

ACTIVACION E INHIBICION DE UNA FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS  
DE XENOPUS LAEVIS

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias  
Básicas y Farmacéuticas

por

Eugenia María Jedlicki Corbeaux

Junio, 1984

Profesor patrocinante: Dra. Catherine Connelly



FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

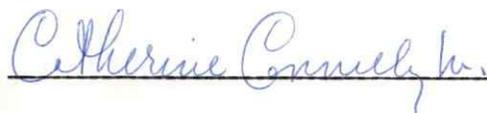
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

Eugenia María Jedlicki Corbeaux

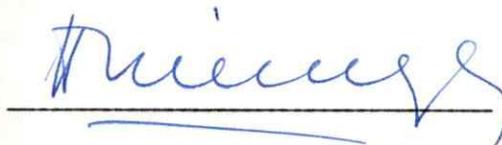
ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 18 de Mayo de 1984.

Patrocinante de Tesis  
Dra. Catherine Connelly

  
\_\_\_\_\_

Comisión Informante de Tesis

Dr. Hermann Niemeyer

  
\_\_\_\_\_

Dr. Osvaldo Alvarez

  
\_\_\_\_\_

Dr. Marco Perreta

  
\_\_\_\_\_

Dr. Mario Sapag-Hagar

  
\_\_\_\_\_



Esta tesis fue realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina (Norte) de la Universidad de Chile, bajo la dirección de la Dra. Catherine Connelly.



A mi Madre y su bondad sin límites

Al recuerdo de un gran hombre, mi Padre

A mis tiernas hijas, Leonora y Marcela



Sobre todas las páginas leídas  
sobre todas las páginas en blanco  
piedra sangre papel o ceniza  
escribo tu nombre

Y por el poder de una palabra  
vuelvo a recomenzar mi vida  
Yo nací para conocerte  
para nombrarte

Libertad.

Paul Eluard.



## AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo, no puedo dejar de expresar mi agradecimiento a las personas que de alguna manera hicieron posible que esta tesis fuera una realidad.

Quiero agradecer a la Dra. Catherine Connelly por su profundo, constante y paciente apoyo científico. Su espíritu crítico y su enriquecedora discusión fueron fundamentales en el desarrollo de mi trabajo. Mi agradecimiento va también a su apoyo en el aspecto humano, tan decisivo en los momentos de desaliento.

Quiero agradecer al Dr. Jorge Allende por darme la oportunidad de ingresar a su laboratorio cuando regresé a Chile. Por enseñarme a ser perseverante cuando los experimentos fallaban. Su razonamiento rico en conocimientos y lógica han sido de gran valor en mi formación científica.

Quiero agradecer a Omar Orellana por su crítica, a veces "despiadada" pero honesta y acertada, en nuestras largas discusiones científicas y humanas. A todos los miembros del laboratorio por los gratos momentos pasados juntos.

Quiero agradecer a todos mis Amigos, aquéllos que con su cariño y comprensión me ayudaron a superar momentos difíciles.

Quiero agradecer a la Dra. Claude Klee por su generosa acogida en Bethesda, MD. Los experimentos realizados bajo su

dirección fueron fundamentales para comprender lo que en ese entonces parecía tan complicado.

Quiero agradecer a Maruja Plaza y su valiosa ayuda en las "preparaciones masivas" y tantos otros experimentos.

Quiero agradecer a la Dra. Carmen González por la dedicación brindada a la revisión de este manuscrito. A la Sra. Erica Johanssen por su meticulosidad y generosa disponibilidad en la corrección de la transcripción de él.

Quiero agradecer a José Mondaca por el esmero con que confeccionó cada una de las figuras de esta tesis.

## INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS .....	xi
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS .....	xii
ABREVIATURAS .....	xiv
LISTA DE AMORTIGUADORES .....	xv
RESUMEN .....	xvi
ABSTRACT .....	xix
INTRODUCCION .....	1
A. MADURACION MEIOTICA DE OOCITOS DE ANFIBIO .....	1
1. Aspectos generales.....	1
2. Relación entre cAMP y maduración meiótica.....	3
3. Relación entre iones $Ca^{2+}$ y maduración meiótica.....	4
B. CARACTERISTICAS DE LA FOSFODIESTERASA DEPENDIENTE DE CALMODULINA Y $Ca^{2+}$ .....	5
1. Activación de la fosfodiesterasa por calmodulina y $Ca^{2+}$ ....	6
2. Activación de la fosfodiesterasa por lípidos y tratamiento con tripsina.....	8
C. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA CALMODULINA .....	10
1. Estructura de la calmodulina.....	10
2. Localización subcelular y regulación de niveles de calmodulina.....	15
3. Unión de $Ca^{2+}$ a calmodulina e interacción con proteínas....	16
4. Inhibición de calmodulina por drogas antisicóticas.....	19
5. Inhibidores proteicos de calmodulina.....	20
a. Interacciones proteína-proteína: un mecanismo de inhibición.....	20
b. Inhibición de calmodulina por diferentes péptidos y proteínas.....	22
D. OBJETIVOS DE LA TESIS .....	27

MATERIALES Y METODOS .....	29
1. ANIMALES Y REACTIVOS .....	29
2. METODOS GENERALES .....	30
a. Determinación de proteínas.....	30
b. Filtración en geles de sefadex.....	31
c. Electroforesis en geles desnaturantes, tinción de proteínas por técnica del nitrato de plata.....	31
d. Preparación de homogeneizado de núcleos.....	32
3. ENSAYOS ENZIMATICOS Y DE LA PROTEINA INHIBITORIA .....	33
a. Ensayo de actividad de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos.....	33
b. Ensayo de actividad de la quinasa de la cadena liviana de la miosina de músculo liso.....	35
c. Ensayo de actividad de la proteína inhibitoria.....	36
4. PREPARACION DE FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS DE OVARIO DE <u>XENOPUS LAEVIS</u> .....	36
a. Preparación del extracto.....	37
b. Cromatografía en DEAE-celulosa.....	37
c. Cromatografía de afinidad en columna de calmodulina-sefarosa.....	38
d. Tratamiento de fosfodiesterasa I con tripsina.....	40
5. CALMODULINA: PREPARACION, PURIFICACION Y DETERMINACION CUANTITATIVA .....	40
a. Preparación de los extractos.....	40
b. Preparación y tratamiento del polvo cetónico.....	41
c. Cromatografía de afinidad en columna de CAPP-Affigel 10....	41
d. Electroforesis en geles de poliácridamida.....	42
e. Determinación cuantitativa.....	45
RESULTADOS .....	48
I. EFECTO DE AGENTES ACTIVADORES SOBRE LA FOSFODIESTERASA I DE OVARIO DE <u>XENOPUS LAEVIS</u> .....	48
A. CALMODULINA DE OVARIO DE <u>XENOPUS LAEVIS</u> .....	48
1. Identificación, purificación y determinación cuantitativa.....	48
2. Efecto de la concentración de iones $Ca^{2+}$ en la activación de fosfodiesterasa I por calmodulina.....	53
3. Agentes que alteran el efecto de calmodulina.....	55
a. Derivados de fenotiazina.....	55
b. Melitina.....	59

B. FOSFOLIPIDOS .....	59
1. Características generales de la activación.....	59
a. Especificidad.....	59
b. Efecto de la concentración de lisofosfatidilcolina sobre la activación de fosfodiesterasa I nativa y fosfodiesterasa I tripsinizada.....	65
2. Acción de derivados de fenotiazina sobre la activación de fosfodiesterasa I por lisofosfatidilcolina.....	68
II. UNA PROTEINA DE OVARIO DE <u>XENOPUS LAEVIS</u> CON CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA FOSFODIESTERASA I ACTIVADA POR DIFERENTES COMPUESTOS .....	71
1. Preparación de la proteína inhibitoria.....	71
2. Características generales de la proteína inhibitoria.....	74
a. Pruebas de su carácter proteico.....	74
b. Determinación de su peso molecular y estructura.....	76
c. Especificidad de la inhibición.....	80
d. Interacción entre la proteína inhibitoria y la calmodulina.....	87
3. Caracterización adicional de la inhibición de fosfodiesterasa I activada por calmodulina o lisofosfatidilcolina.....	87
a. Dependencia de la concentración de la proteína inhibitoria.....	90
b. Desplazamiento de la inhibición por aumento de la concentración del agente activante.....	93
c. Efecto de la proteína inhibitoria sobre los pará- metros cinéticos de la fosfodiesterasa I activada por calmodulina y lisofosfatidilcolina.....	96
d. Efecto de la preincubación de fosfodiesterasa I con varios componentes que regulan su actividad.....	102
4. Caracterización de la inhibición de fosfodiesterasa I activada por tratamiento con tripsina.....	105
a. Influencia del grado de tripsinización de fosfo- diesterasa I en su capacidad para ser inhibida por la proteína inhibitoria.....	105
b. Reversión por calmodulina de la inhibición de la fosfodiesterasa I activada por tripsinización.....	107
c. Interacción entre fosfodiesterasa parcialmente tripsinizada y proteína inhibitoria.....	107

DISCUSION .....	112
CALMODULINA DE OVARIO DE <u>XENOPUS LAEVIS</u> COMO AGENTE ACTIVANTE DE FOSFODIESTERASA I .....	112
FOSFOLIPIDOS COMO AGENTES ACTIVANTES DE FOSFODIESTERASA I .....	116
INHIBICION DE LA ACTIVACION DE FOSFODIESTERASA I POR UNA PROTEINA INHIBITORIA PRESENTE EN OVARIO DE <u>XENOPUS LAEVIS</u> . POSIBLE MECANISMO DE ACCION .....	120
CONCLUSIONES Y PROYECCIONES DEL TRABAJO REALIZADO .....	130
BIBLIOGRAFIA .....	134

\* \* \* \* \*

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
TABLA I.	Procesos celulares y proteínas reguladas por calmodulina.....	12
TABLA II.	Activación de fosfodiesterasa I por diferentes lípidos.....	62
TABLA III.	Características de la activación de fosfodiesterasa I por lisofosfatidilcolina.....	64
TABLA IV.	Efecto de la concentración de lisofosfatidilcolina sobre fosfodiesterasa I tripsinizada.....	69
TABLA V.	Sensibilidad del inhibidor a enzimas hidrolíticas.....	75
TABLA VI.	Actividad inhibitoria frente a diversas formas de fosfodiesterasa.....	83
TABLA VII.	Actividad inhibitoria frente a diversos agentes activantes.....	84
TABLA VIII.	La quinasa de la cadena liviana de la miosina activada por calmodulina es inhibida por la proteína inhibitoria.....	86
TABLA IX.	Efecto de la proteína inhibitoria sobre las constantes cinéticas de la fosfodiesterasa I activada por calmodulina y lisofosfatidilcolina.....	101
TABLA X.	Efecto de la preincubación de la fosfodiesterasa I con varios componentes que regulan su actividad.....	103
TABLA XI.	Influencia del grado de tripsinización de fosfodiesterasa I en su capacidad para ser inhibida por la proteína inhibitoria.....	106
TABLA XII.	Reversión por calmodulina de la inhibición de la fosfodiesterasa I activada por tripsinización.....	108

\* \* \* \* \*

## LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

		Pág.
Esquema I.	Mecanismo de activación de la fosfodiesterasa por calmodulina, fosfolípidos y tratamiento con proteasas.....	11
Esquema II.	Representación esquemática del mecanismo "flip-flop" de las citocalbinas.....	25
Esquema III.	Mecanismo de activación de la fosfodiesterasa I por calmodulina, fosfolípidos y tratamiento con tripsina. Efecto de la proteína inhibitoria sobre estas activaciones.....	128
Figura 1.	Secuencia aminoacídica de la calmodulina de cerebro de bovino.....	14
Figura 2.	Cromatografía de afinidad de calmodulina de ovario en columna de CAPP-Affigel 10.....	43
Figura 3.	Determinación cuantitativa de calmodulina por medición de la activación de fosfodiesterasa I.....	46
Figura 4.	Activación de fosfodiesterasa I por extracto total de ovario y por extracto de núcleos.....	49
Figura 5.	Electroforesis de un extracto de ovario y medición de actividad estimulante de fosfodiesterasa en las diversas fracciones.....	52
Figura 6.	Activación de fosfodiesterasa I por calmodulina purificada de ovario.....	54
Figura 7.	Efecto de iones $Ca^{2+}$ en la actividad fosfodiesterásica activada por calmodulina.....	56
Figura 8.	Antagonismo de derivados de fenotiazina sobre la actividad de fosfodiesterasa I activada por calmodulina de cerebro de bovino y de ovario de <u>Xenopus laevis</u> .....	57

Figura 9.	Inhibición por melitina de la fosfodiesterasa I activada por calmodulina.....	60
Figura 10.	Efecto de la concentración de lisofosfatidilcolina sobre la actividad de fosfodiesterasa I.....	66
Figura 11.	Acción de derivados de fenotiazina sobre la activación de fosfodiesterasa I por lisofosfatidilcolina..	70
Figura 12.	Separación de la proteína inhibitoria de las actividades fosfodiesterásicas por cromatografía en columna de DEAE-celulosa.....	72
Figura 13.	Filtración de la proteína inhibitoria en gel de Sefacril S-200.....	77
Figura 14.	Determinación del peso molecular relativo de la proteína inhibitoria.....	78
Figura 15.	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS...	81
Figura 16.	Retención de la proteína inhibitoria en columna de afinidad de CaM-Sefarosa.....	88
Figura 17.	Efecto de la proteína inhibitoria sobre la activación de fosfodiesterasa I por calmodulina y lisofosfatidilcolina.....	91
Figura 18.	Desplazamiento de la inhibición por aumento de la concentración del agente activador.....	94
Figura 19.	Gráfico de dobles recíprocos para la activación de fosfodiesterasa I por calmodulina y su inhibición por la proteína inhibitoria.....	97
Figura 20.	Gráfico de dobles recíprocos para la activación de fosfodiesterasa I por lisofosfatidilcolina y su inhibición por la proteína inhibitoria.....	99
Figura 21.	Curva de progreso de la reacción de la fosfodiesterasa.....	104
Figura 22.	Cromatografía de afinidad de fosfodiesterasa tripsinizada en presencia y ausencia de proteína inhibitoria.....	109

\* \* \* \* \*

## ABREVIATURAS

ATPasa	: ATP fosfohidrolasa
CaM	: calmodulina
CAPP	: 2 Cl-10(3-aminopropil) fenotiazina
DEAE	: dietilaminoetil
DTT	: ditioneitol
EDTA	: etilendiamino-tetraacetato
EGTA	: etilenglicol-bis( -amino etil)N,N'-tetraacetato
FDE	: fosfodiesterasa
Hepes	: ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2 etanol sulfónico.
PPO	: 2,5-difeniloxazol
POPOP	: 1,4-bis-2-(5 feniloxazol)
PMSF	: fluoruro de fenil metil sulfonilo
PI	: proteína inhibitoria
SDS	: dodecil sulfato de sodio
TCA	: ácido tricloroacético
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminometano

## LISTA DE AMORTIGUADORES

- Amortiguador A : Hepes, 10 mM pH 7,5; MgCl<sub>2</sub>, 5 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol, 3 mM; EDTA, 0,1 mM y EGTA, 0,1 mM.
- Amortiguador B : Hepes, 50 mM pH 8,0; MgCl<sub>2</sub>, 5 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol, 3 mM; EDTA, 0,1 mM y EGTA, 0,1 mM.
- Amortiguador C : Tris-HCl, 40 mM pH 7,5; NaCl, 50 mM; CaCl<sub>2</sub>, 0,2 mM; MgCl<sub>2</sub>, 3 mM y DTT, 0,1 mM.
- Amortiguador C' : Tris-HCl, 40 mM pH 7,5; NaCl, 0,2 M; CaCl<sub>2</sub>, 0,2 mM; MgCl<sub>2</sub>, 3 mM y DTT, 0,1 mM.
- Amortiguador D : Tris-HCl, 40 mM pH 7,5; NaCl, 0,2 M; MgCl<sub>2</sub>, 3 mM; DTT, 0,1 mM y EGTA, 2 mM.
- Amortiguador E : Tris-HCl, 0,02 M pH 7,5; MgCl<sub>2</sub>, 1 mM y NaCl 0,05 M.
- Amortiguador F : Hepes, 40 mM pH 7,5; NaCl, 50 mM; DTT, 0,5 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1 mM y CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM.
- Amortiguador F' : Hepes, 40 mM pH 7,5; NaCl, 50 mM; DTT, 0,5 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1 mM; CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM y NaCl, 0,4 M.
- Amortiguador G : Hepes, 40 mM pH 7,5; NaCl, 0,4 M; DTT, 0,5 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1 mM y EGTA, 2 mM.

## RESUMEN

En esta tesis se estudian diferentes mecanismos de regulación de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos dependiente de calmodulina y  $\text{Ca}^{2+}$  (fosfodiesterasa I) extraída de ovario de Xenopus laevis.

El primer agente activante estudiado ha sido la proteína regulatoria denominada calmodulina. Se ha logrado purificar, a partir de ovario, una proteína que se identifica como calmodulina por sus características de migración electroforética, de activación de la fosfodiesterasa I en una forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y de inhibición de su efecto tanto por derivados de fenotiazina como por un péptido de características anfifílicas como la melitina.

Dentro de los lípidos estudiados como posibles agentes activantes, sólo lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina son capaces de provocar una activación igual o incluso superior a la provocada por calmodulina y  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la fosfodiesterasa I. Esta activación es independiente de la presencia de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . La activación de la enzima por fosfolípidos es abolida por uno sólo de los dos derivados de fenotiazina empleados.

Tanto el complejo calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$  como la lisofosfatidilcolina activan la enzima provocando un aumento en la  $V_{\text{max}}$  de la reacción, sin cambiar significativamente la  $K_m$  aparente.

Los efectos activantes de calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos no son aditivos a concentraciones saturantes de estos compuestos; lo que sugiere que la fosfodiesterasa I posee un sitio o dos sitios muy cercanos para la interacción con ambos efectores.

Ha sido posible detectar, aislar y purificar hasta aparente homogeneidad, un compuesto que suprime la activación de la fosfodiesterasa I por calmodulina. Este inhibidor es una proteína, presenta un peso molecular relativo de 94.000 y está compuesto aparentemente por dos subunidades de peso molecular 44.000 cada una.

La proteína inhibitoria inhibe la estimulación de la fosfodiesterasa I activada por calmodulina y  $\text{Ca}^{2+}$ , sin afectar ni la actividad basal de la enzima, ni la actividad de la forma enzimática independiente de calmodulina y  $\text{Ca}^{2+}$ .

La proteína inhibitoria inhibe la acción tanto de la calmodulina de cerebro de bovino como la de la calmodulina de ovario. Es además capaz de inhibir otra enzima activable por calmodulina, como la proteína-quinasa de la cadena liviana de la miosina.

La unión de la proteína inhibitoria a una columna de afinidad de calmodulina-sefarosa, la inhibición de más de una enzima activable por calmodulina, y la importancia de la secuencia de adición de los diferentes componentes proteicos en el ensayo para obtener un máximo de inhibición, permiten postular que la inhibición de la acción de calmodulina por la proteína inhibitoria se debería a la formación de un complejo entre ambas proteínas.

La proteína inhibitoria es capaz de antagonizar también la activación de la enzima por lisofosfatidilcolina. Esta inhibición se asemeja a la de calmodulina, en el sentido que ambas son reversibles,

son desplazadas por un aumento de la concentración del agente activante, y en ambas, la acción de la proteína inhibitoria se refleja en una disminución de los valores de  $V_{max}$  de la reacción, obteniéndose valores semejantes a los de la reacción medida en condiciones basales.

La fosfodiesterasa I es susceptible de ser activada por tratamiento controlado con tripsina. La proteína inhibitoria es capaz de antagonizar hasta en un 50% este tipo de activación. La inhibición es revertida por la presencia de calmodulina y calcio en el medio. Los resultados presentados en este trabajo sugieren que la proteína inhibitoria podría unirse a la enzima tripsinizada disminuyendo su actividad.

En resumen, la fosfodiesterasa I de ovario de Xenopus laevis, es capaz de ser activada tanto por calmodulina de cerebro de bovino como por la de ovario de Xenopus laevis, como por ciertos derivados de fosfolípidos y por digestión controlada con tripsina. Una proteína inhibitoria extraída de ovario es capaz de inhibir estas tres activaciones utilizando por lo menos dos mecanismos de acción diferentes.

## ABSTRACT

This thesis comprises a study of the different mechanisms of regulation of the calmodulin and  $\text{Ca}^{2+}$  dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (phosphodiesterase I) obtained from Xenopus laevis ovary.

The regulatory protein calmodulin was the first activating agent considered. A protein purified from ovarian extracts was identified as calmodulin, based on its characteristic behavior on electrophoresis, its capacity to activate phosphodiesterase I in a  $\text{Ca}^{2+}$  dependent manner, as well as its inhibition by phenothiazine derivatives and an amphiphilic type peptide, melittin.

Among the lipids analyzed as possible activating agents, only lysophosphatidyl choline and lysophosphatidyl ethanolamine are able to stimulate phosphodiesterase I equal to or more than calmodulin. This stimulation is independent of the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  ion. The activation of the enzyme by phospholipids is lost upon incubation with only one of two phenothiazine derivatives tested.

Both the calmodulin- $\text{Ca}^{2+}$  complex and lysophosphatidyl choline activate the enzyme by causing an increase in the  $V_{\text{max}}$  of the reaction without changing significantly the apparent  $K_m$ .

The activating effects of calmodulin- $\text{Ca}^{2+}$  and phospholipids are not additive at saturating concentrations of both compounds, suggesting that phosphodiesterase I has one site, or two proximate sites, for

the interaction with both effectors.

An inhibitor of the calmodulin activation of phosphodiesterase I has been isolated and purified. This inhibitor is a protein with a molecular weight of 94,000 and apparently has two subunits, each one of molecular weight 44,000.

The inhibitor protein inhibits the activation of the phosphodiesterase by calmodulin and  $\text{Ca}^{2+}$  without altering either the basal enzyme activity or the activity of an enzyme form which is calmodulin and  $\text{Ca}^{2+}$  independent.

The inhibitor protein blocks the action of bovine brain and ovarian calmodulin. It is also able to inhibit another calmodulin activated enzyme, light chain myosin kinase.

The fact that the inhibitor protein binds to a calmodulin-sepharose affinity column, the inhibition of more than one calmodulin activated enzyme, as well as the importance in the sequence of addition of the different protein compounds in the assay in order to obtain maximum inhibition, permit one to postulate that the inhibition of the calmodulin activity by the inhibitor is due to the formation of a complex between both proteins.

The inhibitor protein is also able to antagonize the activation of the enzyme by lysophosphatidyl choline. This inhibition is similar to that seen with calmodulin, in the sense that both are reversible, both are reverted by an increase in the concentration of the activating agent and, in both cases, the inhibitor protein provokes a decrease in the  $V_{\text{max}}$  of the reaction to the value observed under basal conditions.

Phosphodiesterase I is activated by controlled trypsinization.

The inhibitor protein antagonizes up to 50% of this type of activation, and the inhibition is reverted by the presence of calmodulin and calcium in the reaction mixture. The results suggest that the inhibitor binds to the trypsinized enzyme, lowering its activity.

In summary, phosphodiesterase I from Xenopus laevis ovary is activated by bovine brain calmodulin, by ovarian calmodulin from Xenopus laevis, as well as by some phospholipid derivatives and controlled tryptic digestion. An ovarian protein inhibitor is capable of interfering with these three different forms of activation of the phosphodiesterase by at least two different reaction mechanisms.

## INTRODUCCION

### A. MADURACION MEIOTICA DE OOCITOS DE ANFIBIO

#### 1. Aspectos generales.

Durante el desarrollo larvario del anfibio Xenopus laevis, los oocitos se detienen en la etapa de profase de la primera división meiótica. A medida que el animal se transforma en adulto, los oocitos crecen hasta alcanzar su tamaño máximo conocido como estado VI (Dumont 1972); y estos oocitos avanzan a la metafase de la segunda división meiótica por efecto de hormonas hipofisiarias. Este último proceso se denomina maduración meiótica y consiste en un conjunto de eventos moleculares coordinados que permiten que un oocito se convierta en huevo apto para ser fecundado. La maduración se acompaña normalmente del rompimiento de la vesícula germinal o núcleo (ref. en Masui y Clarke, 1979).

Existe una serie de agentes capaces de inducir la maduración meiótica de oocitos in vitro, siendo las más importantes las hormonas gonadotróficas y las esteroidales.

A pesar de que aún no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual estas hormonas son capaces de inducir la maduración, se ha descrito que los oocitos desprovistos de su capa de células foliculares son capaces de responder a progesterona, pero no a hormonas gonadotróficas. Este resultado y los datos de otros sistemas

sobre los efectos esteroidogénicos de las gonadotrofinas ha permitido postular que estas hormonas provocan en las células foliculares de los anfibios la secreción de una hormona esteroidea, semejante a progesterona, la que sería responsable de desencadenar la maduración del oocito (Schatz y Morrill, 1979).

El mecanismo establecido para la acción de las hormonas esteroideas en otros sistemas consiste esencialmente en la penetración de la hormona a la célula, su unión a un receptor y posterior acción a nivel de la cromatina, regulando así la expresión de ciertos genes (Yamamoto y Alberts, 1976); sin embargo, existe una serie de pruebas que apoyan la hipótesis de que, en oocitos de anfibios, la progesterona tendría su sitio de acción en la membrana plasmática (ref. en Masui y Clarke, 1979; Baulieu y col., 1978; Godeau y col., 1978). Esta hipótesis es apoyada por el descubrimiento reciente de una proteína ubicada en la membrana plasmática de oocitos de Xenopus laevis que podría ser el receptor de esta hormona (Sadler y Maller, 1982).

El hecho de que la hormona esteroidea, que induce la maduración, actúe a nivel de la superficie del oocito, hace necesario postular la presencia de uno o más factores que actúen como mensajeros de la señal hacia el interior de la célula.

Hasta la fecha se ha acumulado una gran cantidad de pruebas que hacen pensar que tanto el cAMP como los iones  $Ca^{2+}$  podrían cumplir la función de segundos mensajeros de la acción hormonal.

## 2. Relación entre cAMP y maduración meiótica.

El cAMP ha sido ampliamente aceptado como segundo mensajero de varias hormonas que actúan a nivel de la membrana plasmática de las células.

Se ha descrito en una serie de sistemas celulares, que los factores que disminuyen los niveles de cAMP intracelulares estimulan la división celular, mientras que los factores que aumentan sus niveles causan una disminución de la actividad mitótica (Friedman y col., 1976).

Existen pruebas experimentales que demuestran que el proceso de división meiótica provocada por agentes que producen la maduración de oocitos de anfibios, va acompañado de una disminución en los niveles de cAMP (Morris y col., 1977; Speaker y col., 1977; Butcher, 1977; Bravo y col., 1978; Maller y col., 1979; Ozon y col., 1979; Schorderet-Slatkine y col., 1982).

La variación de los niveles de cAMP tiene un efecto directo sobre el proceso de maduración de oocitos de anfibio, puesto que se ha demostrado que se inhibe o retarda la maduración de oocitos al provocar un aumento de la concentración de cAMP ya sea en forma directa (Bravo y col., 1978), o indirectamente mediante la inhibición de la actividad fosfodiesterásica (Morris y col., 1977; Bravo y col., 1978), o activación de la adenililciclase (Maller y col., 1979; Ozon y col., 1979; Schorderet-Slatkine y col., 1982).

La variación de los niveles de cAMP tiene un efecto directo en la actividad de las proteína-quinasa dependientes de cAMP, enzimas que están involucradas en el proceso de maduración (Maller y

Krebs, 1977; Houchon y col., 1981).

### 3. Relación entre iones $\text{Ca}^{2+}$ y maduración meiótica.

La presencia intracelular de iones  $\text{Ca}^{2+}$  es esencial en el proceso de maduración de oocitos de anfibios (Ozon y col., 1976; Masui y col., 1977). La concentración total del  $\text{Ca}^{2+}$  interno en el oocito es 10 mM, sin embargo el  $\text{Ca}^{2+}$  libre alcanza sólo niveles de 0,1  $\mu\text{M}$  (ref. en Ozon y col., 1976); por lo tanto, una movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  compartimentalizado podría producir un cambio apreciable de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular. Esta hipótesis de la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  de un compartimiento de almacenamiento hacia uno de  $\text{Ca}^{2+}$  libre como producto de la acción de un agente que provoca la maduración, está apoyada por una serie de pruebas (Schorderet-Slatkine y col., 1976; Schorderet-Slatkine y col., 1977; Dorée y col., 1978; Morrill y col., 1980). En este punto, tiene gran importancia la demostración de un aumento (hasta de diez veces) rápido y transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en oocitos tratados con progesterona (Dorée y col., 1978; Smith y Wasserman, 1979; Wasserman y col., 1980).

Todos estos antecedentes sugieren que el agente inductor de maduración, al interactuar con la membrana plasmática, provoca una movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado hacia el citoplasma. El  $\text{Ca}^{2+}$  libre podría actuar directamente regulando una o más vías metabólicas, o podría unirse a una proteína específica que a su vez sea un modulador. El descubrimiento de la calmodulina (Cheung, 1970; Kakiuchi y Yamazaki, 1970), una proteína con capacidad para regular diversas enzimas cuando se encuentra unida a calcio, hace suponer

que ella podría estar relacionada con la maduración. De hecho, la microinyección de calmodulina y  $\text{Ca}^{2+}$  desencadena la maduración de oocitos de Xenopus laevis (Cartaud y col., 1980; Wasserman y Smith, 1981).

Entre las varias enzimas cuyas actividades son reguladas por el complejo calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$  (CaM- $\text{Ca}^{2+}$ ) se encuentra una de las formas de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, y en algunos tejidos, la adenililciclase, enzimas involucradas en la degradación y en la síntesis del cAMP respectivamente (ref. en Klee y Vanaman, 1982).

De esta manera, a través de la acción regulatoria de la calmodulina, es posible relacionar la acción de los dos posibles segundos mensajeros hormonales: el cAMP y el ion  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### B. CARACTERISTICAS DE LA FOSFODIESTERASA DEPENDIENTE DE CALMODULINA Y $\text{Ca}^{2+}$ .

Se han identificado tres formas moleculares diferentes de fosfodiesterasa en extractos de diversos tejidos de mamíferos; estas formas difieren entre sí en su afinidad y especificidad por el sustrato, así como en otras propiedades (Wells y Hardman, 1977).

La forma de fosfodiesterasa más abundante en los diversos tejidos estudiados es aquella que se designa como de "alta  $K_m$ ", y que cataliza la hidrólisis tanto de cAMP como de cGMP. Esta enzima es activada por el complejo calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$  (Cheung, 1970), y por otros agentes, como se mostrará más adelante. Esta forma enzimática se ha denominado también fosfodiesterasa I.

Otra forma enzimática con actividad fosfodiesterásica es

aquella que se ha denominado de "baja Km"; esta enzima hidroliza específicamente el cAMP, y no es activable por CaM-Ca<sup>2+</sup>. Posiblemente corresponde a una enzima particulada, y se le ha denominado fosfodiesterasa II.

La tercera forma enzimática, corresponde a una actividad fosfodiesterásica capaz de utilizar tanto cAMP como cGMP como sustratos, siendo la hidrólisis de cAMP estimulada alostéricamente por cGMP (Wells y Hardman, 1977).

El estudio de los mapas peptídicos de estas diferentes formas de fosfodiesterasa ha llevado a la conclusión de que se trata de entidades moleculares totalmente diferentes (Takemoto y col., 1982).

Los antecedentes expuestos en la primera parte de este capítulo, que demuestran la participación del cAMP y de iones Ca<sup>2+</sup> en el proceso de maduración meiótica, nos indujeron a estudiar conjuntamente con Omar Orellana y Manuel Echeverría, la forma enzimática dependiente de CaM-Ca<sup>2+</sup>.

#### 1. Activación de la fosfodiesterasa por calmodulina y Ca<sup>2+</sup>.

La fosfodiesterasa I es una enzima soluble ampliamente repartida en diferentes tejidos de vertebrados e invertebrados. La enzima de cerebro de bovino se ha purificado a homogeneidad y se ha demostrado que es un dímero de peso molecular 120.000 compuesto por dos subunidades idénticas de peso molecular alrededor de 60.000. Cada una de estas subunidades uniría una molécula de calmodulina en presencia de Ca<sup>2+</sup> (Klee y col., 1979b; Morril y col., 1979; Sharma y col., 1980).

Esta enzima, en ausencia de calmodulina o calcio, posee una

actividad muy baja y variable; la adición de CaM-Ca<sup>2+</sup> provoca un aumento de la actividad enzimática debido principalmente al incremento en el valor de Vmax (entre 10 y 50 veces), el valor de la Km aparente no varía, o disminuye 2 a 5 veces en algunos casos (Cheung, 1971; Teo y col., 1973; Klee, 1979a).

La activación de la fosfodiesterasa por calmodulina y calcio implicó la formación de un complejo enzima-CaM-Ca<sup>2+</sup> (Richman y Klee, 1978), siendo la constante de afinidad de la enzima por calmodulina entre 10<sup>-9</sup> y 10<sup>-10</sup>M, medida a concentraciones saturantes de Ca<sup>2+</sup> (Klee y col., 1979a; Huang y col., 1981).

Por otra parte, se requerirían 3 a 4 iones Ca<sup>2+</sup> por molécula de calmodulina para obtener la activación de la fosfodiesterasa (Crouch y Klee, 1980; Huang y col., 1981), siendo la constante de activación de la enzima por calcio, en presencia de concentraciones saturantes de calmodulina, de alrededor de 10<sup>-6</sup>M (Cox y col., 1981).

Aunque algunos autores habían informado que el oocito no poseía una forma de fosfodiesterasa capaz de ser estimulada por CaM-Ca<sup>2+</sup> (Mulner y col., 1980), más tarde en nuestro laboratorio se logró detectar esta forma enzimática en oocitos de Xenopus laevis (Echeverría y col., 1981). Posteriormente, Miot y Erneux (1982) confirmaron este hallazgo.

La enzima de oocitos de Xenopus laevis se asemeja a la de cerebro de bovino en varios aspectos. En primer lugar, la enzima de oocito también es un dímero de peso molecular 135.000, constituido por dos subunidades aparentemente iguales de peso molecular aproximado de 66.000 cada una (Orellana y col., 1984). Además, la

fosfodiesterasa de oocitos se une a  $\text{CaM-Ca}^{2+}$  con una constante de afinidad de alrededor de  $10^{-9}\text{M}$  y la activación se traduce en un aumento de alrededor de 6 veces de la  $V_{\text{max}}$  de la reacción, sin variación significativa del valor de la  $K_{\text{m}}$  aparente (Echeverría y col., 1981). En contraposición, experimentos de microinyección de sustratos en el oocito sugieren que la enzima se encontraría inactiva in vivo (Allende y Allende, 1982).

## 2. Activación de la fosfodiesterasa por lípidos y tratamiento con tripsina.

El grado de estimulación de la fosfodiesterasa por  $\text{CaM-Ca}^{2+}$  puede ser también alcanzado por otros agentes, tales como algunos lípidos y también por tratamiento con tripsina, en condiciones controladas.

Ciertos ácidos grasos no saturados y fosfolípidos ácidos son capaces de actuar como activadores de la fosfodiesterasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de cerebro de bovino (Pichard y Cheung, 1977), de cerebro de cerdo (Wolff y Brostrom, 1976), de aorta humana (Hidaka y col., 1978), de cerebro de rata (Gietzen y col., 1982) y de oocitos de Xenopus laevis (Orellana y col., 1984). La fosfodiesterasa de cerebro de rata es también activada por derivados de la vitamina E (Sakai y col., 1977). Como se indicó más arriba, es posible obtener también un incremento de la actividad de esta especie de fosfodiesterasa al someterla a un tratamiento controlado de tripsina. Este aumento de actividad en las fosfodiesterasas de diversos sistemas va acompañado de una disminución del peso molecular de la enzima, de una pérdida de su sensibilidad al complejo  $\text{CaM-Ca}^{2+}$ , y de

un aumento en la velocidad máxima de la reacción (siendo este valor muy semejante al medido en la reacción de activación por CaM-Ca<sup>2+</sup>) (Sakai y col., 1977; Strewler y Manganiello, 1979; Orellana y col., 1981; Tucker y col., 1981; Orellana y col., 1984).

El fenómeno de activación de la fosfodiesterasa por ciertos lípidos y tratamiento con tripsina se hace extensible también a otras enzimas regulables por CaM-Ca<sup>2+</sup>. Así, por ejemplo, tanto la ATPasa del transporte de Ca<sup>2+</sup> como la quinasa de la cadena liviana de la miosina, son enzimas susceptibles de ser activadas por lípidos (Tanaka e Hidaka, 1980; Niggli y col., 1981; Gietzen y col., 1982). Por otra parte, es posible activar por tratamiento con tripsina la quinasa de la cadena liviana de la miosina (Tanaka y col., 1980), la fosforilasa-quinasa (Walch y col., 1980), la Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-ATPasa (Gietzen y col., 1982), la NAD<sup>+</sup>-quinasa (Meijer y Guerrier, 1982) y la proteína fosfatasa 2B (Manalan y Klee, 1983); todas estas enzimas son regulables por calmodulina y calcio.

Estos resultados han llevado a postular que las enzimas que presentan estas propiedades poseen una región de su estructura con características comunes.

Tanto la calmodulina como la mayoría de los activadores de carácter lipídico, pueden considerarse como sustancias anfifílicas aniónicas, es decir, que poseen en su molécula una zona hidrofóbica y otra polar de carga negativa. De aquí entonces que se ha postulado que las enzimas regulables por estos agentes poseen en su estructura una secuencia peptídica con características hidrofóbicas, por una parte, y otra con carga positiva. Esta secuencia peptídica

ejercería una acción inhibitoria sobre este tipo de enzimas y podría ser desplazada en forma reversible por CaM-Ca<sup>2+</sup> o algunos lípidos, o en forma irreversible por tratamiento controlado con tripsina (Klee, 1980; Gietzen y col., 1982) (Esquema I).

