencionó en la sección *Introducción*, los estudios realizados por varios grupos indican que existen por lo menos tres regiones de interacción de G_{sq} con la adenililciclase, ubicados todos en el dominio denominado de la GTPasa (Itoh y Gilman, 1991; Berlot y Bourne, 1992; Conklin y Bourne, 1993). Estos estudios fueron realizados con la proteína G_{sq} de rata que es 100% homóloga a G_{sq} de humano. Los aminoácidos que

estos grupos determinaron como importantes para la interacción de G_{sq} con la adenililciclase, están todos presentes en las dos proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis*. La región de 110 aminoácidos que nosotros hemos intercambiado entre las proteínas de humano y de *Xenopus laevis*, se encuentran fuera de los dominios de interacción anteriormente mencionados. Esta región cae dentro del dominio que se encuentra presente en todas las proteínas G_q , pero que no está en ras (dominio de inserción i-1, Berlot y Bourne, 1992). Estudios previos de funcionalidad (Markby y cols., 1993; Conklin y Bourne, 1993) y también estructurales (Noel y cols., 1993), indican que este dominio se encuentra estructuralmente separado del resto de G_q . Esta parte de la molécula está involucrada en la unión de GTP y en los sitios de interacción con el efector (por ejemplo adenililciclase) (Noel y cols., 1993; Berlot y Bourne, 1992). Aunque en base a nuestros experimentos no se puede afirmar o descartar que la región de 110 aminoácidos sea una región de interacción física con la adenililciclase, nosotros favorecemos la idea de que esta región tiene importancia en la regulación de otra función distinta a la del reconocimiento del efector. Los resultados obtenidos con las quimeras G_{i-20}/G_{sq} apoyan esta proposición. Estas proteínas, que poseen la mitad amino terminal proveniente de G_{i-20} de ratón, estimulan la actividad de la adenililciclase mucho más eficientemente que la G_{sq} de humano. El hecho de que la quimera G_{i-20}/G_{sq} de *Xenopus laevis* reconstituye la actividad adenililciclase apoya también la noción de que la falta de activación de las proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* de la adenililciclase de membranas cyc-, se debe a una secuencia de aminoácidos ubicada en el amino terminal de G_{sq} . Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Osawa y cols. (1990), quienes en base a la construcción de quimeras entre las proteínas G_{i-20} y G_{sq} ambas derivadas de rata, postularon que en la región amino terminal de G_q existiría una región que regularía el intercambio de GDP por GTP. Aunque su evidencia no es

directa, esta hipótesis puede dar cuenta de los resultados obtenidos por nosotros con las proteínas quiméricas. Sin embargo, no se puede descartar que esta región regule alguna otra función relacionada con la activación de las proteínas G_q . En este sentido, los resultados de la digestión con tripsina de las proteínas quiméricas en las que se ha intercambiado el fragmento de 170 y 126 aminoácidos entre las proteínas de humano y de *Xenopus laevis*, indican que las proteínas G_{sq} de oocitos no se activan debido a que no sufren el cambio conformacional como consecuencia de la unión de GTP. Con respecto a este cambio conformacional que sufren las proteínas G_q , los resultados experimentales de varios grupos, indican que la región que está involucrada en él, se encuentra entre los aminoácidos 213 y 243 (esquema 21) de G_{sq} de humano. Dentro de esta región está la arginina 213 que se protege de la digestión por tripsina (Fung y Nash, 1983) y el triptofano 219 cuya fluorescencia es alterada como consecuencia de la unión de GTP (Higashijima, 1987a; Philips y Cerione, 1988). Por otra parte, Noel y cols. (1993) en base al estudio de difracción de rayos X de la transducina cristalizada con GTP- γ -S unido, han propuesto que como consecuencia de la unión del GTP, toda esta región sufriría una transición de una estructura flexible a una α -hélice ordenada. Contigua a esta región se encuentra en G_{sq} de humano una glicina (glicina 211), que al mutarse por una alanina, produce una proteína que es incapaz de sufrir el cambio conformacional que conduce a la subsecuente activación (Miller y cols., 1988; Lee y cols., 1992a). Esta glicina interacciona directamente con el fosfato γ del GTP (Noel y cols., 1993). La región anteriormente descrita se encuentra perfectamente conservada a nivel de secuencia de aminoácidos en G_{sq} de humano, bovino, rata y también en las dos proteínas de *Xenopus laevis* (esquema 21). Sin embargo, esto no necesariamente descarta la posibilidad de que la región de 110 aminoácidos, también pueda estar involucrada en la regulación del cambio conformacional de las proteínas G_q .

Los resultados obtenidos por Markby y cols. (1993), indican que una región que va desde los aminoácidos 71 a 201 (esquema 21) de G_{sq} de humano (que corresponde a la secuencia de inserción i-1) y que comprende a la región de 110 aminoácidos donde se encuentran concentrados los cambios de aminoácidos entre las proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis* y de humano, puede atribuirle la capacidad al resto de la proteína G_{sq} (dominio GTPasa) de acoplarse funcionalmente a la adenililciclase, cuando ambos fragmentos son expresados simultáneamente por transfección en células en cultivo (Markby y cols., 1993). Estos sorprendentes resultados indican que este fragmento tiene además la capacidad de estimular significativamente la unión de GTP- γ -S y la actividad hidrolítica de GTP del dominio GTPasa de G_{sq} . Los experimentos de Markby y cols. (1993), indican que este dominio no tendría la capacidad de interactuar por sí solo con la adenililciclase, por lo que no contendría secuencias de reconocimiento del efector. Estos resultados, junto con los nuestros son una nueva evidencia de que la región de 110 aminoácidos podría estar involucrada en alguna función relacionada con la activación funcional de G_q . Un posible candidato podría ser la función de regulación del recambio de GDP por GTP y/o el cambio conformacional que resulta de la unión de G_q con GTP.

Los resultados obtenidos con fluoruro merecen un comentario adicional. Como se mencionó en la *Introducción*, fluoruro en presencia de Mg^{2+} se une al GDP que está unido a las proteínas G_q y forma un complejo que imita la conformación del GTP- Mg^{2+} en el sitio de unión de G_q (Higashijima y cols., 1991; Antonny y cols., 1993). Si este mecanismo es correcto y la causa de la no funcionalidad de las proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis*, en el ensayo de reconstitución de la adenililciclase se debe exclusivamente a que estas proteínas tienen un recambio de GDP por GTP muy lento, nosotros podríamos esperar que en presencia de fluoruro y Mg^{2+} las proteínas G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* se

Esquema 21: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas G_q .

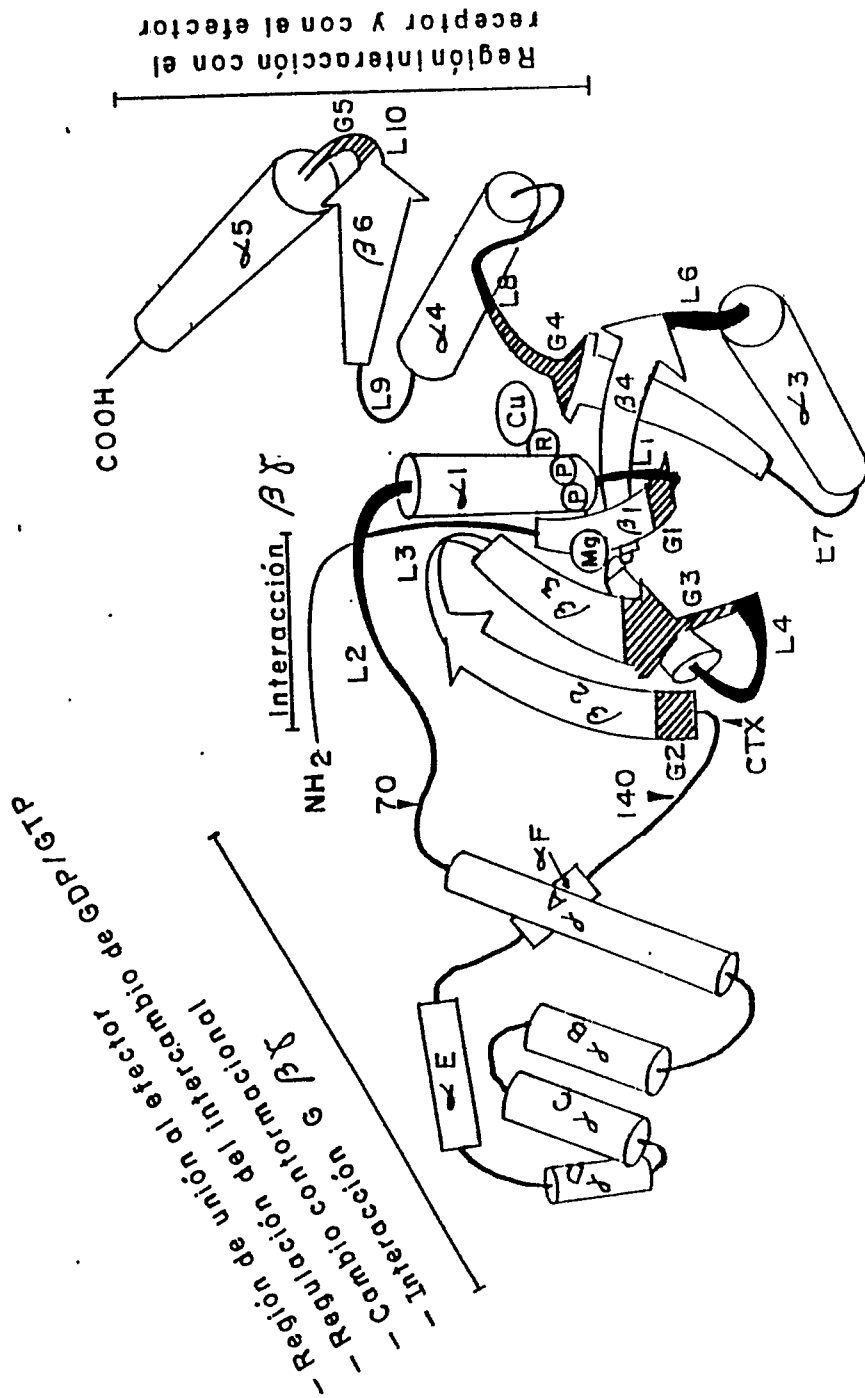
Las secuencias comparadas son: G_{sq} de humano (Mattera y cols., 1986), G_{sq} 6A1 y G_{sq} 12B2 de *Xenopus laevis* (Olate y cols., 1990), G_{sq} de drosófila (Quan y cols., 1989) y los primeros 195 aminoácidos de G_{i-2q} de ratón (Sullivan y cols., 1986). i-1, i-2, i-3 e i-4 indican las secuencias de inserción en relación a la proteína ras. Los aminoácidos realzados en negro en la secuencia de humano, indican la región de 110 aminoácidos intercambiada entre G_{sq} de humano y G_{sq} 6A1 de *Xenopus laevis*.

acoplaran funcionalmente a la adenililciclase, ya que en este caso dicho recambio no sería necesario. Sin embargo en este caso tampoco se observa reconstitución. Fluoruro no induce una conformación activa de $G_{s\alpha}$ de *Xenopus laevis*. Estos resultados apoyan la idea de que estas proteínas bajo las condiciones del ensayo, no pueden experimentar el cambio conformacional. Sin embargo no se puede descartar que el resultado obtenido con fluoruro fuese la consecuencia de algún evento desconocido en el mecanismo de activación de las proteínas G_q , que no tuviese que ver necesariamente con el cambio conformacional inducido por $GTP-Mg^{2+}$.

Con respecto a los grupos de aminoácidos de G_q que están involucrados en la interacción con el complejo $GTP-Mg^{2+}$, todos los estudios estructurales indican que éstos se encuentran en el dominio de la GTPasa, fuera de la región de 110 aminoácidos que nosotros hemos estudiado (esquema 22) (Noel y cols., 1993; Conklin y Bourne, 1993). Estas regiones, denominadas G1, G2, G3, G4 y G5 (Conklin y Bourne, 1993) se encuentran perfectamente conservadas en todas las proteínas G_q conocidas y también se encuentran en las dos proteínas $G_{s\alpha}$ de oocitos de *Xenopus laevis*.

Los resultados presentados en esta Tesis aportan el hecho que la región de 110 aminoácidos ubicada hacia el extremo amino terminal de $G_{s\alpha}$ estaría involucrada en la regulación de una o más etapas relacionadas con la activación de las proteínas G_q .

En el esquema 21 se muestra una comparación de secuencias a nivel de aminoácidos entre las proteínas $G_{s\alpha}$ de humano, *Xenopus laevis*, drosófila y el segmento de $G_{i-2\alpha}$ de ratón usado por nosotros en la construcción de las quimeras $G_{i-2\alpha}/G_{s\alpha}$. El segmento de $G_{i-2\alpha}$ muestra un 35% de identidad a nivel de aminoácidos con la proteína $G_{s\alpha}$ de humano y de *Xenopus laevis*. Las proteínas de humano y de *Xenopus laevis* tienen un 73 % de identidad a nivel de aminoácidos con $G_{s\alpha}$ de drosófila. El interés de nosotros en esta última proteína se debe a que como se discutió con anterioridad, esta



Esquema 22: Estructura tridimensional hipotética de G_q (ver leyenda en la página siguiente).

Esquema 22: Estructura tridimensional hipotética de G_q .

Esta estructura ha sido adaptada de Masters y cols. (1986), Berlot y Bourne (1992), Olate y Allende (1991) y Noel y cols. (1993). Las α hélices son indicadas por cilindros, las hojas β por flechas y las regiones no estructuradas por líneas negras. G1 a G5 son las regiones involucradas en la unión de GTP (áreas achuradas). La arg modificada por la toxina del colera es indicada por la flecha (CT). Gu: base de guanina, R: ribosa, P: fosfato.

proteína se parece a las de *Xenopus laevis* en que reconstituye mal la actividad de la adenililciclase de cyc- (Quan y cols., 1991). No es fácil deducir directamente del análisis de la comparación de estas secuencias el o los aminoácidos que pudieran dar cuenta de los resultados obtenidos por nosotros en esta Tesis. Por ejemplo, si se intenta comparar las secuencias de aminoácidos de las proteínas de humano, drosófila y *Xenopus laevis*, en la región de 110 aminoácidos que hemos intercambiado, se observa que algunos aminoácidos que están en la proteína de humano y que no están en ninguna de las proteínas de *Xenopus laevis*, sí están en drosófila. Lo mismo sucede si se intenta comparar G_{1-20} con cualquiera de las proteínas G_{sq} .

5. Interacción con $G_{\beta\gamma}$

Los resultados obtenidos por nosotros indican que la proteína $G_{sq} 6A1$ de *Xenopus laevis* no es capaz de asociarse adecuadamente con $G_{\beta\gamma}$ de cerebro de bovino. Esta preparación es en realidad una mezcla de por lo menos dos subtipos de G_{β} ($G_{\beta 1}$ y $G_{\beta 2}$) y de cuatro subtipos de subunidades G_{γ} (Boyer y cols., 1992). Sin embargo, cuando a esta proteína se le coloca el fragmento de 126 aminoácidos que contiene a la región de 110 aminoácidos de la proteína de humano, ésta recupera parcialmente la propiedad de interaccionar con $G_{\beta\gamma}$ aunque no alcanza el nivel de interacción de G_{sq} de humano. La proteína de humano a la cual se le coloca el fragmento de 126 aminoácidos de la proteína de *Xenopus laevis* pierde la capacidad de asociarse a $G_{\beta\gamma}$. Estos resultados indican que la secuencia de 110 aminoácidos de la proteína G_{sq} de *Xenopus laevis* no le permite a esta proteína interaccionar con $G_{\beta\gamma}$.

Los resultados comentados anteriormente son importantes, pues indican que la región de 110 aminoácidos ubicada hacia el amino terminal de G_{α} podría también estar involucrada en el reconocimiento de $G_{\beta\gamma}$. Aunque la mayor parte de la evidencia experimental indica que el extremo amino

terminal de G_0 cumple un rol fundamental en la interacción con $G_{\beta\gamma}$ (Conklin y Bourne, 1993), algunos experimentos realizados en base a la construcción de quimeras $G_{1-20}/G_{s0}/G_{1-20}$ indican que en la región de inserción i-1 también podría participar en el reconocimiento de $G_{\beta\gamma}$ (Johnson y cols., 1991).

Un aspecto importante de los resultados obtenidos por nosotros, es el que dice relación con la especificidad de reconocimiento entre G_0 y $G_{\beta\gamma}$. Aunque hasta este momento ha sido difícil demostrar la existencia de algún tipo de especificidad en este reconocimiento, los resultados obtenidos por nosotros apuntan a la existencia de regiones en G_0 que podrían participar en la regulación de la especificidad de interacción con distintos subtipos de $G_{\beta\gamma}$. Aunque algunos autores han sospechado de la existencia de esta especificidad (Birnbaumer, 1992; Kleuss, 1992), sólo una relativa selectividad de interacción ha sido detectada entre transducina y algún subtipo de complejo $G_{\beta\gamma}$ (Fawzi y cols., 1991). Hasta el momento no se ha caracterizado ningún tipo de subunidad $G_{\beta\gamma}$ en oocitos de *Xenopus laevis*, pero es posible predecir en base a nuestros resultados que en oocitos podrían existir algunos subtipos de $G_{\beta\gamma}$ distintos a los previamente caracterizados en mamíferos.

6. G_{s0} de oocitos de *Xenopus laevis*: especulaciones a cerca de su funcionalidad.

Los resultados obtenidos de los experimentos de protección por GTP- γ -S a la degradación por tripsina nos permiten afirmar que podríamos estar en la presencia de dos proteínas G_0 con características cinéticas distintas a las previamente caracterizadas en mamíferos, debido a que no parecen activarse a concentraciones de GTP y Mg^{2+} en las cuales la gran mayoría de las proteínas G_0 caracterizadas lo hacen (entre ellas varios tipos de G_{s0} , G_{00} y G_{i0} de mamíferos. Gilman, 1987; Birnbaumer y cols., 1990). Sin embargo, esta técnica no nos permite definir si es el intercambio de GDP por GTP o el cambio conformacional, las etapas que se encuentran alteradas

en las proteínas $G_{\beta\gamma}$ de *Xenopus laevis*. Para diferenciar entre estas dos posibilidades será necesario determinar en el futuro la velocidad a la cual estas proteínas intercambian el GDP unido por el GTP y si experimentan el cambio conformacional como consecuencia de la unión de GTP. Para realizar estos experimentos, se requieren proteínas purificadas y en mayor cantidad que las producidas por el lisado de reticulocitos. El hecho de que una proteína G_q presente propiedades cinéticas de activación distintas a las de la mayoría de las estudiadas no es extraño. La caracterización de nuevos subtipos de proteínas G_q por técnicas de clonamiento molecular han permitido establecer que no todas las subunidades G_q se comportan cinéticamente de manera similar. Una proteína denominada $G_{z\alpha}$ o $G_{x\alpha}$ ha sido simultáneamente clonada por dos grupos a partir de una genoteca de cDNA de retina humana (Fong y cols., 1988) y de una genoteca de cDNA de cerebro de rata (Matsuoka y cols., 1988). Estudios con preparaciones de la proteína expresada en *Escherichia coli* y purificada indican que posee una velocidad de intercambio de GTP por GDP extremadamente lenta en comparación con la mayor parte de las proteínas G_q purificadas. Además la velocidad de hidrólisis de GTP de esta proteína es 200 veces menor que la de otras proteínas G_q (Casey y cols., 1990). Resultados recientes han vinculado a $G_{z\alpha}$ con la posible inhibición de la actividad adenilil ciclasa (Wong y cols., 1992). Transducina (Fung, 1983; Fawzi, 1991) y $G_{q\alpha}$ (Pang y Sternweis, 1990) también presentan cinéticas de recambio lento de GDP por GTP comparada con otras proteínas G_q . Sin embargo la asociación de estas proteínas con su receptor (Berstein y cols., 1992; Fawzi y cols., 1991) activa dicho recambio. Aunque en el caso de $G_{z\alpha}$ no se sabe a que tipo de receptores podría acoplarse, se ha postulado que esta proteína podría necesitar de un factor adicional para su activación en analogía con la proteína ras (Casey y cols., 1990). Esta última proteína requiere de un factor citosólico para su activación, que cataliza el recambio de GDP por

GTP (Bourne y cols., 1991). Esta hipótesis ha sido confirmada con la caracterización de un factor citosólico que estimula el recambio de GDP por GTP en G_{00} y G_{i0} , pero no en G_{s0} (Strittmatter y cols., 1991). Este factor, denominado GAP, se comporta de manera análoga al complejo hormona receptor en su mecanismo de activación de G_{00} , pero a diferencia del receptor no requiere que la proteína G esté en su forma trimerica para su acción. Es posible postular la existencia de una proteína tipo GAP específica para las proteínas G_{s0} que fueron clonadas de una genoteca de cDNA de oocitos de *Xenopus laevis*. Esta proteína tipo GAP podría activar específicamente a G_{s0} de oocitos en su sistema nativo. Un hallazgo que apoya esta hipótesis es que la microinyección de GAP en oocitos de *Xenopus laevis*, estimula la actividad de la fosfolipasa C (Strittmatter y cols., 1993). Existe evidencia contundente que indica que por lo menos en este sistema la actividad de la fosfolipasa C es regulada por G_{00} (Blitzer y cols., 1993).