### C. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA CALMODULINA

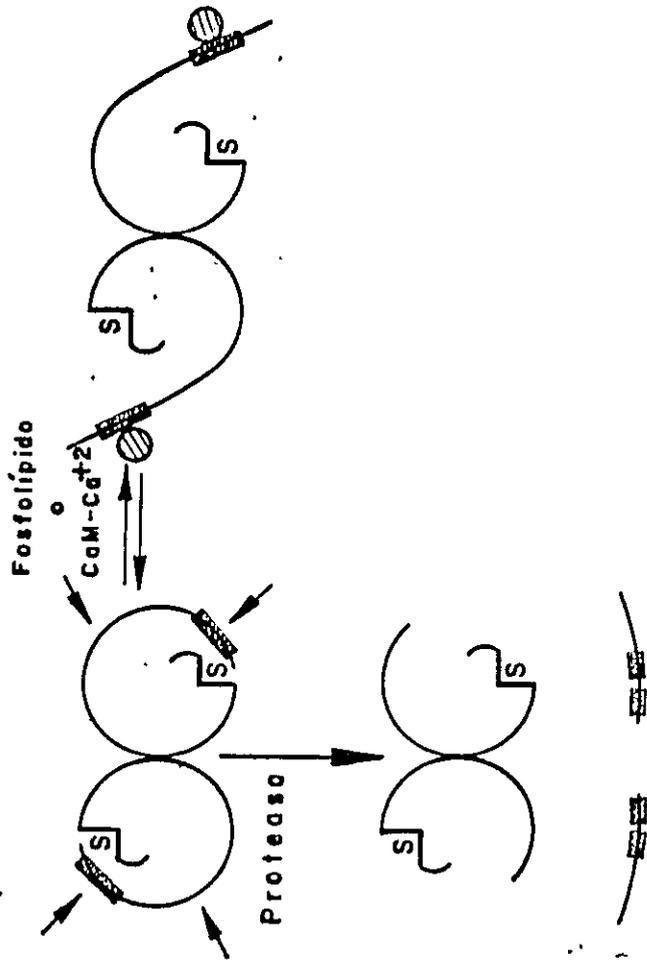
La calmodulina es la proteína más importante entre las que unen Ca<sup>2+</sup> en células no musculares. Inicialmente fue descrita como un factor activante de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de cerebro de bovino (Cheung, 1970), siendo esta activación dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Kakiuchi y Yamazaki, 1970).

El descubrimiento de que el requerimiento de Ca<sup>2+</sup> se debe a la unión de este ion a la calmodulina (Teo y Wang, 1973), condujo a la hipótesis que la calmodulina podría actuar como receptor intracelular del Ca<sup>2+</sup>, ion que se ha postulado como segundo mensajero hormonal. Es así como se ha estudiado esta proteína en una gran variedad de especies, encontrándose que la calmodulina está presente en todos los organismos eucarióticos estudiados, siendo su secuencia aminoacídica altamente conservada en todos ellos. Estos hechos sugieren que esta proteína debe tener un papel fundamental en la función celular. Para revisiones ver: Wolff y Brostrom, 1979; Means y col., 1982; Klee, 1980; Klee y Vanaman, 1982.

En la Tabla I se presenta una serie de procesos celulares en los cuales las enzimas involucradas son regulables por calmodulina.

#### 1. Estructura de la calmodulina.

La calmodulina es una proteína monomérica, termoestable de peso molecular 16.800. Ha sido purificada a homogeneidad a partir



Esquema 1. Mecanismo de activación de la fosfodiesterasa por calmodulina, fosfolípidos y tratamiento con proteasas.

S representa el sustrato de la enzima, el rectángulo punteado el sitio de unión de calmodulina o de fosfolípidos, el círculo achurado la molécula activante. Las flechas muestran los sitios de corte de la proteasa (Orellana, 1983).

Tabla I

Procesos celulares y proteínas reguladas por calmodulina.

Evento celular	Proteína regulada	Tejido
Motilidad celular	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Quinasa de la cadena liviana de la miosina.</li> <li>2. ATPasas del axonema</li> <li>3. Proteínas del citoesqueleto:               <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Microtúbulos (polimerización)</li> <li>b. Caldesmona</li> <li>c. Espectrina</li> </ol> </li> </ol>	<p>músculo, plaqueta, cerebro, riñón extractos ciliares</p> <p>cerebro</p> <p>buche eritrocito</p>
Metabolismo nucleótidos cíclicos.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fosfodiesterasa</li> <li>2. Adenililciclase</li> </ol>	<p>cerebro, tiroides, pulmón, aorta, embrión, parótidas, oocitos anfibios</p> <p>cerebro células gliales médula adrenal islote pancreático</p>
Metabolismo intermediario	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fosforilasa-quinasa</li> <li>2. NAD<sup>+</sup>-quinasa</li> <li>3. Fosfolipasa A<sub>2</sub></li> </ol>	<p>músculo esquelético, hígado</p> <p>semilla de arveja huevo de erizo</p> <p>plaquetas</p>
Sistema de transporte de Ca <sup>2+</sup>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ATPasa de la bomba de Ca<sup>2+</sup> de membrana plasmática</li> <li>2. Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de retículo sarcoplasmático</li> </ol>	<p>eritrocito membrana sináptica membrana adipocito</p> <p>músculo cardíaco</p>
Fosforilación de proteínas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Proteína-quinasa</li> <li>2. Proteína-fosfatasa 2B</li> </ol>	<p>terminales presinápticos</p> <p>músculo esquelético.</p>

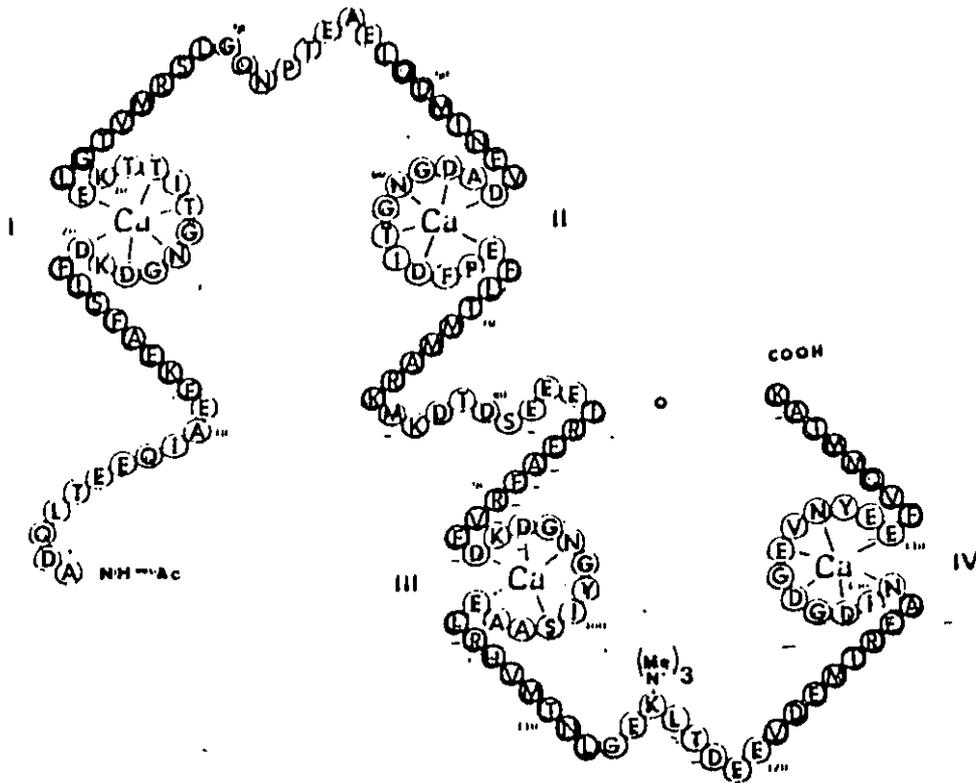
Los datos señalados en esta tabla han sido recopilados de la información presentada en la revisión de C. Klee (1982).

de cerebro de bovino, encontrándose que está compuesta por 148 aminoácidos. La figura 1 muestra la secuencia aminoacídica de esta proteína. La estructura primaria de la calmodulina presenta una serie de características interesantes: el alto contenido de aminoácidos de carácter ácido, el ácido aspártico y el glutámico (alrededor de un 35%); el alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos (alrededor de un 36%), la ausencia de residuos de cisteína y triptófano, y la presencia de una trimetil lisina (en la posición 115 de la secuencia peptídica) (Watterson y col., 1980). El alto contenido de aminoácidos ácidos confiere a la calmodulina un fuerte carácter ácido con un punto isoeléctrico de alrededor de 4 (Klee y col., 1979a).

La estructura secundaria, determinada en ausencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , presenta un contenido de 30-35% de  $\alpha$ -hélice y un 15-20% de estructura  $\beta$ -plisada. Estas características le confieren una estructura globular compacta (Klee, 1977).

Una de las características interesantes de la calmodulina es la de ser altamente conservada en las diferentes especies estudiadas. La proteína purificada de cerebro de bovino presenta una homología superior al 90% con calmodulinas de otros sistemas. Además presenta un gran grado de homología con la troponina C, una proteína que une  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo esquelético (Vanaman, 1980).

Recientemente se ha podido determinar que existe un solo gen que codifica a la calmodulina de cerebro de pollo. Este gen posee por lo menos tres intrones (Putkey y col., 1983).



*Figura 1. Secuencia aminoacídica de la calmodulina de cerebro de bovino.*

Las letras simbolizan los siguientes aminoácidos: A, Ala; D, Asp; E, glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; Y, Tyr.

Se muestran los cuatro sitios de unión a Ca<sup>2+</sup> señalados con números romanos. Los círculos oscuros indican las zonas de  $\alpha$ -hélice. (Tomado de Klee, 1980).

## 2. Localización subcelular y regulación de niveles de calmodulina.

La calmodulina se ha encontrado en los diferentes tejidos estudiados, tanto en fracciones solubles como asociada a fracciones particuladas. La forma particulada se encuentra preferencialmente en microsomas, mitocondrias y fracciones nucleares (Smoake y col., 1974). En tejido nervioso se encuentra, además, asociada a las membranas sinápticas (Egrie y col., 1977).

Utilizando técnicas de inmunocitoquímica analizada al microscopio electrónico, se ha podido describir la presencia de calmodulina en el aparato mitótico, alrededor del centriolo y de los microtúbulos (Means y Dedman, 1980).

En las células que se encuentran en interfase, la calmodulina no está asociada a organelos, en cambio en el período de mitosis, se produce una redistribución de esta proteína, encontrándose principalmente en el aparato centriolar.

En espermatozoides de mamíferos también se ha descrito un cambio en la distribución de la calmodulina ubicada en la cabeza del espermio, luego de la reacción acrosómica (ref. en Klee y Vanaman, 1982).

Se ha podido determinar un aumento de calmodulina que acompaña a una serie de eventos celulares, por ejemplo en células en proceso de diferenciación (Evain y col., 1979), en oocitos de Xenopus laevis en el período de rompimiento de la vesícula germinal (Cartaud y col., 1980), en células transformadas por agentes químicos o por virus (LaPorte y col., 1979).

Se ha observado que algunos sistemas celulares que son

inducidos a crecer a una velocidad mayor que el control, por diferentes mecanismos, muestran un aumento en la concentración de calmodulina citoplasmática con una concomitante disminución de la calmodulina unida a membrana, lo que hace pensar que el traslado de esta proteína de un compartimiento a otro podría ser un mecanismo de regulación de su actividad (ref. en Klee y Vanaman, 1982).

### 3. Unión de $\text{Ca}^{2+}$ a calmodulina e interacción con proteínas.

Se ha postulado que la calmodulina contiene en su estructura cuatro sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , cada uno de los cuales posee dos regiones de  $\alpha$ -hélice separadas por la secuencia de aminoácidos responsable de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos cuatro sitios son similares entre sí, existiendo una mayor analogía entre los sitios I y III, por una parte, y los sitios II y IV, por otra parte (Klee, 1980) (Ver figura 1).

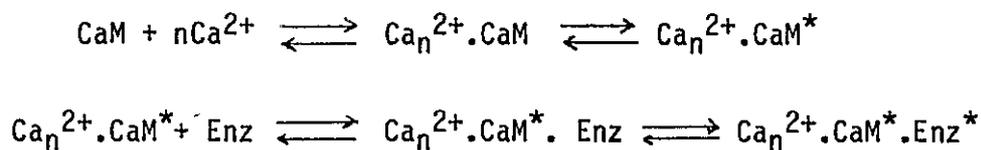
Estos sitios son de alta afinidad, presentando valores de  $K_D$  entre  $10^{-5}$  y  $10^{-7}\text{M}$  (Crouch y Klee, 1980). Existen estudios que indican que los dos sitios ubicados en el péptido amino terminal poseen mayor afinidad que los otros (Delville y col., 1980).

Diferentes estudios basados en mediciones de las perturbaciones de las propiedades espectroscópicas de la calmodulina, han demostrado que la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a la proteína es de naturaleza secuencial (ref. en Klee, 1980; Klee y Vanaman, 1982). Esta unión provoca cambios en la estructura secundaria de la calmodulina, observándose un aumento de un 8 a 10% en el contenido de  $\alpha$ -hélice (Klee, 1977).

La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a la calmodulina es un requisito

indispensable para que ella interactúe con la proteína blanco. Sin embargo, existe una excepción a este fenómeno, y es el caso de la fosforilasa-quinasa. Esta es una enzima compuesta por 4 subunidades, una de las cuales es calmodulina. Esta subunidad permanece unida al resto de las subunidades de la enzima incluso en presencia de EGTA (Cohen y col., 1978).

Se considera que la activación de una enzima regulable por calmodulina transcurre en dos etapas:



El  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la calmodulina formando un complejo ( $\text{Ca}_n^{2+}.\text{CaM}^*$ ) capaz de unirse a una enzima (Enz), y de esta manera activarla ( $\text{Ca}_n^{2+}.\text{CaM}^*.\text{Enz}^*$ ) (Klee y Vanaman, 1982).  $\text{CaM}^*$  y  $\text{Enz}^*$  indican los estados activados de ambas proteínas.

El número de iones  $\text{Ca}^{2+}$  que deben unirse a la calmodulina (n), puede ser inferior a 4, como en el caso de la estimulación de la quinasa de la cadena liviana de la miosina de músculo esquelético (Crouch y col., 1981).

A pesar del gran número de estudios que se han realizado sobre calmodulina, aún no está establecido cual es el sitio o los sitios de la estructura de esta proteína que le permiten interactuar con las proteínas regulables.

Los resultados de los estudios de modificación de aminoácidos en la estructura de la calmodulina tienden a excluir la posibilidad de que esta proteína interactúe con todas las enzimas mediante un

mismo sitio de su estructura (Thiry y col., 1980). Sin embargo, los estudios de inhibición de la capacidad activadora de la calmodulina por diferentes sustancias hidrofóbicas sugieren que la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a la calmodulina genera un sitio de alta hidrofobicidad, que actúa como interfase para las interacciones entre calmodulina y las proteínas (Tanaka e Hidaka, 1980; LaPorte y col., 1980). Esta idea es apoyada por los resultados de experimentos de entrecruzamiento entre calmodulina y el neuropéptido  $\beta$ -endorfina y con un péptido derivado de la  $\beta$ -endorfina que tiene una estructura eminentemente hidrofóbica (Giedroc y col., 1983).

Al enfocar ahora el problema desde el punto de vista de la proteína regulada, se ha podido descartar la hipótesis que las enzimas activables por calmodulina poseen todas una subunidad común (Sharma y col., 1980). Sin embargo, existen pruebas que sugieren que estas enzimas podrían tener una parte de su estructura en común, constituyendo ésta el sitio de interacción con calmodulina. Ha sido posible aislar un anticuerpo monoclonal contra la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina, el cual, además de reconocer esta enzima, reconoce calcineurina y fosforilasa-quinasa, otras dos enzimas activables por  $\text{CaM-Ca}^{2+}$  (Wang y col., 1983). Esta posible región común en las enzimas reguladas por calmodulina tendría también una estructura hidrofóbica, siendo esta condición necesaria pero no suficiente, puesto que además sería importante una región de carácter iónico que rodee la región hidrofóbica, según lo sugieren los resultados de los estudios comparativos de cromatografía de afinidad de enzimas dependientes de calmodulina en columnas de

calmodulina-sefarosa y columnas de fenilsefarosa (Gopalakrishna y Anderson, 1983).

#### 4. Inhibición de calmodulina por drogas antisicóticas.

Al estudiar la influencia de drogas antisicóticas en el metabolismo de los nucleótidos cíclicos, se pudo comprobar que estos agentes son capaces de inhibir tanto la adenililciclase como la fosfodiesterasa (Weiss y Wallace, 1980). Estudios posteriores demostraron que la inhibición de la actividad fosfodiesterásica se limita a aquella forma de la enzima activable por calmodulina. Las concentraciones de la droga necesarias para provocar tal inhibición no tienen efecto sobre la actividad basal de la enzima, hecho que sugiere que el mecanismo de inhibición no sería por interacción de la droga con la enzima (Weiss y col., 1974). La inhibición no se debe tampoco a un efecto de quelación del  $\text{Ca}^{2+}$  por el agente antisicótico, puesto que al aumentar la concentración del ion en el medio no se obtiene reversión de la inhibición (Weiss y col., 1980).

Una de las drogas más estudiadas es la trifluoroperazina; al utilizar este compuesto radiactivo, se pudo demostrar su unión específica a la calmodulina (Levin y Weiss, 1977).

La calmodulina posee sitios de unión tanto de alta afinidad como de baja afinidad para este tipo de drogas. La unión a los sitios de alta afinidad es dependiente de la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y del pH del medio (Levin y Weiss, 1977). Existen entre uno y tres sitios de alta afinidad en calmodulina para las diferentes drogas antisicóticas (Levin y Weiss, 1979), y éstas pueden unirse a la calmodulina aún en presencia de proteínas que se unen a esta

proteína reguladora (Weiss y col., 1980).

Sobre la base de todos estos datos, se ha propuesto un modelo en el cual la droga antisicótica se uniría a la calmodulina en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , impidiendo así su interacción con la enzima regulable (Weiss y col., 1980).

Recientemente se ha descrito la obtención de un complejo covalente entre la calmodulina y un derivado de fenotiazina (droga antisicótica), que es capaz de unirse a dos enzimas regulables por  $\text{CaM-Ca}^{2+}$ , sin que la unión provoque una activación de dichas enzimas. Este resultado sugiere un mecanismo alternativo al propuesto anteriormente, puesto que el complejo calmodulina-agente antisicótico se uniría a la enzima, pero esta interacción no conduciría a una activación de la enzima (Newton y Klee, 1984).

## 5. Inhibidores proteicos de calmodulina.

### a. Interacciones proteína-proteína: un mecanismo de inhibición.

La actividad biológica de las enzimas y de las proteínas en general es regulada a través de una gran variedad de mecanismos, dentro de los cuales se incluye la interacción proteína-proteína. Dicha interacción puede resultar ya sea en activación, o en inhibición de la actividad de la proteína regulable.

Una de las enzimas más importantes dentro del metabolismo celular, cuya actividad es inhibida por este tipo de mecanismo, es la proteína-quinasa, dependiente de cAMP.

La proteína-quinasa dependiente de cAMP es un tetrámero constituido por dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C) (Glass y Krebs, 1980). En ausencia de cAMP, las

subunidades R y C tienen una alta afinidad entre sí, pero en presencia del nucleótido cíclico, esta afinidad disminuye en  $10^4$  veces (Flockhart y Corbin, 1982). En ausencia de cAMP, la subunidad regulatoria ejerce una actividad inhibitoria sobre la subunidad catalítica. El cAMP es capaz de unirse a la subunidad regulatoria, disminuyendo así la afinidad entre las subunidades, lo que se traduce en la disociación de ellas, y recuperación de la actividad catalítica. Este fenómeno queda descrito en la siguiente ecuación (Corbin y col., 1978):



Se ha descrito además la existencia de un inhibidor proteico termoestable de esta proteína-quinasa que aparentemente se une a la enzima (Walsh y col., 1971).

La fosfodiesterasa activable por la luz del sistema de retina, representa también un caso de inhibición por interacción proteína-proteína. Esta enzima, que hidroliza específicamente el cGMP, está compuesta por 3 subunidades: la subunidad  $\alpha$  (88Kd), la  $\beta$  (84Kd) y la  $\gamma$  (11Kd) (Baehr y col., 1979). Esta enzima es capaz de ser estimulada por acción controlada de tripsina (Miki y col., 1975); este hecho hizo suponer la presencia de un inhibidor, el cual fue posteriormente puesto en evidencia (Dumler y Etingof, 1976). Recientemente se ha identificado al inhibidor como la subunidad  $\gamma$  de la enzima. Este péptido es capaz de interactuar con la enzima tripsinizada, uniéndose a ella y provocando la inhibición de su actividad (Hurley y Stryer, 1982).

Se ha encontrado también un inhibidor proteico en el sistema

de ATPasa, tanto para la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática, donde el inhibidor está unido a la membrana (Lotersztajn y Pecker, 1982), como para la  $\text{H}^{+}$ -ATPasa mitocondrial en que el inhibidor es un péptido termoestable y se une al complejo ATPasa en una forma dependiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Frangione y col., 1981; Yamada y col., 1981).

b. Inhibición de calmodulina por diferentes péptidos y proteínas.

Como ha sido expuesto previamente en esta tesis, la calmodulina es una proteína acídica, y por lo tanto se encuentra cargada negativamente a pH fisiológico. Se puede suponer que proteínas de carácter básico, es decir, con carga neta positiva a pH fisiológico, podrán interactuar con la calmodulina. De hecho, se ha encontrado que la activación de la fosfodiesterasa por calmodulina es inhibida por los diferentes tipos de histonas. Esta inhibición también se obtiene con polímeros sintéticos cargados positivamente como poliarginina y polilisina. Estas interacciones son independientes de la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Itano y col., 1980). Se ha demostrado también que la proteína básica de la mielina interactúa con calmodulina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibiendo la activación de la fosfodiesterasa por calmodulina (Grand y Perry, 1979).

Por otra parte, la técnica de "gel overlay" en la cual las proteínas separadas por electroforesis en gel son expuestas a calmodulina marcada con  $^{125}\text{I}$ , ha permitido detectar una gran cantidad de proteínas de diferentes pesos moleculares de varios tejidos, que se unen a calmodulina en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$

(Palfrey y col., 1982).

La característica de basicidad no es la única condición que requiere una proteína para unirse a calmodulina, puesto que existen proteínas básicas que no inhiben la acción de calmodulina.

Otro factor importante que debe considerarse en la interacción de calmodulina con otras proteínas, es la naturaleza hidrofóbica de ellas. Se ha demostrado que neuropéptidos como la  $\beta$ -endorfina y la dinorfina son capaces de bloquear la activación de la fosfodiesterasa por calmodulina, sin alterar la actividad basal de la enzima. Se ha logrado determinar que esta inhibición se debe a la unión de la  $\beta$ -endorfina a la calmodulina en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Sellinger-Barnette y Weiss, 1982).

Estudios de entrecruzamiento del neuropéptido con calmodulina demuestran que las interacciones electrostáticas entre ambos no serían importantes en la formación del complejo. Un péptido derivado de la  $\beta$ -endorfina, formado por 10 aminoácidos, de entre los cuales sólo uno es básico y los nueve restantes tienen carácter hidrofóbico, es capaz de inhibir a la calmodulina (Giedroc y col., 1983).

Se ha sugerido que la calmodulina interactúa con la  $\beta$ -endorfina en el mismo sitio que las enzimas regulables por  $\text{CaM-Ca}^{2+}$ , puesto que la unión entre el neuropéptido y la proteína reguladora es abolida por la presencia de una droga antisicótica, la clorpromazina (Sellinger-Bagnette y Weiss, 1982).

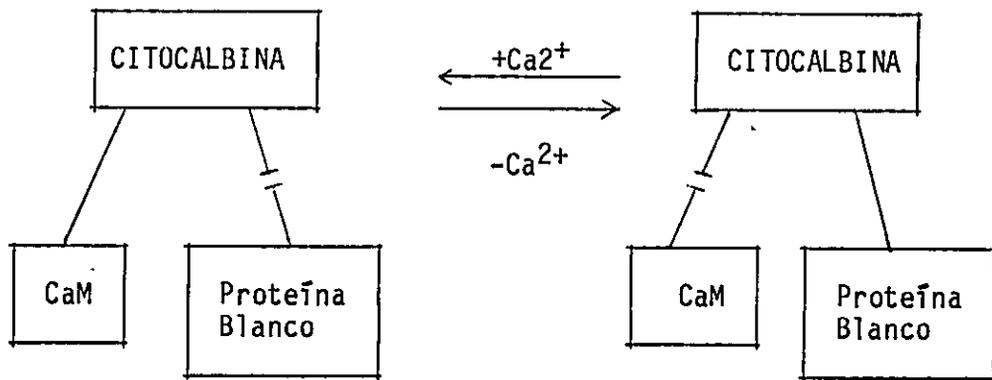
La melitina es un polipéptido tóxico presente en el veneno de la abeja Apis mellifera. Está formado por 26 aminoácidos, de

los cuales 6 poseen carga (+) a pH neutro, y 10 son apolares; lo que le confiere un carácter anfifílico al péptido (Terwilliger y Eisenberg, 1982a). Este polipéptido es capaz de inhibir tanto la activación de la cadena liviana de la miosina (Kato y col., 1982), como la de la fosfodiesterasa de cerebro de bovino (Comte y col., 1983) por calmodulina.

La formación de un complejo equimolar entre la calmodulina y la melitina (Comte y col., 1983) es otra prueba de interacción hidrofóbica, puesto que este péptido adquiere una conformación de  $\alpha$ -hélice de carácter anfifílico al interactuar con superficies hidrofóbicas (Terwilliger y Eisenberg, 1982b).

Existe un grupo de proteínas de carácter neutro o levemente acídicas que también son capaces de unirse a la calmodulina. Se les ha denominado "citocalbinas" (Sobue y col., 1983). En el aparato contráctil y citoesqueleto de células de músculo liso y de tejido no muscular, las citocalbinas son capaces de unirse por una parte a filamentos de F-actina o de tubulina en ausencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , y por otra parte a calmodulina en presencia de estos iones.

La unión de la calmodulina a la citocalbina impide la interacción de esta última con la F-actina o la tubulina (Sobue y col., 1983). A este mecanismo se le ha denominado "flip-flop" (Sobue y col., 1981; Sobue y col., 1983) y se presenta en el esquema II.



Esquema II. Representación esquemática del mecanismo "flip-flop" de las citocalbinas. (Sobue y col., 1983).

Hasta el momento se han aislado 7 citocalbinas de diferentes tejidos y que difieren en su peso molecular (Sobue y col., 1981; Sobue y col., 1983).

De todas las proteínas que se unen a la calmodulina inhibiendo su actividad estimulante, las más estudiadas son las originalmente denominadas CaMBP70 y CaMBP80 (denominación utilizada para las proteínas que unen calmodulina; el subíndice indica el peso molecular aproximado) (Wang y col., 1980).

CaMBP70 es una proteína aislada de cerebro de bovino, termoestable, de peso molecular aproximado 70.000, que inhibe la activación de fosfodiesterasa por calmodulina, por formación de un complejo en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . La actividad basal de la enzima no es afectada por la presencia del inhibidor proteico (Sharma y col., 1978).

CaMBP80 es una proteína aislada también de cerebro de bovino, y a diferencia de CaMBP70, es termolábil. Inhibe específicamente

la activación de la fosfodiesterasa dependiente de CaM-Ca<sup>2+</sup>, sin alterar su actividad basal. Tampoco tiene efecto sobre la forma de fosfodiesterasa independiente de CaM-Ca<sup>2+</sup>, ni sobre la enzima estimulada por tripsinización.

CaMBP<sub>80</sub> se une a calmodulina, formando un complejo en presencia de iones Ca<sup>2+</sup> (Wang y Desai, 1977). Este inhibidor es una proteína globular de peso molecular alrededor de 80.000, que posee dos subunidades: la subunidad A, de peso molecular 60.000; y la subunidad B, de peso molecular 15.000 (Wallace y col., 1978; Klee y Krinks, 1978; Sharma y col., 1979).

Posteriormente, este inhibidor fue designado con el nombre de calcineurina por encontrarse principalmente en cerebro.

La calcineurina A (subunidad A) posee en su estructura el sitio de unión a calmodulina, en cambio, la calcineurina B (subunidad B) contiene los sitios de alta afinidad para Ca<sup>2+</sup>. Ambas subunidades son capaces de interactuar entre ellas en ausencia de Ca<sup>2+</sup> (Klee y col., 1979a).

La calcineurina inhibe la activación de la fosfodiesterasa compitiendo con la enzima por la calmodulina; su efectividad como inhibidor depende del nivel de cAMP, ya que una alta concentración del nucleótido cíclico aumenta la afinidad de la calmodulina por la fosfodiesterasa. (Cheung y col., 1981).

Recientemente se ha encontrado una actividad proteína-fosfatásica dependiente de CaM-Ca<sup>2+</sup> asociada a la calcineurina. Se ha sugerido que la proteína-fosfatasa 2B y calcineurina son una sola entidad (Stewart y col., 1982). Se ha podido determinar

que en la calcineurina A, el sitio de unión a calmodulina es sensible a la acción de tripsina, en cambio el sitio catalítico (actividad fosfatásica) y el de interacción con calcineurina B son resistentes a la proteólisis (Manalan y Klee, 1983).

Todos estos datos sugieren que CaMBP<sub>80</sub> o calcineurina no es un inhibidor fisiológico de calmodulina, sino que por el hecho de ser una proteína regulable por CaM-Ca<sup>2+</sup>, puede competir por la unión a calmodulina, inhibiendo así la activación de otra enzima.

Otra proteína que se une a calmodulina bloqueando la activación de fosfodiesterasa es la denominada CaMBP<sub>7</sub>. Se trata de una proteína de peso molecular aproximado 125.000, compuesta por dos subunidades de peso molecular 60.000. Esta proteína se encuentra en extractos de macrófagos de ratón estimulados por tio-glicolato, y en extractos de una línea celular tipo macrófago de ratón; sin embargo está ausente en una mutante de esta línea celular que es resistente a la acción de trifluoroperazina (Speaker y col., 1983).

#### D. OBJETIVOS DE LA TESIS

Se ha demostrado que la disminución de los niveles de cAMP y la movilización del ión Ca<sup>2+</sup> son esenciales para que ocurra la maduración meiótica. En nuestro laboratorio se ha demostrado que la progesterona es capaz de inhibir la adenililciclase de oocito de Xenopus laevis (Jordana y col., 1982; Jordana y col., 1984), lo que involucra a esta enzima en el mecanismo de acción de la progesterona. Sin embargo, la regulación de la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina

y calcio podría representar un mecanismo alternativo o complementario en el desencadenamiento de la maduración meiótica. La inactividad de esta enzima in vivo y en extractos crudos de ovario planteó la posibilidad de una regulación negativa de esta enzima con posibles implicaciones fisiológicas para el mecanismo de acción de la progesterona.

El objetivo fundamental de esta tesis es el estudio de los agentes implicados en la regulación de la fosfodiesterasa I de Xenopus laevis.

En este trabajo se analizan con detalle los siguientes mecanismos de regulación de esta forma enzimática.

- 1) Activación por calmodulina. Establecer en primer lugar la existencia de esta proteína moduladora de ovario de Xenopus laevis. Caracterizar posteriormente su efecto activante, comparándolo al efecto de calmodulina purificada de cerebro de bovino.
- 2) Activación por lípidos. Estudiar la especificidad y las características de dicha activación.
- 3) Inhibición de la enzima activada. Demostrar la existencia de una proteína inhibitoria de la acción de calmodulina en ovario. Caracterizar su mecanismo de inhibición frente a la enzima activada por diversos agentes.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. ANIMALES Y REACTIVOS

Las hembras adultas de Xenopus laevis se obtienen de South African Snake Farm, Cape Province, R.S.A.. Se mantienen en viveros a 22°, en los cuales se alterna un período de 12 horas de luz con uno de 12 horas de oscuridad.

Los compuestos siguientes se obtienen de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.: Hepes, DTT, EDTA, EGTA,  $\beta$ -Mercaptoetanol, Tris, ATP, cAMP, cGMP, acrilamida, bisacrilamida, TEMED, PPO, POPOP, azul de Coomassie, azul dextrano, PMSF, inhibidor de tripsina de frijol de soya (Tipo 1-S) L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina (de yema de huevo tipo I), L- $\alpha$ -lisofosfatidil-etanolamina (de yema de huevo tipo I), L- $\alpha$ -fosfatidilinositol, ácido oleico, estearato de sodio, linoleato de sodio, estradiol, testosterona, hidrocortisona, melitina, Dowex 1-X4 (malla 100-200), sefarosa (Sepharose) 4B activada con bromuro de cianógeno, seroalbúmina de bovino, y proteínas patrones de electroforesis.

Las enzimas siguientes también se obtienen de Sigma: tripsina (tipo III), quimotripsina (tipo 1-S), subtilisina (tipo VIII), 5'-nucleotidasa de veneno de serpiente (Naja-Naja), fosfolipasa C (tipo XII) de Clostridium perfringens.

Los siguientes isótopos se obtienen de New England Nuclear, Boston, MA, U.S.A.: [2-8<sup>3</sup>H] cAMP (32Ci/mmol), [5-8<sup>3</sup>H] cGMP (34Ci/mmol)

y [ $^3\text{H}$ ]  $\text{H}_2\text{O}$  (0,46 mci/mmol). [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP (10-25 Ci/mmol) se obtiene de ICN, Irvine, CA, U.S.A.

Flufenazina se obtiene de Schering Co., DEAE-celulosa (DE-52 y DE-22) de Whatman Biochemicals, Springfield Mill, Kent, England, metanol de VWR Scientific Inc., San Francisco, CA, U.S.A., glicerol de J.T.Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ, U.S.A. Progesterona y seroalbúmina de bovino se obtienen de Calbiochem-Behring Corp., Kinggrove, Australia. Sefacril (Sephacryl) S-200 superfino y proteínas patrones de determinación de peso molecular por filtración de geles de Sefadex (Sephadex) se obtienen de Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia.

La quinasa de la cadena liviana de la miosina de músculo liso y la cadena liviana de la miosina de músculo liso son donaciones del Dr. R. Adelstein, N.I.H., Md., U.S.A.

Calmodulina pura de cerebro de bovino, fosfodiesterasa pura de cerebro de bovino y Affigel-10 de Bio Rad, son donaciones de la Dra. C. Klee, N.I.H., Md., U.S.A.

CAPP es una donación del Psychopharmacology Research Branch, N.I.H., Md., U.S.A. Todos los reactivos inorgánicos son de grado analítico.

## 2. METODOS GENERALES

### a. Determinación de proteínas.

La concentración de proteínas se determina por la técnica descrita por Lowry y col., (1951), usando seroalbúmina de bovino como estándar.

b. Filtración en geles de sefadex.

La técnica de filtración en geles de sefadex (Sephadex) se utiliza tanto en la purificación de la proteína inhibitoria como en la determinación de su peso molecular.

La columna (115 x 1,5 cm) de Sefacril (Sephacryl) S-200 superfino se equilibra con una solución compuesta por: Hepes, 10 mM pH7,5; MgCl<sub>2</sub>, 5 mM; β-mercaptoetanol, 3 mM; EDTA, 0,1 mM y EGTA, 0,1 mM (amortiguador A) y que además contiene NaCl, 100 mM. El volumen de la muestra a filtrar es de 1 ml, el flujo de la columna es de 0,2 ml/minuto y se recogen fracciones de 2 ml. Esta columna se calibra haciendo filtrar los siguientes patrones proteicos cuyos pesos moleculares se indican entre paréntesis: ribonucleasa A (13.700), quimotripsinógeno (25.000), ovoalbúmina (43.000), albúmina (67.000), aldolasa (158.000) y catalasa (232.000).

Se determina el volumen de elución (V<sub>e</sub>) de cada uno de ellos midiendo absorbancia a 280 nm, el volumen de exclusión de la columna (V<sub>o</sub>) utilizando azul dextrano, y el volumen total (V<sub>t</sub>) por medio de agua tritiada. Al graficar los valores de K<sub>av</sub> de cada uno de los marcadores (siendo  $K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$ ) en función del valor logarítmico de los pesos moleculares respectivos, se obtiene una recta en la cual se interpola el valor de K<sub>av</sub> de la proteína de peso molecular desconocido.

c. Electroforesis en geles desnaturantes, tinción de proteínas por técnica del nitrato de plata.

Los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes se preparan de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970).

El gel de concentración contiene un 9% de acrilamida, y el gel separador un 5%, ambos geles poseen dodecil sulfato de sodio al 0.1%. La electroforesis se corre durante 1 hora, con una corriente de  $1,3 \text{ mA/cm}^2$  para continuar 2,5 horas con  $3,2 \text{ mA/cm}^2$ .

La tinción de proteínas se realiza por el método del nitrato de plata descrito por Wray y col. (1981) y modificado por Eschenbruk (1982). El gel que ha sido previamente teñido con azul de Coomassie se lava exhaustivamente con agua bidestilada, y se pone en un baño con metanol al 50% por 1 hora.