Los resultados obtenidos en esta Tesis plantean varias interrogantes. Una de ellas se refiere a la naturaleza de las dos proteínas de *Xenopus laevis*. Debido a su alta homología de secuencia (alrededor de un 90% de identidad a nivel de aminoácidos) con las formas de G_{s0} previamente clonadas de varios sistemas de mamíferos (rata, humano y bovino) fueron clasificadas como proteínas G_q que regulan la actividad de la adenilciclase y por tanto denominadas G_{s0} (Olate y cols., 1990). Trabajos previos realizados en este laboratorio permitieron caracterizar en la membrana de oocitos de *Xenopus laevis*, una actividad biológica que podía activar a la adenilciclase en presencia de análogos no hidrolizables de GTP, fluoruro y toxina del colera. Por sus características funcionales similares a la de otros sistemas descritos parecía ser G_{s0} (Jordana, 1982; Olate, 1985). Nada indicaba en aquel momento que esta proteína pudiese tener características peculiares.

Una posible explicación para nuestros resultados es que debido a una

especificidad de especies, la adenililciclase de *Xenopus laevis* fuera diferente de la o las formas de esta enzima presentes en las células cyc-, derivadas de una línea de linfoma de ratón. Esto explicaría la falta de acoplamiento funcional de las proteínas G_{sq} de *Xenopus laevis* con la adenililciclase de las células cyc-. Trabajos recientes indican que las células cyc- expresarían mRNA para los subtipos de adenililciclasas VI y VII (Krupinski y cols., 1992; Iyengar, 1993). Sin embargo todavía queda pendiente el establecer que subtipos de adenililciclasas se expresan en oocitos de *Xenopus laevis*.

Aunque nuestros resultados no nos permiten descartar la posibilidad de que estas dos proteínas puedan regular la actividad adenililciclase de *Xenopus laevis*, no se puede descartar la posibilidad de que las proteínas tipo G_{sq} clonadas en nuestro laboratorio, correspondan en realidad a proteínas semejantes sólo en estructura primaria a las verdaderas G_{sq} , pero que no regulen la actividad de la adenililciclase sino que cumplan otra función. Recientemente, Murphy y McDermott (1992) han descrito la existencia de una actividad sensible a toxina del cólera en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*. Esta actividad regula la apertura de un canal de Ca^{2+} . Es posible que esta actividad corresponda a la de una proteína de la familia de G_{sq} . Cabe señalar que las dos proteínas de *Xenopus laevis* poseen en su estructura primaria la arginina que se modifica por esta toxina (esquema 20) (Olate y cols., 1990).

Aunque en el presente momento, no tenemos indicaciones sobre que sistema efector pueden estar regulando estas proteínas tipo G_{sq} , si sabemos que sus genes se expresan a nivel de mRNA en oocitos de *Xenopus laevis* estadio VI (Oñate y cols., 1992) y en diversos estadios del desarrollo temprano en embriones de *Xenopus laevis* (Otte y cols., 1992). La sobreexpresión del gen $G_{sq}6A1$ mediante la microinyección del su mRNA codificante en el huevo fertilizado de *Xenopus laevis*, modifica el patrón de desarrollo

del embrión en la etapa de inducción del ectodermo de la gastrula para la formación del tejido neural (Otte y cols., 1992). Esto indica que la proteína $G_{s\alpha}6A1$ cumple una importante función en el desarrollo de la rana.

Otro punto que es necesario discutir es el que se refiere a las modificaciones post traduccionales que experimentan las proteínas G_{α} . Hasta hace algún tiempo no se conocían que tipo de modificaciones covalentes sufrían las proteínas de la familia de $G_{s\alpha}$, aunque si se sabía que $G_{\alpha 0}$ y $G_{\alpha 10}$ eran miristoilados en una glicina del extremo amino terminal (Mumby y cols., 1990; Jones y cols., 1990). Esta modificación es importante para la asociación de estas dos proteínas con la membrana (Jones y cols., 1990) plasmática y también con $G_{\beta\gamma}$ (Linder y cols., 1991). Sin embargo, el hecho de que $G_{s\alpha}$ de bovino sintetizado en *Escherichia coli* reconstituye la actividad adenililciclase de cerebro de bovino, pero con menor afinidad que una proteína G_s purificada de hígado de conejo (Graziano y cols., 1989), indica que las proteínas $G_{s\alpha}$ requieren de algún tipo de modificación que de cuenta de la diferencia observada entre las proteínas nativas y las recombinantes. Recientemente, se ha demostrado que efectivamente $G_{s\alpha}$ experimenta la adición de ácido palmítico en un residuo de cisteína ubicado en el extremo amino terminal de $G_{s\alpha}$ (Linder y cols., 1993; Wedegaertner y col., 1993; Degtyarev y cols., 1993). Esta modificación tiene importancia en la asociación de $G_{s\alpha}$ a la membrana, pero no parece ser un requisito fundamental para la interacción de la proteína con la adenililciclase, pues mutantes a las cuales se les ha sustituido esta cisteína, tienen la capacidad (aunque menor) de asociarse funcionalmente con la adenililciclase (Wedegaertner y cols., 1993). Esta cisteína que se palmitoila está presente en la secuencia de las dos proteínas $G_{s\alpha}$ de *Xenopus laevis* (esquema 19) y la región aminoácida que la rodea es idéntica en $G_{s\alpha}$ de humano, bovino, rata y en las dos proteínas de *Xenopus laevis*. Hasta el momento no se ha publicado en la literatura ninguna información que indique que en la región

de 110 aminoácidos exista algún aminoácido que se modifique químicamente. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que en el sistema del oocito exista algún tipo de modificación post traduccional que afecte uno o más aminoácidos de G_{sq} que siendo o no de la región estudiada por nosotros, sea esencial para la activación funcional de G_{sq} por la región de 110 aminoácidos. De ser cierta esta idea, este sistema sería específico del oocito de *Xenopus laevis* y no estaría presente en lisado de reticulocitos de conejo.

C. PROYECCIONES DEL TRABAJO REALIZADO EN ESTA TESIS.

1. Efecto de polilisinas.

Los estudios realizados en este Tesis en lo referente al efecto de polilisina, nos indican que este compuesto imita al complejo hormona receptor en su mecanismo de acción. Estos resultados son de interés, pues abren la posibilidad de usar a polilisina como un análogo del complejo hormona receptor en los estudios de la regulación de la activación de las proteínas G por hormonas. Uno de los factores que limitan los estudios *in vitro* con receptores purificados es el de la cantidad de proteína obtenida. Generalmente es poca, en relación a la cantidad que se requiere para los estudios de reconstitución funcional con proteínas G purificadas en vesículas de fosfolípidos. Este punto es la causa del interés que varios investigadores han tenido en el uso de péptidos como el mastoparín para estudiar el mecanismo de activación hormonal de las proteínas G (Higashijima y cols., 1990). El hecho de que en oocitos de *Xenopus laevis* no se haya encontrado hasta ahora alguna hormona que active a la adenililciclase a través de G_s , realza el interés en el uso de polilisina como compuesto modelo para futuros trabajos sobre la activación hormonal de la adenililciclase en el oocito.

Otro aspecto importante de señalar es el interés de realizar a futuro

estudios estructurales sobre la conformación que adopta polilisina en solución. Uno de los aspectos que queda por dilucidarse es el que se refiere a la conformación que tienen que adoptar las regiones de los receptores que interactúan físicamente con las proteínas G. Polilisina puede ser útil en este propósito. Estudios de este tipo podrían resolver a futuro problemas tan importantes como el de la especificidad que poseen los receptores las proteínas G.

Polilisina podría también ser muy útil en el estudio del mecanismo de activación de las proteínas G en los aspectos relacionados con el recambio de GDP por GTP y el efecto de Mg^{2+} . En este sentido se propone realizar estudios mas finos relacionados con el efecto de polilisina en la velocidad de disociación de GDP, y en la unión de GTP. Todavía con respecto a este punto no existe un consenso en la literatura acerca de si el receptor es capaz o no de regular estas dos etapas en forma independiente la una de la otra. Otro aspecto que tampoco ha sido resuelto es el relacionado con los efectos que el Mg^{2+} tiene sobre las proteínas G, sobre todo en relación al efecto que altas concentraciones del metal tiene sobre las proteínas G. Tampoco está clara la relación que existe entre la activación hormonal de las proteínas G y el Mg^{2+} .

2. Estudios de funcionalidad de proteínas G_s de oocitos de *Xenopus laevis*.

Los resultados obtenidos por nosotros en esta Tesis plantean una serie de incógnitas con respecto a las proteínas clonadas por nuestro laboratorio de oocitos y que hemos denominado G_{sq} . Pensamos que a futuro los aspectos inmediatos que deben resolverse pueden subdividirse en dos puntos principales.

1) Estudiar que aminoácidos de las proteínas de *Xenopus laevis* son los responsables de la falta de reconstitución de la adeniliciclase de las membranas cyc-. Los resultados obtenidos por nosotros facilitan la tarea

pues delimitan la búsqueda a un número de mas o menos 20 aminoácidos. El uso de mutagénesis sitio dirigida nos permitirá resolver este problema. Dentro de este punto, hay que mencionar también los estudios que hay que realizar en relación a determinar la o las etapas del mecanismo de activación de G_{sq} de *Xenopus laevis* que se encuentran alteradas con respecto a la proteína de humano. El uso de sistemas de expresión como el de báculo virus pueden solucionar el problema de una expresión adecuada de G_{sq} de oocitos. Posteriormente será necesario realizar con la proteína purificada los estudios pertinentes en relación a la cinética de unión de GTP, disociación de GDP, efecto de Mg^{2+} , etc.

2) El segundo aspecto que nos interesa abordar a futuro (y quizás el mas importante desde nuestro punto de vista) es el de la funcionalidad de las proteínas $G_{sq}6A1$ y $G_{sq}12B2$ en el oocito de *Xenopus laevis*. Dentro de los aspectos que quedan por resolver, está el de estudiar si las proteínas de oocitos se acoplan funcionalmente a la adenilciclase del oocito de *Xenopus laevis*. Sin embargo, estos estudios requieren el diseño de sistemas de reconstitución homologa con fracciones de membranas de oocitos de *Xenopus laevis*. Una de las limitaciones que hasta ahora hemos tenido en la realización de este tipo de estudios, es que la actividad G_s endógena de la membrana enmascara los efectos que podrían producir la adición de proteínas G_{sq} exógenas. Existen algunas aproximaciones que nos podrían ayudar a resolver el problema, como el usar mutantes de las proteínas de oocito con su actividad GTPásica inhibida con el fin de obtener proteínas permanentemente activas. La ventaja de usar este tipo de aproximaciones es que la actividad endógena G_s en membranas de oocitos se activa sólo en presencia de análogos no hidrolizables de GTP. El uso de las proteínas con su actividad GTPásica inhibida permitiría realizar los estudios de reconstitución con GTP. En esta condición la actividad G_{sq} endógena no se activa.

Finalmente es necesario destacar, que si la adenililciclase de oocitos no es el sistema regulado por las proteínas G_{sq} clonadas en nuestro laboratorio, habrá que diseñar a futuro estrategias que nos permitan encontrar él o los sistemas efectores regulados por estas proteínas. De ser ésto cierto, la proteína G_{sq} que existe en la membrana del oocito y que regula la actividad de la adenililciclase de oocitos de *Xenopus laevis*, no ha sido aún clonada.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos de esta *Tesis* y los antecedentes analizados en la *Introducción*, las conclusiones más importantes de este trabajo son:

A. Efecto de policationes:

1. Polilisina, poliornitina y espermina producen una estimulación de la actividad adenililciclase en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*. Esta estimulación es específica a nivel de la proteína G_s .
2. Polilisina, poliornitina y en menor extensión poliarginina, estimulan significativamente la actividad GTPásica de la proteína $G_{\alpha i-3}$. La estimulación de la polilisina se manifiesta también sobre la transducina y en menor grado sobre ras.
3. Los resultados obtenidos tanto con G_s en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*, como con las proteínas purificadas $G_{i-3\alpha}$ y transducina, indican que la estimulación se debe fundamentalmente a un efecto de la afinidad de la proteína G por GTP o GTP- γ -S. Polilisina también afecta los requerimientos de Mg^{2+} en la activación tanto para G_s en membrana de oocitos de *Xenopus laevis*, como para $G_{i-3\alpha}$ y transducina. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros grupos con péptidos que contienen aminoácidos básicos y que imitan al complejo hormona receptor en su mecanismo de activación de las proteínas G.
4. Polilisina revierte la inhibición de la adenililciclase por progesterona en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*. Estos resultados son una evidencia mas que indica que progesterona puede afectar la activación de la adenililciclase por G_s .

B. Estudios del acoplamiento funcional de G_{sq} de oocitos de *Xenopus laevis* a la adeniliclasa

1. Las proteínas G_{sq} clonadas a partir de una genoteca de oocitos de *Xenopus laevis* y expresadas en lisado de reticulocitos no se acoplan funcionalmente a la adeniliclasa de un sistema de mamíferos, a diferencia de la proteína G_{sq} humana sintetizada en igual forma.
2. Los experimentos realizados con las proteínas quiméricas indican que la causa de esta falta de acoplamiento reside en diferencias de secuencia de aminoácidos de una región de 110 aminoácidos ubicada hacia el extremo amino terminal de G_{sq} . Esta región forma un dominio proteico separado del resto de la proteína, y del sitio de unión de GTP (Markby y cols., 1993; Noel y cols., 1993).
3. Esta región de 110 aminoácidos es también responsable de la sensibilidad diferencial que tienen las proteínas G_{sq} de humano y de *Xenopus laevis* a la digestión por tripsina en presencia de GTP- γ -S.
4. La región de 110 aminoácidos parece ser también importante en el reconocimiento de $G_{\beta\gamma}$.
5. En su conjunto, estos resultados indican que el dominio amino terminal de G_{sq} sería importante en la regulación de la actividad de esta proteína. Este dominio está probablemente involucrado en el intercambio de GDP por GTP o en el cambio conformacional que resulta de la unión de este nucleótido.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, K., Kusakabe, Y., Tanemura, K., Emori, Y. y Arai, S. (1993) Primary structure and cell-type specific expression of a gustatory G protein-coupled receptor related to olfactory receptors. *J. Biol. Chem.* **268**, 12033-12039.
- Allende, J. (1988) GTP-mediated macromolecular interactions: the common features of different systems. *FASEB J.* **2**, 2356-2367.
- Amatruda, T., Gautam, N., Fong, H., Northup, J. y Simon, M. (1988) The 35- and 36 kDa β subunits of GTP-binding regulatory proteins are products of separate genes. *J. Biol. Chem.* **263**, 508-5011.
- Antonelli, M., Olate, J., Allende, C. y Allende, J. (1991) Polylysine activates membrane-bound adenylyl cyclase from *Xenopus laevis* oocytes through the G_s transducing protein. *Com. Biochem. Physiol.* **99B**, 827-832.
- Antonelli, M., Olate, J., Graf, R., Allende, C. y Allende, J. (1992) Differential stimulation of the GTPase activity of G-proteins by polylysine. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 547-551.
- Antonelli, M., Birnbaumer, L., Allende, J. y Olate, J. (1994) Human-*Xenopus* chimeras of G_{α} reveal a new region imports for its activation of adenylyl cyclase. *FEBS Lett.* **340**, 249-254.
- Antonny, B., Bigay, J. y Chabre, M. (1990) A novel magnesium-dependent mechanism for the activation of transducine by fluoride. *FEBS Lett.* **268**, 277-280.
- Antonny, B. y Chabre, M. (1992) Characterization of the aluminium and beryllium fluoride species which activate transducin. Analysis of the binding and dissociation kinetics. *J. Biol. Chem.* **267**, 6710-6718.
- Antonny, B., Sukumar, M., Bigay, J., Chabre, M. y Higashijima, T. (1993) The mechanism of aluminium-independent G-protein activation by fluoride and Magnesium. ^{31}P NMR spectroscopy and fluorescence kinetic studies. *J. Biol. Chem.* **268**, 2393-2402.
- Asano, T., Pedersen, S., Scott, C. y Ross, E. (1984) Reconstitution of catecholamine-stimulated binding of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) to the stimulatory GTP-binding protein of adenylate cyclase. *Biochemistry* **23**, 5460-5467.
- Arshavsky, V., Gray-Keller, M. y Bownds, M. (1991) cGMP suppresses GTPase activity of a portion of transducin equimolar to phosphodiesterase in frog rod outer segments. *J. Biol. Chem.* **266**, 18530-18537.

Arshavsky, V. y Bownds, M. (1992) Regulation of deactivation of photoreceptor G protein by its target enzyme and cGMP. *Nature* 357, 416-417.

Bakalyar, H. and Reed, R. (1990) Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* 250, 1403-1406

Beals., C., Wilson, C. y Perlmutter, R. (1987) A small multigene family encodes Gi signal-transduction proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84,7886-7890.

Bender, J. y Neer, E. (1983) Properties of the adenylate cyclase catalytic unit from caudate nucleus. *J. Biol. Chem.* 258, 2432-2439.

Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C., Schirmer, N., Sprinzl, N. y Hilgenfeld, R. (1993) Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature* 365, 126-132.

Berlot, C. y Bourne, H. (1992) Identification of effector-activating residues of G_{sq} . *Cell* 68, 911-922.

Berstein, G., Blank, J., Jhon, D., Exton, J., Rhee, S. y Ross, E. (1992) Phospholipase C- $\beta 1$ is a GTPase-activating protein for $G_{q/11}$, its physiologic regulator. *Cell* 70, 411-418.

Bigay, J., Deterre, P., Pfister, C., y Chabre, M. (1985) Fluoro aluminates activate transducin-GAP by mimicking the γ -phosphate of GTP in its binding site. *FEBS Lett.* 191, 181-185.

Birnbaumer, L., Abramowitz, J. and Brown, A. (1990) Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 1031, 163-224.

Birnbaumer, L., (1992) Receptor-to-signaling through G proteins: roles for $\beta\lambda$ dimers as well as α subunits. *Cell* 71, 1069-1072.

Blank, J., Ross, A. y Exton, J. (1991) Purification and characterization of two G-proteins that activate the $\beta 1$ isozyme of phosphoinositide-specific phospholipase C. Identification as members of the G_q class. *J. Biol. Chem.* 266, 18206-18216.

Blitzer, R., Omri, G., De Vivo, M., Carty, D., Premont, R., Codina, J., Birnbaumer, L., Cotecchia, S., Caron, M., Lefkowitz, R., Landau, E. y Iyengar, R. (1993) Coupling of the expressed $\alpha_{1\beta}$ -adrenergic receptor to the phospholipase C pathway in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 7532-7537.

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

- Bokoch, G., Katada, T., Northup, J., Hewlett, E. y Gilman, A. (1983) Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J. Biol. Chem.* 258, 2072-2075.
- Bokoch, G., Katada, T., Northup, J., Ui, M. and Gilman, A. (1984) Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259, 3560-3567.
- Bourne, H., Sanders, D. y McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348, 125-132.
- Bourne, H., Sanders, D. y McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117-127.
- Bourne, H. GTPases. A turn-on and a surprise. (1993) *Nature* 366, 628-630.
- Boyer, J., Waldo, G., Evans, T., Northup, J., Downes, P. y Harden, K. (1989) Modification of AlF_4^- -and receptor-stimulated phospholipase C activity by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.* 264, 13917-13922.
- Boyer, J., Waldo, G., y Harden, K. (1992) $\beta\gamma$ -subunit activation of G-protein-regulated phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 267, 25451-25456.
- Brandt, D., Asano, T., Pedersen, S. y Ross, E. (1983) Reconstitution of catecholamine-stimulated guanosinetriphosphatase activity. *Biochemistry* 22, 4357-4362.
- Brandt, D. y Ross, E. (1986) Catecholamine-stimulated GTPase cycle. Multiple sites of regulation by β -adrenergic receptor and Mg^{2+} studied in reconstituted receptor- Gs vesicles. *J. Biol. Chem.* 261, 1656-1664.
- Bravo, R.; Otero, C.; Allende, C. and Allende, J. (1978) Amphibian oocyte maturation and protein synthesis: related inhibition by cyclic AMP, theophylline and papaverine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1242-1246.
- Breitwieser, G. y Szabo, G (1988) Mechanism of muscarinic receptor-induced K^+ channel activation as revealed by hydrolysis-resistant GTP analogues. *J. Gen. Physiol.* 91, 469-493.
- Burzio, L.O. y Koide, S.S. (1977). Stimulation of poly (adenosin diphosphate ribose) synthase activity of *Xenopus* germinal vesicle by progesterone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 286, 398-407.
- Cali, J., Balcueva, E., Rybalkin, I. y Robishaw, J. (1992) Selective tissue distribution of G protein γ subunits, including a new form of the γ subunits identified by cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 267, 24023-24027.
- Capon, D., Chen, E., Levinson, A., Seeburg, P. y Goeddel, D. (1983) Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 302, 33-37.

Carrasco, D., Jacob, G., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1988). Polylysine and polyamine stimulation of the phosphatidylinositol kinases of amphibian oocyte membranes. *Biochem. Int.* 17, 319-327.

Casey, P., Fongs, H., Simon, M. y Gilman, A. (1990) G_z , a guanine nucleotide-binding protein with unique biochemical properties. *J. Biol. Chem.* 265, 2383-2390.

Cassel, D., Levkovitz, H., y Selinger, Z. (1977) The regulatory GTPase cycle of turkey erythrocyte adenylate cyclase. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 3, 393-406.

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

Cheung, A., Huang, R., Graziano, M. y Strader, C. (1991) Specific activation of G_s by synthetic peptides corresponding to an intracellular loop of the β -adrenergic receptor. *FEBS Lett.* 2, 277-280.