La tinción de proteínas se lleva a cabo con una solución de  $\text{AgNO}_3$  amoniacal que se prepara inmediatamente antes de su uso, en la forma siguiente: a una mezcla de 31,5 ml de  $\text{NaOH}$  0,09N y 2.05 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  14,8 N, se agregan, gota a gota, 6 ml de  $\text{AgNO}_3$  al 20% (p/v) agitando vigorosamente.

La solución así preparada se agrega al gel, y se agita suavemente por 15 minutos. Al cabo de este tiempo se lava el gel con agua bidestilada hasta retirar totalmente el  $\text{AgNO}_3$  remanente. El revelado del gel se lleva a cabo adicionando sobre éste, 500 ml de una solución que contiene ácido acético al 0,005% y formaldehído al 0,019%. La tinción se detiene lavando el gel con agua bidestilada y colocándolo en metanol al 50%.

#### d. Preparación de homogeneizado de núcleos.

A partir de un ovario recientemente sacado del animal, se aíslan manualmente los oocitos en estado VI (Dumont, 1972), mediante pinzas de relojero. La separación y aislamiento de los oocitos se realizan en solución salina de Barth modificada (Kofoid y col.,

1979); una vez aislados, los oocitos se traspasan a una solución compuesta por: Hepes, 10 mM, pH 7,4; MgCl<sub>2</sub>, 7 mM; NH<sub>4</sub>Cl, 70 mM; DTT, 1 mM y EDTA, 0,1 mM.

Bajo la lupa, con una aguja delgada se pincha el polo animal de cada uno de los oocitos. Al cabo de unos 5 minutos, se puede apreciar que el núcleo comienza a aparecer hacia el exterior de la perforación, terminando por desprenderse totalmente del oocito.

Una vez extraídos todos los núcleos, se lavan exhaustivamente con el amortiguador arriba indicado, se homogeneizan con un mínimo de una solución que contiene: Hepes, 50 mM pH 8,0; MgCl<sub>2</sub>, 5 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol, 3 mM; EDTA, 0,1 mM; EGTA, 0,1 mM (amortiguador B) y que además contiene KCl, 300 mM. Con el fin de obtener una preparación de calmodulina, el homogeneizado se calienta a 90° por 10 minutos y se centrifuga a 12.000 x g durante 10 minutos.

### 3. ENSAYOS ENZIMATICOS Y DE LA PROTEINA INHIBITORIA.

#### a. Ensayo de actividad de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos.

Se utiliza el método descrito por Thompson y col., (1974) que consiste en el acoplamiento de las reacciones siguientes:

- Hidrólisis del 3'-5'-nucleótido cíclico (ya sea cAMP o cGMP), catalizada por la fosfodiesterasa, obteniéndose el nucleótido-5' correspondiente.
- Hidrólisis del nucleótido-5', catalizada por la nucleotidasa de veneno de serpiente, para formar el nucleósido correspondiente.

En esta tesis se utiliza como sustrato esencialmente el [8-<sup>3</sup>H]cAMP en una concentración final de 5  $\mu$ M (a.e.: 2,8 x 10<sup>5</sup> cpm/nmol) o de 100  $\mu$ M (a.e.: 1,5 x 10<sup>4</sup> cpm/nmol). Con el fin de eliminar

el [ $^3\text{H}$ ]H<sub>2</sub>O que contamina al sustrato comercial, previo a su uso, éste debe ser purificado adsorbiéndolo en una columna de Dowex 1-X4. El [ $^3\text{H}$ ]H<sub>2</sub>O se eluye con agua, y el [ $^3\text{H}$ ]cAMP con HCl 0,05M. Las fracciones que contienen el nucleótido radiactivo se juntan y se liofilizan a sequedad. El residuo se disuelve en etanol al 50% y esta solución se guarda a -20°.

La medición de actividad enzimática se realiza en 200  $\mu\text{l}$  de una mezcla de reacción que contiene: Hepes, 10 mM pH 7,5; MgCl<sub>2</sub>, 5 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol, 3 mM; fosfodiesterasa y [ $^3\text{H}$ ]cAMP en las concentraciones indicadas en cada caso.

La medición de actividad basal de la enzima se realiza en presencia de EGTA, 1 mM, en cambio la determinación de actividad estimulada por CaM-Ca<sup>2+</sup> se hace en presencia de calmodulina purificada a homogeneidad de cerebro de bovino en una concentración final de  $3,0 \times 10^{-7}\text{M}$  y de CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM.

La reacción se comienza por la adición del sustrato (salvo en los casos señalados), siendo el tiempo de incubación de 20 ó 30 minutos a 30°. Esta primera etapa de la reacción se termina colocando la mezcla de reacción a 100° durante 90 segundos. Luego de enfriar a 4°, se agregan 25  $\mu\text{l}$  de 5'-nucleotidasa de veneno de serpiente (2,0 mg/ml) y se incuba por 10 minutos a 30°.

La reacción se detiene agregando 1 ml de metanol. Se toman alícuotas de 0,5 ml o 1 ml, para pasarlas a través de columnas de intercambio iónico que contienen 0,4 ml de Dowex 1-X4 previamente equilibrado con HCl, 0,1 N, y lavado con agua bidestilada hasta pH 4 ó 5. La adenosina formada por acción de la 5'-nucleotidasa es

eluida de la columna agregando 1,5 ml de metanol (la recuperación de adenosina de la columna es superior a un 97%). El eluido se recoge en un frasco para el contador de centelleo líquido al cual se le agregan 12 ml de una mezcla de líquido de centelleo con base de tolueno (3,92 g PPO y 80 mg POPOP por litro de tolueno) y Tritón X-100 en una relación 2:1 (v/v) respectivamente. Los blancos de la reacción se realizan agregando ya sea enzima hervida o seroalbúmina de bovino en lugar de la preparación enzimática.

b. Ensayo de la actividad de la quinasa de la cadena liviana de la miosina de músculo liso.

La quinasa de la cadena liviana de la miosina cataliza la transferencia del fosfato  $\gamma$  del ATP a la miosina. La actividad enzimática se ensaya según la metodología descrita por Adelstein (1981). La mezcla de reacción de 100  $\mu$ l contiene: Tris-HCl, 20 mM pH 7,3; MgCl<sub>2</sub>, 10 mM; CaCl<sub>2</sub>, 0,2 mM; [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 0,1 mM (a.e: 190 cpm/pmol), cadena liviana de la miosina, 0,2 mg/ml y calmodulina, 1,2 x 10<sup>-9</sup>M. Los tubos de esta mezcla de reacción se colocan en un baño de incubación a 37°, y la reacción se inicia agregando la enzima. A diferentes tiempos, se sacan alícuotas de la mezcla de reacción que se colocan en trozos de papel Whatman N°3, los cuales se sumergen inmediatamente en una solución de TCA al 10% y pirofosfato de potasio al 2% a 4°. Una vez finalizado el período de incubación de todas las reacciones, la totalidad de los papeles filtros se lavan según la técnica descrita por Corbin y Reimann (1974) que consiste en colocar los filtros en una solución de TCA al 10% por 15 minutos, operación que se repite 3 veces consecutivas. Luego se sumergen en

etanol puro por cinco minutos y finalmente en éter por igual período; los filtros se secan y su radiactividad se cuenta en 4 ml de líquido de centelleo en tolueno.

c. Ensayo de actividad de la proteína inhibitoria.

La actividad de la proteína inhibitoria se mide comparando la cantidad de una cierta alícuota de fosfodiesterasa I estimulada por CaM-Ca<sup>2+</sup>, lisofosfatidilcolina o tratamiento con tripsina, con la actividad de una alícuota equivalente de fosfodiesterasa, en presencia del agente activante y de la proteína inhibitoria en las mismas condiciones descritas en el punto 3a. (Cuando el ensayo se realiza con una preparación de proteína inhibitoria proveniente de cromatografía en DEAE-celulosa, la concentración de CaCl<sub>2</sub> se aumenta a 15 mM para evitar la quelación del ion Ca<sup>2+</sup> por el EGTA que se concentra en las fracciones de la columna. Esta concentración de Ca<sup>2+</sup> no altera la actividad basal ni la activada por calmodulina.)

La concentración del agente activante en el ensayo debe ser tal que la fosfodiesterasa I alcance valores de activación no mayores al 95% del valor máximo.

Se define como unidad de proteína inhibitoria, la cantidad necesaria para disminuir en un 50% la activación de fosfodiesterasa por CaM-Ca<sup>2+</sup>, en las condiciones del ensayo.

4. PREPARACION DE FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS DE OVARIO DE XENOPUS LAEVIS .

La enzima se prepara esencialmente como describen Echeverría y col. (1981).

#### a. Preparación del extracto.

En general se usan 10 sapos Xenopus laevis que se anestesian por inmersión en una mezcla de hielo y agua y se sacan sus ovarios quirúrgicamente. El ovario típico de un animal adulto está compuesto en un 90% por oocitos de estado V y VI (Dumont, 1972), el 10% restante está constituido por oocitos de menor tamaño, tejido conectivo y células foliculares.

Los ovarios, alrededor de 150 g, se mantienen en solución salina de Barth, modificada por Kofoid y col. (1979); luego se cortan en pequeños trozos, los cuales se homogeneizan en un homogeneizador Potter-Elvehjem, en una relación de un volumen de tejido por un volumen de solución amortiguadora B.

El homogeneizado total se centrifuga a 27.000 x g por 20 minutos a 4°, obteniéndose los desechos celulares y pigmentos en el fondo del tubo.

El líquido sobrenadante queda cubierto por una fina película constituida por material lipídico, la que se separa por filtración a través de lana de vidrio. El filtrado se recentrifuga a 27.000 x g durante 20 minutos a 4°, obteniéndose un líquido sobrenadante denominado "extracto".

#### b. Cromatografía en DEAE-celulosa.

El extracto obtenido es inmediatamente adsorbido en una columna de DEAE-celulosa (DE-52) (1,5 x 30 cm) que ha sido previamente equilibrada con la solución amortiguadora A, se lava con esta solución A hasta que la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas sea menor que 0,1. Posteriormente se eluye con un gradiente

lineal de acetato de sodio entre 0 y 0,8 M en solución A. El volumen total del gradiente es 1,5 litros.

El flujo de la columna se mantiene en 2 ml/minuto y se colectan fracciones de 7 ml.

La elución con el gradiente lineal salino permite la separación de diferentes actividades fosfodiesterásicas presentes en oocitos de Xenopus laevis (Echeverría y col., 1981). A una concentración salina de 0,2 M, se obtiene un pico de actividad fosfodiesterásica denominado fosfodiesterasa I. Esta forma enzimática utiliza tanto cAMP como cGMP como sustratos, y se caracteriza por ser activada por calmodulina y  $Ca^{2+}$ . A una concentración de 0,35 M de sal, se obtiene otro pico de actividad fosfodiesterásica denominado fosfodiesterasa II. Esta forma enzimática sólo reconoce al cAMP como sustrato y es insensible a calmodulina y  $Ca^{2+}$ .

Existe una tercera forma de fosfodiesterasa que eluye a una concentración salina de 0,30 M, que al catalizar la hidrólisis de cAMP es susceptible de ser estimulada por cGMP (Connelly, manuscrito en preparación).

c. Cromatografía de afinidad en columna de calmodulina-sefarosa.

- Preparación del gel CaM-sefarosa.

Se utiliza la técnica descrita por Klee y Krinks (1978), que consiste en ligar 1,2 mg de calmodulina purificada a homogeneidad de cerebro de bovino con 4 ml de sefarosa-4B (Sephrose-4B) activada con bromuro de cianógeno; en las condiciones descritas por estos autores.

- Adsorción y elución de la fosfodiesterasa I.

Alícuotas de la preparación de fosfodiesterasa I proveniente de la cromatografía en DEAE-celulosa se ajustan a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de 0,5 mM final y se adsorben en una columna de 1 ml de CaM-sefarosa previamente equilibrada con una solución que contiene: Tris-HCl, 40 mM pH 7,5; NaCl, 50 mM;  $\text{CaCl}_2$ , 0,2 mM;  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM y DTT, 0,1 mM (amortiguador C).

Posteriormente el gel se lava con 10 ml del amortiguador C, luego con 5 a 10 ml de solución de NaCl 0,2 M en solución C (amortiguador C'), finalmente se eluye con una solución que contiene: Tris-HCl, 40 mM pH 7,5; NaCl, 0,2 M;  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM; DTT, 0,1 mM y EGTA, 2 mM (amortiguador D); se mantiene un flujo de 0,2 ml/min y se recogen fracciones de 0,5 ml.

La fosfodiesterasa I es retenida en la columna de afinidad en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , puesto que ellos permiten la interacción de la enzima con la calmodulina. Este hecho permite purificar la fosfodiesterasa I de todas aquellas proteínas que no tienen afinidad por calmodulina. Las fracciones correspondientes al lavado de la columna presentan actividad fosfodiesterásica, sin embargo, ésta no es activable por CaM- $\text{Ca}^{2+}$ . Al hacer pasar el amortiguador D, que contiene EGTA, se elimina la interacción enzima-calmodulina, recuperándose así la actividad de fosfodiesterasa I en las fracciones correspondientes a la elución con dicha solución amortiguadora.

La enzima así obtenida es capaz de ser activada entre 4 y 10 veces por el complejo CaM- $\text{Ca}^{2+}$ . La preparación purificada por

esta técnica debe conservarse en solución con 50% glicerol (pH 8,0) y a  $-80^{\circ}$ .

Cabe hacer notar que la cromatografía de la proteína inhibitoria en esta columna de afinidad, se realiza en las mismas condiciones arriba descritas.

d. Tratamiento de fosfodiesterasa I con tripsina.

La incubación de fosfodiesterasa I con tripsina en las cantidades señaladas en cada experimento, se realiza durante 10 minutos a  $30^{\circ}$ . La reacción se comienza con la adición de tripsina y se detiene agregando inhibidor de tripsina de poroto de soya en cantidades 5 veces superiores a las de tripsina empleada; al tubo control se agrega la tripsina y además el inhibidor de tripsina de poroto de soya al comienzo de la reacción.

5. CALMODULINA: PREPARACION, PURIFICACION Y DETERMINACION CUANTITATIVA

a. Preparación de los extractos.

En algunos experimentos que se exponen en esta tesis se utiliza una preparación de calmodulina proveniente de un extracto no purificado y obtenido a partir de pequeñas cantidades de ovario. Alrededor de 1 g de ovario, se homogeneiza en 3 ml de KCl 0,3M en amortiguador B. El extracto obtenido se calienta a  $90^{\circ}$  por 5 minutos y se centrifuga a  $12.000 \times g$  durante 10 minutos. Este extracto puede congelarse para su posterior utilización.

Cuando se desea obtener calmodulina purificada de ovario, la preparación se realiza a partir de unos 40 g de ovario. Estos se obtienen y se tratan como se describió arriba, y se homogeneizan en una solución Tris-HCl, 20 mM, pH 7,5 y  $MgCl_2$ , 1 mM.

b. Preparación y tratamiento del polvo cetónico:

Al homogeneizado preparado como se indica en el punto anterior, se agregan 300 ml de acetona a  $-20^{\circ}$ , se agita y el precipitado formado se filtra al vacío, lavándolo con 100 ml de acetona fría, se liofiliza, obteniéndose aproximadamente 11 g de polvo cetónico.

El tratamiento del polvo cetónico se realiza según la técnica descrita por Klee (1977), para lo cual se resuspenden 10 g de polvo cetónico en 150 ml de solución de Tris-HCl, 0,1 M pH 7,5, y se agita 1 hora a  $4^{\circ}$ ; la suspensión obtenida se centrifuga a  $9.000 \times g$  durante 15 minutos con el fin de eliminar las proteínas no disueltas, se separa el líquido sobrenadante, al que se agregan 6 g de un intercambiador iónico DE-22 [previamente equilibrado con una solución que contiene Tris-HCl, 0,02 M pH 7,5;  $MgCl_2$ , 1 mM y NaCl, 0,05 M (amortiguador E)] y luego se agita a  $4^{\circ}$  durante 15 minutos. Esta mezcla del líquido sobrenadante con DE-22 se lava por decantación con el amortiguador E y se eluye con una solución de NaCl, 0,7 M en amortiguador E. El eluido se precipita con sulfato de amonio al 50%, el precipitado formado se recupera por centrifugación, se disuelve en 20 ml de solución E, y se dializa contra esta misma solución amortiguadora.

c. Cromatografía de afinidad en columna de CAPP-Affigel 10.

Se utiliza la técnica descrita por Jamieson y Vanaman (1979), modificada por Klee (comunicación personal).

Esta técnica se basa en la propiedad de la calmodulina de unirse a drogas antisicóticas como las fenotiazinas (Levin y Weiss,

1977). Se usan 25 ml de Affigel-10 que se lavan tres veces con el mismo volumen de metanol y luego se dejan agitando toda la noche a 4° con 50 mg de un derivado de fenotiazina denominado 2Cl-10 (3-aminopropil) fenotiazina (CAPP). Posteriormente se lava dos veces con 25 ml de solución de borato de sodio 0,1M, pH 8,2 y se deja el gel toda la noche en una solución de amino etanol 0,5M, pH 8,5.

Doce ml de una solución de calmodulina proveniente de una solución de polvo cetónico (ver párrafo b) se adsorben en una columna (6 x 1,5 cm) de CAPP-Affigel 10, que ha sido previamente equilibrada con una solución que contiene: Hepes, 40 mM pH 7,5; NaCl, 50 mM; DTT, 0,5 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1 mM y CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM (amortiguador F). La columna se lava con 85 ml de solución F y luego con 55 ml de solución de NaCl, 0,4 M en solución F (amortiguador F'). La calmodulina es eluida de la columna con una solución que contiene: Hepes, 40 mM pH 7,5; NaCl, 0,4 M; DTT, 0,5 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1 mM y EGTA, 2 mM (amortiguador G). El flujo se mantiene en 0,1 ml/min y se colectan fracciones de 5 ml.

En la figura 2 se puede observar que se obtiene una actividad tipo calmodulina en las fracciones correspondientes a la elución de la columna con el amortiguador G que contiene EGTA, puesto que en ausencia de iones Ca<sup>2+</sup> se anulan las interacciones entre la calmodulina y el derivado de fenotiazina (Levin y Weiss, 1979).

#### d. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se utilizan geles de poliacrilamida al 12,5%, según la técnica descrita por Davis (1964).

El gel se somete toda la noche a una corriente constante de

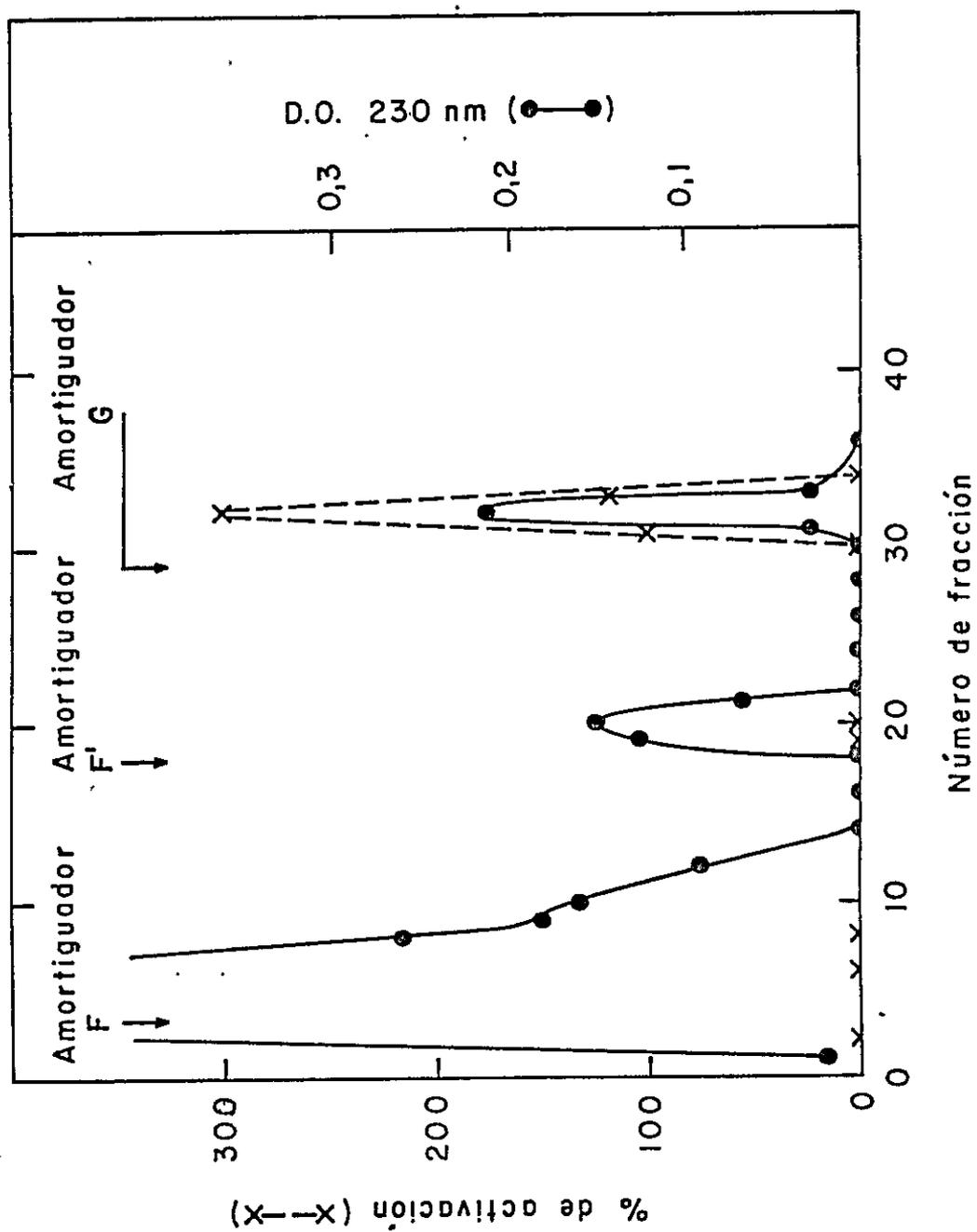


Figura 2. Cromatografía de afinidad de calmodulina de ovario en columna de CAPP-A (fig. 10).

*Figura.2. Cromatografía de afinidad de calmodulina de ovario en columna de CAPP-Affigel 10.*

La actividad de calmodulina (X---X), proveniente de 10 g de polvo cetónico preparado y tratado como se indica en Métodos, se expresa como porcentaje de activación de la actividad basal de fosfodiesterasa I. La actividad enzimática se determina como se describe en Métodos, utilizando 50  $\mu$ g de una preparación de fosfodiesterasa I proveniente de la etapa de purificación en DEAE-celulosa, y que presenta una actividad basal de 42 pmoles/min x mg proteína.

1,1 mA/cm<sup>2</sup>. Una vez colocadas las muestras por duplicado, el gel se trata durante 1,5 horas con una corriente de 1,6 mA/cm<sup>2</sup> y luego 2 horas con 2,2 mA/cm<sup>2</sup>. Posteriormente la mitad del gel se tiñe con solución de azul de Coomassie, y la otra mitad se corta en trozos de 3 mm de ancho los cuales se incuban en 0,1 ml de amortiguador A a 4° por 18 horas.

e. Determinación cuantitativa.

La medición de la calmodulina presente en diversas preparaciones de ovario se realiza en dos etapas. En primer lugar se determina la actividad fosfodiesterásica con diferentes concentraciones de una solución de calmodulina purificada a homogeneidad de cerebro de bovino, obteniéndose una curva de activación como la que se muestra en la figura 3. Se define el valor de  $[CaM]_{50}$  como la cantidad de calmodulina necesaria para alcanzar la mitad de la activación máxima de una cierta preparación de fosfodiesterasa I. En el caso señalado en la figura 3, este valor corresponde a 60 ng de calmodulina por ensayo, es decir una concentración de  $1,8 \times 10^{-8}M$ . Este valor debe determinarse para cada nueva preparación de fosfodiesterasa utilizada.

En segundo lugar se determina la actividad de una alícuota de fosfodiesterasa con diferentes cantidades de la preparación de ovario a la cual se quiere determinar la concentración de calmodulina. La alícuota de la muestra que provoca la mitad de la activación máxima, contiene una cantidad de calmodulina equivalente al  $[CaM]_{50}$  determinado.

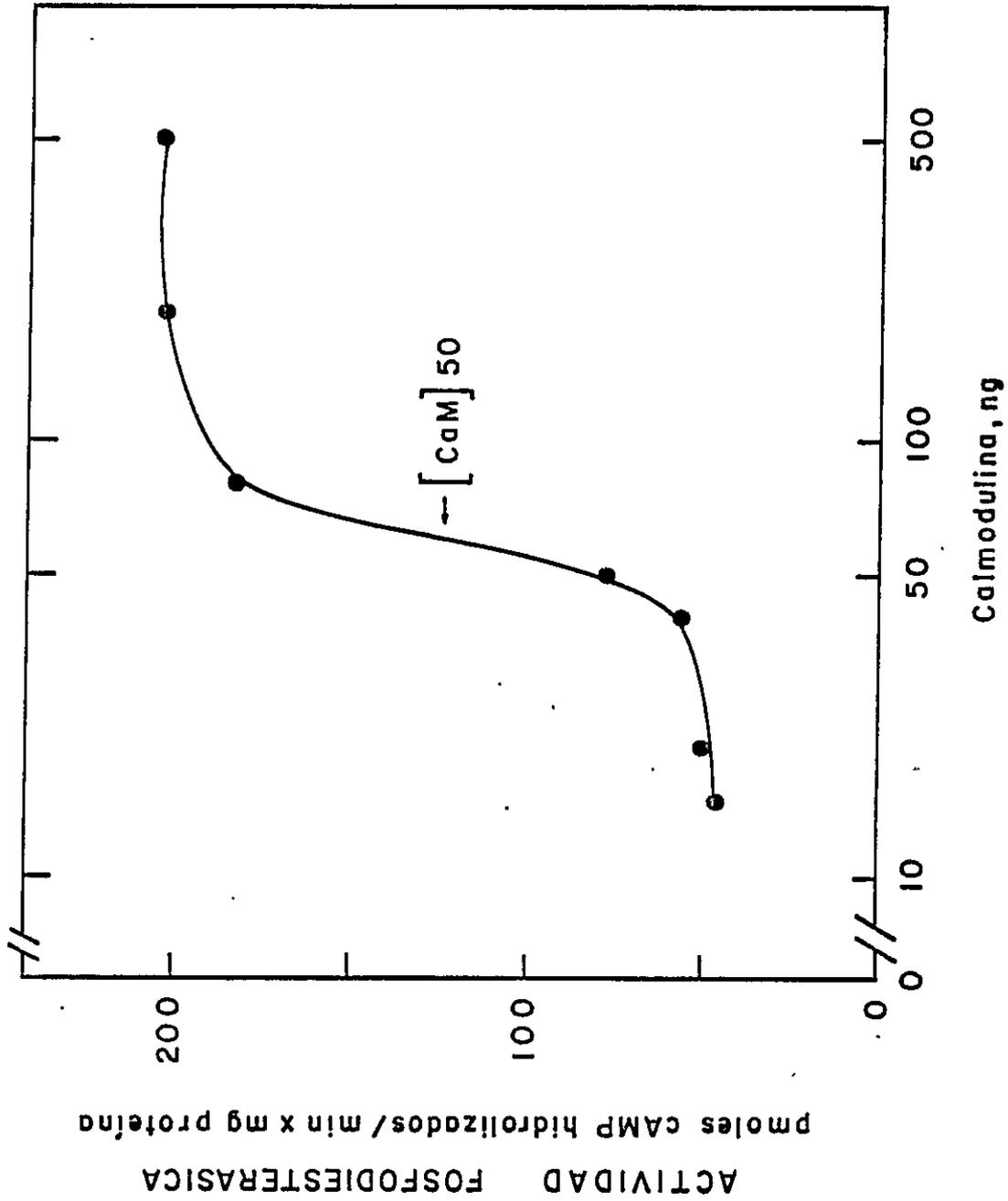


Figura 3. Determinación cuantitativa de calmodulina por medición de la activación de fosfodiesterasa I.

*Figura 3. Determinación cuantitativa de calmodulina por medición de la activación de fosfodiesterasa I.*

La actividad basal de 30  $\mu\text{g}$  de una preparación de fosfodiesterasa I proveniente de la etapa de purificación en DEAE-celulosa es de 45 pmoles de cAMP hidrolizados/min x mg proteína. La actividad estimulada se mide en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM y cantidades crecientes de calmodulina purificada a homogeneidad de cerebro de bovino.

## RESULTADOS

### I. EFECTO DE AGENTES ACTIVADORES SOBRE LA FOSFODIESTERASA I DE OVARIO DE XENOPUS LAEVIS.

La calmodulina, una proteína que se ha encontrado en todos los tejidos estudiados, está también presente en ovario de Xenopus laevis.

En la primera parte de esta tesis se muestran las pruebas de su existencia en este sistema y la caracterización de su efecto y el de fosfolípidos sobre la actividad de la fosfodiesterasa I.

#### A. CALMODULINA DE OVARIO DE XENOPUS LAEVIS.

##### 1. Identificación, purificación y determinación cuantitativa.

La calmodulina es capaz de activar una gran variedad de enzimas, entre ellas, una de las especies de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos. (Cheung, 1971). Uno de los criterios utilizados rutinariamente para detectar la presencia de calmodulina en una preparación fisiológica, es medir la capacidad de un extracto calentado para activar la fosfodiesterasa dependiente de  $Ca^{2+}$  en presencia de estos iones, y la reversión de la activación en presencia de EGTA (Wolff y Broston, 1974).

En la figura 4 se observa la activación de la fosfodiesterasa I de ovario por cantidades crecientes de dos extractos diferentes. La figura 4 A corresponde a la activación por un extracto

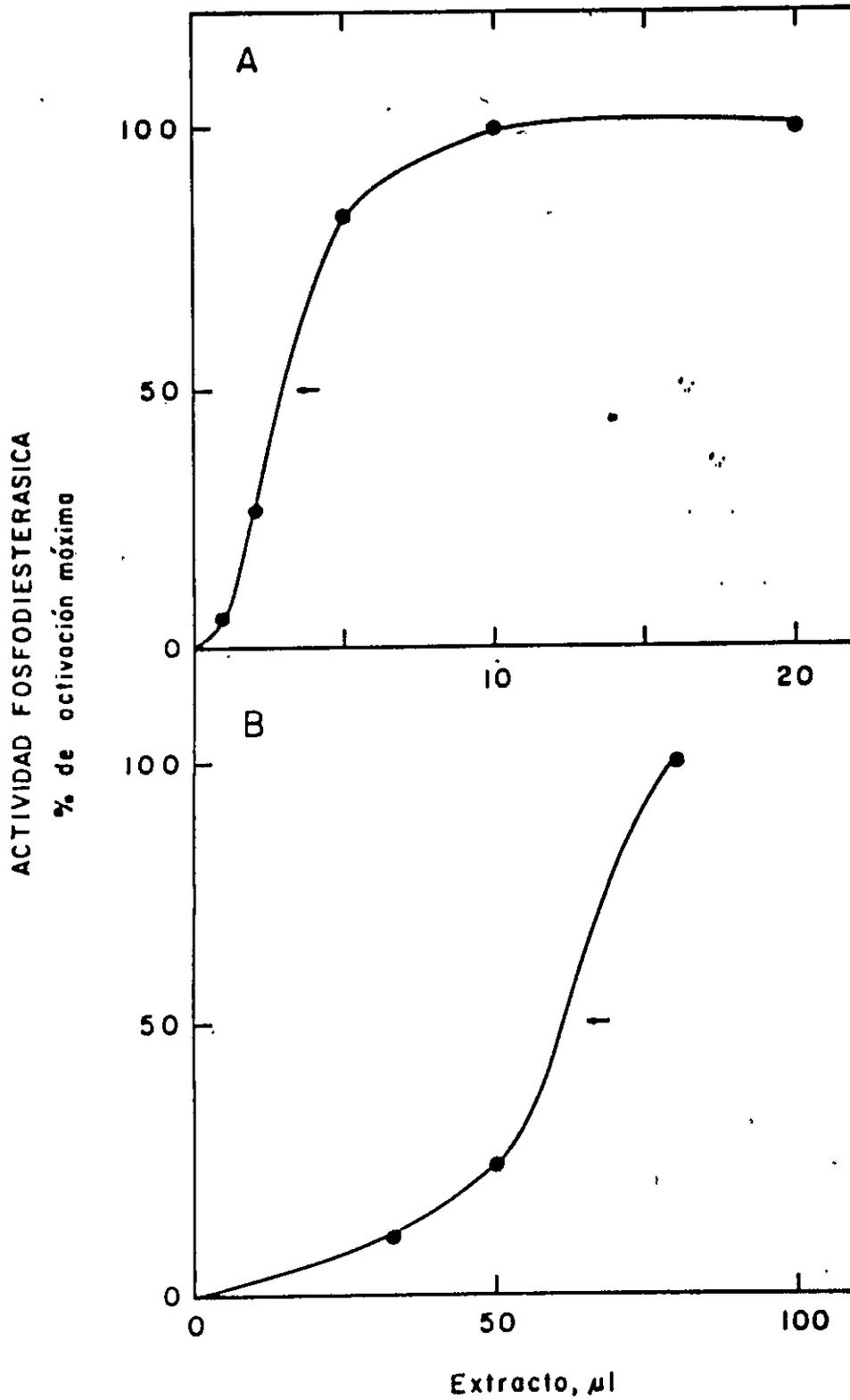


Figura 4. Activación de fosfodiesterasa I por extracto total de ovario y por extracto de núcleos.

Figura 4. Activación de fosfodiesterasa I por extracto total de ovario y por extracto de núcleos.

El ensayo se realiza como se describe en Métodos utilizando 70  $\mu\text{g}$  de preparación de fosfodiesterasa I proveniente de la etapa de purificación de DEAE-celulosa, en presencia de [ $^3\text{H}$ ]cAMP 100  $\mu\text{M}$ . La actividad basal de la enzima es de 458 pmoles cAMP hidrolizados/min x mg proteína.

Diferentes alícuotas de un extracto total de ovario preparado a partir de 1 g de ovario (A) y de extracto de núcleos preparado a partir de 208 núcleos (B), se agregan a la mezcla de reacción.

La actividad enzimática ensayada en presencia de estos extractos y de EGTA 1 mM es equivalente a la actividad basal.

Las flechas indican el volumen de cada extracto necesario para producir un 50% de activación de la enzima.

El valor máximo de activación alcanzado con ambos extractos es equivalente al que se obtiene al utilizar concentraciones saturantes de calmodulina.

calentado total de ovario y la 4 B a la activación por un extracto calentado de núcleos.

Al comparar los valores obtenidos para un 50% de la estimulación de la enzima, con el valor de  $[CaM]_{50}$  obtenido de la curva estándar de calibración bajo las mismas condiciones de ensayo, y utilizando calmodulina purificada a homogeneidad de cerebro de bovino, se concluye que existirían 118  $\mu\text{g}$  de calmodulina por gramo de ovario. Tomando en cuenta que 1 g de ovario posee alrededor de 660 oocitos, se puede establecer que habría 179 ng de calmodulina por oocito, es decir que la calmodulina se encuentra en una concentración de 18  $\mu\text{M}$  en el oocito (en este cálculo se considera que el volumen acuoso de un oocito estado VI es de 660 nl). Estos valores se asemejan a los descritos por Cartaud y col. (1980) para oocitos de Xenopus laevis.

Un cálculo semejante para el extracto obtenido de núcleos de oocitos arroja una cifra de 2 ng de calmodulina por núcleo, es decir, que éste sólo contendría cantidades trazas de este agente estimulador.

La figura 5 muestra la separación por electroforesis de calmodulina de un extracto proveniente de 1 g de ovario; se puede observar también que la calmodulina comigra con una actividad estimulante de fosfodiesterasa I.

La calmodulina es una proteína de bajo peso molecular que migra junto con el frente en una electroforesis en geles de bajo porcentaje de poliacrilamida. Con el fin de obtener una banda aislada e identificable se emplean geles al 12,5% de

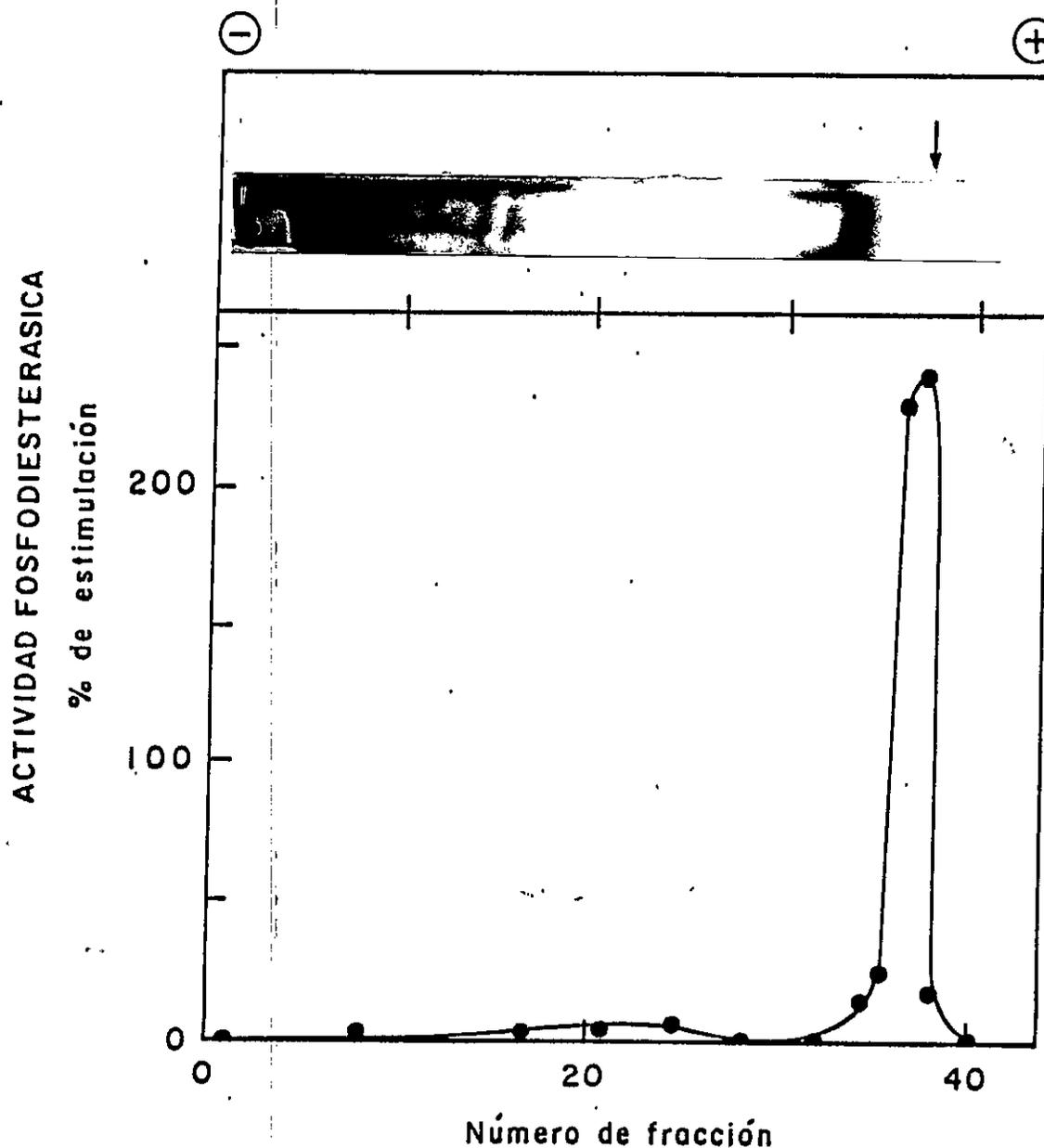


Figura 5. Electroforesis de un extracto de ovario y medición de actividad estimulante de fosfodiesterasa en las diversas fracciones.