Cerione, R., Codina, J., Benovic, J., Lefkowitz, R., Birnbaumer, L. y Caron, M. (1984) *Biochemistry* 23, 4519-4525.

Cerione, R. (1991) Reconstitution of receptor/GTP-binding protein interactions. *Biochem. Biophys. Acta.* 1071, 473-501.

Cicirelli, M.F., Pelech, S.L. y Krebs, E.G. (1988). Activation of multiple protein kinases during the burst in protein phosphorylation that precedes the first meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 2009-2019.

Clapham, D. y Neer, E. (1993) New roles for G-protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365, 403-406.

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

Codina, J., Hildebrandt, J., Sekura, R., Birnbaumer, M., Bryan, J., Manclark, C., Iyengar, R. and Birnbaumer, L. (1984a) Ns and Ni, the Stimulatory and Inhibitory Regulatory Components of Adenylyl Cyclases. Purification of the human erythrocyte proteins without the use of activating regulatory ligands. *J. Biol. Chem.* 259, 5871-5886.

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

Codina, J., Olate, J., Abramowitz, J., Mattera, R., Cook, R. y Birnbaumer, L. (1988) α -3 cDNA encodes the α subunit of G α , the stimulatory G protein of receptor-regulated K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **263**, 6746-6750.

Conklin, B. y Bourne, H. (1993) Structural elements of G α subunits that interact with G $\beta\gamma$, receptors, and effectors. *Cell* **73**, 631-641.

Conklin, B., Farfel, Z., Lustig, K., Julius, D. y Bourne, H. (1993) Substitution of three amino acids switches receptor specificity of G α_q to that of G α_i . *Nature* **363**, 274-276.

Conway, T. y Lipmann, F. (1964) Characterization of a ribosome-linked guanosine triphosphatase in *Escherichia coli* extracts. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* **52**, 1462-1469.

Cotecchia, S., Exum, S., Caron, M. y Lefkowitz, R. (1990) Regions of the α_1 -adrenergic receptor involved in coupling to phosphatidylinositol hydrolysis and enhanced sensitivity of biological function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 2896-2900.

Degtyarev, M., Spiegel, A. y Jones, T. (1993) Increased palmitoylation of the Gs protein α subunit after activation by the β -adrenergic receptor or cholera toxin. *J. Biol. Chem.* **268**, 23769-23772.

Denker, B., Neer, E. y Schmidt, C. (1992) Mutagenesis of the amino terminus of the α subunit of the G protein G α_o . *In vitro* characterization of $\alpha_o\beta\gamma$ interactions. *J. Biol. Chem.* **267**, 6272-6277.

Deretic, D y Hamm, H. (1987) Topographic analysis of antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies to the photoreceptor guanyl nucleotide-binding protein. *J. Biol. Chem.* **262**, 10839-10847.

Didsbury, J., Ho, Y. y Snyderman, R. (1987) Human Gi protein alpha-subunit: deduction of amino acid structure from a cloned cDNA. *FEBS Lett* **211**, 160-164.

Didsbury, J. y Snyderman, R. (1987) Molecular cloning of a new G protein. Evidence for two Gi α -like protein families. *FEBS Lett* **219**, 259-263.

Dixon, R., Sigal, I., Rands, E., Register, R. B., Candelore, M., Blake, A. y Strader, C. (1987) Ligand binding to the β -adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. *Nature* **326**, 73-77.

Dumont, J. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). Stages of oocytes in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* **136**, 156-180.

Fawzi, A., Fay, D., Murphy, E., Tamir, H., Erdos, J. y Northup, J. (1991) Rhodopsin and the retinal G-protein distinguish among G-protein $\beta\gamma$ subunit forms. *J. Biol. Chem.* **266**, 12194-12200.

- Feinstein, P., Schrader, K., Bakalyar, H., Tang, W., Krupinski, J., Gilman, A. and Reed, R. (1991) Molecular cloning and characterization of a Ca²⁺/calmodulin-insensitive adenylyl cyclase from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10173-10177.
- Ferguson, K., Higashijima, T., Smigel, M. y Gilman, A. (1986) The influence of bound GDP on the kinetics of guanine nucleotide binding to G proteins. *J. Biol. Chem.* **261**, 7393-7399.
- Findlay, J. y Pappin, D. (1986) The opsinfamily of proteins. *Biochem. J.* **238**, 625-642.
- Finidori-Lepicard, J., Schorderet-Slatkine, S., Hanoune, J. y Baulieu, E-E. (1981). Progesterone inhibits membrane-bound adenylylase cyclase in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* **292**, 255-257.
- Florio, V. y Sternweis, P. (1989) Mechanism of muscarinic receptor action on G₀ in reconstituted phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* **264**, 3909-3915.
- Fong, H., Amatruda, T., Birren, B. y Simon, M. (1987) Distinct forms of the β subunit of GTP-binding regulatory proteins identified by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 3792-3796.
- Fong, H., Yoshimoto, K., Eversole-Cire, P. y Simon, M. (1988) Identification of a GTP-binding protein α subunit that lacks an apparent ADP-ribosylation site for pertussis toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 3066-3070.
- Freissmuth, M. y Gilman, A. (1989) Mutations of G_{sq} designed to alter reactivity of the protein with bacterial toxins. Substitutions at arg¹⁸⁷ result in loss GTPase activity. *J. Biol. Chem.* **264**, 21907-21914.
- Fung, B. y Stryer, L. (1980) Photolyzed rhodopsin catalyzes the exchange of GTP for bound GDP in retinal rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 2500-2504.
- Fung, B. (1983) Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. I. Separation and reconstitution of the subunits. *J. Biol. Chem.* **258**, 10495-10502.
- Fung, B. y Nash, C. (1983) Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. II. Evidence for distinct binding sites and conformational changes revealed by limited proteolysis with trypsin. *J. Biol. Chem.* **258**, 10503-10510.
- Gao, B., Gilman, A. y Robishaw, J. (1987) A second form of the β subunit of signal-transducing G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 6122-6125.
- Gao, B., and Gilman, A. (1991) Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10178-10182.

Gatica, M., Allende, C., Antonelli, M. y Allende, J.E. (1987). Polylysine-containing peptides, including the carboxyl-terminal segment of the human c-Ki-ras 2 protein, affect the activity of some key membrane enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**, 324-328.

Gilman, A. (1987) G protein: transducers of receptor-generated signals. Ann. Rev. Biochem. **56**, 615-649.

Glass, C. Lipkin, S., Devary, O. y Rosenfeld, M. (1989) Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer. Cell **59**, 697-708.

González, C., Salas, A. y Monasterio, O. (1993) Factores que influyen sobre la solubilidad de polipéptidos sobreproducidos en bacterias. Noticiero de Biología. Resúmenes de la XXXVI Reunión de la Sociedad de Biología de Chile. **1**, página 94.

Graf, R., Mattera, R., Codina, J., Estes, M. y Birnbaumer, L. (1992) A truncated recombinant α subunit of G_{i3} with a reduced affinity for $\beta\gamma$ dimers and altered guanosine 5'-3-O-(Thio)triphosphate binding. J. Biol. Chem. **267**, 24307-24314.

Graziano, M., Casey, P. y Gilman, A. (1987) Expression of cDNAs for G proteins in *Escherichia coli*. Two forms of $G_{s\alpha}$ stimulate adenylate cyclase. J. Biol. Chem. **262**, 11375-11381.

Graziano, M., Freissmuth, M. y Gilman, A. (1989) Expression of $G_{s\beta}$ in *Escherichia coli*. Purification and properties of two forms of the protein. J. Biol. Chem. **264**, 409-418.

Gross, M., Toscano, D. and Toscano, W. (1987) Calmodulin-mediated adenylate cyclase from mammalian sperm. J. Biol. Chem. **262**, 8672-8676.

Gutowski, S., Smrcka, A., Nowak, L., Wu, D., Simon, M. y Sternweis, P. (1991) Antibodies to the α_q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein α subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate hydrolysis by hormones. J. Biol. Chem. **266**, 20519-20524.

Guy, P., Koland, J. y Cerione, R. (1990) Rhodopsin-stimulated activation-deactivation cycle of transducin: kinetics of the intrinsic fluorescence response of the α subunit. Biochemistry **29**, 6954-6964.

Haga, K., Haga, T., Ichiyama, A., Katada, T., Kurose, H. y Ui, M. (1985) Functional reconstitution of purified muscarinic receptors and inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. Nature **316**, 731-733.

Hamm, H., Deretic, D., Arendt, A., Hargrave, P., Koenig, B. y Hofmann, K. (1988) Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the α subunit. Science **241**, 832-835.

- Hamm, H. (1991) Molecular interactions between the photoreceptor G protein and rhodopsin. *Cell Mol. Neurobiol.* 11, 563-578.
- Harlow, E. y Lane, D. (1988) *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hanahan, D. y Meselson, M. (1983) Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.* 100, 333-360.
- Hanski, E., Sternweis, P., Northup, J., Dromerick, A. y Gilman, A. (1981) The regulatory component of adenylate cyclase. Purification and properties of the turkey erythrocyte protein. *J. Biol. Chem.* 256, 12911-12919.
- Hepler, J. y Gilman, A. (1992) G proteins. *Trends. Biochem. Sci.* 17, 383-387.
- Higashijima, T., Ferguson, K., Sternweis, P., Ross, E., Smigel, M. y Gilman, A. (1987a) The effect of activating ligands on the intrinsic fluorescence of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 262, 752-756.
- Higashijima, T., Ferguson, K., Smigel, M. y Gilman, A. (1987b) The effect of GTP and Mg^{2+} on the GTPase activity and the fluorescent properties of G_0 . *J. Biol. Chem.* 262, 757-761.
- Higashijima, T., Ferguson, K., Sternweis, P., Smigel, M. y Gilman, A. (1987c) Effects of Mg^{2+} and the $\beta\gamma$ -subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *J. Biol. Chem.* 262, 762-766.
- Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T. y Ross, E. (1988) Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J. Biol. Chem.* 263, 6491-6494.
- Higashijima, T., Burnier, J. y Ross, E. (1990) Regulation of G_i and G_o by Mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. Mechanism and structural determinants of activity. *J. Biol. Chem.* 265, 14176-14186.
- Higashijima, T., y Ross, E. (1991) Mapping of the mastoparan-binding site on G proteins. Cross-linking of [^{125}I -Tyr³, Cys¹¹] mastoparan to G_o . *J. Biol. Chem.* 266, 12655-12661.
- Higashijima, T., Graziano, M., Suga, H., Kainosho, M. y Gilman, A. (1991) ^{19}F and ^{31}P NMR spectroscopy of G protein α subunits. Mechanism of activation by Al^{3+} and F^- . *J. Biol. Chem.* 266, 3396-3401.
- Hirsch, J., Dietzel, C. y Kurjan, J. (1991) The carboxyl terminus of Scg1, the G_α subunit involved in yeast mating, is implicated in interactions with the pheromone receptors. *Genes Dev.* 5, 467-474.

Holbrook, S. y Kim, S. (1989) Molecular model of the G protein α subunit based on the crystal structure of the HRAS protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 1751-1755.

Hudson, T., Roeber, J. y Johnson, G. (1981) Conformational changes of adenylate cyclase regulatory proteins mediated by guanine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **256**, 1459-1465.

Iñiguez-Lluhi, J., Simon, M., Robishaw, J. y Gilman, A. (1992) G protein $\beta\gamma$ subunits synthesized in Sf9 cells. Functional characterization and the significance of prenylation of γ . *J. Biol. Chem.* **267**, 23409-23417.

Itoh, H., Toyama, R., Kozasa, T., Tsukamoto, T., Matsuoka, M. and Kaziro, Y. (1988) Presence of three distinct molecular species of G_i protein α subunit. Structure of rat cDNAs and human genomic DNAs. *J. Biol. Chem.* **263**, 6656-6664.

Itoh, H. and Gilman, A. (1991) Expression and analysis of G_s Mutants with decreased ability to activate adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **266**, 16226-16231.

Iyengar, R. y Birnbaumer, L. (1981) Hysteretic activation of adenylyl cyclases. I. Effect of Mg ion on the rate of activation by guanine nucleotides and fluoride. *J. Biol. Chem.* **256**, 11036-11041.

Iyengar, R. (1981) Hysteretic activation of adenylyl cyclases. II. Mg ion regulation of the activation of the regulatory component as analyzed by reconstitution. *J. Biol. Chem.* **256**, 11042-11050.

Iyengar, R. and Birnbaumer, L. (1982) Hormone receptor modulates the regulatory component of adenylyl cyclase by reducing its requirement for Mg^{2+} and enhancing its extent of activation by guanine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 5179-5183.

Iyengar, R., Rich, K., Herberg, J., Premont, R. y Codina, J. (1988) Glucagon receptor-mediated activation of G_s is accompanied by subunit dissociation. *J. Biol. Chem.* **263**, 15348-15353.

Iyengar, R. (1993) Molecular and functional diversity of mammalian G_s -stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J.* **7**, 768-775.

Johnson, G., Dhanasekaran, N., Gupta, S., Lowndes, J., Vaillancourt, R. y Ruoho, A. (1991) Genetic and structural analysis of G protein α subunit regulatory domains. *J. Cell. Biochem.* **47**, 136-146.

Jones, D. y Reed, R. (1989) G_{olf} : an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* **244**, 790-795.

Jones, T., Simonds, W., Merendino, J., Brann, M. y Spiegel, A. (1990) Myristoylation of an inhibitory GTP-binding protein α subunit is essential for its membrane attachment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 568-572.

Jordana, X., Otero, C., Allende, C., Allende, J., Flawia, M., Kornblihtt, A. and Torres, H. (1981a) Adenylate cyclase activity in *Xenopus laevis* ovarian follicles. *Mol. and Cell. Biochem.* **40**, 85-91.

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

Jordana, X., (1982) Estudio de actividades de adenililciclase en ovario de *Xenopus laevis*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

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

Journot, L., Pantaloni, C., Bockaert, J. y Audigier, Y. (1991) Deletion within the amino-terminal region of $G_{\beta\gamma}$ impairs its ability to interact with $\beta\gamma$ subunits and to activate adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **266**, 9009-9015.

Kanaho, Y Tsai, S., Adamik, R., Hewlett, E., Moss, J. y Vaughan, M. (1984) Rhodopsin-enhanced GTPase activity of the inhibitory GTP-binding protein of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **259**, 7378-7381.

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

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

Katada, T., Oinuma, M. y Ui, M. (1986) Two guanine nucleotide-binding proteins in rat brain serving as the specific substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. Interaction of the α -subunits with $\beta\gamma$ -subunits in development of their biological activities. *J. Biol. Chem.* **261**, 8182-8191.

Katsushika, S., Chen, L., Kawabe, J., Nilakantan, R., Halnon, N., Homcy, C. y Ishikawa, Y. (1992) Cloning and characterization of a sixth adenylyl cyclase isoform: types V and VI constitute a subgroup within the mammalian adenylyl cyclase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 8774-8778.

- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M. y Satoh, T. (1991) Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 60, 349-400.
- Kleuss, C., Scherübl, H., Hescheler, J., Schultz, G. y Wittig, B. (1992) Difference β -subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors. *Nature* 358, 424-426.
- Kobilka, B., MacGregor, C., Daniel, K., Kobilka, T., Caron, M. y Lefkowitz, R. (1987) Functional activity and regulation of human β_2 -adrenergic receptors expressed in *Xenopus* Oocytes. *J. Biol. Chem.* 262, 15796-15802.
- Konig, B., Arendt, A., McDowell, J., Kahalert, M., Hargrave, P. and Hofmann, K. (1989) Three cytoplasmatic loops of rhodopsin interact with transducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6878-6882.
- Kozasa, T., Itoh, H., Tsukamoto, T. and Kaziro, Y. (1988) Isolation and characterization of the human Gsa gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 2081-2085.
- Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H., Tang, W., Feinstein, P., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R., and Gilman, A. (1989) Adenylyl Cyclase Amino Acid Sequence: Possible Channel- or Transporter-Like Structure. *Science*. 244, 1558-1564.
- Krupinski, J., Lehman, T., Frankenfield, C., Zwaagstra, J. y Watson, P. (1992) Molecular diversity in the adenylylcyclase family. Evidence for eight forms of the enzyme cloning of type VI. *J. Biol. Chem.* 267, 24858-24862.
- Kühn, H. (1980) Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes. *Nature* 283, 587-589.
- Kurose, H., Katada, T., Amano, T. y Ui, M. (1983) Specific uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via α -adrenergic, cholinergic, and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J. Biol. Chem.* 258, 4870-4875.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the heads of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lancet, D. y Ben-Arie, N. (1993) Olfactory receptors. *Curr. Biol.* 3, 668-674.
- La Rosa, G., Thomas, K., Kaufmann, M., Mark, R., White, M., Taylor, L., Gray, G., Witt, D. y Navarro, J. (1992) Amino terminus of the interleukin-8 receptor is a major determinant of receptor subtype specificity. *J. Biol. Chem.* 267, 25402-25406.

Lechleiter, J., Hellmiss, R., Duerson, K., Ennulat, D., David, N., Clapham, D. y Peralta, E. (1990) Distinct sequence elements control the specificity of G protein activation by muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *EMBO J.* **9**, 4381-4390.

Lee, E., Taussig, R. y Gilman, A. (1992a) The G226A mutant of $G_{\alpha q}$ highlights the requirement for dissociation of G protein subunits. *J. Biol. Chem.* **267**, 1212-1218.

Lee, Ch., Park, D., Wu, D., Rhee, S. y Simon, M. (1992b) Members of $G_{\alpha q}$ subunit gene family activate phospholipase C_{β} isozymes. *J. Biol. Chem.* **267**, 16044-16047.

Lester, H., Steer, M. y Levitzki, A. (1982) Prostaglandin-stimulated GTP hydrolysis associated with activation of adenylate cyclase in human platelet membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 719-723.

Levine, M., Smallwood, P., Moen, P., Helman, L. y Ahn, T. (1990) Molecular cloning of β_3 subunit, a third form of the G protein β -subunit polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 2329-2333.

Lewin, B. (1990). Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners, and substrates. *Cell* **61**, 743-752.

Linder, M., Enwald, D., Miller, R. y Gilman, A. (1990) Purification and characterization of $G_{\alpha q}$ and three types of G_{i1} after expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 8243-8251.

Linder, M., Pang, I., Duronio, R., Gordon, J., Sternweis, P. y Gilman, A. (1991) Lipid modifications of G protein subunits. Myristoylation of $G_{\alpha q}$ increases its affinity for $\beta\gamma$. *J. Biol. Chem.* **266**, 4654-4659.

Linder, M., Middleton, P., Hepler, J., Taussig, R., Gilman, A. y Mumby, S. (1993) Lipid modification of G proteins: α subunits are palmitoylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 3675-3679.

Lohka, M.J., Kyes, J.L. y Maller, J.L. (1987). Metaphase protein phosphorylation in *Xenopus laevis* eggs. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 760-768.

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

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

Maller, J.L. (1985). Regulation of amphibian oocyte maturation. *Cell Diff.* **16**: 211-221.

- Maltese, W. y Robishaw, J. (1990) Isoprenylation of C-terminal cysteine in a G-protein γ subunit. *J. Biol. Chem.* 265, 18071-18074.
- Manning, D. y Gilman, A. (1983) The regulatory components of adenylate cyclase and transducin. A family of structurally homologous guanine nucleotide-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 258, 7059-7063.
- Markby, D., Onrust, R. y Bourne, H. (1993) Separate GTP binding and GTPase activating domains of a $G\alpha$ subunit. *Science* 262, 1895-1901.
- Marston, F. (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 240, 1-12.
- Martell, A. y Smith, R. (1974) Critical stability constants. Vol 1, Plenum Press, New York.
- Martin, J. y Doty, D. (1949) Determination of inorganic phosphate. Modification of isobutyl alcohol procedure. *Anal. Chem* 21, 965-967.
- Masters, S., Stroud, R. y Bourne, H. (1986) Family of G protein α chains: amphipatic analysis and predicted structure of functional domains. *Prot. Eng.* 1, 47-54.
- Matsuoka, M., Itoh, H., Kozasa, T. y Kaziro, Y. (1988) Sequence analysis of cDNA and genomic DNA for a putative pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein α subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5384-5388.
- Mattera, R., Codina, J., Kidd, V., Woo, S. y Birnbaumer, L. (1986) Identification by molecular cloning of two forms of the alpha-subunit of the human liver stimulatory (G_s) regulatory component of adenylate cyclase. *FEBS Lett* 206, 36-42.
- Mattera, R., R. Graziano, M., Yatani, A., Zhou, Z., Graf, R., Codina, J., Birnbaumer, L., Gilman, A., y Brown, A. (1989) Splice variants of the α subunit of the G protein G_s activate both adenylate cyclase and Calcium channels. *Science* 243, 804-807.
- May, D. y Ross, E. (1988) Rapid binding of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) to an apparent complex of β -adrenergic receptor and the GTP-binding regulatory protein G_s . *Biochemistry* 27, 4888-4893.
- Mazzoni, M., Malinski, J. y Hamm, H. (1991) Structural analysis of rod GTP-binding protein, G_t . Limited proteolytic digestion pattern of G_t with four proteases defines monoclonal antibody epitope. *J. Biol. Chem.* 266, 14072-14081.
- McConahey, P. y Dixon, F. (1980) Radioiodination of proteins by the use of the chloramine-T method. *Methods Enzymol.* 70, 210-213.