Se somete a una electroforesis en geles de poliacrilamida una preparación de extracto de ovario obtenido como se describe en Métodos. La electroforesis y la elución de actividad estimulante del gel se realiza como se describe en Métodos.

Alícuotas de 50  $\mu$ l de cada una de las fracciones se ensayan con 80  $\mu$ g de una preparación de fosfodiesterasa I proveniente de la etapa de purificación en DEAE-celulosa, en presencia de [ $^3$ H]cAMP 100  $\mu$ M. La actividad basal de la enzima en estas condiciones es de 389 pmoles de cAMP hidrolizados/min x mg proteína. La flecha señala la banda de proteína que comigra con calmodulina de cerebro y que es capaz de activar la fosfodiesterasa I de ovario.

poliacrilamida.

\* La electroforesis de este extracto presenta una serie de bandas que se tiñen de azul de Coomassie. Al ensayar alícuotas del eluido de los trozos del gel, se puede observar en la figura 5 que se obtiene una actividad estimulante de fosfodiesterasa que comigra con una de las bandas. Dicha banda comigra con una banda de calmodulina de cerebro de bovino purificada a homogeneidad (resultado no mostrado).

Al seguir los métodos convencionales para la preparación de calmodulina, descritos en Métodos, se obtiene una purificación notable al aprovechar la propiedad de unión altamente específica de esta proteína a compuestos derivados de fenotiazina (figura 2).

La figura 6 muestra la activación de la fosfodiesterasa I al agregar diferentes cantidades de la preparación purificada por cromatografía en columna de afinidad de CAPP-Affigel 10. Se observa que la cantidad de calmodulina que produce un 50% de activación máxima corresponde a 124 ng de proteína de la preparación. El valor de  $[CaM]_{50}$  de la curva de calibración correspondiente es de 58 ng, lo que indica que la preparación de calmodulina de ovario tiene una pureza aproximada de un 50%.

## 2. Efecto de la concentración de iones $Ca^{2+}$ en la activación de fosfodiesterasa I por calmodulina.

La activación de fosfodiesterasa por calmodulina en otros sistemas es dependiente de la presencia de iones de  $Ca^{2+}$ .

Se determina entonces el efecto de  $Ca^{2+}$  sobre la activación

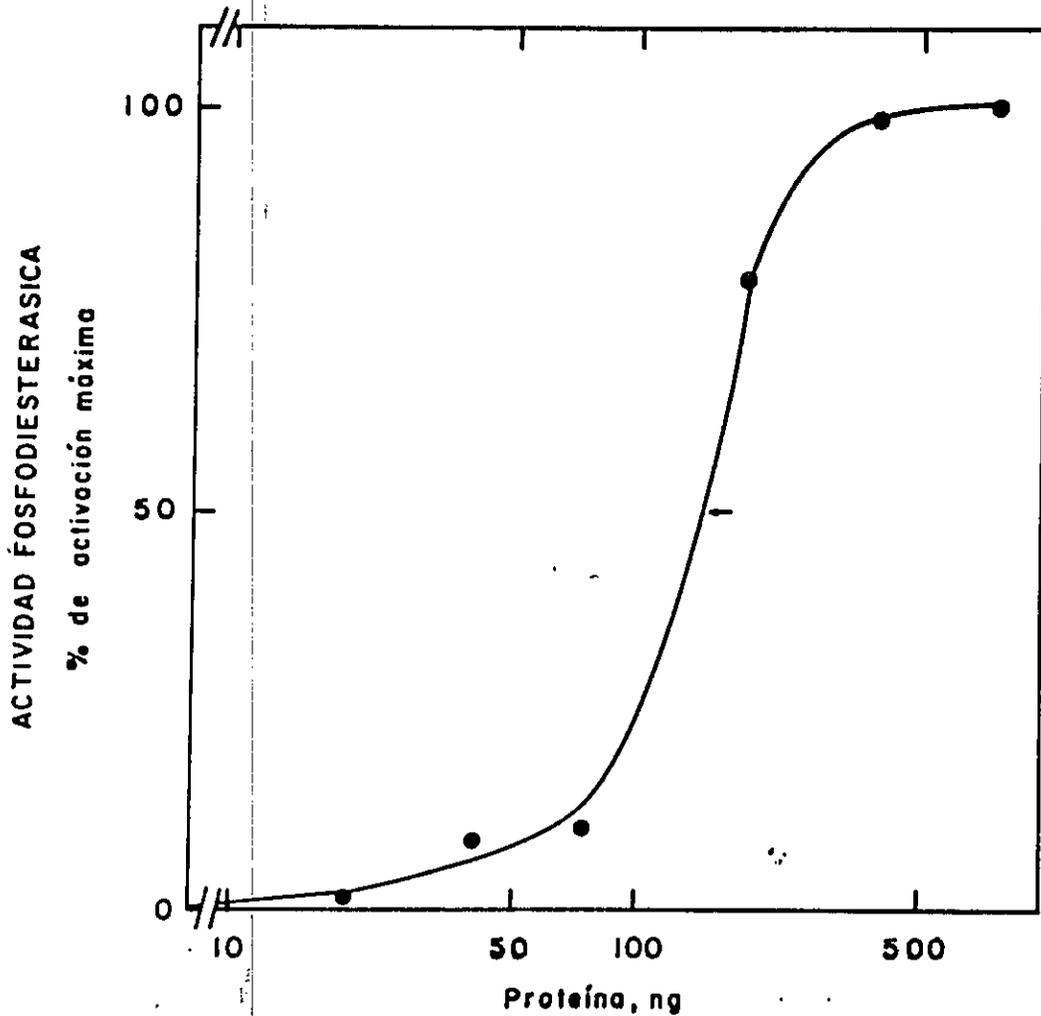


Figura 6. Activación de fosfodiesterasa I por calmodulina purificada de ovario.

Cantidades crecientes del eluido de la columna de CAPP-Affigel 10 se agregan al medio de incubación descrito en Métodos, utilizando  $[^3\text{H}]$ cAMP  $5 \mu\text{M}$ . La actividad basal de la enzima es de  $48,7 \text{ pmoles de cAMP hidrolizados/min} \times \text{mg proteína}$ . La actividad enzimática medida en presencia de  $800 \text{ ng}$  de preparación de calmodulina y de EGTA  $1 \text{ mM}$  es idéntica a la basal.

La flecha indica la cantidad de proteína necesaria para provocar un 50% de la activación de la enzima.

de fosfodiesterasa I por calmodulina de ovario, utilizando el sistema amortiguado con EGTA descrito por Fabiato y Fabiato (1979) y modificado por Mario Luxoro para el pH utilizado en el ensayo (comunicación personal).

En la figura 7 se observa que se obtiene la mitad de la activación máxima con una concentración de  $0,5 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ , valor muy similar a los encontrados en la literatura con otros tejidos (Dedman y col., 1977; Piascik y col., 1980).

### 3. Agentes que alteran el efecto de calmodulina.

#### a. Derivados de fenotiazina.

Las drogas antisicóticas derivadas de fenotiazina se unen a la calmodulina, impidiendo su acción activante sobre la fosfodiesterasa I.

La figura 8 muestra el efecto antagonico de flufenazina y de CAPP en la estimulación provocada por calmodulina sobre fosfodiesterasa I. A medida que aumenta la concentración de la droga, se observa una inhibición progresiva sobre la activación de la fosfodiesterasa I tanto por calmodulina de cerebro de bovino (figura 8 A) como por calmodulina purificada de ovario (figura 8 B).

La concentración de CAPP necesaria para antagonizar en un 50% la activación provocada por calmodulina de cerebro y de ovario es de  $2,3 \times 10^{-5}\text{M}$  y de  $1,0 \times 10^{-5}\text{M}$  respectivamente. La concentración de flufenazina para producir el mismo efecto es de  $3,7 \times 10^{-5}\text{M}$  y de  $7,0 \times 10^{-6}\text{M}$  respectivamente.

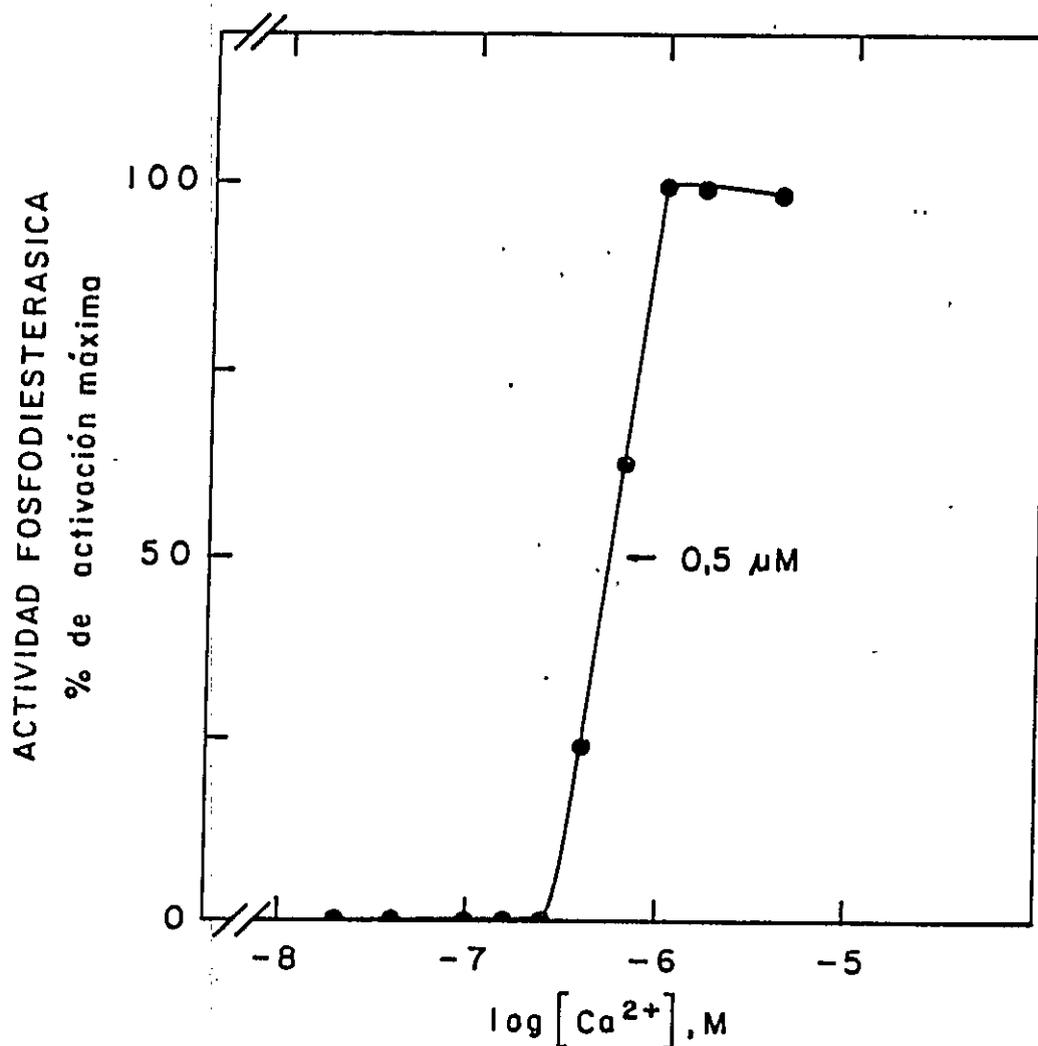


Figura 7. Efecto de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la actividad fosfodiesterásica activada por calmodulina.

La actividad de 70  $\mu\text{g}$  de preparación de fosfodiesterasa proveniente de la etapa de purificación en DEAE-celulosa, se mide en una mezcla de reacción cuyo pH es 7,0, en presencia de [<sup>3</sup>H]cAMP 100  $\mu\text{M}$ . La concentración de  $\text{MgCl}_2$  es de 6 mM y las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se ajustan haciendo variar la relación  $[\text{CaCl}_2]/[\text{EGTA}]$ . (Fabiato y Fabiato, 1979).

La calmodulina de ovario (25  $\mu\text{g}$ /ensayo) utilizada, corresponde a una preparación de polvo cetónico preparada como se describe en Métodos.

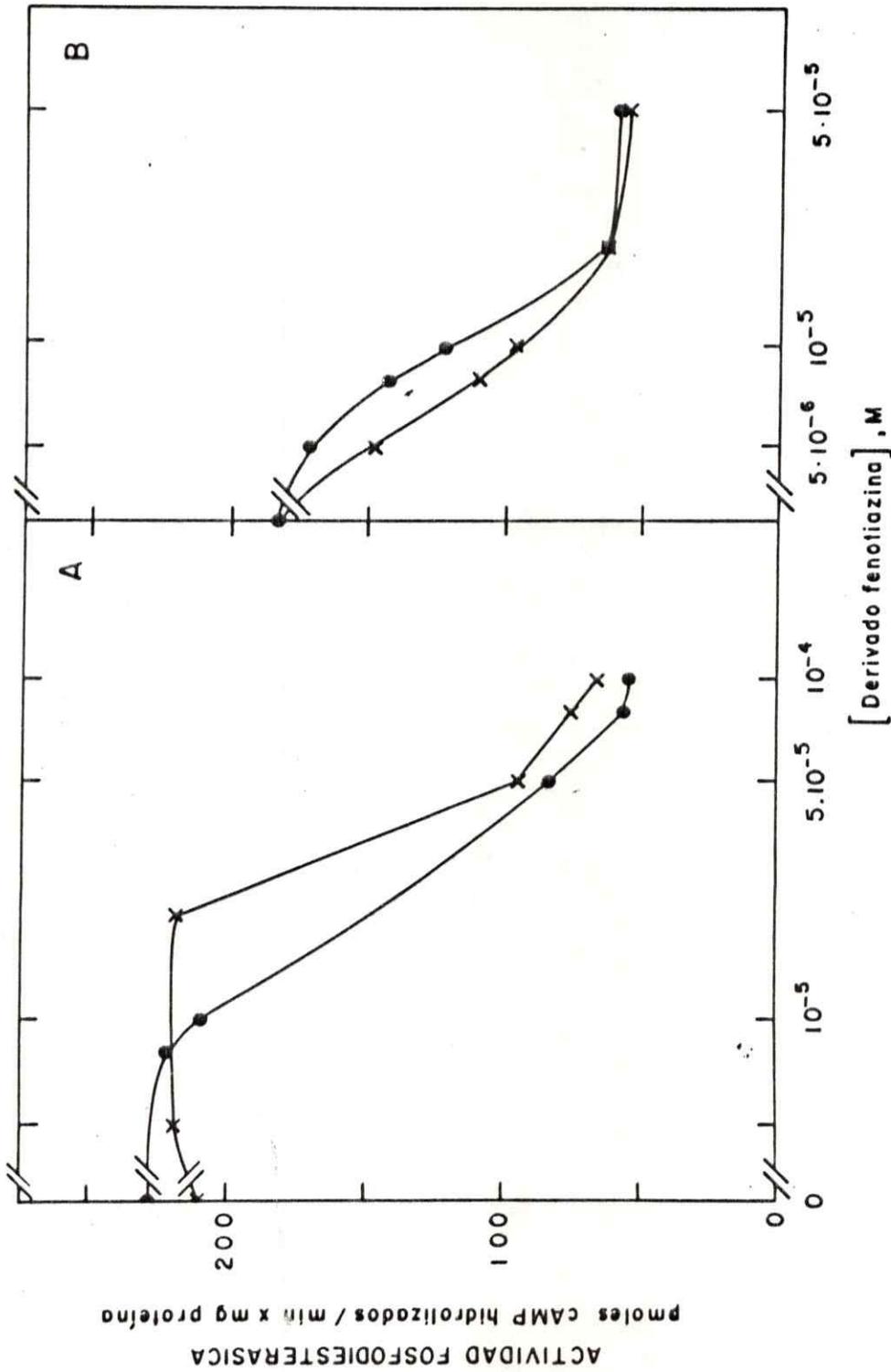


Figura 8. Antagonismo de derivados de fenotiazina sobre la actividad de fosfodiesterasa I activada por calmodulina de cerebro de bovino y de ovario de Xenopus laevis.

Figura 8. Antagonismo de derivados de fenotiazina sobre la actividad de fosfodiesterasa I activada por calmodulina de cerebro de bovino y de ovario de Xenopus laevis.

La actividad de 27  $\mu\text{g}$  de una preparación de fosfodiesterasa I proveniente de la etapa de purificación de DEAE-celulosa se mide en presencia de  $\text{CaCl}_2$  250  $\mu\text{M}$  y [ $^3\text{H}$ ]cAMP 5  $\mu\text{M}$ .

La actividad basal de la enzima es de 52,0 pmoles de cAMP hidrolizados/min x mg proteína. La actividad estimulada con calmodulina de cerebro de bovino,  $3,0 \times 10^{-7}$  M (0,5  $\mu\text{g}$ /ensayo) (A), y con 382 ng de calmodulina de ovario de una preparación de polvo cetónico preparada como se describe en Métodos (B), es inhibida por concentraciones variables de CAPP (●—●) o flufenazina (X—X).

La actividad obtenida con las concentraciones más altas de las drogas es equivalente a la actividad basal, indicando que ésta no es susceptible a estos derivados de fenotiazina.

Las concentraciones de calmodulina utilizadas en A y B provocan una activación máxima de la enzima.

### b. Melitina.

La melitina es capaz de antagonizar la activación de algunas enzimas por calmodulina.

La figura 9 muestra el efecto de concentraciones crecientes de melitina sobre la actividad de fosfodiesterasa I activada por calmodulina de cerebro y de ovario. En ambos casos hay una inhibición progresiva de la activación hasta llegar a los valores basales de la actividad enzimática. La concentración de melitina necesaria para inhibir en un 50% la activación provocada por calmodulina de cerebro es de 86 nM y de 120 nM para la calmodulina de ovario. Estos valores son cercanos a los descritos por Comte y col. (1983).

Los resultados mostrados sobre inhibición de calmodulina por derivados de fenotiazina y melitina indican que la calmodulina de ovario interactúa con la fosfodiesterasa I de una manera semejante a como lo hace la calmodulina de cerebro.

## B. FOSFOLIPIDOS

### 1. Características generales de la activación.

#### a. Especificidad.

Como hemos dicho, una gran variedad de lípidos, principalmente ácidos grasos, fosfolípidos y sus lisoderivados, son capaces de estimular la fosfodiesterasa dependiente de  $Ca^{2+}$  de diferentes sistemas.

La tabla II muestra que de los lípidos ensayados, solamente lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina activan la fosfodiesterasa I de ovario a niveles iguales o

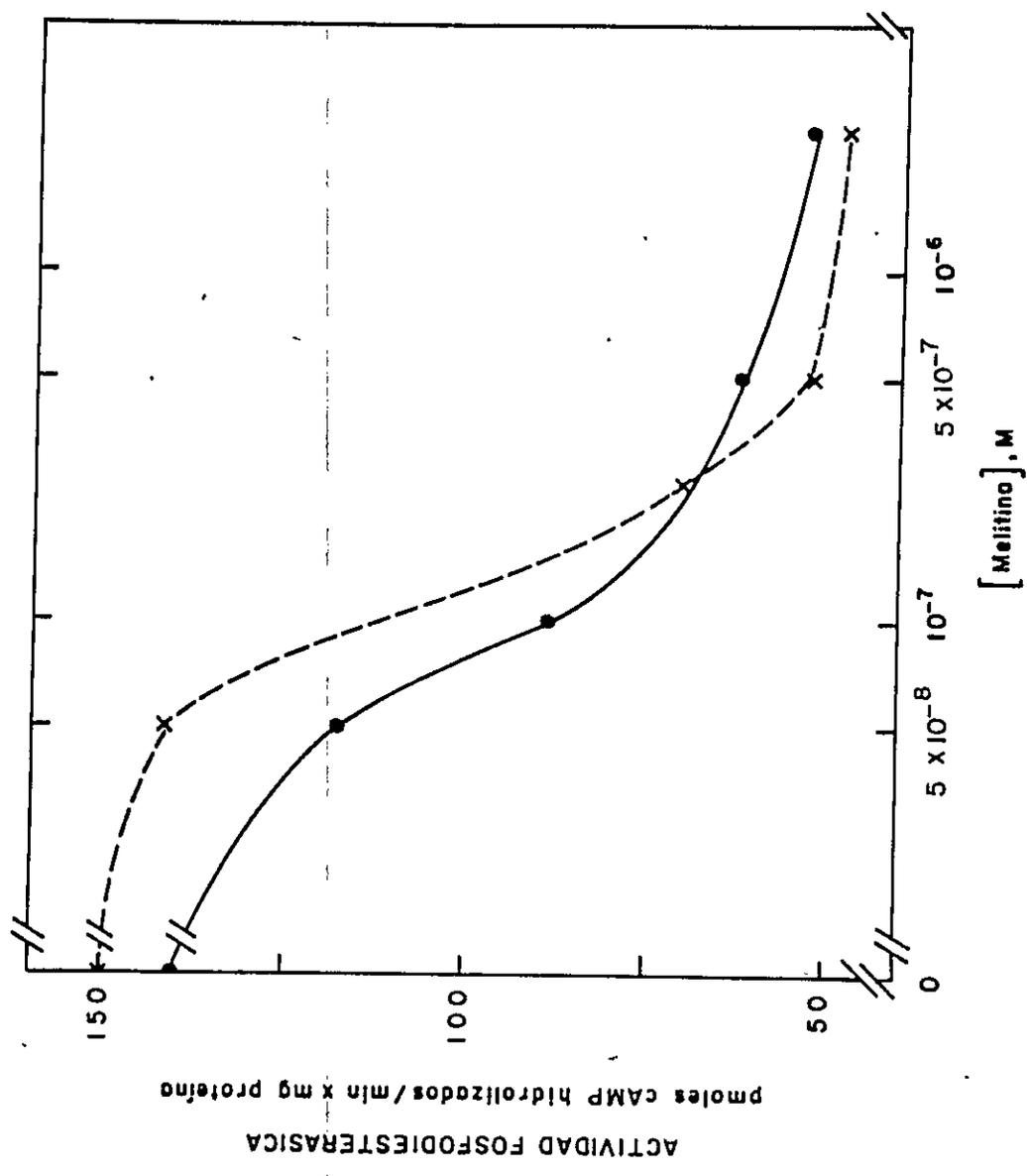


Figura 9. Inhibición por melitina de la fosfodiesterasa I activada por calmodulina.

Figura 9. Inhibición por melitina de la fosfodiesterasa I activada por calmodulina.

27  $\mu\text{g}$  de una preparación de fosfodiesterasa I proveniente de la etapa de purificación en DEAE-celulosa se incuban en presencia de [ $^3\text{H}$ ]CAMP 5  $\mu\text{M}$  con calmodulina de cerebro de bovino  $1,8 \times 10^{-8}\text{M}$  (60 ng por ensayo) (●—●) o con 382 ng de calmodulina de ovario purificada por columna de afinidad de CAPP-Affigel 10 (X---X).

La cantidad de calmodulina de ovario utilizada provoca una activación máxima de la enzima; la concentración de calmodulina de cerebro utilizada produce un 98% de la activación máxima.

La actividad basal de la enzima (51,0 pmoles de CAMP hidrolizados/min x mg proteína) no es afectada por concentraciones de melitina de  $5 \times 10^{-7}\text{M}$ .

Tabla II

Activación de fosfodiesterasa I por diferentes lípidos.

Exper. N°	Adición		Actividad fosfodiesterásica [ <sup>3</sup> H]cAMP hidrolizado.	
	Compuesto	Concentración	$\frac{\text{pmoles}}{\text{min} \times \text{mg prot.}}$	$\frac{\text{Activ. estimul}}{\text{Activ. basal}}$
1.	Nada	-	58,8	-
	Calmodulina	0,001	251,0	4,3
	Lisofosfatidilcolina	0,5	277,0	4,7
	Acido oleico	0,004	52,9	0,9
2.	Nada	-	88,3	-
	Lisofosfatidilcolina	0,1	383,0	4,3
	Lisofosfatidil- etanolamina.	0,2	372,0	4,2
	Fosfatidilinositol	0,2	149,0	1,7
	Estearato de Na	0,15	149,0	1,7
	Linoleato de Na	0,15	0	Inhibición
3.		$\mu\text{M}$		
	Nada	-	15,3	-
	Progesterona	17	19,5	1,3
	Progesterona	170	12,4	0,8
	$\beta$ -Estradiol	10	13,6	0,9
	Testosterona	10	8,6	0,6

El ensayo, como se describe en Métodos, se realiza con una preparación de fosfodiesterasa proveniente de una columna de afinidad de CaM-sefariosa (10  $\mu\text{g}$  por ensayo), en presencia de [<sup>3</sup>H]cAMP 5  $\mu\text{M}$ .

Lisofosfatidiletanolamina, estearato de sodio y linoleato de sodio se suspenden en agua, y se sonicen durante 5 minutos previo a su uso.

La sonicación se efectúa en un desintegrador ultrasónico Braunsonic modelo 1510, con un vástago de titanio de 9,5 mm de diámetro, aplicando una potencia de 50 Watts.

Las hormonas esteroidales se disuelven en etanol. La concentración final de etanol en el ensayo es entre 0,001 y 0,1%. El resto de los lípidos se solubiliza en agua.

superiores a los alcanzados con calmodulina. De los ácidos grasos ensayados, sólo el estearato de sodio, a diferencia de otros sistemas, produce una leve activación, obteniéndose incluso una inhibición por linoleato de sodio. El fosfatidil inositol, un buen agente activante en otros sistemas, en este caso produce una activación de sólo 1,7 veces. Las hormonas de estructura esteroideal ensayadas no presentan tampoco un efecto activante sobre la actividad de la enzima.

Cabe hacer notar que de las varias formas enzimáticas que se resuelven en la columna de DEAE-celulosa, solamente la fosfodiesterasa I es capaz de sufrir la activación por lípidos, en cambio la fosfodiesterasa II, es decir aquella que es independiente de calcio, no es activable por lisofosfatidilcolina ni lisofosfatiletanolamina.

En la tabla III aparecen resultados de algunos experimentos que aportan mayores detalles acerca de la activación de la enzima por lisofosfatidilcolina. Esta activación es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , puesto que cuando el ensayo se hace en presencia de EGTA, se obtiene el mismo grado de activación que en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Pichard y Cheung (1977) describen una activación de la fosfodiesterasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  por fosfolipasa C, sin embargo, en la tabla III se puede observar que la actividad de la fosfodiesterasa I de ovario no es alterada por la presencia de 5 unidades de fosfolipasa C en la mezcla de reacción.

Tabla III

Características de la activación de fosfodiesterasa I por lisofosfatidilcolina.

Exp. N°	Adición	Actividad fosfodiesterásica [ <sup>3</sup> H]cAMP hidrolizado	
		$\frac{\text{pmoles}}{\text{min} \times \text{mg prot.}}$	$\frac{\text{Activ. estimul.}}{\text{Actividad basal}}$
1	Ca <sup>2+</sup> 1,5 mM	30,0	-
	Ca <sup>2+</sup> 1,5 mM + LFC 0,2 mg/ml	116,6	3,9
	EGTA 2 mM + LFC 0,2 mg/ml	116,2	3,9
2	Nada	71,5	-
	Fosfolipasa C, 5U	76,8	1,1
	LFC 0,2 mg/ml	511,9	7,2
	LFC 0,2 mg/ml + fosfolipasa C, 5U	69,4	1

30 µg de fosfodiesterasa I proveniente de DEAE-celulosa se ensaya en presencia de [<sup>3</sup>H]cAMP 5 µM.

Lisofosfatidilcolina (LFC) se agrega en las concentraciones indicadas. En el experimento 2, la fosfolipasa C se agrega a la mezcla de incubación al comienzo de la reacción. Se denomina 1 unidad de fosfolipasa C aquella cantidad de enzima que libera 1 µmol de fosfato/min a 37°C.

La activación por lisofosfatidilcolina es dependiente de la integridad de su estructura molecular, puesto que al hidrolizar el fosfolípido con fosfolipasa C, no se produce activación de la fosfodiesterasa I.

- b. Efecto de la concentración de lisofosfatidilcolina sobre la activación de fosfodiesterasa I nativa y fosfodiesterasa I tripsinizada.

En la figura 10 se muestra el efecto de concentraciones crecientes de lisofosfatidilcolina sobre la actividad de fosfodiesterasa I nativa. Se observa un aumento progresivo de la actividad hasta llegar a una estimulación máxima de 7,2 veces con 100  $\mu\text{g/ml}$  del fosfolípido.

En esta figura se puede observar también que la activación máxima obtenida por el fosfolípido es superior a la alcanzada con calmodulina y calcio (símbolo cuadrado en la ordenada). También es evidente que al agregar  $\text{CaM-Ca}^{2+}$  a la enzima en presencia de 100  $\mu\text{g}$  de lisofosfatidilcolina no se obtiene mayor actividad indicando que el efecto de ambos activadores no es aditivo a concentraciones saturantes de ellos.

Se ha descrito que la fosfodiesterasa I de ovario de Xenopus laevis es activada por un tratamiento controlado con tripsina (Orellana y col., 1981; Orellana y col., 1984). Si se realiza un experimento equivalente al descrito en la figura 10, utilizando una fosfodiesterasa I activada por tripsinización y purificada posteriormente por cromatografía en columna de CaM-sefarosa para eliminar cualquier contaminación

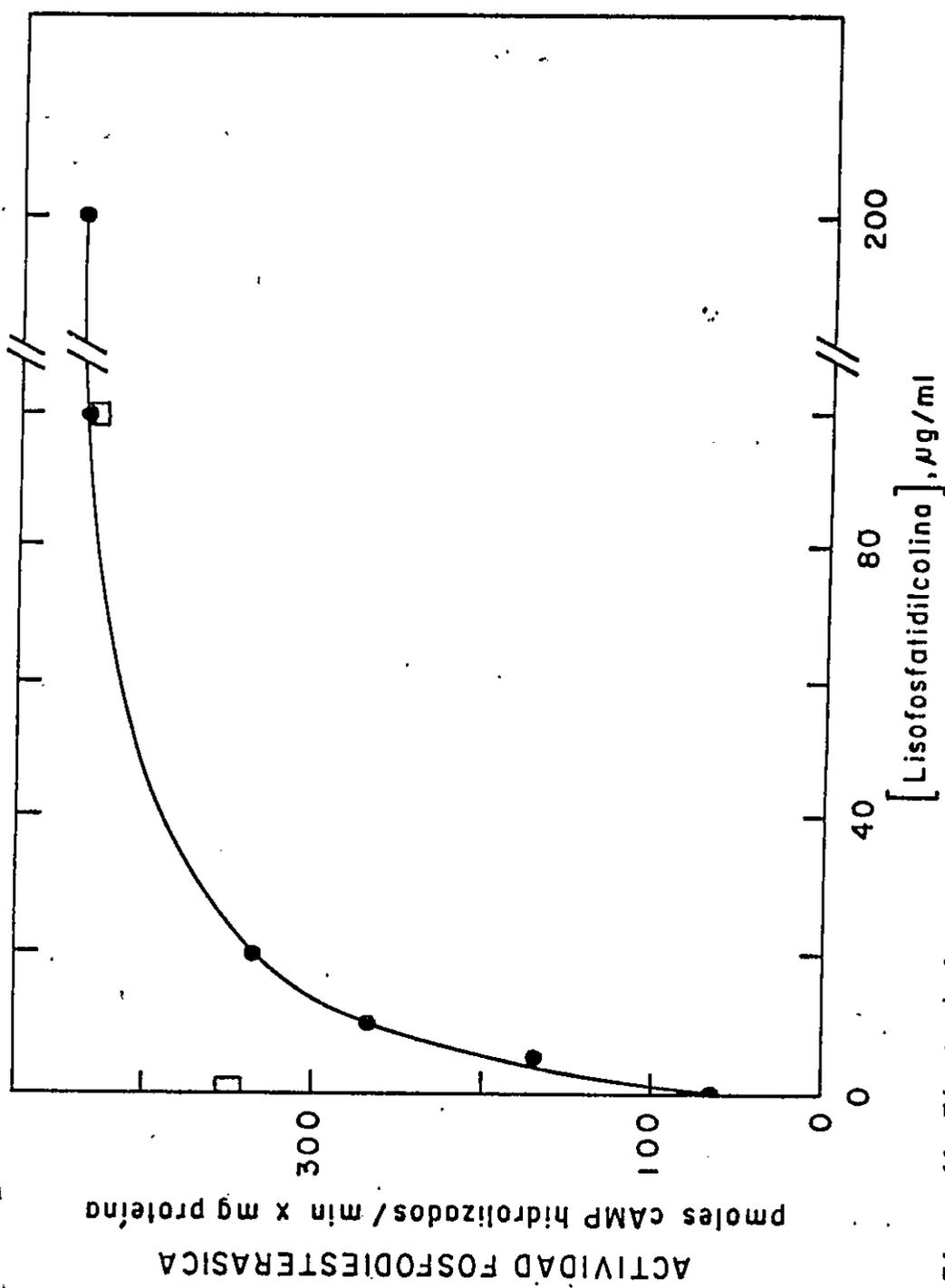


Figura 10. Efecto de la concentración de lisofosfatidilcolina sobre la actividad de la fosfodiesterasa I.

Figura 10. Efecto de la concentración de lisofosfatidilcolina sobre la actividad de fosfodiesterasa I.

9  $\mu\text{g}$  de fosfodiesterasa I purificada por columna de CaM-sefarosa se incuban en presencia de diferentes concentraciones de lisofosfatidilcolina ( $\bullet$ — $\bullet$ ). La medición de actividad fosfodiesterásica estimulada por CaM-Ca<sup>2+</sup> ( $\square$ ) se lleva a cabo en presencia de calmodulina  $3,0 \times 10^{-6}\text{M}$ . Los ensayos se realizan con [<sup>3</sup>H]cAMP 5  $\mu\text{M}$ .

de fosfodiesterasa nativa, se encuentra que la lisofosfatidilcolina no es capaz de activar la enzima previamente activada por tripsinización, indicando nuevamente que estos dos mecanismos de activación no son aditivos (ver tabla IV).

## 2. Acción de derivados de fenotiazina sobre la activación de fosfodiesterasa I por lisofosfatidilcolina.

Se ha sugerido que los lípidos activan la fosfodiesterasa dependiente de  $\text{CaM-Ca}^{2+}$  por un mecanismo semejante al de la calmodulina (Wolff y Brostrom, 1976; Gietzen y col., 1982), teniendo como antecedentes la estructura anfifílica de ambos activadores, como también la variación de los parámetros cinéticos de las reacciones activadas.

En este sentido es interesante estudiar el efecto de antagonistas de calmodulina, como los derivados de fenotiazina, sobre la activación causada por fosfolípidos.

La figura 11 muestra como la fosfodiesterasa activada por lisofosfatidilcolina disminuye progresivamente hacia el valor de actividad basal a medida que se aumenta la concentración de flufenazina. La concentración de la droga necesaria para alcanzar un 50% de la inhibición es de  $1,3 \times 10^{-5}$  M, valor muy semejante al que se obtiene cuando se inhibe la enzima activada por  $\text{CaM-Ca}^{2+}$ . Sin embargo, otro derivado de fenotiazina, el CAPP, que a concentraciones del orden de  $10^{-5}$  M produce un 50% de inhibición de la enzima activada por calmodulina, no tiene ningún efecto sobre la activación por lisofosfatidilcolina a concentraciones aún superiores a  $10^{-4}$  M.

Tabla IV

Efecto la concentración de lisofosfatidilcolina sobre fosfodiesterasa I tripsinizada.

[lisofosfatidilcolina] µg/ml	Actividad fosfodiesterásica pmoles cAMP hidrolizados/min x mg proteína
-	133,0
5	132,8
10	133,7
25	126,4
50	128,3
100	141,8
200	132,7

Una preparación de fosfodiesterasa I proveniente de DEAE-celulosa (5,3mg) se somete a tratamiento con tripsina (2,2 µg/ml) en las condiciones descritas en Métodos.

La enzima tripsinizada se somete a una cromatografía en columna de CaM-sefarosa. Alícuotas de la actividad fosfodiesterásica que no se retiene en dicha columna (29 µg/ensayo) se ensayan en presencia de [<sup>3</sup>H]cAMP 5 µM, con las cantidades indicadas de lisofosfatidil colina. La actividad de la enzima nativa es de 35,0 pmoles cAMP hidrolizados/min x mg proteína.

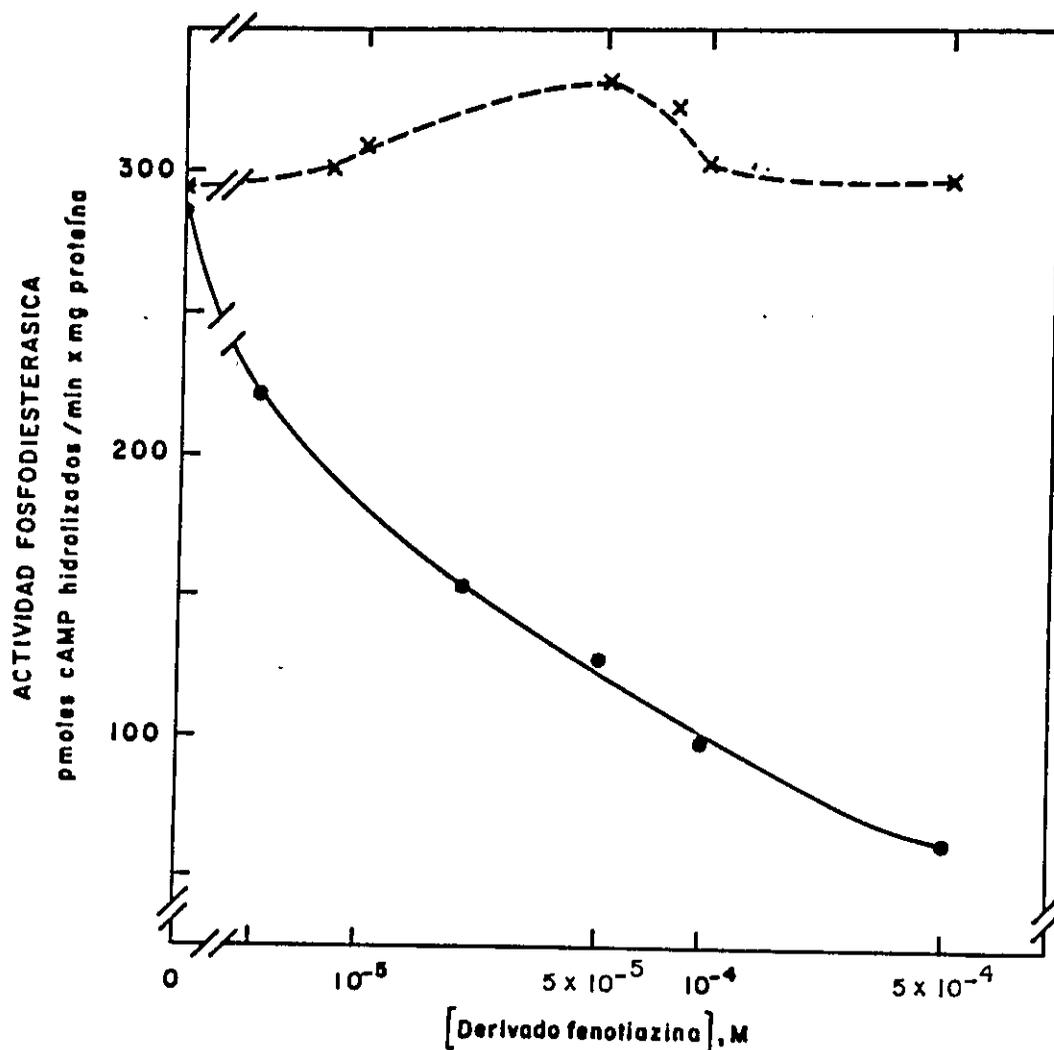


Figura 11. Acción de derivados de fenotiazina sobre la activación de fosfodiesterasa I por lisofosfatidilcolina.

9  $\mu\text{g}$  de una preparación de fosfodiesterasa I purificada por cromatografía en columna de CaM-sefarsosa se tratan con lisofosfatidilcolina en una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  por ensayo, alcanzándose un 65% del valor de activación máxima.

La actividad fosfodiesterásica se mide en presencia de [<sup>3</sup>H]CAMP 5  $\mu\text{M}$  y cantidades crecientes de flufenazina (●—●) o de CAPP (X---X).

## II. UNA PROTEINA DE OVARIO DE XENOPUS LAEVIS CON CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA FOSFODIESTERASA I ACTIVADA POR DIFERENTES COMPUESTOS.

Como se ha mencionado en la introducción, hasta la fecha se ha descrito con cierto detalle la caracterización de dos inhibidores proteicos de la activación de calmodulina sobre fosfodiesterasa, extraídos de cerebro de bovino, y el aislamiento de una serie de proteínas que se unen a calmodulina, impidiendo su acción activadora.

Estos antecedentes y la falta de actividad de la fosfodiesterasa I in vivo y en extractos crudos de ovario (Echeverría y col., 1981; Allende y Allende, 1982) nos llevaron a buscar un inhibidor de la activación de calmodulina en extractos de ovario de Xenopus laevis.

### 1. Preparación de la proteína inhibitoria.

La poca actividad fosfodiesterásica susceptible a calmodulina y  $Ca^{2+}$  en los extractos crudos de ovario, y la aparición de una fosfodiesterasa activable por calmodulina, como componente mayoritario después del fraccionamiento de dichos extractos por cromatografía en DEAE-celulosa (Echeverría y col., 1981), nos sugirieron que dicha cromatografía podría estar retirando un compuesto inhibitorio.

La figura 12 muestra el patrón de elución de una columna de DEAE-celulosa que se prepara y eluye en las mismas condiciones descritas en Métodos para la obtención de fosfodiesterasa I. Se puede observar la elución de las actividades de fosfodiesterasa I y II a 0,2 M y a 0,30 M de acetato de sodio respectivamente.

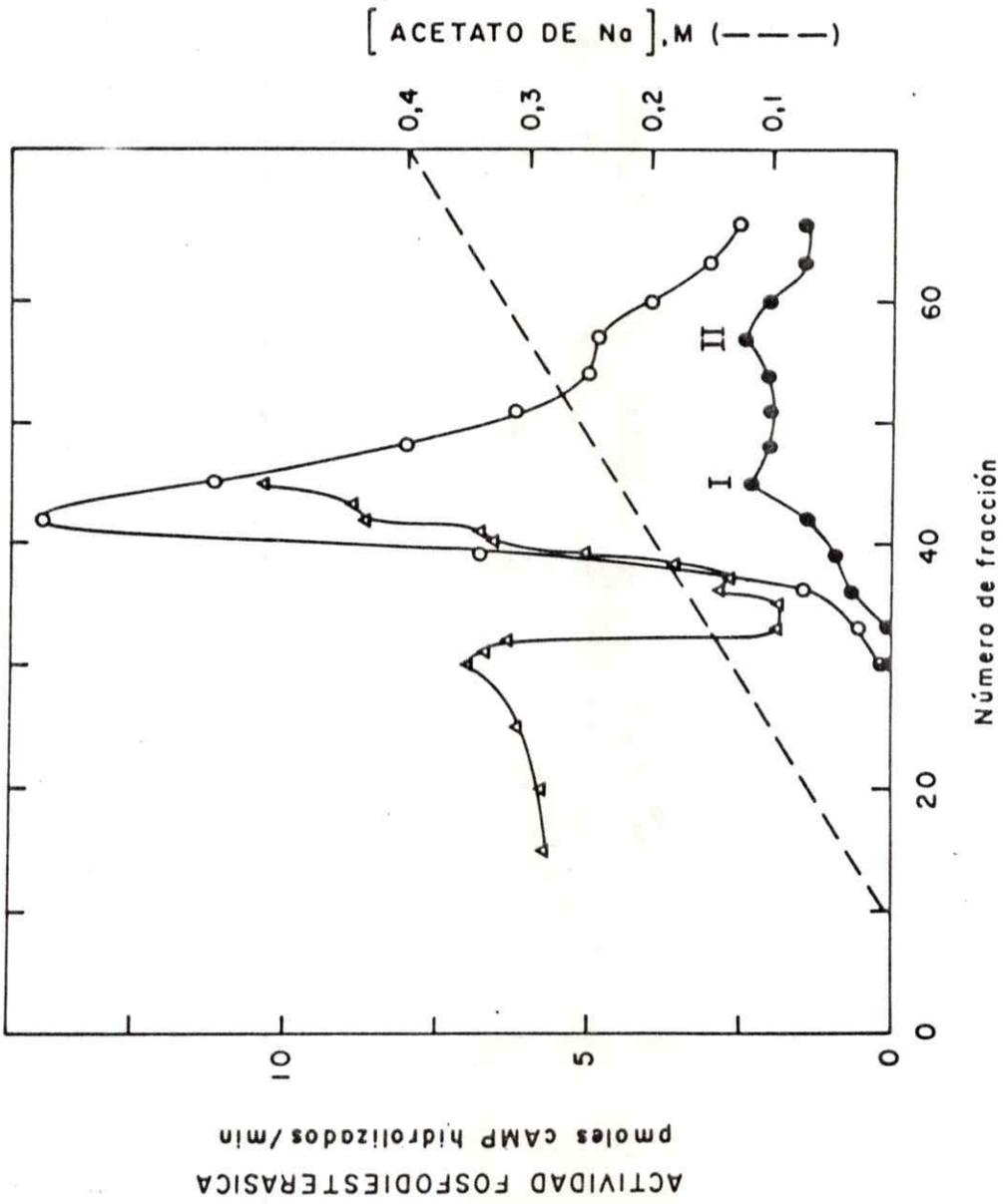


Figura 12. Separación de la proteína inhibidora de las actividades fosfodiesterásicas por cromatografía en columna de DEAE-celulosa.

Figura 12. Separación de la proteína inhibitoria de las actividades fosfodiesterásicas por cromatografía en columna de DEAE-celulosa.

La preparación del extracto de ovario de Xenopus laevis, la adsorción y elución en columna de DEAE-celulosa (DE-52) se llevan a cabo como se describe en Métodos.

La actividad fosfodiesterásica endógena, tanto basal (●—●) como estimulada por CaM-Ca<sup>2+</sup> (o—o) se miden en alícuotas de 20 µl de cada fracción en presencia de [<sup>3</sup>H]cAMP 5 µM.

La actividad inhibitoria (Δ—Δ) se evidencia ensayando 50 µg de una preparación de fosfodiesterasa I proveniente de la etapa de purificación en DEAE-celulosa activada por calmodulina 2,4 x 10<sup>-8</sup> M (alcanzándose un 98% de la activación máxima) y una alícuota de 100 µl de las fracciones de la columna en las condiciones descritas en Métodos.

El gradiente de concentración salina (---) se verifica midiendo la conductividad de las fracciones de la columna.

Al analizar algunas fracciones de esta separación cromatográfica donde no existe actividad fosfodiesterásica, en presencia de fosfodiesterasa I, calmodulina y  $\text{Ca}^{2+}$ , se observa que la activación disminuye. Es decir, que las fracciones que eluyen entre las concentraciones 0,14 y 0,18 M de acetato de sodio, muestran una actividad inhibitoria de la fosfodiesterasa I activada por CaM- $\text{Ca}^{2+}$ .

Estas fracciones constituyen la preparación de proteína inhibitoria utilizada en una serie de experimentos que se señalan a continuación.

## 2. Características generales de la proteína inhibitoria.

### a. Pruebas de su carácter proteico.

La actividad inhibitoria se pierde al calentar una preparación del inhibidor a  $100^\circ$  por 2 minutos. Este compuesto precipita con sulfato de amonio a concentraciones de 40 a 80% de saturación a  $0^\circ$ .

El carácter proteico del inhibidor se confirma midiendo su susceptibilidad a la hidrólisis proteolítica. Una preparación del inhibidor se somete a la acción de 3 enzimas proteolíticas diferentes: tripsina, quimotripsina y subtilisina. Una vez finalizado el tratamiento, se ensaya su capacidad para inhibir la fosfodiesterasa I activada por CaM- $\text{Ca}^{2+}$ .

En la tabla V se encuentra el resultado de este experimento, que indica que la actividad inhibitoria es totalmente eliminada por la acción de la quimotripsina, y parcialmente por la de tripsina y subtilisina.

Tabla V

Sensibilidad del inhibidor a enzimas hidrolíticas.

Adición al ensayo		Actividad fosfodiesterásica <u>pmoles cAMP hidrolizados</u> min x mg proteína	% inactivación actividad inhibitoria
calmodulina	proteína inhibitoria		
-	-	51,8	-
+	-	214,6	-
+	N*	53,5	-
+	T*	104,2	36
+	Q*	208,5	97
+	S*	130,8	43

625 µg de una preparación de una proteína inhibitoria proveniente de DEAE-celulosa se preincuban por 60 minutos a 30°C ya sea con tripsina, quimotripsina o subtilisina en una concentración de 50 µg/ml en cada caso. Las reacciones se detienen agregando una solución que contiene PMSF e inhibidor de tripsina de poroto de soya, en una concentración final de 2,5 mM y 0,6 mg/ml respectivamente.

Una alícuota de esta mezcla de incubación (125 µg proteína) se ensaya para determinar su actividad inhibitoria utilizando fosfodiesterasa I proveniente de DEAE-celulosa (50 µg) y calmodulina  $3,0 \times 10^{-8}M$ , en presencia de [ $^3H$ ]cAMP 5 µM.

N\* : proteína inhibitoria nativa

T\* : proteína inhibitoria preincubada con tripsina

Q\* : proteína inhibitoria preincubada con quimotripsina

S\* : proteína inhibitoria preincubada con subtilisina

b. Determinación de su peso molecular y estructura.

Usando la técnica de filtración en geles de Sefacril S-200, se determina el peso molecular de la proteína con actividad inhibitoria.

La figura 13 muestra el resultado de una filtración en este tipo de columna, de una preparación de proteína inhibitoria proveniente de una cromatografía en DEAE-celulosa.

Se puede observar la aparición de un pico de actividad inhibitoria, cuyo volumen de elución ( $V_e$ ) permite determinar su valor de  $K_{av}$  como se describe en Métodos.

El gráfico mostrado en la figura 14 permite deducir un peso molecular relativo, de 94.000, para la proteína inhibitoria.

Con el fin de obtener información acerca de la estructura molecular de la proteína inhibitoria, se lleva a cabo una electroforesis en condiciones desnaturantes de una preparación que se ha sometido a las siguientes etapas de purificación: un extracto preparado a partir de 164 g de ovario se somete a una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. La solución resultante de juntar todas las fracciones con actividad inhibitoria contiene 39 mg de proteína y 650 unidades de proteína inhibitoria.

Esta solución se filtra en una columna de Sefacril S-200 recuperándose 408 unidades de proteína inhibitoria y 14,4 mg totales de proteínas. Finalmente se somete este eluido a una cromatografía en una columna de afinidad de CaM-sefarosa (cuyas características de elución se muestran en la figura 16) de donde

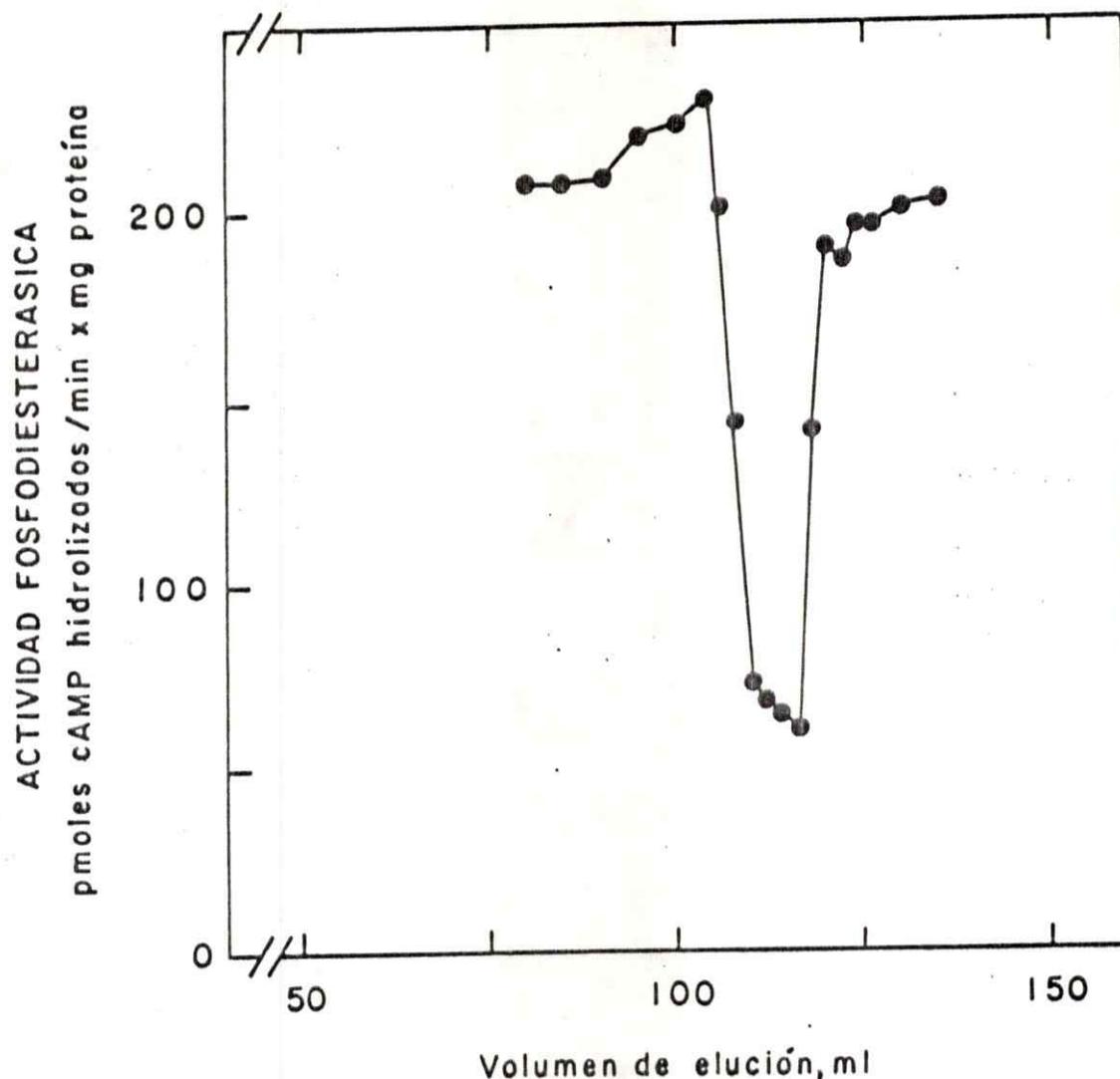


Figura 13. Filtración de la proteína inhibitoria en gel de Sefacril S-200.

15 mg de una preparación de proteína inhibitoria proveniente de la etapa de purificación en DEAE-celulosa, en un volumen de 1 ml, se filtran por una columna de Sefacril S-200 superfino como se describe en Métodos.

La actividad inhibitoria se determina en una alícuota de 100  $\mu$ l de cada fracción que se ensaya en presencia de 25  $\mu$ g de fosfodiesterasa I. proveniente de una cromatografía en DEAE-celulosa, estimulada por calmodulina  $1,5 \times 10^{-8}$ M.

La actividad basal de la enzima es de 58,0 pmoles de cAMP hidrolizados/min x mg proteína, y la actividad estimulada es de 196 pmoles/min x mg proteína; ambas actividades medidas en presencia de [ $^3$ H]cAMP 5  $\mu$ M.

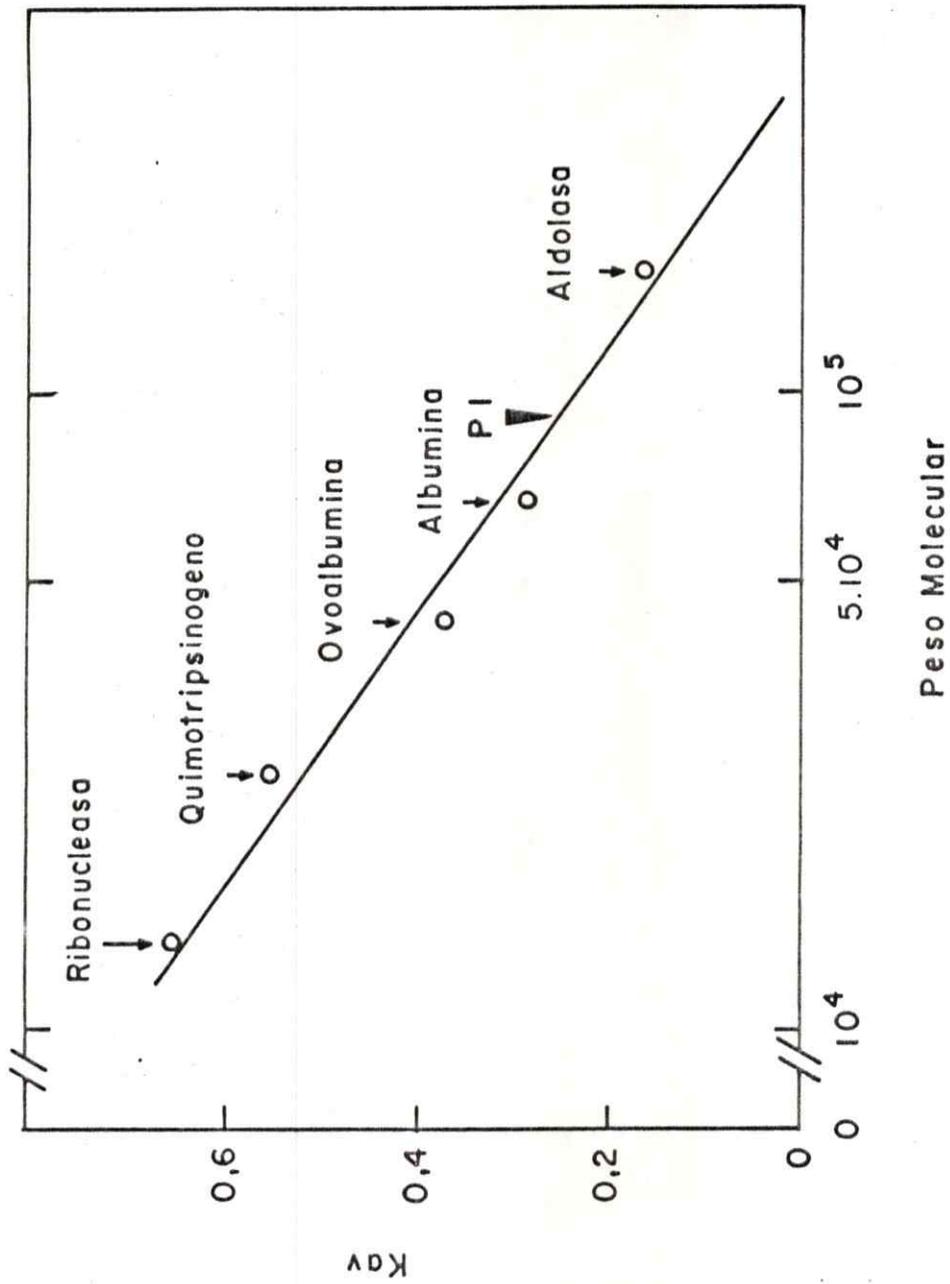


Figura 14. Determinación del peso molecular relativo de la proteína inhibitoria.

*Figura 14. Determinación del peso molecular relativo de la proteína inhibitoria.*

Los patrones proteicos utilizados en la calibración de la columna son los indicados en la figura y sus respectivos pesos moleculares están señalados en la sección Métodos.

PI representa la proteína inhibitoria.

La recta representa la curva de regresión trazada según el método de los mínimos cuadrados.

es posible recuperar 27 unidades de proteína inhibitoria. (El contenido de proteína de esta solución es muy bajo y no se alcanza a detectar con los métodos convencionales).

La figura 15 muestra el resultado de una electroforesis de 13 unidades de la proteína inhibitoria así purificada en un gel de poliácridamida con SDS teñido con el método del nitrato de plata (canal 3).

La cromatografía de afinidad representa una excelente etapa de purificación, puesto que elimina las proteínas contaminadas que coeluyen con la proteína inhibitoria de la columna Sepacril S-200 (canal 2). Teniendo en cuenta la sensibilidad del método de tinción del nitrato de plata, se puede hacer un cálculo aproximado del contenido de proteína de esta preparación, y por lo tanto de la actividad específica de la proteína inhibitoria, deduciéndose que la columna de afinidad purifica alrededor de 500 veces.

Se obtiene así un preparación aparentemente homogénea, donde la única banda detectable posee un peso molecular de 44.000. Este resultado sugiere que la proteína inhibitoria, que presenta un peso molecular de 94.000, determinado por el método de filtración en sefadex, estaría compuesta por dos subunidades de igual peso molecular.

#### c. Especificidad de la inhibición.

En un primer intento de comprender el mecanismo de acción de la proteína inhibitoria, se estudia su efecto sobre diversas formas enzimáticas y sobre la fosfodiesterasa activada

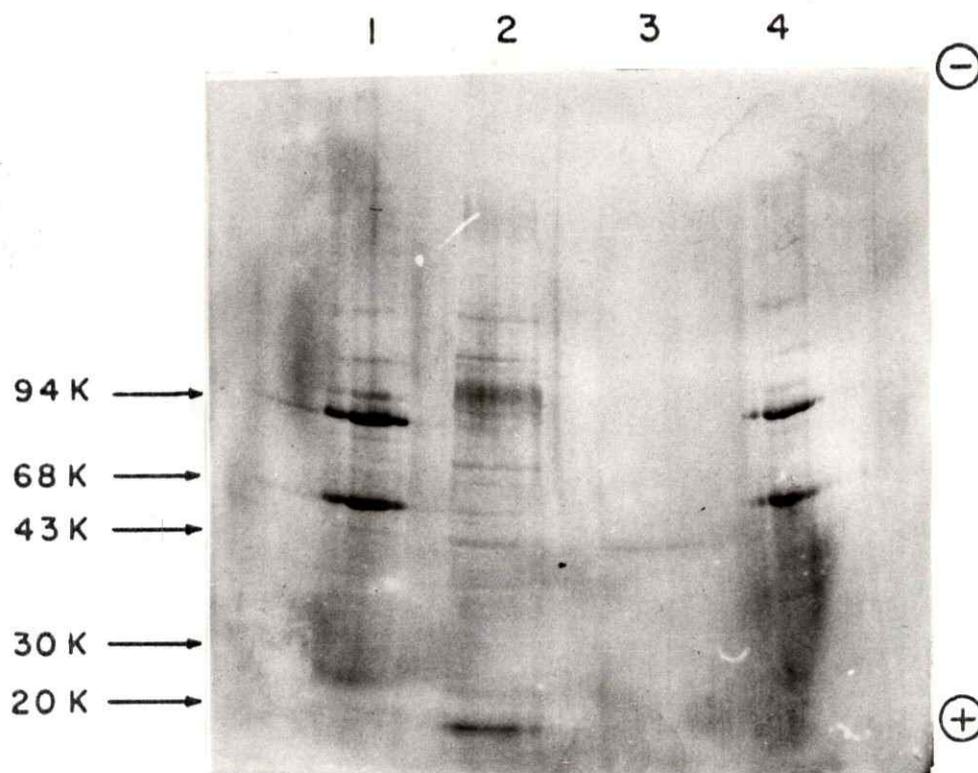


Figura 15. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

Alícuotas de la preparación purificada por columna de Sefacril S-200 (canal 2) y CaM-sefarosa (canal 3) se someten a electroforesis en geles de poliacrilamida al 9% con SDS. El gel es corrido y teñido con nitrato de plata como se describe en Métodos.

En los canales 1 y 4 aparecen las proteínas de referencia cuyos pesos moleculares se indican entre paréntesis: fosforilasa b (94.000), seroalbúmina de bovino (68.000), ovoalbúmina (43.000), anhidrasa carbónica (30.000) e inhibidor de tripsina (20.000).

Los canales 2 y 3 representan la electroforesis de una preparación de proteína inhibitoria obtenida de una filtración en Sefacril S-200 y de una cromatografía en columna de afinidad de CaM-sefarosa, respectivamente.

por diferentes agentes activadores.

Los resultados mostrados en la tabla VI indican que ni la actividad basal de la fosfodiesterasa I, ni la actividad de la fosfodiesterasa II (forma enzimática no activable por  $\text{CaM-Ca}^{2+}$ ) son afectadas por la presencia de la proteína inhibitoria. En cambio, la activación por calmodulina de la fosfodiesterasa I de ovario de Xenopus laevis y de la fosfodiesterasa sensible a  $\text{CaM-Ca}^{2+}$  de cerebro de bovino, es totalmente eliminada por la presencia de la proteína inhibitoria.

Los resultados mostrados en esta tabla utilizando cAMP como sustrato, son igualmente válidos al ensayar la enzima con cGMP como sustrato (resultados que no se muestran).

Los resultados presentados anteriormente en esta tesis, demuestran que la actividad de fosfodiesterasa I es susceptible de ser activada por lisofosfatidilcolina, por calmodulina extraída de ovario de Xenopus laevis y por tratamiento controlado con proteasas.

El objetivo del experimento cuyos resultados se muestran en la tabla VII es estudiar el efecto de la proteína inhibitoria sobre la actividad de fosfodiesterasa I estimulada por varios agentes activantes.

En los experimentos 1 y 2, la actividad basal de fosfodiesterasa I es activada entre 3 y 4 veces por calmodulina de oocito y lisofosfatidilcolina respectivamente; al incubar la enzima simultáneamente con el agente activante y con la proteína inhibitoria se obtiene nuevamente una reducción de la actividad

Tabla VI

Actividad inhibitoria frente a diversas formas de fosfodiesterasa.

Exp. N°	Especie y origen de fosfodiesterasa	CaM cerebro de bovino	Proteína Inhibitoria	Activ.fosfodiesterásica
				$\frac{\text{pmoles cAMP hidrolizados}}{\text{min x mg proteína}}$
1	I (ovario)	-	-	44,5
	I (ovario)	-	+	45,5
	I (ovario)	+	-	205,0
	I (ovario)	+	+	46,2
2	II (ovario)	-	-	95,2
	II (ovario)	-	+	101,3
3.	CaM-dependiente (cerebro de bovino)	-	-	$10,3 \times 10^6$
	CaM-dependiente (cerebro de bovino)	+	-	$25,5 \times 10^6$
	CaM-dependiente (cerebro de bovino)	+	+	$8,9 \times 10^6$

En el experimento 1 se ensaya 25  $\mu\text{g}$  de preparación de fosfodiesterasa I proveniente de DEAE-celulosa en ausencia y presencia de calmodulina de cerebro de bovino  $1,5 \times 10^{-8}\text{M}$ .

En el experimento 2 se ensayan 50  $\mu\text{g}$  de una preparación de fosfodiesterasa II proveniente de DEAE-celulosa. En ambos experimentos la concentración de [ $^3\text{H}$ ]cAMP es de 5  $\mu\text{M}$ .

En el experimento 3, 10 ng de fosfodiesterasa purificada a homogeneidad de cerebro de bovino se activan con calmodulina  $3,7 \times 10^{-9}\text{M}$ , en presencia de [ $^3\text{H}$ ]cAMP 200  $\mu\text{M}$  (a.e.: 7200 cpm/mmol).

Las concentraciones de calmodulina utilizadas producen un 97% de la activación máxima de la enzima.

En los tres experimentos se emplea una preparación de proteína inhibitoria proveniente de DEAE-celulosa (115  $\mu\text{g}$  por ensayo).

Tabla VII

Actividad inhibitoria frente a diversos agentes activantes.

Exp. N°	Agente activador	Proteína Inhibitoria	Actividad fosfodiesterásica <u>pmoles cAMP hidrolizados</u> min x mg proteína
1.	Ninguno	-	51,8
	Calmodulina (ovario)	-	162,1
	Calmodulina (ovario)	+	49,8
2.	Ninguno	-	55,0
	Lisofosfatidilcolina	-	195,2
	Lisofosfatidilcolina	+	56,2
3.	Ninguno	-	42,1
	Tratamiento con tripsina	-	241,3
	Tratamiento con tripsina	+	143,1

30  $\mu\text{g}$  de una preparación de fosfodiesterasa I proveniente de DEAE-celulosa se incuban con (1) 191  $\mu\text{g}$  de una preparación de calmodulina de ovario purificada por cromatografía de afinidad como se describe en Métodos (obteniéndose un 98% de la activación máxima), o con (2) 200  $\mu\text{g/ml}$  de lisofosfatidilcolina (obteniéndose un 100% de la activación máxima). (3) 500  $\mu\text{g}$  de fosfodiesterasa I proveniente de DEAE-celulosa se preincuban con 1  $\mu\text{g/ml}$  de tripsina en las condiciones descritas en Métodos (obteniéndose un 85% de la activación máxima).

En los 3 experimentos se agregan 130  $\mu\text{g}$  de una preparación de proteína inhibitoria proveniente de DEAE-celulosa, donde se señala.

Los ensayos se realizan en las condiciones descritas en Métodos utilizando cAMP 5  $\mu\text{M}$ .

llegando a valores de actividad basal.

La preincubación de fosfodiesterasa I con tripsina provoca una activación de alrededor de 6 veces de la actividad enzimática basal. La incubación de esta enzima así activada, con la proteína inhibitoria, se traduce en una pérdida de la actividad estimulada en alrededor de un 50%. Hasta el momento no ha sido posible encontrar condiciones que lleven a un mayor porcentaje de inhibición. (En la sección II-4 se vuelve sobre este punto).

Como se ha dicho, una gran variedad de enzimas son regulables por el complejo CaM-Ca<sup>2+</sup> (revisión en Klee y Vanaman, 1982). Este hecho hace posible enfocar desde otro punto de vista la especificidad de la proteína inhibitoria, es decir, observar su capacidad de inhibir la activación por CaM-Ca<sup>2+</sup> de una enzima diferente a la fosfodiesterasa.

La quinasa de la cadena liviana de la miosina de músculo liso, enzima que cataliza la transferencia del fosfato  $\gamma$  del ATP a la miosina, requiere de Ca<sup>2+</sup> y de calmodulina para su actividad (Dabrowska y col., 1977), siendo totalmente inactiva en ausencia de estos efectores. Los resultados de la tabla VIII muestran que es posible obtener una inhibición del 75% de la quinasa de la cadena liviana de la miosina por acción de la proteína inhibitoria de ovario.

Es interesante hacer notar que la proteína inhibitoria no muestra una actividad fosfatásica intrínseca respecto a histona H<sub>2</sub>b fosforilada (resultado no mostrado), hecho que descarta

Tabla VIII

La quinasa de la cadena liviana de la miosina activada por calmodulina es inhibida por la proteína inhibitoria.

Adición	Actividad quinásica pmoles $PO_4^{-3}$ /min
-	0
CaM	1,20
CaM + proteína inhibitoria	0,24

La quinasa de la cadena liviana de la miosina se ensaya como se describe en Métodos. Donde corresponde se agrega calmodulina en una concentración final de  $1,2 \times 10^{-9}M$ , y 25  $\mu g$  de una preparación de proteína inhibitoria purificada por filtración en columna de Sefacril S-200. Los datos corresponden a una incubación de 5 minutos, tiempo en el cual la reacción es lineal.

La concentración de calmodulina utilizada produce una activación máxima de la enzima.

la posibilidad de una semejanza con calcineurina (Stewart y col., 1982).

d. Interacción entre la proteína inhibitoria y la calmodulina.

Uno de los métodos para determinar si una proteína interactúa con calmodulina en una forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , es estudiar su capacidad de retención en una columna de afinidad de CaM-sefaroosa en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ .

La figura 16 muestra el resultado de una cromatografía de afinidad en este tipo de columna de una preparación de proteína inhibitoria obtenida después de una filtración en columna de Sefacril S-200 (ver Métodos). Se puede observar que la actividad inhibitoria de la estimulación por calmodulina queda retenida en el gel, y es eluida al eliminar el  $\text{Ca}^{2+}$ , por lavado con solución amortiguadora D, que contiene EGTA.

Este resultado indica que la proteína inhibitoria es capaz de unirse a calmodulina en una forma dependiente de la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ .

3. Caracterización adicional de la inhibición de fosfodiesterasa I activada por calmodulina o lisofosfatidilcolina.

Las tablas VI y VII muestran que la proteína inhibitoria es capaz de inhibir la activación de fosfodiesterasa I tanto por calmodulina como por lisofosfatidilcolina. Los experimentos que se describen a continuación tienen como finalidad caracterizar con mayor detalle estas inhibiciones.