Miller, R., Masters, S., Sullivan, B. y Bourne, H. (1988) A mutation that prevents GTP-dependent activation of the α chain of Gs. *Nature* **334**, 712-715.

Milburn, M., Tong, L., DeVos, A., Brünger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. y Kim, S. (1990) Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras protein. *Science* **247**, 939-945.

Mollner, s. and Pfeuffer, T. (1988) Two different adenylyl cyclases in brain distinguished by monoclonal antibodies. *Eur. J. Biochem.* **171**, 265-271.

Morrison, B., Feltz, S. y Pessin, J. (1989) Polylysine specifically activates the insulin-dependent insulin receptor protein kinase. *J. Biol. Chem.* **264**, 9994-10001.

Mousli, M., Bronner, C., Bueb, J., Tschirhart, E., Gies, J. y Landry, Y. J. (1989) Activation of rat peritoneal mast cells by substance P and Mastoparan. *Pharmacol. Exp. Ther.* **250**, 329-335.

Mousli, M., Bronner, C., Landry, Y., Bockaert, J. y Rouot, B. (1990a) Direct activation of GTP-binding regulatory proteins (G-proteins) by substance P and compound 48/80. *FEBS Lett.* **259**, 260-262.

Mousli, M., Bueb, J., Bronner, Ch. Rouot, B. y Landry, Y. (1990b) G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *Trends. Pharmacol. Sci.* **11**, 358-362.

Mumby, S., Kahn, R., Manning, D. y Gilman, A. (1986) Antisera of designed specificity for subunits of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 265-269.

Mumby, S., Casey, P., Gilman, A., Gutowski, S. y Sternweis, P. (1990) G protein γ subunits contain a 20-carbon isoprenoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 5873-5877.

Münch, G., Dees, Ch., Hekman, M. y Palm, D. (1991) Multisite contacts involved in coupling of the β -adrenergic receptor with the stimulatory guanine-nucleotide-binding regulatory protein. Structural and functional studies by β -receptor-sitespecific synthetic peptides. *Eur. J. Biochem.* **198**, 357-364.

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

Murphy, P. y McDermott, D. (1992) The guanine nucleotide-binding protein Gs activates a novel calcium transporter in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **267**, 883-888.

- Navon, S. y Fung, B. (1984) Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments: mechanism and effects of cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *J. Biol. Chem.* **259**, 6686-6693.
- Neer, E., Lok, J. and Wolf, L. (1984) Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **259**, 14222-14229.
- Neet, K. y Ainslie, R. (1980) Hysteretic enzymes. *Methods in enzymology* Vol. **64**, 192-205, Academic Press, New York.
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y. y Ogata, E. (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G_0 . *Nature* **362**, 75-79.
- Noel, J., Hamm, H. y Sigler, P. (1993) The 2.2Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP- γ -S. *Nature* **366**, 654-663.
- Northup, J., Sternweis, P., Smigel, M., Schleifer, L., Ross, E. y Gilman, G. (1980) Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 6516-6520.
- Northup, J., Smigel, M., Sternweis, P. y Gilman, A. (1983a) The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Resolution of the activated 45,000-Dalton (α) subunit. *J. Biol. Chem.* **258**, 11369-11376.
- Northup, J., Sternweis, P. y Gilman, A. (1983b) The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Resolution, activity, and properties of the 35,000-Dalton (β) subunit. *J. Biol. Chem.* **258**, 11361-11368.
- Nukada, T., Tanabe, T., Takahashi, H., Noda, M., Haga, K., Haga, T., Ichiyama, A., Kangawa, K., Hiranaga, M., Matsuo, H. y Numa, S. (1986) Primary structure of the alpha-subunit of bovine adenylate cyclase inhibiting G-protein deduced from the cDNA sequences. *FEBS Lett.* **197**, 305-310.
- O'Dowd, B., Hnatowich, M., Regan, J., Leader, M., Caron, M. y Lefkowitz, R. (1988) Site-directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human β_2 -adrenergic receptor. Localization of regions involved in G protein-receptor coupling. *J. Biol. Chem.* **263**, 15985-15992.
- Okamoto, K.; Katada, T.; Murayama, Y.; Ui, M.; Ogata, E. and Nishimoto, I. (1990) A simple structure encodes G protein-activating function of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor. *Cell.* **62**, 709-717.
- Okamoto, T., Murayama, Y., Hayashi, Y., Inagaki, M., Ogata, E. y Nishimoto, I. (1991) Identification of G_s activator region of the β_2 -adrenergic receptor that is autoregulated via protein kinase A-dependent phosphorylation. *Cell* **67**, 723-730.

Olate, J.; Allende, C.; Allende, J.; Sekura, R. and Birnbaumer, L. (1984) Oocytes adenylyl cyclase contains Ni, yet guanine nucleotide-dependent inhibition by progesterone is not sensitive to pertussis toxin. FEBS Lett. 175, 25-30.

Olate, J.; Anker, R. and Allende, J. (1985) Treatment of oocyte membranes with 2'-3' dialdehyde of guanosine triphosphate reduces progesterone inhibition of adenylyl cyclase. FEBS Lett. 185, 170-176.

Olate, J. (1985) Participación de las proteínas reguladoras N_s y N_i en la inhibición de la adenililciclase de oocitos de *Xenopus laevis* por la progesterona. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Olate, J., Mattera, R., Codina, J. and Birnbaumer, L. (1988) Reticulocyte Lysates Synthesize an Active α Subunit of the Stimulatory G protein G_s^* . J. Biol. Chem. 263, 10394-10400.

Olate, J.; Jorquera, H.; Purcell, P.; Codina, J.; Birnbaumer, L. and Allende, J. (1989) Molecular cloning and sequence determination of a cDNA coding for the α -subunit of a G_0 -type protein of *Xenopus laevis* oocytes. FEBS Lett. 244, 188-192.

Olate, J., Martinez, S., Purcell, P., Jorquera, H., Codina, J., Birnbaumer, L. y Allende, J. (1990) Molecular cloning and sequence determination of four different cDNA species coding for α -subunits of G proteins from *Xenopus laevis* oocytes. FEBS Lett. 268, 27-31.

Olate, J. y Allende, J. (1991) Structure and function of G proteins. Parmac. Ther. 51, 403-419.

Oñate, A., Herrera, L., Antonelli, M, Birnbaumer, L. y Olate, J. (1992) Detection and quantitation during oogenesis and early embryogenesis by competitive reverse PCR. FEBS Lett. 313, 213-219.

Osawa, S., Dhanasekaran, N., Woon, C. and Johanson, G. (1990) Gai-Gas chimeras define the function of α chain domains in control of G protein activation and $\beta\gamma$ subunit complex interactions. Cell 63, 697-706.

Otte, A., McGrew, L., Olate, J., Nathanson, N., y Moon, R. (1992) Expression and potential functions of G-protein α subunits in embryos of *Xenopus laevis*. Development 116, 141-146.

Pang, I. y Sternweis, P. (1989) Isolation of the α subunits of GTP-binding regulatory proteins by affinity chromatography with immobilized $\beta\gamma$ subunits. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 7814-7818.

Pang, I. y Sternweis, P. (1990) Purification of unique α subunits of GTP-binding regulatory proteins (G proteins) by Affinity Chromatography with immobilized $\beta\gamma$ subunits. J. Biol. Chem. 265, 18707-18712.

- Pay, E., Krengel, U., Petsko, G., Goody, R., Kabsch, W. y Wittinghofer, A. (1990) Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* **9**, 2351-2359.
- Perara, E., Rothman, R. y Vishwanath, R. (1986) Uncoupling translocation from translation: implications for transport of proteins across membranes. *Science* **232**, 348-352.
- Pfeuffer, E., Mollner, S. y Pfeuffer, T. (1991) Purification of adenylyl cyclase from heart and brain. *Methods Enzymol.* **195**, 83-91.
- Pfeuffer, T. y Metzger, H. (1982) 7-O-Hemisuccinyl-deacetyl forskolin-sepharose: a novel affinity support for purification of adenylate cyclase. *FEBS Lett.* **146**, 369-375.
- Phillips, W. y Cerione, R. (1988) The intrinsic fluorescence of the α subunit of transducin. Measurement of receptor-dependent guanine nucleotide exchange. *J. Biol. Chem.* **263**, 15498-15505.
- Premont, R., Chen, J., Ma, H., Ponnappalli, M. y Iyengar, R. (1992) Two members of a widely expressed subfamily of hormone-stimulated adenylylcyclases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 9809-9813.
- Pronin A. y Gautam, N. (1992) Interaction between G-protein β and γ subunit types is selective. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 6220-6224.
- Quan, F., Wolfgang, W. y Forte, M. (1989) The *drosophila* gene coding for the α subunit of a stimulatory G protein is preferentially expressed in the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 4321-4325.
- Quan, F. y Forte, M. (1990) Two forms of *Drosophila melanogaster* G_{50} are produced by alternate splicing involving an unusual splice site. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 910-917.
- Quan, F., Thomas, L. y Forte, M. (1991) *Drosophila* stimulatory G protein α subunit activates mammalian receptors: implications for receptor-G protein interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 1898-1902.
- Quinton, P. y Philpott, C. (1973) A role for anionic sites in epithelial architecture. Effects of cationic polymers on cell membrane structure. *J. Cell Biol.* **56**, 787-796.
- Ransnäs, L., Svoboda, P., Jasper, J. y Insel, P. (1989) Stimulation of β -adrenergic receptors of S49 lymphoma cells redistributes the α subunit of the stimulatory G protein between cytosol and membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 7900-7903.
- Rarick, H., Artemyev, N. y Hamm, H. (1992) A site on rod G protein α subunit that mediated effector activation. *Science* **256**, 1031-1033.

Robishaw, J., Russell, D., Harris, B., Smigel, M. y Gilman, A. (1986) Deduced primary structure of the α subunit of the GTP-binding stimulatory protein of adenylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 1251-1255.

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

Sadler, S.E. y Maller, J.E. (1981). Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes. J. Biol. Chem. 256, 6368-6373.

Sadler, S.E. y Maller, J.E. (1982). Identification of a steroid receptor on the surface of *Xenopus* oocytes by photoaffinity labeling. J. Biol. Chem. 257, 355-361.

Sadler, S., Maller, J. y Cooper, D. (1984) Progesterone inhibition of *Xenopus laevis* oocyte adenylate cyclase is not mediated via the *Bordetella pertussis* toxin substrate. Mol. Pharmacol. 26, 526-531.

Salomon, Y., Londos, C. Y Rodbell, M. (1974) A highly sensitive adenylate cyclase assay. Anal. Biochem. 58, 541-548.

Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).

Sandford, J., Codina, J. y Birnbaumer, L. (1991) γ -subunits of G proteins, but not their α - or β -subunits, are polyisoprenylated. Studies on post-translational, modifications using *in vitro* translation with rabbit reticulocyte lysates. J. Biol. Chem. 266, 9570-9579.