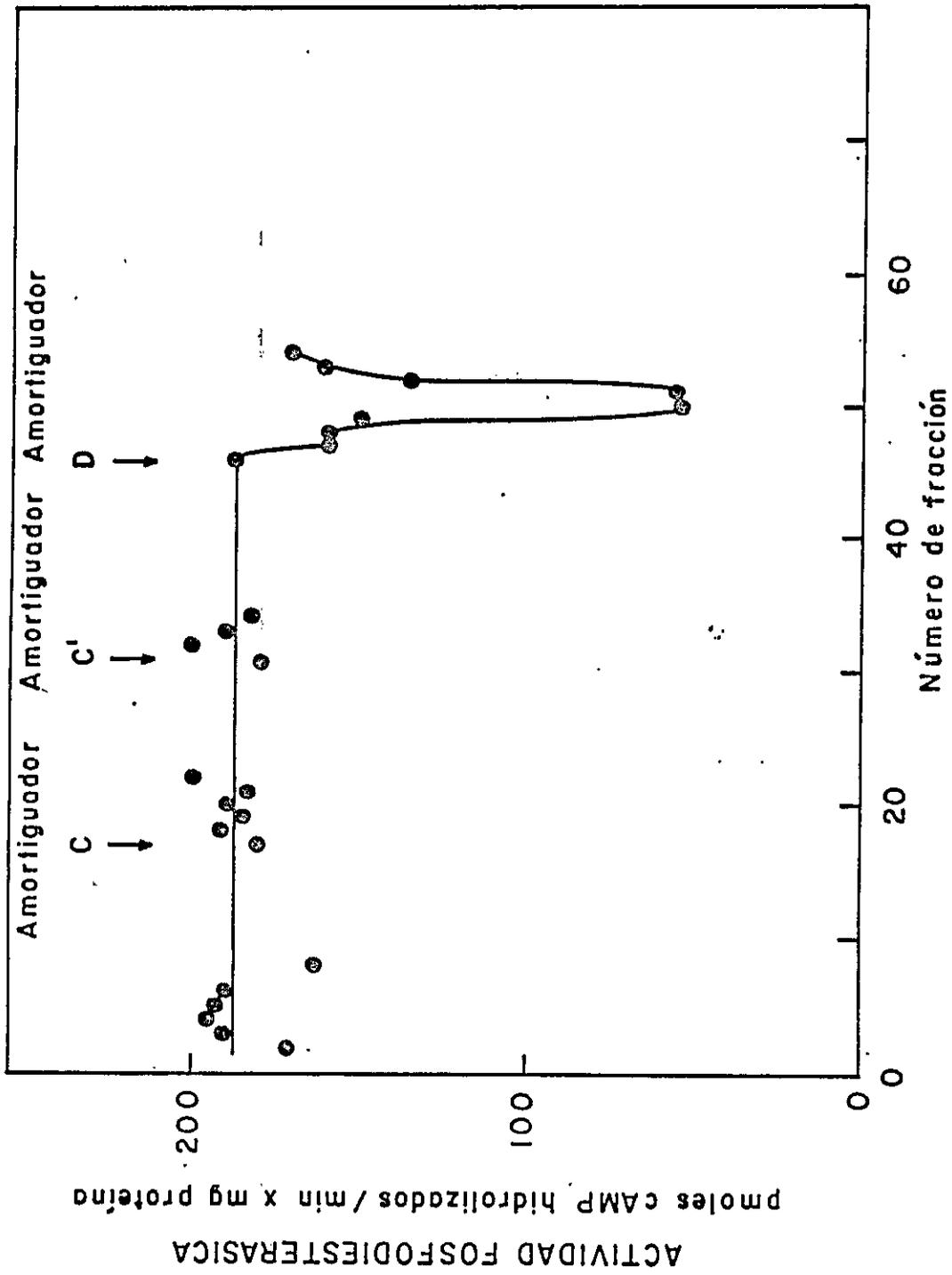


Figura 16. Retención de la proteína inhibidora en columna de Cal-Sepharosa.

Figura 16. Retención de la proteína inhibitoria en columna de afinidad de CaM-Sefarosa.

6,6 mg de una preparación de proteína inhibitoria que ha sido previamente purificada por cromatografía en DEAE-celulosa y filtración en columna de Sefacril S-200, se colocan en una columna de afinidad de 1 ml de CaM-sefarosa en las condiciones de adsorción y elución que se describen en Métodos.

100  $\mu$ l de cada fracción se ensayan por actividad inhibitoria utilizando 50  $\mu$ g de una preparación de fosfodiesterasa I proveniente de la etapa de purificación en DEAE-celulosa, estimulada con calmodulina,  $6,0 \times 10^{-8}$  M. La actividad basal de la enzima es de 52,0 pmoles de cAMP hidrolizados/min x mg proteína.

Las flechas indican el punto en que se lava la columna con las soluciones amortiguadoras indicadas.

a. Dependencia de la concentración de la proteína inhibitoria.

El grado de activación de fosfodiesterasa I por CaM-Ca<sup>2+</sup> y por lisofosfatidilcolina va disminuyendo a medida que se incrementa la concentración de proteína inhibitoria en el ensayo (figura 17), alcanzándose en ambos casos los valores basales de actividad enzimática en presencia de cantidades semejantes de proteína inhibitoria.

La reacción de inhibición de la activación por CaM-Ca<sup>2+</sup> puede realizarse en condiciones de concentraciones de CaCl<sub>2</sub> 10 veces superiores a la descrita, sin obtenerse reversión de la inhibición. Este resultado indica que la proteína inhibitoria no actúa por un mecanismo de quelación del Ca<sup>2+</sup> del medio. La actividad inhibitoria con respecto a la activación por lisofosfatidilcolina es independiente de la presencia de iones Ca<sup>2+</sup>, puesto que se obtiene una inhibición análoga cuando la reacción se hace en presencia de EGTA.

El hecho que la proteína inhibitoria suprima la acción de la fosfodiesterasa I activada por ambos efectores, sugiere la pregunta de si otro inhibidor proteico de la acción de calmodulina sería capaz de actuar sobre la activación por fosfolípidos. En la figura 8 se mostró que la melitina es capaz de inhibir la activación por calmodulina; sin embargo, en el sistema activado por lisofosfatidilcolina, no se observa variación en la actividad estimulada, en un margen de concentraciones del péptido entre 5 nM y 2,5 µM (resultado que no se muestra).

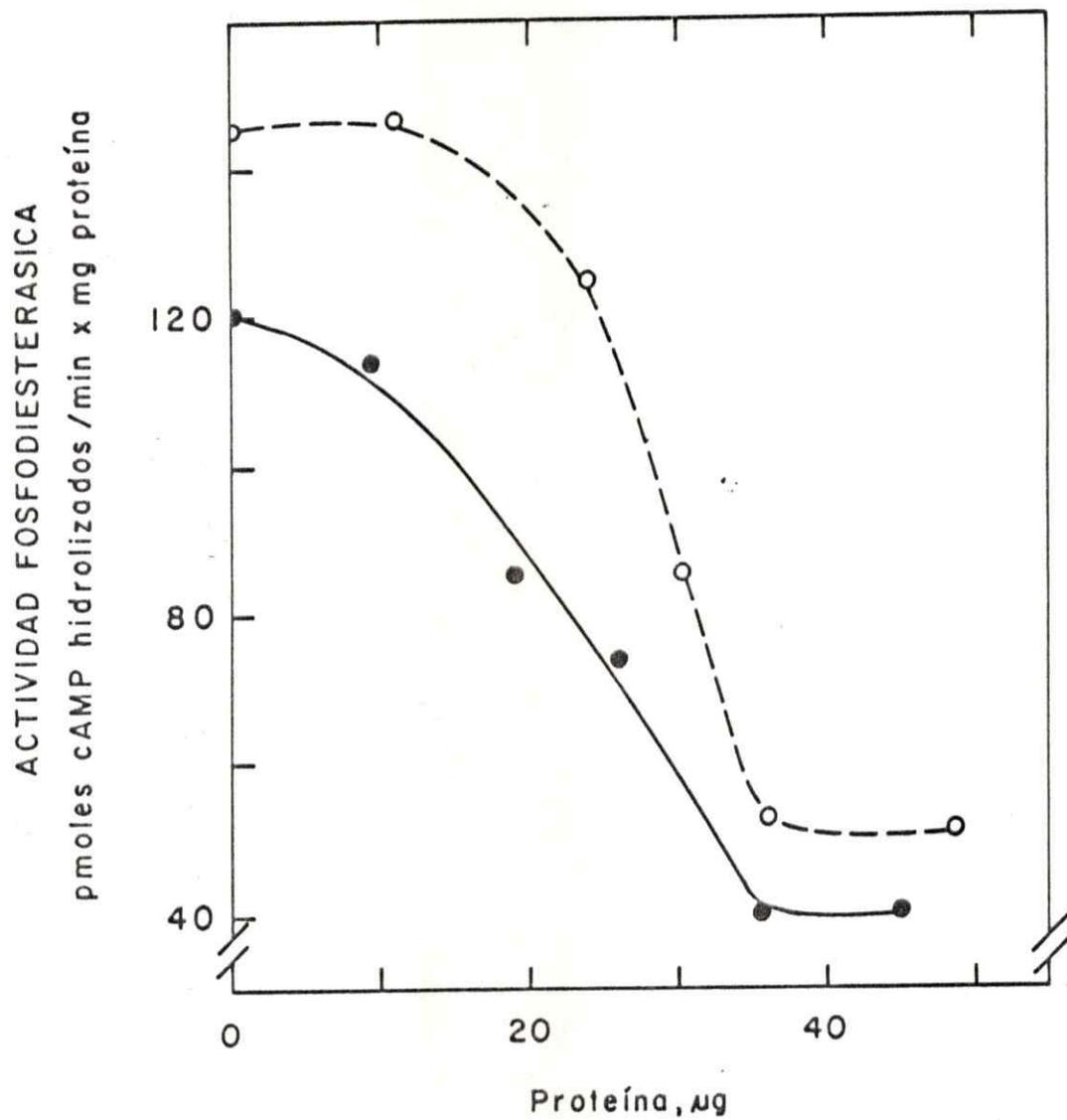


Figura 17. Efecto de la proteína inhibitoria sobre la activación de fosfodiesterasa I por calmodulina y lisofosfatidilcolina.

Figura 17. Efecto de la proteína inhibitoria sobre la activación de fosfodiesterasa I por calmodulina y lisofosfatidilcolina.

16  $\mu\text{g}$  de fosfodiesterasa I proveniente de la etapa de purificación en DEAE-celulosa, con una actividad basal de 44,8 pmoles de cAMP hidrolizados/min x mg proteína se incuban con calmodulina de cerebro de bovino,  $1,5 \times 10^{-8}\text{M}$  (o---o). Esta concentración permite obtener un 98% de la activación máxima de la enzima.

16  $\mu\text{g}$  de fosfodiesterasa I proveniente de la etapa de purificación en DEAE-celulosa, con una actividad basal de 40,0 pmoles de cAMP hidrolizados/min x mg proteína se incuban con 70  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de lisofosfatidilcolina (●—●). Esta concentración permite obtener un 97% de la activación máxima de la enzima.

Ambas incubaciones se efectúan como se describe en Métodos, en presencia de [ $^3\text{H}$ ]cAMP 5 $\mu\text{M}$ , agregando las cantidades señaladas de una preparación de proteína inhibitoria purificada por filtración en columna de Sefacril S-200.

- b. Desplazamiento de la inhibición por aumento de la concentración del agente activante.

La inhibición de la activación de fosfodiesterasa I por lisofosfatidilcolina o por calmodulina, por efecto de la proteína inhibitoria, es totalmente revertida al aumentar la concentración del agente activante en el medio de incubación (figura 18 A y 18 B respectivamente).

En la figura 18 A se puede observar que en la reacción efectuada en presencia de 1,7 unidades de proteína inhibitoria, la concentración de lisofosfatidilcolina necesaria para alcanzar la mitad de la activación máxima es alrededor del doble de la concentración usada en la reacción control.

En la figura 18 B se muestra el resultado de un experimento de activación de fosfodiesterasa I por calmodulina en ausencia y en presencia de 3 concentraciones diferentes de proteína inhibitoria. Se puede observar que los valores de  $[CaM]_{50}$  van aumentando proporcionalmente con el aumento de la concentración del inhibidor.

Cabe hacer notar que la inhibición de la activación de fosfodiesterasa por lisofosfatidilcolina es totalmente revertida por concentraciones saturantes de calmodulina, lo que sugiere que el mismo inhibidor estaría actuando sobre ambos mecanismos de activación.

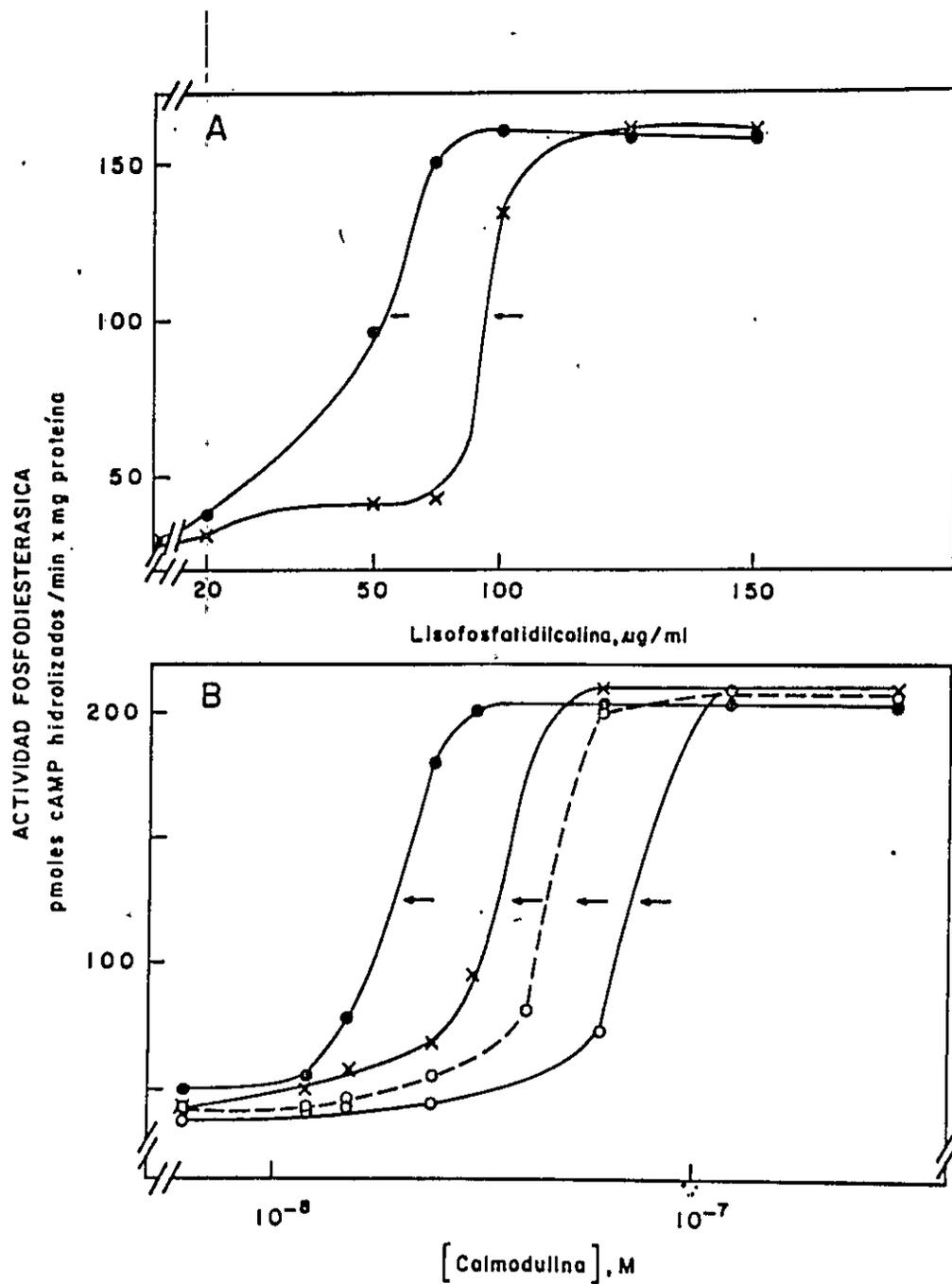


Figura 18. Desplazamiento de la inhibición por aumento de la concentración del agente activador.

Figura 18. Desplazamiento de la inhibición por aumento de la concentración del agente activador.

16  $\mu\text{g}$  de fosfodiesterasa I proveniente de la etapa de purificación en DEAE-celulosa se incuban como se describe en Métodos, en presencia de [ $^3\text{H}$ ]cAMP 5  $\mu\text{M}$ , con concentraciones variables de lisofosfatidilcolina en ausencia ( $\bullet\text{---}\bullet$ ) y presencia ( $\text{X---X}$ ) de 1,7 unidades (36  $\mu\text{g}$ ) de proteína inhibitoria purificada por filtración en Sefacril S-200 (A).

15  $\mu\text{g}$  de fosfodiesterasa I proveniente de la etapa de purificación en DEAE-celulosa se incuban como se describe en Métodos, en presencia de [ $^3\text{H}$ ]cAMP 5  $\mu\text{M}$ , con concentraciones variables de calmodulina de cerebro de bovino, en ausencia de proteína inhibitoria ( $\bullet\text{---}\bullet$ ) o en presencia de 1,25 unidades ( $\text{X---X}$ ), 2 unidades ( $\text{o---o}$ ) o 3,5 unidades ( $\text{o---o}$ ) de ella (B). Estas unidades corresponden a 75, 120 y 210  $\mu\text{g}$  respectivamente de una preparación de proteína inhibitoria proveniente de una cromatografía en DEAE-celulosa.

Las flechas indican la concentración del agente activante necesaria para alcanzar la mitad de la activación máxima.

- c. Efecto de la proteína inhibitoria sobre los parámetros cinéticos de la fosfodiesterasa I activada por calmodulina y lisofosfatidilcolina.

Varios autores han descrito que para la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina y calcio de cerebro de bovino la activación por calmodulina lleva a un aumento en la  $V_{max}$  de la reacción sin afectar en forma significativa la  $K_m$  aparente. Esto mismo fue demostrado para la enzima de Xenopus laevis (Echeverría y col., 1981). Resultados equivalentes se obtienen para la activación de la enzima de mamífero por fosfolípidos (Wolff y Brostrom, 1976; Hidaka y col., 1978; Pichard y Cheung, 1977).

Los resultados mostrados en las figuras 19 y 20 confirman estos datos para la fosfodiesterasa I de ovario de Xenopus laevis. El efecto de la proteína inhibitoria en este sistema se refleja en una disminución de la  $V_{max}$  de las reacciones activadas por calmodulina (figura 19) y por lisofosfatidilcolina (figura 20) hasta alcanzar los valores de  $V_{max}$  de la reacción medida en condiciones basales.

La  $K_m$  aparente de ninguna de estas reacciones se ve afectada en forma significativa por la presencia de la proteína inhibitoria.

En la tabla IX aparecen tabulados los valores de las constantes cinéticas de la reacción en condiciones basales, activadas por ambos agentes activantes e inhibidas por la proteína inhibitoria, obtenidos de los gráficos de la figuras 19 y 20.

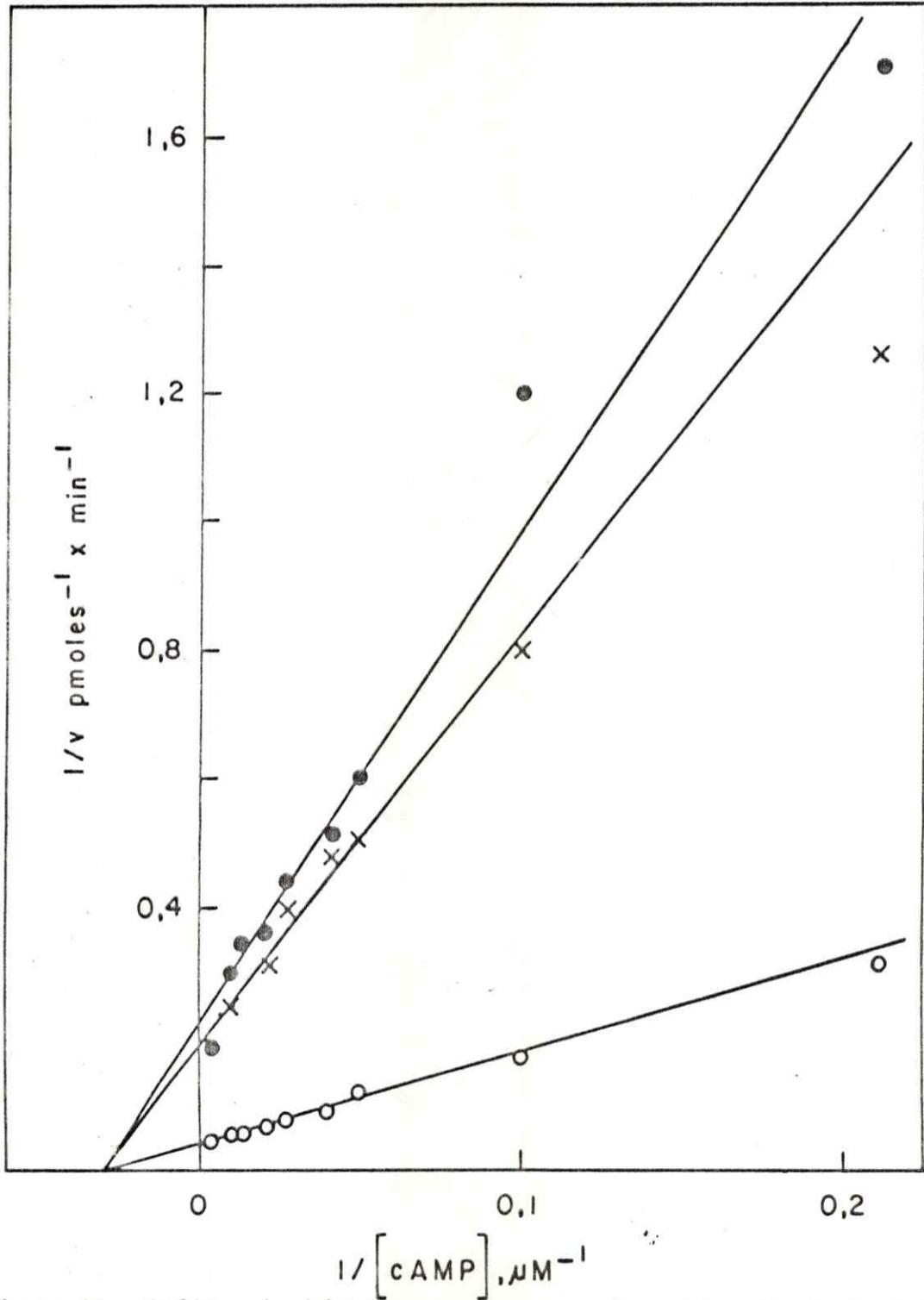


Figura 19. Gráfico de dobles recíprocos para la activación de fosfodiesterasa I por calmodulina y su inhibición por la proteína inhibitoria.

*Figura 19. Gráfico de dobles recíprocos para la activación de fosfodiesterasa I por calmodulina y su inhibición por la proteína inhibitoria.*

La fosfodiesterasa I purificada por cromatografía en columna de CaM-sefarosa (12  $\mu\text{g}$ ) se incubó con [ $^3\text{H}$ ]cAMP cuya concentración varía entre 4,85  $\mu\text{M}$  y 265  $\mu\text{M}$  (a.e.:  $5,2 \times 10^5$  y  $5,5 \times 10^3$  cpm/nmol respectivamente). Una vez detenida la reacción acoplada con fosfodiesterasa de veneno de serpiente, se agrega a todos los tubos cAMP de tal manera que quede una concentración final de  $10^{-3}\text{M}$  del nucleótido cíclico en cada uno de ellos.

Se mide la actividad basal de la fosfodiesterasa I ( $\bullet\text{---}\bullet$ ), su actividad estimulada con calmodulina  $1,8 \times 10^{-8}\text{M}$  ( $\circ\text{---}\circ$ ) y la actividad de la enzima en presencia de calmodulina de cerebro de bovino  $1,8 \times 10^{-8}\text{M}$ , y 50  $\mu\text{g}$  de una preparación de proteína inhibitoria proveniente de una filtración en Sefacril S-200 ( $\text{X}\text{---}\text{X}$ ). La concentración de calmodulina utilizada provoca un 98% de la activación máxima de la enzima. La reacción se inicia mediante la adición de la enzima.

Las rectas representan las líneas de regresión obtenidas por el método del cálculo de los mínimos cuadrados.

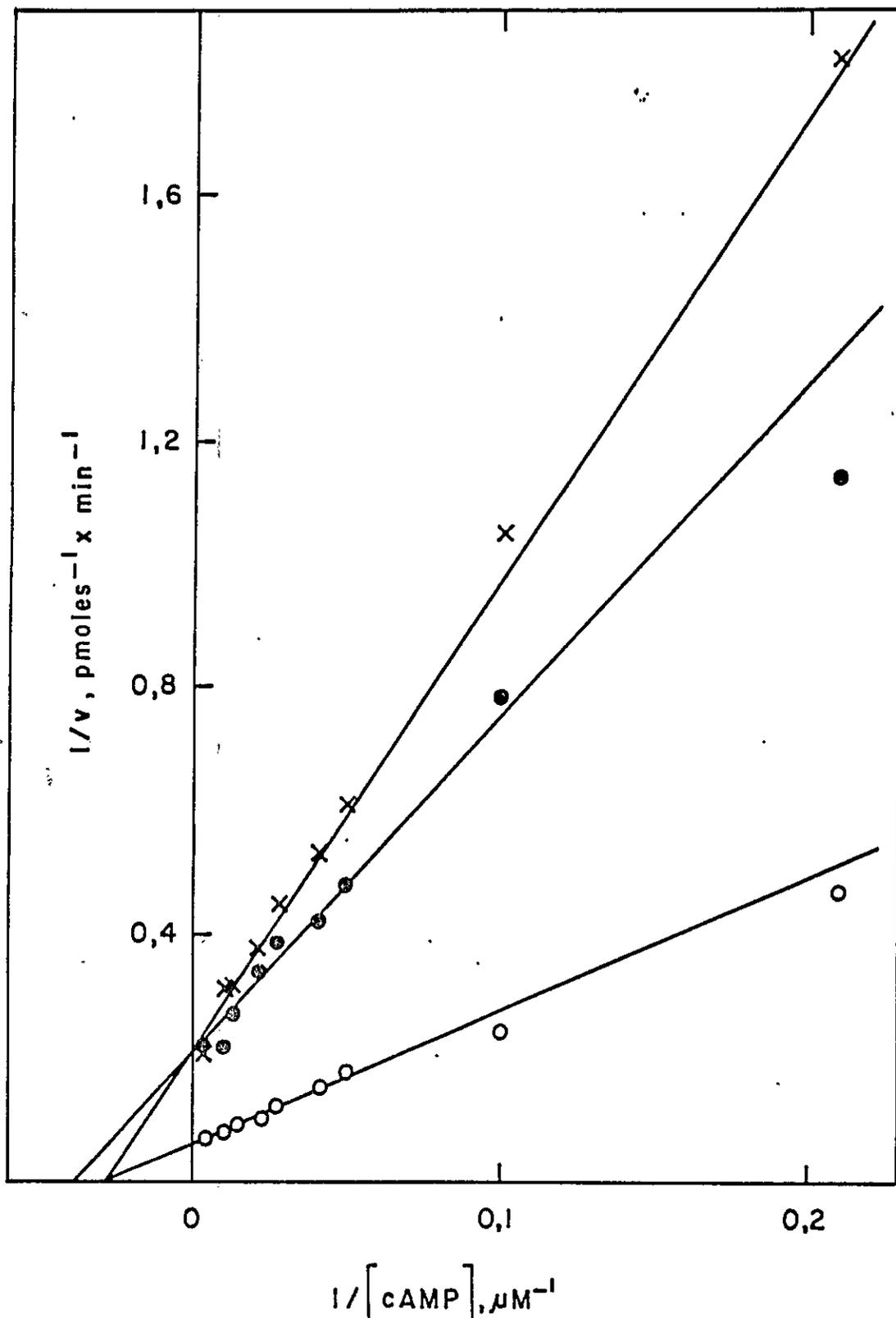


Figura 20. Gráfico de dobles recíprocos para la activación de fosfodiesterasa I por lisofosfatidilcolina y su inhibición por la proteína inhibitoria.

Figura 20. Gráfico de dobles recíprocos para la activación de fosfodiesterasa I por lisofosfatidilcolina y su inhibición por la proteína inhibitoria.

La fosfodiesterasa I purificada por cromatografía en columna de CaM-sefarosa (9,2  $\mu\text{g}$ ) se incubó con [ $^3\text{H}$ ]cAMP cuya concentración varía entre 4,85  $\mu\text{M}$  y 265  $\mu\text{M}$  con una a.e.:  $2,8 \times 10^5$  y  $5,1 \times 10^3$  cpm/nmol para la actividad estimulada, y de  $5,7 \times 10^5$  y  $1,1 \times 10^4$  cpm/nmol para la actividad basal.

Una vez detenida la reacción acoplada con fosfodiesterasa de veneno de serpiente, se agrega a los tubos cAMP, de tal manera que quede una concentración final de  $10^{-3}\text{M}$  de nucleótido cíclico en cada uno de ellos.

Se miden las actividades en ausencia ( $\bullet\text{---}\bullet$ ) o presencia ( $\circ\text{---}\circ$ ) de 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de lisofosfatidilcolina, y en presencia además de 35  $\mu\text{g}$  de una preparación de proteína inhibitoria proveniente de filtración por Sefacril S-200 ( $\text{X}\text{---}\text{X}$ ). La concentración de lisofosfatidilcolina utilizada provoca un 95% de la activación máxima. La reacción se inicia mediante la adición de la enzima.

Las rectas representan las líneas de regresión obtenidas por el método del cálculo de los mínimos cuadrados.

Tabla IX

Efecto de la proteína inhibitoria sobre la constantes cinéticas de la fosfodiesterasa I activada por calmodulina y lisofosfatidilcolina.

Exp. N°	Adición	Km ( $\mu$ M)	Vmax <u>nmoles cAMP hidrolizados</u> min x mg proteína
1	Nada	32,5 - 34,5	0,31 - 0,41
	CaM	31,3 - 34,5	2,08 - 2,24
	CaM+PI	34,5 - 37,0	0,46 - 0,50
2	Nada	26,6 - 27,8	0,54 - 0,54
	LFC	37,3 - 38,5	1,80 - 1,82
	LFC+PI	38,5 - 40,0	0,49 - 0,57

Los valores señalados en esta tabla se calculan de las intercciones de los gráficos de dobles recíprocos de las figuras 19 y 20.

Las concentraciones de calmodulina (CaM), lisofosfatidilcolina (LFC) y proteína inhibitoria (PI) son las señaladas en las leyendas de dichas figuras.

d. Efecto de la preincubación de fosfodiesterasa I con varios componentes que regulan su actividad.

La tabla X muestra que el grado de inhibición varía dependiendo de la combinación de dos de las tres proteínas que están presentes durante el tiempo de preincubación.

Se puede observar que se obtiene un máximo de inhibición cuando la fosfodiesterasa no está presente en la preincubación, así como también cuando se agrega la calmodulina como último componente después de la preincubación. Sin embargo, si la proteína inhibitoria se agrega una vez que la fosfodiesterasa y la calmodulina han tenido oportunidad de interactuar, la inhibición es significativamente menor, alcanzando a ser sólo de un 75%.

Cabe mencionar que una vez establecida la inhibición, ésta permanece constante en el transcurso de la reacción como se puede observar en la figura 21.

Esta figura muestra la curva de progreso de la actividad de la fosfodiesterasa en presencia y en ausencia de calmodulina, y en presencia y en ausencia de la proteína inhibitoria. La rapidez de la reacción de la fosfodiesterasa I activada es constante hasta los 30 minutos, para comenzar a declinar a tiempos mayores, permaneciendo la actividad basal y la inhibida prácticamente iguales y constantes, incluso hasta los 120 minutos de incubación.

Tabla X

Efecto de la preincubación de la fosfodiesterasa I con varios componentes que regulan su actividad.

Preincubación de	Incubación adiciones	Actividad fosfodiesterásica <u>pmoles cMAP hidrolizados</u> min x mg proteína	% inhibición
FDE sola	-	59,7	-
FDE + CaM	-	245,2	-
FDE + CaM	PI	104,9	75,6
FDE + PI	CaM	67,0	96,1
CaM + PI	FDE	62,4	98,5

15  $\mu\text{g}$  de una preparación de fosfodiesterasa I (FDE) proveniente de DEAE-celulosa se activan con calmodulina de cerebro de bovino (CaM)  $2,4 \times 10^{-8}\text{M}$ , activación que es inhibida al agregar 150  $\mu\text{g}$  de una solución de proteína inhibitoria (PI) proveniente de DEAE-celulosa. Luego de 5 minutos de preincubación a  $30^{\circ}\text{C}$ , se adiciona la proteína señalada en la segunda columna, e inmediatamente se inicia la reacción con la adición de [ $^3\text{H}$ ]-cAMP 5  $\mu\text{M}$ .

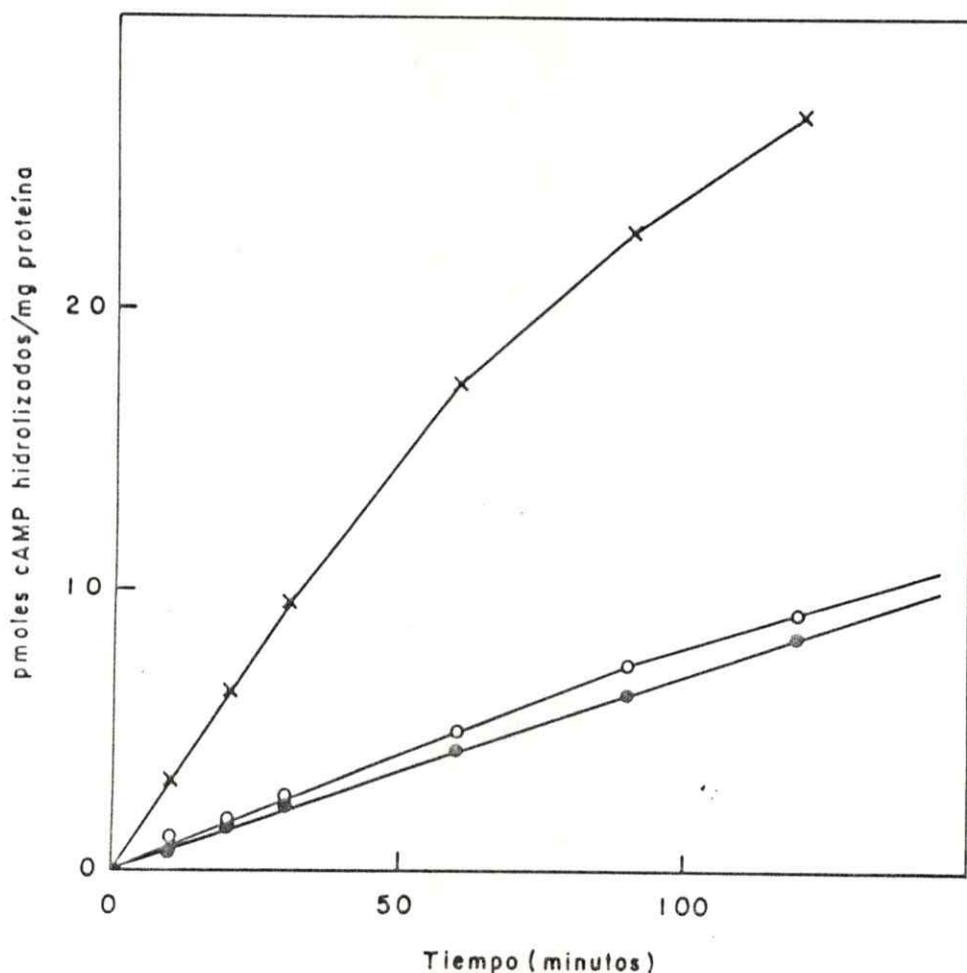


Figura 21. Curva de progreso de la reacción de la fosfodiesterasa.

En la mezcla de reacción descrita en Métodos, se adicionan en todos los casos 130  $\mu\text{g}$  de fosfodiesterasa I proveniente de la cromatografía en DEAE-celulosa, en un volumen final de 1,6 ml. El control no posee ni activador, ni inhibidor ( $\bullet$ — $\bullet$ ), la enzima se activa hasta un 97% de su valor máximo, con calmodulina de cerebro de bovino,  $1,8 \times 10^{-8}\text{M}$  (X—X), y la inhibición se hace en presencia de esta misma concentración de calmodulina y 840  $\mu\text{g}$  de una preparación de proteína inhibitoria proveniente de la cromatografía en DEAE-celulosa (o—o).

A los tiempos indicados, se toman alícuotas de 200  $\mu\text{l}$ , se calientan a  $100^\circ$  por 2 minutos y se procede como se describe en Métodos.

#### 4. Caracterización de la inhibición de fosfodiesterasa I activada por tratamiento con tripsina.

Como se ha dicho antes, un tratamiento controlado con tripsina de la fosfodiesterasa I de ovario de Xenopus laevis provoca un aumento de su actividad. En la tabla VI se mostró que la proteína inhibitoria es capaz de provocar un 50% de inhibición de la fosfodiesterasa I activada por tripsinización. Los experimentos que se detallan a continuación pretenden entregar algunos argumentos para comprender el mecanismo de esta inhibición.

##### a. Influencia del grado de tripsinización de fosfodiesterasa I en su capacidad para ser inhibida por la proteína inhibitoria.

A medida que aumenta la concentración de tripsina, aumenta gradualmente el nivel de activación de la fosfodiesterasa I, pudiendo alcanzarse valores de hasta un 50% superiores a los obtenidos por activación con CaM-Ca<sup>2+</sup> (Orellana, 1983).

La tabla XI muestra que si la fosfodiesterasa I se preincuba con tripsina a una concentración que permite que la enzima alcance un nivel de activación superior al provocado por concentraciones saturantes de calmodulina (50% en este caso), la presencia de la proteína inhibitoria en la incubación no tiene un efecto significativo sobre la actividad estimulada. Sin embargo, si el tratamiento con tripsina provoca una activación de la fosfodiesterasa I equivalente a la obtenida con CaM-Ca<sup>2+</sup>, en este caso, la proteína inhibitoria es capaz de inhibir la activación en un 54%.

Tabla XI

Influencia del grado de tripsinización de fosfodiesterasa I en su capacidad para ser inhibida por la proteína inhibitoria.

Exp. N°	Preincubación	Incubación		Actividad fosfodiesterásica <u>pmoles cAMP hidrolizados</u> min x mg proteína
	Tripsina	CaM	PI	
1	-	-	-	32,6
	-	+	-	151,7
	+	-	-	211,8
	+	-	+	194,5
2	-	-	-	42,1
	-	+	-	178,2
	+	-	-	175,5
	+	-	+	104,2

1,5 mg de una preparación de fosfodiesterasa I proveniente de DEAE-celulosa se preincuba con 3,3,  $\mu\text{g/ml}$  (experimento 1) y 1,2  $\mu\text{g/ml}$  de tripsina (experimento 2) en las condiciones descritas en Métodos.

50  $\mu\text{g}$  de la preparación enzimática, tanto nativa como tratada con ambas concentraciones de tripsina se incuban como se describe en Métodos con cAMP 5  $\mu\text{M}$ . Donde se indica, se agrega calmodulina de cerebro de bovino (CaM),  $3,0 \times 10^{-7}\text{M}$ , y 180  $\mu\text{g}$  de preparación de proteína inhibitoria (PI); proveniente de DEAE-celulosa.

- b. Reversión por calmodulina de la inhibición de la fosfodiesterasa I activada por tripsinización.

Como se ha demostrado previamente, la fosfodiesterasa I activada por tripsina no es susceptible de ser activada adicionalmente por calmodulina, y tampoco se une con este modulador (Orellana y col., 1981).

Sin embargo, en la tabla XII se demuestra que calmodulina es capaz de revertir totalmente la inhibición causada por la proteína inhibitoria de una enzima activada por tratamiento triptico.

- c. Interacción entre fosfodiesterasa parcialmente tripsinizada y proteína inhibitoria.

La inhibición de la fosfodiesterasa I tripsinizada por la proteína inhibitoria, sugiere que se formaría un complejo entre ambas proteínas, de tal modo que la enzima que ha sido activada debido a la remoción de un péptido inhibitorio, por tratamiento con tripsina (Klee, 1980; Lin y Cheung, 1980), al interactuar con la proteína inhibitoria, vuelve a adoptar una configuración que la hace menos activa.

En la figura 22 se muestra el resultado de un experimento que apoya este modelo.

Cuando la fosfodiesterasa I es parcialmente activada con tripsina no se retiene en una columna de afinidad de CaM-sefarosa (Orellana y col., 1981); y al hacer una recromatografía en esta misma columna, no es posible detectar ninguna actividad fosfodiesterásica remanente que eluya al eliminar los iones

Tabla XII

Reversión por calmodulina de la inhibición de fosfodiesterasa I activada por tripsinización.

Incubación	Actividad fosfodiesterásica <u>pmoles cAMP hidrolizados</u> min x mg proteína
Control	272,8
+ PI	186,9
+CaM	281,5
+CaM + PI	279,9

Una preparación de fosfodiesterasa I proveniente de DEAE-celulosa (1,6 mg) se preincuba con 1,5 µg/ml de tripsina en las condiciones descritas en Métodos.

El ensayo enzimático se realiza en presencia de 50 µg de la preparación enzimática tratada con tripsina y [<sup>3</sup>H]cAMP 5 µM. Calmodulina de cerebro de bovino (CaM) 3,0 x 10<sup>-7</sup>M y 360 µg de preparación de proteína inhibitoria (PI) proveniente de DEAE-celulosa, se agrega donde se indica.

El control con enzima sin tripsinizar (50 µg) tiene una actividad basal de 62,0 pmoles cAMP hidrolizados/min x mg proteína.

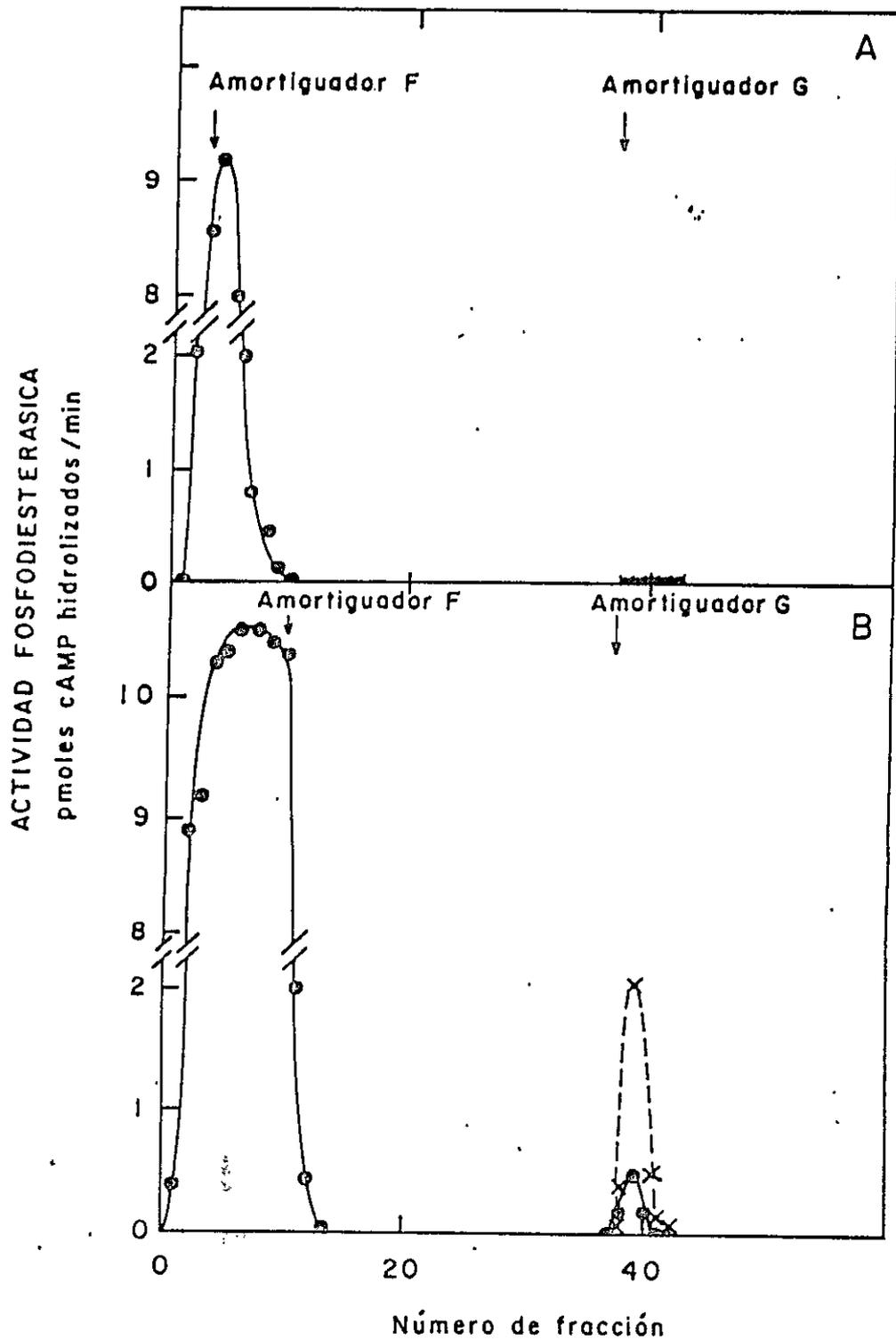


Figura 22. Cromatografía de afinidad de fosfodiesterasa tripsinizada en presencia y ausencia de proteína inhibitoria.

iii

Figura 22. Cromatografía de afinidad de fosfodiesterasa tripsinizada en presencia y ausencia de proteína inhibitoria.

Una preparación de fosfodiesterasa I (3,2 mg) parcialmente tripsinizada, como se describe en Métodos, purificada por cromatografía en columna de CaM-sefarosa, se recromatografía en esta misma columna.

50  $\mu$ l de cada fracción se ensayan en condiciones basales (●—●) y de estimulación con calmodulina  $3,0 \times 10^{-7}M$  (X—X) con una concentración de [ $^3H$ ]cAMP 5  $\mu$ M (A).

6,5 mg de una preparación de proteína inhibitoria purificada por columna de Sefacril S-200, se incuban por 5 minutos a 30° con 5,3 mg de una preparación de fosfodiesterasa I activada por tratamiento con tripsina y purificada por cromatografía en columna de CaM-sefarosa.

100  $\mu$ l de cada fracción se ensayan en condiciones basales (●—●) y de estimulación con calmodulina  $3,0 \times 10^{-7}M$  (X—X) (B).

Las condiciones de adsorción y elución son las indicadas en Métodos.

Ca<sup>2+</sup> con EGTA (figura 22 A).

Una preparación de fosfodiesterasa I activada por tratamiento con tripsina y así purificada, se incubó con una preparación de proteína inhibitoria purificada por filtración en columna de Sefacril S-200. Luego de incubarse por 5 minutos a 30°, esta mezcla de incubación se sometió a una cromatografía en una columna de CaM-sefarosa, obteniéndose el resultado mostrado en la figura 22B. Se puede observar que gran parte de la actividad fosfodiesterásica no es retenida en el gel, sin embargo, es posible recuperar una actividad fosfodiesterásica activable por CaM-Ca<sup>2+</sup> en las fracciones que eluyen con EGTA.

Puesto que tanto la preparación de la enzima tripsinizada como la de proteína inhibitoria han sido purificadas de tal manera que no contengan una actividad fosfodiesterásica dependiente de CaM-Ca<sup>2+</sup> contaminante, la obtención de este tipo de actividad en la elución con EGTA podría indicar la formación de un complejo enzima tripsinizada-proteína inhibitoria.

Cabe hacer notar que la cantidad de enzima tripsinizada que se utiliza en el experimento (A) es un 60% de la utilizada en el experimento (B). La ausencia de un pico de actividad fosfodiesterásica estimulable por CaM-Ca<sup>2+</sup> no puede atribuirse a esta causa ya que, dada la sensibilidad, el método de ensayo habría detectado hasta un 10% de la actividad obtenida en el experimento B.

## DISCUSION

### CALMODULINA DE OVARIO DE XENOPUS LAEVIS COMO AGENTE ACTIVANTE DE FOSFODIESTERASA I

La calmodulina está presente en todos los tejidos de los organismos superiores estudiados. Cheung (1980) propone que para confirmar el papel de la calmodulina en la regulación de una cierta reacción fisiológica, deben cumplirse los siguientes requisitos:

- el tejido o célula debe poseer calmodulina.
- el hecho de retirar la calmodulina del medio, debe alterar la reacción; por lo tanto, el sistema depletado de esta proteína, debería responder a calmodulina exógena.
- al retirar el  $Ca^{2+}$  del medio de reacción, la actividad estimulada por calmodulina debe disminuir al valor de la actividad basal.
- la activación por calmodulina debe ser inhibida por drogas antisicóticas.
- anticuerpos anti-calmodulina deben revertir la activación por este compuesto.

El objetivo principal de esta tesis es el estudio de algunos mecanismos de regulación de la fosfodiesterasa I de ovario. Trabajos en nuestro laboratorio previos a esta tesis, sugerían la presencia de calmodulina en ovario de Xenopus laevis.

Los experimentos mostrados en la primera parte de esta tesis confirman la presencia de calmodulina en ovario y su papel regulatorio

sobre la fosfodiesterasa I, al cumplirse en este sistema algunos de los requisitos propuestos por Cheung.

El método de ensayo utilizado en este trabajo para poner en evidencia la actividad estimulante de la calmodulina, se basa en la capacidad de esta proteína para activar una preparación de fosfodiesterasa I de ovario en una forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Aprovechando el carácter termoestable de la calmodulina, este ensayo es también aplicable a la medición de su actividad en extractos crudos, puesto que el calentamiento de ellos elimina las fosfodiesterasas endógenas.

Luego de haber establecido que los extractos de oocitos y de núcleos de oocitos poseen efectivamente una proteína con propiedades de calmodulina, se ha llevado a cabo una caracterización más detallada de ella, haciendo por una parte una determinación cuantitativa de su concentración en los extractos, y por otra parte sometiéndola a ciertos pasos de purificación y determinando algunas de sus características.

Una manera de determinar cuantitativamente la calmodulina presente en una cierta preparación consiste en medir la activación de la actividad fosfodiesterásica en presencia de cantidades crecientes de esta preparación de calmodulina y comparar el valor de  $[\text{CaM}]_{50}$  obtenido con el de una curva trazada a partir de un experimento realizado con una solución de calmodulina purificada a homogeneidad. Utilizando esta técnica, hemos determinado un contenido de calmodulina de 180 ng/oocito y de 2 ng/núcleo. Estos valores son muy semejantes a los comunicados por Cartaud y col. (1980).

El proceso de purificación utilizado en esta tesis permite

obtener una preparación de calmodulina que presenta un 50% de pureza, cuando se parte de un extracto crudo de ovario.

La etapa de purificación más importante la constituye la cromatografía de afinidad en columna de CAPP-Affigel 10. Esta técnica se basa en la capacidad de la calmodulina para unirse en forma específica, selectiva y reversible a los derivados de fenotiazina en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Levin y Weiss, 1977).

Las proteínas que aún contaminan esta preparación de calmodulina de ovario, son probablemente aquellas que se unen a calmodulina formando un complejo no disociable por fenotiazinas, u otras proteínas que se unen a estas drogas antisicóticas.

Una de las características estudiadas de la calmodulina de ovario, que cumple con los requisitos propuestos por Cheung, es su susceptibilidad para ser antagonizada por ciertas drogas antisicóticas como los derivados de fenotiazina.

En nuestro laboratorio se ha observado que la maduración meiótica es marcadamente inhibida por CAPP 1 mM. Nuestros resultados muestran que la activación de la fosfodiesterasa I tanto por calmodulina de ovario como por calmodulina de cerebro, es totalmente inhibida por concentraciones semejantes de dos drogas antisicóticas, el CAPP y la flufenazina.

A pesar de que se ha descrito que la adenililciclase de ovario es también inhibida por este tipo de drogas, el efecto inhibitorio no requiere de la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , y no se altera por la adición de calmodulina y  $\text{Ca}^{2+}$  (Olate y col., 1983).

Estos resultados muestran que la activación de la fosfodiesterasa

de ovario presenta una respuesta típica tanto a la activación por calmodulina como a la inhibición por drogas antisicóticas. Es de interés hacer notar entonces que otros agentes son también capaces de afectar la activación de fosfodiesterasa I por calmodulina. La melitina, un péptido compuesto por 26 aminoácidos que le confieren un carácter anfifílico a la molécula (Terwilliger y Eisenberg, 1982a), ha sido descrita como un antagonista de calmodulina de cerebro de bovino (Comte y col., 1983). Nuestros resultados muestran que este péptido es capaz de inhibir la acción de la calmodulina extraída de ovario con una curva de concentración semejante a la obtenida en la inhibición de la calmodulina de cerebro.

Cabe hacer notar que las concentraciones de melitina necesarias para inhibir la activación de fosfodiesterasa I son alrededor de 100 veces menores que las concentraciones necesarias de las drogas antisicóticas para producir el mismo efecto. Este hecho podría sugerir que la melitina interactúa con la calmodulina en el mismo sitio en que esta proteína une las enzimas regulables.

Otra de las características estudiadas en esta tesis, para la calmodulina de ovario es la dependencia de su actividad con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . El papel de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el efecto estimulante de calmodulina ha sido exhaustivamente informado para la activación de la fosfodiesterasa de cerebro. Se ha demostrado que la calmodulina de este sistema, al unir dos iones  $\text{Ca}^{2+}$ , sufre un cambio conformacional significativo (Klee, 1977).

El estudio de la activación de fosfodiesterasa I de ovario por calmodulina de este mismo tejido en función de la concentración de

$\text{Ca}^{2+}$ , muestra que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria para alcanzar el 50% de activación de la enzima es de  $0,5 \mu\text{M}$ . Considerando que la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular es de  $0,1 \mu\text{M}$  (ref. en Ozon y col., 1976), la regulación por calmodulina será efectiva, pues el sistema va a responder con gran sensibilidad al aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Este conjunto de resultados nos permiten confirmar la presencia de calmodulina en ovario de Xenopus laevis, siendo las características estudiadas muy semejantes a las de calmodulina de otras especies. Por otra parte, Wasserman y Smith (1981) demostraron también la existencia de este modulador en el mismo sistema. Los estudios de Cartaud y col. (1980) muestran además que la proteína moduladora de oocito posee un contenido de aminoácidos muy semejante al de la calmodulina de cerebro de bovino, existiendo sólo una diferencia en el contenido de residuos serinas.

#### FOSFOLIPIDOS COMO AGENTES ACTIVANTES DE FOSFODIESTERASA I.

En la literatura es posible encontrar una serie de trabajos que demuestran que diferentes lípidos son capaces de estimular la fosfodiesterasa dependiente de  $\text{CaM-Ca}^{2+}$  de varios tejidos, y la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de eritrocito. La fosfodiesterasa sensible a  $\text{CaM-Ca}^{2+}$  de una serie de sistemas presenta diferentes respuestas a la acción de lípidos.

Los resultados obtenidos en esta tesis coinciden con los del resto de la literatura en cuanto a la estimulación de la actividad fosfodiesterásica por lisofosfatidilcolina, activación que se caracteriza por ser independiente de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , a diferencia de la activación por calmodulina (Wolff y Brostrom, 1976; Pichard y Cheung, 1977).

La lisofosfatidiletanolamina es también capaz de activar la enzima en el mismo grado que lo hace lisofosfatidilcolina, en un mismo intervalo de concentraciones; sin embargo el fosfatidilinositol activa sólo en un 70% la actividad basal de la enzima. Este resultado se asemeja más al obtenido con fosfodiesterasa de cerebro de bovino (Pichard y Cheung, 1977) que al de fosfodiesterasa de cerebro de cerdo, enzima que es activada alrededor de un 400% por acción de este fosfolípido (Wolff y Brostrom, 1976).

La enzima de ovario presenta una activación de un 70% con ácido esteárico, no sufriendo mayores modificaciones con los otros ácidos grasos estudiados, a diferencia de las fosfodiesterasas de otros sistemas (Wolff y Brostrom, 1976; Pichard y Cheung, 1977; Hidaka y col., 1978). Estas diferencias podrían deberse al hecho de tratarse de preparaciones enzimáticas totalmente diferentes, o a una posible especificidad de especie.

Las estructuras de las hormonas esteroidales son también de carácter lipídico, y se hizo interesante estudiar el efecto directo de ellas sobre la actividad de fosfodiesterasa I; sin embargo el resultado de este experimento indica que no hay un cambio significativo de la actividad enzimática por acción de este tipo de compuestos.

Se ha informado que la fosfodiesterasa de cerebro de bovino puede ser activada al incubarla en presencia de fosfolipasa C (Pichard y Cheung, 1977), sin embargo la enzima de ovario no es sensible a esta enzima. Esta diferencia podría explicarse por la posible presencia de una actividad proteolítica no identificada, presente en la preparación de fosfolipasa C usada por el grupo de Cheung. Este hecho podría

dar cuenta de la activación experimentada por la enzima de bovino.

La activación de la fosfodiesterasa I de ovario por fosfolípidos podría deberse a la remoción de algún inhibidor de la actividad de esta enzima, por acción de estos compuestos, sin embargo esta explicación parece poco probable dado el alto grado de pureza de la preparación enzimática utilizada (enzima proveniente de la etapa de purificación de la columna de afinidad de CaM-sefarosa; Orellana, 1983). Probablemente la activación obtenida se debe a la interacción específica de los fosfolípidos con una zona inhibitoria de la enzima permitiendo que ésta tome su conformación más activa.

La activación de fosfodiesterasa I por CaM-Ca<sup>2+</sup> y por fosfolípidos comparte algunas características comunes, pero también presenta algunas diferencias. Una de las características más importantes, común a la activación por ambos efectores, es la que se refiere al efecto de ellos en los parámetros cinéticos de la reacción. Los resultados de esta tesis muestran que tanto la calmodulina como los derivados de fosfolípidos provocan un aumento en la velocidad máxima de la reacción, sin alterar en forma significativa la Km aparente. Este resultado podría estar confirmando la hipótesis de un mecanismo de activación semejante para ambos efectores, a pesar de su diferencia en el requerimiento de iones Ca<sup>2+</sup>.

Los resultados muestran que la activación de la fosfodiesterasa I por lisofosfatidilcolina puede ser mayor que la alcanzada por efecto de calmodulina, sin embargo, los efectos activadores de ambos agentes no son aditivos. De esta misma manera, una fosfodiesterasa I activada

por tratamiento controlado con tripsina, no es susceptible a una activación posterior por lisofosfatidilcolina. Estos datos sugieren que la fosfodiesterasa posee en su estructura un sitio común, o dos sitios muy cercanos para interactuar con calmodulina y fosfolípidos. Este o estos sitios estarían ubicados en el péptido inhibitorio postulado para la enzima, el cual es removido por la acción de proteasas. Estos resultados apoyan el modelo planteado en el esquema I.

La activación de la fosfodiesteras I por lisofosfatidilcolina es inhibida por la droga antisicótica flufenazina, en concentraciones semejantes a las que inhiben la reacción activada por calmodulina. Haciendo un cálculo aproximado de la concentración de lisofosfatidilcolina en el ensayo, se puede estimar que ésta es de alrededor de  $2 \times 10^{-5} M$ , valor muy semejante al de la concentración de flufenezina para inhibir la mitad de la activación máxima. Esta inhibición podría explicarse entonces por una interacción directa entre el fosfolípido y el derivado de fenotiazina, hecho que impediría la acción del agente activante sobre la enzima.

Los resultados en otros sistemas enzimáticos apoyan este posible mecanismo de inhibición. La proteína-quinasa C, enzima que es activada por fosfolípidos en presencia de  $Ca^{2+}$ , pero que no es activable por calmodulina, es capaz de ser inhibida por drogas antisicóticas (Mori y col., 1980; Schatzman y col., 1981). Se ha demostrado que esta inhibición es revertida al aumentar la concentración del fosfolípido en el medio de incubación (Schatzman y col., 1981). Este mismo trabajo muestra que fosfatidilserina, un fosfolípido que no afecta la actividad basal de una fosfodiesterasa sensible a  $CaM-Ca^{2+}$ , es capaz de

revertir la inhibición de la enzima provocada por trifluoroperazina.

La fosfodiesterasa I activada por lisofosfatidilcolina no es inhibida por CAPP, otro derivado de fenotiazina que sí actúa sobre la enzima activada por calmodulina. Probablemente este compuesto no puede interactuar eficientemente con el fosfolípido.

INHIBICION DE LA ACTIVACION DE FOSFODIESTERASA I POR UNA PROTEINA INHIBITORIA PRESENTE EN OVARIO DE XENOPUS LAEVIS. POSIBLE MECANISMO DE ACCION.

El hecho de que la fosfodiesterasa I demuestre estar inactiva in vivo (Allende y Allende, 1982), que en extractos de ovario sea escasamente activada por calmodulina y  $Ca^{2+}$  (Echevarría y col., 1981), y la posibilidad de obtener esta actividad estimulable por CaM- $Ca^{2+}$  luego de un fraccionamiento del extracto en una columna de DEAE-celulosa, nos sugirió la posible existencia de un inhibidor presente en los extractos de ovario, que podría estar siendo separado de la enzima por dicho fraccionamiento.

El ensayo utilizado en esta tesis para la determinación de la actividad del inhibidor, consiste en medir la disminución de la actividad de una cierta preparación de fosfodiesterasa activada por calmodulina u otros agentes activantes. Este ensayo impide poner en evidencia la presencia del inhibidor en extractos de ovario, puesto que estos contienen actividad fosfodiesterásica endógena, en cambio es posible identificar la presencia de una actividad inhibitoria en algunas fracciones que eluyen de la columna de DEAE-celulosa. El patrón de elución de la columna muestra que el inhibidor aparece en las fracciones que eluyen a baja concentración salina. La actividad inhibitoria

comienza a aparecer sólo algunas fracciones anteriores al pico de actividad de fosfodiesterasa I; este hecho podría estar enmascarando una cierta cantidad de proteína inhibitoria que coeluye con la enzima.

En esta tesis, se logra obtener una preparación de proteína inhibitoria aparentemente homogénea, utilizando técnicas clásicas de purificación. La etapa de cromatografía de afinidad en columna de CaM-sefarosa es esencial en esta purificación, puesto que el eluido de esta columna con actividad inhibitoria presenta una sola banda en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes.

Los datos obtenidos de la filtración en columnas de Sefacril S-200 y de la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, indican que el inhibidor posee un peso molecular relativo de 94.000, y aparentemente estaría constituido por dos subunidades con un peso molecular aproximado de 44.000.

La naturaleza proteica de este inhibidor se ve confirmada por sus características de termosensibilidad, de ser precipitable por sulfato de amonio, y su susceptibilidad a la acción de proteasas, especialmente quimotripsina.

El hecho que la proteína inhibitoria de ovario tenga un peso molecular relativo de 94.000 y sea termosensible, permite descartar que sea CaM-BP70, una proteína inhibitoria de calmodulina presente en cerebro, termoresistente y de peso molecular 70.000 (Sharma y col., 1978).

Los resultados hasta aquí discutidos constituyen además las primeras pruebas que esta proteína inhibitoria de ovario no es una misma especie molecular que calcineurina, el otro inhibidor proteico descrito

en cerebro, dada sus diferencias en el peso molecular, y principalmente sus diferencias en el contenido de subunidades; puesto que calcineurina está constituida por dos subunidades diferentes, de pesos moleculares 60.000 y 15.000 cada una (Klee y col., 1979a; Sharma y col., 1979).

Además se ha comprobado que el inhibidor de ovario no posee actividad fosfatásica con respecto a Histona H<sub>2</sub>b fosforilada, lo que constituye otra diferencia con calcineurina (Stewart y col., 1982).

Los experimentos realizados con la proteína inhibitoria extraída de ovario han tenido como objeto tratar de comprender el mecanismo de acción de este inhibidor. La inhibición de la actividad de fosfodiesterasa activada por calmodulina podría explicarse por la formación de un complejo entre la proteína moduladora y el inhibidor, de tal manera que se neutraliza el poder activante de la calmodulina sobre la enzima. Una explicación alternativa sería una interacción competitiva en la unión de los dos efectores proteicos a la enzima, excluyéndose mutuamente.

Los resultados de los estudios de especificidad realizados con la proteína inhibitoria de ovario, ayudan a comprender en parte su modo de acción.

En primer lugar la inhibición es específica sobre la actividad estimulada de la fosfodiesterasa I, puesto que la actividad basal de la enzima no se ve afectada por la presencia del inhibidor. Sin embargo, este hecho no descarta que pueda existir una interacción entre la enzima y la proteína inhibitoria, sin que ello se traduzca en un cambio de la actividad basal. La actividad de la fosfodiesterasa II

de ovario, forma enzimática no activable por  $\text{CaM-Ca}^{2+}$ , no es afectada si la incubación se realiza en presencia de la proteína inhibitoria.

El hecho de que la proteína inhibitoria, además de inhibir la activación de la fosfodiesterasa I de ovario, sea capaz de inhibir la activación por calmodulina de la fosfodiesterasa de cerebro de bovino y la de la quinasa de la cadena liviana de la miosina, sugiere que su mecanismo de acción sería a través de una interacción directa con calmodulina. Esta hipótesis se confirma con el resultado de la cromatografía de afinidad de  $\text{CaM}$ -sefarosa de la proteína inhibitoria. Esta proteína es retenida en la columna en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y es eluida de ella al disminuir estos iones, este hecho indica que el inhibidor es capaz de interactuar reversiblemente con calmodulina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Podría suponerse que la proteína inhibitoria se retuviera en esta columna de afinidad por estar unida a otra proteína, que a su vez sería la responsable de interactuar con calmodulina, sin embargo se puede descartar esta posibilidad dado que la preparación de inhibidor que eluye de la columna de  $\text{CaM}$ -sefarosa no presenta proteínas contaminantes en el gel de poliacrilamida.

Otro resultado que apoya la hipótesis de una interacción directa entre la calmodulina y el inhibidor, es el obtenido en el experimento de secuencia de adición de los diferentes componentes proteicos en la reacción. Para obtener un 100% de inhibición, pareciera ser necesaria una interacción entre el activador y el inhibidor, como primera etapa de la reacción; si en primer lugar se produce una interacción de calmodulina con la enzima, la inhibición obtenida es menor. Una posible interpretación de estos resultados, es que la calmodulina tuviera una

mayor afinidad por la proteína inhibitoria que por la fosfodiesterasa, bajo las condiciones del ensayo.

Un resultado semejante se ha obtenido con calcineurina (Wallace y col., 1978), la cual es capaz de formar un complejo con calmodulina, según se ha demostrado por técnicas de filtración en geles y de unión cruzada (Klee y col., 1979a; Wang y Desai, 1977).

Como ya se ha mencionado, algunos lípidos como la lisofosfatidilcolina son capaces de activar la fosfodiesterasa I por un mecanismo semejante al de la calmodulina, supuestamente llevando a la enzima a un estado activado por desplazamiento del péptido inhibitorio.

La proteína inhibitoria es capaz de anular ambas activaciones en forma similar. Cantidades del inhibidor suficiente para revertir la activación por calmodulina, son también capaces de hacer retornar la actividad enzimática de fosfodiesterasa I activada por lisofosfatidilcolina a sus valores basales.

El desplazamiento de la inhibición de la enzima estimulada por calmodulina o por lisofosfatidilcolina por concentraciones mayores de los respectivos agentes activantes, es indicativo de un mecanismo de competencia entre el inhibidor y el agente activante. Este resultado además demuestra que ambas inhibiciones son reversibles.

Tanto calmodulina como lisofosfatidilcolina activan la enzima aumentando la  $V_{max}$  de la reacción. La acción de la proteína inhibitoria frente a ambas activaciones se refleja en una disminución del valor de  $V_{max}$ , resultando un valor semejante al obtenido en la reacción medida en condiciones basales. Este resultado podría sugerir un mecanismo común de inhibición para ambos agentes activantes.

Los datos hasta aquí obtenidos sobre inhibición de la fosfodiesterasa activada por la lisofosfatidilcolina no permiten discernir si el mecanismo de inhibición en esta reacción se debe a una interacción directa entre la proteína inhibitoria y el derivado de fosfolípido impidiendo que éste active la enzima, o a una interacción entre la proteína inhibitoria y la fosfodiesterasa I en un sitio tal de la enzima que impida la acción activante del fosfolípido.

El haber obtenido una reversión de la inhibición de la enzima activada por lisofosfatidilcolina con concentraciones saturantes de calmodulina es un resultado que puede explicarse por ambos mecanismos. Sin embargo el hecho que melitina no sea capaz de inhibir la enzima activada por lisofosfatidilcolina, podría estar apoyando el segundo mecanismo mencionado, ya que posiblemente la melitina, no reconocería el sitio de unión del inhibidor en la enzima.

En el caso de la activación de la proteína-quinasa C por fosfolípidos, ésta es inhibida por melitina, y se ha sugerido que el polipéptido se uniría a la enzima anulando la acción del activador (Kato y col., 1982).

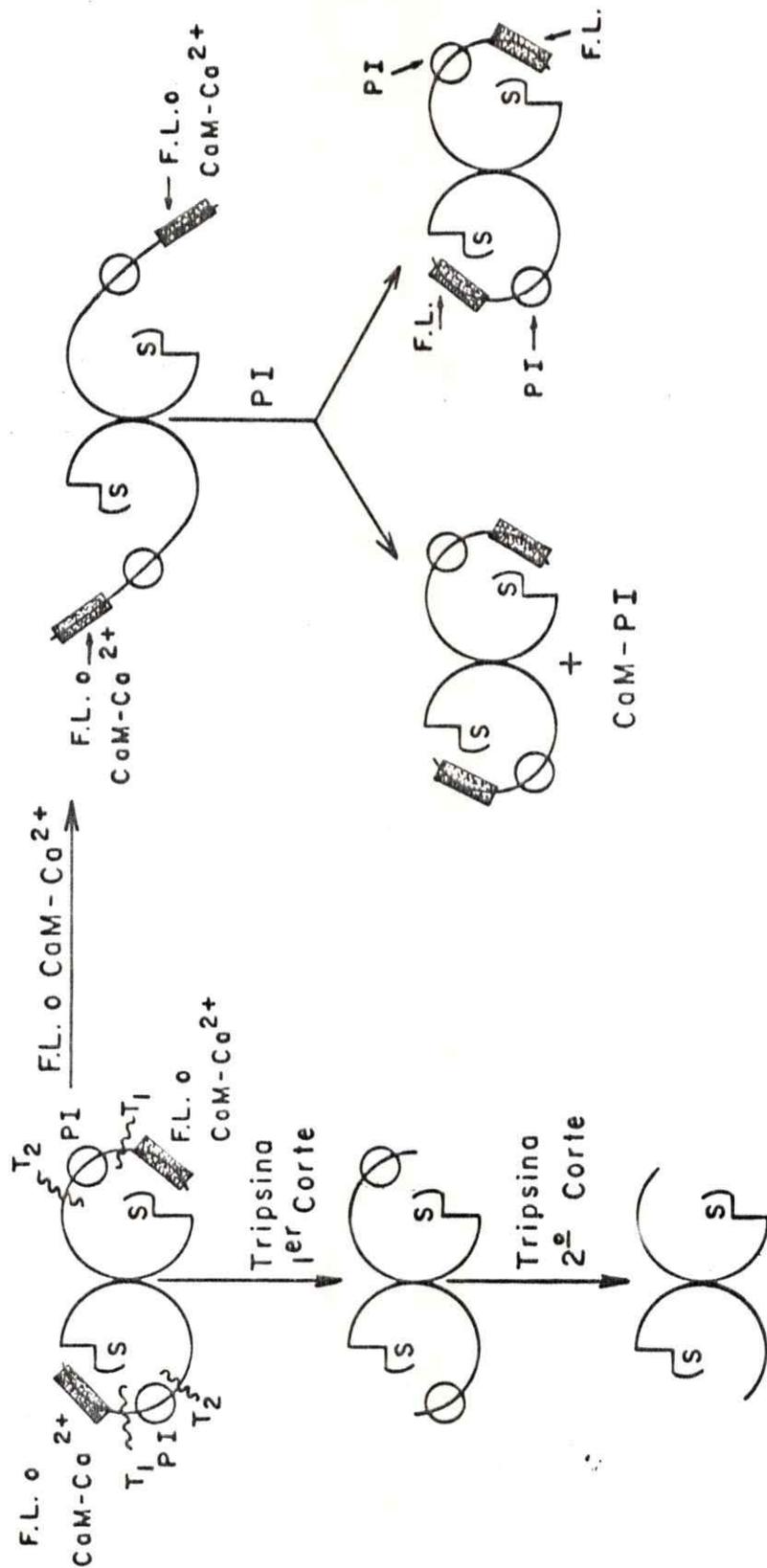
La explicación más simple que da cuenta de la inhibición de la enzima activada por tripsinización por la proteína inhibitoria es una interacción entre ambas proteínas que resulta en un cambio conformacional de la enzima activada, adoptando ésta una configuración con menor actividad enzimática. Esta explicación implica necesariamente que la fosfodiesterasa I debe poseer un sitio de interacción para la proteína inhibitoria, lo que permitiría la formación de un complejo entre ambas proteínas.

Esta hipótesis está apoyada por el resultado obtenido al realizar la cromatografía de una mezcla de fosfodiesterasa I tripsinizada y proteína inhibitoria en una columna de afinidad de CaM-sefarosa. Puesto que la enzima tripsinizada ha perdido el sitio de unión a calmodulina, no es capaz de unirse a CaM-sefarosa (Orellana, 1981), salvo que se una a la proteína inhibitoria que sí posee este sitio, como lo indican los resultados de esta tesis. Por lo tanto la obtención de actividad fosfodiesterásica en las fracciones que eluyen de la columna al suprimir los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , es una indicación que dicho complejo podría formarse. La enzima que eluye en estas fracciones es activable por  $\text{CaM-Ca}^{2+}$ , lo que sugiere que en presencia de calmodulina, el complejo podría disociarse, uniéndose la proteína moduladora con la proteína inhibitoria, recuperándose así la actividad estimulada de la enzima tripsinizada. Esta sugerencia se ve apoyada por el hecho que la presencia de  $\text{CaM-Ca}^{2+}$  en el medio permite la reversión de la inhibición de la enzima activada por tripsina, lo que podría significar que la proteína inhibitoria interactúa con la calmodulina en su sitio de unión, el cual estaría disponible al modulador, aun cuando el inhibidor esté interactuando con la enzima tripsinizada. Otro argumento en favor de esta hipótesis lo constituye el resultado de un experimento no mostrado en esta tesis, en el cual se trató de detectar el complejo enzima tripsinizada- proteína inhibitoria en una columna de Sefacril S-200. En este experimento, las fracciones de la columna que correspondían al peso molecular del complejo, mostraron una cierta actividad fosfodiesterásica que comigraba con una actividad parcial de la proteína inhibitoria.

Se ha mostrado que la fosfodiesterasa I activada por tratamiento con tripsina a un nivel superior al alcanzado por la acción de calmodulina, no es susceptible de ser inhibida por la proteína inhibitoria. Este resultado podría explicarse si se postula que en la enzima existen a lo menos dos sitios de corte de tripsina: al actuar la proteasa en el primer sitio, la enzima se activa a un nivel similar a lo que hace calmodulina, este corte no modificaría el sitio de unión de la proteína inhibitoria a la enzima. Al actuar la tripsina en el segundo sitio, la actividad fosfodiesterásica sobrepasa los valores alcanzados anteriormente, y la secuencia peptídica eliminada contendría el sitio de unión del inhibidor, de tal manera que esta nueva forma enzimática no es susceptible de ser inhibida .