Sanger, F. y Coulson, A. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J. Mol. Biol. 94, 441-448.

Santos, E., Nebreda, A., Bryan, T. y Kempner, E. (1988) Oligomeric structure of p21 ras proteins as determined by radiation inactivation. J. Biol. Chem. 263, 9853-9858.

Schubert, B., Van Dongen, A., Kirsch, G. y Brown, A. (1989) β -adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G-protein pathway. Science 245, 516-519.

Schindler, M., Koppel, D. y Sheetz, M. (1980) Modulation of membrane protein lateral mobility by polyphosphates and polyamines. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 1457-1461.

Schmidt, C., Thomas, T., Levine, M. y Neer, E. (1992) Specificity of G protein β and γ subunit interactions. J. Biol. Chem. 267, 13807-13810.

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

Seamon, K., y Daly, J. (1983) Forskolin, cyclic AMP and cellular physiology. *Trends. Pharmacol. Sci.* 4, 120-123.

Segal, I. (1975) En "Enzyme kinetics" (Wiley and Sons, Inc. eds.). Wiley Interscience Publication. New York.

Senogles, S., Spiegel, A., Padrell, E., Iyengar, R. y Caron, M. (1990) Specificity of receptor-Gprotein interactions. Discrimination of Gi subtypes by the D₂ dopamine receptor in a reconstituted system. *J. Biol. Chem.* 265, 4507-4514.

Shenker, A., Goldsmith, P., Unson, C. y Spiegel, A. (1991) The G protein coupled to the thromboxane A₂ receptor in human platelets is a member of the novel G_q family. *J. Biol. Chem.* 266, 9309-9313.

Siciliano, S., Rollins, T., DeMartino, J., Konteatis, Z., Malkowitz, L., Van Riper, G., Bondy, S., Rosen, H. y Springer, M. (1994) Two-site binding of C5a by its receptor: an alternative binding paradigm for G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 1214-1218.

Simon, M., Strathmann, M. y Gautam, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-808.

Simonds, W., Goldsmith, P., Codina, J., Unson, C. y Spiegel, A. (1989) G₁₂ mediated α_2 -adrenergic inhibition of adenylylcyclase in platelet membranes: *in situ* identification with G_q C-terminal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7809-7813.

Smigel, M. (1986) Purification of the catalyst of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem* 261, 1976-1982.

Smith, L.D. (1989). The induction of oocyte maturation: transmembrane signalling events and regulation of the cell cycle. *Development* 107, 685-699.

Somkuti, S., Hildebrand, J., Herber, J. y Iyengar, R. (1982) Divalent cation regulation of adenylyl cyclase. An allosteric site on the catalytic component. *J. Biol. Chem.* 257, 6387-6393.

Sternweis, P. Northup, J. Smigel, M. y Gilman, A. (1981) The regulatory component of adenylate cyclase. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 256, 11517-11526.

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

- Sternweis P. y Robishaw, J. (1984) Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J. Biol. Chem.* **259**, 13806-13813.
- Storer, A. y Cornish-Bowden, A. (1976) Concentration of Mg ATP and other ions in solution. Calculation of the true concentrations of the species present in mixtures of associating ions. *Biochem. J.* **159**, 1-5.
- Strader, C., Dixon, R., Cheung, A., Candelore, M. Blake, A. y Sigal, I. (1987) Mutations that uncouple the β -adrenergic receptor from Gs and increase agonist affinity. *J. Biol. Chem.* **262**, 16439-16443.
- Strader, C., Sigal, I. y Dixon, R. (1989) Structural basis of β -adrenergic receptor function. *FASEB J.* **3**, 1825-1832.
- Strathmann, M. y Simon, M. (1990) G protein diversity: A distinct class of α subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 9113-9117.
- Strittmatter, S., Valenzuela, S., Sudo, Y., Linder, M. y Fishman, M. (1991) An intra cellular guanine nucleotide release protein for Go. GAP 43 stimulates isolated α subunits by a novel mechanism. *J. Biol. Chem.* **266**, 22465-22471.
- Strittmatter, S., Cannon, S., Ross, E., Higashijima, T. y Fishman, M. (1993) GAP-43 augments G protein-coupled receptor transduction in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 5327-5331.
- Studier, F. and Moffat, B. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Suki, W., Abramowitz, J., Mattera, R., Codina, J. y Birnbaumer, L. (1987) The human genomes encodes at least three non-allelic G proteins with α_i -type subunits. *FEBS Lett* **220**, 187-192.
- Sullivan, K., Liao, Y., Alborzi, A., Beiderman, B., Chang, F., Masters, S., Levinson, A. y Bourne, H. (1986) Inhibitory and stimulatory G proteins of adenylate cyclase: cDNA and amino acid sequences of the α chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 6687-6691.
- Sullivan, K., Miller, T., Masters, S., Beiderman, B., Heideman, W. y Bourne, H. (1987) Identification of receptor contact site involved in receptor-G protein coupling. *Nature* **330**, 758-760.
- Sunyer, T., Codina, J. y Birnbaumer, L. (1984) GTP hydrolysis by pure N_i , the inhibitory regulatory component of adenyl cyclases. *J. Biol. Chem.* **259**, 15447-15451.

- Tabor, S. y Richardson, C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 4767-4771.
- Tang, W., Krupinski, J. y Gilman, A. (1991) Expression and characterization of calmodulin-activated (type I) adenylylcyclase. *J. Biol. Chem.* **266**, 8595-8603.
- Tang, W. y Gilman, A. (1991) Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Science* **254**, 1500-1503.
- Tang, W. y Gilman, A. (1992) Adenylyl Cyclases. *Cell* **70**, 869-872.
- Taussig, R., Iñiguez-Lluhi, J. y Gilman, A. (1993a) Inhibition of adenylyl cyclase by G_{i0} . *Science* **261**, 218-221.
- Taussig, R., Quarmby, L. y Gilman, A. (1993b) Regulation of purified type I and type II adenylylcyclases by G protein $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.* **268**, 9-12.
- Taylor, C. (1990) The role of G protein in transmembrane signalling. *Biochem. J.* **272**, 1-13.
- Tota, M., Kahaler, K. y Schimerlik, M. (1987) Reconstitution of the purified porcine atrial muscarinic acetylcholine receptor with purified porcine atrial inhibitory guanine nucleotide binding protein. *Biochemistry* **26**, 8175-8182.
- Treacy, M., Nelson, L., Turner, E., He, X. y Rosenfeld, M. (1992) Twin of I-POU: a two amino acid difference in the I-POU homeodomain distinguishes an activator from an inhibitor of transcription. *Cell* **68**, 491-505.
- Uhing, R., Polakis, P. y Snyderman, R. (1987) Isolation of GTP-binding proteins from Myeloid HL-60 cells. Identification of two pertussis toxin substrates. *J. Biol. Chem.* **262**, 15575-15579.
- Van Dop, C., Tsubokawa, M., Bourne, H. and Ramachandran, J. (1984a) Amino acid sequence of retinal transducin at the site ADP-ribosylated by cholera toxin. *J. Biol. Chem.* **259**, 696-698.
- Van Dop, C., Yamanaka, G., Steinberg, F., Sekura, R., Manclark C., Stryer, L. and Bourne, H. (1984b) ADP-ribosylation of transducin by Pertussis toxin blocks the light-stimulated hydrolyses of GTP and cGMP in retinal photoreceptors. *J. Biol. Chem.* **259**, 23-26.
- Van Meurs, K., Angus, W., Lavu, S., Kung, H., Czarnecki, S., Moss, J. y Vaughan, M. (1987) Deduced amino acid sequence of bovine retinal G_{00} : similarities to other guanine nucleotide-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3107-3111.

von Weizsäcker, E., Strathmann, M. y Simon, M. (1992) Diversity among the beta subunits of heterotrimeric GTP-binding proteins: characterization of a novel beta-subunit cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 350-356.

Voss, T., Wallner, E., Czernilofosky, A. y Freissmuth, M. (1993) Amphipatic α -helical structure does not predict the ability of receptor-derived synthetic peptides to interact with guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 4637-4642.

Wahli, W. y Martínez, E. (1991). Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. *FASEB J.* **5**, 2243-2249.

Walseth, T. y Johnson, R. (1979) The enzymatic preparation of 32 -P nucleoside triphosphates, cyclic 32 -P AMP, and cyclic 32 -P GMP. *Biochim. Biophys. Acta* **562**, 11-31.

Wedegaertner, P., Chu, D., Wilson, P., Levis, M. y Bourne, H. Palmitoylation is required for signaling functions and membrane. Attachment of G α and G β . *J. Biol. Chem.* **268**, 25001-25008.

Weingarten, R., Ransnäs, L., Mueller, H., Sklar, L., y Bokoch, G. (1990) Mastoparan interacts with the carboxyl terminus of the α subunit of Gi. *J. Biol. Chem.* **265**, 11044-11049.

Weiss, L. (1970) The cell periphery. *Int. Rev. Cytol.* **26**, 63-105.

West, R., Moss, J., Vaughn, M., Liu, T. and Liu, T. (1985) Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *J. Biol. Chem.* **260**, 14428-14430.

Winslow, J. Van Amsterdam, J. y Neer, E. (1986) Conformations of the α_{39} , α_{41} , and $\beta\gamma$ component of brain guanine nucleotide-binding proteins. Analysis by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* **261**, 7571-7579.

Wittinghofer, A. (1994) The structure of transducin G $_{\alpha t}$: more to view than just ras. *Cell* **76**, 202-204.

Wolff, J. and Cook, G. (1975) Charge effects in the activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **250**, 6897-6903.

Wong, S., Parker, E. y Ross, E. (1990) Chimeric muscarinic cholinergic: β -adrenergic receptors that activate G $_s$ in response to muscarinic agonists. *J. Biol. Chem.* **265**, 6219-6224.

Wong, Y., Federman, A., Pace, A., Zachary, I., Evans, T., Pouysségur, J. y Bourne, H. (1991) Mutant α subunits of Gi2 inhibit cyclic AMP accumulation. *Nature* **351**, 63-65.

Wong, Y., Conklin, B. y Bourne, H. (1992) G γ -mediated hormonal inhibition of cyclic AMP accumulation. *Science* **255**, 339-342.

Yatani, A., Imoto, Y., Codina, J., Hamilton, S., Brown, A. y Birnbaumer, L. (1988) The stimulatory G protein os adenylate cyclase, G_s , also stimulates dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels. Evidence for direct regulation independent of phophorylation by cAMP-dependent protein kinase or stimulation by a dihydropyridine agonist. *J. Biol. Chem.* **263**, 9887-9895.

Yatsunami, K., Pandya, B., Oprian, D. y Khorana, G. (1985) cDNA-derived amino acids sequence of the γ subunit of GTPase from bovine rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 1936-1940.

Yoshimura, M., y Cooper, D. (1992) Cloning and expression of a Ca^{2+} -inhibitable adenylyl cyclase from NCB-20 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 6716-6720.