El conjunto de datos presentados puede resumirse en el modelo planteado en el esquema III, en el cual se muestra que la proteína inhibitoria puede, por una parte, inhibir la acción de calmodulina uniéndose a ella, y por otra parte puede interactuar con la fosfodiesterasa I impidiendo así la acción activante de los fosfolípidos, e inhibiendo la enzima activada por tratamiento con tripsina. También están señalados los dos posibles sitios de corte de la tripsina, quedando el sitio de unión postulado para el inhibidor entre los dos cortes.

Los resultados mostrados en esta tesis sugieren que la proteína inhibitoria aislada de ovario es diferente a los inhibidores de calmodulina descritos en otros sistemas, principalmente por los criterios de peso molecular, composición de subunidades, e inhibición de la enzima activada por tratamiento con tripsina. Esta última característica



Esquema III. Mecanismo de activación de la fosfolipasa I por calmodulina, fosfolípidos y tratamiento con tripsina. Efecto de la proteína inhibidora sobre estas activaciones.

Esquema III. *Mecanismo de activación de la fosfodiesterasa I por calmodulina, fosfolípidos y tratamiento con tripsina. Efecto de la proteína inhibitoria sobre estas activaciones.*

S representa al sustrato, CaM a la calmodulina, F.L. al fosfolípido, PI a la proteína inhibitoria. T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> muestran los respectivos sitios de tripsinización.

Las flechas indican la interacción de los agentes reguladores en sus respectivos sitios de unión a la fosfodiesterasa I.

descarta también la posibilidad de que la proteína inhibitoria represente alguna enzima regulada por calmodulina. Por último, a diferencia del sistema de retina, en el cual se ha demostrado que el tratamiento con tripsina de la fosfodiesterasa retira una subunidad inhibitoria, la cual es a su vez capaz de inhibir la enzima tripsinizada (Hurley y Stryer, 1982), los resultados obtenidos con la proteína inhibitoria de ovario sugieren que ésta no correspondería al péptido inhibitorio que es eliminado luego del tratamiento con tripsina. La fosfodiesterasa I nativa posee un peso molecular de 140.000; luego de tratamiento con tripsina, éste se reduce a 90.000 (Orellana y col., 1984), es decir, se elimina uno o más péptidos cuyo peso molecular total es de 50.000, siendo el peso molecular relativo de la proteína inhibitoria de 94.000.

#### CONCLUSIONES Y PROYECCIONES DEL TRABAJO REALIZADO.

Es interesante hacer notar que casi todos los organismos estudiados contienen formas enzimáticas con actividad fosfodiesterásica de nucleótidos cíclicos que difieren ampliamente entre sí en sus propiedades.

Como se ha dicho anteriormente en esta tesis, la regulación de esta actividad enzimática puede ser controlada por los niveles del sustrato, o a través de una modificación de los niveles de la enzima por hormonas o agentes activadores. Los oocitos de anfibio son células particularmente susceptibles de ser analizadas in vivo, y este tipo de estudio ha mostrado claramente el importante papel que juegan los nucleótidos cíclicos en el proceso de maduración meiótica. Es de esperar, entonces, que esta célula no sólo tenga varias actividades

fosfodiesterásicas para cAMP, sino que una de estas enzimas posea una actividad regulable por tres diferentes mecanismos: calmodulina, lípidos y proteólisis.

Sobre la base de los estudios aquí presentados, no es posible asegurar si uno o todos estos mecanismos de activación son efectivos en el oocito intacto. Sin embargo, es posible establecer que cada uno de estos mecanismos de activación es consistente con la fisiología de esta célula. Existe una estrecha relación entre los cambios de los niveles de cAMP con el flujo de  $Ca^{+2}$ , relacionando así la activación por calmodulina de la fosfodiesterasa I con el proceso de maduración.

Además existen pruebas en otros sistemas, como por ejemplo en oocitos de erizo de mar, de que la proteólisis puede desencadenar la maduración de estas células.

Por último, el metabolismo de los fosfolípidos, es también alterado durante la maduración de los oocitos de otros anfibios (Carmen González, comunicación personal). Sin embargo, estos cambios aún no han sido definidos en el sistema de Xenopus laevis.

El papel de los inhibidores protéicos en la regulación de las vías metabólicas es ampliamente generalizado. Sería posible suponer una relación directa entre la proteína inhibitoria descrita en esta tesis, y el estado inactivo de la fosfodiesterasa I in vivo y en extractos crudos de ovario.

Resultados de nuestro laboratorio demuestran que al hacer una cromatografía de un extracto de ovario por una columna de CaM-sefarosa, la fosfodiesterasa I no se une a ella, hecho que sí sucede con una preparación de esta enzima purificada por una columna de DEAE-celulosa.

Sería interesante demostrar que la unión de la enzima a la proteína inhibitoria sería la responsable de este cambio de afinidad.

El inhibidor aislado de oocitos daría cuenta de la supresión de los tres tipos de activaciones descritos para la fosfodiesterasa I, utilizando a lo menos dos mecanismos de acción diferentes.

Al terminar esta tesis, aún quedan problemas interesantes que resolver en este tema, principalmente:

1. Determinar con exactitud los mecanismos de acción de la proteína inhibitoria. Para ello es necesario contar con una preparación masiva y purificada a homogeneidad del inhibidor, de tal manera de tener la posibilidad de introducir en su molécula una marca radiactiva, lo que permitiría visualizar sus interacciones con otras moléculas.

2. Hacer un estudio sistemático de la tripsinización de una preparación de fosfodiesterasa I purificada a homogeneidad, determinando la correlación entre el grado de tripsinización y la susceptibilidad a la inhibición. Asimismo identificar y caracterizar el o los péptidos liberados de la enzima luego del tratamiento con tripsina.

Estos experimentos junto a los señalados en el primer punto indicarían en forma definitiva si existe un sitio de unión en la enzima para la proteína inhibitoria, y su localización.

3. Determinar si la proteína inhibitoria actúa sobre el conjunto de enzimas activables por CaM-Ca<sup>2+</sup>, lípidos y tratamiento con tripsina.

4. Determinar el posible papel fisiológico de la proteína inhibitoria en oocito de Xenopus laevis. Para ello sería necesario medir las posibles variaciones de los niveles de la proteína inhibitoria en los diferentes estados de la oogénesis, así como también durante el

proceso de maduración.

La técnica de microinyección podría facilitar estudios sobre el papel del inhibidor en la célula intacta.

## BIBLIOGRAFIA

- Adelstein, R.S. y Klee, C.B. (1981) Purification and Characterization of Smooth Muscle Myosin Light Chain Kinase. *J.Biol.Chem.* 256, 7501-7509.
- Allende, C.C. y Allende, J.E. (1982) Calmodulin-Dependent Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase of Amphibian Oocytes is Inhibited in vivo. *Biochem.Int.* 5, 91-96.
- Baehr, W., Devlin, M.J. y Applebury, M.L. (1979) Isolation and Characterization of cGMP Phosphodiesterase from Bovine Rod Outer Segments. *J.Biol.Chem.* 254, 11669-11677.
- Baulieu, E., Godeau, F., Schorderet, M. y Schorderet-Slatkine, S. (1978) Steroid-Induced Meiotic Division in Xenopus laevis Oocytes: Surface and Calcium. *Nature* 275, 593-598.
- Bravo, R., Otero, C., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1978) Amphibian Oocyte Maturation and Protein Synthesis: Related Inhibition by Cyclic AMP, Theophylline and Papaverine. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 75, 1242-1246.
- Cartaud, A., Ozon, R., Walsh, M.P., Haiech, J. y Demaille, J.G. (1980) Xenopus laevis Oocyte Calmodulin in the Process of Meiotic Maturation. *J.Biol.Chem.* 255, 9404-9408.
- Cohen, P., Burchell, A., Foulkes, J.G. y Cohen, P.T. (1978) Identification of the Ca<sup>2+</sup>-Dependent Modulator Protein as the Fourth Subunit of Rabbit Skeletal Muscle Phosphorylase Kinase. *FEBS Lett.* 92, 287-293.
- Comte, M., Maulet, Y. y Cox, J.A. (1983) Ca<sup>2+</sup>-Dependent High-Affinity Complex Formation Between Calmodulin and Melittin. *Biochem.J.* 209, 269-272.
- Corbin, J.D. y Reimann, E.M. (1974) Assay of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinases. En "Methods in Enzymology" (Hardman, J.G. y O'Malley, B.W., eds.) vol. 38, 287-382.
- Corbin, J.D., Sugden, P.M., West, L., Flockhart, D.A., Lincoln, T.M. y McCarthy, D. (1978) Studies on the Properties and Mode of Action of the Purified Regulatory Subunit of Bovine Heart cAMP-Dependent Protein Kinase. *J.Biol.Chem.* 253, 3997-4003.
- Cox, J.A., Malnoe, A. y Stein, E.E. (1981) Regulation of Brain Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase by Calmodulin. A Quantitative Analysis. *J.Biol.Chem.* 256, 3218-3222.

- Crouch, T.H. y Klee, C.B. (1980) Positive Cooperative Binding of Calcium to Bovine Brain Calmodulin. *Biochemistry* 19, 3692-3698.
- Crouch, T.H., Holroyde, M.J., Collins, J.H., Solaro, R.J. y Potter, J.D. (1981) Interaction of Calmodulin with Skeletal Muscle Myosin Light Chain Kinase. *Biochemistry* 20, 6318-6325.
- Cheung, W.Y. (1970) Cyclic 3'5'-Nucleotide Phosphodiesterase: Demonstration of an Activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 533-538.
- Cheung, W.Y. (1971) Cyclic 3'5'-Nucleotide Phosphodiesterase. Evidence for and Properties of a Protein Activator. *J. Biol. Chem.* 246, 2859-2869.
- Cheung, W.Y. (1980) Calmodulin Plays a Pivotal Role in Cellular Regulation. *Science* 207, 19-27.
- Cheung, W.Y., Lynch, T.J., Wallace, H.W. y Tallant E.A. (1981) cAMP Renders Ca<sup>2+</sup>-Dependent Phosphodiesterase Refractory to Inhibition by a Calmodulin-Binding Protein (Calcineurin). *J. Biol. Chem.* 256, 4439-4443.
- Davis, B.J. (1964) Disc Electrophoresis: Method and Application to Human Serum Protein. *Ann. NY. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Dabrowska, R., Aromatorio, D., Sherry, J.M.F. y Hartshorne, D.J. (1977) Composition of the Myosin Light Chain Kinase from Chicken Gizzard. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 1263-1272.
- Dedman, J.R., Potter, J.D., Jackson R.L., Johnson, J.D. y Means, A.R. (1977) Physicochemical Properties of Rat Testis Ca<sup>2+</sup>-Dependent Regulator Protein of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* 252, 8415-8422.
- Delville, A., Grandjean, J., Laszlo, P., Gerday, C., Brzeska, H. y Drabikowski, W. (1980) Sodium-23 Nuclear Magnetic Resonance as an Indicator of Sodium Binding to Calmodulin and Tryptic Fragments, in Relation to Calcium Content. *Eur. J. Biochem.* 109, 515-522.
- Dorée, M., Moreau, M. y Guerrier, P. (1978) Hormonal Control of Meiosis. *In vitro* Induced Release of Calcium Ions from the Plasma Membrane in Starfish Oocytes. *Exp. Cell Res.* 115, 251-260.
- Dumler, I. y Etingof, R. (1976) Protein Inhibitor of Cyclic Adenosine 3':5'-Monophosphate Phosphodiesterase in Retina. *Biochim. Biophys. Acta* 429, 474-484.
- Dumont, J.N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). Stages of Oocyte in Laboratory Maintained Animals. *J. Morphol.* 136, 153-180.

- Echeverría, M., Orellana, O., Jedlicki, E., Plaza, M., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1981) Regulation of a Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase from *Xenopus laevis* Ovary by Calmodulin and Calcium. *Biochem. Int.* 2, 539-545.
- Egrie, J.C., Campbell, J.A., Flangas, A.L. y Siegel, F.L. (1977) Regional, Cellular and Subcellular Distribution of Calcium-Activated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase and Calcium-Dependent Regulator in Porcine Brain. *J. Neurochem.* 28, 1207-1213.
- Eschenbruch, M. y Bürk, R. (1982) Experimentally Improved Reliability of Ultrasensitive Silver Staining of Protein in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 125, 96-99.
- Evain, D., Klee, C. y Anderson, W.B. (1979) Chinese Hamster Ovary Cell Population Density Affects Intracellular Concentrations of Calcium-Dependent Regulator and Ability of Regulator to Inhibit Adenylate Cyclase Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3962-3966.
- Fabiato, A. y Fabiato, F. (1979) Calculator Programs for Computing the Composition of the Solutions Containing Multiple Metals and Ligands used for Experiments in Skinned Muscle Cells. *J. Physiol. (Paris)* 75, 463-505.
- Flockhart, D.A. y Corbin, J.D. (1982) Regulatory Mechanisms in the Control of Protein Kinases. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 12, 133-186.
- Frangione, B., Rosenwasser, E., Penefsky, H.S. y Pullman, M.E. (1981) Amino Acid Sequence of the Protein Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7403-7407.
- Friedman, D.L., Johnson, R.A. y Zeilig, C.E. (1976) The Role of Cyclic Nucleotide in the Cell Cycle. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 7, 69-114.
- Giedroc, D.P., Puett, D., Ling, N. y Staros, J.V. (1983) Demonstration by Covalent Cross-linking of a Specific Interaction Between  $\beta$ -Endorphin and Calmodulin. *J. Biol. Chem.* 258, 16-19.
- Gietzen, K., Sadorf, I. y Bader, H. (1982) A Model for the Regulation of the Calmodulin-Dependent Enzymes. Erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport ATPase and Brain Phosphodiesterase by Activators and Inhibitors. *Biochem. J.* 207, 541-548.
- Glass, D.B. y Krebs, E.G. (1980) Protein Phosphorylation Catalyzed by Cyclic AMP-Dependent and Cyclic GMP-Dependent Protein Kinases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 363-388.
- Godeau, J.F., Schorderet-Slatkine, S., Hubert, P. y Baulieu, E. (1978) Induction of Maturation in *Xenopus laevis* Oocytes by a Steroid Linked to a Polymer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2353-2357.

- Gopalakrishna,R. y Anderson,W.B. (1983) Calmodulin Interacts with Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase and Calcineurin by Binding to a Metal Ion-Independent Hydrophobic Region on these Proteins. *J.Biol. Chem.* 258, 2405-2409.
- Grand,R.J. y Perry,S.V. (1979) Calmodulin-Binding Proteins from Brain and Other Tissues. *Biochem.J.* 183, 285-295.
- Hidaka,H., Yamaki,T. y Yamabe,H. (1978) Two Forms of  $Ca^{2+}$ -Dependent Cyclic 3'-5'-Nucleotide Phosphodiesterase from Human Aorta and Effect of Free Fatty Acids. *Arch.Biochem.Biophys.* 187, 315-321.
- Houchon,D., Ozon,R. y Demaille,J.G. (1981) Protein Phosphatase-I is Involved in *Xenopus* Oocyte Maturation. *Nature* 294, 358-359.
- Huang,C.Y., Chau,V., Chock,P.B., Wang,J.H. y Shama,R.K. (1981) Mechanism of Activation of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase: Requirement of the Binding of Four  $Ca^{2+}$  to Calmodulin for Activation. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 78, 871-874.
- Hurley,J.B. y Stryer,L. (1982) Purification and Characterization of the Regulatory Subunit of the Cyclic GMP Phosphodiesterase from Retinal Rod Outer Segments. *J.Biol.Chem.* 257, 11094-11099.
- Itano,T., Itano,R. y Penniston,J.T. (1980) Interactions of Basic Polypeptides and Proteins with Calmodulin. *Biochem.J.* 189, 455-459.
- Jamieson,G.A. y Vanaman,T.C. (1979) Calcium-Dependent Affinity Chromatography of Calmodulin on a Immobilized Phenothiazine. *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 90, 1048-1056.
- Jordana,X., Allende,C.C. y Allende,J.E. (1982) Differential Inhibition by Progesterone of the Adenylate Cyclase of Oocytes and Follicle Cells of *Xenopus laevis*. *FEBS Lett.* 143, 124-128.
- Jordana,X., Olate,J., Allende,C.C. y Allende,J.E. (1984) Studies on the Mechanism of Inhibition of Amphibian Oocyte Adenylate Cyclase by Progesterone. *Arch.Biochem.Biophys.* 228, 379-383.
- Kakiuchi,S. y Yamazaki,R. (1970) Calcium Dependent Phosphodiesterase Activity and its Activating Factor (PAF) from Brain. Studies on Cyclic 3',5'-Nucleotide Phosphodiesterase (III). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 41, 1104-1110.
- Katoh,N., Raynor,R.L., Wise,B.C., Schatzman,C., Turner. R.S., Helfman, O.M., Fain,J.N. y Kuo,J. (1982) Inhibition by Melittin of Phospholipid-Sensitive and Calmodulin-Sensitive  $Ca^{2+}$ -Dependent Protein Kinase. *Biochem.J.* 202, 217-224.
- Klee,C.B. (1977) Conformational Transition Accompanying the Binding of  $Ca^{2+}$  to the Protein Activator of 3'-5'-Cyclic Adenosine Monophosphate Phosphodiesterase. *Biochemistry* 16, 1017-1024.

- Klee, C.B. (1980) Calmodulin: Structure-Function Relationships. Calcium and Cell Function. (W.Y. Cheung ed.) Academic Press N.Y., vol. 1, 59-77.
- Klee, C.B. y Krinks, M.H. (1978) Purification of Cyclic 3':5'-Nucleotide Phosphodiesterase Inhibitory Protein by Affinity Chromatography on Activator Protein Coupled to Sepharose. *Biochemistry* 17, 120-126.
- Klee, C.B. y Vanaman, T.C. (1982) Calmodulin. *Adv. Protein Chem.* 35, 213-321.
- Klee, C.B., Crouch, T.H. y Krinks, M.H. (1979a) Calcineurin: a Calcium- and Calmodulin-Binding Protein of the Nervous System. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6270-6273.
- Klee, C.B., Crouch, T.H. y Krinks, M.H. (1979b) Subunit Structure and Catalytic Properties of Bovine Brain  $Ca^{2+}$ -Dependent Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase. *Biochemistry* 18, 722-729.
- Kofoid, E.C., Knauber, D.C. y Allende, J.E. (1979) Induction of Amphibian Oocyte Maturation by Polyvalent Cations and Alkaline pH in the Absence of Potassium Ions. *Dev. Biol.* 72, 374-380.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227, 680-685.
- LaPorte, D.C., Gidwitz, S., Weber, M.J. y Storm, D.R. (1979) Relationship Between Changes in the Calcium Dependent Regulatory Protein and Adenylate Cyclase During Viral Transformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86, 1169-1177.
- LaPorte, D.C., Wierman, B.M. y Storm, D.R. (1980) Calcium Induced Exposure of a Hydrophobic Surface on Calmodulin. *Biochemistry* 19, 3814-3819.
- Levin, R.M. y Weiss, B. (1977) Binding of Trifluoperazine to the Calcium-Dependent Activator of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase. *Molec. Pharmacol.* 13, 690-697.
- Levin, R.M. y Weiss, B. (1979) Selective Binding of Antipsychotics and other Psychoactive Agents to the Calcium-Dependent Activator of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208, 454-459.
- Lin, Y.M. y Cheung, W.Y. (1980)  $Ca^{2+}$ -Dependent Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase. Calcium and Cell Function (W.Y. Cheung, ed.) Academic Press, N.Y., vol. 1, 79-107.
- Lotersztajn, S. y Pecker, F. (1982) A Membrane-Bound Protein Inhibitor of the High Affinity Ca ATPase in Rat Liver Plasma Membranes. *J. Biol. Chem.* 257, 6638-6641.

- Lowry, O.M., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275.
- Maller, J.L. y Krebs, E.G. (1977) Progesterone-Stimulated Meiotic Cell Division in *Xenopus* Oocytes: Induction by Regulatory Subunit and Inhibition by Catalytic Subunit of Adenosine 3':5'-Monophosphate-Dependent Protein Kinase. *J.Biol.Chem.* 252, 1712-1718.
- Maller, J.L., Butcher, F. y Krebs, E. (1979) Early Effect of Progesterone on Levels of Cyclic Adenosine 3':5'-Monophosphate in *Xenopus* Oocytes. *J.Biol.Chem.* 254, 579-582.
- Manalan, A.S. y Klee, C.B. (1983) Activation of Calcineurin by Limited Proteolysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80, 4291-4295.
- Masui, Y. y Clarke, H.J. (1979) Oocyte Maturation. *Int.Rev.Cytol.* 57, 185-282.
- Masui, Y., Meyerhof, P.G., Miller, M.A. y Wasseman, W.J. (1977) Roles of Divalent Cations in Maturation and Activation of Vertebrate Oocytes. *Differentiation* 9, 49-57.
- Means, A.R. y Dedman, J.R. (1980) Calmodulin, an Intracellular Calcium Receptor. *Nature* 285, 73-78.
- Means, A.R., Tash, J.S. y Chafouleas, J.G. (1982) Physiological Implications of the Presence, Distribution and Regulation of Calmodulin in Eukaryotic Cells. *Physiol.Rev.* 62, 1-30.
- Meijer, L. y Guerrier, P. (1982) Activation of Calmodulin-Dependent NAD<sup>+</sup> Kinase by Trypsin. *Biochim.Biophys.Acta* 702, 143-146.
- Miki, N., Baraban, J.M., Keirns, J.J., Boyce, J.J. y Bitensky, M.W. (1975) Purification and Properties of the Light-Activated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase of Rod Outer Segments. *J.Biol.Chem.* 250, 6320-6327.
- Miot, F. y Erneux, C. (1982) Characterization of the Soluble Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase in *Xenopus laevis* Oocytes. Evidence for a Calmodulin-Dependent Enzyme. *Biochim.Biophys.Acta* 701, 253-259.
- Mori, T., Takai, Y., Minakuchi, R., Yu, B., Nishizuka, Y. (1980) Inhibitory Action of Chlorpromazine, Dibucaine and Other Phospholipid-interacting Drugs on Calcium-activated, Phospholipid-dependent Protein Kinase. *J.Biol.Chem.* 255, 8378-8380.
- Morril, G.A., Schatz, F., Kostellow, A.B. y Poupko, J.M. (1977) Changes in Cyclic AMP Levels in the Amphibian Ovarian Follicle Following Progesterone Induction of Meiotic Maturation. *Differentiation* 8, 97-104.

Morril, M.E., Thompson, S.T. y Stellwagen, E. (1979) Purification of a Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase from Bovine Brain Using Blue Dextran-Sepharose Chromatography. *J. Biol. Chem.* 254, 4371-4374.

Morril, G.A., Ziegler, D.M. y Kostellow, A.B. (1980) Kinetics of Calcium Efflux and Exchange from Rana pipiens Oocytes Immediately Following Reinitiation of the First Meiotic Division: Comparison of Various Meiotic Agonists and Antagonists. *Cell Calcium* 1, 359-370.

Mulner, O., Cartaud, A. y Ozon, R. (1980) Cyclic AMP Phosphodiesterase Activities in Xenopus laevis Oocytes. *Differentiation* 16, 31-39.

Newton, D.L. y Klee, C.B. (1984) CAPP-Calmodulin: a Potent Competitive Inhibitor of Calmodulin Actions. *FEBS Lett.* 165, 269-272.

Niggli, V., Adunyah, E.S. y Carafoli, E. (1981) Acidic Phospholipids, Unsaturated Fatty Acids, and Limited Proteolysis Mimic the Effect of Calmodulin on the Purified Erythrocyte  $Ca^{2+}$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 256, 8588-8592.

Olate, J., Jordana, X., Allende, C.C. y Allende, J. (1983) Inhibition by Phenothiazine Derivatives of the Adenylate Cyclase of Amphibian Oocytes. *Biochem. Pharmacol.* 32, 3227-3232.

Orellana, O. (1983) Estudios Sobre la Activación por Calmodulina y por Proteólisis de una Fosfodiesterasa de Nucleótidos Cíclicos de Ovario de Xenopus laevis. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Orellana, O., Allende, C.C., y Allende, J.E. (1981) Trypsin Activates the Calmodulin Sensitive Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase of Amphibian Oocytes. *Biochem. Int.* 3, 663-668.

Orellana, O., Jedlicki, E., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1984) Properties of a Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase of Amphibian Oocytes that is Activated by Calmodulin and Calcium, by Tryptic Proteolysis and by Phospholipids. *Arch. Biochem. Biophys.* (en prensa).

Ozon, R., Bellé, R., Huchon, D. y Mulner, O. (1979) Roles of Cyclic AMP and Calcium in Maturation of Xenopus laevis Oocytes. *J. Steroid. Biochem.* 11, 709-713.

Ozon, R., Bellé, R., Cartaud, A., Marot, J., Mulnes, O. y Thibier-Fouchet, C. (1976) Mechanism of Action of Progesterone in Amphibian Oocytes. Proceedings of the V International Congress of Endocrinology. Hamburg, vol. I (V.H.T. James, ed.) Excerpta Medica International Congress Series N°402 Endocrinology.

Palfrey, H.C., Schiebler, W. y Greengard, P. (1982) A Major Calmodulin-Binding Protein Common to various Vertebrate Tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3780-3784.

- Piasek, M.T., Lewis, W.P., Johnson, C.L. y Potter, J.D. (1980)  $Ca^{2+}$ -dependent Regulation of Guinea Pig Brain Adenylate Cyclase. *J.Biol.Chem.* 255, 4176-4181.
- Pichard, A. y Cheung, W.Y. (1977) Cyclic 3':5'-Nucleotide Phosphodiesterase-Stimulation of Bovine Brain Cytoplasmic Enzyme by Lysophosphatidylcholine. *J.Biol.Chem.* 252, 4872-4875.
- Putkey, J.A., Ts'ui, K.F., Tanaka, T., Lagacé, L., Stein, J.P., Lai, E.C. y Means, A.R. (1983) Chicken Calmodulin Genes. A Species Comparison of cDNA Sequences and Isolation of a Genomic Clone. *J.Biol.Chem.* 258, 11864-11870.
- Richman, P.G. y Klee, C.B. (1978) Interaction of  $^{125}I$ -Labeled  $Ca^{2+}$ -Dependent Regulator Protein with Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase and its Inhibitory Protein. *J.Biol.Chem.* 253, 6323-6326.
- 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.
- Sakai, T., Hiroko, Y., Tanaka, R., Makino, H. y Kasai, H. (1977) Stimulation of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase from Rat Brain by Activator Protein, Proteolytic Enzymes and a Vitamin E Derivative. *Biochim.Biophys.Acta* 483, 121-134.
- Schatz, F. y Morrill, G.A. (1979) Studies on the Relative Roles of Pituitary and Progesterone in the Induction of Meiotic Maturation in the Amphibian Oocyte. *Differentiation* 13, 89-99.
- Schatzman, R.C., Wise, B.C. y Kuo, J.F. (1981) Phospholipid-sensitive Calcium-dependent Protein Kinase: Inhibition by Antipsychotic Drugs. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 98, 669-676.
- Schorderet-Slatkine, S., Schorderet, M. y Baulieu, E.E. (1976) Initiation of Meiotic Maturation in *Xenopus laevis* Oocytes by Lanthanum. *Nature* 262, 289-290.
- Schorderet-Slatkine, S., Schorderet, M. y Baulieu, E.E. (1977) Progesterone-Induced Meiotic Reinitiation *in vitro* in *Xenopus laevis* Oocytes. A Role for the Displacement of Membrane-Bound Calcium. *Differentiation* 9, 67-76.
- Schorderet-Slatkine, S., Schorderet, M. y Baulieu, E.E. (1982) Cyclic AMP-Mediated Control of Meiosis: Effects of Progesterone, Cholera Toxin, and Membrane-Active Drugs in *Xenopus laevis* Oocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79, 850-854.
- Sellinger-Barnette, M. y Weiss, B. (1982) Interaction of  $\mu$ -Endorphin and Other Opioid Peptides with Calmodulin. *Mol.Pharmacol.* 21, 86-91.

- Sharma,R.K., Wirch,E. y Wang, J.H. (1978) Inhibition of  $Ca^{2+}$ -Activated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Reaction by a Heat-Stable Inhibitor Protein from Bovine Brain. *J.Biol.Chem.* 253, 3575-3580.
- Sharma,R.K., Desai,R., Waisman,D.M. y Wang,J.H. (1979) Purification and Subunit Structure of Bovine Brain Modulator Binding Protein. *J.Biol.Chem.* 254, 4276-4282.
- Sharma,R.K., Wang,T.H., Wirch,E. y Wang,J.H. (1980) Purification and Properties of Bovine Brain Calmodulin-Dependent Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase. *J.Biol.Chem.* 255, 5916-5923.
- Smoake,J.A., Song,S.Y. y Cheung,W.Y. (1974) Cyclic 3':5'-Nucleotide Phosphodiesterase. Distribution and Developmental Changes of the Enzyme and its Protein Activator in Mammalian Tissues and Cells. *Biochim.Biophys.Acta* 341, 402-411.
- Sobue,K., Kanda,K., Adachi,J. y Kakiuchi,S. (1983) Calmodulin-Binding Proteins that Interact with Actin Filaments in a  $Ca^{2+}$ -Dependent Flip-Flop Manner: Survey in Brain and Secretory Tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80, 6868-6871.
- Sobue,K., Muramoto,Y., Fujita,M. y Kakiuchi,S. (1981) Purification of a Calmodulin-Binding Protein from Chicken Gizzard that Interacts with F-Actin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78, 5652-5655.
- Smith,L.D. y Wasserman,W.J. (1979) Non Nuclear Steroid Regulation in Amphibian Oocytes. "Eukaryotic Gene Regulation" ICN-UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology. vol. XIV, 229-238. Academic Press N.Y.
- Speaker,M.G. y Butcher,F.R. (1977) Cyclic Nucleotide Fluctuations During Steroid Induced Maturation of Frog Oocytes. *Nature* 267, 848-850.
- Speaker,M.G., Orlow,S.J., Sturgill,T.W. y Rosen,O.M. (1983) Characterization of a Calmodulin-Binding Protein that is Deficient in Tri-fluoperazine Resistant Variants of the Macrophage-like Cell Line J774. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80, 329-333.
- Stewart,A.A., Ingebritsen,T.S., Manalan,A., Klee,C.B. y Cohen,P.(1982) Discovery of a  $Ca^{2+}$ - and Calmodulin-Dependent Protein Phosphatase. Probable Identity with Calcineurin (CaM-BP<sub>80</sub>). *FEBS Lett.* 137, 80-84.
- Strewler,G.J. y Manganiello,V.C. (1979) Purification and Characterization of Phosphodiesterase Activator from Kidney. A Lysosomal Protease. *J.Biol.Chem.* 254, 11891-11898.
- Takemoto,D.J., Hansen,J., Takemoto,L.J. y Houslay,M.D. (1982) Peptide Mapping of Multiple Forms of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase. *J.Biol.Chem.* 257, 14597-14599.

- Tanaka, T. e Hidaka, H. (1980) Hydrophobic Regions Function in Calmodulin-Enzyme(s) Interactions. *J.Biol.Chem.* 255, 11078-11080.
- Tanaka, T., Naka, M. e Hidaka, H. (1980) Activation of Myosin Light Chain Kinase by Trypsin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 92, 313-318.
- Teo, T.S. y Wang, J.H. (1973) Mechanism of Activation of a Cyclic Adenosine 3':5'-Monophosphate Phosphodiesterase from Bovine Heart by Calcium Ions: Identification of the Protein Activator as a  $Ca^{2+}$ -Binding Protein. *J.Biol.Chem.* 248, 5950-5955.
- Teo, T.S., Wang, T.H. y Wang, J.H. (1973) Purification and Properties of the Protein Activator of bovine Heart Cyclic Adenosine 3':5'-Monophosphate Phosphodiesterase. *J.Biol.Chem.* 248, 588-595.
- Terwilliger, T.C., Eisenberg, D. (1982a) The Structure of Melittin. Structure Determination and Partial Refinement. *J.Biol.Chem.* 257, 6010-6015.
- Terwilliger, T.C. y Eisenberg, D. (1982b) The Structure of Melittin. II. Interpretation of the Structure. *J.Biol.Chem.* 257, 6016-6022.
- Thiry, P., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M., Rate, J. y Christophe, J. (1980) The Activation of Brain Adenylate Cyclase and Brain Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase by Seven Calmodulin Derivatives. *Eur.J. Biochem.* 103, 409-414.
- Thompson, W.J., Brooker, G. y Appleman, M.M. (1974) Assay of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase with Radioactive Substrates. *Methods in Enzymology* (Hardman, J.G. y O'Malley, B.W. ed.) vol. 38, 205-212.
- Tucker, M.M., Robinson, J.B., Jr. y Stellwagen, E. (1981) The Effect of Proteolysis on the Calmodulin Activation of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase. *J.Biol.Chem.* 256, 9051-9058.
- Vanaman, T.C. (1980) Structure, Function, and Evolution of Calmodulin. Calcium and Cell Funtion, vol. 1, 41-58 (W.Y.Cheung, ed.) Academic Press N.Y.
- Wallace, R.W., Lynch, T.J., Tallant, E.A. y Cheung, W.Y. (1978) Purification and Characterization of an Inhibitor Protein of Brain Adenylate Cyclase and Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase. *J.Biol.Chem.* 254, 377-382.
- Walsh, D.A., Ashby, C., González, C., Calkins, D., Fischer, E. y Krebs, E.G. (1971) Purification and Characterization of a Protein Inhibitor of Adenosine 3':5'-Monophosphate-Dependent Protein Kinases. *J.Biol.Chem.* 246, 1977-1985.
- Walsh, K.X., Millikin, D.M., Schlender, K.K. y Reiman, E.M. (1980) Stimulation of Phosphorylase b Kinase by the Calcium-Dependent Regulator. *J.Biol.Chem.* 255, 5036-5042.

- Wang, J.H. y Desai, R. (1977) Modular Binding Protein: Bovine Brain Exhibiting the  $Ca^{2+}$ -Dependent Association with the Protein Modulator of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase. *J.Biol.Chem.* 252, 4175-4184.
- Wang, J.H., Sharma, R.K. y Tam, S.W. (1980) Calmodulin-Binding Proteins. *Calcium and Cell Function*. vol. 1, 305-328 (W.Y.Cheung, ed.) Academic Press N.Y.
- Wang, K.C., Wong, H.Y., Wang, J.H. y Lam, H.P. (1983) A Monoclonal Antibody Showing Cross-reactivity Toward Three Calmodulin-Dependent Enzymes. *J.Biol.Chem.* 258, 12110-12113.
- Wasserman, W.J. y Smith, L.O. (1981) Calmodulin Triggers the Resumption of Meiosis in Amphibian Oocytes. *J.Cell.Biol.* 89, 389-394.
- Wasserman, W., Pinto, L., O'Connor, C. y Smith, D. (1980) Progesterone Induces a Rapid Increase in  $[Ca^{2+}]_{in}$  of *Xenopus laevis* Oocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77, 1534-1536.
- Watterson, D.M., Sharief, F.S. y Vanaman, T.C. (1980) The Complete Amino Acid Sequence of the  $Ca^{2+}$ -Dependent Modulator Protein (Calmodulin) of Bovine Brain. *J.Biol.Chem.* 255, 962-975.
- Weiss, B. y Wallace, T.L. (1980) Mechanisms and Pharmacological Implications of Altering Calmodulin Activity. En "Calcium and Cell Function" (W.Y. Cheung, ed.) Academic Press, N.Y., vol. 1, 329-379.
- Weiss, B., Fertel, R., Figlin, R. y Uzunov, P. (1974) Selective Alteration of the Activity of the Multiple Forms of Adenosine 3':5'-Monophosphate Phosphodiesterase of Rat Cerebrum. *Mol.Pharmacol.* 10, 615-625.
- Weiss, B., Prozialeck, W., Cimino, M., Sellinger-Barnette, M. y Wallace, T.L. (1980) Pharmacological Regulation of Calmodulin. *Ann.NY.Acad.Sci.* 356, 319-345.
- Wells, J.N. y Hardman, G.J. (1977) Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *Adv.Cyclic Nucleotide Res.* 8, 119-143.
- Wolff, D.J. y Brostrom, C.O. (1974) Calcium-Binding Phosphoprotein from Pig Brain: Identification as a Calcium-Dependent Regulator of Brain Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase. *Arch.Biochem.Biophys.* 163, 349-358.
- Wolff, D.J. y Brostrom, C.O. (1976) Calcium-Dependent Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase from Brain: Identification of Phospholipids as Calcium-Dependent Activators. *Arch.Biochem.Biophys.* 173, 720-731.
- Wolff, D.J. y Brostrom, C.O. (1979) Properties and Functions of the Calcium-Dependent Regulator Protein. *Adv.Cyclic Nucleotide Res.* 11, 27-88.

Wray,W., Boulikas,T., Wray,V. y Hancock,R. (1981) Silver Staining of Proteins in Polyacrilamide Gels. *Anal.Biochem.* 118, 197-203.

Yamada,E.W., Huzel,N.J. y Dickison,J.C. (1981) Reversal by Uncouplers of Oxidative Phosphorylation and by  $Ca^{2+}$  of the Inhibition of Mitochondrial ATPase Activity by the ATPase Inhibitor Protein of Rat Skeletal Muscle. *J.Biol.Chem.* 256, 10203-10207.

Yamamoto,K.R. y Alberts,B.M. (1976) Steroid Receptors: Elements for Modulation of Eukaryotic Transcription. *Annu.Rev.Biochem.* 45, 45-746.